

11-15430  
00-00209  
5-01

발간등록번호

11-1543000-002095-01

국내산  
산양유를  
활용한 기능성  
소재개발 및  
이를 활용한  
환자식 개발

최종  
보고서

2018

농림축산식품부

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

국내산 산양유를 활용한 기능성  
소재개발 및 이를 활용한 환자식 개발  
최종보고서

2018. 2. 28.

주관연구기관 / (주)이담

협동연구기관 / (제1협동) 삼육대학교 산학협력단

(제2협동) 경상대학교 산학협력단

(제3협동) 경상대학교 산학협력단

농림축산식품부

## 제 출 문

동원출판인공부 3권 4차

본 보고서는 “국내산 산양유를 활용한 소재개발 및 이를 활용한 환자식의 개발 (개발기간 : 2014. 11. 28 ~ 2017. 11. 27)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 2. 28.

주관연구기관명 : (주) 이담

(대표자) 정희환

협동연구기관명 : (1협동)삼육대학교 산학협력단 (대표자) 서경희

(2,3협동)경상대학교 산학협력단 (대표자) 정종일(인)



주관연구책임자 : 윤승섭

협동연구책임자 : (제1협동) 한경익

(제2협동) 이권재

(제3협동) 김진욱

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	314045-3	해 당 단 계 연 구 기 간	3년	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업				
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	국내산 산양유를 활용한 소재개발 및 이를 활용한 환자식 개발			
	세 부 과 제 명	(주 관) 국내산 산양유를 활용한 기능성 소재개발 및 이를 활용한 환자식 개발 (제1협동) 산양유 단백질 소재 생산 및 제품 가공 적성 연구 (제2협동) 산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤 전달체의 기능성 규명 및 제품 적용 공정 개발 (제3협동) 질환모델을 이용한 산양유 기능성소재의 작용 기전 연구			
연구책임자	윤송섭	해당단계 참 여 연구원 수	총: 44명 내부: 42명 외부: 2명	해당단계 연 구 개 발 비	정부:675,000천원 민간:225,500천원 계:900,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 44명 내부: 42명 외부: 2명	총 연구개발비	정부:675,000천원 민간:225,500천원 계:900,000천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	주 관 기 관 : (주)이담 제1협동기관 : 삼육대학교 산학협력단 제2협동기관 : 경상대학교 산학협력단 제3협동기관 : 경상대학교 산학협력단			참여기업명  (주)이담	
위 탁 연 구	해당사항 없음			연구책임자: 해당사항 없음	
				보고서 면수	

## < 요약 문 >

		D-01
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 산양유 단백질 소재 대량 생산 및 질환별 환자식 생산 기술 개발</li> <li>○ 산양유 단백질 소재 생산 및 제품 가공 적성 연구</li> <li>○ 산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤 전달체의 기능성 규명 및 제품 적용 공정 개발</li> <li>○ 질환모형을 이용한 산양유 기능성소재의 작용 기전 연구</li> </ul>	
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 제1협동기관에서 개발한 산양유 단백질 분해물 (HGMP)과 산양유 단백질 분획물 (A2 <math>\beta</math>-casein)의 대량생산 최적 조건을 확립하였으며, 일반성분 및 물리화학적 특성과 일반세균 및 대장균 등의 미생물학적 검사를 실시하여 제품 품질 규격을 표준화 하였음. 또한, 국내 환자식 시장조사를 통해 특정 질환 및 타겟층을 선정하여 1, 2차년도에 개발된 산양유 단백질 소재(HGMP, A2 <math>\beta</math>-casein)을 포함하여 환자식 3품목을 개발 완료하였음.</li> <li>○ 다양한 상업용 효소 처리를 통해 산양유 단백질을 가수분해시켜 <math>\beta</math>-락토글로부린 및 <math>\alpha_s</math>-케이신이 저감화된 단백질 분해물 소재를 개발하였음. 또한, 산양유로부터 유청 제거 및 염화칼슘 처리를 통해 A2 <math>\beta</math>-케이신 분획이 풍부하게 함유된 소재를 정제하였음. 개발된 소재들의 이화학적 특성 및 제품 가공 적성을 연구하여 개발된 소재들이 소화 흡수에 용이하고 저알러지성 특성이 있으며 기존 사용 중인 단백질 소재들을 대체할 수 있음을 확인하였음. 주관기관에서 대량 생산된 산양유 소재들을 함유한 환자식 3종의 저장성을 평가한 결과 제품 종류별 적정 유통 기간 이상 안정적으로 보존됨을 확인하였음.</li> <li>○ 저온 유도 젤화 기술을 이용하여 산양유 단백질 유래 (산양유 단백질 분해물 및 A2 <math>\beta</math>-casein) 하이드로젤 나노 전달체를 제조 하였고 레스베라트롤과 같은 생리활성물질의 성공적인 포집을 통해 생리활성물질 이용성을 향상시킬 수 있었음. 또한 장 상피세포를 이용한 나노 전달체의 세포 내 독성 평가를 통해 안전성을 규명하였음. 나노 전달체는 질환별 맞춤형 환자식 적용 공정 과정 동안 높은 물리적 안정성을 보였으며, 질환별 맞춤형 환자식 (드링킹 요구르트) 적용 시 물성학적, 관능적 특성을 향상시킬 수 있었음.</li> <li>○ 질환모형을 이용한 산양유 기능성 소재의 작용 기전 연구를 위해 인간의 장상피세포인 Caco-2 cell을 이용하여 3차원 transwell system을 확립하고 단백질 분해물의 상피세포내 흡수를 확인하기 위해 형광물질을 부착하여 상피세포내 흡수를 규명하였음. 동물 실험은 1차로 임신모형을 이용하여 단백질 분해물이 급여가 어미쥐 및 새끼쥐의 성장을 촉진하였으며, 특히 어미쥐의 포유능력을 개선하였음. 2차로 장염유도 생쥐모형을 이용하여 단백질 분해물 및 이를 이용한 나노 전달체가 장염이 유도된 생쥐의 체중감소를 보전하여 장염을 개선하는 효과를 나타냈음.</li> </ul>	

<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 소화, 흡수가 용이하고 모유와 가장 유사한 구조와 특성을 지닌 산양유 단백질 소재를 개발하여 장 기능 발달이 미숙한 유아를 위한 유아식, 임산부 및 수유부의 영양보충을 위한 임신수유부용식품, 급속한 고령 사회로의 전환에 따른 노인 맞춤형 실버 식품, 다양한 질환을 대상으로 한 특수의료용도식품 등 미래 식품산업 대비를 위한 맞춤형 특수용도식품 개발은 관련 산업의 내수시장 확대와 수출 효과를 기대할 수 있음.</li> <li>○ 산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤 전달체 제조를 통한 산양유 소재의 고부가 가치화가 가능하며 산양유 성분을 이용한 전달체에 다양한 생리활성물질을 포집할 수 있어 특수용도식품 (질환별 맞춤형 환자식)을 제조할 수 있기 때문에 기능성 식품소재로서 산양유 성분의 이용성을 극대화 할 수 있음.</li> <li>○ 산양유의 기능성소재를 과학적으로 분석하고 동물질환모델을 이용하여 작용기전을 규명함으로써 특수용도식품으로 이용 가능하도록 함.</li> <li>○ 산양유를 활용한 기능성 소재 개발 및 이를 이용한 특수용도식품 개발 관련 연구는 아직까지 기초단계에 머물러 있어 학문적이나 산업적인 가치가 높을 것으로 생각되며 주관기업에서는 본 연구를 통해 개발된 기술과 기 구축된 생산설비 및 영업망을 통해 환자식을 판매할 예정임.</li> </ul>				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>특수용도식품</p>	<p>산양유 단백질 분해물</p>	<p>A2 β-케이신</p>	<p>하이드로젤 전달체</p>	<p>동물질환모델</p>

## SUMMARY >

		D-02
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Developing the technique of mass production of goat milk protein hydrolysate and EN(enteral nutrition, patient's diet by disease)products.</li> <li>○ Studies on development of functional materials from goat milk protein and their properties</li> <li>○ Studies on the functional properties of goat milk protein hydrolysate based hydrogel delivery system and its food application</li> <li>○ Study on mechanisms of goat milk based functional food material by using animal disease model</li> </ul>	
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ The optimal conditions for mass production of goat milk protein hydrolysate (HGMP) and goat milk protein derivatives (A2 <math>\beta</math>-casein) have been established, and micro-organisms such as general ingredients, physicochemical properties, and Escherichia, General bacteria and E. coli have been tested. In addition, through the domestic patient market research, specific diseases and target groups were selected and 3 items(EN) including the goat milk protein materials (HGMP, A2 <math>\beta</math>-casein) developed in the first and second years were developed.</li> <li>○ We developed the goat milk protein hydrolysate and A2 <math>\beta</math>-casein fraction with enhanced digestibility and better hypoallergenic properties by hydrolysis of <math>\alpha</math>-casein and <math>\beta</math>-lactoglobulin using commercial food-grade proteases and calcium chloride precipitation method, respectively. Moreover, the physicochemical properties of materials were determined by analysis of amino acid composition, solubility, viscosity and emulsifying activity index. The materials are useful as functional food sources which can improve nutrition and health, and food applications may include the development of a formula milk powder and other types of dairy products for infants, the elderly, and convalescent patients, thus replacing cow milk.</li> <li>○ In this study, goat milk protein-based hydrogel nano delivery systems were developed by using cold-induced gelation method. Goat milk protein hydrolysate and A2 <math>\beta</math>-casein were used to produce hydrogel nano delivery systems. Bioactive compounds, such as resveratrol, can be encapsulated in nano delivery systems. Impacts of manufacturing variables on the physicochemical and functional properties of hydrogel nano delivery systems were determined. Nano delivery systems were non-cytotoxic to human epithelial Caco-2 cells. Nano delivery systems had good physical stability during food processing storage while the use of hydrogel nano delivery system enhanced the rheological and sensory properties of medical food (drinking</li> </ul>	

	<p>yogurt).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Human intestine epithelial cell line (Caco-2 cell) was used to mimic 2-D uptake system (transwell system). Goat milk protein hydrolysate developed from this study was tagged with fluorescent (Alex-488). Goat milk protein hydrolysate without or with nano delivery system was uptaken into the intestine epithelial cell system. In animal studies, goat milk protein hydrolysate improved growth and milking performance of maternal rat and increased body weight of pup rat. Furthermore, goat milk protein hydrolysate and its nano particle restored the loss of body weight caused by colitis-induced mouse model. Overall, goat milk protein hydrolysate can be absorbed into intestine and have beneficial effects on pregnancy and patient diet.</li> </ul>				
<p>Expected Contribution</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ The functional materials developed from goat milk protein has improved digestibility and hypoallergenic properties which can be not only useful as food material for infants, the elderly, pregnant women, and convalescent patients, but also induce revitalization of related industry and effect of export improvement.</li> <li>○ This study demonstrated that goat milk protein-based hydrogel nano delivery systems could entrap various bioactive compounds and may enhance the rheological and sensory properties of medical food medical foods. Therefore, goat-milk protein-based hydrogel delivery systems could be useful for the application in medical foods.</li> <li>○ This studies of human intestine epithelial cell system and animal disease model confirmed that goat milk and its derived-compounds (protein hydrolysate) could be used as a functional food or supplement for pregnancy and patient diet</li> <li>○ As the development of functional material using goat milk and the research on the development of special purpose food products is still at the basic stage, it is believed that the research results will be developed through the establishment of the technology for scientific and industrial value. Using the technology developed through this study, the host company will sell the patient meal through the existing production facilities and sales network.</li> </ul>				
<p>Keywords</p>	<p>food for special dietary use</p>	<p>goat milk protein hydrolysate</p>	<p>A2 <math>\beta</math>-casein</p>	<p>hydrogel delivery system</p>	<p>animal disease model</p>

## < Contents >

1. Outline of research .....	1
2. Current technique development trend in internal and external .....	7
3. Contents and results of research .....	10
4. Achievements and contribution to related industry .....	85
5. Practical use and plan for field application .....	89
6. Oversea gathering of information and technology .....	90
7. Security level for results of research .....	90
8. Current condition research facility and equipment registered in NTIS .....	90
9. Results of safety action of laboratory .....	91
10. Representative results of research .....	92
11. Considerations .....	94
12. References .....	94



## < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	1
2. 국내외 기술개발 현황 .....	7
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	10
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	85
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	89
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	90
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	90
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	90
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	91
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	92
11. 기타사항 .....	94
12. 참고문헌 .....	94

<별첨> 자체평가의견서

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

# 1. 연구개발과제의 개요

D-03

## 1-1. 연구개발 목적

- 주관(이담): 산양유 단백질 소재 대량 생산 및 질환별 환자식 생산 기술 개발
- 제1협동(삼육대학교) : 산양유 단백질 소재 생산 및 제품 가공 적성 연구
- 제2협동(경상대학교) : 산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤 전달체의 기능성 규명 및 제품 적용 공정 개발
- 제2협동(경상대학교) : 질환모델을 이용한 산양유 기능성소재의 작용 기전 연구

## 1-2. 연구개발의 필요성

### 가. 특수의료용도등 식품 (환자식)의 개발 필요성 및 국내 시장 현황

- 특수의료용도등식품이란 특수용도식품내 포함되며 정상적으로 식품을 섭취, 소화, 흡수 또는 대사할 수 있는 능력이 제한되거나 손상된 환자 또는 질병이나 임상적 상태로 인하여 일반인과 생리적으로 특별히 다른 영양 요구량을 가진 사람의 식사의 일부 또는 전부를 대신할 목적으로 이들에게 경구 또는 경관급식을 통하여 공급할 수 있도록 제조, 가공된 식품을 말함.
- 특수의료용도등 식품에는 환자용 균형영양식, 당뇨환자용 식품, 신장질환자용 식품, 장질환자용 가수분해 식품, 열량 및 영양공급용 의료용도 식품, 선천성 대사질환자용 식품, 영유아용 특수조제식품, 연하곤란 환자용 점도 증진 식품 등이 포함됨.
- 국내 노인용 특수의료용도등 식품 시장 규모는 정액제 시설의 증가와 영양지원팀의 활동이 활발해져 의약품(경장영양제)은 물론 식품(농후유동식)을 선택하는 병원이 점차 증가되어 2000년대부터 시장이 지속적으로 성장하고 있음. 이중 경장영양제의 경우, 영양보충식과 특수질환식 등 약 350억 시장을 형성하고 있음.

표 1. 국내 경장영양제 생산 회사 및 제품명

분류	영양보충식(250억)					특수질환식(100억)			
	기본식 (standard)	고식이섬유 (fiber)	고단백식 (high protein)	고열량식	경관식 (RTH)	간질환식	신장식	당뇨식	단백질 제한식
대용&매일 (메디웰)	스탠다드	화이버	하이프로틴			헤파틱 포물라			
정식품 (그린비아) 120억	마일드케어	화이버	하이프로틴		TF(켄)	Hepacare	RD, RD plus	DM	
대상 (뉴케어) 80억	구수한맛, 바닐라맛, 딸기맛, 커피맛	화이버	단백식		300(켄)			당뇨식	

KMF 45억	메디푸드 스탠다드	엘디	프로맥스	맥시줄				Medifood Glutrol	듀오칼
에보트 71억	엔슈어	제비티, 엔리치			제비티, 엔슈어			글루서나	
영진약품 30억	이뮤닐란				누트릴란			디아릴란	

- 질환 치료시 병행하는 식이는 의약적 치료와 더불어 매우 중요한 환자 회복 요인 중 하나로서 질환 치료 대상 환자는 부족한 소화기능 뿐만 아니라 소화에 용이한 고영양 환자식이 필요하며 그 수요가 증가하고 있음. 2010년 475억원에서 2012년 630억원으로 급속히 성장하고 있음. 향후 10년 이내 2000억원 시장으로 성장할 것으로 예상됨에 따라 노인성 질환 치료 보조용 고기능성 식품 개발이 필요한 실정임.
- 기존 환자식에 국한되었던 제품이 시니어 푸드 (senior food)로 점차 확대되고 있는 추세이며 다양화를 통하여 여러 가지 용도의 제품이 개발되고 있음. 특히 개호식 관련 개발이 활발하게 진행되고 있음. 시니어식의 경우 주로 죽류가 대부분이며 식품업체(동원, CJ, 대상, 오뚜기 등) 및 외식업체(본죽 등)가 이 시장을 차지하고 있음. 고품질 원료, 웰빙, 기능성 제품수요 확대로 고가의 특화시장이 확대되고 있는 추세임. 따라서 지속적인 수익성 확보를 위해 차별화된 제품군의 신규 시장 개척이 필요함.
- 향후 건강한 시니어세대를 타겟으로 한 실버 식품의 다양화와 지속적 성장세가 전망됨. 환자식에서 개호식으로 점차 범위가 확대되고 발전함에 따라서 개호식과 일반식의 개념이 융합된 다양한 시니어 푸드 제품의 개발이 필요함.



그림 1. 고령화 시대 식품 산업 전망

- 즉, 식사 제한이 필요한 환자용 식품이 쇼핑이나 조리가 곤란해진 고령자를 위한 영양 균형이 잘 잡힌 식사제공 용도로 변화되는 추세이며 부드러운 음식, 영양보충식 등 모두 성장이 지속되리라 판단되며 통신판매, 소매점포 및 대형매장에서 판매 가능한 식품으로 발전할 수 있음.
- 시니어 푸드는 저작, 연하 기능 저하의 심각한 문제 해결과 정상적인 섭식을 유도하는 식

품으로 차별화 전략을 통한 다양한 품목군 제품의 개발 필요성이 대두됨. 특히 맛, 영양 및 저작을 고려한 제품 개발도 필요한 실정.

- 또한 장 기능 발달이 미흡한 유아를 위한 유아식 시장 규모는 연간 약 4,208억원으로 추정되고 있음. 이와 같이 국내 특수의료용도등 식품을 포함한 특수용도식품 시장은 2010년 3,070억 규모의 국내 매출액과 연간 약 1,540만 달러 규모의 수출액을 보유하고 있음.

#### 나. 초고령화 사회를 위한 실버식 (환자식 및 개호식)의 개발 필요성

- 현재 우리나라는 저출산 및 수명 증대로 인해 고령 인구가 증가하여 인구구조가 변화하고 있음. 2000년에 이미 고령화 사회 (aging society)에 진입하였으며 2018년경에는 고령 사회 (aged society), 2026년경에는 초고령사회(super-aged society)에 진입 할 것으로 예상됨. 고령사회로의 전환은 필연적으로 과도한 의료비 지출을 초래하게 되어 노인성 질환들에 대한 예방책과 치료가 필요한 실정임.
- 최근 20년 사이 10.8세 이상 평균 수명이 증가하였으며 과거 1980년에 우리나라 전체 인구 중 65세 이상의 비율이 약 3.8%였지만 2030년경에는 약 24.1%, 75세 이상 인구비율이 약 9.8%를 차지하게 됨. 평균 수명 증가의 원인으로서는 의학의 발달과 의료 시설의 증가, 경제 발달에 따른 생활 수준 증가 등이 있음.

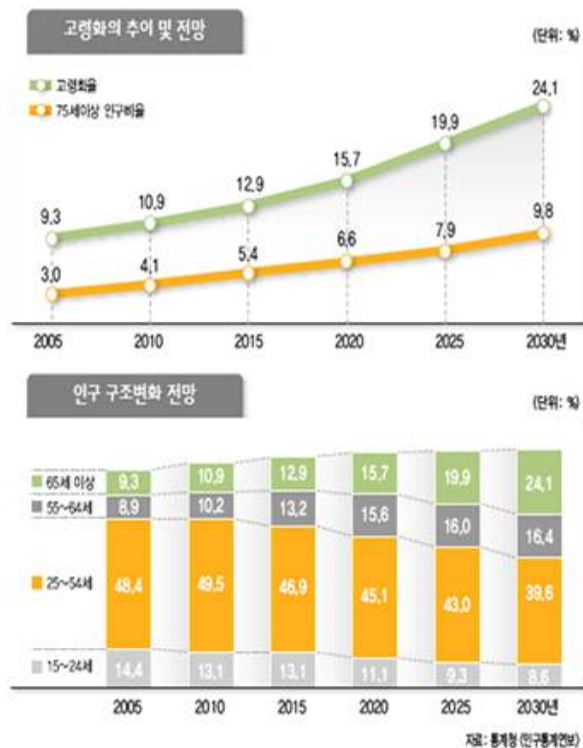


그림 2. 국내 고령화의 추이 및 전망

- 고령인구의 증가로 시니어 관련 사업의 분야별 규모와 다양성도 증가하고 있는 추세임. 앞으로 시니어 산업이 주력시장이 될 것이며 전반적인 소비자 구조를 변화시킬 것으로 예상됨. 50대 이상 시니어 소비 규모는 약 117조원이며 (2010 트렌드 보고서, LG 경제연구원) 55세 이상 가구의 소득은 매년 10%씩 증가 추세에 있음.
- 이제는 노인이 자신의 판단에 의해 직접 물품을 구매하는 소비 주체 세력으로 등장하고 있고 독립된 생활을 즐기려는 경향이 뚜렷함. 특히 장기요양 서비스 및 의료 건강 사업에 정부 뿐 아니라 민간 유료 시설이 늘어나고 있으며 건강식품 사업은 성장 가도에 있음.

**다. 국외(일본) 시니어식 제품 현황**

- 2011년 시니어식 시장은 1,000억엔을 돌파하였으며 유동식, 부드러운 음식, 영양 보충식, 수분 보충식 등 중장기적으로 성장이 지속되고 있음. 기호성과 간편성을 바탕으로 다양한 시니어 세대 관련 제품이 마련되어 있으며 분류체계가 확립되어 있음. 물성 조절 제품군의 경우 연하곤란 정도에 따라 단계별 맞춤형 상품 적용이 가능하도록 세분화되어 있음

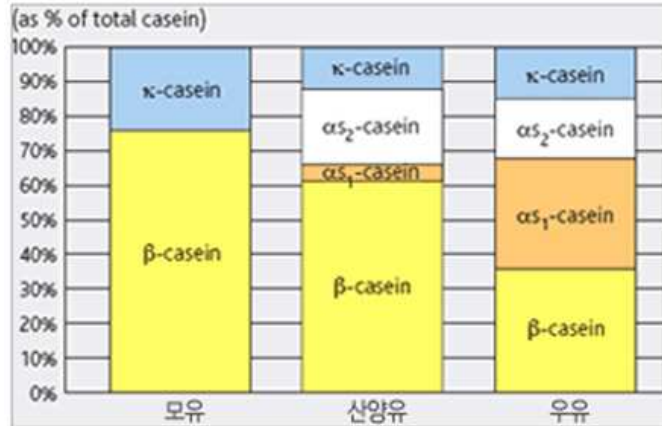
물성 조절		점도 조절	
칼로리 조절		식사대용식	

**라. 산양유의 우수성**

- 산양유는 고유의 건강 증진 기능으로 인해 의약계와 식품 업계로부터 많은 관심을 받아 왔음. 산양유는 젖소유에 비해 총고형분 함량이 높을 뿐만 아니라 단백질, 지방, 미네랄 성분이 다량 함유되어 있고 소화 흡수율이 좋음. 뿐만 아니라 산양유 내 단백질 구성은 모유와 매우 유사하며 특히 α<sub>s1</sub>-casein이 우유에 많은 반면 산양유에는 낮은 비율로 존재함. α<sub>s1</sub>-casein은 위산에 응고되어 단단한 덩어리를 형성하여 소화를 방해하지만 산양유는 모유와 같이 β-casein 함량이 높아 부드러운 커드를 형성하여 소화가 잘됨.

**그림 3. 모유, 산양유, 우유 케이신 단백질 조성 비교**

- 유단백질 중 β-casein은 다양한 유전적 변이체를 가지고 있고 이중 가장 높은 빈도를 차지하는 변이체는 A1과 A2임 (Kaminski et al., 2007). 오랜 기간 논쟁의 소지가 있지만 A1변이체가, 낮은 빈도로 B 변이체를 포함하여, 사람의 질병 발생과 상관성이 있음이 여러 연구들을 통해 밝혀져 왔음 (Swinburn, 2004). 지금까지의 보고에 따르면 A2 β-casein은 제 1형 진성 당뇨병(diabetes mellitus), 허혈성 심장질환 (ischemic heart disease), 정신분열증 (schizophrenia), 자폐증 (autism) 등의 잠재적 병인 요소와는 A1 β



-casein에 비하여 무관한 것으로 알려져 있음.

- 그 이유로 β-케이스인은 총 209개의 아미노산 잔기로 되어 있는데 A1 변이체에서는 67번째 잔기에 histidine을 함유하고 있어 체내 효소 분해작용 등에 의해 β-casomorphin 7 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile)이 파생되는 것으로 알려져 있지만 A2 변이체의 경우 67번째 자리에 proline 잔기를 함유하고 있어 이러한 펩티드가 생산되지 않음. 즉, 오피오이드 (opioid) 펩티드인 β-casomorphin 7이 잠재적 병인성 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있음 (Cade et al., 2000; Laugesen & Elliott, 2003). 산양유와 모유 단백질에는 주로 A2 β-casein으로만 구성되어 있음.
- 모유와 유사한 단백질 구성과 특성을 가지고 있는 산양유 단백질 중 특정 단백질의 분리 정제와 효소로 가수분해된 단백질 분해물 소재 개발은 포괄적 영양 보충 및 소화 흡수가 용이하도록 제조되는 특수 용도 식품 원료로 가치가 높음. 특히, 우유 단백질에 민감하거나 소화가 떨어지는 유아 및 노인들에게 유단백질 분해물을 이용한 고품질의 식품 제조는 고령사회에 접어드는 우리나라에서 알맞은 연구분야라 판단됨.
- 산양은 우리나라 환경에서 사육하기 용이하고 산야초를 주로 이용하여 사료비가 적게 들 뿐 아니라 번식속도 및 쌍둥이 출산율이 높음. 소비자에게 좋은 이미지가 구축되어 있어 다양한 제품군이 생산될 경우 수익성이 보장되고 시장 규모는 점차 확대될 수 있음.
- 현재 산양유를 이용한 분유 생산은 몇몇 나라에서 이루어지고 있지만 국내외적으로 산양유 단백질 소재 제품 생산은 아직 진행되고 있지 않아 본 과제를 통해 개발될 산양유 단백질 소재는 국내 산양유의 고부가 가치화는 물론 특수식 원료 소재의 국가 경쟁력을 제고할 수 있으며 관련 산업의 내수시장 확대와 수출 효과를 기대할 수 있음. 또한, 산양유 단백질 소재는 기능 특성상 다양한 프리미엄제품 (영유아용 조제분유, 특수 영양식 등)에 적용할 수 있는 가능성이 농후하여 최종 제품에 미치는 가격 민감도는 높지 않음.

**(기존제품의 문제점)**

- 기존 생리활성물질 전달체 제조에 사용된 분무건조 (spray drying) 방법은 고온의 열처리 (130~180°C)를 통해 제조되고 기존 특수용도식품의 대부분을 차지하는 레토르트 제품 또한 고온 (121°C)의 열처리가 필요하여 식품 내 열에 민감한 생리활성물질의 활성이 저하

되는 문제점을 지님. 또한 식품 저장과정 중 빛, 산소 등에 대한 안정성이 낮은 생리활성 물질이 소실되는 문제점을 지녀 저온에서 제조되고 생리활성물질을 보다 효과적으로 포집할 수 있는 새로운 전달체의 개발이 필요한 실정임.

- 본 연구에 이용될 소화 흡수가 용이한 고영양의 산양유 단백질은 젖소유에 비해 응집력이 부족하여 기존 산양유를 이용한 유식품 (요구르트, 치즈 등) 제조 시 상당양의 합성 안정제가 이용되었음. 이러한 합성 안정제의 사용은 급증하는 well-being 건강시대 소비자들의 천연 (natural) 기능성 유식품에 대한 NEEDS를 만족시키지 못하는 단점을 지님.

### (본 연구가 해결해야할 과제)

- 일반적으로 특정 소비자 (예, 노인, 유아, 임산부, 수유부, 특정 질환 환자 등)들의 면역기능 증진을 위해 특수용도식품 제조에 첨가되는 생리활성물질 (예, 오메가-3 지방산, 비타민, 항산화 물질 등)의 이용성을 증진시키고 동시에 산양유 단백질 소재 이용성도 확대시킬 수 있는 특수용도식품용 산양유 식품소재 개발이 필요함
- 본 연구에서 제조할 산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤은 특유의 보수력 (water retention capacity) 및 texture modifier 기능으로 인해 기존의 합성 안정제를 대체할 수 있을 것으로 기대되며 안정제로서 하이드로젤의 기능성 규명 연구가 필요한 실정임.

### 1-3. 연구개발 범위

- 주관(이담)
  - 산양유 단백질 분해물 소재의 표준화 및 대량 생산 기술 개발
  - 산양유 A2 β-케이스인 소재의 표준화 및 대량 생산 기술 개발
  - 질환별 환자식 식품의 생산 공정 기술 개발
- 제1협동(삼육대학교)
  - 산양유 β-락토글로부린 및 αs-케이스인을 저감화시킨 단백질 분해물 소재 개발
  - 산양유 단백질에서 A2 β-케이스인을 분리 정제한 분말 소재 개발
  - 산양유 단백질 소재의 특성 및 제품 가공 적성 연구
- 제2협동(경상대학교)
  - 저온 유도젤화 기술을 이용한 산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤 전달체 제조 및 물리화학적 기능성 연구
  - 하이드로젤 전달체의 생리활성물질 이용성 극대화 및 안전성 평가
  - 하이드로젤 전달체의 산양유 유래 질환별 맞춤형 환자식 적용 공정 개발 및 물리적 기능성 연구
- 제3협동(경상대학교)
  - 산양유 단백질 분해물의 장관내 흡수 작용 연구
  - 산양유 기능성 소재의 생체내 작용 기전 연구



## 2. 국내외 기술개발 현황

D-04

- 산양유 (goat milk)은 1903년 처음으로 우리나라에 도입되어 100여년 넘게 사육해 오고 있으며 아직 국내 생산은 영세한 규모로 이루어지고 있으며 집유시설 및 품질기준 등이 미비한 실정임. 하기 표에서 볼 수 있는 바와 같이 국내에서 유산양은 40여 농가에서 5,000마리 정도를 사육하고 있는 것으로 추정되고 있음.

Table 1. Locations of dairy goat farms in Korea

Kangwon		Chungnam		Chungbuk		Kyunggi		Cheonam	
County	Goat farms	County	Goat farms	County	Goat farms	County	Goat farms	County	Goat farms
Hongcheon	5	Keumsan	3	Youngdong	3	Yangju	2	Youngam	5
Uljin	2	Asan	1	Okcheon	3	Pocheon	2	Hampyong	1
Chuncheon	1	Yesan	2	Jincheon	3			Kwangyang	2
Wonju	1			Boeun	1			Haenam	3
								Naju	1
Total	9	Total	6	Total	10	Total	4	Total	12

- 산양유는 모유와 흡사한 조성을 지니고 있으며 소화하기 쉽고 흡수가 용이할 뿐만 아니라 항 알레르기효과, 혈당강하 효과 등 다양한 건강 증진 기능이 입증되면서 식품 업계로부터 많은 관심을 받아 왔음. 특히 산양분유는 아기에게 가장 흡수가 잘되고 장트러블 감소나 아토피 방지 등의 효과가 있는 것으로 알려져 연간 약 4,208억원으로 추정되고 있는 유아식 시장의 점유율도 높아질 것으로 예상되며 일반 유아식과 비교해 최대 2배 정도 높은 가격을 형성하여 매출액 증가와 함께 수익증대가 될 것으로 기대됨. 최근 아이배넷 남양유업 등이 산양유 사업에 참여하는 등 산양유를 이용한 유아식장은 확대되고 있음.
- 유아식시장 뿐 아니라 산양유의 항 알레르기효과, 혈당강하 효과 등이 입증되면서 다양한 형태의 식품으로서 산양유를 찾는 소비자들은 점점 늘어나고 있음. 산양유 제품의 독특한 냄새와 맛에 익숙해지고 있는 경향과 웰빙식품에 대한 관심증가와 더불어 관련 소비시장은 더욱 커질 것으로 기대됨. 특히 포괄적인 영양보충이 필요한 임산부, 수유부를 위한 임산수유부용식품, 급속한 고령 사회로의 전환에 따른 노인 맞춤형 실버 식품, 다양한 질환을 대상으로 한 특수의료용도등식품 등 미래 식품산업 대비를 위한 특수용도식품에 대한 수요가 급격히 증가하고 있는 추세이므로 이러한 흐름에 편승하기 위하여 본 연구기술의 산양유를 활용한 새로운 기능성 소재의 개발과 이를 활용한 맞춤형 특수용도식품 개발이 요구되고 있음.
- 국내 특수용도식품은 2010년 74개 업체에서 연간 약 41,000톤을 생산하고 있으며 국내 출

하액 2800억원, 국외 출하액 1,500만 달러 규모의 시장을 형성하고 있으며 건강에 대한 관심 증대 및 고령화 시대로의 전환에 따라 시장규모는 더욱 커질 것으로 예상되고 있음.

- 산양유 소비에 있어서 가장 오랜 역사와 전통을 가진 나라는 프랑스라고 하며, 현재 약 90만두의 산양을 사육하고 그 가공식품으로는 산양유로 제조한 숙성치즈가 있으며 그 종류가 매우 다양하여 신속숙성치즈인 “Chabichou”, 연성산양치즈인 “Poulligny-St Pierre”, 목장형 연성산양치즈인 “Crottin de Shavinol”, 긴 원통형의 강한 풍미를 가진 “St. Maure” 등이 있음.
- 뉴질랜드는 우리나라를 비롯한 아시아 국가등으로 조제식 산양분유를 수출하고 있으며 그리스는 Feta치즈의 원산국으로 국민 1인당의 연간 소비량이 22kg에 이르는 등의 높은 소비국가로서 EU 국가 중 유방암의 발생비율이 가장 낮음.
- 전통적으로 산양유를 섭취하여 왔던 일부 국가들을 제외하고는 전 세계적으로 산양유의 소비는 그다지 높은 편은 아니며 최근 건강에 대한 관심증대 및 인구 고령화 또는 성인병 증가와 더불어 의료식품으로서의 요구가 높아지고 있어 산양유의 소비시장은 더욱 커질 것으로 예상함.
- 최근들어 인도, 파키스탄, 프랑스, 그리스, 이란, 스페인 등에서 산양유의 생산이 증가되고 있고, 미국에서는 약 1백만 두의 산양이 사육되고 있으며, 1960년대 암과 알러지 예방을 위한 biomedical용으로 소비되기 시작하였다고 하며, 산양유는 주로 분유형태로 제조하여 원조용 물품으로 사용하고 있음. 본격적인 특수용도식품으로서의 시장 확대를 위해서는 산양유 유효성분의 정제, 가공 및 특정질환에서의 메카니즘 및 약효입증 등의 연구를 통해 산양유를 활용한 기능성 소재의 개발이 필요할 것임.
- 전세계적인 바이오메디컬(Biomedical) 시장규모는 2천억달러이며, 의료약품(biopharmaceuticas), 의료 진단(medical devices and equipment) 및 관련 R&D에 고루 분포된 것으로 조사되었음.

Table 2. Size of biomedical industry, 2009.

Industry	Employment	Wages, US\$B	Outputs, US\$B
Biopharmaceuticals	283,700	\$29.0	\$82.4
Medical devices and equipment	409,200	\$26.5	\$66.2
Research, testing and medical labs	526,300	\$40.3	\$64.5
<b>Total biomedical</b>	<b>1,219,200</b>	<b>\$95.9</b>	<b>\$213.2</b>

Sources: Bureau of Labor Statistics, Moody's Analytics, Milken Institute.

- 최근 Leatherhead Food Research 보고서에 따르면, 기능성 식품 또는 음료시장(functional food and market)시장은 일반적인 식품 또는 음료시장은 크게 앞질러 가고 있으며 2003년과 2010년 사이의 세계적인 기능성 식품 및 음료시장은 1.5배 증가하고

14%의 CAGR을 보여주었으며 2010년 \$ 24.2 billion규모를 가지는 것으로 조사되었고 향후 2010년부터 2014년까지 약 세계시장은 22.8% 성장할 것이며 2014년에는 \$ 29.8 billion 까지 도달할 것으로 Leatherhead는 전망하였음.

- 현재까지 특수용도식품으로서의 산양유를 활용한 기능성 소재 개발과 이를 활용한 제품 개발은 미비한 수준인 것으로 파악됨. 개발 도상 국가의 인구증가와 선진국에서의 산양유 요구르트, 산양유 치즈 등 소비 증가에 따라 산양유제품의 건강증진 효과에 관심이 많은 사람들로 인하여 산양유 및 산양유제품 소비는 증가될 것으로 예상되고 특히, 산양유의 기능성 소재의 개발과 이를 활용한 특수용도식품에 관한 연구개발을 활발히 이루어질 것으로 전망됨.
- 산양유를 활용한 기능성 소재 개발은 선진국에서도 개발 초기 단계이고, 이를 활용한 특수용도식품 개발에 관한 연구는 전무한 실정임. 특히 유아, 임산부, 수유부, 노인, 환자 등에 따라 필요한 영양성분 및 생리활성물질이 다르기 때문에 맞춤형 특수용도식품 개발이 필요한 실정임.
- 기존 특수용도식품의 대부분을 차지하는 레토르트 제품은 고온 (121°C)의 열처리가 필요하여 식품 내 열에 민감한 영양성분 및 생리활성물질이 저하될 뿐만 아니라 식품 저장과정 중 빛, 산소 등에 의해 생리활성물질이 소실되는 문제점이 있음. 따라서 특정 소비자 (예, 노인, 유아, 임산부, 수유부, 특정 질환 환자 등)들의 영양 보충, 면역 기능 증진, 질환 개선 효과 등을 위해 특수용도식품 제조에 첨가되는 생리활성물질 (예, 오메가-3 지방산, 비타민, 항산화 물질 등)의 이용성을 증진시키고 동시에 산양유 단백질 소재 이용성도 확대시킬 수 있는 특수용도식품용 산양유 식품소재 개발이 필요함
- 본 연구과제를 통해 개발 될 산양유를 활용한 기능성 소재를 개발하고 과학적인 연구를 통해 기능성을 입증하며 이를 활용하여 특수용도식품을 개발은 다양한 소비자의 NEEDS를 만족시켜 새로운 시장을 개척할 수 있을 것으로 기대됨. 추가적으로 특수용도식품 뿐 아니라 건강보조식품 또는 기능성 식품으로서 다양한 음료, 보조식, 분말, 펠렛, 기타 다양한 제품에 적용될 수 있을 것으로 예상하고 있음.
- 세계적인 기능성 식품 및 의료식품의 시장은 확대되고 있으며 이 시장이 커지면서 새로운 소재발굴에 관련 업계는 고민하고 있음. 종래 유해활성산소를 억제하는 다양한 항산화 식품이 건강기능식품 시장의 대세를 이루고 있으나, 아직 민간요법에 쓰이는 각종 천연추출물에 그치고 있으며 과학적인 효과 규명이 부족한 실정임. 본 기술의 연구개발을 통하여 새로운 제형의 기능성 소재를 개발하여 업계에서 필요로 하는 기술을 공급할 수 있을 것임.
- 우리나라의 빠른 속도의 고령화 인구증가 및 경제수준 향상 등으로 건강기능식품에 대한

수요는 증가할 것으로 예상되며 특히 맞춤형 특수용도식품에 대한 요구가 증가될 것으로 예상됨. 이러한 시장수요에 따라 새로운 식품 소재 개발 및 과학적인 효과 규명을 통해 맞춤형 특수용도식품을 개발한 후 글로벌 시장을 향한 적극적인 마케팅을 통하여 본 기술의 사업화가 확대될 수 있을 것으로 기대함.

### 3. 연구수행 내용 및 결과

[주관 : 이담]

#### ○ 효소 처리에 의한 산양유 단백질 가수분해물의 대량생산 공정 확립 및 조건 설정

제1 협동기관에서 설정된 최적 효소 반응조건을 사용하여 대량생산을 위한 기본 공정을 설계하고, 대량 생산을 위한 최적 조건을 설정하여 산양유 단백질 가수분해물 (HGMP)를 생산한 후 생산 수율을 조사하였다. 또한, 생산 단계별 단백질 소재의 특성을 조사하여 품질 개선을 위한 공정을 확립하고, 저장안정성을 확보하였다. 가수분해물을 최대로 회수할 수 있는 공정을 확립하기 위해 농축 및 건조 조건을 달리하여 5회에 걸쳐 반복 실험한 결과 약 76.2%의 생산 수율이 확인되었고, 최대의 생산 수율을 얻을 수 있는 조건을 확립하였다(표 1). 특히, 효소 가수분해시 생성되는 침전물을 제거하고 시제품의 용해도 개선을 위해 효소 처리 가수분해물의 pH를 8로 조정후 다시 7로 조정하였으며 그 결과 우수한 생산 수율과 용해도를 갖게 되었다. 생산된 시제품은 그림 1과 같다.

표 1. 산양유 단백질 가수분해물의 최적 생산 수율 조건 (산양유 5톤 기준)

공정 단계	처리 조건
탈지시 원심분리	8,000 rpm 3시간 원심분리, 규격(Brix 9.1, T/S 8.4%)
효소처리	Alcalase 0.4%, 30분 처리; Neutrase 0.05% 10분 처리
pH 조정	가수분해물 용액을 pH 8로 조정한 다음 다시 pH 7로 조정
농축	90℃, 3시간
분무건조	급기온도 195℃, 배풍온도 95℃, 807 rpm 4시간 분무건조



**그림 1.** Alcalase 및 neutrase 처리에 의해 대량생산된 산양유 단백질의 가수분해물(HGMP)

생산된 소재의 분자량 분포와  $\alpha$ -케이신 및  $\beta$ -락토글로부린에 대한 저감화도를 조사하기 위해 RP-HPLC와 SDS-PAGE를 수행하였다. 산양원유 단백질 (red line)과 비교할 때 산양유 단백질 가수분해물 (green line)에서  $\alpha$ -케이신 및  $\beta$ -락토글로부린의 저감화 양상이 확인되었고 (그림 2A), 분말의 전기영동시  $\alpha$ -케이신의 밴드 농도가 흐려지고  $\beta$ -락토글로부린의 밴드가 상당량 사라지는 것을 보았을 때  $\alpha$ -케이신 및  $\beta$ -락토글로부린이 선택적으로 저감화되었음을 확인할 수 있었다 (그림 2B). 밴드 농도를 기준으로 한 저감화도를 측정된 결과  $\alpha$ -케이신은 약 30% 이상,  $\beta$ -락토글로부린은 약 75% 이상 저감화되었다. 이러한 수치는 소재가 사용될 제품의 특성에 알맞게 효소 처리 시간의 연장으로 다소 조정가능하며 목적하는 단백질 이외에 다른 산양유 단백질들의 불필요한 가수분해를 방지하지는 면에서 본 연구의 저감화 정도는 적절하다고 판단된다. 또한 O-phthaldialdehyde (OPA), Free amino nitrogen (FAN), Non protein nitrogen (NPN) 방법을 이용하여 생산된 소재의 가수분해율을 조사하였고, 산양원유와 비교할 때 OPA 기법 측정시 약 11.2%의 가수분해도를 보였으며, FAN 측정시 70.11 mg/L, NPN 측정시 2.35 mg/ml의 수치가 측정되어 효소처리에 의해 단백질에 변화가 있었음을 확인할 수 있었다 (표 2).

