

발간등록번호

11-1543000-002152-01

유기농 치즈 부산물을 활용한 유기농 기능성 소재
개발 및 응용한 유기농 분유의 개발 최종보고서

2018.01.30.

주관연구기관 (주)네오크레마
참여연구기관 매일유업(주)
협동연구기관 고려대학교산학협력단

농림축산식품부

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “유기농치즈부산물을 활용한 유기농 기능성 소재 개발 및 응용한 유기농분유의 개발”(개발기간 : 2014.12.17. ~ 2016.12.16.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018 . 01 . 30 .

주관연구기관명 : (주)네오크레마

(대표자) 김재환 (인)



참여연구기관명 : 매일유업(주)

(대표자) 김선화 (인)



협동기관명 : 고려대학교 산학협력단

(대표자) 고재상



주관연구책임자 : 김재환

협동연구책임자 : 서형주

참여기관책임자 : 김용기

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	314077-3	해당 단계 연구 기간	2014.12.17. ~ 2017.12. 16.	단계 구분	3단계/ 3단계
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대과제명	유기농치즈부산물을 활용한 유기농 기능성 소재 개발 및 응용한 유기농분유의 개발			
	세부 과제명	유기농치즈부산물을 활용한 유기농 기능성 소재 개발 및 응용한 유기농분유의 개발			
연구책임자	김재환	해당단계 참여 연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:300,000천원 민간:300,000천원 계:600,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 54명 내부: 54명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:900,000천원 민간:900,000천원 계:1,800,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)네오크레마 고려대학교 산학협력단			참여기업명 매일유업(주)	
위탁연구	해당사항없음				
				보고서 면수 244 페이지	

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유기농 치즈부산물로부터 유기농 기능성 소재 원료 분리 ○ 부산물을 활용한 기능성 소재의 개발 ○ 유기농 기능성 소재의 기능성평가 ○ 유기농 기능성 소재의 안전성평가 ○ 유기농 기능성 소재의 사업화 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유기농 치즈부산물로부터 유기농 기능성 소재원료 분리 완료 <ul style="list-style-type: none"> ■ 유당 및 유청단백 분리·정제 기술개발, 원료표준화 및 규격설정 ○ 유기농 치즈부산물을 활용한 기능성소재 개발 완료 <ul style="list-style-type: none"> ■ 유기농 갈락토올리고당(50%, 60%) 및 락툴로스(30%, 40%) 개발 ■ 중국규격용 유기농갈락토올리고당 개발 ■ 단백질가수분해물 개발 및 기호도 개선평가 ○ 유기농 기능성 소재의 기능성 평가 완료 <ul style="list-style-type: none"> ■ 유산균 증식효과 및 변비개선 효과 확인 ■ 유청 단백질가수분해물의 성장촉진 확인 ■ 유기농분유의 유산균 증식작용 확인 ○ 기능성 소재의 안전성 평가 완료 <ul style="list-style-type: none"> ■ 유기분유적용 소재의 스펙확립 및 독성평가 ○ 기능성 소재의 사업화 <ul style="list-style-type: none"> ■ 유기농분유 시제품제작 및 분유제품 출시 ■ 인증획득 (유기가공식품인증, 할랄인증, 중국인증) ■ 유기농갈락토올리고당의 해외수출 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 영유아를 대상으로 하는 고부가가치 소재 및 유제품의 국제경쟁력 확보를 위한 기반기술 개발완료 ■ 개발된 기술을 바탕으로 국내외 매출확대를 통한 기업경쟁력 확보 					
중심어 (5개 이내)	갈락토올리고당	유청단백 가수물	락툴로스	유기농분유	성장촉진	

< SUMMARY >

	코드번호	D-02
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Separation of Organic Functional Materials from Organic Cheese by-products ○ Development of functional materials using by-products ○ Functional evaluation of organic functional materials ○ Safety evaluation of organic functional materials ○ Commercialization of organic functional materials 	
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Separation of Organic Functional Materials from Organic Cheese by-products: complete <ul style="list-style-type: none"> ■ Development of lactose and whey protein separation and purification technology, standardization and specification of raw materials ○ Development of functional materials using by-products: complete <ul style="list-style-type: none"> ■ Developed organic galactooligosaccharides (50%, 60%) and lactulose (30%, 40%) ■ Development of organic galactooligosaccharide for Chinese standard ■ Development of protein hydrolysates and evaluation of improvement preference ○ Functional evaluation of organic functional materials: complete <ul style="list-style-type: none"> ■ Confirming the effects of lactic acid bacteria growth and constipation improvement ■ Confirm growth promotion of whey protein hydrolysates ■ Confirming lactic acid bacterial proliferation of organic powdered milk ○ Safety evaluation of organic functional materials: complete <ul style="list-style-type: none"> ■ Specification and toxicity evaluation of organic milk powder application materials ○ Commercialization of organic functional materials: complete <ul style="list-style-type: none"> ■ Production of organic milk powder and milk powder production ■ Obtained certification (Certified organic food, Halal certification, China organic food certification) ■ Export of Organic Galactooligosaccharide to overseas 	

Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ■ Developed infrastructure technology to secure international competitiveness of high-value-added materials and dairy products targeting infants and toddlers ■ Securing corporate competitiveness by expanding domestic and overseas sales based on developed technology 				
Keywords	galactooligosaccharide,	whey protein hydrolysate	lactulose	organic infant formula	growth stimulating activity,

<Contents>

1. Introduction	8
2. Present status of related R&D in domestic and foreign countries	18
3. Contents and results of the research	20
4. Degree of achievement against research goal and impact on other research areas	222
5. Plan for utilization of results of the research	225
6. Information of science and technology of foreign countries	234
7. Security level of R&D achievement	234
8. Equipments and facilities to be registered	234
9. Performance result for laboratory safety	235
10. Primary research achievement	238
11. Etc	241
12. References	241

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	8
가. 연구개발 목적	8
나. 연구개발의 필요성	8
다. 연구개발의 범위 및 내용	18
2. 국내외 기술개발 현황	18
가. 기술개발 현황	18
나. 국내 상용화 기술 수준	18
3. 연구수행 내용 및 결과	20
가. 연구개발의 추진전략 및 추진체계	20
나. 연구내용	22
다. 사업화 실적	189
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	222
가. 연구성과목표	222
나. 연차별 목표달성도	222
다. 관련 기여도	224
5. 연구결과의 활용계획 등	225
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	234
7. 연구개발성과의 보안등급	234
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	234
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	235
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	238
11. 기타사항	241
12. 참고문헌	241

별첨1. 연구개발보고서 초록

별첨2. 자체평가의견서

별첨3. 연구성과활용계획서

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

가. 연구개발 목적

본 과제는 유기농 치즈 부산물을 원료로 하여 성장촉진, 정장기능 등의 생리활성을 가지는 기능성 식품소재를 개발하고, 이를 응용한 기능성 유기농 분유를 개발하고자 한다.

현재 시판되고 있는 유기가공 식품은 주로 영유아를 대상으로 하는 유제품을 중심으로 형성되어 있으며, 식품을 구성하는 전체 성분 중 95% 이상을 유기농 혹은 유기가공식품으로 구성하여야 한다.

유기가공 식품은 건강을 보다 지향하는 소비자의 니즈로서, 지속적으로 그 시장이 증가하고 있으나, 유기가공식품에 적용할 수 있는 유기농 소재가 매우 제한적이기 때문에, 소비자의 다양한 니즈에 기존 제품이 부응하고 있지 못하고 있다.

본 과제를 통해 개발하고자 하는 성장촉진 기능을 가지는 유기농 단백질 가수분해물과 정장기능을 가지는 유기농 올리고당(락툴로스과 갈락토올리고당)은 모두 영유아에 필수적인 생리활성을 가지고 있는 소재로서, 유기농 분유를 비롯한 다양한 유기농 식품에 적용할 수 있도록 사업화에 목적을 둔다.

나. 연구개발의 필요성

1) 유기가공식품이란 ?

유기가공식품(Organic processed food)은 인증 받은 유기원료(유기농산물, 유기축산물 등)를 유기적인 방법으로 가공한 식품으로 법에 의해 인증 받은 식품 즉, ‘친환경농업육성법’ 제 16조에 따른 유기농산물을 원료 또는 제조, 가공, 유통되는 식품을 의미한다.

여기서 말하는 유기적인 방법은 화학적으로 합성된 첨가물의 사용을 최소화하고 방사선 조사를 하지 않으며, 유기식품이 비유기식품 또는 오염물질과 접촉하지 않도록 구분하여 취급함으로써 유기농산물의 순수성이 가공과정을 통해 훼손되지 않도록 하는 방법이다.

유기가공식품의 인증제도는 현재 농산물과 가공식품으로 이원화되어 있어, 인증기관의 지정관리는 국제적으로 통용되는 ISO가이드 65로 통일하기로 하였으며, 최근 유기생산계획제도를 도입하여 유기농식품의 생산과정 관리를 강화하는 한편, 수입유기식품에 대한 관리 강화 및 유기농 시장 확대를 위해 유기농인증동등성협약(Organic Equivalence Agreement)을 체결하여 2014년부터 시행하였다.

2) 국내시장현황

가) 국내 유기가공식품의 시장규모

한국농수산식품유통공사가 닐슨컴퍼니코리아를 통해 추산한 국내 유기농식품의 시장규모는 2010년 기준 6,276억규모로 조사되었으며 이는 전년도에 비해 27.3% 성장한 수치였으며 그 중 유기가공식품은 3,102억원으로 전년대비 24.6% 성장률을 기록하였다.