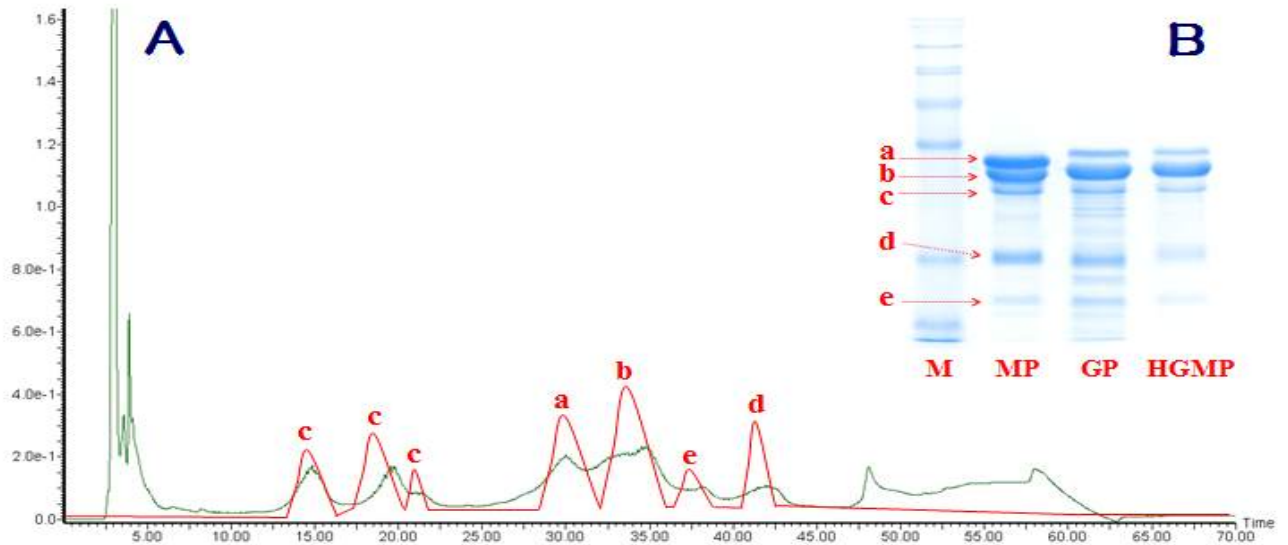


그림 2. 산양원유 및 산양유 단백질 가수분해물의 가수분해 양상. 산양원유 (red line), 산양유 단백질 가수분해물 (green line). RP-HPLC (A), SDS-PAGE (B). 단백질 분자량 마커 (M), 젖소유 단백질 (MP), 산양유 단백질 (GP), 산양유 단백질 가수분해물 (HGMP). as-케이스인 (a), β-케이스인 (b), κ-케이스인 (c), β-락토글로부린 (d), α-락트알부민 (e).

표 2. 산양유 단백질 가수분해물의 가수분해도 측정

가수분해도 측정 방법	산양원유	산양유 단백질 가수분해물	변화량
O-phthaldialdehyde (%)	0.48	11.69	11.21
Free amino nitrogen (mg/L)	116.28	186.39	70.11
Non protein nitrogen (mg/ml)	0.21	2.56	2.35

### ○ 생산된 분말 소재의 품질 기준 설정 및 표준화

대량 생산된 소재의 품질 기준 설정 및 표준화를 위해 기본적인 관능특성, 일반성분 및 물리화학적 특성과 미생물 잔존여부를 조사하였다 (표 3과 4). 일반성분은 AOAC법 (1984)에 따라 수분은 상압가열 건조법, 회분은 건식회화법, 조단백질은 켈달법을 사용하였고, pH는 시료 (10%)를 증류수에 용해시킨 후 측정하였다. 미생물의 잔존 검사를 위해 일반세균은 SPCA배지, 대장균은 EMB배지를 사용하였고, 효모와 곰팡이는 PDA배지를 사용하여 수행한 결과 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* 등의 유해균은 검출되지 않았으며 기타 미생물 검사 또한 문제없이 제품화시킬 수 있는 수준이었다.

표 3. 산양유 단백질 가수분해물의 관능적 특성

검사 항목	결과
Colour	Bright white
Odour & Taste	Typical of goat milk taste
Origin	Powder

표 4. 산양유 단백질 가수분해물의 일반성분, 물리화학적 특성 및 미생물 검사

검사 항목	결과
pH (10% solution)	6.9 ~ 7.0
Proteins	32.54 % min
Fat	1.9 % max
Lactose	50.36 % min
Moisture	5.0 %
Sodium	0.6 ~ 0.7 %
SNF	90.62
Solubility (ADMI)	99 %
Scorched particles (ADMI)	DISC A (typical), DISC B (max)
Standard plate count	20,000 cfu/g max
Coliforms	Negative
<i>Escherichia coil</i>	None detected/g
Thermophiles	5,000 cfu/g max
Yeasts and moulds	100 cfu/g max
<i>Staphylococcus aureus</i>	None detected/g
<i>Salmonella</i>	Negative

#### ○ 산양유 단백질, A2 β-케이신 분획의 대량생산 공정 확립 및 조건 설정

제1협동기관에서 설정된 최적의 산양유단백질의 등전점 조정 및 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여 저온분리법으로 대량생산을 위한 기본 공정을 개발하고, 대량 생산을 위한 분말화의 최적 조건을 설정하여, 산양유로부터 분리정제한 A2 β-케이신 농축액을 분무건조한 후에 생산 수율을 조사하였다. 또한, 생산 단계별 A2 β-케이신 함량을 추적하여 품질 개선 및 수율 증가를 위한 공정을 확립하였다(UF Filtration Method의 대량생산의 공정으로의 문제점이 확인됨). A2 β-케이신의 순도와 함량을 최대로 회수할 수 있는 공정을 확립하기 위해 분획(pH를 조정하여 유청단백질 분리) 및 0.05M의 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여 저온분리법(7도에서 48시간 정치)으로 as-케이신 분획을 제거하고, 분리정제를 진행한 결과, A2 β-케이신 분획이 약 90.1%의 생산 회수율로 확인되었고, 이때 A2 β-케이신 순도는 약 85%로 확인되었다. 단, 유아용 조제분유 소재로의 유효성으로 인하여 잔존하는 κ-케이신은 제거하지 않았다(약 15% 함유).

본 실험의 결과로 높은 순도의 A2 β-케이신을 최대의 생산 수율로 얻을 수 있는 조건을 확립하였으며(그림 1). 특히, Pilot공정을 large-scale up 과정에서 공정 step을 최소화하였고, 그 결과 대량생산을 위한 간편한 분리공정과 분무건조 공정을 확립/표준화 하였다.

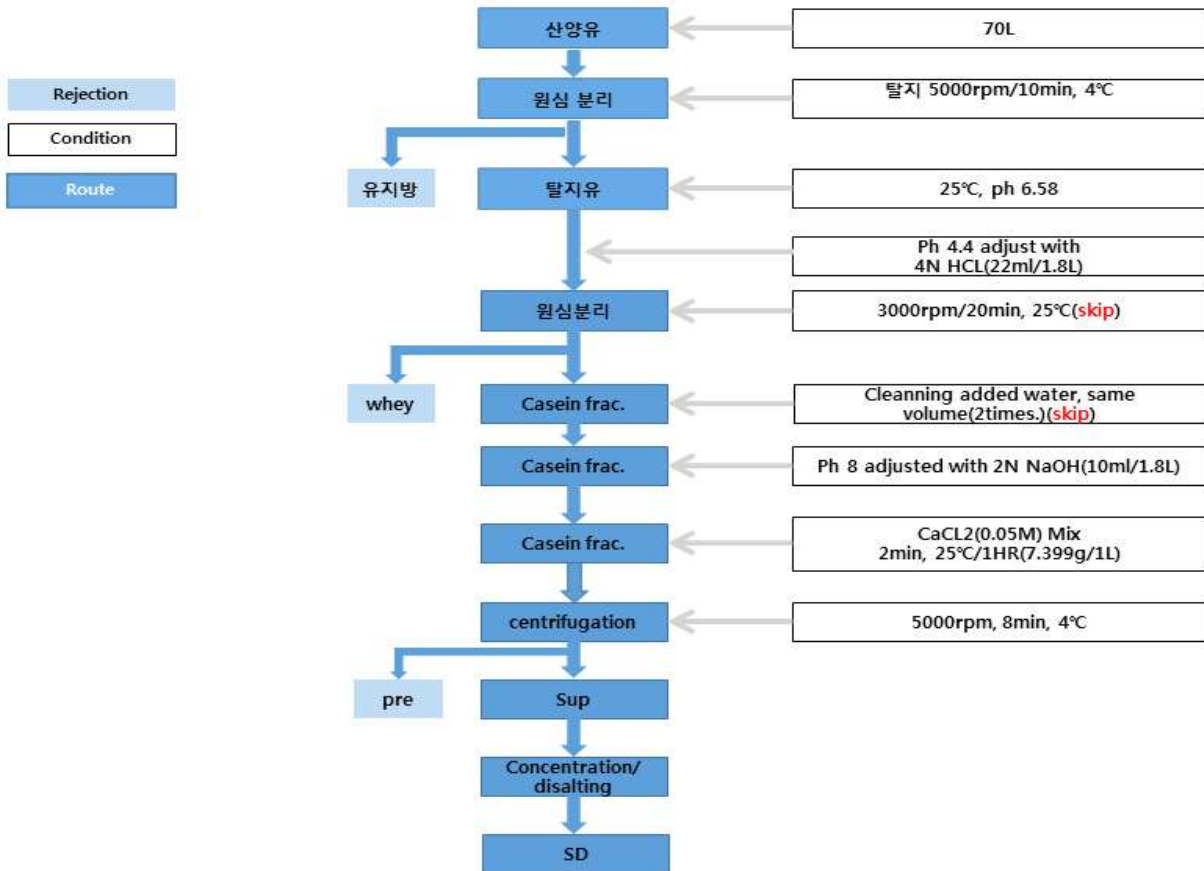


그림 3. Purification flow of A2  $\beta$ -casein enriched fraction from goat milk.

### ○ pH 조정, 저온분리 및 $\text{CaCl}_2$ 처리

산양유 단백질 분획물(A2  $\beta$ -케이스인 분획) 소재의 생산 표준화를 진행하면서 탈지유의 등전점을 pH 4.4로 진행할 때 침전이 가장 높은 것으로 확인되고, 유청의 분리가 가장 양호한 결과를 보였다. 제1 협동기관에서 설정한 조건으로 진행하는 경우 pH 4.4 조정 이후 원심분리 및 현탁과정을 통해 유청 단백질을 완벽하게 분리해내는 세척공정의 필요성이 제기되었으나, 현장 적용 실험인 large-scale up 과정에서 확인한 결과 7°C, 48시간 저온분리법을 통하면 유청 단백질과 케이스인의 분리가 분명하게 일어나 카제인 분획의 세척공정을 단축시킬 수 있었으며(그림 3), 이를 통해 대량 생산을 위한 공정의 효율성(간편화)을 높일 수 있었다. 또한  $\alpha_s$ -카제인의 제거를 위하여 0.05M  $\text{CaCl}_2$ 의 유효 첨가량을 검증하고, 적용하여  $\alpha_s$ -카제인을 거의 제거하였다(전기영동 데이터상에서는 검출되지 않았음).



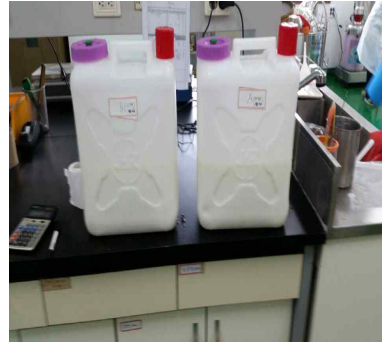


그림 4. 산양원유의 pH 조정 및 저온보관 분리 패턴. 산양원유 pH 4.4 조정, CaCl<sub>2</sub> 첨가 및 저온 정치(7°C, 48시간) 후 분리상태 (좌), 원심분리법을 이용하여 α<sub>s</sub>-케이신 분획의 분리 이후 모습(우)

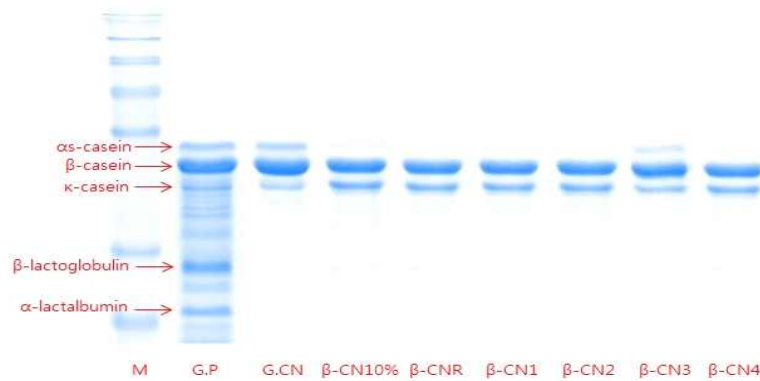


그림 5. CaCl<sub>2</sub> 첨가 조건에 따른 A2 β-casein enriched fraction의 SDS-PAGE 패턴. (M) 단백질 분자량 마커, (G.P) 산양유 단백질, (G.CN) 산양유 케이신, (β-CN10%) A2 β-케이신 frac., (β-CNR) A2 β-케이신 frac., (β-CN 1~3) A2 β-케이신 상등액, (β-CN4) A2 β-케이신 frac. 대량생산 분획물.

산양유 케이신 단백질 분획중 α<sub>s</sub>-케이신의 제거를 위하여 CaCl<sub>2</sub>처리를 하였으며, 0.05M의 양이 적당량으로 검토되었으며, casein의 펩타이드 구조상 인을 모두 가지고 있기 때문에 CaCl<sub>2</sub>처리로 인한 손실을 SDS-PAGE로 확인한 결과 (그림 5) 0.05M로 진행함에 있어서 A2 β-케이신의 손실이 가장 적은 결과를 확인하였다. 각기 다른 농도의 침전물 샘플 및 결과를 종합하여 0.05M로 진행하는 것이 대량생산을 위한 최적의 조건임을 확인하였다.

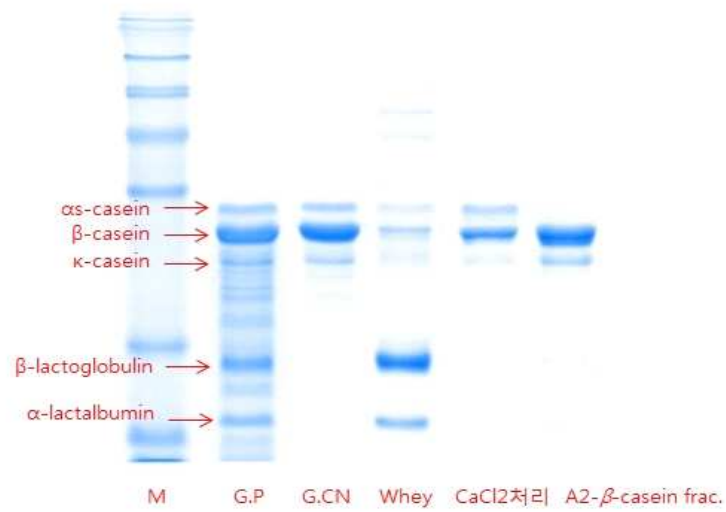


그림 6. CaCl<sub>2</sub>처리에 의한 SDS-PAGE 패턴. (M) 단백질 분자량 마커, (G.P) 산양유 단백질, (G.CN) 산양유 케이스인. (Whey) 산양 유청 단백질, (CaCl<sub>2</sub>처리) CaCl<sub>2</sub> 처리후 케이스인 침전물, (A2 β-casein frac.) A2 β-케이스인 frac.



그림 7. A2 β-케이스인 분획의 CaCl<sub>2</sub>처리 후 원심분리한 양상. CaCl<sub>2</sub>처리 후 원심분리 직후(좌), α<sub>s</sub>-케이스인 침전물(우)

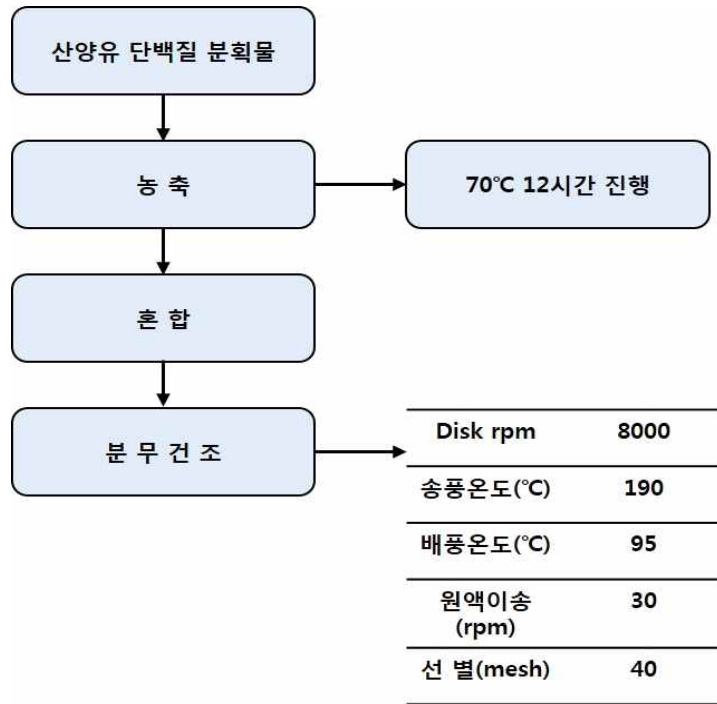


그림 8. 산양유 단백질(A2 β-케이신 분획물)의 분무건조 제조 공정



그림 9. 산양유 단백질 분획물(A2 β-케이신)의 농축 및 분무설비. 농축기(좌), pilot 분무건조기(가운데) 대량생산용 분무건조기(우)

표 5. 산양유 단백질중 A2 β-케이신 분획의 최적 생산 수율 조건 (1L 기준)

공정 단계	처리 조건
탈지유 제조	5,000 rpm 10분 4°C 원심분리
유청분리	산양유를 pH 4.4로 조정하여 유청단백질 분리후, NaOH로 다시 pH 8.0으로 조정
as-casein의 분리	0.05M CaCl <sub>2</sub> 처리후, 7°C 48시간 정치
탈염 및 농축	70°C, 12시간
분무건조	급기온도 190°C, 배풍온도 95°C, 300 rpm

○ 생산된 분말 소재의 품질 기준 설정 및 표준화

대량 생산된 소재의 품질 기준 설정 및 표준화를 위해 기본적인 관능특성, 일반성분 및 물리화학적 특성과 미생물 잔존여부를 조사하였다 (표 6와 7). 일반성분은 AOAC법 (1984)에 따라 수분은 상압가열 건조법, 회분은 건식회화법, 조단백질은 켈달법을 사용하였고, pH는 시료 (10%)를 증류수에 용해시킨 후 측정하였다. 미생물의 잔존 검사를 위해 일반세균은 SPCA배지, 대장균은 EMB배지를 사용하였고, 효모와 곰팡이는 PDA배지를 사용하여 수행한 결과 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* 균주 등의 유해균은 검출되지 않았으며, 기타 미생물 검사 또한 문제없이 제품화시킬 수 있는 수준이었다.

표 6. 산양유 A2 β-케이신 분획의 관능적 특성

검사 항목	결과
Colour	Bright milky white
Odour & Taste	Typical of goat milk taste
Origin	Powder

표 7. 산양유 A2 β-케이신의 일반성분, 물리화학적 특성 및 미생물 검사

검사 항목	결과
pH (10% solution)	6.9 ~ 7.0
Proteins	68.3 %
Fat	0.2 % max
Maltodextrin	20 %
Moisture	< 5.0 %
Solubility (ADMI)	High
Scorched particles (ADMI)	DISC A (typical), DISC B (max)
Standard plate count	20,000 cfu/g max
Coliforms	Negative
<i>Escherichia coli</i>	None detected/g
Yeasts and moulds	100 cfu/g max
<i>Staphylococcus aureus</i>	None detected/g
<i>Salmonella</i>	Negative



그림 10. A2 β-casein enriched fraction (SD Powder)

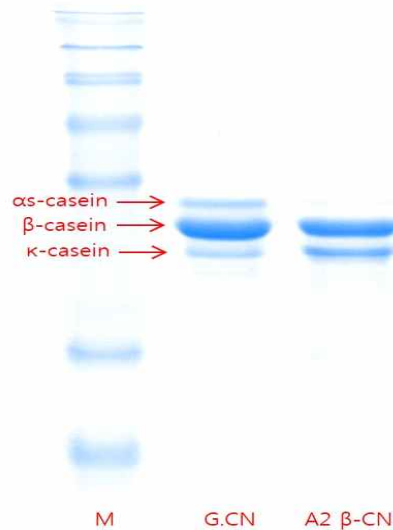


그림 11. 대량생산 공정으로 처리된 산양유 단백질 분획물(A2 β-케이신)분말의 SDS-PAGE 패턴. (M) 단백질 분자량 마커, (G.CN) 산양유 케이신, (A2 β-CN) A2 β-케이신 분획 샘플

#### ○ 산양유 단백질중 A2 β-케이신 분획물 회수율

산양유 단백질(A2 β-케이신 분획물)을 대량생산 공정으로의 large-scale up 과정에서 A2 β-케이신 분획의 회수율을 조사하였다. 먼저 0.05M CaCl<sub>2</sub> 처리 및 저온분리 후 농축하여 분무건조를 수행하였다. 산양유 단백질 분획물만으로는 분말화가 곤란하여, 분획/농축물의 고형분 대비 20%의 말토덱스트린을 혼합하여 분무건조를 진행하였다. 그 결과 1.28kg의 산양유 A2 β-케이신 분획의 분말을 회수하였다. A2 β-케이신 분획물의 케이신 함유량은 β-케이신과 κ-케이신이 약 85 : 15(%) 비율로 구성되어 있었다. 산양유 단백질 구성표(표 8)를 기준으로 A2 β-케이신 분획물 (β-케이신 및 κ-casein)에 대한 총회수율을 조사한 결과 약 90.12%임을 확인하였다(즉, 산양원유 70L 기준으로 총 단백질은 2.52kg를 포함하고 있으며, 이 중 α<sub>s</sub>-케이신을

제외한  $\beta$ -케이신 및  $\kappa$ -케이신은 1.42kg가 이론상 회수할 수 있는 최대 양임).

표 8. 산양유 단백질 구성

Whey protein, 23%			
산양유 단백질(3.6%)	Casein, 77%	$\alpha_{s1}$ -casein	5.6%
		$\alpha_{s2}$ -casein	21.20%
		$\beta$ -casein	62.80%
		$\kappa$ -casein	10.40%
		Total casein	100%

(ref. 산양유의 조성과 그 식품영양학적 의의; 김호희, 박영서, 윤성식)

표 9. A2  $\beta$ -케이신의 회수율(환산값)

구분	Protein g/L	Protein kg/70L
Whole milk protein	36 g	2.52 kg
Whey protein	8.28 g	0.58 kg
Casein protein fraction	27.72 g	1.94 kg
$\alpha_{s1}$ -casein	1.552 g	0.11 kg
$\alpha_{s2}$ -casein	5.877 g	0.41 kg
$\beta$ -casein	17.408 g	1.22 kg
$\kappa$ -casein	2.883 g	0.20 kg

표 10. 산양유 A2  $\beta$ -케이신 분말제품의 Specifications

<b>TITLE</b>	A2 $\beta$ -casein frac. (Goat milk)
Definition	A2 $\beta$ -casein enriched frac.
Ingredients	Goat A2 $\beta$ -casein frac., Maltodextrin
Origin	Korea(EDAM)
<b>Organoleptical Characteristics</b>	
Colour	Bright milky white
Odour & Taste	Typical of goat milk taste
Texture	Powder
<b>Chemical Characteristic</b>	
<b>Result</b>	
Ph 10% Solution	6.9 ~ 7.0
Proteins	68.3%~
Fat	0.2% max
Maltodextrin	20%
Moisture	5.0%
Solubility (ADMI)	High
Scorched particles (ADMI)	DISC A(typical), DISC B (max)
<b>Microbiological characteristics</b>	
Standard Plate Count	20,000 cfu/g max.
Coliforms	Negative

○ 산양유 A2  $\beta$ -케이신 분획물의 단백질 정량 및 순도 분석

대량 생산된 산양유 단백질 분획물(A2  $\beta$ -케이신)의 A2  $\beta$ -케이신 단백질 농도를 확인하기 위해 조사하였다. BSA를 이용하여 standard curve를 제작하였다. 각 cuvette에 Bradford solution(1X)를 1ml씩 투입, 샘플을 적당량 희석(증류수)하여 20ul씩 넣고 혼합하였다. 5분간 반응시킨 후, 595 nm에서 흡광도를 측정된 결과 소재의 A2  $\beta$ -케이신의 단백질 농도는 354(ug/ml)로 확인하였다(그림 10).

BSA 농도(ug/ml)	흡광도(595nm)
62.5	0.104
125	0.179
250	0.315
500	0.562
1000	1.016

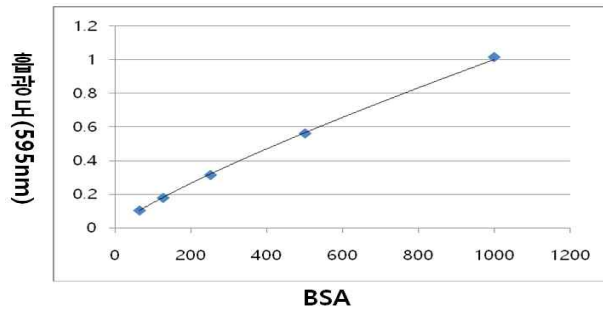


그림 12. 산양유 단백질, A2  $\beta$ -케이신 분획물의 단백질 정량분석. standard curve(우), bradford 정량 결과(좌)

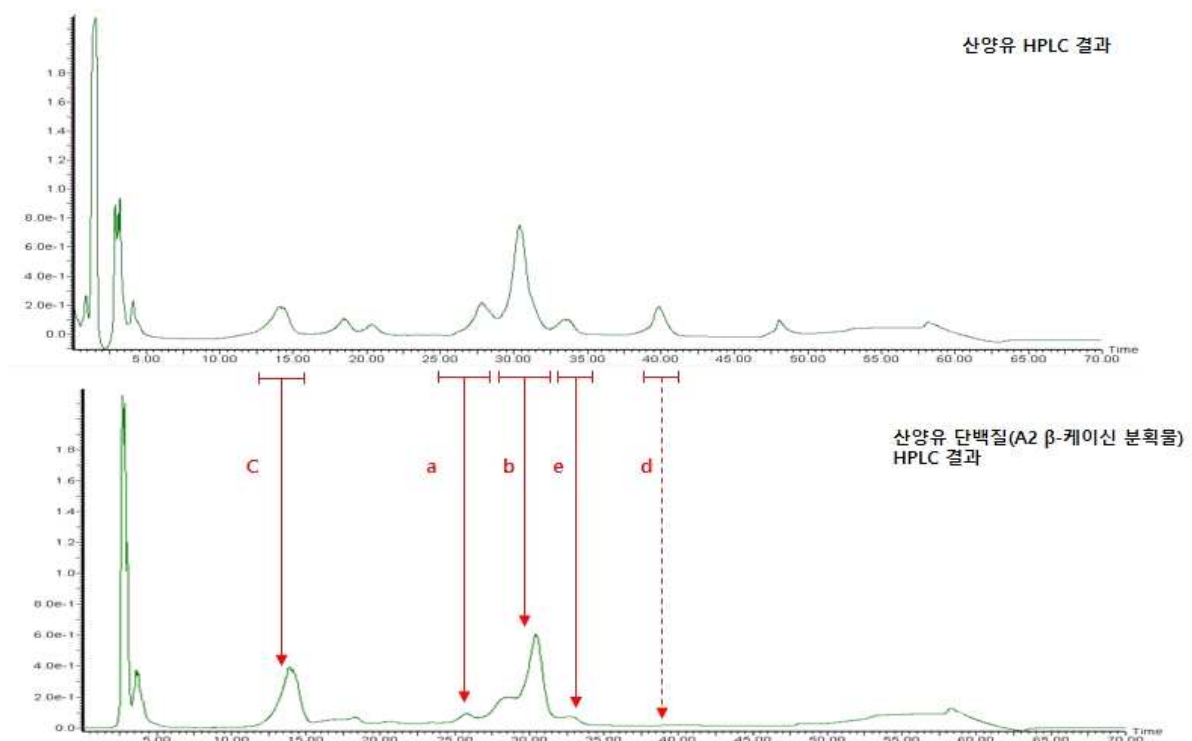


그림 13. 산양유 단백질 및 A2  $\beta$ -케이신 분획물의 RP-HPLC 패턴. A2  $\beta$ -케이신 분획물 (green line)의 RP-HPLC (A) 패턴. (a) as-케이신, (b)  $\beta$ -케이신, (c)  $\kappa$ -케이신, (d)  $\beta$ -락토글로부린, (e)  $\alpha$ -락트알부민.



표 11에서 제시된 바와 같이 대량생산된 A2 β-케이신 분획물을 대상으로 RP-HPLC를 실시하였으며 그 결과, A2 β-케이신 분획물은 αs-케이신이 대부분 제거 되었고 β-케이신과 κ-케이신만이 함유되어 있었으며 전기영동에서 제시된 바와 같이 β-케이신이 풍부한 분말임을 확인할 수 있었다 (그림 13).

표 11. 산양유 유래 A2 β-케이신 분획물의 RP-HPLC 분석조건

Parameter	Condition	
Column	XTerra® RP18 (250 mm length × 4.6 mm i.d., 5.0 μm)	
Detector	Photodiode Array Detector 2996 (Waters)	
Mobile Phase	A : 10% Acetonitrile with 0.1% trifluoroacetic acid B : 90% Acetonitrile with 0.1% trifluoroacetic acid	
Flow rate	1 ml/min	
Gradient	Time (min)	B (%)
	5	27
	15	32
	18	33
	29	38.5
	31	39
	34	39
	36	40
	46	45
	50	100
	55	100
	60	27
70	27	

○ 국내 환자식 시장분석

우리나라는 2005년 고령화 사회로 진입한 이래 고령화 속도가 더욱 빨라져 2018년에 고령사회, 2026년에는 초고령사회로 진입할 것으로 예상되며 2050년에는 노인인구의 비율이 약 40%에 도달할 것으로 전망된다 (그림 14).





**그림 14. 고령화 추이 및 전망 그래프(통계청)**

고령화가 속도가 빨라짐에 따라 고령친화식품 개발이 증가하고 있으며, 국내 대형식품업체들도 관련 사업을 확장시키고 있다. 2012년 고령친화산업 시장규모는 약 27조 3,809억원이고, 향후 8년간 CAGR은 13.0%를 나타내며, 2020년 72조 8,305억원으로 성장할 것으로 전망된다. 2014년 복지부와 진흥원에서 고령자 (65세 이상)들을 대상으로 실시한 “고령친화 산업 소비자 수요조사”에 따르면 제조업은 고령친화식품과 의약품, 서비스업은 요양 서비스에 대한 수요가 높아 소비자 니즈와 시장규모간에 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다. 표 12처럼 고령 친화 식품산업의 시장규모는 2012년 기준 약 6조 4,106억원으로 2020년 까지 연평균 13.5%씩 성장하여 그 규모가 약 17조 6,343억원 까지 증가할 것이라 전망되고 있다. 고령친화 식품 산업의 전략 품목에는 건강 기능 식품, 특수의료용도 식품, 전통 발효 식품, 두부 및 목류 등이 포함되고, 시장규모는 2012년 기준 약 2조 1,525억원이며 이 중 건강 기능 식품이 62.8%로 가장 큰 비중을 차지한다.

**표 12. 고령친화 식품산업 및 전략품목 시장규모 현황(한국보건산업진흥원 고령친화산업 시장동향 2015-1)**

<고령친화 식품 산업 시장규모 전망>

(단위: 억원, %)

구분	2012년	2015년	2020년	CAGR(12-20)
고령친화식품산업	64,016	93,609	176,343	13.5
모태산업	435,561	571,267	897,752	9.5
모태산업 대비 비중	14.7	16.4	19.6	-

<고령친화 식품 산업 전략품목 시장규모>

(단위: 억원, %)

구분	2007년	2010년	2012년	CAGR(07-12)	
전략품목	건강기능식품	6,888	10,211	13,507	14.4
	특수용도식품	292	711	905	25.4
	전통발효식품	1,880	2,534	6,386	27.7
	두부류, 목류	389	619	727	13.3
	합계	9,450	14,075	21,525	17.9
고령친화 식품산업	33,982	48,990	64,016	13.5	
고령친화 식품산업 대비 비중	27.8	28.7	33.6	-	

국내 환자식(diets for patients) 시장규모를 정확히 제시하는 자료는 없으나 업계 추산에 의하면 2014년 기준 약 800억원 이다. 이 중 의약품으로 나오는 환자식(치료식)은 약 200억원, 환자의 영양상태 회복 및 질병치료를 목적으로 하는 특수용도식품 환자식은 약 600억원 으로 추정되며 매년 약 5~10%씩 성장하고 있다. 특히 당뇨환자가 높은 비율 (연간 6.3%)로 증가함에 따라 당뇨환자식 생산액은 2014년 기준 2294톤으로 2009년 대비 2.3배 증가 하였다.

시장 분석을 바탕으로 개발된 환자식은 기초적인 영양성분을 충분하게 공급되었으며 산양유 단백질 분해물(HGMP) 소재가 함유된 ‘소화율이 우수한 균형 영양식’, 산양유 단백질 분해물(HGMP) 및 산양유 단백질 분획물(A2  $\beta$ -casein)이 함유된 ‘소화율이 우수한 고단백식’, 소화율이 높고, 저 알러지성이며 식후 혈당 조절에 도움을 주는 ‘당뇨 환자식 요구르트’ 등 총 3종의 환자식을 제품화 하였다.

○ 단백질 소재를 이용한 환자식 식품 개발

1차년도 및 2차년도에 확립된 최적조건을 이용하여 산양유 단백질 가수분해물 (HGMP)와 산양유 단백질 분획물 (A2-beta casein)을 제조하였으며, 생산수율은 HGMP가 평균 75.8%, A2  $\beta$ -casein이 평균 85.2%로 확인되었다. (표 13).

표 13. 산양유 유래 고단백 식품소재 생산수율

구분	1차
HGMP	평균 75.8%
A2 $\beta$ -casein	평균 85.2%



그림 15. 환자식에 함유된 기능성 소재들. 산양유 단백질 가수분해물(HGMP, 왼쪽), 산양유 단백질 분획물(A2  $\beta$ -casein, 오른쪽).

개발된 산양유 소재들을 이용하여 총 3종의 제품을 개발하였다. 필수 영양소와 산양유 단백질 가수분해물 (HGMP)가 주요 단백질 급원으로 사용된 ‘소화율이 우수한 균형 영양식’, 산양유 단백질 분획물(A2  $\beta$ -casein) 및 산양유 단백질 가수분해물 (HGMP)가 함유된 ‘소화율이 우수한 고 단백질’, 소화율이 높고, 저 알러지성이며 식후 혈당 조절에 도움을 주는 ‘당뇨 환자식 요구르트’을 제조하였고, 표 14~16과 같이 환자의 영양 균형을 고려하여 제조 배합비를 설정하였으며 제조 공정은 표 17&18과 같다.

표 14. 환자 균형 영양식 배합비

번호	원료명	함량(%)
1	HGMP	1

2	A2-β casein	0.5
3	NEOSOFT J-53	0.01
4	카제인나트륨	1.40
5	ISP-1651(분리대두단백)	1.30
6	식이섬유(LGG용)	1.10
7	설탕 포	2.15
8	덱스트린	10.50
9	프락토올리고당	1.00
10	황산동	0.00044
11	요오드칼륨	0.000016
12	제2인산칼슘	0.05
13	탄산칼슘 혼합제제	0.15
14	황산아연	0.0038
15	구연산칼륨	0.2
16	염화마그네슘	0.11
17	타우린 합성	0.013
18	L-카르니틴	0.013
19	L-아르기닌	0.025
20	황산제1철	0.0048
21	황산망간	0.00048
22	염화칼슘	0.02
23	제2인산칼륨	0.074
24	MCT OIL	0.5
25	정제 대두유	2.5
26	almax 3800	0.35
27	L-아스코르빈산나트륨	0.035
28	비타민K1(5%)	0.00014
29	베타카로틴(30%)	0.0018
30	비타민D3(100-CWS)	0.00034
31	비타민E OIL	0.011
32	비타민A OIL	0.00035
33	니코틴산 아미드	0.002
34	Vit. B1 엽산염	0.00021
35	Vit.B6 엽산염	0.0003
36	비타민B2	0.00024
37	엽산	0.00009
38	비타민B12	0.0000007
39	판토텐산칼슘	0.001
40	비오틴	0.0000077
41	염화콜린	0.066
42	바닐라향(X77565S)	0.08
43	로스트라이스향(SC-60433)	0.11
44	정제수	76.7169856

---

총계	100
----	-----

---

표 15. 고단백 환자식 배합비

번호	원료명	함량(%)
1	HGMP	1
2	A2-β casein	0.5
3	NEOSOFT J-53	0.01
4	카제인나트륨	4.5
5	ISP-1651(분리대두단백)	2.6
6	프락토올리고당(TS-75)	1.0
7	식이섬유(LGG용, F90)	1.5
8	덱스트린	16.5
9	황산동	0.0018
10	요오드칼륨	0.00004
11	제2인산칼슘	0.14
12	황산아연	0.0075
13	구연산칼륨	0.3
14	타우린	0.026
15	L-카르니틴	0.026
16	L-아르기닌	0.025
17	아세실팜칼륨	0.003
18	황산제1철	0.009
19	황산망간	0.0024
20	염화칼륨	0.001
21	제2인산칼륨	0.07
22	MCT OIL	0.5
23	대두유	4.0
24	almax 3800	0.35
25	비타민E OIL	0.015
26	비타민A OIL	0.00055
27	베타카로틴(30%)	0.001215
28	비타민D3(100-CWS)	0.000255
29	비타민 K1(5%)	0.0001455
30	니코틴산 아마이드	0.00243
31	Vit. B1 엽산염	0.000225
32	Vit. B6 엽산염	0.00035
33	L-아스코르빈산나트륨	0.05
34	비타민B2	0.0003
35	엽산	0.0000705
36	비타민B12	0.0000003
37	판토텐산칼슘	0.001005
38	비오틴	0.00000555
39	염화마그네슘	0.25

40	염화콜린	0.066
41	로스트라이스향(SC-60433)	0.13
42	정제수	66.41070815
총계		100

표 16. 당뇨 환자식 요구르트 배합비

번호	원료명	합량(%)
1	산양원유	60.9
2	락타아제	0.015
3	크림후레버	0.02
4	유산균(YF-L903)	0.0006
5	유산균(ABY-3)	0.0001
6	HGMP	2
7	자일리톨	0.5
8	탈티톨	1
9	대두다당류	0.2
10	난소화성말토덱스트린	4
11	폴리덱스트로스	5
12	펙틴	0.15
13	치커리식이섬유	1.3
14	꾸지뽕혼합농축액	0.25
15	바나바잎추출물	1
16	강화약썩농축액	0.05
17	비타민 C	0.15
18	감초농축액	0.65
19	헛개향	0.14
20	정제수	22.6743
총계		100

표 17. 일반환자식, 고단백환자식 제조공정도

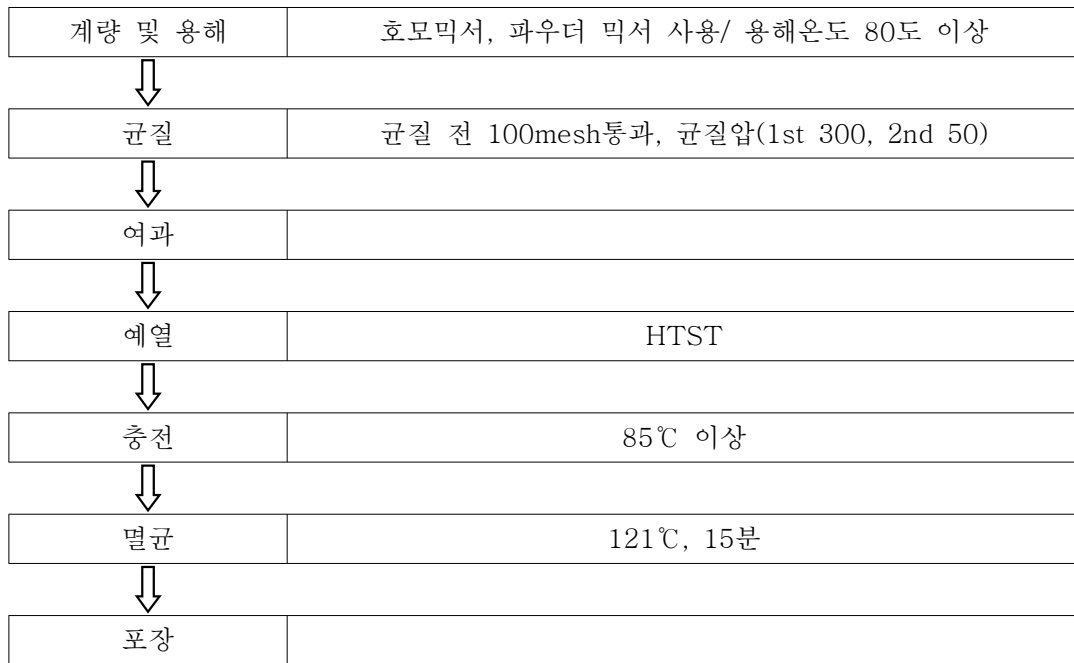
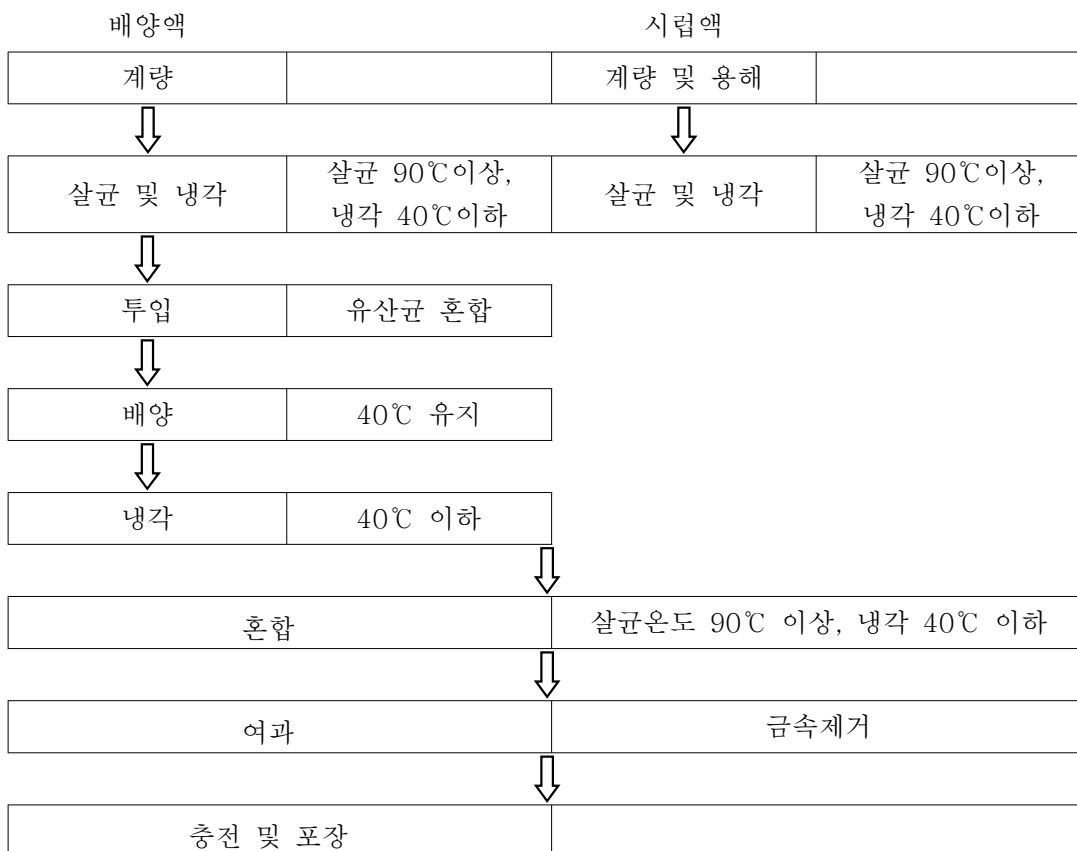


표 18. 당뇨환자식 요구르트 제조공정도



○ 제품의 품질 기준 설정 및 표준화

특수용도식품으로서의 적합성 여부를 판단하기 위해 식품공전의 기준 (표 19&20)에 의거하여 개발된 환자식 3종에 대한 관능특성, 일반성분 및 물리화학적 특성과 미생물 잔존여부를 조

사하였다. 일반성분은 AOAC법 (1984)에 따라 회분은 건식회화법, 조단백질은 켈달법을 사용하였고, pH는 시료(10%)를 증류수에 용해시킨 후 측정하였다. 미생물의 잔존 검사를 위해 일반세균은 SPCA배지, 대장균은 EMB배지, 효모와 곰팡이는 PDA배지를 사용하여 조사한 결과 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* 등의 유해균은 검출되지 않았으며 기타 미생물 검사 또한 문제없이 제품화시킬 수 있는 수준으로 확인되었다.