구분		2009		2010			
		금액	구성비	금액	구성비	증가율	
유기가공 식품	계	2490.2	50.5	3102.2	49.4	24.6	
	국내생산	국내인증	1047.4	21.2	1250.7	19.9	19.4
		표시	1354.0	27.5	1732.0	27.6	27.9
	해외수입	국내인증	8.7	0.2	14.8	0.2	70.1
		해외인증	80.1	1.6	104.7	1.7	30.7

그림 4 유기가공식품 시장현황(2010)

출처: 닐슨컴퍼니코리아(2011)

국산 원료를 사용한 제품은 296억 원, 수입 원료를 사용한 제품은 1,547억 원, 수입 완제품은 315억 원인 것으로 나타난다.

(단위 : 억원, %)

구분	판매액	구성비
국산	1,843	85.4
(국산원료)	(296)	(13.7)
(수입원료)	(1,547)	(71.7)
수입	315	14.6
합계	2,158	100.0

그림 5 국내 유기가공식품 시장규모(2008년)

출처: 박성훈. 2008. 유기식품 시장동향 2008. 한국식품연구원

유기가공식품 시장규모는 2010년 3,167억 원, 2015년 5,781억 원, 2020년 6,817억 원으로 추정되며, 이 가운데 국내생산 유기가공식품은 2010년 2,696억 원, 2015년 4,937억 원, 2020년 5,867억 원으로 나타남. 유기가공식품 시장규모를 인구수로 나누어 1인당 연간 소비액을 계산해 보면, 2010년 기준 6,410원이었으나, 2015년 11,421원, 2020년 13,253 원으로 지속적으로 증가할 것으로 추정되었다.

(단위 : 억원)

	2008	2010	2011	2012	2013	2015	2017	2020
합 계	2,158	3,167	3,777	4,355	4,908	5,781	6,355	6,817
국내 생산	1,843	2,696	3,219	3,712	4,184	4,937	5,445	5,867
(국산원료 전체)	296	382	480	549	626	790	977	1,203
(수입원료 전체)	1,547	2,314	2,739	3,162	3,558	4,147	4,468	4,663
수입완제품	315	471	558	644	724	844	910	950

그림 6 유기가공식품의 시장규모 전망(2012년)^{주1)}

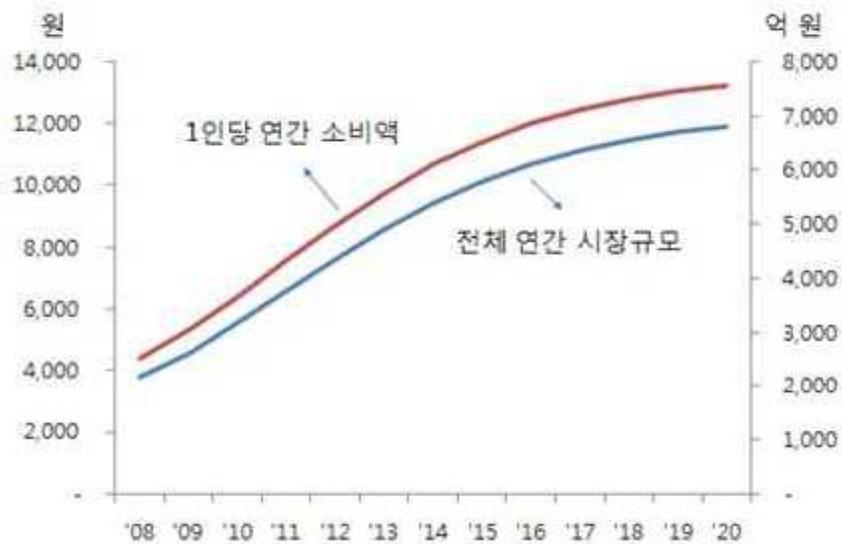


그림 7 유기가공식품 시장규모와 1인당 소비액 추이^{주2)}

나) 유기농산물 생산 증진 배경

최근 저탄소 녹색성장이 국가발전의 패러다임으로 추진되면서 친환경농업의 확산이 농업부문의 대표적인 저탄소농업 정책과제로 제시되고 있다.

정 부는 2013년까지 유기와 무농약의 친환경농산물 생산 비중 9%까지 확대 목표를 세우고 다양한 정책을 추진하였다.

주1) 국내생산의 국산원료는 유기재배면적의 증감율을 적용하였으며, 유기재배면적의 전망치는 2020년을 목표연도로 정책변수를 고려하여 추정됨. 출처 : 한국농촌경제연구원(2012).

주2) 1인당 연간 소비액은 전체 시장규모를 인구수를 나누어 계산함. 출처 : 한국농촌경제연구원(2012).

유기농식품산업 육성을 위해 2010년에는 유기농산물 재배면적 및 유기농식품산업 시장 규모 확대 목표를 가지고 생산기반 구축, 기술개발, 유기농식품 관리체계 확립 등의 과제를 추진하고 있음. 상기와 같은 정책들로 인해 유기농산물 생산비중은 현재보다 더 크게 증가할 것으로 예상된다.

유기농 산업 육성을 위한 가공제품개발 활성화 필요성 대두

상기와 같은 정책들로 인해 유기농 산업 육성을 위한 가공제품 개발 활성화 필요성이 더욱 크게 대두되고 있다.

향후 저농약 재배 농가의 유기 혹은 무농약 재배 전환에 따른 유기농산물 가격하락 위험에 대응할 고부가 유기농 가공제품의 개발이 필요성이 증대되고 있다.

다) 영유아식품에서의 유기가공식품 시장 현황

유기가공식품의 구매경험이 있는 소비자의 사회 경제적 특성을 분석해보면 40~50대 주부들이 대부분이며 미취학 및 초중고생 자녀가 있는 계층이 73.8%를 차지하고 있으며, 그 중 미취학아동의 부모가 63.4%로 가장 높았다.

유아식/분유의 한달 평균 구매 횟수는 약 1.6회로 조사되었으며, 비싸도 구입하는 이유는 '안전성' 63.9%, '건강' 31.9%로 나타났다.

또한 현재 구매횟수와 비교시 유아식/분유의 구입 확대 의사가 11.5%로 높게 나타났음. 또한 유아식/분유의 현재 가격 수준에서 유기가공식품으로서 향후 지불의사 금액 또한 큰 것으로 나타났다.

따라서 유기가공식품의 특징을 최대한 살릴수 있는 '유아식/분유'식품류를 중심으로 집중적인 아이템 개발의 필요성이 대두된다.

라) 유기가공식품 제조의 한계성

현재 국내법상 가공식품을 '유기'로 표시하거나 판매할 수 있는 대상은 1) 국산 또는 외 국산 유기 원료를 사용하여 국내에서 유기가공식품을 제조 및 가공하고자 하는자(도축 및 신선편이 가공, 육가공, 유가공, 도정 및 제분 업자 포함), 2) 국내 판매를 목적으로 국산 또는 외국산 유기 원료를 사용하여 외국에서 유기가공식품을 제조하고자 하는 자, 3) 국내에서 국산 또는 외국산 유기가공 식품을 소분 또는 재포장 하는 자로 정해져 있다.

유기가공식품 제조, 가공시 사용되는 원재료는 정제수와 염화나트륨을 제외한 95%이상

이 「친환경농업육성법」에서 규정한 유기농림산물 또는 유기축산물로 인증 받은 농축임산물이어야 하며, 세부표지기준은 다음과 같이 지정되어 있다.

유기농산물 함량	내용	표시사항
100%	유기농산물 외 어떤 식품 또는 식품첨가물도 최종제품에 남아 있지 않아야 함.	<ul style="list-style-type: none"> • ‘유기 100%’ 용어를 제품명에 사용 가능 • 표시장소: 제품의 어느 장소든지 가능
95% 이상	최종제품에 남아 있는 원재료의 95% 이상이 유기농산물이어야 함.	<ul style="list-style-type: none"> • ‘유기’ 용어를 제품명에 사용 가능 • 표시장소: 제품의 어느 장소든지 가능
70% 이상	최종제품에 남아 있는 원재료의 70% 이상 95% 미만이 유기농산물이어야 함.	<ul style="list-style-type: none"> • 유기라는 용어 앞에 70% 이상에 해당되는 원재료명, 함량을 함께 표시하는 방법으로 제품명 또는 제품명의 일부로 사용 가능 • 표시장소: 주표시면을 제외한 곳 사용 가능
70% 미만	물, 소금을 제외한 원재료 함량이 70% 미만인 제품	<ul style="list-style-type: none"> • 해당 원재료명의 일부로 ‘유기’ 용어 표시 가능 • 표시장소: 원재료명 및 함량 표시란만 가능

그림 8 유기농산물 함량에 따른 표시기준

유기가공식품으로 확대가능성이 가장 높은 시장은 영유아식품 시장이라고 할 수 있으나, 영유아식품에 반드시 포함되어야 하는 올리고당류는 현재 유기농으로 판매되는 것이 이소말토올리고당뿐이며, 유기농 원료의 제한으로 인한 다양한 제품 개발이 어려운 실정이다.

따라서 본 과제를 통해 유기농 치즈 부산물을 활용하여 유기농 갈락토올리고당 및 락툴로스를 개발하여 영유아식품에 적용가능한 다양한 유기농 올리고당을 개발함으로써 유기농 원료의 제한성을 극복하고 제품의 다양화를 이룰 수 있다.

3) 국외 시장 현황

가) 미국 유기가공식품 시장

미국의 유기가공식품 시장은 지난 5년간 24.5% 성장했으며 2014년 기준 128억 달러를 기록하였다.



그림 9 미국유기가공식품 시장 규모 추이

미국의 유기가공식품 판매 중 유제품이 29억달러로 가장 높은 매출을 보였으며 2009년 대비 약 26%성장 하였으며 미국유기가공식품 시장의 현 추세를 보면 지속적 성장이 전망된다.