**표 19.** 식품공전에 제시된 일반시험법

구분	시험방법
수분	제7. 일반시험법 2. 식품성분시험법 2.1.1 수분에 따라 시험한다.
영양소	제7. 일반시험법 2. 식품성분시험법 및 2.2 미량영양성분시험법에 따라 시험한다.
대장균군	제7. 일반시험법 4. 미생물시험법 4.7 대장균군에 따라 시험한다.
세균수	제7. 일반시험법 4. 미생물시험법 4.5.1 일반세균수에 따라 시험한다.
타르색소	제7. 일반시험법 3.4 착색료에 따라 시험한다.
크로노박터	제7. 일반시험법 4. 미생물시험법 4.21크로노박터에 따라 시험한다.
바실러스 세레우스	제7. 일반시험법 4. 미생물시험법 4.18 바실러스세레우스 4.18.2 정량시험에 따라 시험한다.
탄화물	제7. 일반시험법 1.2이물 1.2.2 식품별 이물 다. 시험조작 바)아이스크림믹스, 무당연유, 가당연유, 가당탈지연유, 전지분유, 탈지분유, 가당분유 및 조제분유, 조제식에 따라 시험한다.

**표 20.** 식품공전 환자용 균형영양식 규격사항

구분	환자용 균형영양식
성상	고유의 색택과 향미를 가지고 이미, 이취가 없어야 한다.
수분	10.0% 이하(분말제품에 한함)
조단백질	표시량 이상이어야 한다.
조지방	표시량 이상이어야 한다.
당류	-
식이섬유	-
비타민	표시량 이상이어야 한다. (비타민A, B1, B2, B6, C, D, E, 나이아신, 엽산에 한하여 적용한다.)
무기질	표시량 이상이어야 한다. (칼슘, 철, 아연에 한하여 적용한다.)
불소	0.2mg/100kcal 이하이어야 한다. (불소 함유 식품첨가물을 사용한 경우에 한함.)
대장균군	음성
세균수	1ml당 100이하 (분말제품은 1g당 20,000 이하)
타르색소	불검출
바실러스세레우스	1g 당 100이하
제조/가공 기준	제품 1000kcal당 비타민 A, B1, B2, B6, C, D, E, 나이아신, 엽산, 단백

	질, 칼슘, 철, 아연을 영양소 기준치의 50% 이상 되도록 원료식품을 조합하고 영양소를 첨가하여야 한다.
--	-------------------------------------------------------------

**표 21.** 축산물 성분규격

구분	당뇨환자용 발효유
성상	고유의 색택과 향미를 가지고 이미, 이취가 없어야 한다.
수분	-
유고형분(%)	-
무지유고형분(%)	3.0 이상
유지방(%)	-
유산균수 또는 효모수	1mL 당 10,000,000 이상
대장균군	n=5, c=2, m=<3, M=10
제조/가공 기준	제품 1000kcal당 비타민 A, B1, B2, B6, C, D, E, 나이아신, 엽산, 단백질, 칼슘, 철, 아연을 영양소 기준치의 50% 이상 되도록 원료식품을 조합하고 영소를 첨가하여야 한다. 포화지방 유래하여 열량은 총 열량의 10%미만으로 한다. 콜레스테롤 제품 1000kcal당 100mg 이하로 하며, 당당류 및 이당류 유래열량은 총열량의 10% 미만으로 한다.



**그림 16.** 산양유 소재들을 첨가하여 제품화된 환자식 3종. 일반환자식(왼쪽), 당뇨식 요구르트(가운데), 고단백 환자식(오른쪽).

식품공전 기준에 의거하여 미네랄을 제외한 일반 영양성분을 분석한 결과 개발된 환자식 3종 모두 특수용도식품으로서 적합하였고 (표 22), 현재 환자식 시장에서 판매되고 있는 제품들과 비교 했을때 제품화 시킬 수 있는 수준으로 확인되었다 (표 23).

**표 22.** 산양유 소재를 포함 한 환자식 3종에 대한 영양성분분석

시험항목	일반 환자식	당뇨식 요구르트	고단백 환자식	단위
열량	103.13	86.83	112.21	kcal / 100mL
탄수화물	15.07	15.15	16.65	g / 100mL
당류	2.94	2.07	4.12	g / 100mL



조단백질	3.94	2.17	4.36	g / 100mL
조지방	3.01	1.95	3.13	g / 100mL
포화지방	1.02	1.36	1.26	g / 100mL
트랜스지방	0.00	0.05	0.01	g / 100mL
콜레스테롤	0.00	9.03	0.00	mg / 100mL
나트륨	57.45	38.75	70.33	mg / 100mL



그림 17. 산양유 소재를 포함 한 환자식 3종에 대한 영양성분분석 검사성적서

표 22. 국내 환자식 시장에서 판매되고 있는 제품의 영양성분. 일반 환자식, 정식품 그린비아 마일드케어; 고단백 환자식, 엠디웰 뉴트리웰 고단백; 당뇨 환자식, 대상 웰라이프 뉴케어 당뇨식 DM

구분	단위	일반 환자식		고단백 환자식		당뇨 환자식	
		내용량	%영양성분기준치	내용량	%영양성분기준치	내용량	%영양성분기준치
열량	kcal	200	-	200	-	103	-
탄수화물	g	30	9	25	8	15	3
당류	g	6	6	8	-	2	-
식이섬유	g	1	4	3	12	2.5	10
단백질	g	8	15	15	27	4	8
지방	g	6	11	5	10	4	9
포화지방	g	2	13	1.5	10	0.7	5
트랜스지방	g	0	-	0	-	0	-
콜레스테롤	mg	0	0	14	5	0	0
나트륨	mg	160	8	250	13	80	4

비타민A	$\mu\text{g RE}$	150	21	400	57	75	11
비타민B1	mg	0.24	20	0.3	25	0.13	11
비타민B2	mg	0.3	21	0.4	29	0.15	11
비타민B6	mg	0.3	20	0.4	27	0.15	10
비타민B12		0.48	20	0.8	33	0.24	10
비타민C	mg	20	20	100	100	14	14
비타민D	$\mu\text{g}$	1	10	1.4	1.4	0.5	10
비타민E	mg $\alpha$ -TE	2	18	9.3	9.3	1	9
비타민K	$\mu\text{g}$	15	21	16	16	7.5	11
칼슘	mg	140	20	160	23	77	11
인	mg	140	20	140	20	70	10
칼륨	mg	270	8	280	8	110	3
마그네슘	mg	44	14	35	11	22	7
철분	mg	2	17	2	17	1.2	10
아연	mg	2	14	4.5	53	1.2	14
염소	mg	240	10			75	3
엽산	$\mu\text{g}$	80	20	100	25	40	10
나이아신	mg NE	3.2	21	3.2	21	1.6	11
비오틴	$\mu\text{g}$	6	20	10	33	3	10
판토텐산	mg	1	20	1.4	28	0.5	10
구리	mg	0.16	20	0.16	20	0.08	10
망간	mg	0.7	23	0.7	23	0.24	8
요오드	$\mu\text{g}$			30	20	15	10

○ 단백질 분해효소의 선발 및 최적 조건 설정

산양유 as-케이스인 및  $\beta$ -락토글로부린을 선택적으로 가수분해하는 단백질 분해 효소를 선발하고자 상업용으로 시판되는 alcalase, flavourzyme, neutrase, protamex 등을 사용하여 산양유 단백질 농도의 10%에 해당되는 효소를 첨가한 다음 각 효소별 분해능력을 SDS-PAGE 기법으로 확인하였다 (그림 1). 그 결과 alcalase가 as-케이스인 및  $\beta$ -락토글로부린을 저감화 시키는 양상이 가장 뚜렷하여 alcalase를 주 효소로 선발하였고, neutrase가 as-케이스인의 분해 능력이 뛰어나 as-케이스인의 분해를 돕는 보조 효소로 선발하였다.

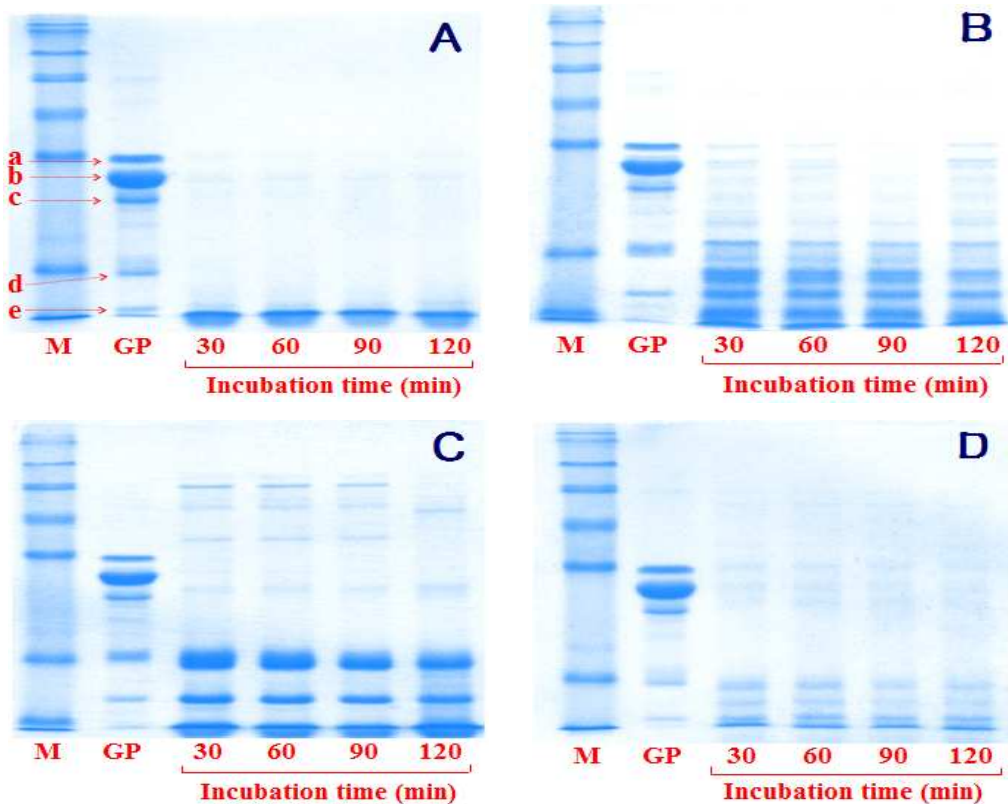


그림 1. 상업용 단백질 분해 효소에 의한 산양유 단백질의 가수분해 양상. 단백질 분자량 마커 (M), 산양유 단백질 (GP). Alcalase (A), Flavourzyme (B), Neutrase (C), Protamex (D). as-케이스인 (a),  $\beta$ -케이스인 (b),  $\kappa$ -케이스인 (c),  $\beta$ -락토글로부린 (d),  $\alpha$ -락트알부민 (e).

산양유 단백질 가수분해를 위해 주 효소로 선발된 alcalase의 최적 가수분해 조건을 설정하고자 배양온도, 배양 시간 및 효소 농도를 달리하여 처리한 결과는 그림 2와 같다. 가수분해 후 효소의 활성을 제거하기 위해 90°C에서 15분간 가열하였으며 샘플링한 뒤 SDS-PAGE를 이용하여 분해양상을 확인하였다. 그 결과, alcalase의 농도는 0.4%, 가수분해 시간 및 온도는 각각 30분과 60°C로 처리하였을 때까지 가수분해율이 꾸준히 상승하였으나 그 이상의 조건에서는 큰 변화가 나타나지 않았다. 또한, OPA 기법을 사용한 가수분해도 측정 및 FAN과 NPN을 정량한 결과에서도 유사한 경향을 나타내었다 (그림 3~5).

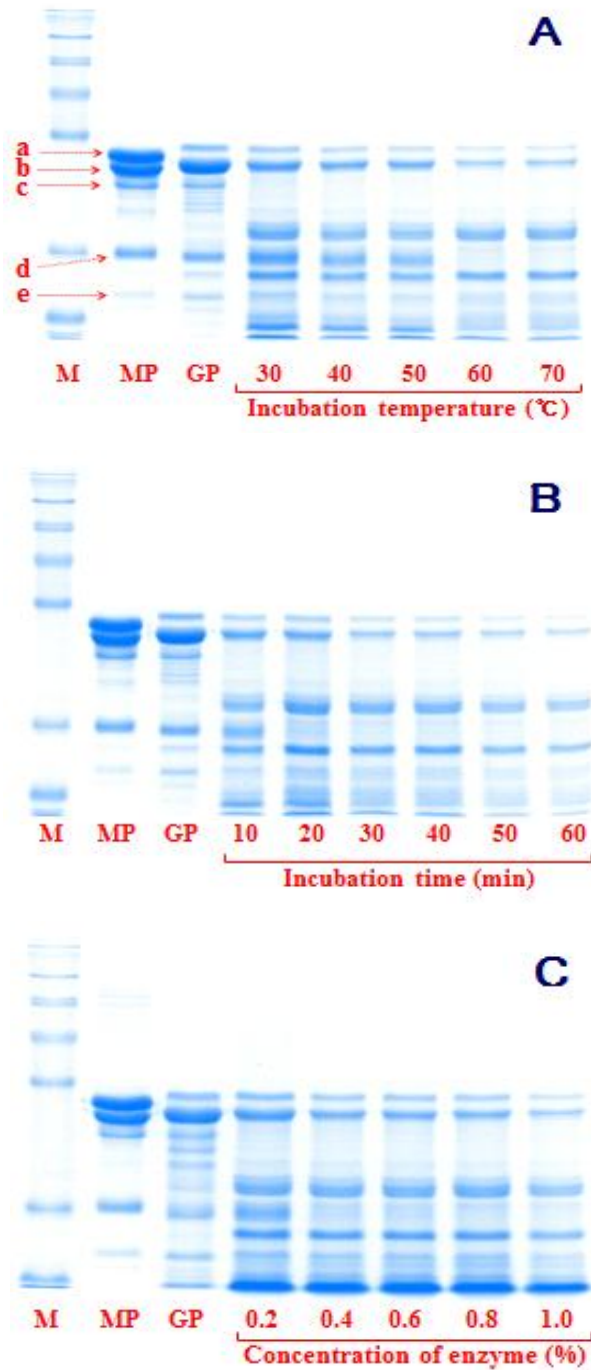


그림 2. Alcalase의 처리 조건에 따른 산양유 단백질의 가수분해 양상. 배양 온도 (A), 배양 시간 (B), 효소 농도 (C). 단백질 분자량 마커 (M), 젖소유 단백질 (MP), 산양유 단백질 (GP).  $\alpha$ S-케이스인 (a),  $\beta$ -케이스인 (b),  $\kappa$ -케이스인 (c),  $\beta$ -락토글로부린 (d),  $\alpha$ -락트알부민 (e).

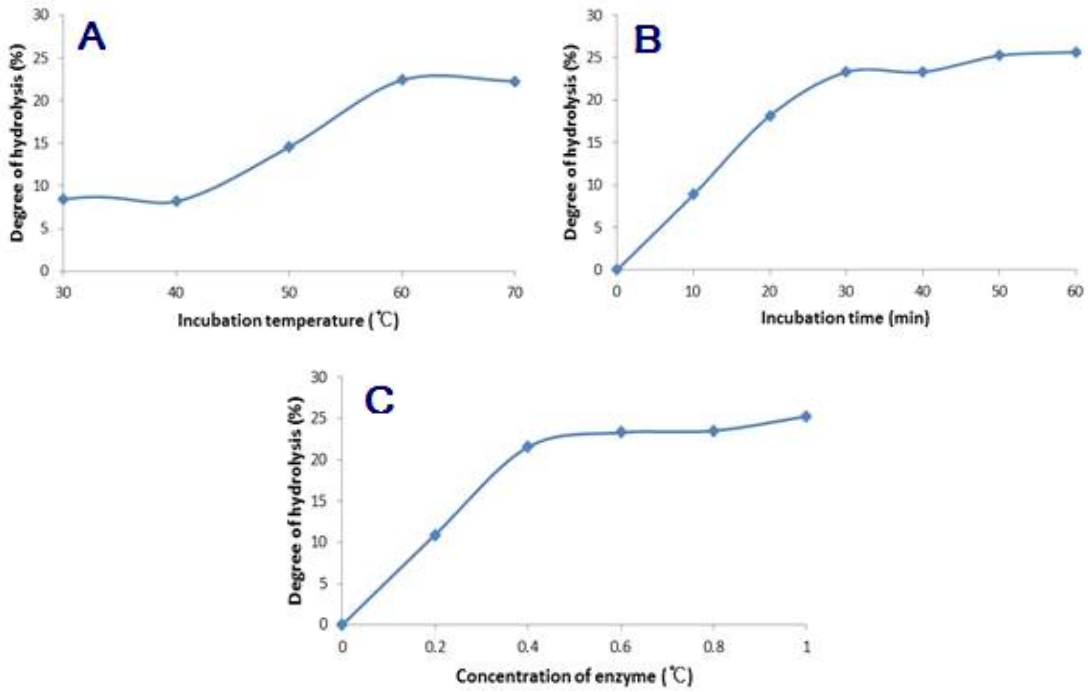


그림 3. O-phthaldialdehyde기법을 이용한 alcalase 처리 조건별 산양유 단백질의 가수분해율. 배양 온도 (A), 배양 시간 (B), 효소 농도 (C).

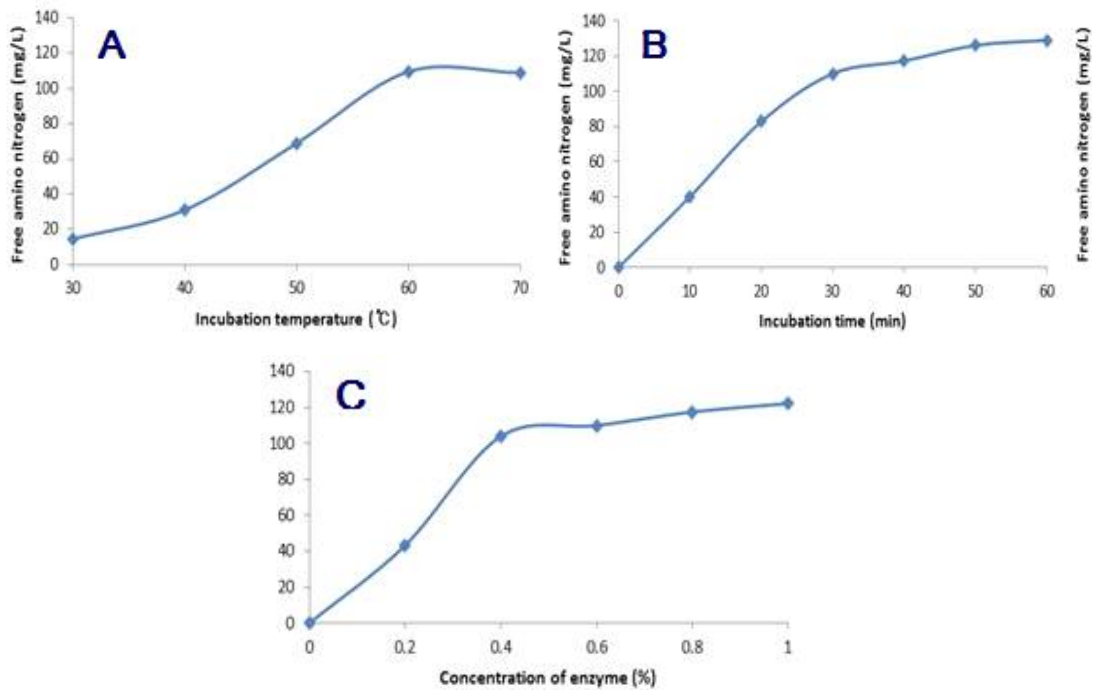


그림 4. Free amino nitrogen 정량법을 이용한 alcalase 처리 조건별 산양유 단백질의 가수분해 양상. 배양 온도 (A), 배양 시간 (B), 효소 농도 (C).

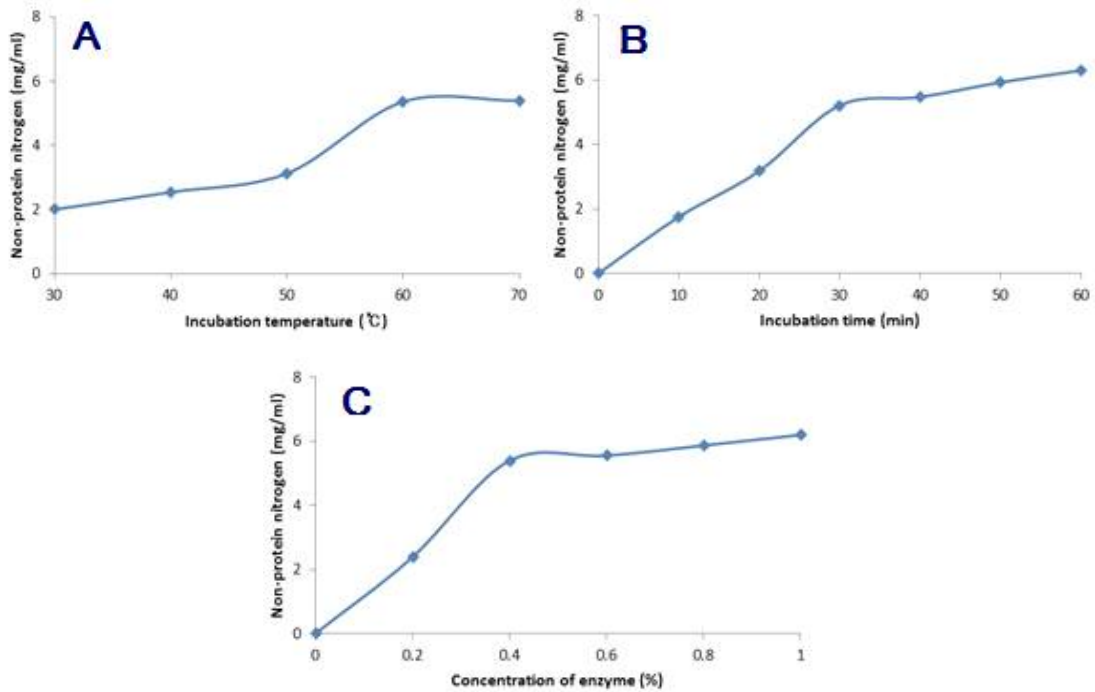


그림 5. Non-protein nitrogen 정량법을 이용한 alcalase 처리 조건별 산양유 단백질의 가수분해 양상. 배양 온도 (A), 배양 시간 (B), 효소 농도 (C).

보조효소로 사용될 neutrase의 농도, 배양온도 및 배양시간을 달리하여 산양유 단백질 가수분해 양상과 가수분해도를 확인하였다. SDS-PAGE를 통해  $\alpha$ s-케이스인 및  $\beta$ -락토글로부린의 선택적 저감화를 확인한 결과 neutrase 0.01%를 첨가한 경우 20분이 경과하여도  $\alpha$ s-케이스인 밴드의 농도에 큰 변화가 나타나지 않았으나 30분과 40분 배양시 다소 감소하는 양상을 보였다. 반면, neutrase를 0.05%로 첨가시 10분 후부터  $\alpha$ s-케이스인의 저감화 현상이 나타났으며 그 이후에는 큰 변화가 없었다 (그림 6). OPA 기법을 사용한 가수분해도 측정, FAN 및 NPN 정량을 통한 분해 양상 결과에서도 neutrase 0.05% 첨가군에서 더 뚜렷하고 명확한 가수분해율이 확인되었다 (그림 7). 따라서, 보조 효소의 처리 조건은 효소 농도 0.05%, 배양시간 10분으로 최종 결정되었으며 공장 내 생산설비를 통한 대량생산 공정과 과도한 가수분해로 인한  $\alpha$ s-케이스인 및  $\beta$ -락토글로부린 이외의 다른 단백질 손실을 방지하기 위해 alcalase와 neutrase의 최적 조건을 표 1과 같이 최종 설정하였다.

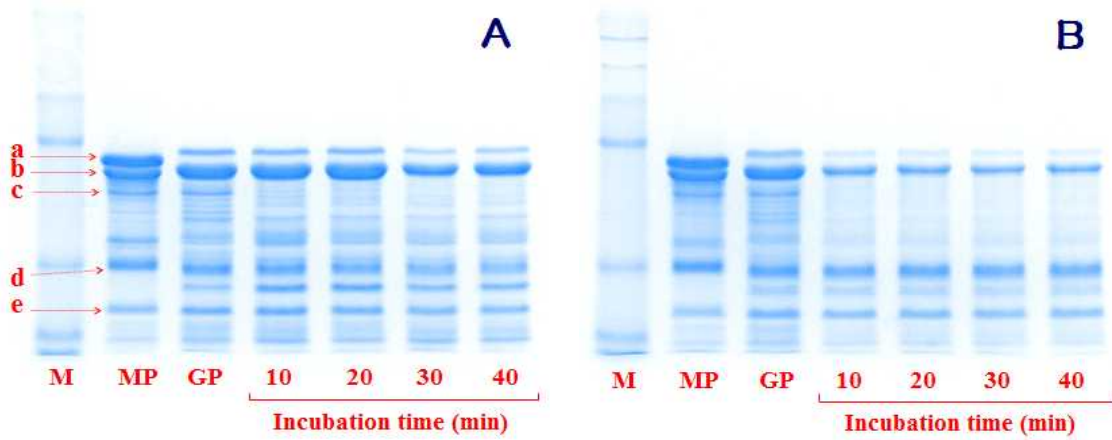


그림 6. Neutrased 처리에 의한 산양유 단백질의 가수분해 양상. Neutrased 첨가량 0.01% (A), 0.05% (B). 단백질 분자량 마커 (M), 젓소유 단백질 (MP), 산양유 단백질 (GP). as-케이신 (a),  $\beta$ -케이신 (b),  $\kappa$ -케이신 (c),  $\beta$ -락토글로부린 (d),  $\alpha$ -락트알부민 (e).

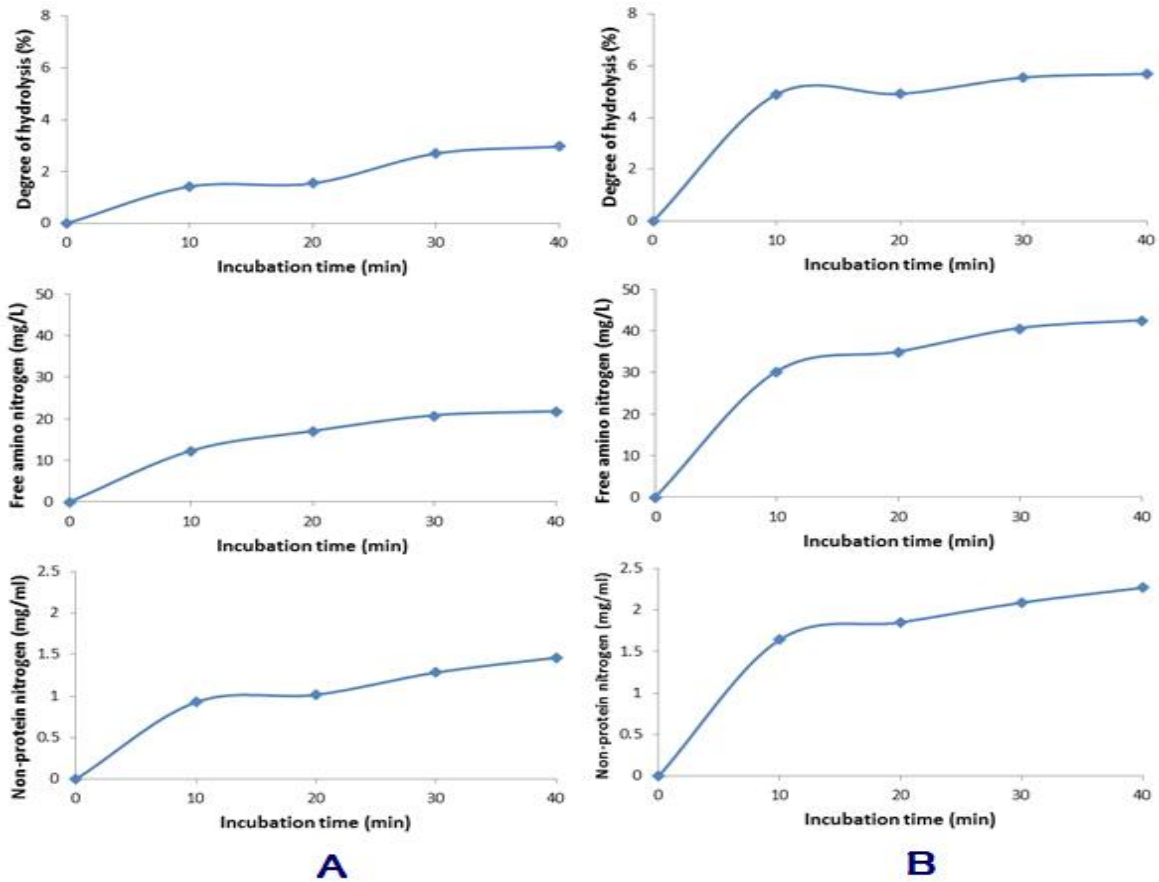


그림 7. O-phthaldialdehyde 기법을 사용한 가수분해율과 free amino nitrogen 및 non-protein nitrogen 정량법에 의한 산양유 단백질 가수분해 양상 조사. Neutrased 첨가량 0.01% (A), 0.05% (B).



표 1.  $\alpha$ s-케이스인 및  $\beta$ -락토글로부린의 선택적 저감화를 위한 효소의 최적 처리 조건

효소 종류	효소 농도 (%) <sup>a</sup>	배양 시간 (min)	배양 온도 (°C)
Alcalase	0.4	30	60
Neutralse	0.05	10	60

<sup>a</sup>: based on protein content

### ○ $\alpha$ s-casein 및 $\beta$ -lactoglobulin의 저감화 조사

최종 효소 처리 조건에 의해 생산된 가수분해물의  $\alpha$ s-케이스인 및  $\beta$ -락토글로부린의 저감화 양상을 SDS-PAGE와 RP-HPLC 방법으로 확인한 결과는 그림 8 및 9와 같다. 그림 8에 제시된 바와 같이 HGMP에서  $\beta$ -락토글로부린 위치의 밴드가 검출되지 않았고, 그림 9C에서도  $\beta$ -락토글로부린에 해당되는 피크가 검출되지 않는 것을 미루어 볼 때, 본 연구에서 선정된 조건으로 효소 처리한 단백질 가수분해물은  $\beta$ -락토글로부린이 저감화된 소재임을 확인할 수 있었다. 또한, 그림 8의 밴드 농도를 바탕으로  $\alpha$ s-케이스인이 약 40% 이상 저감화됨을 알 수 있었고 RP-HPLC의 결과에서도  $\alpha$ s-케이스인이 가수분해물에서 감소된 양상을 나타내었다.

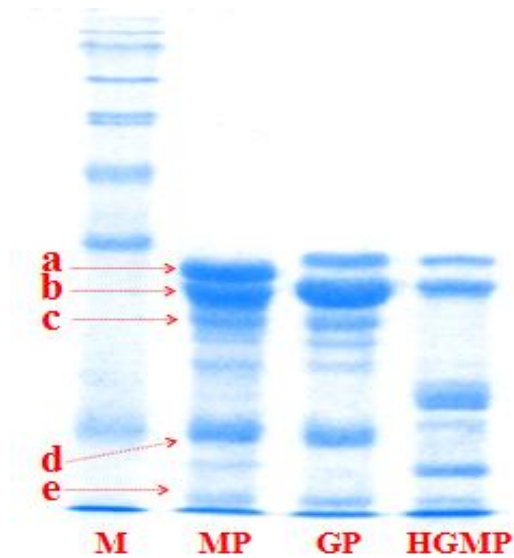


그림 8. Alcalase 및 neutralse 처리에 의한 산양유 단백질 가수분해물의 분해양상. 단백질 분자량 마커 (M), 젖소유 단백질 (MP), 산양유 단백질 (GP), 산양유 단백질 가수분해물 (HGMP).  $\alpha$ s-케이스인 (a),  $\beta$ -케이스인 (b),  $\kappa$ -케이스인 (c),  $\beta$ -락토글로부린 (d),  $\alpha$ -락트알부민 (e).

### ○ 산양유 단백질 가수분해물의 회수

최적 효소 처리 조건을 활용하여 산양유 단백질을 가수분해하고 가장 효과적으로 가수분해물을 회수할 수 있는 방법을 조사하였다. 먼저, 가수분해가 끝난 뒤 분해물을 농축하여 바로 분무건조를 수행하였고, 또 다른 방법으로 가수분해후 원심분리하거나 에탄올을 각각 25% 및 50%로 처리한 뒤 상층액은 버리고 침전물을 동결건조시켰다. 마지막으로 가수분해 후 에탄올을 각각 25% 및 50%로 처리한 뒤 1시간 동안 정치하고, 상층액을 버린 후 100% 에탄올을 침



가한 뒤 상온에서 24시간 이상 건조하여 가수분해물을 회수하였다. 동결건조 및 상온건조시 가수분해물의 회수율은 2.98~3.87% 범위였으며 분무건조시에는 6.32%로 다른 건조방법보다 회수율이 높게 측정되었다 (그림 10). 또한, 각 최종 분말들의 성분 함량의 차이를 고려하여 분말 내 단백질 함량 기준으로 회수율을 조사할 때에도 분무건조 처리시 회수율이 가장 높게 나타났다. 따라서, 산양유 단백질 가수분해물의 대량생산 공정에 적합하고 효과적인 방법으로 분무건조방법을 선정하였다.

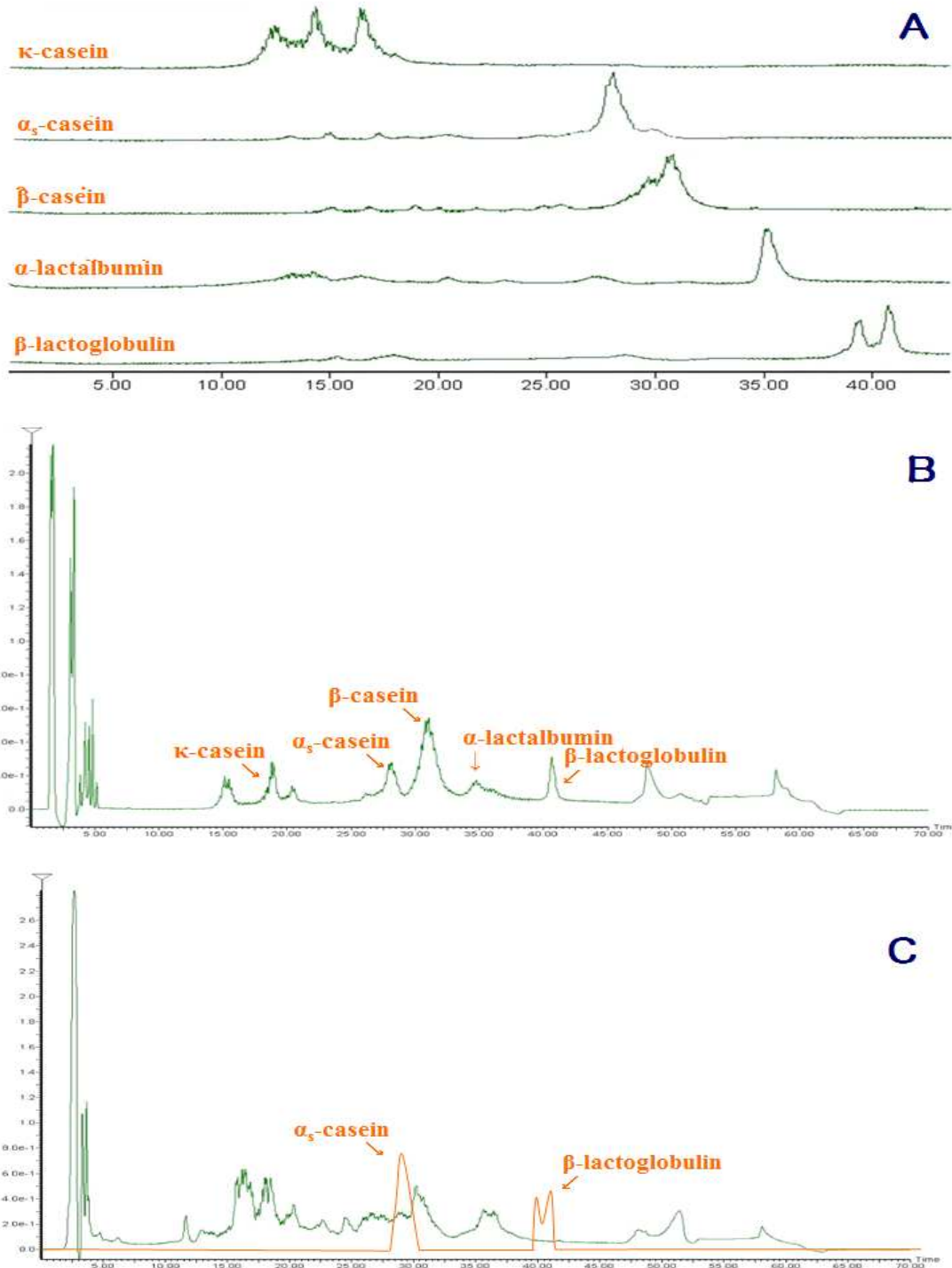


그림 9. RP-HPLC에 의한 산양유 단백질의 가수분해 양상. 각종 케이신 및 유청단백질 스탠다드 (A), 산양유 단백질 용출 양상 (B), 산양유 단백질 가수분해물의 용출 양상 (C).

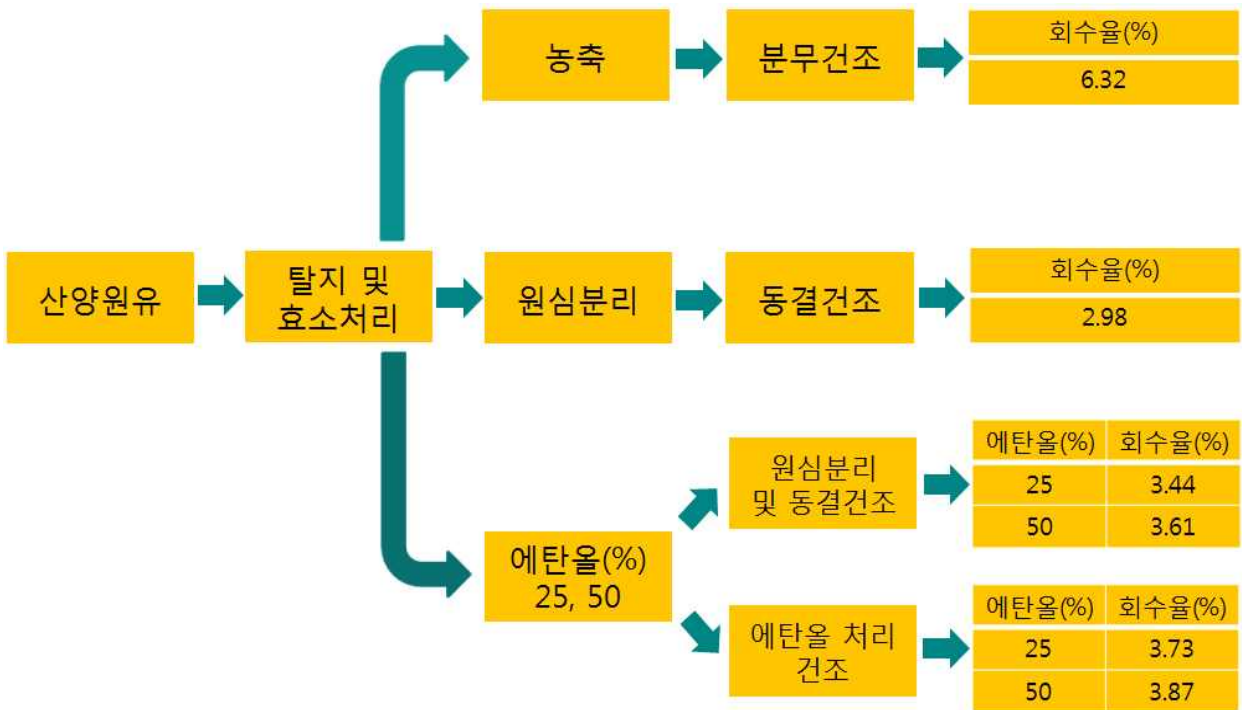


그림 10. 다양한 단백질 가수분해물 회수 방법에 따른 분말 수율의 변화

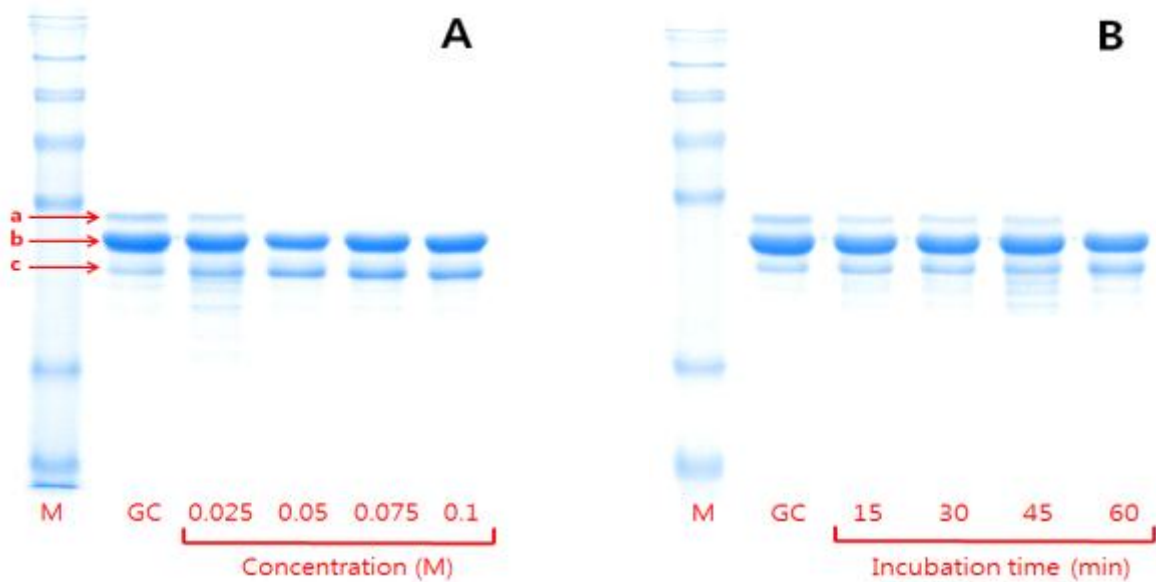
○ 산양유 A2 β-케이스인의 분리 조건 설정

산양유의 케이스인 분리 조건을 설정하기 위해 원심분리하여 산양유를 탈지하고 pH 4.0~4.8로 조정 후 상온에서 20분간 방치하여 케이스인 분리양상을 확인하였다(그림 11). 그 다음 원심분리하여 상등액을 제거한 뒤 침전물을 동결건조하여 케이스인의 회수율을 조사하였다. 그 결과 pH 4.0~4.6으로 조정된 처리구에서는 케이스인과 유청단백질이 뚜렷하게 분리되었으나 pH 4.7~4.8로 조정된 처리구에서는 케이스인의 분리 양상이 선명하지 않았다. 또한, 동결건조시 케이스인의 회수율은 pH 4.4로 조정할 때 까지는 2.48%로 증가하였으나 pH 4.4이하의 처리구에서는 케이스인 회수율에 큰 차이가 없어 산양유에서 케이스인을 분리하는 조건은 pH 4.4로 설정하였다.