그림 10 미국유기가공식품 10대 품목매출

2014년 7월 발표된 한미 유기 가공식품 상호 동등성 인정에 대한 가공식품은 해당 조건을 충족할 경우 상대국의 규정에 따른 인증을 별도로 획득할 필요 없이 유기로 표시해 수출이 가능하다.



그림 11 한국과 미국의 유기농 인증 마크

나) 중국 유기가공식품 시장

중국의 가공식품시장은 소비 지출액의 꾸준한 증가에 힘입어 고속 성장하고 있으며 도시 소비자들을 중심으로 식품소비구조도 점차 서구적 유형으로 전환됨.

2011년 중국의 가공식품수요는 1,404억 달러 규모로 조사되었으며, 2015년까지 연평균 11%의 속도로 성장할 전망이다.

현재 중국 내수식품시장에서 한국식품이 차지하는 비중은 미미한 것으로 나타났지만 식품안전, 맛, 제품디자인 측면에서 일부 품목별로 경쟁우위 및 성장잠재력이 확인 된다.

한국식품은 유제품, 과자 및 베이커리, 면류, 인삼가공식품, 일부 음료제품 등에서 경쟁력이 있는 것으로 나타났으며, 향후 성장 잠재력도 풍부한 것으로 분석되고, 반면 영유아 식품을 비롯하여 즉석식품, 김, 치류, 소스 및 장류, 주류 등은 중국 소비자들에게 인지도를 넓혀가고는 있으나 여전히 교민시장이 주류이다.

우리식품은 풍부한 성장 잠재력에도 불구하고 밀어내기, 소극적 투자, 단기적 성과에 치중한 경영 및 투자경향 등의 문제들로 인해 중국 내수시장에서 더딘 성장을 보이고 있는 상황이다

급성장하고 있는 중국 식품시장을 우리 식품산업의 지속 가능한 성장 동력원으로 만들기 위한 중장기적인 전략마련이 필요한 시점이다.

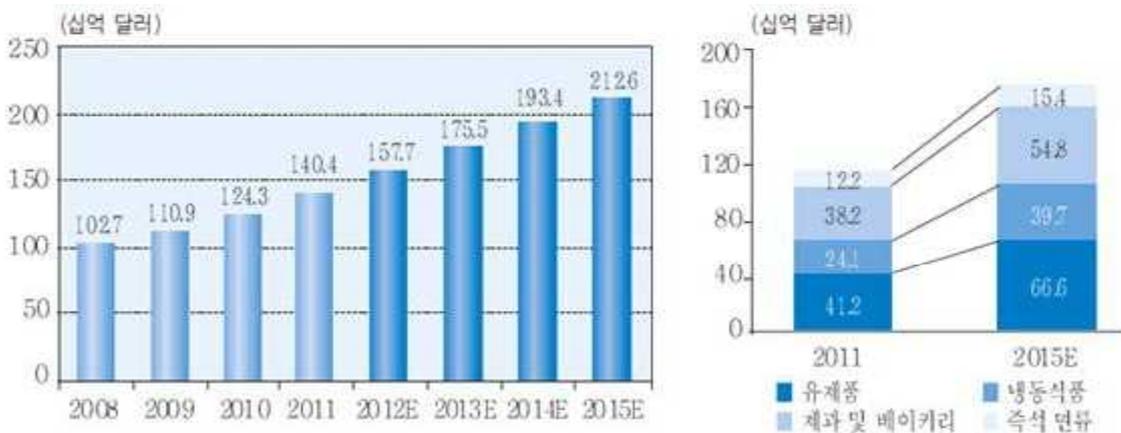


그림 12 중국 가공식품 수요 및 전망

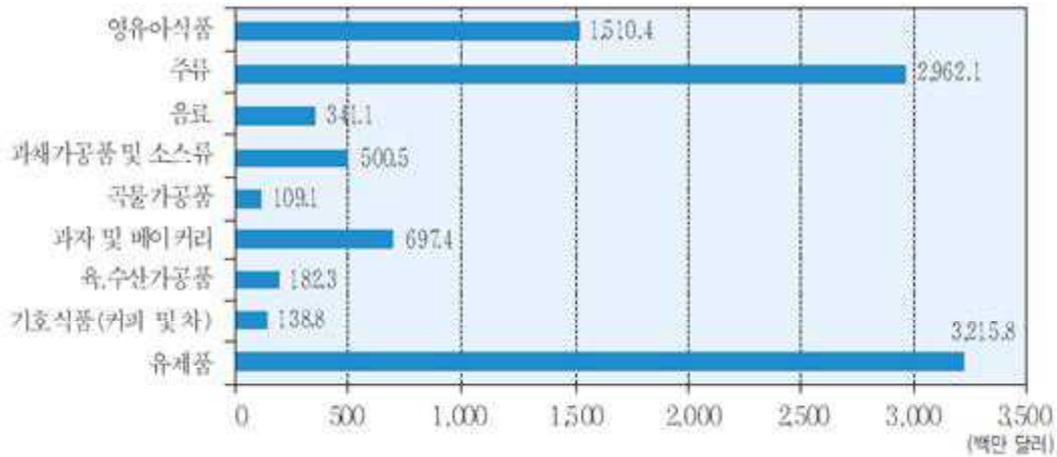


그림 13 주료가공식품의 수입액 비교

출처 : 무역협회

다) 중국 내수 영유아식품 시장 공략을 위한 기능성 소재 개발의 필요성

2008년도 중국의 녹색식품(유기가공식품) 시장규모는 약 17배 확대되었으며 한화로는 약 41.9조원 내외로 조사되었음. 영유아 분유로 대표되는 영유아 식품시장은 현재 중국 식품시장에서 성장세가 가장 두드러진 영역으로, 중국 소비자에 대한 영향력은 제품 및 국가 등 브랜드의 영향력이 가장 큰 것으로 분석된다.

2008년 멜라민 분유 파동 이후 중국 소비자들의 로컬 분유제품에 대한 불신이 심한 상태이며, 유럽산 분유를 가장 선호하는 것으로 조사된다.

한국 분유제품은 최근 수출이 증가하고는 있으나 브랜드 이미지에서 유럽산에 못 미치고 있는 상태로 한국 분유의 안전성 및 품질의 우수성을 강조한 적극적인 마케팅이 필요하다.

특히, 일반분유보다 유기농 분유 등 고가 분유 시장에서의 기회가 있을 것으로 전망됨에 따라 차별성 있는 제품이 필요하다.

유기농 유청으로부터 제조한 유기농 기능소재 (단백 가수분해물, 락툴로스 및 갈락토올리고당)를 사용할 경우, 기존의 유기농 분유 대비 유기원료 함량(국내 기준 95%이상)에 의한 제약이 없어지게 된다.

따라서 본 과제로 개발하고자 하는 유기농 유청 유래의 기능성 소재는 올리고당 함량에 대한 차별성이 부여될 뿐만 아니라 단백질 가수분해물의 성장 효과, 락툴로스와 갈락토올리고당의 정장기능 효과가 추가되어 차별성 있는 제품 생산이 가능하다.

결론적으로 유기농 치즈 부산물을 이용한 기능성 소재의 개발은 엄청난 규모와 시장 확대의 잠재력을 가지고 있는 중국내 영유아식품 시장을 공략을 위해 반드시 필요하며, 본 과제를 통해 개발하게 될 단백질 가수분해물, 락툴로스 및 갈락토올리고당은 시장 공략의 핵심 소재가 될 것으로 사료된다.

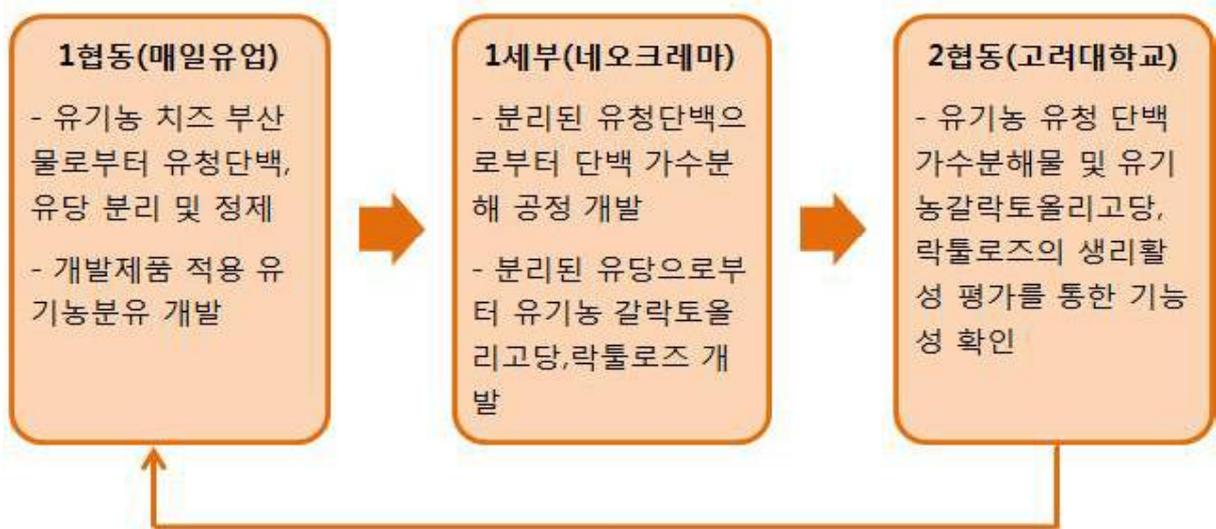
다. 연구개발의 범위 및 내용

유기농 치즈부산물을 원재료로 유기농 분유의 개발과 유기농 분유 개발에 필요한 유청단백질 가수분해물과 락툴로스, 갈락토올리고당을 유기농 유청으로부터 개발함에 따라 기존의 유기농 분유와는 달리 분유에 첨가되는 부재료도 유기농 소재화하여 차별성을 부여하는 것이 주된 목적이다.