그림 11. pH 변화에 따른 산양유 케이스인의 분리 양상.

분리된 산양유 케이신과 증류수를 혼합한 뒤 원심분리하여 남아있는 유청을 완전히 제거하고, 케이신을 재현탁시키기 위해 pH를 7.0로 조정하였다. 케이신 현탁액에서  $\alpha_s$ -케이신이 저감화된 산양유 A2  $\beta$ -케이신의 최적 분리 조건을 설정하기 위해  $\text{CaCl}_2$ 의 첨가 농도 및 배양 시간을 달리한 결과는 그림 12와 같다.  $\text{CaCl}_2$ 를 첨가하여 25°C에서 배양한 뒤 상등액을 회수하고 SDS-PAGE를 이용하여 산양유 케이신의 분리양상을 확인하였다. 그 결과,  $\text{CaCl}_2$ 의 첨가 농도는 0.05 M, 배양 시간은 1시간으로 처리했을 때,  $\alpha_s$ -케이신이 효과적으로 저감화 되었으나 그 이상의 조건에서는 큰 변화가 나타나지 않아 A2  $\beta$ -케이신 분리를 위한  $\text{CaCl}_2$ 의 최적 처리 조건은 산양유 케이신 현탁액에 0.05 M  $\text{CaCl}_2$ 를 첨가한 후 1시간 동안 배양하는 것으로 설정하였다.



**그림 12.**  $\text{CaCl}_2$  처리 조건에 따른 산양유 A2  $\beta$ -케이신의 분리 양상. (A)  $\text{CaCl}_2$  첨가 농도, (B) 배양 시간. (M) 단백질 분자량 마커, (GC) 산양유 케이신. (a)  $\alpha_s$ -케이신, (b)  $\beta$ -케이신, (c)  $\kappa$ -케이신.

#### ○ $\alpha_s$ -케이신의 저감화 조사

$\text{CaCl}_2$ 의 최적 처리 조건에 의해 생산된 산양유 A2  $\beta$ -케이신 분획의  $\alpha_s$ -케이신 저감화 양상을 SDS-PAGE와 RP-HPLC 기법을 이용해 확인하였다(그림 13 & 14). 그림 3의 밴드 농도 조사시 산양유내  $\alpha_s$ -케이신의 고유 함량은 19.5%였으나 산양유 A2  $\beta$ -케이신 분획내  $\alpha_s$ -케이신의 함량은 1.9%로 감소되었고  $\beta$ -케이신 및  $\kappa$ -케이신의 상대적 함량은 각각 10.9%, 6.7%씩 증가하였다. 또한, 그림 4의 RP-HPLC 결과에서도  $\alpha_s$ -케이신에 해당되는 피크가 검출되지 않은 것을 미루어 볼 때, 본 연구에서 선정된 조건으로 생산된 산양유 A2  $\beta$ -케이신 분말은  $\alpha_s$ -케이신이 효과적으로 저감화 되었고,  $\beta$ -케이신의 함량이 다량 함유되어 있는 것을 확인할 수 있었다

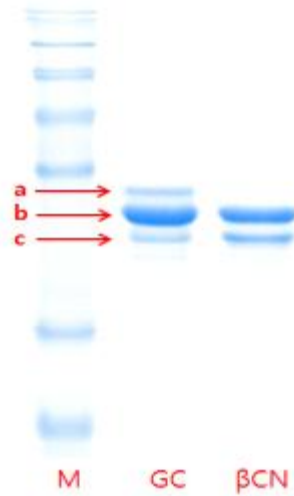
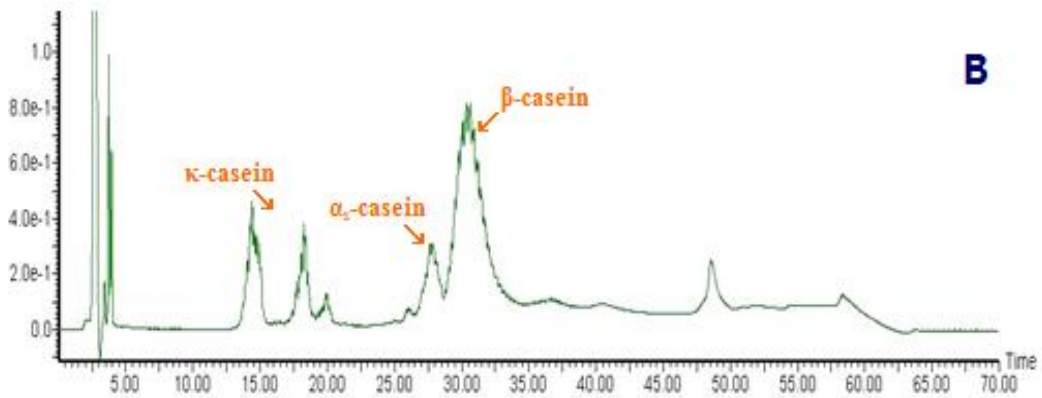
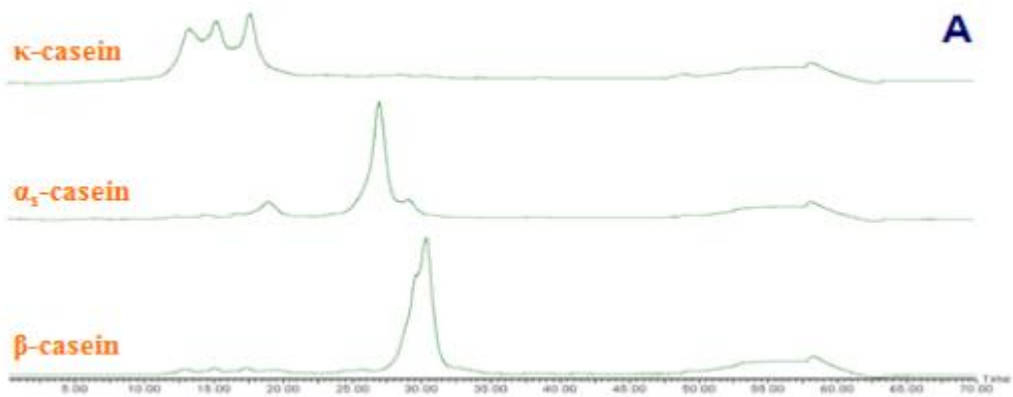


그림 13. 산양유 A2 β-케이스인 분획의 단백질 양상. (M) 단백질 분자량 마커, (GC) 산양유 케이스인, (βCN) 산양유 A2 β-케이스인 분획. (a) α<sub>s</sub>-케이스인, (b) β-케이스인, (c) κ-케이스인.



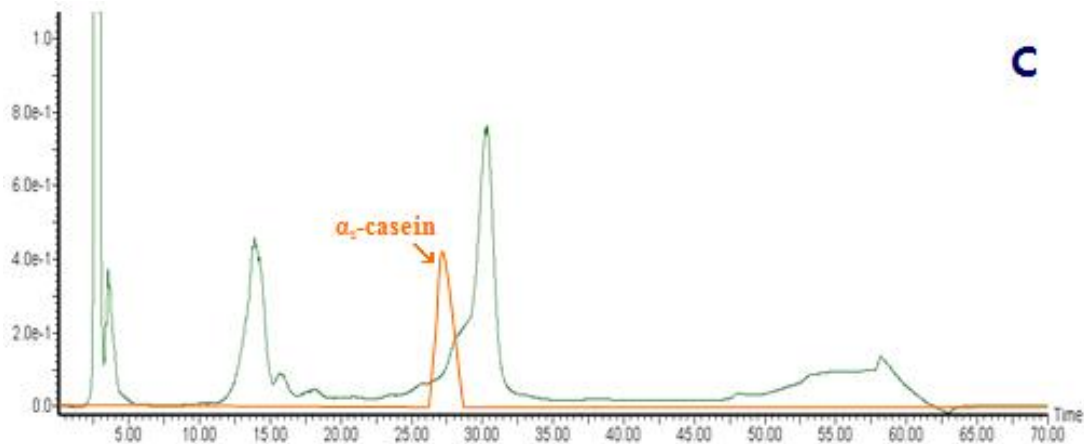


그림 14. RP-HPLC에 의한 산양유 단백질의 가수분해 양상. (A) 각종 케이신 스탠다드, (B) 산양유 케이신 용출 양상, (C) 산양유 A2 β-케이신 분획 용출 양상.

### ○ 산양유 A2 β-케이신의 회수율 조사

본 연구에서 선정된 최적 처리 조건을 활용하여 산양유 A2 β-케이신을 가장 효과적으로 회수할 수 있는 방법을 조사하였다. 먼저, CaCl<sub>2</sub>를 처리하고 원심분리하여 상등액을 회수한 뒤 농축하여 분무건조를 수행하였고, 또 다른 방법으로 CaCl<sub>2</sub> 처리 후 원심분리하거나 에탄올을 각각 25% 및 50%로 처리한 뒤 상등액은 버리고 침전물을 동결건조 시켰다. 마지막으로 CaCl<sub>2</sub> 처리 후 에탄올을 각각 25% 및 50%로 처리한 뒤 1시간 동안 정치하고, 상등액을 버린 후 100% 에탄올을 첨가한 뒤 상온에서 24시간 이상 건조하여 산양유 A2 β-케이신 분말을 회수한 다음, 각 분말들의 회수율 및 단백질 함량을 측정하였다. 분무건조시에는 2.43%의 회수율이 측정되었고, 동결건조 및 상온 건조시 회수율은 2.23~2.78%로 측정되었다(그림 15). 에탄올 처리 후 건조한 산양유 A2 β-케이신의 회수율이 2.45~2.78%로 높게 측정되었으나 각 최종 분말들의 단백질 함량 수치가 매우 낮았다. 각 분말들의 회수율과 분말내 단백질 함량을 고려할 때 분무건조 처리시 산양유 A2 β-케이신의 회수율이 가장 높게 나타났다. 따라서, 산양유 A2 β-케이신 분말의 대량생산 공정에 가장 적합하고, 효과적인 방법으로 분무건조 방법을 선정하였다.

### ○ 산양유 A2 β-케이신의 저알러지성 조사

환자식을 포함한 다양한 제품의 기능성 식품소재로서 사용될 산양유 A2 β-케이신의 알러지성을 조사하기 위해 human mast cell line (HMC-1 cells)을 이용하여 tumor necrosis factor-α (TNF-α)와 히스타민 방출량을 조사하였다 (그림 16). 알러지성 물질과 반응시 TNF-α와 히스타민을 방출하는 HMC-1 cells의 특성을 이용하여 기존에 알러지를 유발하는 것으로 보고된 다양한 물질들과 산양유 A2 β-케이신 분말을 HMC-1 cells와 반응시킨 후 ELISA 기법을 이용하여 TNF-α 및 히스타민의 방출량을 측정하였다. 그 결과 compound 48/80, 오브알부민, 콩단백질, 산양유 유청 단백질 등은 대조군과 비교할 때 TNF-α 및 히스타민 방출량이 유의적으로 증가하였으나 ( $p < 0.01$ ) 산양유 A2 β-케이신 분말은 대조군과 큰 차이가 나타나지 않는 것을 볼 때, 산양유 A2 β-케이신 분말은 저알러지성의 기능성 식품소재로서 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

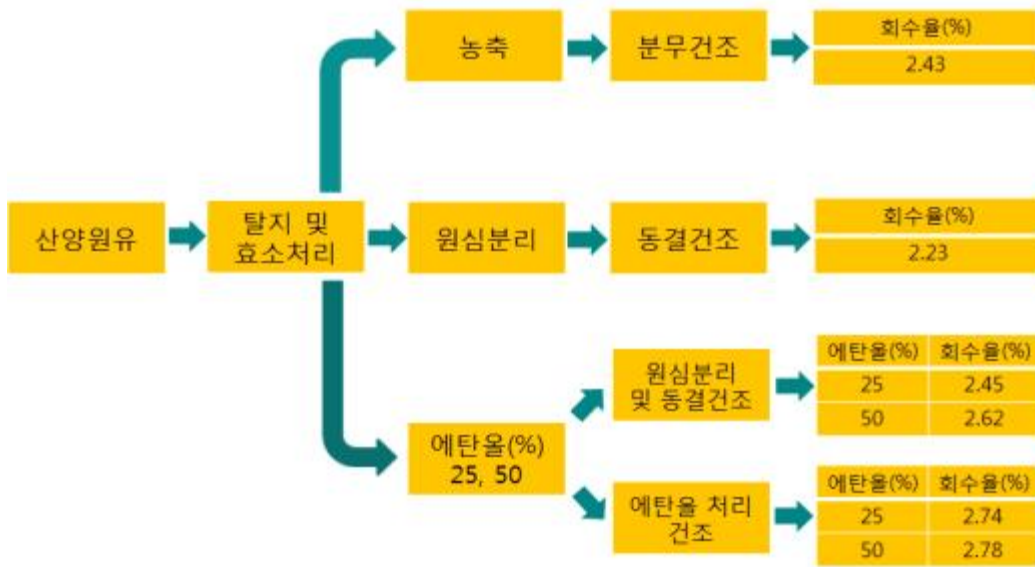


그림 15. 다양한 회수 방법에 따른 산양유 A2 β-케이스신 분말의 회수율의 변화

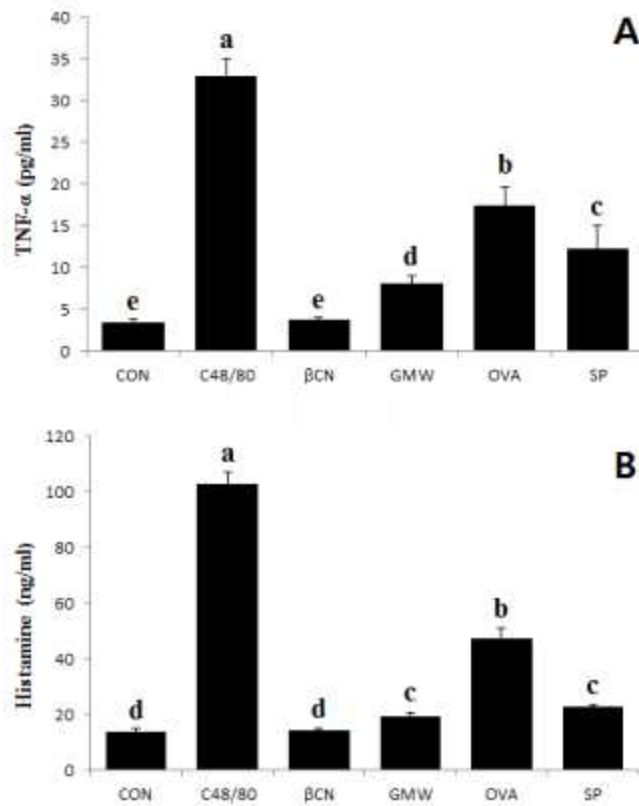


그림 16. Human mast cell line을 이용한 TNF-α 및 Histamin 방출량 측정. (A) TNF-α, (B) Histamin. (CON) 대조군, (C48/80) compound 48/80, (βCN) 산양유 A2 β-케이스신 분말, (GMW) 산양유 유청 단백질, (OVA) 난백 단백질, (SP) 콩단백질.

○ 산양유 단백질 소재들의 아미노산 조성 분석 및 영양성 평가

1차년도 및 2차년도에 개발된 산양유 소재들의 대량생산 공정을 최적화하여 HGMP 및 A2  $\beta$ -casein을 생산하였고, 개발된 소재들의 일반성분 및 아미노산 조성을 분석한 결과는 표 2 & 3과 같다. 개발된 HGMP 및 A2  $\beta$ -casein 소재들의 단백질 함량은 각각 34.86% 및 42.03%였으며, 2종의 소재 모두 필수아미노산 중 leucine (9.50% & 11.91%)과 valine (7.01% & 9.83%)이 가장 많이 함유되어 있었고 비필수 아미노산 중 proline (12.12% & 17.71%)과 glutamine (22.46% & 9.83%)이 가장 높은 수치를 보였다. 특히, leucine과 valine은 branched-chain amino acids라고 알려져 있으며 인슐린 저항성 및 저알부민혈증을 개선시킬 뿐만 아니라 단백질 합성 및 환자들의 회복에 도움이 되기 때문에 영양학적으로 매우 큰 가치가 있다.

표 2. 산양유 단백질 소재들의 일반성분

Nutrient (%)	HGMP	A2 $\beta$ -casein
Crude protein	34.86 $\pm$ 0.46	42.03 $\pm$ 0.73
Fat	0.93 $\pm$ 0.12	0.90 $\pm$ 0.22
Ash	9.13 $\pm$ 0.12	48.97 $\pm$ 0.02
Moisture	2.35 $\pm$ 0.10	5.52 $\pm$ 0.36
Carbohydrate	52.73 $\pm$ 0.55	2.59 $\pm$ 0.62

Values are means  $\pm$  SEM. HGMP, 산양유 단백질 가수분해물.



표 3. 산양유 단백질 소재들의 아미노산 조성

Amino acid	Composition	
	(% of total amino acid)	
	HGMP	A2 β-casein
Essential		
Histidine	3.78	4.62
Threonine	5.82	6.40
Valine	7.01	9.83
Methionine	1.86	2.01
Isoleucine	4.80	6.48
Leucine	9.50	11.91
Phenylalanine	4.17	5.81
Tryptophan	0.00	0.00
Lysine	4.66	5.73
Total essential amino acid	41.59	52.79
Non-Essential		
Cystein	0.84	0.30
Asparagine	7.74	1.34
Glutamine	22.46	9.83
Serine	5.71	5.88
Glycine	1.93	1.79
Arginine	2.35	3.43
Alanine	3.54	3.80
Proline	12.12	17.71
Tyrosine	1.72	3.13
Total non-essential amino acid	54.41	47.21

HGMP, 산양유 단백질 가수분해물.

### ○ 산양유 단백질 소재들의 이화학적 특성 조사

개발된 산양유 소재들의 단백질 용해도, 유화력, 유화안정성, 점도, 수화능력 등의 이화학적 특성을 측정하여 제품 가공 적성을 조사하였고 시판되는 bovine whole casein 및 콩단백질과 비교 분석하였다. 용해도는 Bera와 Mukherjee (1989)의 방법을 일부 수정하여 수행하였다. 시료 1g을 100 mL의 증류수에 넣고 1 N HCl 또는 1 N NaOH를 이용하여 pH를 2~10으로 조정 후 상온에서 1시간동안 교반하였다. 12,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 회수하였고 Bradford 및 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 아래와 같이 계산하여 단백질 용해도를 조사하였으며 그 결과는 그림 17과 같다.

단백질 용해도 (%) = (각 pH에서 시료의 단백질 함량) / 시료내 단백질 함량 × 100.

모든 시료는 단백질의 등전점 부근인 pH 4에서 용해도가 급격하게 감소했으며 등전점에서 멀어질수록 용해도가 증가하였다. 단백질 용해도는 각 pH별로 시료들 간에 큰 차이가 나타나지 않았으나 pH 6에서 콩단백질의 단백질 용해도가 다른 시료들에 비해 유의적으로 낮게 나타났다 ( $p < 0.01$ ).



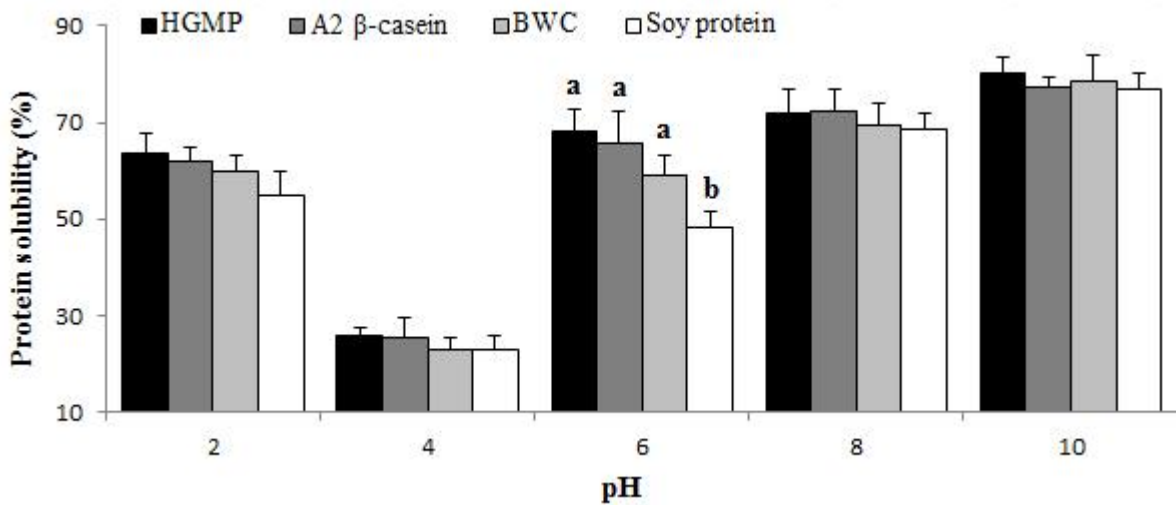


그림 17. 산양유 단백질 소재 및 상업용 단백질 소재들의 용해도. HGMP, 산양유 단백질 가수분해물; BWC, bovine whole casein.

산양유 단백질 소재들의 유화력 및 유화안정성은 Pearce와 Kinsella (1978)의 방법을 일부 수정하여 수행하였다. 각 소재의 혼합액(1%)들을 1 N HCl 또는 1 N NaOH를 이용하여 pH를 2~10으로 조정하고 카놀라유 (10%)를 혼합한 후 유화기를 이용하여 10,000 rpm에서 3분간 혼합하였다. 혼합액은 0.1% sodium dodecyl sulfate를 이용하여 100배 희석한 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였고, 유화력 및 유화안정성은 다음과 같이 계산하였다.

유화력 ( $m^2/g$ ) =  $2 \times 2.303 \times A_{500} \times D / \Phi \times \text{protein concentration (g/mL)} \times 10000$ ;  $A_{500}$  is absorbance at 500 nm,  $D$  is dilution factor ( $\times 100$ ),  $\Phi$  is the fraction of oil used to form the emulsion (0.25).

유화안정성 (min) =  $A_0 / (A_0 - A_{10}) \times 10$ ;  $A_0$  and  $A_{10}$  are the absorbance at 0 and 10 min, respectively.

모든 시료들은 pH 4에서 유화력 및 유화안정성이 감소했으며 산도 및 알칼리도가 증가할 수록 유화능력이 개선되었다 (표 4). 시료에 따른 유화력 및 유화안정성은 큰 차이를 보이지 않았으며, pH 6에서 soy protein이 다른 시료들에 비해 유화력 및 유화안정성이 낮은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

표 4. 산양유 및 상업용 단백질 소재들의 유화능력

Sample	pH	EAI (m <sup>2</sup> /g)	ESI (min)
HGMP	2	13.20 ± 0.90	78.50 ± 10.43
	4	7.93 ± 0.37	64.76 ± 12.04
	6	14.40 ± 0.38	85.18 ± 11.40
	8	19.33 ± 0.96	88.82 ± 9.27
	10	21.25 ± 1.06	89.07 ± 14.62
A2 β-casein	2	13.63 ± 1.32	80.06 ± 15.16
	4	8.98 ± 0.41	70.28 ± 8.07
	6	15.20 ± 1.24	84.04 ± 6.57
	8	17.59 ± 1.63	86.13 ± 10.08
	10	18.49 ± 1.70	86.36 ± 13.53
BWC	2	14.64 ± 1.45	83.12 ± 11.53
	4	7.87 ± 0.88	66.25 ± 3.70
	6	14.22 ± 1.43	79.64 ± 8.07
	8	18.93 ± 2.01	86.79 ± 4.23
	10	20.31 ± 1.61	88.84 ± 8.30
Soy protein	2	14.59 ± 1.40	79.86 ± 13.55
	4	8.08 ± 0.41	60.63 ± 13.23
	6	11.92 ± 0.64	68.98 ± 9.95
	8	18.25 ± 1.41	82.78 ± 8.48
	10	19.46 ± 0.89	87.05 ± 8.41

Values are means ± SEM. n=3. EAI, 유화력; ESI, 유화안정성; HGMP, 산양유 단백질 가수분해물; BWC, bovine whole casein.

각 소재들의 현탁액(10%)을 pH 2~10으로 조정한 후 DV1 Viscometer (Brookfield Ametek, USA)를 이용하여 점도를 측정하였다 (그림 18). 각 시료들의 점도는 용해도 및 유화능력의 결과와 유사한 경향을 보였으며 등전점 부근인 pH 4에서 점도가 급격하게 감소하였고, pH 4에서 멀어질수록 점도가 증가하였으나 시료간 유의적인 차이를 보이지 않았다.

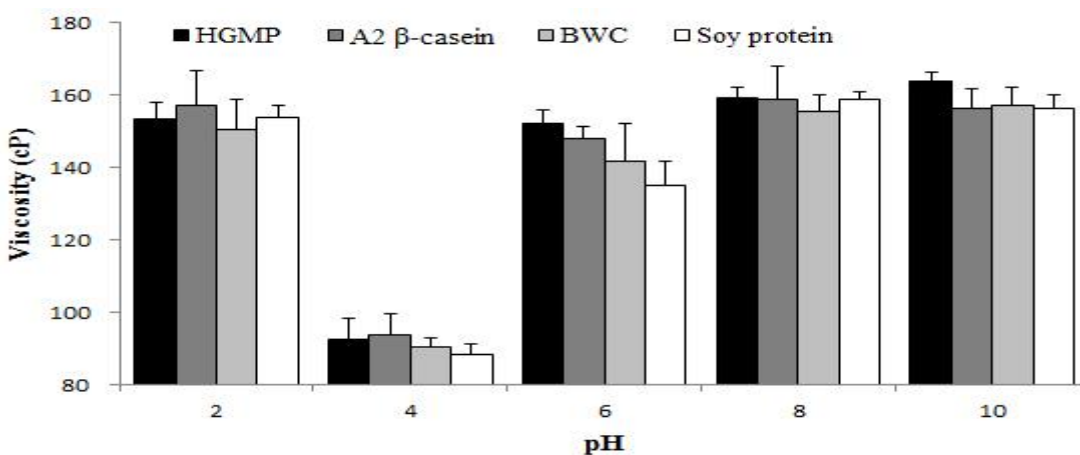


그림 18. 산양유 및 상업용 단백질 소재들의 점도. HGMP, 산양유 단백질 가수분해물; BWC, bovine whole casein.

각 시료들의 수분흡수지수는 Anderson (1982)의 방법을 일부 수정하여 진행하였다. 시료 1 g과 증류수 10 mL를 튜브에 넣고 흔들어주면서 상온에서 30분간 방치시킨 후 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거하고 침전물의 무게를 측정하여 시료 1 g에 흡수된 수분함량 (g)으로 수분흡수지수를 계산하였고, 그 결과 다른 시료들과 비교할 때 soy protein의 수분흡수지수가 가장 높게 나타났다 (그림 19).

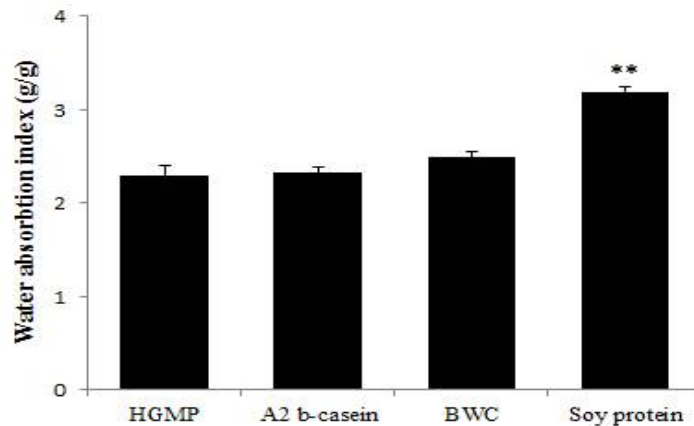


그림 19. 산양유 및 상업용 단백질 소재들의 수분흡수지수 ( $p < 0.01$ ). HGMP, 산양유 단백질 가수분해물; BWC, bovine whole casein.

#### ○ 산양유 단백질 소재 함유 환자식 식품의 물성과 저장 중 안정성 평가

주관기관에서 개발한 산양유 단백질 소재 함유 환자식 3종 (당뇨식 요구르트, 일반 환자식, 고단백 환자식)을 공급받아 물성 및 저장 중 안정성을 평가하였다. 개발된 환자식들의 물성을 조사하기 위해 DV1 Viscometer (Brookfield Ametek, USA)를 이용하여 점도를 측정된 결과는 그림 20과 같다. 당뇨식 요구르트의 점도는 2주간 큰 변화가 없었으나 3주 뒤에 급격하게 상승하여 유의적인 차이를 보였고 ( $p < 0.01$ ), 일반 및 고단백 환자식의 점도는 8주의 저장기간 동안 큰 변화가 없었다.

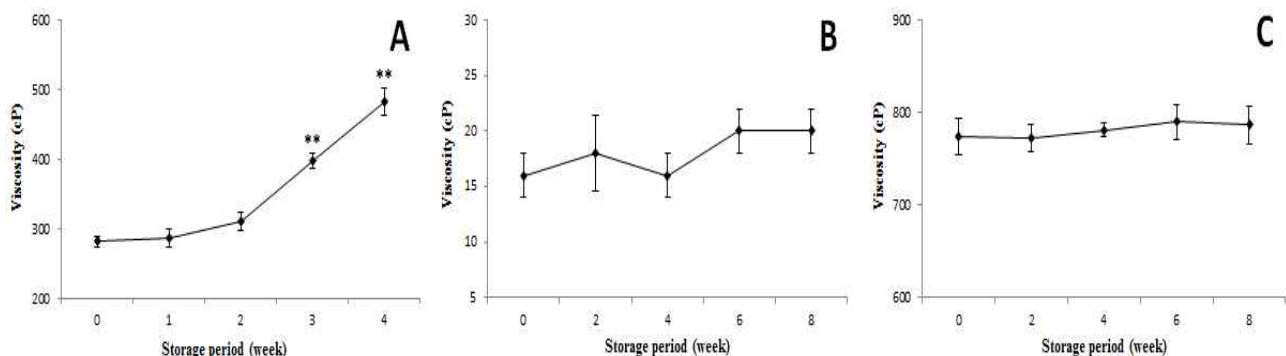


그림 20. 산양유 단백질 소재 함유 환자식들의 점도변화 ( $p < 0.01$ ). A, 당뇨식 요구르트; B, 일반 환자식; C, 고단백 환자식.

제조된 환자식 식품들의 저장 중 안정성을 평가하기 위하여 저장 기간 중 pH 변화를 측정하였

고 일반세균, 대장균, 곰팡이 검출 여부를 조사하였으며 당노식 요구르트는 유산균수를 추가로 측정하였다. 각 환자식 제품들의 특성을 고려하여 당노식 요구르트는 4°C에 저장하며 4주 동안 보관하였고, 일반 및 고단백 환자식은 25°C 및 37°C에서 8주간 저장하였다.

당노식 요구르트내 유산균수는 MRS agar를 이용하여 pour plate 방법으로 37°C에서 48시간 배양한 후 형성된 colony 수를 측정하였으며 그 결과는 그림 21과 같다. 당노식 요구르트내 유산균수는 2주간 큰 변화가 없었으나 3주 후부터 유의적으로 감소하였다 ( $p < 0.01$ ).

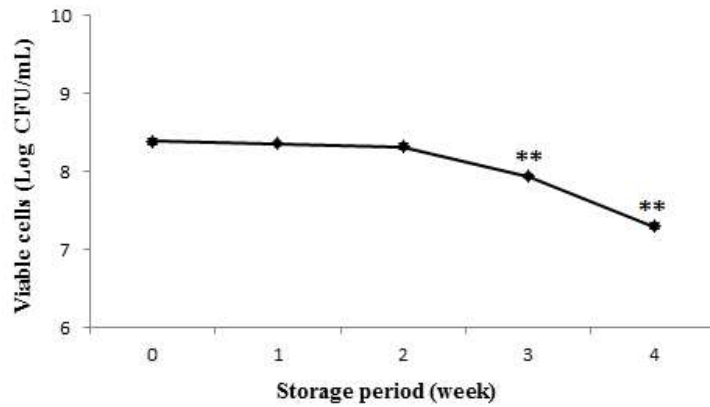


그림 21. 저장 기간에 따른 당노식 요구르트의 유산균 수 변화 ( $p < 0.01$ ).

개발된 환자식 제품들의 pH 변화를 측정된 결과는 그림 22와 같다. 당노식 요구르트는 저장 기간이 길어짐에 따라 pH가 감소하는 양상을 보였으며 특히 4주 뒤 pH가 유의적으로 감소하였고 ( $p < 0.05$ ), 일반 및 고단백 환자식은 25°C에 저장시 8주간 저장 기간 동안 pH의 큰 변화가 없었으나 37°C에서 저장할 때 2주 뒤 부터 pH가 유의적으로 감소하였다 ( $p < 0.01$ ).

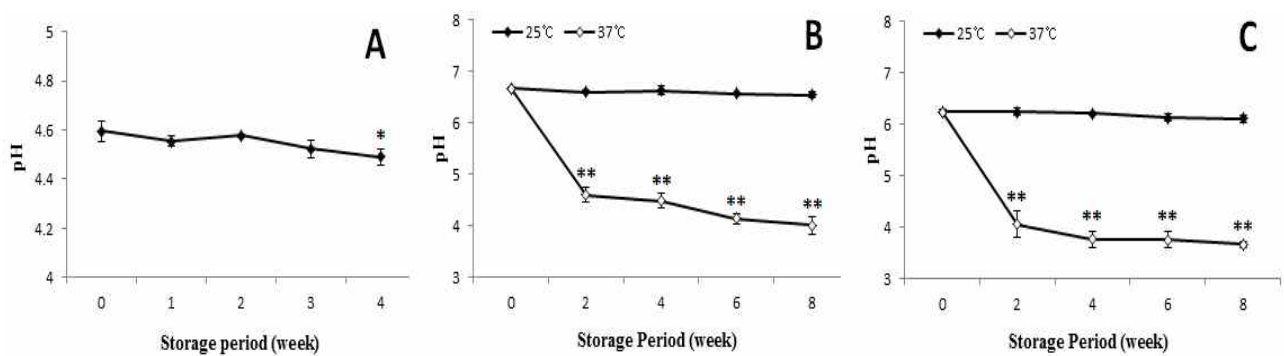


그림 22. 저장 기간에 따른 환자식 제품들의 pH 변화 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). A, 당노식 요구르트; B, 일반 환자식; C, 고단백 환자식.

제조된 환자식 제품들의 일반세균, 대장균, 곰팡이 수를 측정하기 위해 각각 plate count agar, MacConkey agar, potato dextrose agar를 이용하여 pour plate 법으로 37°C에서 24시간 동안 배양하였고, 생성된 colony 수를 계측한 결과는 표 5와 같다. 대장균은 모든 처리구에서 검출되지

않았으나 일반세균 및 곰팡이 수는 제품 및 저장 조건에 따라 다른 경향을 보였다. 당뇨식 요구르트는 4주간의 저장 기간동안 곰팡이가 검출되지 않았으며 일반세균은 3주까지 검출되지 않았으나 4주동안 저장했을시 약  $4.33 \times 10^4$  cells/mL가 검출되었다. 일반 및 고단백 환자식은 25°C에서 저장할 경우 8주 동안 일반 세균 및 곰팡이가 검출되지 않았으나 37°C에서 저장할 경우 2주 뒤부터 각각 약  $4.53 \times 10^4$  cells/mL 및  $1.90 \times 10^5$  cell/mL의 일반세균이 검출되었고, 8주 후에는 약  $7.50 \times 10^5$  cells/mL 및  $9.37 \times 10^5$  cells/mL 까지 증가하였다. 곰팡이 수는 일반 및 고단백 환자식을 37°C에서 저장했을 때 6주 뒤부터 각각 약  $3.00 \times 10^4$  cells/mL 및  $3.67 \times 10^4$  cells/mL가 검출되었으며 8주 후에는  $4.67 \times 10^4$  cells/mL 및  $6.33 \times 10^4$  cells/mL가 검출되었다. 결론적으로 산양유 단백질 소재들을 첨가한 환자식 제품들의 물성, pH, 미생물학적 변화양상 등을 확인한 결과 당뇨식 요구르트는 4°C로 저장할 때 약 2주간 안정적으로 저장할 수 있으며 일반 및 고단백 환자식은 25°C로 저장하여 최소 8주 이상 안정적으로 보관할 수 있음이 확인되었다.

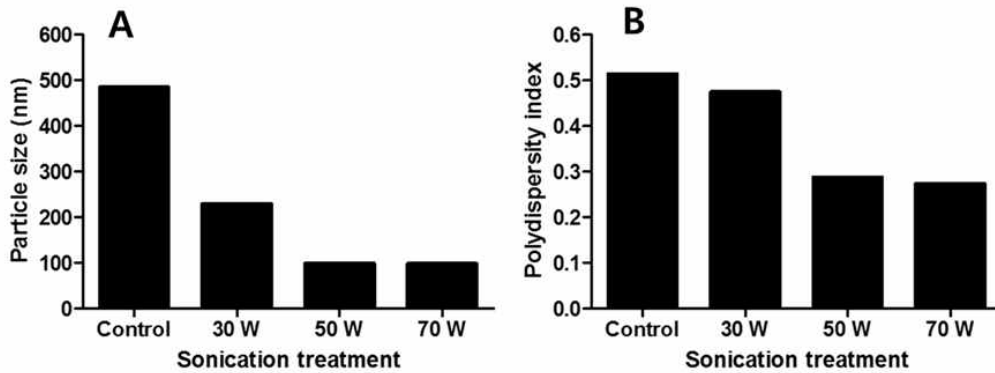
표 5. 저장 기간에 따른 환자식 제품들의 미생물학적 변화양상 (cells/mL).

Sample	Storage temperature (°C)	Storage period (week)	General bacteria	<i>Escherichia coli</i>	Fungi
A	4	0	ND	ND	ND
		1	ND	ND	ND
		2	ND	ND	ND
		3	ND	ND	ND
		4	4.33×10	ND	ND
B	25	0	ND	ND	ND
		2	ND	ND	ND
		4	ND	ND	ND
		6	ND	ND	ND
		8	ND	ND	ND
	37	0	ND	ND	ND
		2	4.53×10 <sup>4</sup>	ND	ND
		4	6.70×10 <sup>5</sup>	ND	ND
		6	7.27×10 <sup>5</sup>	ND	3.00×10
		8	7.50×10 <sup>5</sup>	ND	4.67×10
C	25	0	ND	ND	ND
		2	ND	ND	ND
		4	ND	ND	ND
		6	ND	ND	ND
		8	ND	ND	ND
	37	0	ND	ND	ND
		2	1.90×10 <sup>5</sup>	ND	ND
		4	9.07×10 <sup>5</sup>	ND	ND
		6	6.44×10 <sup>5</sup>	ND	3.67×10
		8	9.37×10 <sup>5</sup>	ND	6.33×10

Values are means. n=3. ND, not detected. A, 당뇨병 요구르트; B, 일반 환자식; C, 고단백 환자식.

○ 산양유 단백질 분해물의 물리화학적 특성 평가

제 1 협동에서 제공받은 산양유 단백질 분해물을 이용한 하이드로젤 전달체 제조에 앞서, 산양유 단백질 분해물의 물리화학적 특성평가를 실시하였다. 우선 산양유 단백질 분해물을 분산시키기 위하여 probe-type 초음파처리기 (Sonoplus HD 3100, Bandelin, Germany)를 이용하여 30, 50, 70W에서 90초간 초음파 처리하였다. 산양유 단백질 분해물의 분산정도는 입도 분석기 (particle size analyzer, Nano-ZS, Malvern, UK)를 이용하여 입자 크기와 다분산 지수 측정을 통하여 평가하였으며 그 결과는 **그림 1**에 나타내었다. 그 결과 초음파를 처리하지 않은 산양유 단백질 분해물 수용액은 약 484 nm의 크기를 지니는데 반해, 초음파 처리 강도가 30에서 50W로 증가함에 따라 약 98 nm로 감소하였다 (**그림 1A**). 입자 크기 분포가 단분산인지, 다분산인지를 나타내는 지표인 다분산 지수는 **그림 1B**에 나타내었다. 다분산지수는 0~1의 값을 가지며, 0에 가까울수록 단분산 (monodisperse), 1에 가까울수록 다분산 (polydisperse) 분포를 지님을 나타내며, 일반적으로 0.3 이하에서 균일한 (homogeneous) 입자 분포를 지닌다고 알려져 있다. 그 결과, 초음파를 처리하지 않았을 시 다분산지수 0.513으로 다분산을 나타내었으나, 50W 이상에서 초음파 처리시 0.287의 값으로 균일한 입도 분포를 나타내었다. 따라서 산양유 단백질 분해물을 이용한 다음 실험은 50W의 초음파 처리를 한 후 실시하였다.



**그림 1.** 초음파 처리 강도에 따른 산양유 단백질 분해물의 크기 (A) 및 다분산지수 (B). 산양유 단백질 분해물 수용액 (0.1%, w/v)을 30, 50, 70W에서 5분간 초음파 처리하였다.

산양유 단백질 분해물 등전위점 및 pH에 따른 표면전하는 제타전위 (zeta-potential) 측정을 통하여 평가하였다 (**그림 2**). 그 결과 산양유 단백질 분해물은 pH 6.6에서 -19.2 mV의 양전하를 나타내었으며 pH가 감소함에 따라 제타전위가 양전하로 변화하였다. Net charge가 0인 지점을 의미하는 등전위점은 약 pH 4.4로 관찰되었다.

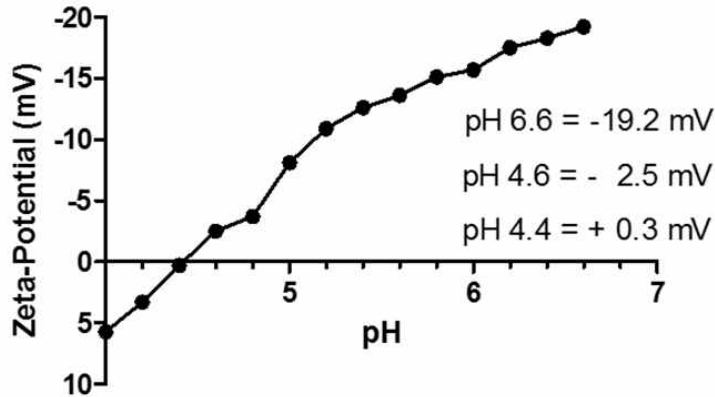


그림 2. pH에 따른 산양유 단백질 분해물 수용액의 제타 전위.