이는 기존 선행 기술인 유당에서 관련 제품을 만드는 것과는 완전히 다른 소재 개발로 100% 유당에서 유래한 것과는 달리 순물질이 아닌 부산물을 정제하는 과정이 필요한 고도의 기술력을 요하는 개발이다.

또한 부가가치가 없던 부산물에 대해 부가가치를 부여하는 개발업무로 ‘유기농’이라는 새로운 시장 확대를 위한 연구로 기존 연구와는 다른 방향의 개발 목표를 가지고 있다.

3개 연구기관의 유기적인 협업을 통해 유기농원료 기술개발을 3차년동안 진행하였으며 기본 프로세스는 다음과 같다.



현행 국내 유기농법상 95%이상의 유기농 함량이 포함되어야 하며, 나머지 5%의 경우 분유내 필수성분인 비타민 미네랄급원이 대부분이기에 유기농 분유에 사용되는 올리고당의 함량이 낮으며, 이로 인하여 일반 분유에 비하여 올리고당의 함량 증대가 필요한 상황이다.

유기농올리고당이 개발되는 경우 사용 함량에 대한 제한이 없어지기 때문에 다량의 올리고당을 첨가하여 조제분유 섭취 영아의 변성을 개선할 수 있는 기반이 마련되었다.

현재 국내 제조되고 있는 유기농 당류가 없어, 수입에 전적으로 의존하고 있다.

유기농 분유 및 단백질 가수분해물과 유기농 락툴로스, 갈락토올리고당을 함유한 식품소재의 활성 확보를 위해 Osteoblast MC3T3-E1 cell 의 분화 촉진 및 ALP 측정, Osteoblast MC3T3-E1 cell을 이용한 선정하여 단백질 가수분해물의 성장 촉진 효능 평가하고 유산균 증식효과를 *in vitro*에서 평가하며, 락툴로스의 활성으로 알려진 변비 개선 효과를 개발된 소재인 유기농 락툴로스를 함유 식품소재 뿐만 아니라 이를 적용한 유기농 분유에서 평가하여 제품 자체의 기능성을 확보하고자 하였다.

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

가. 기술개발 현황

유기농 치즈부산물을 가공 시 사용되는 원료 성분은 유단백인 카제인이 주로 활용되고 있으며, 이때 부산물로 유청(Whey)이 발생한다.

유청은 단백질은 6-10 g/L, 유당(lactose) 45-52 g/L, mineral 2.5-7.2 g/L로 구성되어 있다.

단백질의 변성을 최소화 하고, 각 단백질내의 유효부위만을 다량 얻을 수 있기 위한 방법으로서 생화학적인 방법인 효소 가수분해 법이 많이 사용되고 있으며 가수분해 방법에 따른 기능성 연구 또한 활발히 이루어지고 있어 유재민 등(2013)은 Alcalase에 의한 유청단백질 가수분해물의 항원성 저감 효과를 확인하여 알러지를 저감화한 유청 단백질의 소재화 가능성을 연구한 바 있고, 우성호 등(2009)은 유단백질 가수분해에 의해 생성된 저분자 peptides의 항산화 활성을 연구한 바 있다.

하지만 유기농유청가수분해물은 전세계적으로 양산, 판매되고 있지 않아, 최초 소재이다.

유당을 원료로 여러 가지 제품들이 개발되어 시판 중에 있으며, 특히 전 세계적으로 일본을 중심으로 시장이 형성되어 있으나 현재는 중국에서의 식품 및 식품소재 개발에 대한 연구개발이 활발히 진행되고 있다.

유당은 락툴로스(lactulose)와 갈락토올리고당(galactooligosaccharide, GOS)의 생산 원료로 활용하여 유기농 락툴로스 및 갈락토올리고당을 개발함에 따라 유기농 치즈부산물의 대부분을 활용하고자 함. 락툴로스 및 갈락토올리고당은 식품과 제약분야에서 기능성 성분으로 알려져 있으며, 산업적으로 많이 활용되고 있어 주목을 받고 있다.

식품분야에서는 정장작용을 위한 비피더스 인자, 제약분야에서는 주로 변비, 간성뇌증, 간질환의 합병증 그리고 혈액 내 포도당(glucose)과 인슐린 수치의 유지 등을 위하여 이용되고 있다.

나. 국내 상용화 기술 수준

국내 갈락토올리고당 및 락툴로스의 시장 현황과 규모는 안정적인 시장을 형성하고 있는 일본과는 달리 다소 답보적인 상태를 유지하고 있으며 품질 개선 및 용도 개발 역시 국내에서는 연구개발 활동이 다소 미흡했다.

특히 락툴로스의 경우 국내 생산업체가 전무한 상태이며, 사용 제품의 전량을 수입에 의존하고 있기 때문에 해외의 기술력에 의존할 수밖에 없었다.

국내에서 갈락토올리고당은 식품 공전 상 ‘올리고당류’로 분류되며 당질원료를 이용하여 효소를 작용시켜 얻은 전이갈락토올리고당액 또는 사탕무, 대두 등에서 추출한 라피노스, 스타치오스의 당액을 여과, 정제, 농축한 액상 또는 분말상의 것을 말한다.

국내에서는 삼양제넥스와 인그리디언에서 각각 썬올리고 L500, 바이올리고 GL45630의 상품명으로 판매하고 있으며 국내 생산의 대부분을 차지하고 있다.

최근에는 1세부 네오크레마가 개발한 갈락토올리고당(상품명 : Mother's Oligo)이 일부 시장에서 판매중에 있다.

하지만 유기농 갈락토올리고당은 현재까지 국내에서는 생산되지 않고 있으며, 관련 제품 역시 개발되고 있지 않다.

조제분유 적용 가수분해 단백질 분야와 관련하여 추출된 핵심 특허의 전체적 출원 동향을 살펴보면, 특허 출원은 1980년대부터 시작되었으며, 1990년대 후반에 특허 출원 활동이 증가하였고, 2000년대 들어 활발해진 것으로 나타난다.

1980-1990년대에는 가수분해 단백질 제조나 이를 이용한 제품에 관한 특허들이 주로 출원되었고, 2000년대 초반에는 가수분해 단백질의 용도에 관한 특허들이 주를 이루었으며, 2000년대 후반에는 가수분해 단백질 제조 및 용도, 이를 이용한 제품에 관한 특허들이 다양하게 출원된 것으로 나타났다

가수분해 단백질 용도에 관련된 주요 특허는 골다공증 등의 골대사 예방 및 치료와 알레르기 예방 및 치료에 대한 연구에 주력하는 모습을 보이고 있으며, 이 외에도 근육 손상 회복 또는 근육 강화, 염증 치료 등에 대한 연구도 활발한 것으로 나타났다

가수분해 단백질 제조 방법에 관련된 주요 특허는 가수분해 효소를 이용하여 다양한 특성을 가진 단백질 가수분해물을 제조하고 있는 것으로 나타난다.

가수분해 단백질을 이용한 제품에 관련된 주요 특허는 알레르기 방지 및 환자를 위한 영양제 형에 대한 연구에 주력하는 모습을 보이고 있으며, 유아용 분유에 대한 연구도 활발한 것으로 나타난다.

3. 연구수행 내용 및 결과

가. 연구개발의 추진전략 및 추진체계

1) 추진전략



그림 15 주관-협동기관 추진전략

영유아를 대상으로 생리활성이 증진된 유기농 식품 소재 개발 및 산업화하며, 유기농 분유 제조 시 다양한 부재료가 첨가되는데 이대 중요한 것이 유산균증식에 관여하는 올리고당이지만, 아직까지 올리고당의 유기농화는 부진한 상태이다.

본 연구개발을 통해 개발된 락툴로스과 갈락토올리고당은 유기농원료를 활용함에 따라 유기농제품에 첨가 시 유기농 소재의 함유 비율을 높여줌으로 타제품과의 차별성부여가 가능하며, 분유 외에 다양한 유가공품의 조재로 활용이 가능하다.

유기농 우유로부터 가공품 제조 시 발생하는 부산물인 유청을 활용기술이 확보됨에 따라 락툴로스 외의 다양한 올리고당의 개발이 가능하며, 유청에 함유된 단백질 역시 유기농 소재화가 가능하다.

매일유업은 우유 및 다양한 이유식 등을 생산하는 제조사로서 본 과제를 통해 개발된 제

품과 소재는 자사 생산 공장을 통해 양산가능하며 현재 관련 제품을 요구하는 다양한 니즈에 수용할 수 있을 것으로 사료된다.

장기적으로 개발된 유기농제품 및 소재 개발기술은 다양한 천연물에 적용하여 기술 확대 및 품목 다양화를 시도하였다.

개발된 기술은 본 연구팀에서 지금까지 연구해오던 많은 천연물 소재에 접목시켜 향산화 및 항암증진 등 다양한 새로운 형태의 식품 트렌드를 주도할 수 있을 것이라 사료된다.

2) 추진체계



그림 16 주관-협동기관 추진체계도

나. 연구내용

1) 유기농치즈부산물로부터 유기농 원료 분리

가) 유기농 치즈부산물로부터 유청 단백질(whey protein) 분리 기술개발

(1) 치즈 부산물 중 발생하는 유청 단백질의 정의

유청(Whey)는 치즈 제조 과정 중 얻어지는 부산물로서 치즈(우유농축물 커드)를 제외한 나머지 수용성 부분을 총칭으로 말하며, 유청은 치즈를 만드는 카제인을 제외한 대부분의 유효성분(유당, 유청단백질, 미네랄 등)을 함유하는 부산물로서 영양, 생리학적으로 높이 평가되고 있으며, 유청은 크게 다음과 같이 2개 분류로 나누어 진다.

표 1 Sweet whey와 Acid whey의 액상과 분말상 성분조성

구성성분	Sweet whey			Acid whey		
	액상	분말	분말	액상	분말	분말
TS*	6.35	96.5	96.3	6.5	96.0	95.4
Protein (N=6.38)	0.80	13.1	13.0	0.75	12.5	11.7
Lactose	4.85	75.0	69.4	5.0	67.4	63.2
Fat	0.50	0.8	1.0	0.04	0.6	0.48
Minerals	0.50	7.3	8.3	0.80	11.8	10.6
Lactic acid	0.05	0.2	-	0.40	4.2	-

Sweet whey는 치즈 제조시 rennet를 가하여 우유로부터 카제인과 지방의 응고물인 커드 제거로 얻어지며 acid whey는 탈지유에서 식용산을 사용하여 pH 4.3 ~ 4.6 수준이 되도록 조정하여 얻어낸다.

통상적으로 만들어지는 sweet whey의 경우 대부분이 치즈 제조 시 rennet 분리를 통해 부산물로서 만들어지고 있으며, acid whey 경우 카제인나트륨, 카제인칼슘 등을 만든 이후의 부산물로서 만들어지게 되며, 본 과제에서 사용되어지는 매일유업에서 부산물로서 제조되는 유청은 sweet whey에 해당하며, 당해 연도에는 이를 원료로서 표준화하는 작업을 진행하였다.

(2) 유기농 원유 규격 관리

원유 내의 고형분 함량은 소가 먹는 사료 및 환경조건(온도, 지역 등)에 따라 차이를 나타내게 되어, 이는 여름에 온도 요인에 의하여 더 큰 차이로 나타나고 있으며, 국내에서는 지역별 차이도 발생하고 있다.

표 2 전국 지역별 원유 유단백 함량 검사현황

지역	2014.01	2014.02	2014.03	2014.04	2014.05	2014.06	2014.07	2014.08	2014.09	2014.10	2014.11	2014.12
전국	3.33	3.31	3.28	3.23	3.19	3.16	3.15	3.17	3.25	3.3	3.35	3.39
경기	3.38	3.35	3.31	3.24	3.21	3.17	3.15	3.17	3.23	3.3	3.36	3.39
강원	3.26	3.26	3.2	3.12	3.12	3.11	3.11	3.16	3.25	3.32	3.35	3.35
충북	3.34	3.35	3.32	3.24	3.19	3.16	3.15	3.18	3.24	3.3	3.36	3.43
충남	3.33	3.33	3.29	3.25	3.22	3.18	3.17	3.2	3.25	3.29	3.35	3.41
전북	3.31	3.29	3.28	3.23	3.19	3.17	3.15	3.17	3.28	3.3	3.36	3.36
전남	3.33	3.29	3.27	3.22	3.18	3.16	3.16	3.17	3.24	3.31	3.35	3.38
경북	3.34	3.32	3.3	3.22	3.18	3.16	3.13	3.17	3.29	3.32	3.34	3.39
경남	3.3	3.26	3.24	3.17	3.15	3.14	3.11	3.12	3.19	3.26	3.28	3.32

표 3 전국 지역별 원유 유지방 함량 검사현황

지역	2014.01	2014.02	2014.03	2014.04	2014.05	2014.06	2014.07	2014.08	2014.09	2014.10	2014.11	2014.12
전국	4.13	4.09	4.03	3.95	3.88	3.82	3.81	3.81	3.89	3.98	4.06	4.13
경기	4.19	4.19	4.11	4	3.91	3.84	3.81	3.84	3.89	3.98	4.12	4.19
강원	3.96	3.97	3.93	3.83	3.75	3.65	3.68	3.66	3.73	3.87	3.9	3.94
충북	4.18	4.18	4.08	3.97	3.88	3.82	3.78	3.79	3.9	4.01	4.05	4.13
충남	4.17	4.16	4.03	3.96	3.86	3.84	3.86	3.85	3.91	3.99	4.08	4.2
전북	4.02	4.01	3.98	3.91	3.85	3.78	3.76	3.77	3.84	3.91	4.01	4.07
전남	4.12	4.04	4.03	3.95	3.89	3.85	3.84	3.83	3.92	4.01	4.1	4.12
경북	4.16	4.14	4.07	3.97	3.93	3.85	3.84	3.84	3.93	4.07	4.1	4.19
경남	4.12	4.08	4.04	4	3.96	3.89	3.88	3.89	3.97	4.07	4.11	4.12

유기농 원유의 경우 통상적으로 일반원유에 비해 지방, 단백질 함량이 낮은 경향을 보이고 이에 따라 총 고형분의 함량도 낮아지게 되며, 이는 일반 젖소 대비 유기농 관리 젖소에게 주는 조사료 제한에 기인하고 있으며, 유기농 사료의 경우 상대적으로 그 종류가 적어 유량도 줄어들고 고형분 함량이 상대적으로 낮은 경향을 나타나게 된다.

매일유업(주)에서 사용 중인 유기농 원유는 전북 고창지역 내 원유만 별도로 집유하여 사용하고 있으며, 원유에는 앞서 설명한 것과 같이 계절별 지방함량의 차이가 있

고, 유기농의 경우 상대적으로 더 낮은 지방, 단백질 함량을 가지고 있다.

따라서 계절에 상관없는 품질의 제품을 생산하기 위해서는 지방의 표준화 공정을 세팅하여 규격화 할 필요가 있고, 본 과제 목표인 유청의 경우 사전에 탈지 공정을 거쳐 진행하게 되며, 단백질의 함량은 최종제품에서 규격화하여 확인하고자 하였다.

해당 단백질, 지방함량 data는 milkoscan(FOSS사) 장비를 이용하여 모니터링 했다.

표 4 자사 2015년 일반원유, 유기농 원유 단백질, 지방함량 비교

분류	영양소	1월	2월	3월	4월	5월	6월
유기농 원유	지방	3.61	3.64	3.63	3.59	3.47	3.40
	단백질	3.27	3.23	3.19	3.10	3.06	3.05
일반 원유	지방	4.06	4.04	3.94	3.85	3.82	3.77
	단백질	3.33	3.31	3.27	3.21	3.15	3.12

(3) 유기농 치즈 공정 중 유청의 분리 및 공정 조건 표준화

유기농 치즈는 원유의 표준화로부터 진행되며 원유의 표준화는 원유로부터 지방을 제외하는 공정으로서 separator에서 rpm을 조정하여 분리한 후 목표로 하는 지방의 함량을 맞추게 된다.

치즈의 경우 제품에 따라 다소 차이는 있지만 지방이 대부분 치즈제품에 함유하게 되고 제조 공정중 발생하는 부산물인 유청에는 그 함량이 매우 낮다.

■ 실험방법

자연 치즈 제조 시 원유의 pH는 통상 6.7 수준이며, 균에 의한 제조 효율을 고려하여 사전에 pH 조정을 진행하게 되고, 해당 과제에서는 까망베르 치즈를 기준으로 pH 6.4 ~ 6.5 값으로 표준화하여 진행하며, pH 저하를 위한 산도조절제는 구연산을 사용하였다.

이후 목표 치즈 제품에 따라 살균된 원유에 스타터 균주를 첨가하고, 적정한 산도 변화가 일어나면 응유효소인 렛넷을 첨가하였다.

일정 시간이 흐른 후 적당한 균기로 원유가 응고되면(통상 1시간 내외) 일정한 크기로 절단 (절단 크기에 따라 치즈의 경도가 달라짐)하고 절단 후 일정시간 정치시키면 부산물인 유청액이 나오기 시작하면서 서서히 해당 커드를 서서히 교반 하면서 가온하게 되고 가온 정도에 따라 스타터 미생물의 생육이 달라지게 된다.

교반 시에는 커드가 부서지지 않게 해야 하며, 제품의 경도에 따라 그 사이즈를 다르게 할 수 있으며, 교반 정도에 따라 커드로부터 유출되는 유당의 양이 다르기 때문에

본 공정에서 유청액 내의 유당의 함량이 조절될 수 있는 과정이다.

교반 후 유청액을 분리하게 되며 상층액 혹은 필터를 통해서 걸러낸 유청액은 별도 보관하게 되고, 유청액의 경우 단백질, 탄수화물, 미네랄 등이 풍부하게 함유되어있어 미생물에 의한 변질이 일어날 수 있기때문에, 분리된 유청액은 세균 증식을 억제하기 위해 냉장하여 보관을 진행하였고, 통상 유청의 보존을 위하여 과산화수소수를 첨가하는 경우도 있으나, lab에서는 바로 냉각이 가능하기 때문에 냉장 보관을 진행하였으며. 사내 공정에서는 농축 후 냉각 보관을 진행하였다.

유청 보관 조건을 제외하고는 lab test와 같이 생산 공정에서 동일하게 진행하였으며, 단백질 함량은 추가로 70% 이상으로 설정하였다.