### ○ 산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤 전달체 제조 및 물리화학적 기능성 연구

본 연구에서는 통계적 모형 (factorial design)을 사용하여 제조공정요인인 pH, 가교제 농도, 산양유단백질 분해물 농도, 키토올리고당 (chitosan oligosaccharide) 농도를 조절하여 하이드로젤 전달체의 제조공정을 정립하고, 제조 공정요인에 따른 하이드로젤 전달체의 물리화학적, 형태학적 특성을 평가하였다. 또한 하이드로젤 전달체의 이용성을 극대화 할 분말화 공정을 개발하였다.

우선, 제조공정요인에 따른 하이드로젤 전달체의 형성 여부 및 형태학적 특성 (morphological properties)은 투과전자현미경 (transmission electron micrograph, TEM, Phillips TECHNAI 12, 120 kV)을 이용하여 평가하였다. 제조공정요인인 pH에 따른 하이드로젤 전달체의 물리화학적 특성은 그림 3에 나타내었다. 그 결과, pH 5.5 (그림 3D)에서 약 100 nm 크기의 구형의 형태를 지닌 하이드로젤 전달체가 성공적으로 제조되었음을 확인하였다. 따라서 추후 실험은 제조공정 요인인 pH level을 5.5로 고정하고 실시하였다.

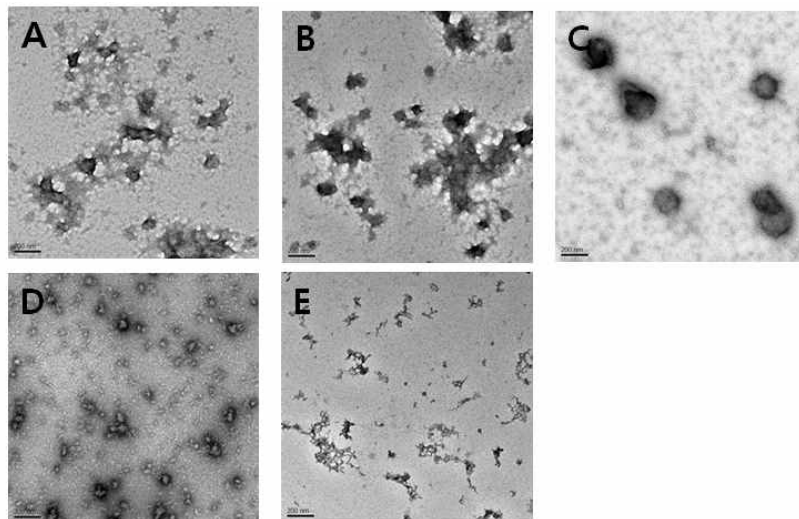
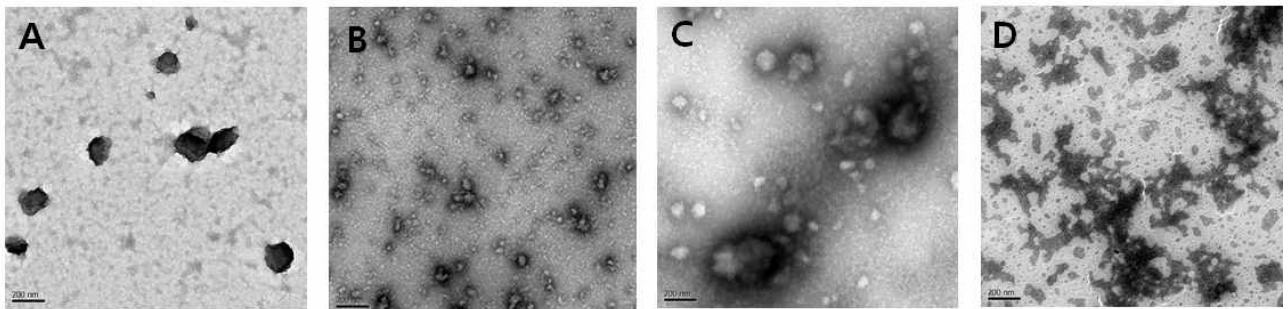


그림 3. pH에 따른 산양유 단백질 분해물 하이드로젤 전달체의 형태학적 특성. 하이드로젤 전달체는 0.1% (w/v) 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 혼합물의 pH를 각각 4.0 (A), 4.5 (B), 5.0 (C), 5.5 (D), 6.0 (E)로 조절한 다음 가교제인 TPP를 0.1 mM 처리하여 제조하였다. Scale



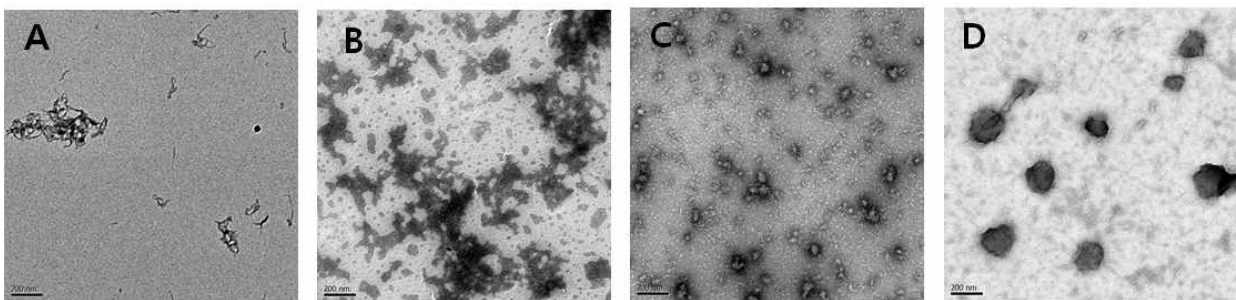
bar = 200 nm.

제조공정요인인 가교제 (sodium triphosphate, TPP) 농도에 따른 하이드로젤 전달체의 형태학적 특성은 **그림 4**에 나타내었다. 그 결과, 0 ~ 0.3 mM TPP를 처리하였을 때 구형의 전달체가 제조된 반면, 0.5 mM에서는 제조되지 않았음을 확인하였다. 또한, TPP 농도가 0과 0.3 mM일 때와 비교하여, 0.1 mM TPP를 처리하였을 시 (**그림 4B**) 가장 크기가 작고 (~ 100 nm), 입자 형태가 뚜렷한 전달체가 제조되었음을 확인하였다. 따라서 추후 실험은 0.1 mM TPP를 처리하여 진행하였다.



**그림 4.** 가교제 농도에 따른 산양유 단백질 분해물 하이드로젤 전달체의 형태학적 특성. 하이드로젤 전달체는 0.1% (w/v) 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 혼합물의 pH를 5.5로 조절한 다음 가교제인 TPP를 0 (A), 0.1 (B), 0.3 (C), 0.5 mM (D) 처리하여 제조하였다. Scale bar = 200 nm.

산양유 단백질 분해물 농도에 따른 하이드로젤 전달체의 형태학적 특성은 **그림 5**에 나타내었다. 그 결과, 산양유 단백질 분해물 농도가 0.1%, 0.2% (w/v)일 때 구형의 전달체가 제조된 반면, 0.01%와 0.05% (w/v) 농도에서는 전달체가 제조되지 않았음을 확인하였다. 또한 0.2%에 비해 0.1% 처리 시 입자 크기가 더 작고 형태가 뚜렷한 전달체가 제조되었으므로 (**그림 5C**) 추후 실험에서는 0.1% 농도로 실험을 진행하였다.



**그림 5.** 산양유 단백질 분해물 농도에 따른 하이드로젤 전달체의 형태학적 특성. 하이드로젤 전달체는 0.01 (A), 0.05 (B), 0.1 (C), 0.2% (D) (w/v) 산양유 단백질 분해물/0.1% (w/v) 키토올리고당 혼합물의 pH를 5.5로 조절한 다음 가교제인 TPP를 0.1 mM 처리하여 제조하였다. Scale bar = 200 nm.

그림 6은 키토올리고당 농도에 따른 하이드로젤 전달체의 형태학적 특성을 나타낸다. 키토올리고당농도를 0.1%로 처리하였을 시 전달체가 제조되지 않은 반면, 0.05%, 0.01%, 0.2% (w/v) 처리 농도에서는 구형의 전달체가 성공적으로 제조되었음을 확인하였다. 또한 키토올리고당 농도가 0.05%에서 0.2%로 증가함에 따라 입자 크기가 커지는 것이 관찰되었다.

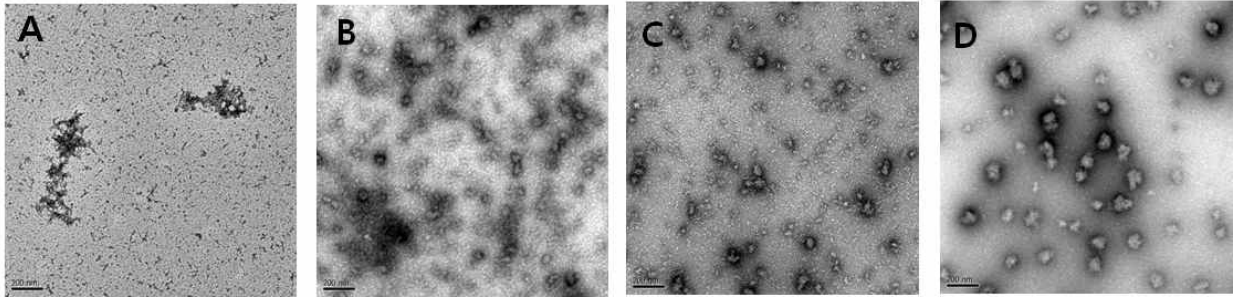


그림 6. 키토올리고당 농도에 따른 산양유 단백질 분해물 하이드로젤 전달체의 형태학적 특성. 하이드로젤 전달체는 0.1% (w/v) 산양유 단백질 분해물과 0.01 (A), 0.05 (B), 0.1 (C), 0.2% (D) (w/v) 키토올리고당 혼합물의 pH를 5.5로 조절한 다음 가교제인 TPP를 0.1 mM 처리하여 제조하였다. Scale bar = 200 nm.

결과적으로 산양유 단백질 분해물 하이드로젤 전달체가 제조되는 최종 공정 요인은 다음과 같다. 초음파 처리된 산양유 단백질 분해물 용액 (0.1%, w/v)과 키토올리고당 용액 (0.1%, w/v)를 혼합한 후 pH를 5.5로 조절한 다음 가교제인 TPP를 0.1 mM 처리후 5분간 교반하여 하이드로젤 전달체를 제조하였다., , 키토올리고당 0.1% (w/v)의 조건에서 제조하였다.

본 연구팀에서는 제조된 산양유 단백질 분해물 하이드로젤 전달체의 형태학적 특성을 3D로 관찰하기 위하여 원자현미경 (atomic force microscopy, AFM)을 이용하여 연구를 수행하였다 (그림 7). AFM 실험 결과, 약 100~200 nm 크기를 지니는 구형의 입자들이 관찰되었다. 이와 같이 투과전자현미경 및 원자현미경을 이용한 morphology test를 통해 하이드로젤 전달체가 성공적으로 제조되었음을 확인하였다.

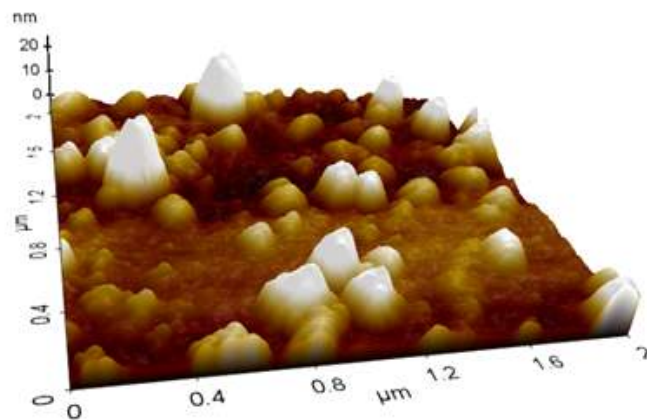
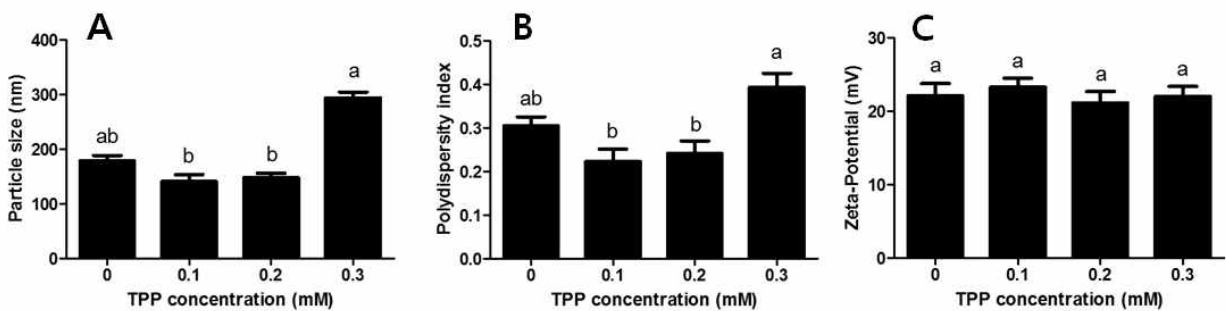


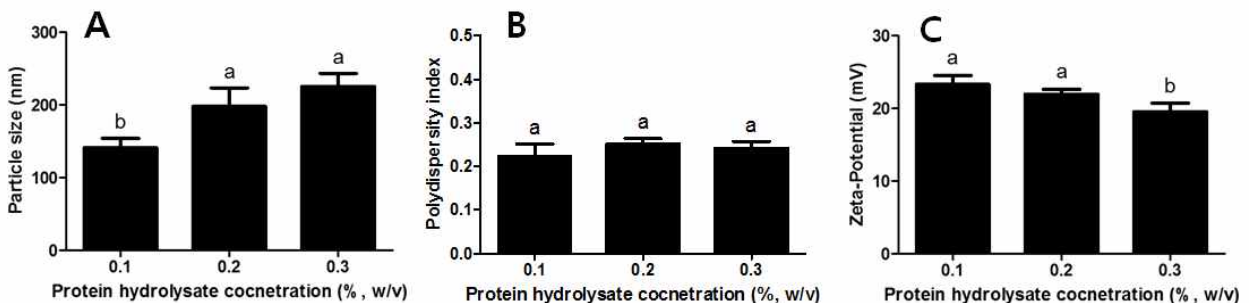
그림 7. 산양유단백질 분해물 하이드로젤 전달체의 형태학적 특성을 나타낸 원자현미경 사진. 하이드로젤 전달체는 0.1% (w/v) 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 혼합물의 pH를 5.5로 조절한 다음 가교제인 TPP를 0.1 mM 처리하여 제조하였다. Scale bar = 200 nm.

제조공정요인인 가교제 (TPP) 농도에 따른 산양유 단백질 분해물 하이드로젤 전달체의 물리화학적 특성은 **그림 8**에 나타내었다. 그 결과, TPP를 처리하지 않았을 경우 179 nm의 전달체가 제조된 반면, TPP를 0.1 mM 처리하였을 때 입자크기가 141 nm로 감소하였다 (그림 8A). 또한 TPP 처리농도가 0.1에서 0.3 mM로 증가함에 따라 입자크기가 141에서 294 nm로 유의적 ( $p<0.05$ )으로 증가하였다. 다분산지수 측정 결과, TPP를 처리하지 않았을 시 0.305의 다분산지수가 관찰된 반면, TPP를 0.1 및 0.2 mM 처리하였을 시 다분산지수 0.3 이하 (각각 0.223, 0.242)의 균일한 크기의 전달체가 형성되었음을 알 수 있었다. 그러나 TPP를 0.3 mM 처리하였을 시 다분산지수가 0.394로 증가하는 것이 관찰되었다 (그림 8B). TPP농도에 따른 제타전위 측정결과, 처리구 간 유의적인 ( $p<0.05$ ) 차이 없이 +21.0 ~ +22.3 mV의 양전하를 띠는 하이드로젤 전달체가 제조되었음을 알 수 있었다 (**그림 8C**).



**그림 8.** 가교제 농도에 따른 산양유 단백질 분해물 하이드로젤 전달체의 물리화학적 특성. 하이드로젤 전달체는 0.1% (w/v) 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 혼합물의 pH를 5.5로 조절 한 다음 가교제인 TPP를 0, 0.1, 0.3, 0.5 mM 처리하여 제조하였으며, 제조된 전달체의 입자 크기 (A), 다분산지수 (B), 제타전위 (C)를 측정하였다.

산양유 단백질 분해물 농도에 따른 하이드로젤 전달체의 물리화학적 특성은 **그림 9**에 나타내었다. 우선 입자 크기의 경우 산양유 단백질 분해물 농도가 0.1에서 0.3% (w/v)로 증가함에 따라 140에서 225 nm로 유의적으로 ( $p<0.05$ ) 증가하였다 (그림 9A). 다분산지수는 처리구간 유의적인 ( $p<0.05$ ) 차이 없이 0.3 이하의 균일한 입자가 형성되었음을 확인하였다 (그림 9B). 제타전위의 경우 산양유 단백질 분해물 농도가 0.1에서 0.3% (w/v)로 증가함에 따라 +22.3에서 +19.5 mV로 감소하였다 (그림 9C).



**그림 9.** 산양유 단백질 분해물 농도에 따른 산양유 단백질 분해물 하이드로젤 전달체의 형태

학적 특성. 하이드로젤 전달체는 0.01, 0.05, 0.1, 0.2% (w/v) 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 혼합물의 pH를 5.5로 조절한 다음 가교제인 TPP를 0.1 mM 처리하여 제조하였으며, 제조된 전달체의 입자 크기 (A), 다분산지수 (B), 제타전위 (C)를 측정하였다.

그림 10은 키토올리고당 농도에 따른 산양유 단백질 분해물 하이드로젤 전달체의 물리화학적 특성을 나타낸다. 키토올리고당 농도가 0.05에서 0.2% (w/v)로 증가함에 따라 전달체의 크기는 138에서 181 nm로 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 증가하였다 (그림 10A). 다분산 지수의 경우 처리구간 유의적인 ( $p < 0.05$ ) 차이는 보였으나, 모든 처리구에서 다분산지수 0.3이하의 균일한 크기의 전달체가 제조되었음을 알 수 있었다 (그림 10B). 키토올리고당 농도가 0.05에서 0.2% (w/v)로 증가함에 따라 제타전위는 +20.6에서 +26.1 mV로 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 증가하였다 (그림 10C).

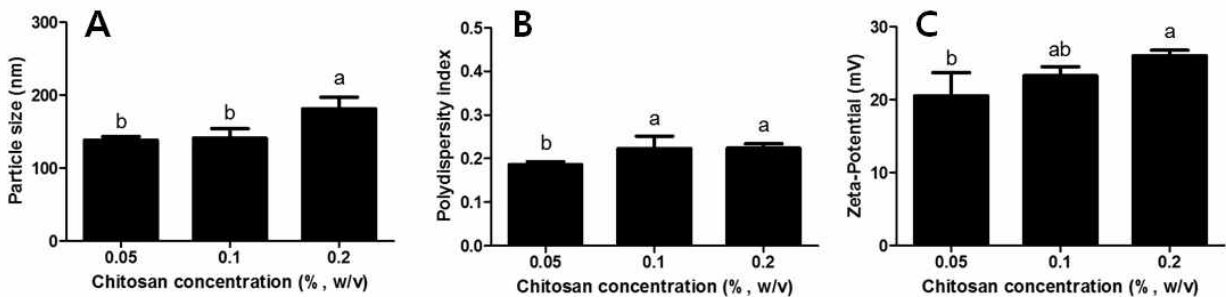


그림 10. 키토올리고당 농도에 따른 산양유 단백질 분해물 하이드로젤 전달체의 형태학적 특성. 하이드로젤 전달체는 0.1% (w/v) 산양유 단백질 분해물과 0.01, 0.05, 0.1, 0.2% (w/v) 키토올리고당 혼합물의 pH를 5.5로 조절한 다음 가교제인 TPP를 0.1 mM 처리하여 제조하였으며, 제조된 전달체의 입자 크기 (A), 다분산지수 (B), 제타전위 (C)를 측정하였다.

제조된 산양유 단백질 분해물 하이드로젤 전달체의 제품적용성 증진을 위한 분말화 공정은 동결건조기를 이용하여 실시하였으며, 동결건조 전,후의 입자크기 및 다분산 지수 측정을 통해 분말화 효율을 평가하였다 (그림 11). 그 결과, 동결방지제 사용 없이 제조된 하이드로젤 전달체 현탁액이 성공적으로 동결건조 후 물에 재분산 되는 것을 확인하였다. 성공적인 분말화 공정 여부 확인을 위해 동결건조 전 (141 nm)과 비교하여 동결건조 후 (144 nm) 하이드로젤 전달체의 크기를 비교한 결과 유의적인 ( $p < 0.05$ ) 차이를 나타내지 않았다 (그림 11A). 다분산지수의 경우에도 동결건조 전,후의 유의적인 ( $p < 0.05$ ) 차이 없이 0.3 이하의 균일한 크기의 전달체가 관찰되었다 (그림 11B). 즉, 하이드로젤 전달체는 동결건조 후에도 균일한 입자 크기와 분포를 유지하였으며, 따라서 본 연구에서는 제조된 산양유 단백질 분해물 하이드로젤 전달체의 분말화 공정을 성공적으로 확립하였다.

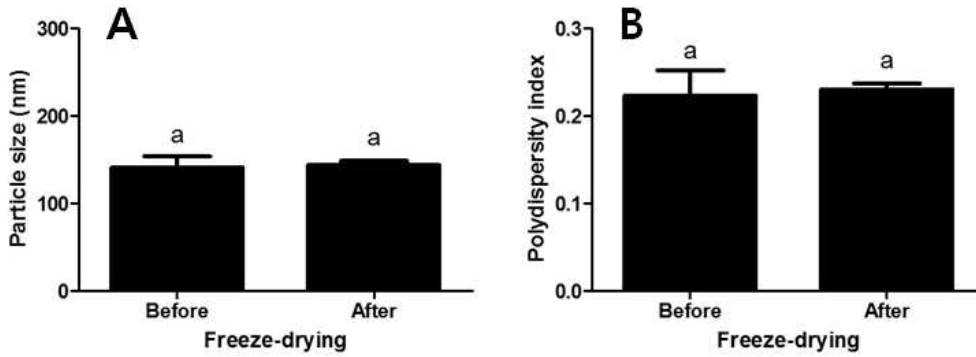


그림 11. 동결건조 전, 후의 하이드로젤 전달체의 입자크기 (A) 및 다분산지수 (B). 하이드로젤 전달체는 0.1% (w/v) 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 혼합물의 pH를 5.5로 조절한 다음 가교제인 TPP를 0.1 mM 처리하여 제조하였다.

○ A2 β-케이스인 소재를 이용한 하이드로젤 전달체의 생리활성물질 이용성 극대화 및 안전성 평가

제 1 협동에서 제공받은 A2 β-케이스인 소재를 이용한 하이드로젤 전달체는 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 하이드로젤 전달체는 통계적 모형을(factorial design) 이용하여 제조공정요인(키토올리고당 농도, 저온 열처리 온도)에 따른 하이드로젤 전달체의 물리화학적 특성을 평가하고, 생리활성 물질인 레스베라트롤(resveratrol)의 포집 효율과 위장관 내 in vitro release를 평가하였다. 또한 사람 장 상피세포주(Caco-2 cell)을 이용하여 세포 내 안전성 평가를 실시하였다.

제조 공정요인인 A2 β-케이스인 농도, 열처리 온도에 따른 하이드로젤 전달체의 물리화학적 특성(입자 크기, 다분산지수, 제타전위)은 입도 분석기(particle size analyzer, Nano-ZS, Malvern, UK)를 이용하여 평가하였다 (그림 12). 그 결과 키토올리고당 농도가 0.1에서 0.3%로 증가함에 따라 입자 크기가 약 162에서 246 nm로 유의적으로( $p < 0.05$ ) 증가하였다. 다분산지수의 경우 키토올리고당 농도에 따른 유의적인 차이 없이 모두 0.3 이하로 균일한 입도 분포를 지니는 전달체가 제조되었음을 확인하였다. 제타전위는 키토올리고당 농도가 0.1에서 0.3%로 증가함에 따라 +18.4에서 +21.8 mV로 유의적으로( $p < 0.05$ ) 증가하였다. 즉, 제조된 전달체는 양(positive)의 표면전하를 지니는 것을 알 수 있었고, 양전하를 띠는 키토올리고당 농도가 증가함에 따라 제조된 전달체의 양전하가 증가함을 알 수 있었다.

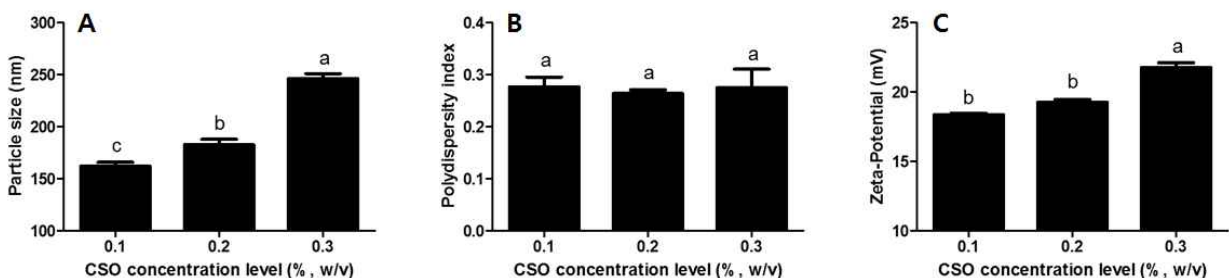
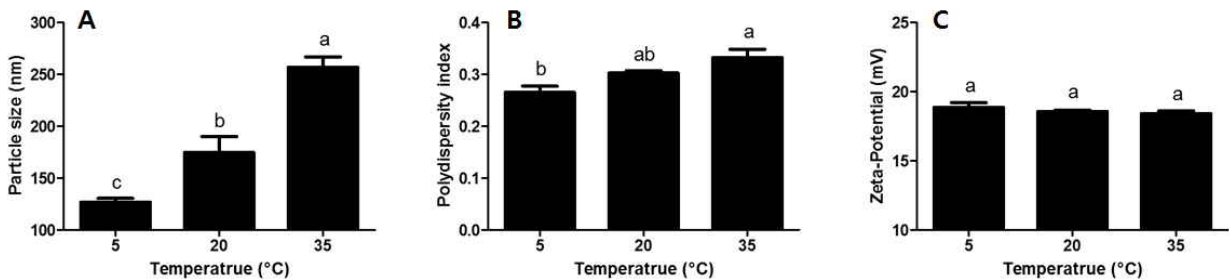


그림 12. 키토올리고당 농도에 따른 A2 β-케이스인/키토올리고당 하이드로젤 전달체의 물리화



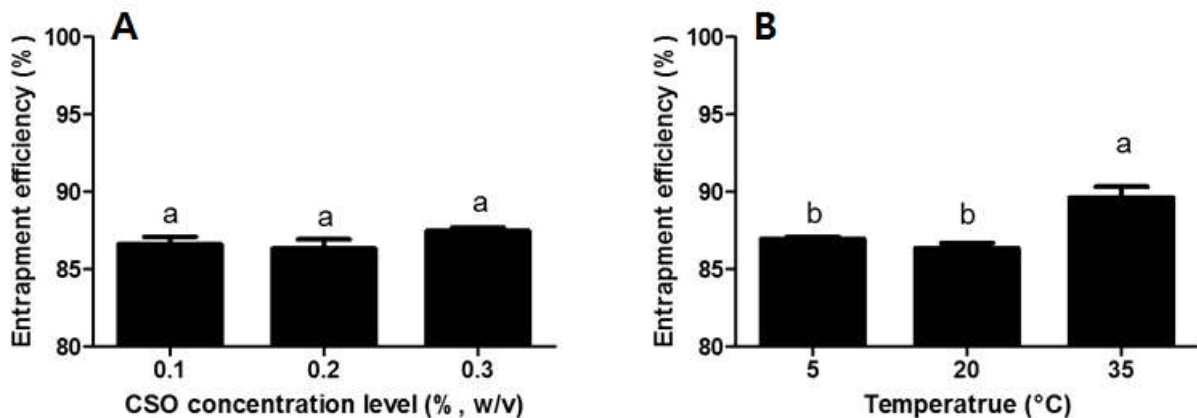
학적 특성. 하이드로젤 전달체는 0.1% (w/v) A2  $\beta$ -케이신/ 0.1, 0.2, 0.3% (w/v) 키토올리고당 혼합물의 pH를 3.5로 조절한 다음 실온(~25°C)에서 30분간 교반 후 가교제인 TPP를 0.1 mM 처리하여 제조하였으며, 제조된 전달체의 입자 크기 (A), 다분산지수 (B), 제타전위 (C)를 측정하였다.

저온 열처리 온도에 따른 A2  $\beta$ -케이신/키토올리고당 하이드로젤 전달체의 물리화학적 특성 (입자 크기, 다분산지수, 제타전위)은 **그림 13**에 나타내었다. 그 결과 열처리 온도가 5에서 35°C로 증가함에 따라 전달체의 크기가 약 127에서 257 nm로 유의적으로( $p < 0.05$ ) 증가하였다. 다분산 지수의 경우 열처리 온도가 5에서 35°C로 증가함에 따라 0.265에서 0.333으로 유의적으로 증가하였다. 제타전위는 열처리 온도에 따른 유의적인 차이 없이 약 +18.4 ~ 18.9 mV 값이 측정되었고, 이를 통해 제조된 하이드로젤 전달체는 양전하를 띠는 것을 알 수 있었다.



**그림 13.** 열처리 온도에 따른 A2  $\beta$ -케이신/키토올리고당 하이드로젤 전달체의 물리화학적 특성. 하이드로젤 전달체는 0.1% (w/v) A2  $\beta$ -케이신/ 0.1 (w/v) 키토올리고당 혼합물의 pH를 3.5로 조절한 다음 5, 20, 35°C에서 각각 30분간 열처리 후 가교제인 TPP를 0.1 mM 처리하여 제조하였으며, 제조된 전달체의 입자 크기 (A), 다분산지수 (B), 제타전위 (C)를 측정하였다.

제조공정요인에 따른 레스베라트롤의 포집효율(entrapment efficiency)을 측정한 결과는 **그림 14**에 나타내었다. 그 결과, 레스베라트롤의 포집 효율은 키토올리고당 농도에 따른 유의적인 차이 없이 약 88%의 포집 효율을 나타내었다. 반면, 저온 열처리온도가 5에서 35°C로 증가함에 따라 레스베라트롤의 포집 효율이 약 87에서 ~90%로 유의적으로( $p < 0.05$ ) 증가하였다.



**그림 14.** 키토올리고당 농도 (A) 및 저온 열처리 온도 (B)에 따른 전달체 내 resveratrol의 포집 효율.

가상의 위장관 조건에서 포집된 레스베라트롤의 *in vitro* release는 그림 4와 5에 나타내었다. 가상의 위 조건에서 키토올리고당 농도에 따른 레스베라트롤의 release를 평가 한 결과(그림 15A), 키토올리고당 농도가 0.1에서 0.3%로 증가함에 따라 release 된 레스베라트롤 함량이 낮은 것을 알 수 있었다. 또한 가상의 위 조건에서 30분간 배양시 전달체 내 포집된 레스베라트롤은 release 되지 않는 것으로 보아 위 조건에서 전달체는 포집된 레스베라트롤을 효율적으로 보호할 수 있음을 알 수 있었다. 장 조건에서 release 되는 레스베라트롤의 양 또한 키토올리고당 농도가 0.1에서 0.3으로 증가함에 따라 줄어드는 것을 알 수 있었고, 배양시간 30분까지는 release 되지 않다가 배양 60분 부터 120분 까지 레스베라트롤의 release가 증가하는 것이 관찰되었다(그림 15B).

저온 열처리 온도에 따른 가상의 위장관 조건에서 레스베라트롤의 release를 평가한 결과는 그림5에 나타내었다. 그 결과 5°C와 20°C에 비해 35°C 열처리 조건에서 더 적은 양의 레스베라트롤이 release 되는 것이 관찰되었다 (그림 16A). 또한 모든 온도 조건에서 제조된 전달체 내에 포집된 레스베라트롤은 위 조건에서 30분간 배양하여도 release 되지 않는 것이 관찰되어 위 조건에서 전달체 이용시 레스베라트롤을 효과적으로 보호 할 수 있음을 알수있었다. 장 조건에서 또한 35°C 처리구에서 더 적은 양의 레스베라트롤이 release 되는 것이 관찰되었고, 배양시간 60분 부터 120분 까지 레스베라트롤이 서서히 release 되는 것을 알 수 있었다 (그림 16B).

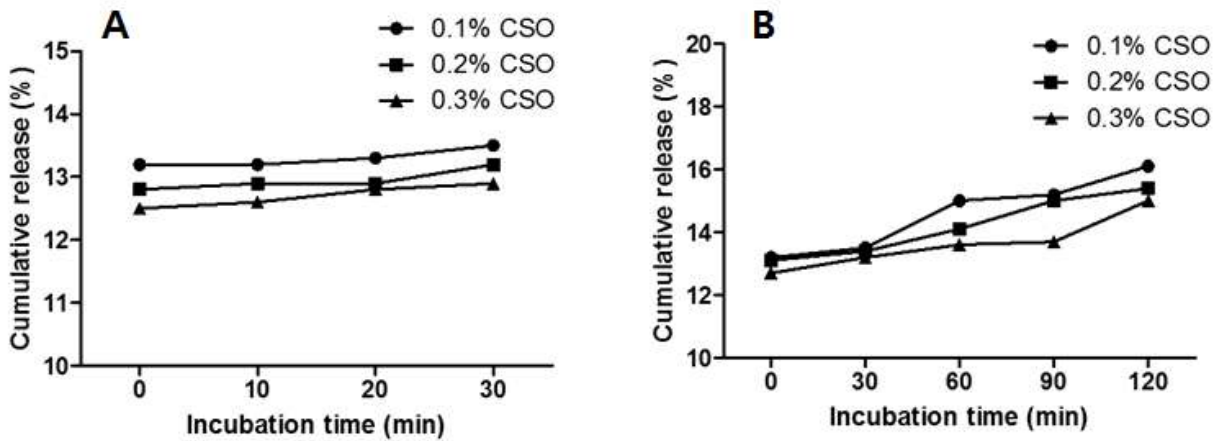


그림 15. 키토올리고당 농도에 따른 A2  $\beta$ -케이신/키토올리고당 하이드로젤 전달체 내 포집된 resveratrol의 가상의 위 (A) 및 장 조건 (B)에서의 *in vitro* release.

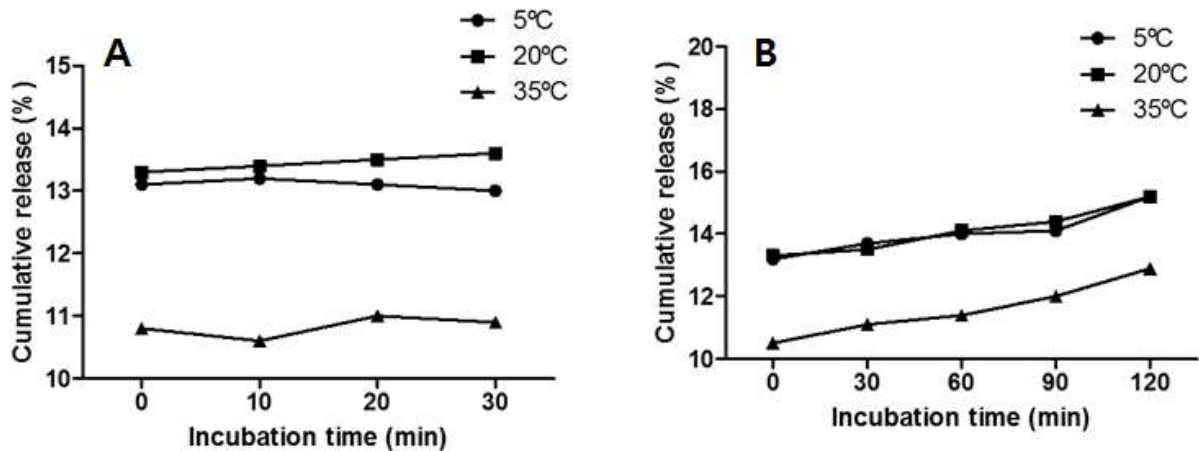


그림 16. 열처리 온도에 따른 A2  $\beta$ -케이신/키토올리고당 하이드로젤 전달체 내에 포집된 resveratrol의 가상의 위 (A) 및 장 조건 (B)에서의 in vitro release.

제조된 A2  $\beta$ -케이신/키토올리고당 하이드로젤 전달체의 세포 내 독성 평가는 장 상피세포주 (Caco-2 cell)를 이용하여 실시하였다. 다양한 농도 (100 - 500  $\mu\text{g/mL}$ )의 전달체를 다양한 배양시간 (1 ~ 4 h)동안 처리한 후 control과 세포 생존율을 비교한 결과, 처리구 사이에 유의적인 차이 없이 세포 생존율을 유지하는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 연구를 통해 개발된 A2  $\beta$ -케이신/키토올리고당 하이드로젤 전달체는 세포 내 독성을 지니지 않음을 알 수 있었다 (그림 17).

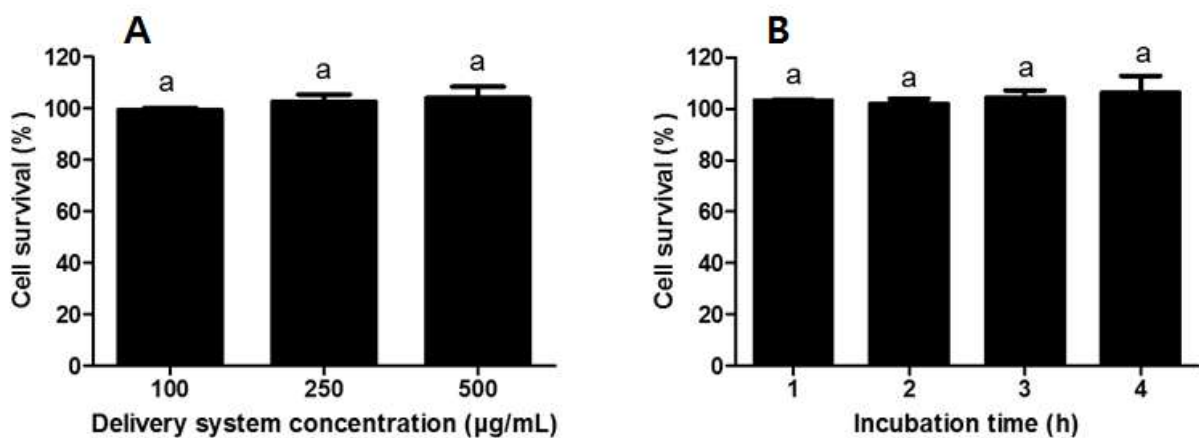


그림 17. 전달체 농도 (A) 및 배양 시간 (B)에 따른 A2  $\beta$ -케이신/키토올리고당 하이드로젤 전달체의 Caco-2 cell 내 세포 생존율 평가.

### ○ 하이드로젤 나노 전달체의 산양유 유래 질환별 맞춤형 환자식 적용 공정 개발 및 물리적 기능성 연구

1차 및 2차 년도 과제를 통해 제조된 하이드로젤 나노 전달체의 산양유 유래 질환별 맞춤형 환자식 적용 공정 및 물리적 기능성 평가는 다음과 같이 실시하였다. 우선 질환별 맞춤형 환자식인 드링킹 요구르트 타입 (산양 당 플러스)과 액상타입 (그린비아)에 하이드로젤 전달체



를 적용하기 위하여, 환자식 제조에 이용되는 열처리에 따른 하이드로젤 전달체의 안정성을 평가하였다. 드링킹 요구르트 타입 제조 시 이용되는 열처리 (90°C에서 30분)과 액상타입 제조에 이용되는 열처리 (125°C에서 15분) 조건에 따른 하이드로젤 전달체의 안정성은 열처리 전 후 입자 크기와 다분산지수 측정을 통해 평가하였다 (그림 18, 19). 그 결과 산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤 나노 전달체는 열처리 전 (control)과 비교하여 열처리 후에도 입자 크기에 유의적인 변화가 관찰되지 않았으며 (그림 18A), 다분산지수 또한 0.3 이하로 균일한 입도 분포를 유지하는 것을 알 수 있었다 (그림 18B). A2  $\beta$ -카제인 유래 하이드로젤 나노 전달체 또한 열처리 전후 입자 크기와 다분산지수에 유의적인 변화가 나타나지 않은 것을 관찰하였다 (그림 19) 이를 통해 본 연구를 통해 제조된 산양유 단백질 분해물 및 A2  $\beta$ -카제인을 이용하여 제조한 하이드로젤 나노 전달체는 열처리에 대해 높은 안정성을 지녀 질환별 맞춤형 환자식에 적용 가능함을 알 수 있었다.

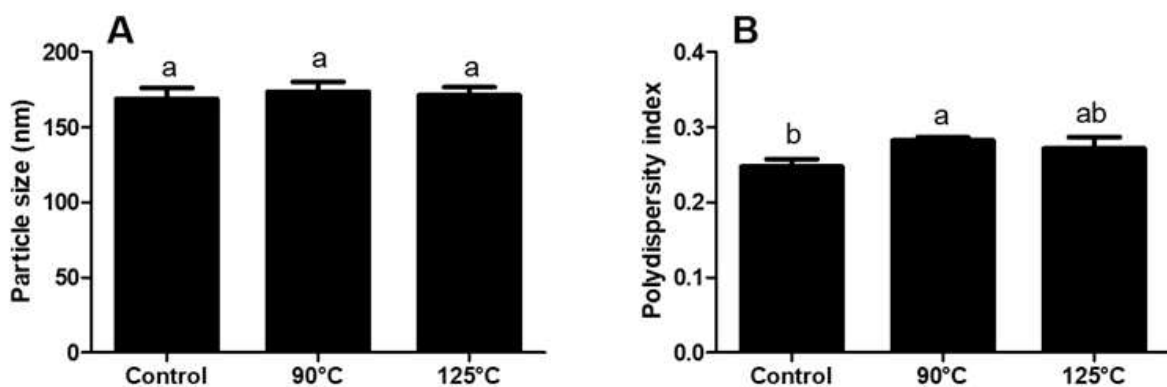


그림 18. 열처리 조건에 따른 키토올리고당/산양유 단백질 분해물 하이드로젤 나노 전달체의 입자크기 (A) 및 다분산지수 (B).