■ 실험결과① : 실험실



그림 17 실험실 테스트 시료

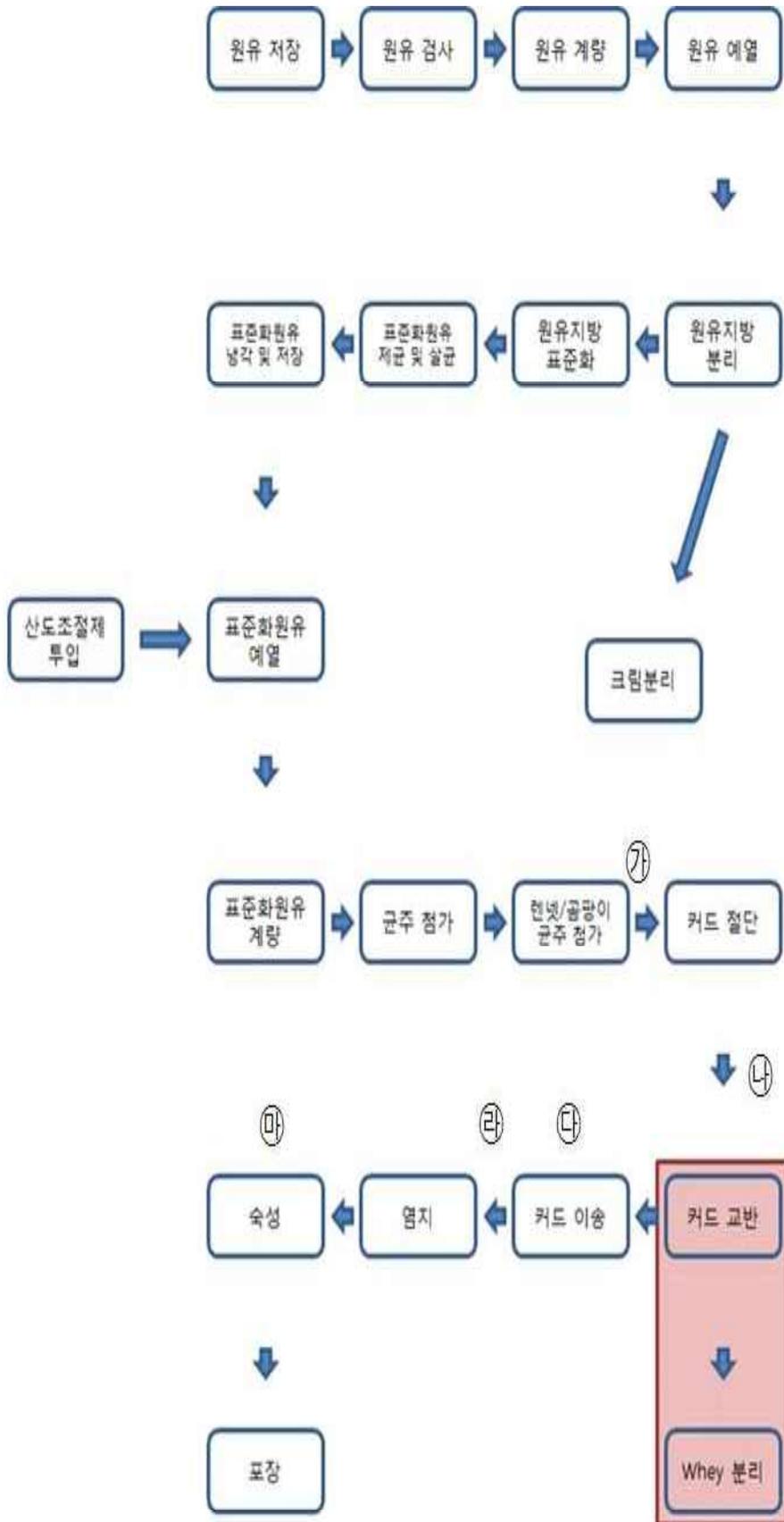


그림 18 치즈 생산 공정 및 부산물 유청액 제조 공정

㉓ 응고 확인



㉔ 커드 교반



㉕ 커드 이송



㉖ 커드 워싱



㉞ 커드 분리



■ 실험결과 ② : 대량생산 공정 확인

㉟ 응고 확인



㊱ 커드 절단



㉔ 커드 교반



㉕ 커드 워싱



농축 이후 만들어진 유청액은 일정기간 보관 후 자사의 아산공장으로 이관하여 분말화를 진행하였으며, 위 실험 결과를 바탕으로 1차 유청 분말의 원료의 규격을 설정하였다.



그림 19 대량생산 유청분말

매일유업(주) 아산공장	제품구분	표준번호	MIS-K-310-02
	유청분말	제(가)정일자	
		제 의 자	1/2
□ 목 차 □ 1. 적용범위 2. 제품명 및 제품유형 3. 성분 및 배합비 4. 관능검사 기준 5. 미생물학적 기준 6. 제용용도 및 유통기한 7. 포장방법 및 제조(포장)단위 8. 표시사항 9. 보관 및 유통상 주의사항 10. 부 록			
작성과	품질보증과	최재영	DATE:
검토자	품질보증과	김성태	DATE:
승인자	공정장	이길우	DATE:

MIS-K-600-03(Rev. 0)

매일유업(주) 아산공장	제품구분	표준번호	MIS-K-310-02
	유청분말	제(가)정일자	
		제 의 자	2/2
1. 적용범위 1.1 이 제품규격은 농가에서 생산하는 유청분말 제품에 대하여 적용한다. 2. 제품명 및 제품유형 2.1 제품명: 유청분말 2.2 제품유형: 유청분말 3. 성분 및 배합비 3.1 생수용 100% 3.2 수분: 8%이하 3.3 수크랄로스: 98%이상 4. 관능검사 기준 4.1 색상: 고추의 색과 광택을 가진 분말로서 이색, 이취가 없어야 한다. 5. 미생물학적 기준 5.1 대장균: 1.1e ⁶ 이하 20,000이하 5.2 대장균군: s=5, c=2, m=3, M=10 5.3 살모넬라: s=5, c=2, m=0.1, M=10/25g 5.4 리스테리아 monocytogenes: s=5, c=2, m=0.1, M=10/25g 5.5 황포스포티아세르프린스: s=5, c=2, m=0.1, M=10/25g 5.6 황색발효단균: s=5, c=2, m=0.1, M=10/25g 5.7 황색포스포균: s=5, c=2, m=0.1, M=10/25g 6. 제용용도 및 유통기한 6.1 제용용도 식품, 주제품 및 기타 가공식품 등의 원료로 저, 저방 원료, 아이스크림, 음료주, 아이스크림 등으로 사용하며, 제품유형에 따라 용도가 사용한다. 6.2 유통기한 제조일로부터 1년 7. 포장방법 및 제조(포장)단위 7.1 내분 용기에 1차 포장, 외분 3월 지대로 202g으로 포장한다. 8. 표시사항 8.1 제품명, 제품의 유형, 주요 원가번호, 원재료 및 향료, 내용량, 유통기한, 포장방법(내분), 보관 기준, 반분 및 효능상호, 제조일 9. 보관 및 유통상 주의사항 직사광선을 피하고 습기가 없는 서늘한 곳에 보관 10. 부 록 10.1 부록은 2015년 10월 15일부로 개정 시행한다.			

MIS-K-600-08(Rev. 0)

그림 20 유청분말 제품 규격

ASF-1C-0037-1968



시 험 성 적 서

제출년	부정분말		
제조사	매일유업(주) 아산공장	반산지	한국
제수일자	2016.05.31	중급서	매일유업(주) 아산공장
의뢰인	아산관산 품질보증팀 구성진	유통기한	2017.05.30
이더목적	사가능성조사		

귀하가 시험 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

분석항목	단위	분석결과	기준규격	신당한계	판정
내장분분	L/Wg	m=2.72, u=0.73, s=0.74, n=5, C=3	r=5, c=2, m=4, M=10		적합
제용수	C/Wg	450	20,000이하		적합
우고함분	%	97.2	95.0이상		적합
리스테리아 monocytogenes	정균	m=불검, n=불검, N=불검, n4=불검, m=불검	n=5, c=3, m=0/25g		적합
살모넬라	정균	m=불검, n=불검, N=불검, n4=불검, m=불검	n=5, c=3, m=0/25g		적합

2016년 06월 28일

매일유업(주) 아산공장 품질보증팀

그림 21 자체분석결과

유기농 유청분말의 제품 규격은 앞서 설정한 바와 같이 동일하게 관리하며, 단백질 함량은 추가로 70% 이상으로 지정하였다.

해당 공정을 바탕으로 자재를 아산공장으로 이관 하여 제품화를 진행, 이러한 공정을 바탕으로 매일유업(주) 아산공장에서 유기농 유청분말을 제조 할 수 있도록 유기인증 업체인 BCS korea를 통해 유기인증 심사를 진행하였다.

유기농 유청분말의 유기인증을 진행하기 위하여 유기농 치즈 부산물인 유기농 유청을 원료로 아산공장에서 아래와 같은 제조공정으로 시험생산을 진행하였다.

표 5 유기유청분말제조공정도

제 조 공 정	세 부 조 건	비 고
*유기 제품 생산 기준에 준한 CIP 이후 생산 진행		
원부자재 계량	전자저울 이용하여 계량	
↓		
원료 용해	정제수 70℃ 가온 후 조유 시작 원료 투입 후 용해 확인 필수 용해 온도 65±5℃ 온도 유지	
↓		
조합액 저장	* 조합액 검사 규격 - 정상 : 이미/이취 무 - Brix : 42±2 - 고형분 : 40±2%	
↓		
여과	여과를 통한 이물 제거	
↓		
균질	균질 진행(1차, 2차)	
↓		
살균	설정 온도 및 시간 확인 압력계지 확인하여 제품 정상 확인	
↓		
살균액 저장		
↓		
고압이송	압력을 이용해 Dryer 상단으로 조합액 이송	
↓		
건조	조합액 분말화	

↓
냉각 및 채사

분말 냉각 및 탄화물, 이물 제거

↓
충전 및 포장

호퍼 충전기 이용하여 제품 충전 및 지대 포장

↓
제품 검사

* 제품 검사 규격

- 성상 : 이미, 이취가 없어야 함
- 용해성 : 용해시 커드가 없어야함
- 용해도 : 0.1/50 mL
- 이물 : Disc A
- 수분 : 3.0% 이하
- 일반세균 : 20,000 CFU/g 이하
- 대장균군 : n=5, c=2 m≤3, M=10
- 리스테리아모노사이토제네스 : n=5, c=0, m=0/25 g
- 살모넬라 : n=5, c=0, m=0/25 g

유기농 치즈 부산물인 유기농 유청을 원료로 하여 진행한 시험생산 결과 제품 제조공정 중에 특이사항이 없었으며 시험생산 제품 검사 결과 적합하였다.