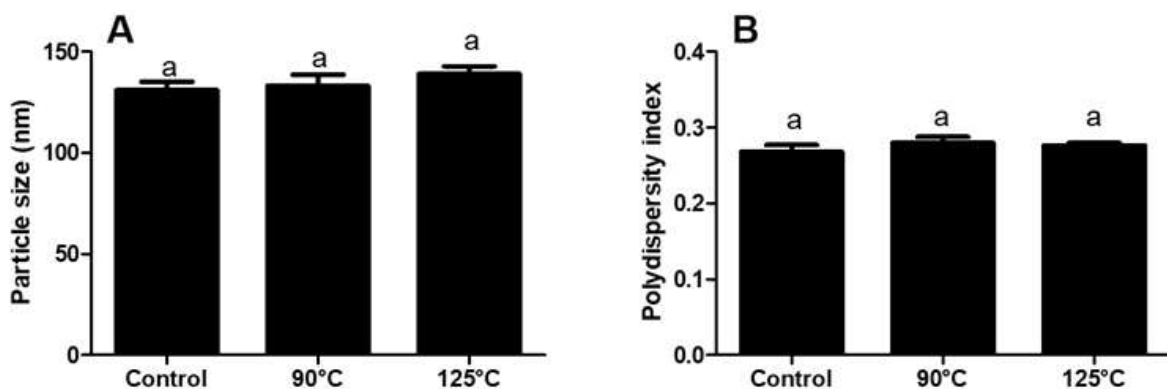


그림 19. 열처리 조건에 따른 키토올리고당/A2  $\beta$ -카제인 하이드로젤 나노 전달체의 입자 크기 (A) 및 다분산 지수 (B).

질환별 맞춤형 환자식의 저장기간에 따른 하이드로젤 나노 전달체의 안정성은 드링킹 요구르트 타입 (pH 4.8)과 액상 타입 (pH 7.0) 조건에서 2주간의 저장기간 동안 입자 크기와 다분산지수 측정을 통해 평가하였다 (그림 20, 21) 그 결과, 산양유 단백질 분해물 유래 (그림 20)

및 A2  $\beta$ -카제인 유래 하이드로젤 나노 전달체 (그림 21) 모두 14일간의 저장 기간동안 입자 크기와 다분산 지수의 유의적인 변화 없이 안정성을 유지함을 알 수 있었다. 이를 통해 본 연구에서 제조한 하이드로젤 전달체는 제조 공정 (열처리) 뿐만 아니라 저장 기간 동안 높은 안정성을 지녀 질환별 맞춤형 환자식에 적용 가능한 것을 알 수 있었다.

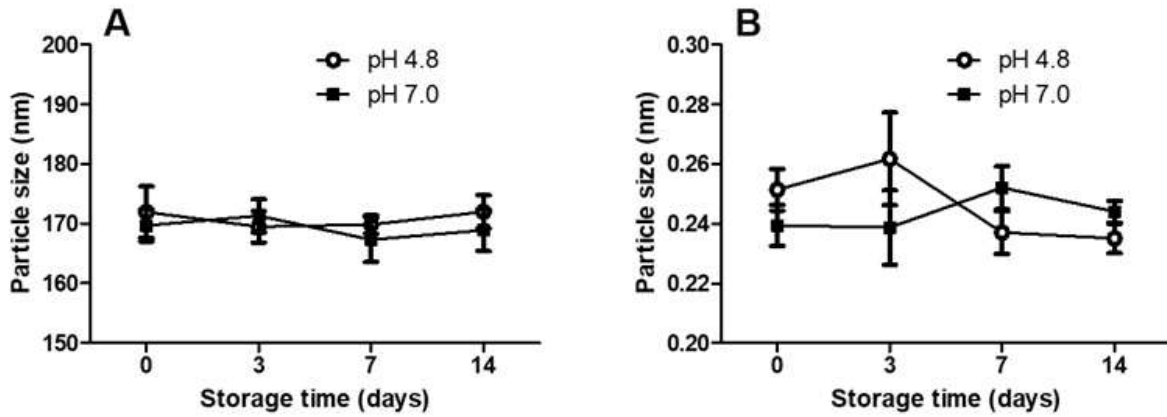


그림 20. pH에 따른 키토올리고당/산양유 단백질 분해물 하이드로젤 나노 전달체의 입자크기 (A) 및 다분산지수 (B).

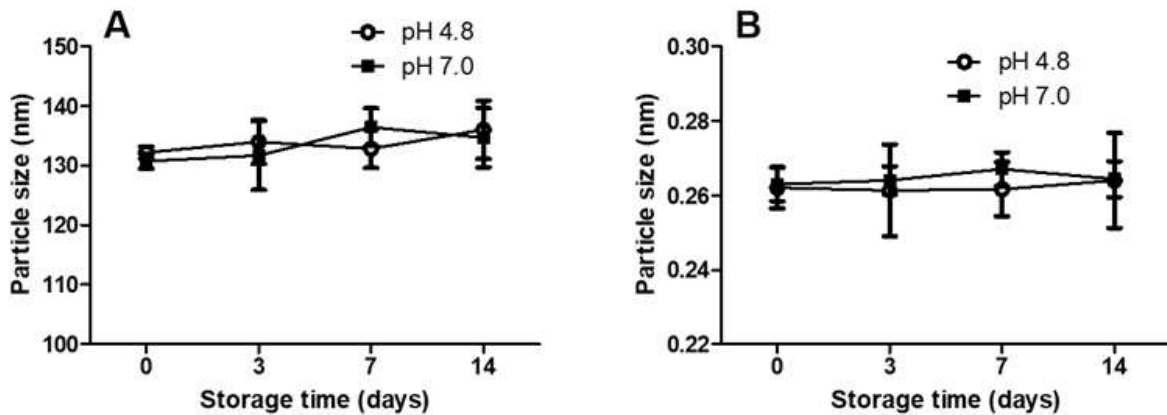


그림 21. pH에 따른 키토올리고당/A2  $\beta$ -카제인 하이드로젤 나노 전달체의 입자 크기 (A) 및 다분산 지수 (B).

하이드로젤 나노 전달체의 유화안정성 관련 기능성 평가는 유화 능력 측정을 통해 평가하였다. 하이드로젤 나노 전달체의 제조 공정 요인에 따른 유화능력은 유화 활성도 (emulsifying activity index, EAI) 측정을 통해 평가하였다 (Pearce와 Kinsella, 1978). 우선 하이드로젤 전달체 1 g을 증류수 20 mL에 용해시킨 후 오일 25 mL와 혼합한 다음 8,000 rpm에서 5분간 균질 (homogenization)하여 에멀전을 제조 하였다. 그런 다음 에멀전을 0.1% sodium dodecyl sulfate 수용액을 이용하여 5,000배 희석한 후 turbidity를 측정하였다. EAI는 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$EAI = 2T/\phi C$$

여기서, T는 turbidity,  $\phi$ 는 dispersed phase의 부피, C는 단백질 농도.

우선 산양유 단백질 분해물 농도에 따른 산양유 키토올리고당/산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤 나노 전달체의 유화 활성도 측정 결과, 산양유 단백질 분해물 농도가 0.1에서 0.3%로 증가함에 따라 하이드로젤 전달체의 유화활성도가 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 증가하였다 (그림 22A). 키토올리고당/A2  $\beta$ -카제인 하이드로젤 나노 전달체의 유화 활성도는 저온 열처리 온도가 35에서 5 $^{\circ}$ C로 감소함에 따라 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 증가하였다. 결과적으로 산양유 유래 하이드로젤 나노 전달체는 보다 높은 산양유 단백질 분해물 농도와 낮은 저온 열처리를 이용할 경우 유화 활성도가 증가 하여 질환별 맞춤형 환자식 적용성이 증진 되는 것을 확인하였다.

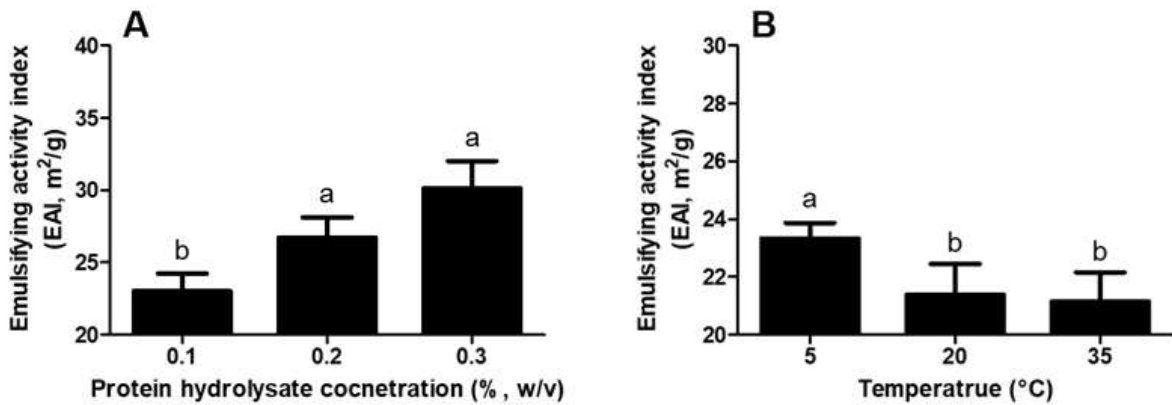


그림 22. 제조 공정 요인에 따른 산양유 유래 하이드로젤 나노 전달체의 유화 활성도. A: 산양유 단백질 분해물 농도에 따른 키토올리고당/산양유 단백질 분해물 하이드로젤 나노 전달체의 유화 활성도. B: 저온 열처리 온도에 따른 키토올리고당/A2  $\beta$ -카제인 하이드로젤 나노 전달체의 유화 활성도.

질환별 맞춤형 환자식 (드링킹 요구르트)에 천연안정제로서 하이드로젤 나노 전달체를 적용한 후 물성학적 특성 평가 결과는 그림 23과 24에 나타내었다. 그 결과 본 연구에 이용된 드링킹 요구르트 형태의 환자식은 shear rate가 0.01~600 s<sup>-1</sup>로 증가함에 따라 apparent viscosity가 감소하는 shear thinning behavior를 지니고 있었다. 또한 control에 비해 산양유 단백질 분해물 및 산양유 단백질 분해물 하이드로젤 나노 전달체를 첨가한 처리구에서 보다 높은 apparent viscosity를 나타내었다. 또한 관능평가 결과에서도 산양유 단백질 분해물 및 이를 이용한 하이드로젤 나노 전달체를 환자식 (드링킹 요구르트)에 적용 시 control에 비해 oral viscosity가 증가하는 것을 확인하였다 (그림 25). 이를 통해 산양유 단백질 유래 기능성 소재는 질환별 맞춤형 환자식의 물성학적 특성을 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

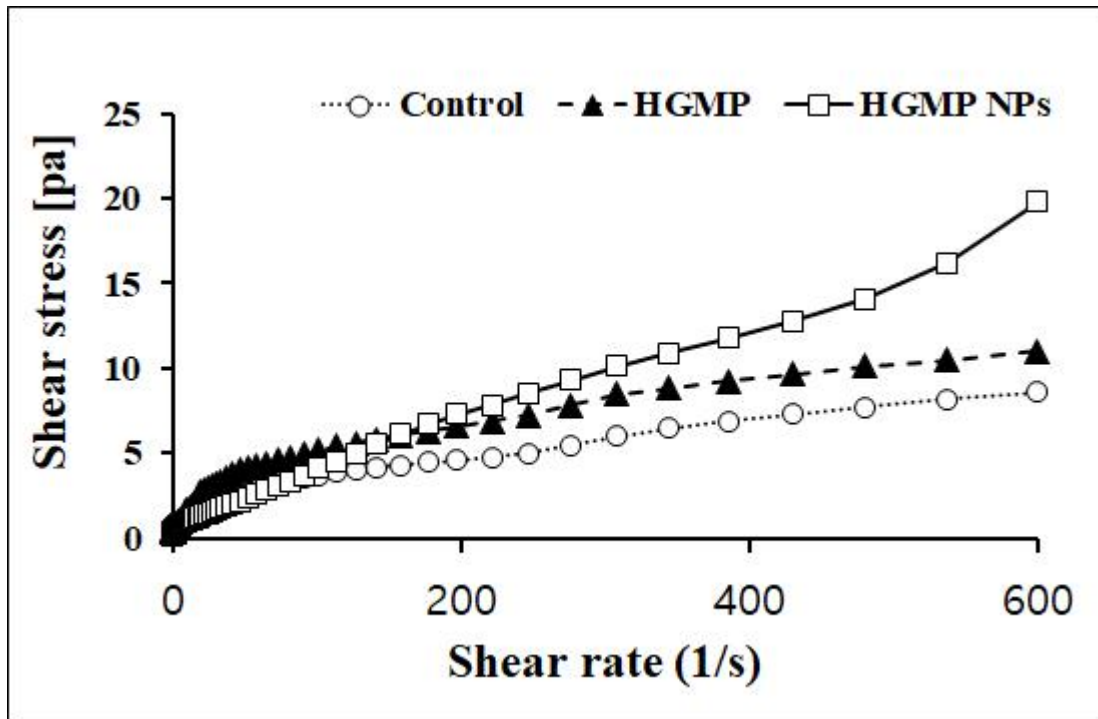


그림 23. Shear rate에 따른 산양유 단백질 소재 함유 환자식의 shear stress. Control, 산양유 단백질 첨가 드링킹 요구르트; HGMP, 산양유 단백질 분해물 2% 첨가 드링킹 요구르트; HGMP NPs, 산양유 단백질 분해물 유래 나노 전달체 2% 첨가 드링킹 요구르트.

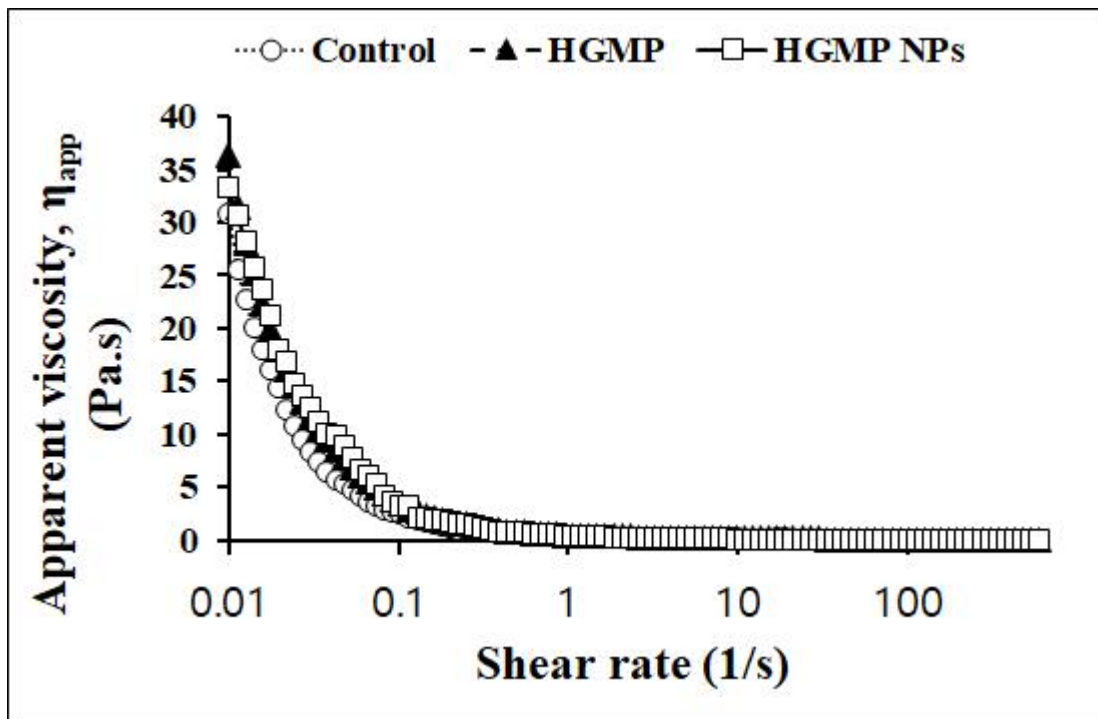


그림 24. Shear rate에 따른 산양유 단백질 소재 함유 환자식의 apparent viscosity. Control, 산양유 단백질 첨가 드링킹 요구르트; HGMP, 산양유 단백질 분해물 2% 첨가 드링킹 요구르트; HGMP NPs, 산양유 단백질 분해물 유래 나노 전달체 2% 첨가 드링킹 요구르트.

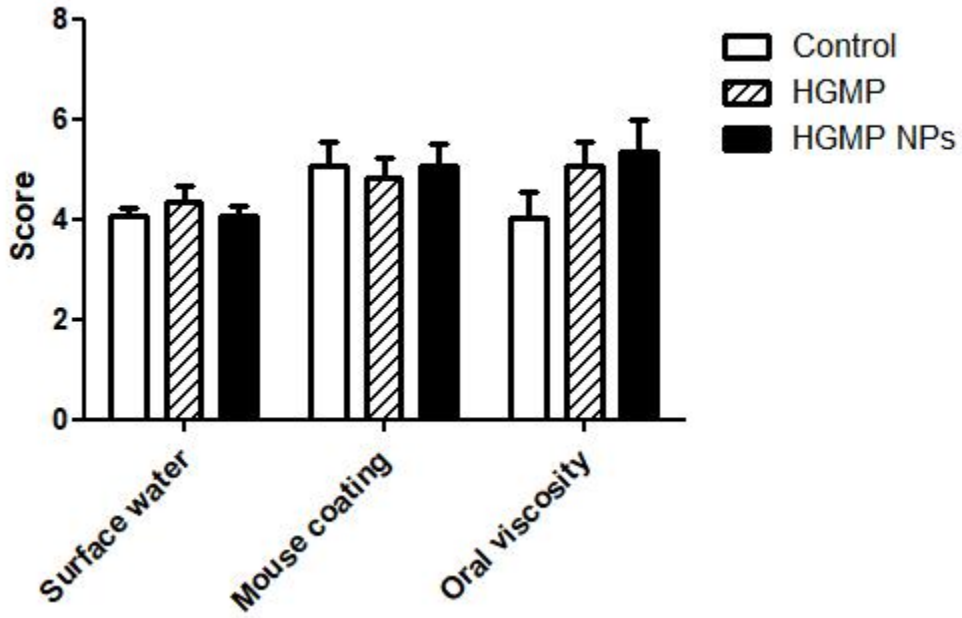


그림 25. 산양유 단백질 소재 함유 환자식의 관능평가. Control, 산양유 단백질 첨가 드링킹 요구르트; HGMP, 산양유 단백질 분해물 2% 첨가 드링킹 요구르트; HGMP NPs, 산양유

### [제3협동 : 경상대학교]

#### ○ 질환모델을 이용한 산양유 기능성소재의 작용 기전 연구

산양유 단백질 분해물 및 2차년도에 수행 될 산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤 전달체의 장관 내 흡수 작용 연구를 위해 우선, 소장상피세포의 배양시스템을 정립하였다. 본 연구에 이용된 Caco-2 cell은 약물의 흡수, 투과, 운송과 대사를 평가하는데 훌륭한 시스템으로 널리 쓰이고 있다. Caco-2 cell은 human colon adenocarcinoma로부터 유래한 세포주로 microporous filter 상에서 배양될 때 형태 및 기능적으로 사람의 소장관 상피세포와 유사성을 가진다. 이러한 특징을 기반으로 in vitro 상에서 약물의 소장흡수, p-glycoprotein inhibition study, 수송연구, 장 내 약물의 투과성, 대사 안정성 등 Caco-2 cell monolayer의 transepithelial electrical resistance (TEER) 값 등을 측정함으로써 장관 상피세포의 특성과 세포의 독성을 평가할 수 있다. Caco-2 cell을 이용한 흡수 실험을 위해서는 세포 간 (intercellular) tight junction 형성이 중요하며 이 tight junction의 형성유무는 transwell 배양 시스템에서 Apical과 basolateral 부분간의 전기저항치 (TEER, transepithelial electrical resistance,  $\Omega \times \text{cm}^2$ ) 측정을 통해 평가할 수 있다.

우선 transwell 배양 시스템 확립을 위해 Caco-2 cell (ATCC HTB-37, Manassas, VA, USA)을 High glucose dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)에 20% heat-inactivated (55°C, 30min) 20% 소 태아 혈청과 1% Penicillin-Streptomycin를 첨가한 후 37°C에서 배양하였다. 사용된 passage number는 15~26, 30~36 것을 사용하였고, 0.25% Trypsin/EDTA를 이용하여 계대배양 하였으며 배지는 2~3일에 한 번 갈아주었다. 단층 상피세포를 배양하기 위해서 6-well cell culture insert (0.4  $\mu\text{m}$  pore size, polycarbonate)의 상층부 (apical side)에  $2.2 \times 10^5$  cells/ $\text{cm}^2$  세포부유액 2 mL를 seeding 후 하층부 (basolateral side)에는 3 mL의 성장배지만 첨가한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 매 48시간 마다 배지를 교환하며 2~3주간 배양하며 분화 (differentiation)를 유도하였다. 그런 다음 Millipore의 Millicell-ERS (Electrical Resistance System) 장치를 이용하여 TEER값이 500  $\Omega \times \text{cm}^2$  이상이 되기까지 배양하였다. 성장배지 (Growth media, GM, 20% 혈청 포함)에서 배양한 다음 흡수 실험 전 무혈청 배지 (serum free media, SFM)로 교체하였다. 무혈청 배지 교체에 따른 TEER 측정 결과는 그림 1에 나타내었다. 그 결과 성장배지에서 무혈청 배지로 교체 후에도 TEER 값이 500  $\Omega \times \text{cm}^2$  이상을 유지하여 세포 간 tight junction이 형성이 유지됨을 알 수 있었다. 즉, Caco-2 세포를 이용한 transwell 시스템을 확립하였고, TEER 측정을 통한 최적 배양 조건을 확립하였다.

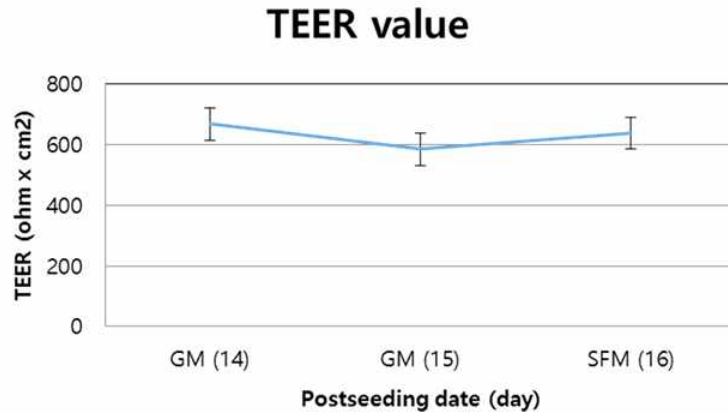


그림 1. 무혈청배지 교체에 따른 Caco-2 cell의 TEER 값. GM=growth media; SFM=serum free media.

산양유 단백질 분해물의 흡수 작용 규명에 앞서, 산양유 단백질 분해물의 Caco-2 cell 내 세포독성 (cytotoxicity) 평가를 위해 산양유 단백질을 0 ~ 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 1, 2, 8, 24, 48 시간 동안 처리한 후 WST-1 용액을 이용하여 Caco-2 cell의 세포생존율을 평가하였다 (그림 2와 3). 그 결과, 48시간 동안 배양 후 control (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  산양유 단백질 처리구)에 비해 산양유 단백질을 10~250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리할 경우 세포생존율에 유의적인 차이를 보이지 않았으며 산양유 단백질을 500~1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리할 경우 control에 비해 세포생존율이 유의적으로 증가하였다. 즉, 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도까지의 산양유 단백질 분해물의 처리는 Caco-2 cell의 생존율을 감소시키지 않은 것으로 보아 본 연구에서 사용된 산양유 단백질 분해물은 세포독성 (cytotoxicity)을 지니지 않음을 알 수 있었다.

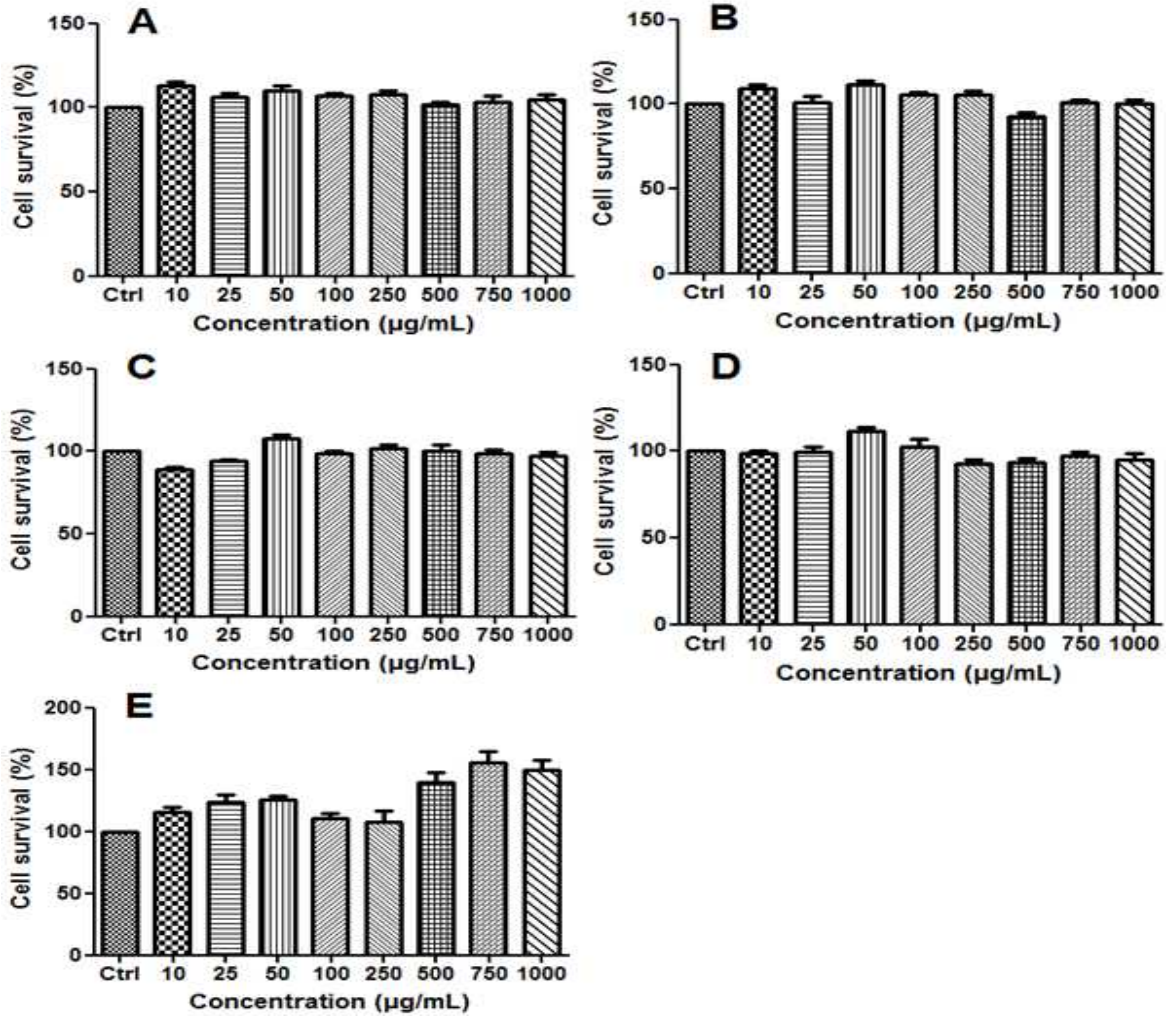


그림 2. 산양유 단백질 분해물 처리 농도 및 시간에 따른 Caco-2 cell의 세포생존율. 세포생존율을 측정하기 위해 산양유 단백질 분해물 (0, 10, 25, 50, 100, 250, 750, 1,000 µg/mL)을 Caco-2 cell에 처리한 후 1 (A), 2 (B), 8 (C), 24 (D), 48 (E) 배양하였다.

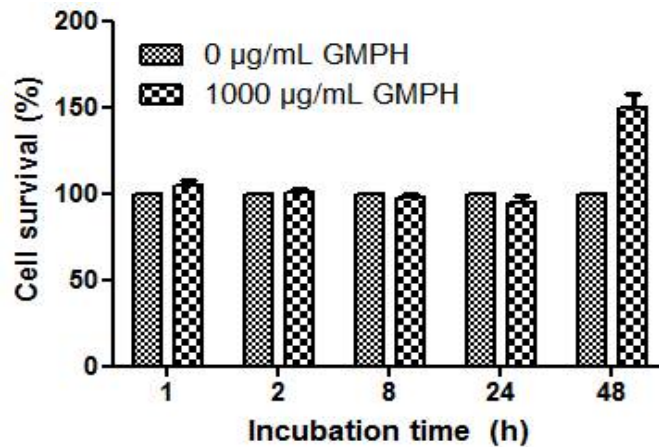


그림 3. 산양유 단백질 분해물 처리 시간에 따른 Caco-2 cell의 세포생존율. 세포생존율을 측정하기 위해 산양유 단백질 분해물 (0 또는 1,000 µg/mL)을 Caco-2 cell에 처리하고 1, 2, 8, 24, 48 시간 동안 배양하였다. GMPH=goat milk protein hydrolysate.



산양유 단백질 분해물의 소장 내 흡수 연구는 Caco-2 cell을 이용하여 실시하였다. 세포 내 흡수율 측정을 위해 산양유 단백질 분해물에 형광물질인 Alexa 488을 부착하였고, Alexa 488이 부착된 산양유 단백질 분해물의 세포 내 흡수여부 및 흡수율은 형광현미경과 flow cytometry를 이용하여 측정하였다 (그림 4, 5, 6). 산양유 단백질 분해물에 Alexa 488의 부착은 Alexa 488 protein labeling kit를 사용하여 부착하였으며, 부착 여부 확인은 280 nm와 494 nm에서 흡광도 측정을 통해 평가하였다 (표 1). 그 결과 Fraction 3번과 4번에서 단백질의 농도를 나타내는 280 nm의 흡광도와 Alexa 488의 농도를 나타내는 494 nm의 흡광도가 모두 높아 alexa 488이 산양유 단백질 분해물에 부착된 fraction임을 확인하였고, 이 두 fraction을 혼합하여 실험에 사용하였다.

산양유 단백질 분해물의 Caco-2 cell 내 흡수율 연구는 control (PBS), 형광물질이 부착되지 않은 산양유 단백질분해물, Alexa 488이 부착된 산양유 단백질 분해물을 Caco-2 cell에 처리 후 2시간 배양한 후 형광현미경 측정을 통해 평가하였다 (그림 4). 그 결과, control과 형광물질을 부착하지 않은 산양유 단백질 분해물 처리구의 경우 형광이 관찰되지 않은 반면, Alexa 488이 부착된 산양유 단백질 분해물 처리구에서는 녹색 형광이 Caco-2 cell 세포막 부분에 관찰되었다. 즉, 산양유 단백질 분해물이 Caco-2 cell에 부착 및 흡수된 것을 확인하였다.

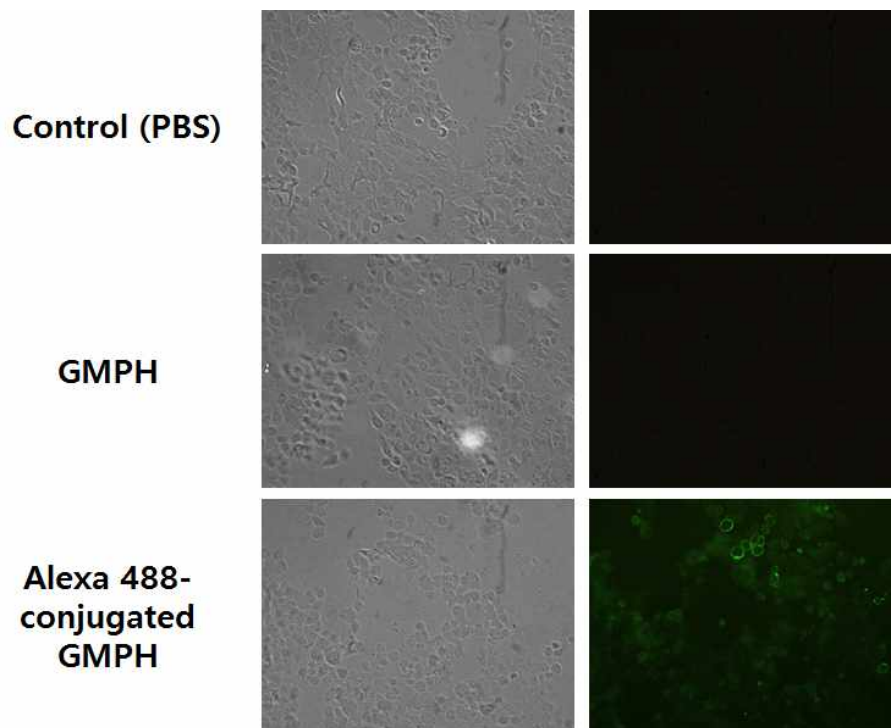


그림 4. 산양유 단백질 분해물의 Caco-2 cell내 흡수를 나타낸 형광현미경 사진.

산양유 단백질 분해물의 흡수율 확인을 위해 flow cytometry를 이용하여 측정한 결과, control에서는 약 3.4%의 흡수율을 보였고 (그림 5A와 그림 6), alexa 488을 부착하지 않은 산양유 단백질 분해물은 control과 유의적인 차이를 보이지 않은 것으로 보아 자가형광 (autofluorescence)은 나타내지 않은 것을 알 수 있었다 (그림 5B와 그림 6). 반면, alexa 488이 부착된 산양유 단백질 분해물은 Caco-2 cell 내 약 58%의 흡수율을 나타내었다 (그림 5C

와 그림 6). 즉, 산양유 단백질 분해물이 소장 상피세포 내에 흡수 되는 것을 알 수 있었다.

표 1. Fraction 별 흡광도 측정을 통한 산양유 단백질에 Alexa 488 부착 여부 평가.

Fraction number	Ab 280 nm (proteins)	Ab 494 nm (Alexa 488)
3	1.036	0.324
4	1.271	0.487
5	0.347	0.125

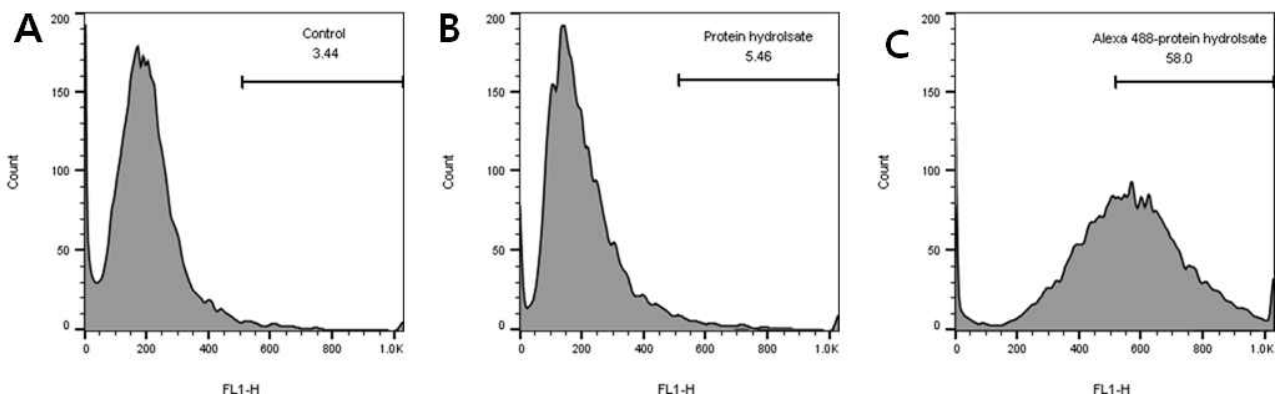


그림 5. Flow cytometry를 이용한 산양유 단백질 분해물 및 Alexa 488이 부착된 산양유 단백질 분해물의 Caco-2 cell내 흡수율 측정 결과. 세포 내 흡수율 평가를 위해 control (A), 산양유 단백질 분해물 (B), Alexa 488이 부착된 산양유 단백질 분해물 (C)를 Caco-2 cell에 2시간 처리 후 흡수율을 측정하였다.

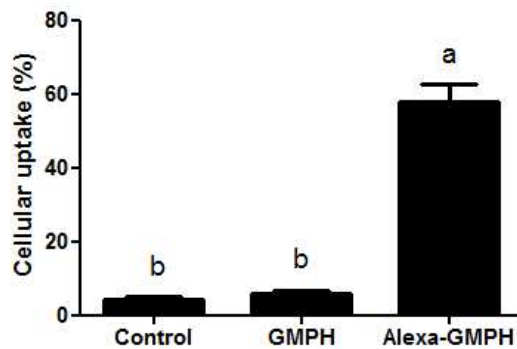


그림 6. 산양유 단백질 분해물 및 Alexa 488이 부착된 산양유 단백질 분해물의 Caco-2 cell내 흡수율. GMPH=goat milk protein hydrolysate; Alexa-GMPH=Alexa 488-conjugated goat milk protein hydrolysate.

2차 년도에 수행할 동물실험을 위한 동물질환모델은 임신모델로, 다음과 같은 동물모델 및 실험계획을 수립하였다. 우선 2차년도에서는 임신모델을 이용할 계획이며, 8주령의 랫트 암수

(총 30수)를 공시하고 교배시켜 임신을 유도한 후 대조구 및 단백질 분해물 처리구 (1X, 2X)로 구분하여 교배시부터 분만 후 2주령까지 급여하며, 체중은 3일 간격으로, 사료섭취량은 1일 간격으로 측정한다. 분만 2주령 후에 부모쥐 및 자녀쥐에서 혈액, 조직 및 채취하여 분석에 이용하고 분만 1-2주에는 단백질 분해물의 흡수효율을 알아보기 위해 대사실험을 실시한다. 사료, 요 및 분을 채취하고, 단백질 및 아미노산 함량을 분석하여 총 단백질 축적량을 산출하고 Bone densitometer (X-ray system)을 이용하여 뼈와 근육의 변화유무를 측정한다.

## ○ 하이드로젤 전달체의 생리 활성물질 이용성 극대화 및 안전성 평가

하이드로젤 전달체의 장상피 세포 흡수작용은 아래와 같은 방법으로 평가하였다.

### · 세포배양 조건

Caco-2 세포 (ATCC HTB37, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)는 CO<sub>2</sub> 세포배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 소태아혈청 (fetal bovine serum, FBS, Lonza BioWhittaker, USA) 20%와 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin, Lonza BioWhittaker, USA) 1%를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza BioWhittaker, USA) 배지에서 배양한다. 배양 중 배지는 2~3일에 한 번씩 교체하고 세포가 90% confluency까지 자라면 다음 passage로 계대배양 한다. 배양한 세포는 PET 재질의 pore size는 0.4 μm인 6-well plate inserts (SPLInsert™ Hanging, SPL, Korea)에 6x10<sup>5</sup> 수 만큼 분주하여 실험에 사용한다. Millipore의 Millicell-ERS (Electrical Resistance System) 장치를 이용하여 transepithelial electrical resistance (TEER) 측정함으로써 배양 종료기간을 측정한다. 값이 500 Ω × cm<sup>2</sup> 이상이 되기까지 48시간 마다 배지를 변경하면서 배양하였다. 각 chamber의 TEER 값이 500 Ω × cm<sup>2</sup> 을 지니면 tight monolayer가 형성됨을 의미한다.

### · 단백질 분획물 및 하이드로젤 전달체에 형광물질 (FITC, Alexa 488) 부착

산양유 단백질 분획물 및 이를 이용하여 제조한 하이드로젤 전달체의 세포 내 흡수 연구를 위한 형광물질 부착은 green color를 띠는 형광물질인 FITC (fluorescein isothiocyanate) 또는 Alexa 488을 이용하여 실시한다. 형광물질을 산양유 단백질 분획물 및 하이드로젤 전달체에 부착시키기 위해 형광물질을 산양유 단백질 분획물 및 하이드로젤 전달체와 각각 혼합한 다음 암실에서 2시간 동안 교반한다. 형광물질이 부착된 산양유 단백질 분획물과 하이드로젤 전달체는 sephadex G-50 column과 fraction collector (FRAC-100, Amersham, UK) 또는 dialysis 방법을 이용하여 회수한 다음 분광광도계 (GENESYS 10-S spectrophotometer, Thermo, Inc., USA)를 이용하여 280 nm와 495 nm에서 흡광도를 측정하여 형광물질 부착 여부를 확인한 다음 세포 실험에 이용하기 전까지 foil로 감싼 뒤 4°C에서 보관한다.

### · Caco-2 세포에 의한 흡수 능력 분석

PET 재질의 pore size는 0.4 μm인 6-well plate inserts (SPLInsert™ Hanging, SPL, Korea)에 배양한 Caco-2 세포를 PBS 0.5 mL을 이용하여 2회 세척한 뒤 혈청을 함유하지 않은 DMEM 배지 2 mL을 첨가하고 2시간 동안 배양한다. 상피세포에 흡수된 산양유 유래 기능

성 소재 (단백질 분해물 및 이를 이용한 하이드로젤 전달체)를 배지 2 mL와 함께 6-well plate의 apical 쪽에 첨가한다. Caco-2 세포 내 및 세포에서 basolateral 쪽으로 분비된 기능성 소재의 함량은 flow cytometry를 이용하여 형광물질의 상대적 비율을 계산하여 측정하여 흡수율을 산출한다. 또한 형광현미경을 이용하여 세포막 및 세포내 형광물질의 유무를 확인한다. 통계분석은 처리구에 따른 분산분석(ANOVA)를 실시하였으며 다중검정(LSD multiple comparison)으로 처리구별 유의차( $P < 0.05$ )를 분석하였다

· 산양유 유래 단백질 분획물의 흡수 평가

장상피세포인 Caco-2 cell에서 산양유 유래 단백질 분획물의 흡수를 규명하기 위해 형광현미경 및 flow cytometry 분석법을 이용하였다. 처리구는 대조구(control), 단백질 분획물로 제조된 전달체(NP), 형광물질인 Alexa-488이 부착된 전달체(Alexa-NP) 로 구분하였다. 처리시간은 2시간 배양한 후 형광현미경으로 세포의 형광색 발현도를 확인하였다 (그림 7). 그 결과 control 및 NP에서는 형광이 관찰되지 않은 반면에 Alexa-NP에서는 녹색 형광을 띄는 세포가 관찰되었다(그림 7). 형광색을 나타내는 세포를 정량적으로 분석하기 위해 flow cytometry를 실시하였다. 앞에서 언급한 결과와 같이 Alexa-NP에서 형광이 유의적으로 높은 값을 나타냈다 (그림 8). 결론적으로 산양유 유래 단백질 분획물은 장상피세포에 흡수가 되는 것으로 판단된다.

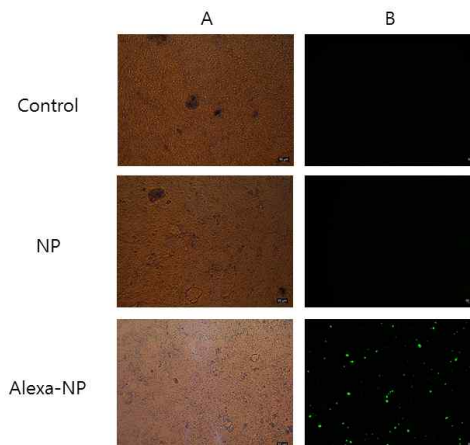
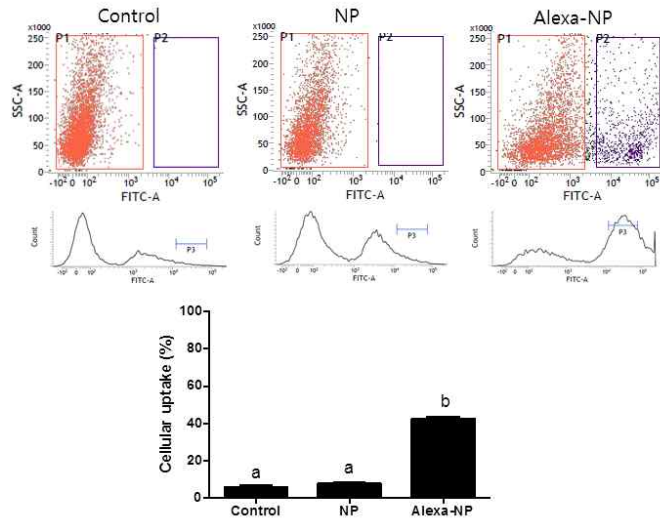


그림 7. Uptake of nanoparticle derived from goat milk protein. A: observation by optical microscopy, B: observation by fluorescence microscopy. NP: nanoparticle made of protein fraction from goat milk, Alexa-NP: NP conjugated with Alexa-488.