- 원료 조합



- 균질 및 살균



- 건조



- 포장



생산된 유청분말원료는 본과제 수행기관인 (주)네오크레마에 전달하여 유청단백가수물개발을 위하여 제공하였다.

해당하는 원료는 분말로서 20kg 지대포장으로 이루어지며, 영양성분 규격화 진행 후 본 과제 수행기간에 네오크레마에 제공하여 유청단백제품 개발에 응용할 수 있도록 진행하였다.

나) 유기농 치즈 부산물로부터 유당 분리 정제기술 개발

(1) 유기농 치즈 공정 중 유당의 분리 및 공정 조건 표준화

유당은 보통 유청으로부터 얻어지는 부산물로 유청 중 약 75%를 차지하고 있어, 유청으로부터 유당을 분리하기 위해서는 치즈유청을 주로 이용하며, 순도가 높은 유당을 얻기 위해서는 유청단백질과 미네랄의 제거가 중요하다.

표 6 일반 유성분 내의 유당함량

food	content (g/100 g)
Whole milk	4.9
Low-fat milk(1%)	4.9
Dry whole milk	38.1
Non-fat dry milk Whey	52
Cottage cheese	4.9
Sweet dry	73.5
Dried acid	66.5

유청단백질을 제거하기 위해서는 보통 산과 알칼리용액을 이용하여 단백질을 제거하게 되며, 미네랄의 경우는 탈염이나 전기투석 등의 공정을 주로 사용하였다.

일반적으로 유당을 제조하는 공정은 과포화추출법, 침출법, 용매 침전법등이 있으나 올리고당을 만들기 위한 유당의 경우 막분리를 통한 Permeate 수준의 정제 원료도 사용이 가능하다.

유당과 같은 원료는 원물의 가격이 저렴하기 때문에 공정이 추가될수록 원료가 인상의 요인이 되며 가급적 쉬운 공정조건을 사용하여 경쟁력 있는 유기농 유당제조가 핵심이다.

따라서 본 과제에서는 원유 혹은 앞서 진행한 유청액으로부터 막분리를 통하여 순도를 높여 Permeate를 만들어 규격화 하는 방법과 유당접종(Lactose seeding)을 통한 유당분리 두가지 방법을 이용하고자 하였다.

유기농치즈부산물 유청액은 사용되는 원유의 품질과 만들고자 하는 치즈의 유형, 그리고 치즈 제조 공정에 따라 유청액의 조성이 달라질 수 있다.

통상적으로 만들어지는 치즈의 유형에 따라서 작용하는 미생물의 차이가 있으며, 이로 인해 효소를 통한 분해 시 아미노산의 함량이 달라져 물성도 달라지게되고 유당이 유청액의 대부분을 차지하고 있는데, 건조 전의 유당의 함량에 따라 유청액의 물성을 결정하며, 유당 제거 정도에 따른 유청분말의 특성이 바뀌게 된다.

좋은 품질의 유청분말 제품은 유청분말 내 유당이 모두 결정화된 이후에 건조된 것이다.

유청 중 유당은 α -lactose와 β -lactose의 두 가지 형태로 존재하며 40:60 비율로 존재하며, α -lactose는 과포화 용액으로부터 결정화되고, 이러한 결정화의 속도는 유청의 온도를 낮추면 빨라진다.

α -lactose는 α -lactose mono hydrate의 형태로 결정화되며 비흡습성이고, 결정화된 결정성수화물이 많을수록 비흡습성으로 non-caking 유청분말을 만들 수 있고, 무결정성 유당이 많으면 흡습의 성질을 나타내어 분말에 단단한 덩어리가 형성되므로 사용 및 보관에 불편함이 발생한다.

이 경우 고결방지제의 투입을 통하여 제품의 고형화를 방지하게 되며, 그 밖의 케리어들을 이용하여 분말의 흐름성을 바꾸어 상품화가 이루어진다.

유기농 유청액에 냉각 과정을 진행하면 포화도가 증가하며, α -lactose가 일부 결정화되었다.

용액상태에서 α -lactose와 β -lactose는 평형을 이루고 있기 때문에 일부분의 α -lactose가 결정화되면 평형 상태를 유지하고자 β -lactose가 α -lactose로 전환되어 용액상태에서 α -lactose와 β -lactose 유당의 일정한 비율이 유지되고 이러한 현상을 가역적 이성화 (mutarotation)라고 하며 이러한 반응의 속도는 온도에 따른 영향을 받았다.

이러한 평형의 유지는 유당의 결정성과 흡습성의 영향을 미치며 감미도에도 차이를 주게 된다.

α -lactose 많아지게 되면 단맛이 줄어들고 유아의 설사를 유발하기 때문에 영유아용 원료의 함량 설정 시 주요한 요인으로 작용한다.

(가) 유기농치즈부산물 유청에 대한 Ultrafiltration (UF)/ Nanofiltration(NF) 처리를 통한 유당 분리

유기농 우유에 Microfiltration 처리를 하면 박테리아와 지방, 카제인을 걸러낼 수 있으므로, 유청 단백질, 비단백질소 (NPN), 유당, 염, 물만이 분리된다.

Ultrafiltration 처리 시 유기농 우유 내 박테리아, 지방, 카제인, 유청 단백질 및 비단백질소의 일부를 걸러낼 수 있으므로, 유당, 염, 물만이 분리되며 이러한 두 미세 필터를 통하여 유기농 우유로부터 유당을 걸러낼 수 있다.

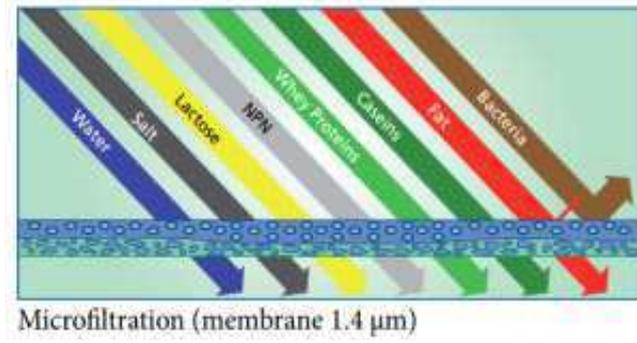


그림 29 Microfiltration (1.4 μm 막) 처리를 통한 우유 내 박테리아 및 지방의 일부 분리 모식도

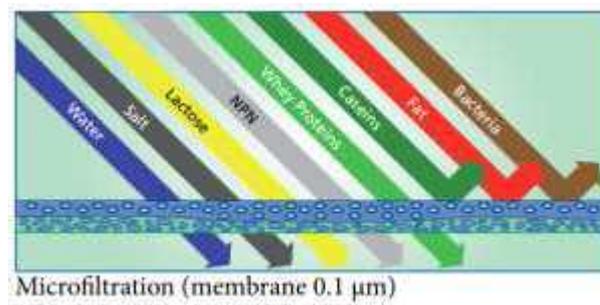


그림 30 Microfiltration (0.1 μm 막) 처리를 통한 우유 내 박테리아, 지방, 카제인 분리 모식도



그림 31 Ultrafiltration 처리를 통한 우유 내 박테리아, 지방, 카제인, 유청 단백질 및 비 단백질소의 일부 분리 모식도

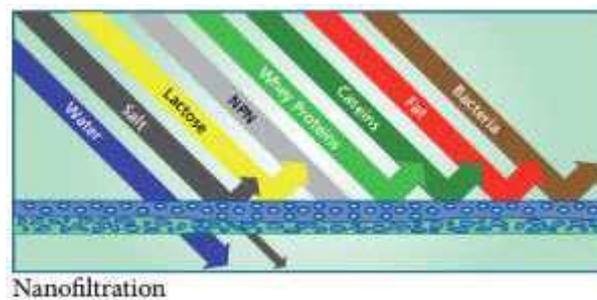


그림 32 Nanofiltration 처리를 통한 유당액내 염 제거 모식도

■ 유당제조 실험 방법(실험실규모)

- ✓ 일반 원유를 원심 분리하여 크림과 탈지유로 분리하여 원유의 지방 제거
- ✓ 탈지유는 UF(Ultrafiltration)공정을 통하여 Permeate를 분리해 내고 NF(Nanofiltration) 공정을 통하여 액상상태에서의 농축을 진행하여 포화도를 올려 유당결정을 생성하는 방법으로 생산
- ✓ 중간 단계에서의 미생물 안전성 확보를 위해서 살균을 실시하며 75°C 15s로 낮은 수준의 살균
- ✓ 매일유업(주)에서는 위와 동일한 형태의 설비가 있어, 공정 세팅을 통하여 유청액이나 원유로부터 유당액을 만들어 원료 생산 가능
- ✓ 유기농원유를 대상으로 UF와 NF 단계를 처리하여 원유로부터 유당(Permeate형)을 분리공정은 아래와 같으며, 이 경우 발생하는 Permeate는 향후 부산물로서 GOS를 만들기 위한 원물로 사용