**그림 8.** Quantitative measurement on cellular uptake of nanoparticle derived from goat milk protein. Upper panel: D-plot, Middle panel: Histogram, Lower panel: Statistical analysis ( $P < 0.001$ ), NP: nanoparticle made of protein fraction from goat milk, Alexa-NP: NP conjugated with Alexa-488.

· 임신모델을 이용한 기능성 소재의 작용 기전 연구

공시동물로 8주령 흰쥐(Wistar rat)를 암컷 30두, 수컷 15두를 공시하였으며 임신을 유도하기 위해 암컷 2두당 수컷 1두를 5일간 합사하여 임신을 유도하였다. 흰쥐의 임신기간은 3주이며 매일 암컷의 체중을 측정하여 임신여부를 확인하였다. 임신이 확인된 흰쥐는 분만 2주전에 부터 1두씩 케이지에 사양관리하였다. 사육실의 온도는 22도, 습도는 60%를 유지하였으며 12 시간 간격으로 소등과 점등을 실시하였다. 전체 실험은 경상대학교 동물실험실에서 실시하였으며 동물윤리위원회의 승인 후 (승인번호 GNU-160531-R0027)에 실시하였다.

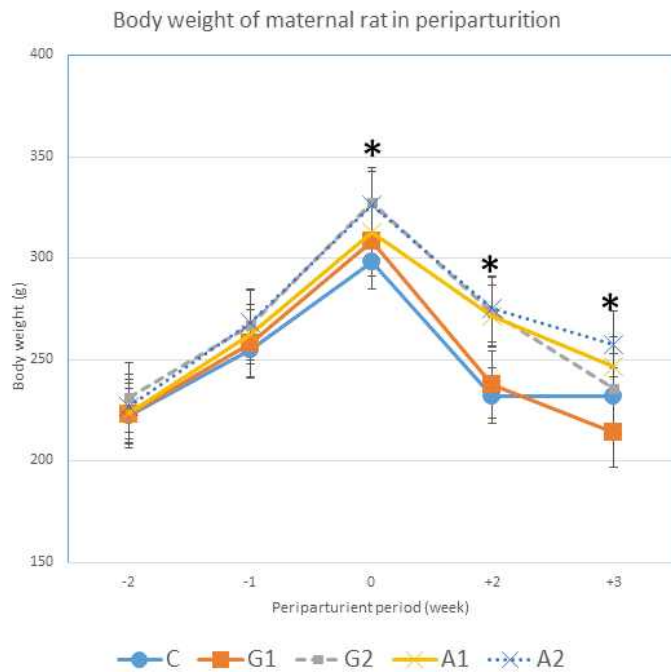
동물실험을 위한 처리구는 5 처리구로 대조구(control), 산양유 5%처리구(G1), 산양유 10% 처리구(G2), 단백질분획물 5%처리구(A1), 단백질분획물 10%처리구(A2)로 각각 구분하였다. 기본사료는 Harlan사료를 이용하였으며 산양유는 건조산양유분말이고 단백질분획물은 주관 및 제 1협동에서 제공한 산양유에서 케이션 단백질을 분획하여 건조한 것이다. 산양유 및 단백질 분획물에 함유되어 있는 단백질 함량은 38%이며 산양유에 포함되어 있는 유당 (49.48%), 단백질 분획물에 포함되어 있는 maltodextran(25%),  $CaCl_2$ (30%)를 전처리구에 보정하였다. 따라서 대조구 대비 G1 및 A1의 단백질 첨가 함량은 1.9g/100g사료, G2 및 A2는 3.8g/100g사료 이다.

동물실험을 위해 시험사료를 1주일전부터 급여하여 사료에 적응하도록 하였으며 체중은 2 회/주, 사료섭취량은 1회/일에 실시하였고 사육환경(온도, 습도, 점등)을 기록하였다. 어미쥐의 분만 1주일 후부터 새끼의 수를 기록하였고 어미쥐의 체중 및 사료섭취량을 측정하였다. 새끼 쥐는 이류주령인 3주에 체중을 측정하였으며 avertin (2,2,2-tribromoethanol)으로 마취하여 복 대정맥에서 혈액을 채취한 후 EDTA를 함유한 tube에 넣어 혈장을 분리 하였다. 어미쥐와 새끼쥐에서 조직 (간, 지방, 근육, 신장, 췌장, 소장, 대장) 및 하반신 골격을 채취하였다. 혈액학적 검사는 혈장에서 약 300uL를 채취하여 혈구분석기(ADVIA2120i, Siemens, Germany)하여 적혈구 (총적혈구수, 혈색소량, 적혈구용적율, 망상적혈구, 평균적혈구용적, 평균적혈구헤모글로

빈량, 평균적혈구헤모글로빈농도, 혈소판) 및 백혈구 (총백혈구수, 중성호성백혈구, 림프구, 단핵구, 산호성백혈구, 염기호성백혈구)에 관한 항목을 분석하였다. 통계분석은 분산분석(Anova)을 실시하였으며 어미쥐의 체중 및 사료섭취량에서는 주령내에서 처리별로, 새끼쥐의 3주 체중 및 혈액분석에서는 처리구별로 다중검정(LSD multiple comparison)을 실시하여 유의차( $P<0.05$ )를 분석하였다.

· 흰쥐의 체중 및 사료섭취량의 변화

실험기간동안 어미쥐의 체중변화는 **그림 9**에 제시한 바와 같다. 실험개시시 체중은 모든 처리구에서 약 220g으로 시작하여 임신과 함께 체중은 증가하였다. 분만 직전에는 모든 처리구에서 300g 이상을 나타냈으며 분만 후 체중은 감소하였다. 분만전에는 처리구별로 체중의 변화는 관찰되지 않았으며 분만직후에서는 G2 및 A2가 다른 처리구에 비해 유의적으로 체중이 증가하였고, 분만 2주에서는 G2, A1, A2가 다른 처리구에 비해 높았으며 분만 3주에서는 A1 및 A2가 유의적으로 높았다. 따라서 대조구에 비해 건조산양유 및 산양유에서 추출한 케이신 단백질 분획물에서 유의적으로 체중이 증가하는 경향을 나타냈다.



**그림 9.** Changes in body weight of maternal rat during periparturient period

이유시(출산 3주령) 새끼쥐의 체중 변화는 **그림 10**에 제시한 바와 같다. 새끼쥐의 체중에 측정된 처리구는 포유새끼의 수를 10-11마리로 고정하여 포유 새끼수에 따른 체중의 변화 (일반적으로 포유새끼수가 많을수록 체중이 적음)를 최소화 하였다. 대조구에서는 약 25g 이었고 G1 및 G2는 약 33g 내외를 나타냈으며 A1 및 A2는 40g 이상을 나타냈다. 따라서 단백질 분획물처리에 의해 새끼의 체중이 증가되었으며 이는 단백질분획물을 섭취한 어미쥐의 포유능력이 대조구에 비해 높다는 것을 의미하며 단백질분획물에 의한 효과로 사료된다.



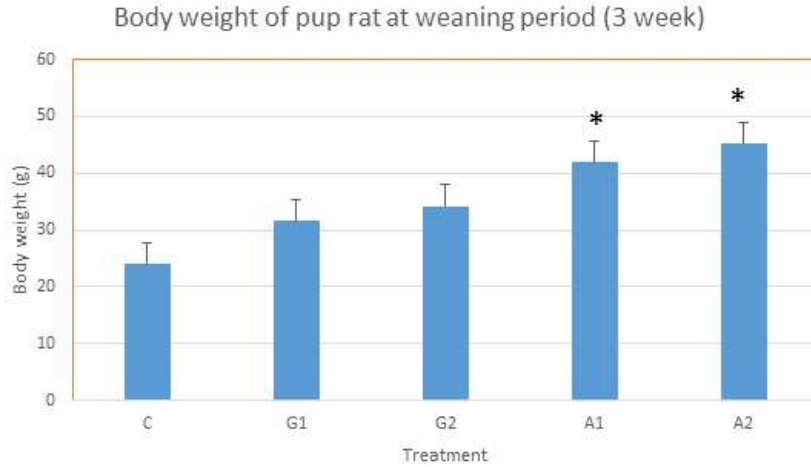


그림 10. Changes in body weight of pup rat at weaning period (3week)

어미쥐에 대한 사료 섭취량의 변화는 그림 11에 제시한 바와 같다. 일당 사료섭취량은 분만 후에 모든 처리구에서 증가하였다. 이는 새끼를 출산 후 나타나는 일반적인 현상으로 사료된다. 분만 1주 및 2주에서 G2 및 A2처리구에서 사료 섭취량이 다른 처리구에 비해 유의적으로 증가한 것으로 나타났다. 위의 처리구는 공히 사료내 단백질 함량이 높은 처리구이며 사료내 단백질 함량이 사료섭취량에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

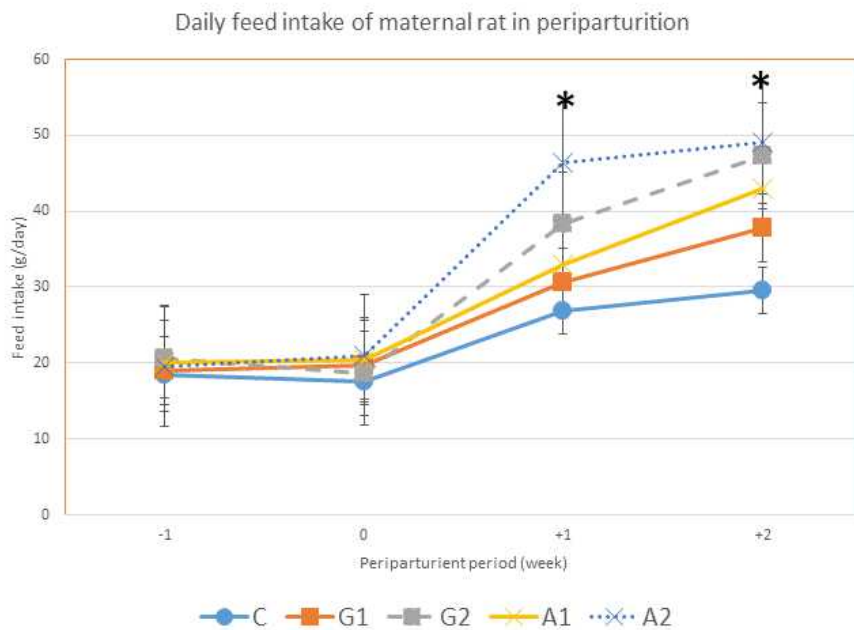


그림 11. Changes in daily feed intake of maternal rat during periparturient period.

· 흰쥐 혈액의 적혈구 및 백혈구 성분 분석

혈액성상의 성분 분석은 어미쥐(표 2) 및 새끼쥐(표 3)로 구분하여 아래와 같이 제시하였다. 적혈구에 대한 성분은 총적혈구수, 혈색소량, 적혈구용적율, 망상적혈구, 평균적혈구용적,

평균적혈구헤모글로빈량, 평균적혈구헤모글로빈농도, 혈소판을 분석하였고, 백혈구에 대한 성분은 총백혈구수, 중성호성백혈구, 림프구, 단핵구, 산호성백혈구, 염기호성백혈구를 분석하였다. 처리구별 혈액성상에는 유의적인 차이가 보이지 않았다. 본 실험을 실시한 이유는 단백질 분획물이 면역작용에 영향을 미친다는 기존의 연구결과를 확인하기 위해서이며 또한 3년차 실험에서 실시할 예정인 질환모델(만성장염 모델)에 대한 실험의 분석자료로 활용하기 위함이다. 어미쥐와 새끼쥐에서 분석된 혈액성분 값들은 모두 정상적인 범위내에 속하는 것으로 사료되며 특별한 질환이 없는 임신모델에서는 그 값들의 변화가 많지 않은 것으로 나타났고 산양유 및 단백질 분획물 처리에 따른 이상 변화가 없는 것으로 판단되어 인체에 급여하여도 문제가 없을 것으로 판단된다. 현재 면역반응에 대한 좀더 구체적인 변화를 분석하기 위해 면역반응과 관련된 IL-1, TGF, IFN 등을 분석 중에 있으며 특히 새끼쥐의 뼈강도를 측정하여 처리구에 따른 성장능력을 구체적으로 분석하고 있다.

**표 2. Hematological parameters of maternal rat**

	RBC ( $\times 10^6$ cells/L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/L)
				MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	
Control	5.3 $\pm$ 2.6	12.1 $\pm$ 5.1	40.0 $\pm$ 11.6	84.0 $\pm$ 24.6	23.8 $\pm$ 3.0	29.3 $\pm$ 4.5	1161.0 $\pm$ 331.3
G1	6.4 $\pm$ 1.4	13.5 $\pm$ 2.1	42.3 $\pm$ 4.7	67.0 $\pm$ 7.2	21.3 $\pm$ 1.5	31.9 $\pm$ 1.4	1023.3 $\pm$ 117.7
G2	6.9 $\pm$ 0.9	14.1 $\pm$ 0.9	43.8 $\pm$ 1.9	64.5 $\pm$ 7.9	20.7 $\pm$ 2.0	32.2 $\pm$ 0.9	1229.0 $\pm$ 182.9
A1	7.0 $\pm$ 0.4	14.5 $\pm$ 1.0	45.4 $\pm$ 3.7	64.9 $\pm$ 3.5	20.8 $\pm$ 1.0	32.0 $\pm$ 0.5	897.0 $\pm$ 74.1
A2	5.3 $\pm$ 0.9	12.1 $\pm$ 1.4	39.5 $\pm$ 4.5	75.6 $\pm$ 14.6	22.9 $\pm$ 2.8	30.5 $\pm$ 1.8	1144.4 $\pm$ 94.2

	WBC ( $\times 10^3$ cells/L)	WBC differential counting (%)				
		NEU	LYM	MONO	EOS	BASO
Control	2.3 $\pm$ 0.2	25.7 $\pm$ 5.0	77.1 $\pm$ 12.1	2.5 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 1.1	0.4 $\pm$ 0.1
G1	2.9 $\pm$ 0.8	25.5 $\pm$ 4.7	70.4 $\pm$ 6.4	2.9 $\pm$ 1.3	0.5 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
G2	3.0 $\pm$ 0.7	20.1 $\pm$ 5.1	71.8 $\pm$ 5.7	2.3 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.1
A1	3.0 $\pm$ 0.6	25.7 $\pm$ 11.3	70.9 $\pm$ 6.9	2.4 $\pm$ 0.8	0.5 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1
A2	4.2 $\pm$ 0.8	26.7 $\pm$ 8.1	69.8 $\pm$ 8.0	2.1 $\pm$ 0.6	0.7 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.1

\*Control: 대조구, G1: 산양유5%처리구, G2: 산양유10%처리구, A1: 단백질분획물5%처리구, A2: 단백질분획물10%처리구.

\*\*RBC: total erythrocyte count (총적혈구수), HGB: hemoglobin conc. (혈색소량), HCT: hematocrit (적혈구용적율), MCV: mean cell volume (평균적혈구용적), MCH: mean cell hemoglobin (평균적혈구헤모글로빈량), MCHC: mean cell hemoglobin conc. (평균적혈구헤모글로빈농도), PLT: platelet (혈소판수), WBC: total leucocyte count (총백혈구수), NEU: neutrophils (중성호성백혈구), LYM: lymphocytes (림프구), MONO: monocytes (단핵구), EOS: eosinophils (산호성백혈구), BASO: basophils (염기호성백혈구)



표 3. Hematological parameters of pup rat

	RBC ( $\times 10^6$ cells/L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/L)
				MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	
Control	4.9 $\pm$ 0.4	10.0 $\pm$ 1.0	34.0 $\pm$ 1.3	69.7 $\pm$ 4.0	20.4 $\pm$ 1.0	29.3 $\pm$ 1.9	802.0 $\pm$ 89.2
G1	4.8 $\pm$ 0.2	9.4 $\pm$ 0.6	32.8 $\pm$ 2.3	68.3 $\pm$ 3.0	19.7 $\pm$ 0.6	28.8 $\pm$ 0.6	954.2 $\pm$ 122.4
G2	4.6 $\pm$ 0.3	9.0 $\pm$ 1.0	30.2 $\pm$ 31.3	65.6 $\pm$ 3.9	19.6 $\pm$ 1.3	29.8 $\pm$ 0.7	961.0 $\pm$ 233.3
A1	4.5 $\pm$ 0.2	9.2 $\pm$ 0.8	31.3 $\pm$ 2.2	69.9 $\pm$ 2.0	20.6 $\pm$ 1.1	29.5 $\pm$ 0.9	939.5 $\pm$ 319.2
A2	4.4 $\pm$ 0.3	9.2 $\pm$ 0.4	31.7 $\pm$ 1.8	72.0 $\pm$ 1.8	20.9 $\pm$ 0.2	29.1 $\pm$ 0.7	868.2 $\pm$ 41.4

	WBC ( $\times 10^3$ cells/L)	WBC differential counting (%)				
		NEU	LYM	MONO	EOS	BASO
Control	3.8 $\pm$ 2.0	13.6 $\pm$ 8.2	81.3 $\pm$ 9.2	2.5 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.1
G1	2.0 $\pm$ 1.0	9.1 $\pm$ 4.1	87.2 $\pm$ 4.9	1.6 $\pm$ 0.7	0.6 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.2
G2	5.1 $\pm$ 1.0	12.5 $\pm$ 1.4	82.8 $\pm$ 2.2	2.5 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.8	0.3 $\pm$ 0.1
A1	4.9 $\pm$ 1.2	12.9 $\pm$ 2.9	83.1 $\pm$ 3.2	2.4 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.1
A2	3.7 $\pm$ 0.9	16.9 $\pm$ 7.5	79.3 $\pm$ 8.2	2.2 $\pm$ 0.6	0.7 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1

\*Control: 대조구, G1: 산양유5%처리구, G2: 산양유10%처리구, A1: 단백질분획물5%처리구, A2: 단백질분획물10%처리구.

\*\*RBC: total erythrocyte count (총적혈구수), HGB: hemoglobin conc. (혈색소량), HCT: hematocrit (적혈구용적율), MCV: mean cell volume (평균적혈구용적), MCH: mean cell hemoglobin (평균적혈구헤모글로빈량), MCHC: mean cell hemoglobin conc. (평균적혈구헤모글로빈농도), PLT: platelet (혈소판수), WBC: total leucocyte count (총백혈구수), NEU: neutrophils (중성호성백혈구), LYM: lymphocytes (림프구), MONO: monocytes (단핵구), EOS: eosinophils (산호성백혈구), BASO: basophils (염기호성백혈구)

○ 질환모델을 이용한 통한 산양유 단백질 유래 소재의 기능성 연구

· 장염유도 생쥐모델(colitis-induced mouse model)

공시동물로 8주령 C57BL/6J mice 수컷 64두를 공시하였으며 4두 씩 케이지에 사양관리하였다. 사육실의 온도는 22도, 습도는 60%를 유지하였으며 12시간 간격으로 소등과 점등을 실시하였다. 전체 실험은 경상대학교 동물실험실에서 실시하였으며 동물윤리위원회의 승인 후에 실시하였다.

동물실험을 위한 처리구는 8 처리구로 대조구 (C1), 유단백질 1% 처리구 (C2), A2  $\beta$ -카제인 1% 처리구 (C3), A2  $\beta$ -카제인 나노 전달체 1% 처리구 (C4), oxazolone 처리구 (O1), oxazolone과 유단백질 1% 처리구 (O2), oxazolone과 A2  $\beta$ -카제인 1% 처리구 (O3), oxazolone과 A2  $\beta$ -카제인 나노입자 1% 처리구 (O4)로 각각 구분하였다. 기본사료는 Harlan사료를 이용하였으며 유단백질은 탈지유분말이고 A2  $\beta$ -카제인은 주관 및 제1 협동에서 제공한

산양유에서 케이신 단백질을 분획하여 건조한 것이며, A2  $\beta$ -카제인 나노입자는 제 2협동에서 제공한 A2  $\beta$ -카제인/키토올리고당 하이드로젤 나노 전달체이다. A2  $\beta$ -카제인에 함유되어 있는 단백질 함량은 38%이며 단백질 분획물에 포함되어 있는 maltodextran (25%)을 전 처리구에 보정하였다. 따라서 대조구 대비 C2-C4, O2-O4의 단백질 급여량은 1g/100g사료이다.

동물실험을 위해 각 처리구 용액을 1일 전부터 zondae를 이용하여 강제급여(force feeding)하였다. 체중은 2회/주, 사료섭취량은 3회/주 실시하였고 사육환경(온도, 습도, 점등)을 기록하였다. 대장염 유발을 위해 0일차에 실험 쥐 양 어깨 사이 등 부분을 선택하여 1.5 × 1.5 cm의 피부를 면도한 후 아세트/올리브 오일 혼합액 (4:1, v/v)에 용해시킨 oxazolone (30 mg/mL) 150  $\mu$ L를 면도한 부분에 떨어뜨려 피부를 통해 흡수시켰다. 대조구 (oxazolone 미처리구)에는 아세트/올리브 오일 혼합액 (4:1, v/v)을 150  $\mu$ L를 이용하였다. 실험 8일차에는 실험 쥐 항문에 카테터를 4 cm 주입 후 oxazolone 에탄올 용액 (10 mg/mL in 50% 에탄올) 100  $\mu$ L를 투여하였다. 주입 후 쥐의 머리가 아래로 가도록 하여 60초간 대기 한 후 cage에 넣었다. 항문 주입 5일(13일차) 후 avertin (2,2,2-tribromoethanol)으로 마취하여 심장에서 혈액을 채취한 후 EDTA를 함유한 tube에 넣어 혈장을 분리 하였다. 그런 다음 결장, 비장, 소장을 채취하였다. H & E 염색을 통한 대장염 유발 및 개선효과 확인을 위해 채취된 결장을 0.5 cm 크기로 자른 뒤 neutral buffered 10% formalin에 담근 후 4°C에서 12시간 보관하여 고정 (fixation) 하였다. 그런 다음 70%, 95%, 100% 에탄올을 각각 45분간 처리하여 탈수 (dehydration) 한 뒤 자일렌을 이용하여 clearing 한 후 파라핀 embedding을 통해 대장 샘플을 고정시켰다. 대장이 든 파라핀은 microtome을 이용하여 5  $\mu$ m 두께로 자른 뒤 slide 위에 올리고 65°C 오븐에서 파라핀을 제거한 다음 자일렌을 이용한 clearing 후 100, 90, 70, 50, 30%에탄올에 순차적으로 담귀수화 (hydration) 시켰다. H & E staining을 위해 hematoxylin 용액 200  $\mu$ L로 5분간 염색하고 세척한 다음 eosine 용액 400  $\mu$ L로 30초간 염색시킨 후 세척하였다. 세척된 대장 샘플은 무수에탄올을 이용한 탈수, 자일렌을 이용한 clearing 후 coverslip을 덮고 현미경을 통해 관찰하였다.

혈액학적 검사는 혈장에서 약 300 $\mu$ L를 채취하여 혈구분석기(ADVIA2120i, Siemens, Germany)하여 적혈구 (총적혈구수, 혈색소량, 적혈구용적율, 망상적혈구, 평균적혈구용적, 평균적혈구헤모글로빈량, 평균적혈구헤모글로빈농도, 혈소판) 및 백혈구 (총백혈구수, 중성호성백혈구, 림프구, 단핵구, 산호성백혈구, 염기호성백혈구)에 관한 항목을 분석하였다. 통계분석은 분산분석(ANOVA)을 실시하였으며 실험쥐의 체중 및 사료섭취량에서는 처리별로 체중 및 혈액 분석에서는 처리구별로 다중검정(LSD multiple comparison)을 실시하여 유의차(P<0.05)를 분석하였다.

#### · 장염유도 생쥐모델(colitis-induced mouse model)의 체중 및 사료섭취량의 변화

단백질분획물의 장염개선효과를 알아보기 위해 장염(colitis) 유도를 유발하는 oxazolone를 항문을 통해 결장(colon)에 투여하였다. 처리구는 우선 대조구(C)와 oxazolone 처리구(O)로 구분하였고, 각 처리구에 유단백질구, A2  $\beta$ -카제인 1% 처리구, A2  $\beta$ -카제인 나노 전달체 1% 처리구를 추가하여 단백질 분획물의 효과를 검증하였다. 전체 실험기간은 2주(14일)이며 8일차에 oxazolone를 처리하여 장염을 유도하였고 3-4일간격으로 체중 및 사료섭취량을 측정하여

처리구별 실험동물의 생리상태를 관찰하였다. 전체 처리기간중 생쥐의 체중은 22-26g를 나타냈으며 장염유도 물질을 투여한 후에는 체중의 감소가 뚜렷하게 나타났다. 특히 oxazolone 처리구(O1)에서는 9일차부터 체중이 감소하여 13일차에는 약 22g 이하로 감소하였다. 반면에 유단백질 처리구(O2), A2  $\beta$ -카제인 1% 처리구(O3)의 감소는 O1 처리구에 비해 적었으며, 특히 A2  $\beta$ -카제인 나노 전달체 1% 처리구(O4)는 유의적으로 증가하는 경향을 나타냈다(그림 12). 이러한 결과는 단백질 분획물에 의해 장염유도 생쥐의 체중이 보전된 것으로 사료된다. 따라서 단백질 분획물 또는 이를 이용한 나노 전달체가 장염이 유도된 생쥐의 체중 감소를 완화하는 효과가 있는 것으로 판단된다. 일당 사료 섭취량의 변화는 그림 13에 제시한 바와 같다. 전체적으로 일당 사료섭취량(g)은 3-4g 내외로 나타났다. 장염유도 (8일차)이후에 떨어지는 경향을 보였으나 다른 시기와 비교하였을 때는 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 따라서 전체 처리기간내에 처리구 또는 장염유도 처리에 따른 사료섭취량의 변화는 나타나지 않았다.

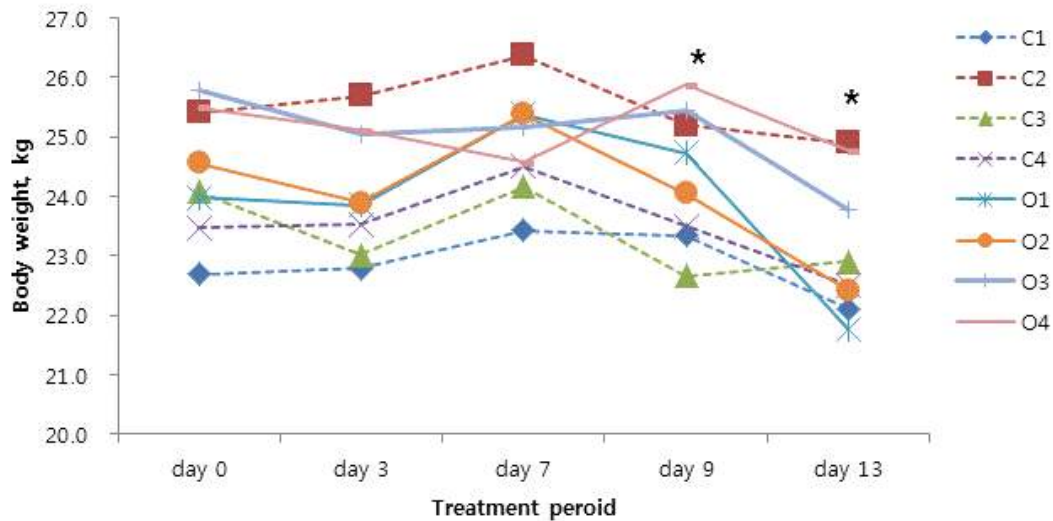


그림 12. Changes in body weight (g) of colitis-induced mouse model.

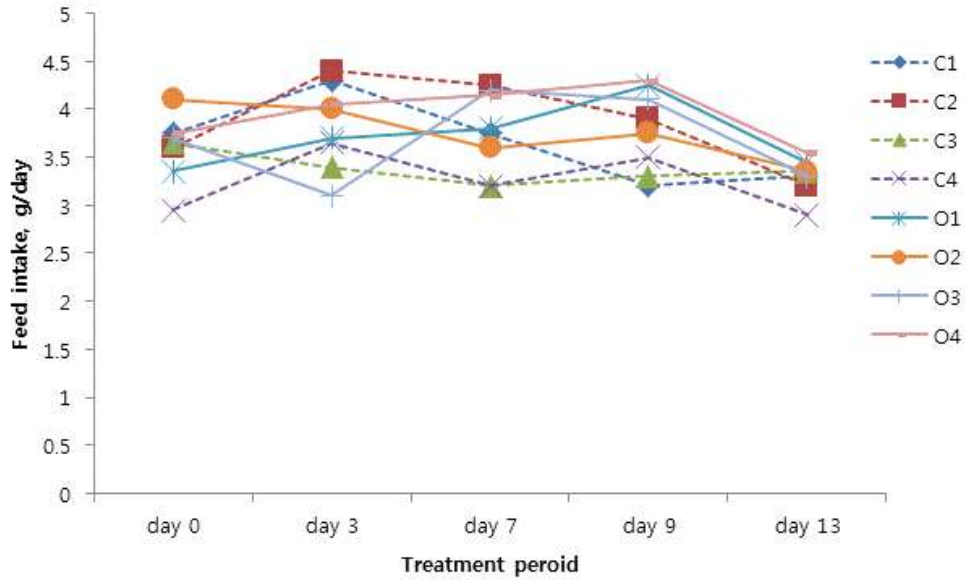


그림 13. Changes in daily feed intake (g) of colitis-induced mouse model

· H & E 염색을 이용한 장염유도 생쥐모델의 분석

산양유 단백질분획물의 장염개선효과를 확인한 결과는 그림 14에 나타내었다. 장염(colitis) 유도를 유발하는 oxazolone를 처리하지 않은 control (C1, C2, C3, C4) 구의 colon을 H & E 염색한 후 현미경으로 관찰 한 결과, 단핵세포 (mononuclear cell)의 colon 내 침윤성 (infiltrating)이나 이를 통한 foci 형성이 관찰되지 않아 염증 유발이 되지 않은 정상적인 colon 입을 확인하였다. 그러나 단백질을 처리하지 않고 oxazolone을 투여 할 경우 (O1) goblet cell의 소실과 백혈구의 침윤, mucus의 파괴 등과 같은 현상을 통해 colon에 매우 심한 염증 반응이 나타나는 것을 확인하였다. 유단백질 (O2), A2  $\beta$ -casein (O3), A2  $\beta$ -casein 유래 하이드로젤 나노 전달체 (O4)의 경우 다수의 foci가 형성이 되어 중간정도의 (moderate) 염증 반응이 유발 되었으나, O1 처리구에 비해 염증반응이 확연히 줄어 든 것을 확인하였다. 이를 통해 산양유 단백질분획물 소재가 대장염을 개선하는 효과를 지니는 것을 알 수 있었다.

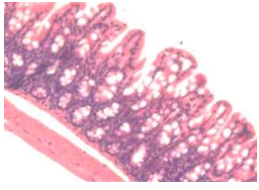
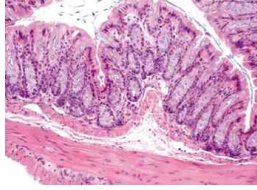
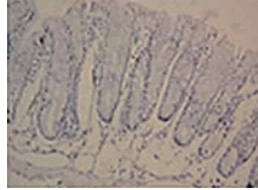
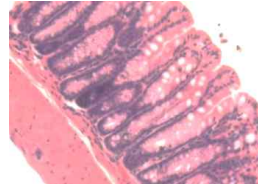
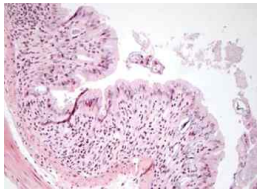
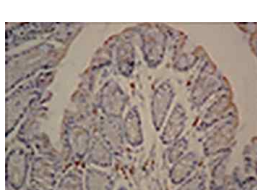
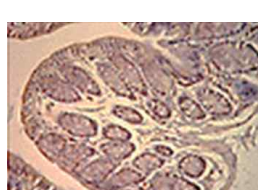
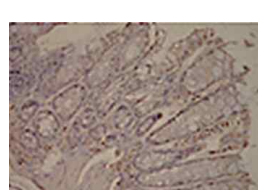
Control			
no protein (C1)	Milk protein (C2)	A2 $\beta$ -casein (C3)	A2 $\beta$ -casein nano delivery system (C4)
			
Oxazolone			
no protein (O1)	Milk protein (O2)	A2 $\beta$ -casein (O3)	A2 $\beta$ -casein nano delivery system (O4)
			

그림 14. H&E 염색을 이용한 실험쥐의 대장염 평가

· 실험쥐 혈액의 적혈구 및 백혈구 성분 분석

혈액성상의 성분 분석은 대조구 (C1), 유단백질 1% 처리구 (C2), A2  $\beta$ -카제인 1% 처리구 (C3), A2  $\beta$ -카제인 나노 전달체 1% 처리구 (C4), oxazolone 처리구 (O1), oxazolone과 유단백질 1% 처리구 (O2), oxazolone과 A2  $\beta$ -카제인 1% 처리구 (O3), oxazolone과 A2  $\beta$ -카제인 나노입자 1% 처리구 (O4)로 각각 구분하여 아래와 같이 제시하였다(표 4). 적혈구에 대한 성분은 총적혈구수, 혈색소량, 적혈구용적율, 망상적혈구, 평균적혈구용적, 평균적혈구헤모글로빈량, 평균적혈구헤모글로빈농도, 혈소판을 분석하였고, 백혈구에 대한 성분은 총백혈구수, 중성호성백혈구, 림프구, 단핵구, 산호성백혈구, 염기호성백혈구를 분석하였다. 총백혈구수(WBC)에서 oxazolone 처리구(O1-4)가 대조구(C1-4)에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며, 이러한 결과는 oxazolone 처리에 의해 백혈구수가 감소한 것으로 판단된다. 다른 혈액성상에서는 각 처리구별 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 추후에 혈액 및 기타 다른 조직 (비장, 간 등)에서 lymphokines 및 cytokines 등과 같은 면역 호르몬을 분석하여 장염 유도 및 단백질 분획물에 대한 면역반응에 대한 분석을 실시할 것이며 결과를 종합하여 논문에 게재할 것이다.

표 4. Hematological parameters of colitis-induced mouse model.

	RBC ( $\times 10^6$ cells/L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/L)
				MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	
C1	8.9 $\pm$ 0.7	12.6 $\pm$ 1.9	43.0 $\pm$ 4.2	48.3 $\pm$ 3.2	14.1 $\pm$ 1.6	29.1 $\pm$ 2.2	985 $\pm$ 301
C2	8.8 $\pm$ 0.4	13.2 $\pm$ 0.5	44.3 $\pm$ 1.5	50.4 $\pm$ 2.1	15.0 $\pm$ 0.4	29.9 $\pm$ 0.9	977 $\pm$ 332
C3	8.2 $\pm$ 0.9	12.2 $\pm$ 1.1	40.1 $\pm$ 4.5	48.9 $\pm$ 1.2	14.8 $\pm$ 0.3	30.4 $\pm$ 0.8	738 $\pm$ 480
C4	8.9 $\pm$ 0.5	13.0 $\pm$ 0.8	44.9 $\pm$ 4.3	50.6 $\pm$ 3.5	14.6 $\pm$ 0.3	29.0 $\pm$ 2.1	1036 $\pm$ 192
O1	9.2 $\pm$ 0.9	13.4 $\pm$ 1.3	45.0 $\pm$ 3.5	49.1 $\pm$ 1.9	14.5 $\pm$ 0.4	29.6 $\pm$ 1.0	1061 $\pm$ 177
O2	9.1 $\pm$ 0.6	13.1 $\pm$ 0.8	45.5 $\pm$ 2.6	50.1 $\pm$ 2.2	14.4 $\pm$ 0.2	28.7 $\pm$ 1.3	1137 $\pm$ 148
O3	9.0 $\pm$ 0.6	13.0 $\pm$ 0.5	45.1 $\pm$ 1.7	50.4 $\pm$ 2.6	14.5 $\pm$ 0.4	28.9 $\pm$ 1.1	1175 $\pm$ 180
O4	8.7 $\pm$ 0.4	12.6 $\pm$ 0.5	42.8 $\pm$ 2.8	49.5 $\pm$ 2.9	14.6 $\pm$ 0.5	29.5 $\pm$ 1.1	1095 $\pm$ 94

	WBC ( $\times 10^3$ cells/L)	WBC differential counting (%)				
		NEU	LYM	MONO	EOS	BASO
C1	5.1 $\pm$ 2.6	14.3 $\pm$ 6.2	76.7 $\pm$ 6.3	0.6 $\pm$ 0.2	6.5 $\pm$ 5.1	0.5 $\pm$ 0.5
C2	3.8 $\pm$ 2.6	11.9 $\pm$ 10.4	82.0 $\pm$ 11.4	0.5 $\pm$ 0.2	3.8 $\pm$ 1.3	0.4 $\pm$ 0.3
C3	4.8 $\pm$ 1.2	24.3 $\pm$ 20.6	67.1 $\pm$ 24.3	0.6 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 2.1	0.6 $\pm$ 0.3
C4	2.3 $\pm$ 1.7	9.9 $\pm$ 5.4	80.7 $\pm$ 10.3	0.6 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 3.2	0.8 $\pm$ 0.4
O1	2.9 $\pm$ 1.1	16.8 $\pm$ 11.9	75.8 $\pm$ 15.1	0.6 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.7	1.3 $\pm$ 2.9
O2	2.4 $\pm$ 0.8	17.6 $\pm$ 12.3	77.6 $\pm$ 13.4	0.6 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 1.5	0.3 $\pm$ 0.2
O3	2.4 $\pm$ 1.3	7.8 $\pm$ 1.8	83.6 $\pm$ 7.7	0.5 $\pm$ 0.3	5.9 $\pm$ 5.5	0.5 $\pm$ 0.4
O4	2.5 $\pm$ 1.3	10.6 $\pm$ 4.3	80.2 $\pm$ 8.4	0.5 $\pm$ 0.2	7.0 $\pm$ 7.6	0.4 $\pm$ 0.3

\*C1: 대조구, C2: 유단백질 1% 처리구, C3: A2  $\beta$ -카제인 1% 처리구, C4: A2  $\beta$ -카제인 나노 전달체 1% 처리구, O1: oxazolone 처리구, O2, oxazolone + 유단백질 1% 처리구, O3: oxazolone + A2  $\beta$ -카제인 1% 처리구, O4: oxazolone + A2  $\beta$ -카제인 나노 전달체 1% 처리구.

\*\*RBC: total erythrocyte count (총적혈구수), HGB: hemoglobin conc. (혈색소량), HCT: hematocrit (적혈구용적율), MCV: mean cell volume (평균적혈구용적), MCH: mean cell hemoglobin (평균적혈구헤모글로빈량), MCHC: mean cell hemoglobin conc. (평균적혈구헤모글로빈농도), PLT: platelet (혈소판수), WBC: total leucocyte count (총백혈구수), NEU: neutrophils (중성호성백혈구), LYM: lymphocytes (림프구), MONO: monocytes (단핵구), EOS: eosinophils (산호성백혈구), BASO: basophils (염기호성백혈구)

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

D-06

##### 4-1. 목표달성도

###### [주관]

###### ○ 산양유 단백질 분해물 소재의 표준화 및 대량 생산 기술 개발

제1협동기관에서 확립한 최적 효소 반응조건을 사용하여 산양유 단백질 분해물 소재 (HGMP)의 대량생산을 위한 기본 공정을 5단계로 구분하였음. 5회에 걸친 제조 공정을 통해 HGMP의 수율을 산출하고, 효율적으로 분말을 회수할 수 있는 방법을 확립하였으며 SDS-PAGE, RP-HPLC, OPA 등의 기법을 사용하여 HGMP의 단백질 분해 양상을 조사하였음. 대량 생산된 HGMP의 일반성분 및 물리화학적 특성을 조사하고, 일반세균 및 대장균 검출 등 미생물학적 검사를 통해 제품 생산 규격 표준화 및 대량 생산 공정을 확립하여 계획 했던 목표를 모두 달성하였음.

###### ○ 산양유 A2 β-케이스인 소재의 표준화 및 대량 생산 기술 개발

한외여과법(UF filtration Method)의 한계로 인하여 A2 β-케이스인 분획의 회수 및 대량 생산이 용이하지 않아 A2 β-케이스인 분획을 최대로 회수할 수 있도록 등전점 분리, 0.05M CaCl<sub>2</sub> 첨가, 저온분리법 등의 공정을 확립하여 A2 β-케이스인 소재를 대량생산 하였음. 생산된 A2 β-케이스인 분획물을 대상으로 RP-HPLC 및 SDS-PAGE를 이용하여 A2 β-케이스인의 순도 및 α<sub>s</sub>-케이스인의 저감화를 확인하였음. 파일럿 제조공정에서 large-scale up을 통한 현장 생산 적용과정을 통해 수율을 조사한 결과 A2 β-케이스인 분말의 회수율이 90.1%을 확인하였고, 대량 생산 공정을 확립하여 계획했던 목표를 모두 달성하였음.

###### ○ 질환별 환자식 식품의 생산 공정 기술 개발

환자식 시장 분석을 통하여 연령층 및 질환 타겟층을 선정하여 3종의 제품을 개발하였고, 1차년도 및 2차년도에 개발된 산양유 단백질 소재들을 첨가하여 영양균형에 알맞은 제조 배합비를 설정하였음. 필수 영양소와 HGMP가 함유된 일반 환자식, A2 β-케이스인 및 HGMP가 함유된 고단백 환자식, 소화율이 높으며 저알리지성인 당뇨식 요구르트 등 3종의 제품을 개발하여 품질 기준을 설정하고 표준화 하여 계획했던 목표를 모두 달성하였음.

###### [제1협동]

###### ○ 산양유 β-락토글로부린 및 α<sub>s</sub>-케이스인을 저감화시킨 단백질 분해물 소재 개발

산양유 단백질 중 α<sub>s</sub>-케이스인 및 β-락토글로부린을 선택적으로 저감화 시키는 효소 2종을 최종 선발하였으며 배양온도, 배양 시간 및 효소 농도에 따른 분해 양상을 조사하여 효소 최적 반응 조건을 설정하였음. 또한, SDS-PAGE 및 RP-HPLC 기법을 사용하여 생산된 소재내 α<sub>s</sub>-케이스인 및 β-락토글로부린의 저감화를 확인하였고 OPA 기법, NPN 및 FAN 정량을 통해 가수분해 양상을 조사하였으며 분무건조, 동결건조, 에탄올 침전법 등의 다양한 방

법을 사용하여 가수분해물의 최적 회수 방법을 제시하여 계획했던 목표를 모두 달성하였음.

#### ○ 산양유 단백질에서 A2 $\beta$ -케이신을 분리 정제한 분말 소재 개발

산양유를 탈지한 후 pH를 조정하고, 케이신 분리양상 및 회수율을 조사하여 산양유 케이신의 최적 분리 조건을 설정하였음. 산양유 A2  $\beta$ -케이신의 최적 분리 조건을 설정하기 위하여 분리된 케이신 용액에  $\text{CaCl}_2$ 의 첨가 농도 및 배양 시간을 다양하게 처리하고, SDS-PAGE 및 RP-HPLC 기법을 이용하여 산양유 A2  $\beta$ -케이신의  $\alpha_s$ -케이신 저감화 및  $\beta$ -케이신의 순도를 측정하였음. 또한, 분무 건조, 에탄올 처리 및 동결건조 등의 다양한 건조기법을 사용한 회수율을 조사하여 산양유 A2  $\beta$ -케이신 분말의 최적 생산 조건을 설정하여 주관기관의 대량 생산 공정에 활용하였으며, HMC-1 cells과 ELISA 기법을 이용한 TNF- $\alpha$  및 히스타민 방출량을 측정하여 생산된 산양유 A2  $\beta$ -케이신의 저알러지성을 확인하여 계획했던 목표를 모두 달성하였음.

#### ○ 산양유 단백질 소재의 특성 및 제품 가공 적성 연구

1차년도 및 2차년도에 개발된 산양유 소재들의 일반성분 및 아미노산 조성을 분석하여 영양성을 평가하였음. 용해도, 유화력, 유화안정성, 점도, 수화능력 등 이화학적 특성을 조사하여 제품 가공 적성을 조사한 결과 본 과제를 통해 개발된 2종의 산양유 소재들 모두 시판되는 bovine whole casein 및 콩단백질을 대체하여 사용할 수 있음이 확인되었음. 또한, 주관기관으로부터 3종의 환자식 제품들(당뇨식 요구르트, 일반 환자식, 고단백 환자식)을 공급받아 저장 중 안정성을 조사한 결과 당뇨식 요구르트는 4°C에서 2주간, 일반 및 고단백 환자식은 25°C에서 최소 8주이상 안정적으로 보존할 수 있음을 확인하여 계획했던 목표를 모두 달성하였음.

### [제2협동]

#### ○ 저온 유도젤화 기술을 이용한 산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤 전달체 제조 및 물리화학적 기능성 연구

통계적 모형을 사용하여 제조공정요인 (pH, 가교제, 산양유 단백질 분해물 농도, 키토산 농도)에 따른 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 하이드로젤 전달체를 제조하였으며, 제조 공정 요인에 따른 하이드로젤 전달체의 형태학적, 물리화학적 특성을 평가하였음. 또한 제품 적용성 증진을 위해 동결건조기를 이용하여 전달체의 분말화 공정을 개발하여 계획했던 목표를 모두 달성하였음.

#### ○ 하이드로젤 전달체의 생리활성물질 이용성 극대화 및 안전성 평가

통계적 모형을 사용하여 제조 공정 요인(키토올리고당 농도, 저온 열처리 온도)에 따른 A2  $\beta$ -케이신/키토올리고당 하이드로젤 전달체를 제조하였고, 전달체의 물리화학적 특성, 전달체 내 생리활성물질(resveratrol)의 entrapment efficiency 및 invitro release를 평가하였음. 또한 장 상피세포를 이용한 세포 내 독성 연구를 통해 전달체의 안전성을 평가하여 계획했던 목



표를 모두 달성하였음.

**○ 하이드로젤 전달체의 산양유 유래 질환별 맞춤형 환자식 적용 공정 개발 및 물리적 기능성 연구**

질환별 맞춤형 환자식 제품 공정 (제조 및 저장) 요인에 따른 생리활성물질 함유 전달체의 안정성 평가하였으며, 전달체의 유화활성도 측정을 통해 안정제로서 물리적 기능성을 연구하였음. 또한 전달체 함유 질환별 환자식의 물성 및 관능적 특성 평가를 통해 계획했던 목표를 모두 달성하였음.

**[제3협동]**

**○ 산양유 단백질 분해물의 장관내 흡수 작용 연구**

장상피세포인 Caco-2 cell의 transwell 배양시스템을 정립하고, 형광물질인 Alexa 488을 부착시켜 산양유 단백질 분해물의 장관 내 흡수 연구를 수행을 통해 생체 내 작용 기전을 연구하였으며 2차년도 동물실험에 필요한 임신마우스 및 장질환 마우스 모델을 선정하여 계획했던 목표를 모두 달성 하였음.

**○ 산양유 기능성 소재의 생체내 작용 기전 연구**

산양유 A2  $\beta$ -케이신 분획물로 제조된 전달체의 장상피세포내 흡수작용 분석하였고, 임신모델(흰쥐)를 이용하여 임신쥐 및 새끼쥐의 성장/포유능력 및 면역체계 분석을 통해 계획했던 목표를 모두 달성하였음.

**○ 질환모델을 이용한 산양유 기능성 소재의 효과 규명 연구**

장염유도 물질을 투여하여 장염유도 생쥐모델을 확립하였음. 대조구, 분해물 및 이를 이용한 나노 전달체를 급여하여 장염질환 모델에서 장염유도유무, 성장 및 면역능력 분석을 통해 계획했던 목표를 달성하였음

**4-2. 관련분야 기여도**

○ 산양유는 모유와 단백질 조성이 유사하여 소화 및 흡수에 용이하고, 고유의 건강 증진 기능으로 인해 의약계 및 식품업계로부터 많은 관심을 받고 있음. 뿐만 아니라 산양은 우리나라 환경에서 사육하기 용이하고 산야초를 주로 이용하여 사료비가 적게들며 소비자에게 좋은 이미지가 구축되어 있어 다양한 제품군이 생산될 경우 수익성이 보장되고 시장 규모가 점차 확대될 수 있음. 그러나 산양유를 이용한 제품 개발은 몇몇 나라에서 이루어지고 있지만 국내외적으로 산양유 단백질 소재 제품 생산은 활발하게 진행되고 있지 않음.

○ 본 연구과제를 통해 개발된 2종의 산양유 소재들은  $\beta$ -락토글로부린 및  $\alpha_s$ -케이신이 저감

화 되어 소화 흡수가 용이하고 저 알러지성으로 영유아, 노인, 회복기 환자 등을 위한 식품에 사용될 수 있음. 각 소재들의 제품 가공 적성여부를 연구하여 일반적으로 사용되는 bovine whole casein 및 콩단백질을 대체하여 사용할 수 있음을 확인하였고, 본 과제를 통해 개발될 산양유 단백질 소재들은 국내 산양유의 고부가 가치화는 물론 특수식 원료 소재의 국가 경쟁력을 제고할 수 있으며 관련 산업의 내수시장 확대와 수출 증가에 기여할 수 있음.

- 본 연구과제를 통해 개발된 산양유 성분을 이용하여 제조한 하이드로젤 나노 전달체는 저온 유도젤화 기술을 사용하여 비교적 낮은 온도 (< ~30°C)에서 제조 가능하여 기존 고온 건조 방식인 분무건조법과 비교하여 제조 및 저장 기간 동안 질화별 맞춤형 환자식에 적용된 생리활성물질의 활성 및 안정성을 증진시킬 수 있음. 또한 노인, 환자들의 면역기능 강화에 필요한 생리활성물질 (예, 오메가-3 지방산, 비타민, 항산화물질 등)을 포집하여 이용성 극대화 할수 있어 노인 및 맞춤형 환자식 제품을 제조에 이용될 수 있음. 특히 하이드로젤 특유의 보수력 (water retention capacity) 및 texture modifier 기능으로 인해 천연 안정제로서 기능성을 향상시킬 수 있어 질화별 맞춤형 환자식의 물성학적, 관능적 특성에 기여 할 수 있으며, 식품 적용시 높은 안정성을 지니고 있음. 이와 같은 산양유 성분을 이용한 새로운 기능성 소재 개발 연구는 국내 산양유 관련 시장의 경쟁력을 확보할 수 있어 내수 시장 활성화 뿐만 아니라 해외 수출 시장 진입에 용이할 것으로 기대됨.
- 본 연구에서는 인간 장상피세포의 3-D system (transwell system) 기술을 확립하였음. 이를 이용하여 협동과제에서 도출된 산양유 분해물의 흡수를 확인하기 위해 단백질 분해물에 형광물질을 부착하여 장상피세포 내로의 흡수를 규명하였음. 또한 동물실험을 통해 산양유 단백질 분해물 및 나노 전달체가 임신동물에서 모축의 성장 및 포유능력이 향상되었고 이에 따라 자축의 성장능력이 향상되었음. 장염유도모델에서 장염이 유도된 동물의 성장저하가 산양유 단백질 및 나노 전달체에 의해 보전되었음. 결과적으로 산양유 단백질은 체내로 흡수가 용이하며 임신기의 포유 및 성장을 촉진하고 특히 장염 등과 같은 질환의 개선에 효과가 있을 것으로 기대됨.

## 5. 연구결과의 활용계획

D-07

- 국내산 산양유를 활용한 기능성 단백질 소재 개발 및 이를 활용한 질환별 환자식의 제조 기술을 확보하고, 특허출원과 함께 관련 업체로의 기술 이전을 포함한 산업화, 실용화를 추진함으로써, 국내 산양유의 고부가가치화 및 특수식 원료 소재의 국가 경쟁력을 제고할 수 있음.
- 소화, 흡수가 용이하고 모유와 가장 유사한 구조와 특성을 지닌 산양유 단백질 소재를 개발하여 장 기능 발달이 미숙한 유아를 위한 유아식, 임산부, 수유부의 영양보충을 위한 임산수유부용식품, 급속한 고령 사회로의 전환에 따른 노인 맞춤형 실버 식품, 다양한 질환을 대상으로 한 특수의료용도등식품 등 미래 식품산업 대비를 위한 맞춤형 특수용도식품 개발은 관련 산업의 내수시장 확대와 수출 효과를 기대할 수 있음.
- 산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤 전달체 제조를 통한 산양유 소재의 고부가 가치화가 가능하며 산양유 성분을 이용한 전달체에 다양한 생리활성물질을 포집할 수 있어 특수용도식품 (질환별 맞춤형 환자식)을 제조할 수 있기 때문에 기능성 산양유 식품소재로서 산양유 성분 이용성을 극대화 할 수 있음.
- 산양유의 기능성소재를 과학적으로 분석하고 동물질환모델을 이용하여 작용 기전을 규명함으로써 특수용도식품으로 이용 가능하도록 함.
- 산양유의 기능성소재를 과학적으로 분석하고 동물질환모델을 이용하여 작용 기전을 규명함으로써 임신, 질환 및 고령에 의한 체력저하를 보충하는 특수용도식품으로 이용 가능하도록 함.
- 산양유를 활용한 기능성 소재 개발 및 이를 이용한 특수용도식품 개발 관련 연구는 아직까지 기초단계에 머물러 있는 실정이므로 학문적이나 산업적인 가치가 높을 것으로 생각되며 본 연구를 통해 개발된 기술을 이용하여 주관기업에서는 기 구축된 생산설비 및 영업망을 통해 환자식을 판매할 예정임.

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	D-08
○ 산양유 유래 생리활성 펩타이드는 항산화, 항균작용 및 면역조절 작용이 있고, 항혈전 작용을 통한 심혈관계 질환 방지 효과가 있으며 혈압조절에 중요한 역할을 하는 안지오텐신 전환효소 저해 작용에도 관여할 수 있음.	
○ 산양유의 발효물은 외부로부터 침입한 병원균이나 항원물질에 대한 면역세포의 반응성을 증가시켜 생체 저항력을 향상 시킬 수 있음. 산양유에 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 균주를 접종하여 만든 발효유 섭취시 영양실조 상태가 회복되고, 장 및 호흡기 감염에 대한 저항력이 높아질 수 있음.	
○ 산양유 단백질 소재를 이용한 나노 전달체 관련 연구는 세계적으로 진행된 바 없음.	
○ 인간 장상피세포의 3-D 배양기술 (transwell system)에 대한 다양한 논문 검색을 통해 기존에 제시된 여러 오류를 수정/보완하여 최적 배양조건을 확립하였으며 이를 이용하여 산양유 유래 단백질 분해물의 흡수기전을 규명하였음	

## 7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 일반과제 (「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음)		

## 8.

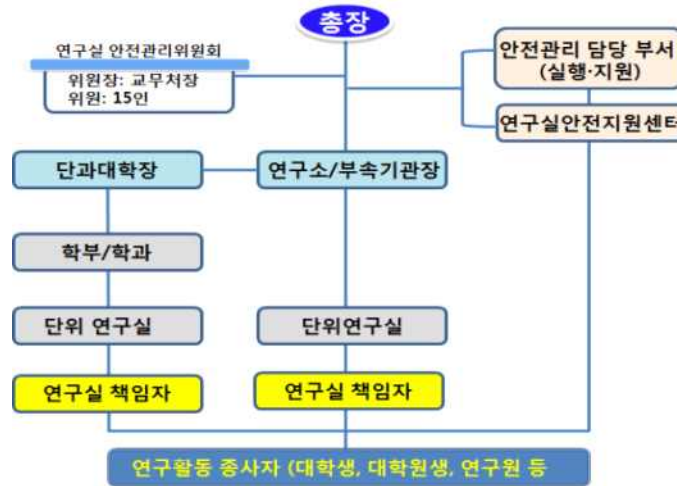
### 등록한 연구시설·장비 현황

없음.

## 9. 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

D-11

### ○ 연구실 안전 점검 체계



### ※ 위험등급별로 체계화 하여 관리

#### ○ 관리위험등급의 지정

- 위험물 제1류 : 아염소산염류, 염소산염류, 과염소산염류, 무기관산염류, 브롬산염류 등의 산화성 고체
- 위험물 제2류 : 황화린, 적린, 유황, 철분, 금속분, 마그네슘, 금속분 등
- 위험물 제3류 : 칼륨, 나트륨, 알킬알루미늄, 알킬리튬, 황린, 유기금속화합물, 금속수소화합물 등
- 위험물 제4류 : 디에틸에테르, 이황화탄소 등의 특수인화물류, 알코올류, 아세톤, 휘발유 등의 제1석유류, 등유, 경유 등의 제2석유류, 중유 등의 제3석유류, 기어유, 실린더유 등의 제4석유류, 동식물유류
- 위험물 제5류 : 유기과산화물, 질산에스테르류, 히드록실아민, 니트로화합물 등의 자기반응성 물질
- 위험물 제6류 : 과염소산, 과산화수소, 질산이 있으며, 산화성 액체

#### ○ 연구실 안전점검의 종류

- 일상점검(연구실 책임자 실시): 매일 1회, 육안 점검
- 정기점검(연구실 안전관리담당부서에서 실시): 매년 1회 이상, 안전점검기기이용 실시
- 특별안전점검: 연중수시, 폭발·화재사고 등
- 정밀안전진단: 경상대학교 규정 제 828호 제 7조에 의한 정밀안전진단지침에 따라 진단

#### ○ 교육훈련

- 목적: 연구 활동 종사자들이 연구 활동에 따른 안전과 건강을 확보하기 위해 필요한 기초적인 안전지식의 함양과 기술을 습득하게 함으로써 안전태도의 변화를 통해 본질적인 안전사고 예방과 캠퍼스 안전문화 정착에 기여

- 교육대상 : 과학기술분야 연구활동종사자(대학생·대학원생·교직원·연구원·연구보조원 등)

#### - 안전교육의 종류

##### ㉠ 일상적 교육

- 단위 연구실 특성에 따라 필요한 사항을 연구실원에 대하여 연구실책임자가 실시하는 교육
- 교육실시자 : 연구실 책임자
- 교육대상 : 단위연구실 근무자
- 교육 시간 : 연구실 책임자가 연구실특성에 따라 자체적으로 실시

㉠ 법정 의무교육

- 근거 : 연구실 안전환경조성에 관한법률 시행령 제17조
- 교육 종류 및 시간
- 교육실시자 : 연구실안전관리부서
- 교육강사 : 법에서 정한 유자격자가 실시

교육과정	교육 대상	교육 시간	교육 내용
정기 교육·훈련	연구 활동 종사자	1시간 이상/월	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 연구실 안전 환경 조성 법령에 관한 사항</li> <li>◦ 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항</li> <li>◦ 안전한 연구개발 활동에 관한 사항</li> <li>◦ 물질안전자료에 관한 사항</li> <li>◦ 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항</li> </ul>
신규채용 등에 따른 교육·훈련	신규채용 된 연구 활동 종사자(계약직 포함)	8시간 이상/월	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 연구실 안전 환경 조성 법령에 관한 사항</li> <li>◦ 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항</li> <li>◦ 보호장비 및 안전장치 취급과 사용에 관한 사항</li> <li>◦ 연구실 사고사례 및 사고예방 대책에 관한 사항</li> <li>◦ 안전표지에 관한 사항</li> <li>◦ 물질안전자료에 관한 사항</li> <li>◦ 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항</li> </ul>
	대학·연구기관 등에 채용된 자 외의 자로서 신규로 연구개발 활동에 참여하는 연구활동 종사자(대학생·대학원생 등)	2시간 이상/월	
연구내용 변경에 따른 교육·훈련	연구 활동 종사자	2시간 이상/월	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항</li> <li>◦ 안전한 연구개발 활동에 관한 사항</li> <li>◦ 물질안전자료에 관한 사항</li> <li>◦ 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항</li> </ul>

○ 보험가입현황

- 목적 : 연구실 안전사고로 인한 사망 및 상해 치료비 등 손해 보상 서비스  
연구활동종사자가 안전하게 교육/연구활동을 할 수 있는 환경 조성

- 보험내용

○ 보험명: 연구실 안전공제

○ 보상금액

- 사망 1인당 1억원, 후유장애 시 급수에 따라 1억~625만원 보상
- 부상의 경우, 1,000만원 한도로 상해 등급별 정액 및 실손 보상
- 적용대상 경상대학교 연구활동종사자

○ 보상내용

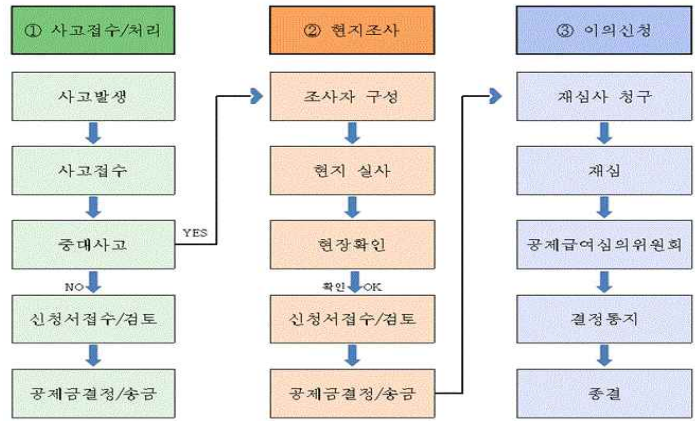
- 연구활동종사자가 연구실에서 발생한 사고로 부상/질병/신체장해/사망 등 생명 및 신체상의 손해를 입었을 때
- 과실이 있고 없음을 가리지 않고 자기 또는 다른대학·연구기관 등에서 연구활동 등에서 연구활동 중에 급격하고도 우연한 외래의 사고로 신체에 상해를 입거나 그 손해가 원인이 되어 질병에 걸렸을 때

○ 보상금 청구

- 청구요건 : 본교 연구활동종사자 『연구실 안전공제』 보험에 가입된 자로서 연구활동 중에 발생한 사고로 인한 생명 및 신체상의 손해가 발생한 경우
- 청구절차: 사고상황 통보서 작성(본교 공동실험실습관 팩스 또는 이메일 송부) → 중대사고 여부 검토 및 현지조사(보험사) → 연구실책임자(사고경위서 작성) → 소속기관장 → 본교 공동실험실습관 접수 및 처리

※ 경미한 사고시 처리절차사고상황 통보서 작성(본교 공동실험실습관 팩스 또는 이메일 송부) → 경미한 사고 확인 → 치료 완료 → 연구실책임자 및 피공제자 작성(사고경위서 및 공제급여청구서 등) → 소속기관장 청구 → 본교 공동실험실습관 → 보험사 청구 → 피공제자 통장 입금

○ 공제 급여 지급 절차



10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	D-12	
								사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	산양유 단백질 가수분해물, 그것의 제조방법 및 그것의 식품에 사용하는 용도	삼육대학 교		대한민국		2017.01.16	단독	특허등록
2	특허	산양유 단백질 분해물 유래 하이드로겔 나노 전달체 및 그 제조방법	경상대학 교		대한민국		2016.09.26.	단독	특허출원
3	논문	Hydrolysis by Alcalase Improves Hypoallergenic Properties of Goat Milk Protein	삼육대학 교	제1 저자	Korean Journal for Food Science of Animal Resources	0.484	2016.07.15	단독	SCI
4	논문	Resveratrol-loaded Nanoparticles Induce Antioxidant Activity against Oxidative	경상대학 교	제1 저자	Asian-Austr alasian Journal of Animal	0.756	2016.02.29.	단독	SCI

		Stress			Sciences				
5	논문	산양유 단백질 분해물/키토올리고당 나노 전달체 제조 및 물리화학적 특성연구	경상대학교	제1저자	J Milk Science and Biotechnology		2017.09.30	단독	연구재단 등재후보지

## 11. 기타사항

	D-13
○ 해당사항 없음	

## 12. 참고문헌

	코드번호	D-14
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Bera, M. B. and Mukherjee, R. K. (1989) Solubility, emulsifying and foaming properties of rice bran protein concentrates. J. Food Sci. 54, 142-145.</li> <li>○ Pearce, K. N. and Kinsella, J. E. (1978) Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. J. Agric. Food Chem. 26, 716-723.</li> <li>○ Anderson, R. A. (1982) Waters absorption and solubility and amylograph characteristics of rolled-cooked small grain products. Cereal Chem 59,265-271.</li> </ul>		



<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 국내산 산양유를 활용한 기능성 소재개발 및 이를 활용한 환자식 개발				
	(영문) Development of goat milk based functional food material and foods for special dietary uses				
주관연구기관	(주)이담		주 관 연 구 책 임 자	(소속) (주)이담	
참 여 기 업	(주)이담			(성명) 윤승섭	
총연구개발비 (900,000 천원)	계	900,000,000	총 연구 기간	2014. 11. 28. ~ 2017. 11. 27.(3 년)	
	정부출연 연구개발비	675,000,000	총 참 여 수	총 인원	44명
	기업부담금	225,500,000		내부인원	42명
	연구기관부담금	0		외부인원	2명

○ 연구개발 목표 및 성과

- 산양유 단백질 소재 대량 생산 및 질환별 환자식 생산 기술 개발  
산양유 단백질 분해물(HGMP)과 산양유 단백질 분획물(A2-beta casein)을 제조할 수 있는 최적 공정을 확립하여 2종의 소재들을 대량생산 하였음. 개발된 소재들을 이용하여 당노식 요구르트, 일반 환자식, 고단백 환자식 등 총 3종의 제품을 개발하여 제품의 품질 기준을 확립하고 표준화 하였음.
- 산양유 단백질 소재 생산 및 제품 가공 적성 연구  
 $\beta$ -락토글로부린 및  $\alpha$ s-케이신을 저감화시켜 소화력이 우수하고 저 알러지성의 산양유 소재 2종을 개발하였으며 대량생산 조건을 확립하였음. 개발된 소재들의 영양성분 및 이화학적 특성을 조사하여 우유 케이신, 콩 단백질 등을 대체할 수 있는 환자식 소재로의 활용 가능성을 확인함.
- 산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤 전달체의 기능성 규명 및 제품 적용 공정 개발  
산양유 단백질 분해물(HGMP)과 산양유 단백질 분획물(A2-beta casein)을 이용한 하이드로젤 나노전달체를 성공적으로 제조하였음. 제조된 하이드로젤 전달체의 생리활성 물질 포집 능력과 같은 기능성을 규명하였으며, 질환별 맞춤형 환자식의 물성학적 특성을 향상시킬 수 있는 적용 공정을 개발하였음.
- 질환모형을 이용한 산양유 기능성소재의 작용 기전 연구

본 연구팀에서는 산양유 단백질 유래 소재인 산양유 단백질 분해물(HGMP)과 산양유 단백질 분획물(A2-beta casein)의 작용 기전 연구를 위해 다양한 질환모델을 이용하였음. 산양유 단백질 분해물의 사람 장 상피세포인 Caco-2 cell 내 흡수연구 및 쥐 임신 모델을 이용한 성장 유도 연구, 장염유도 생쥐모델을 이용한 A2-beta casein 및 이를 이용한 하이드로젤 전달체의 장염 개선 효과를 연구하였음.

#### ○ 연구내용 및 결과

- 산양유 단백질 소재 2종 (HGMP, A2  $\beta$ -casein)을 생산할 수 있는 공정을 확립하여 대량생산한 후 일반성분 및 미생물잔존 검사를 실시하여 시제품의 품질 기준을 확립하고 표준화하였음. 또한 시장분석을 통해 질환 타겟층을 선정 후 개발된 단백질 소재들이 포함된 환자식 3종 (당뇨식 요구르트, 일반 환자식, 고단백 환자식)을 개발하였고 영양성분, 이화학적 및 미생물학적 특성을 분석하여 개발된 환자식 3종의 품질을 표준화 하였음.
- 산양유로부터  $\beta$ -락토글로부린 및  $\alpha$ s-케이스인이 저감화된 단백질 소재들을 개발하고, 대량생산할 수 있는 최적의 조건을 확립하였음. SDS-PAGE 및 RP-HPLC 기법 등을 이용하여 개발된 소재들내  $\beta$ -락토글로부린 및  $\alpha$ s-케이스인이 효과적으로 저감화 되었음을 확인하였고, HMC-1 cells 배양실험을 통해 histamin 및 TNF- $\alpha$  방출량을 조사하여 저알러지성을 확인하였음. 또한 개발된 소재들의 영양학적 특성, 이화학적 특성, 제품 가공 적성, 제품 적용시 안정성 등을 평가하여 환자식 제품 소재로서의 실효성을 검증하였음.
- 저온 유도 젤화 기술을 이용하여 산양유 단백질 유래 (산양유 단백질 분해물 및 A2  $\beta$ -카제인) 하이드로젤 나노 전달체를 제조 하였고 레스베라트롤과 같은 생리활성물질의 성공적인 포집을 통해 생리활성물질 이용성을 향상시킬 수 있었음. 또한 장 상피세포를 이용한 나노 전달체의 세포 내 독성 평가를 통해 안전성을 규명하였음. 나노 전달체는 질환별 맞춤형 환자식 적용 공정 과정 동안 높은 물리적 안정성을 보였으며, 질환별 맞춤형 환자식 (드링킹 요구르트) 적용 시 물성학적, 관능적 특성을 향상시킬 수 있었음.
- 질환모델을 이용한 산양유 기능성 소재의 작용 기전 연구를 위해 인간의 장상피세포인 Caco-2 cell을 이용하여 3차원 transwell system을 확립하고 단백질분해물의 상피세포내 흡수를 확인하기 위해 형광물질을 부착하여 상피세포내 흡수를 규명하였음. 동물 실험은 1차로 임신모델을 이용하여 단백질 분해물이 급여가 어미쥐 및 새끼쥐의 성장을 촉진하였으며, 특히 어미쥐의 포유능력을 개선하였음. 2차로 장염유도 생쥐모델을 이용하여 단백질 분해물 및 이를 이용한 나노 전달체가 장염이 유도된 생쥐의 체중감소를 보전하여 장염을 개선하는 효과를 나타냈음.

#### ○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 산양유를 이용하여 단백질 소재들을 생산하고 개발된 소재들을 이용하여 환자식을 제조하는 전체적인 공정을 확립하여 계획했던 실적을 모두 달성하였음. 산양유 단백질 소재들

(HGMP, A2  $\beta$ -casein)을 이용하여 개발된 환자식들은 관련 산업의 내수시장 확대와 수출효과를 기대할 수 있으며, 소비자 니즈(needs) 분석결과에 따라 새로운 개념의 특수용도식품 개발 시스템의 모델로 활용될 수 있음.

- 본 연구를 통해 도출된 결과들로 당초 계획했던 특허 출원 및 등록, 논문 및 학술대회 발표 등 모든 실적이 성공적으로 달성되었음. 개발된 산양유 소재들을 다양한 환자식에 적용하여 산양유의 고부가 가치화 뿐 아니라 특수식 원료 소재의 국가 경쟁력을 제고할 수 있으며 관련 산업의 활성화를 기대할 수 있음.
- 본 연구를 통해 개발된 산양유 단백질 유래 하이드로젤 나노 전달체 연구를 통해 당초 계획했던 특허 출원, 국내외 논문 투고, 학술대회 발표 등과 같은 업적을 성공적으로 수행하였음. 특히 산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤 나노 전달체는 질환별 맞춤형 환자식 적용성이 뛰어나며 관능적 특성을 향상시킬 수 있어 산양유 단백질 유래 소재의 고부가 가치화에 기여 할 수 있을 것으로 기대됨.
- 본 연구 과제를 통해 수행된 in vitro 및 in vivo model을 이용한 산양유 단백질 소재의 기능성 규명 연구 결과를 SCI급 논문에 투고하였으며, 현재 투고 중임. 또한 관련 결과를 국내외 학술대회에서 발표하였음. 본 과제에서 도출된 산양유 단백질 소재의 기능성 규명 연구 결과는 산양유의 고부가 가치화에 기여할 수 있을 것으로 기대됨.

[별첨 2]

## 자체평가의견서

1.

				D-15	
		과제번호		314045-3	
사업구분	고부가가치식품기술개발				
연구분야	개발			과제구분	단위
사업명	고부가가치식품기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	국내산 산양유를 활용한 소재개발 및 이를 활용한 환자식 개발			과제유형	개발
연구기관	(주) 이담			연구책임자	윤송섭
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2014.11.28- 2015.11.27	225,000	75,000	300,000
	2차년도	2015.11.28- 2016.11.27	225,000	75,000	300,000
	3차년도	2016.11.28- 2017.11.27	225,000	75,000	300,000
	4차년도				
	5차년도				
	계	2014.11.28- 2017.11.27	675,000	225,000	900,000
참여기업	(주) 이담				
상대국		상대국연구기관			

2. 평가일 : 2017. 2. 1.

3. 평가자(연구책임자) : 윤송섭

소속	직위	성명
(주) 이담	전무	윤송섭

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 윤송섭

평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	--

## I. 연구개발실적

다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

국내산 산양유를 이용하여 소화율이 우수하고, 저알러지성의 산양유 소재 2종을 개발하였으며 이를 이용하여 3종의 환자식 제품을 성공적으로 생산하였습니다. 소재의 개발부터 환자식 제품 생산에 이르는 전체적인 공정을 확립하였고, 하이드로젤 나노 전달체 제조, *in vitro* 및 *in vivo* 연구를 통해 개발된 소재의 기능성 및 활용 가능성이 성공적으로 확인되었습니다.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

현재 산양유를 활용한 기능성 소재 개발 및 이를 이용한 특수용도식품 개발 관련 연구는 기초단계에 머물러 있는 실정이므로 본 연구의 도출된 유의미한 결과들은 학문적, 산업적 가치가 높을 것으로 생각되며 관련 산업의 내수시장 확대와 수출 효과를 기대할 수 있습니다.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

본 연구과제를 수행하여 개발한 3종의 환자식 외에도 산양유 소재들을 이용하여 다양한 제품들의 개발이 가능하며, 소재의 개발부터 제품 생산까지 확립된 공정은 특수용도식품 개발 시스템의 모델로 활용될 수 있습니다.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

각 기관별로 계획했던 실험들이 모두 체계적으로 성실하게 수행되었으며 의미있는 결과들이 도출되었습니다. 또한, 각 년차별로 과제 종료시 평가원의 의견을 적극적으로 수용하여 연구 내용을 보완 및 수정하고 변경된 내용을 성실하게 수행 하였습니다.

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수)

당초 계획했던 성과들을 모두 달성하였을 뿐만 아니라 본 과제의 연구결과들을 다양한 학술대회에 활발하게 발표하여 학술대회 업적을 초과 달성하였습니다.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
<주관> 산양유 단백질 분해물 소재의 표준화 및 대량 생산 기술 개발	10	100	산양유 단백질 분해물(HGMP)의 대량생산 공정을 확립하였고 일반성분, 물리화학 및 미생물학적 특성을 조사하여 제품 생산 규격을 표준화 하였음
<제1 협동> 산양유 β-락토글로부린 및 αs-케이스인을 저감화시킨 단백질 분해물 소재 개발	8	100	상업용 효소를 이용하여 산양유로부터 β-락토글로부린 및 αs-케이스인이 저감화된 단백질 소재를 개발하였고 최적의 조건을 성공적으로 확립하였음
<제2 협동> 저온 유도젤화 기술을 이용한 산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤 전달체 제조 및 물리화학적 기능성 연구	8	100	통계적 모형을 사용하여 산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤 전달체의 제조방법을 정립하고 제조 공정 요인에 따른 전달체의 형태학적, 물리화학적 특성을 평가하였음. 또한 동결건조 분말화 공정을 통해 하이드로젤 전달체의 이용성을 극대화 하였음
<제3 협동> 산양유 단백질 분해물의 장관내 흡수 작용 연구	8	100	산양유 단백질 분해물에 형광물질 (FITC, Alexa 488) 부착 및 효율을 측정하였고 Flow cytometry를 이용한 단백질 분해물의 흡수 효율을 규명하였음
<주관> 산양유 A2 β-케이스인 분획의 표준화 및 대량 생산 기술 개발	10	100	산양유를 이용하여 A2 β-케이스인 소재의 대량생산 공정을 확립하였고, 일반성분 및 물리화학적 특성과 일반세균 및 대장균 등 미생물학적 검사를 실시하여 제품의 품질을 표준화 하였음
<제1 협동> 산양유 단백질에서 A2 β-케이스인을 분리 정제한 분말 소재 개발	8	100	산양유로부터 A2 β-케이스인이 다량 함유된 분획을 성공적으로 정제하였고, 개발된 소재의 저알리지성을 검증하였음
<제2 협동> 하이드로젤 전달체의 생리활성 물질 이용성 극대화 및 안전성 평가	7	100	A2 β-케이스인을 이용하여 제조된 하이드로젤 전달체 내 생리활성물질 (레스베라트롤)의 포집 및 포집 효율을 측정하였으며 하이드로젤 전달체 내에 포집된 레스베라트롤의 위장관 조건에서의 in vitro release를 평가하였음. 또한 인간 장상피세포(Caco2 cell)을 이용하여 하이드로젤 전달체의 안전성을 평가하였음
<제3 협동> 산양유 기능성 소재의 생체내 작용 기전 연구	7	100	인간 장상피세포(Caco2 cell)을 이용하여 단백질분획물로 제조된 전달체의 흡수 작용을 확인하였으며 임신모델(rat)을 이용한 단백질분획물의 성장능력 및 포유능력 검증을 통해 인체 이용가능성 확립하였음
<주관> 질환별 환자식 식품의 생산 공정 기술 개발	10	100	국내 환자식 시장조사를 통하여 특정 질환 및 타겟층을 선정하였고, 이를 토대로 개발된 산양유 소재들이 함유된 환자식을 제조하는 공정을 확립했으며 제품의

			품질을 표준화 하였음.
<제1 협동> 산양유 단백질 소재의 특성 및 제품 가공 적성 연구	10	100	1, 2차년도에 개발된 소재들의 영양적 특성, 이화학 특성, 제품 가공 적성, 제품 적용시 저장성 등을 평가하여 기존 단백질 소재들을 대체할 수 있는 환자식 소재로서의 가능성을 성공적으로 검증하였음
<제2 협동> 하이드로젤 전달체의 산양유 유래 질환별 맞춤형 환자식 적용 공정 개발 및 물리적 기능성 연구	7	100	질환별 맞춤형 환자식 제품 공정에 따른 하이드로젤 전달체의 안정성을 평가하였고, 안정제로서 물리적 기능성을 연구하였음. 또한 질환별 맞춤형 환자식 적용후 물성학적, 관능적 평가를 통해 제품 적용성 증진 공정을 연구하였음.
<제3 협동> 질환모델을 이용한 산양유 기능성 소재의 효과 규명 연구	7	100	질환모델(Oxazolone 유도 모델)을 이용한 산양유 단백질 유래 기능성 소재의 장질환 관련 기능성을 연구하였음.
합계	100	100	

### III. 종합의견

#### 1. 대한 종합의견

초기 계획된 실험들이 모두 성실하게 체계적으로 수행되었고 유의적이고 의미있는 결과들이 도출되었습니다. 소화율이 좋은 저 알러지성의 소재를 개발하기 위해 국내산 산양유를 이용하여 as-케이신 및 β-락토글로불린이 저감화된 2종의 소재들을 개발했을 뿐만 아니라 개발된 소재들을 이용하여 당뇨식 요구르트, 일반 환자식, 고단백 환자식 등 3종의 환자식 제품 생산 공정을 성공적으로 확립하였습니다. 또한, 개발된 소재의 기능성 및 활용 가능성을 검증하기 위해 하이드로젤 나노 전달체 제조, *in vitro* 및 *in vivo* 연구를 계획대로 성실하게 진행하였고 유의미한 결과들이 도출 되었습니다.

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 과제를 성공적으로 수행하기 위하여 각 기관별로 계획했던 목표를 모두 달성하였을 뿐만 아니라 각 년차별로 과제 종료시 평가원의 보완 의견을 적극 수용하여 연구 내용을 수정하였고, 보완된 연구 내용 또한 성실하게 수행 하였습니다. 당초 계획했던 특허, 기술이전, 제품화, 논문 등 주요 실적을 모두 달성하였고, 연구기간 동안 학술대회에 활발하게 참석하여 학술대회 발표 실적을 초과 달성하였습니다.

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구과제를 수행하며 개발된 산양유 소재들은 3종의 환자식 뿐만 아니라 다양한 제품에 적용 가능하며 소재의 개발부터 제품을 생산하는 전체적인 공정은 특수용도식품 개발 시스템의 모델로 활용될 수 있습니다. 또한, 본 연구를 통해 개발된 기술을 이용하여 확립된 공정을 통해 다양한 환자식을 제조할 예정입니다.



#### IV. 보안성 검토

○ 해당사항 없음

##### 1. 의견

○ 해당사항 없음

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

○ 해당사항 없음

[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	국내산 산양유를 활용한 기능성 소재개발 및 이를 활용한 환자식 개발			
주관연구기관	(주)이담		주관연구책임자	윤승섭
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	675,000,000 원	225,000,000 원	-	900,000,000 원
연구개발기간	2014년 11월 28일 - 2017년 11월 27일			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자체사업화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유: _____ )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 산양유 단백질 소재 대량 생산 및 질환별 환자식 생산 기술 개발 (주관)	제1협동기관에서 확립된 조건을 토대로 산양유 단백질 분해물 (HGMP)과 산양유 단백질 분획물 (A2 β-casein)의 대량 생산 공정을 최적화시켰으며, 개발된 소재들의 일반성분, 물리화학적 및 미생물학적 특성을 조사하여 제품의 품질을 표준화 하였음. 또한, 국내 환자식 시장조사를 통해 특정 질환 및 타겟층을 선정하였고, 이를 토대로 1, 2차년도에 개발 된 산양유 단백질 소재들이 포함된 3종의 환자식 (당뇨식 요구르트, 일반 환자식, 고단백 환자식) 생산 공정을 확립하였고, 제품의 품질 규격을 표준화 하였음.
② 산양유 단백질 소재 생산 및 제품 가공 적성 연구 (제1협동)	당초 계획대로 β-락토글로부린 및 αs-케이신을 효과적으로 저감화하여 소화 흡수에 용이한 산양유 단백질 소재들을 개발하였고, 대량생산을 위한 최적 조건을 확립 하였음. SDS-PAGE 및 RP-HPLC 기법 등을 이용하여 개발된 소재들의 정제 양상을 확인했으며 HMC-1 cells 배양을 통해 histamin 및 TNF-α 방출량을 조사하여 저알러지성을 확인하였음. 또한, 개발된 소재들의 영양성, 이화학적 특성, 제품 가공 적성, 제품 적용시 안정성 등을 평가하여 개발된 소재들이 환자식 제품에 성공적으로 적용될 수 있으며 우유 케이신이나 콩단백질과 같은 기존 단백질 소재의 대체 소재로서의 가능성을 검증하였음.
③ 산양유 단백질 분해물 유래 하이드로젤 전달체의 기능성 규명 및 제품 적용 공정 개발 (제2)	당초 계획한 대로 주관 및 제1협동에서 개발한 산양유 단백질 소재들을 이용하여 하이드로젤 나노 전달체를 성공적으로 제조하였으며, 공정 요인에 따른 물리화학적 기능성을 연구하였음. 또한 다양한 생리활성물질을 성공적으로 포집하였으며 포집 효율 극대화를 위한 공정을 연구하였음. 사람 장 상피세포주를 이용하여 전달체의 안전성을 규명하였으며 질환별 맞춤형 환자식 적용 공정과 물리적 기능성 연구를 통해 제품 적용성을 평가하여 3년간 모든 연구 목표를 달성하였음.

협동)	
④ 질환모델을 이용한 산양유 기능성소재의 작용 기전 연구 (제3협동)	본 연구팀에서는 장 상피세포주와 실험동물 (임신 모델 및 약물투여 모델)을 이용하여 주관, 제1협동, 제 2협동에서 개발 한 산양유 유래 단백질 소재 및 이를 이용한 하이드로젤 전달체의 기능성과 작용 기전 연구를 통해 당초 계획한 연구 목표를 달성하였음.

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표										
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					소 재	기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	보고서	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치			논문	학술발표	논문 평균 IF				정책 활용	홍보 전시	
	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	명	건	건			
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	명	건	건			
가중치	10	10		10		10				10		15	10		10		5	5		5	
최종목표	3	1		1		1				2		6	2		9		9	1		2	
연구기간 내 달성실적	3	1		1		1				2		6	2		12		9	1		2	
달성율(%)	100	100		100		100				100		100	100		133		100	100		100	

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	산양유 단백질 가수분해물, 그것의 제조방법 및 그것의 식품에 사용하는 용도
②	산양유 단백질로부터 β-카제인 A2의 분리 방법 및 이의 식품에 사용하는 용도
③	산양유 단백질 유래 소재를 이용한 하이드로젤 나노 전달체 제조 기술

### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해결	정책자료	기타
①의 기술		v				v	v			
②의 기술		v				v				
③의 기술	v					v	v			

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	본 연구를 통해 개발된 산양유 단백질 분해물 소재는 특허 등록이 완료되었고 기업으로 소유권이 이전되었으며 향후 영유아, 노인, 회복기 환자들을 위한 특수용도식품에 사용될 계획임. 이는 산양유의 고부가 가치화 뿐만 아니라 특수용도식품 원료 소재의 국가 경쟁력을 제고할 수 있으며 관련 산업의 활성화를 기대할 수 있음.
②의 기술	본 연구 과제를 통해 개발된 산양유 A2 β-카제인 소재는 특허 출원을 완료하였고, 현재 특허 등록 진행 중임. 개발된 소재는 특수용도식품의 제조에 활용될 예정이며 현재 산양유를 활용하여 소재를 개발하는 연구들이 미비한 실정이므로 산업적인 가치 뿐만 아니라 학문적인 활용 가능성 또한 높을 것으로 기대됨.
③의 기술	본 연구 과제를 통해 개발된 하이드로젤 전달체 제조 기술은 국내 특허 출원을 완료하였고, 등록 진행 중임. 산양유를 활용한 기능성 소재 개발 및 이를 이용한 질환별 맞춤형 환자식 개발 관련 연구는 아직까지 기초단계에 머물러 있는 실정이므로 학문적이거나 산업적인 가치가 높을 것으로 기대됨. 본 과제를 통한 연구 내용은 국내외 논문에 투고 및 제품 개발/판매에 활용될 계획임

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표											연구기반지표										
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					소재	기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	보고서	정책 활용홍보		기타(타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치			논문	학술발표	논문평균 IF	정책 활용				홍보 전시		
											SC I	비 SC I					논문	학술	정책		홍보	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	명	건	건				
가중치	10	10		10		10	5				10		15	5		10		5	5		5	
최종목표	3	3		1		3	500				2		9	3		9		9	2		2	
연구기간내 달성실적	3	1		1		1					2		6	2		12		9	1		2	
연구종료 후 성과창출 계획		2				2	500						3	1				1				