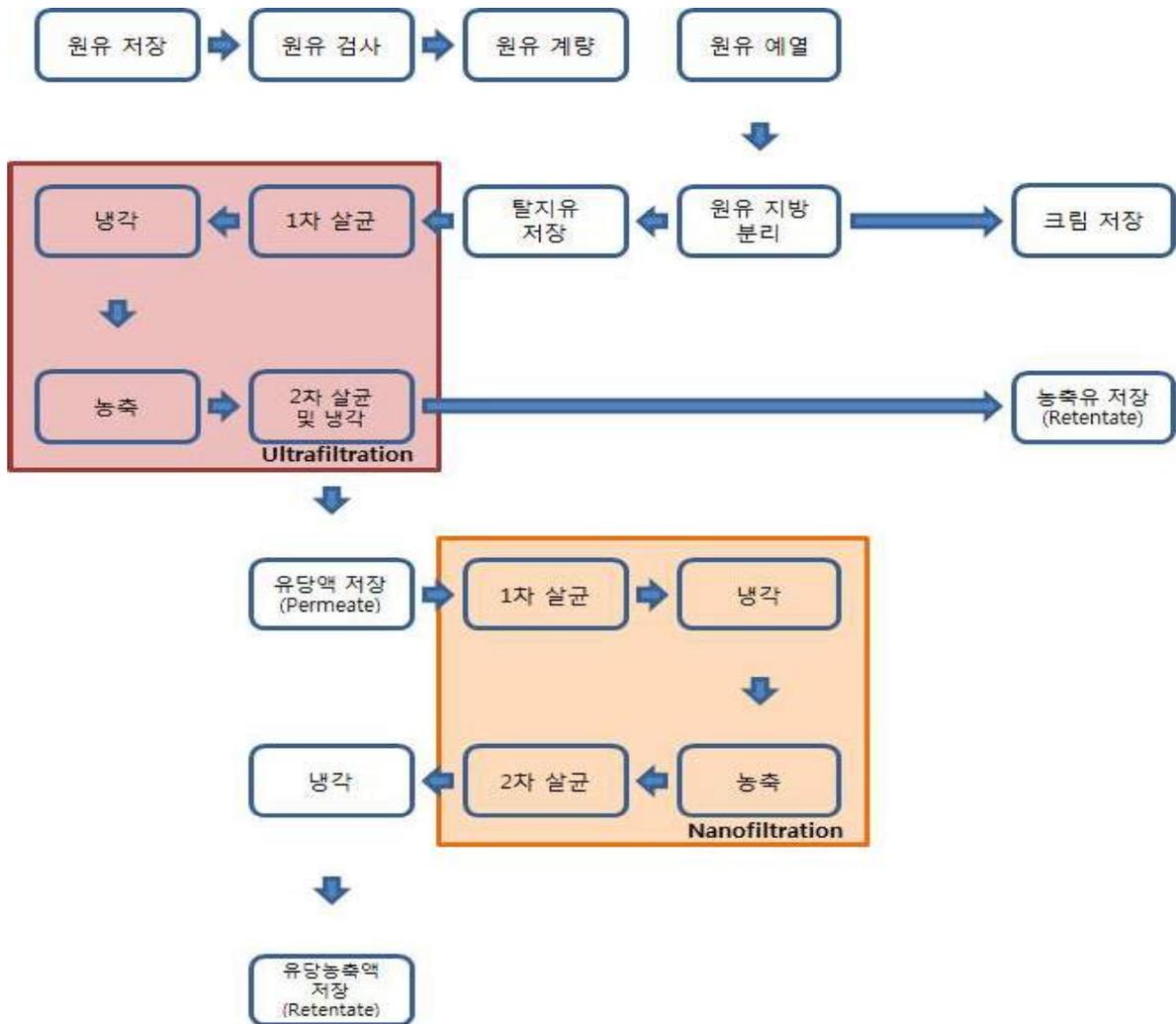


그림 33 유당액 예상 제조공정도

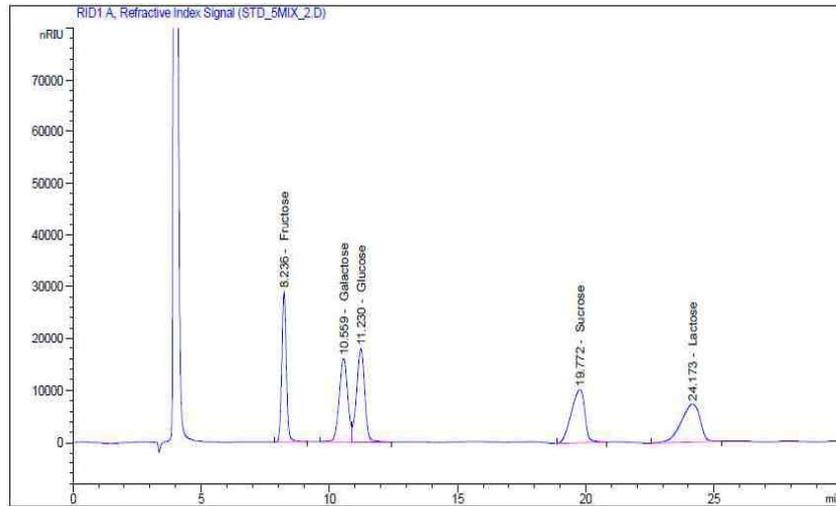
■ 실험결과

본 TEST는 앞선 유청액과 동시에 진행하여 원유로부터 우선 유당을 만드는 방법으로 진행하였고, 테스트를 진행하며 중간 산물로 만들어진 Permeate와 Retentate에 대하여 유당에 함량 분석한 결과는 다음과 같다.

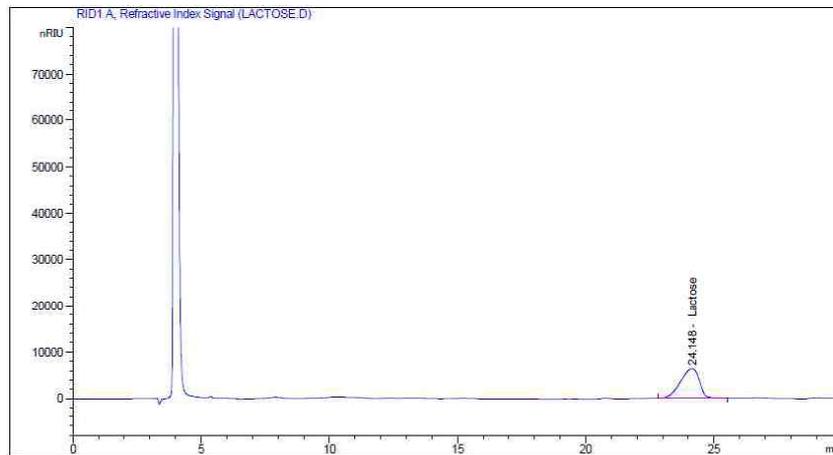
표 7 Permeate와 Retentate 분석 결과

샘플명	당류결과(g/100mL)		
	Galactose	Glucose	Lactose
Permeate	불검출	불검출	4.45
Retentate	불검출	불검출	4.86

A. Standard



B. Permeate



C. Retentate

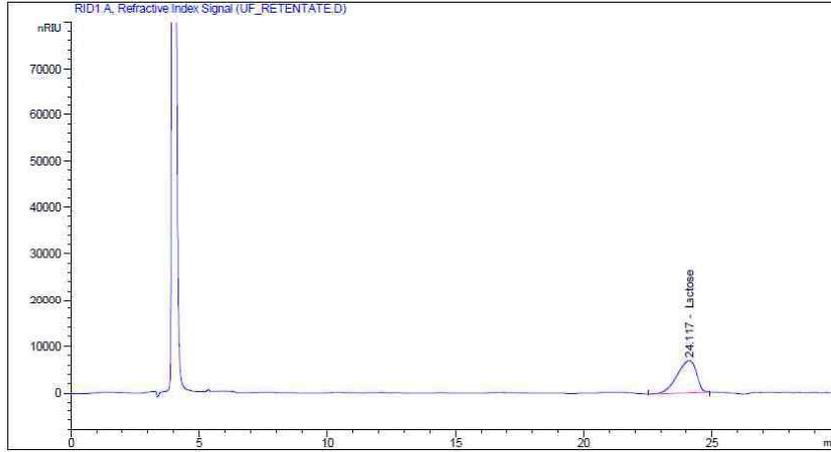


그림 34 Permeate와 Retentate에 따른 당류 분석 결과

최종 NF를 거친 Retentate의 brix는 약 21% 수준이며 TS 기준으로 확인 시 통상 20% 이상으로 확인되었으며, 추가로 확인된 이화학 검사 결과 하여 원료로서의 유당액의 규격은 다음과 같이 1차 설정하였다.

표 8 유당액 규격

항목		규격
이화학	성상	황색 액체, 이미/이취 무
	산도	0.3 이하
	비중	1.100±0.05
	pH	6.5±0.5
	이물	Disc A
	유온	10℃이하
	Brix	21±1%
미생물	일반세균	3,000cfu/g이하
	대장균군	음성

이외의 미생물과 유당이 제거된 농축유(Retentate)는 유당액의 RO 처리를 통한 미네랄을 따로 모아 혼합하여 자연치즈를 만들기 위한 원물로 사용될 예정이다.

① 최종 유당분리 공정 확립

유기농 원유로부터 지방을 분리하여 탈지유와 크림으로 나누어 저장하며, 여기서 분리된 크림은 별도의 제품으로서 생산되어 상품으로 출하됨. 이후 탈지유에 UF 처리를 통하여 유당과 농축유로 분리된다.

본 처리를 통하여 원물 대비 미생물의 수를 99.9% 수준으로 낮추어 주게 되며, 가공 중 보관 적성을 연장시킨다.

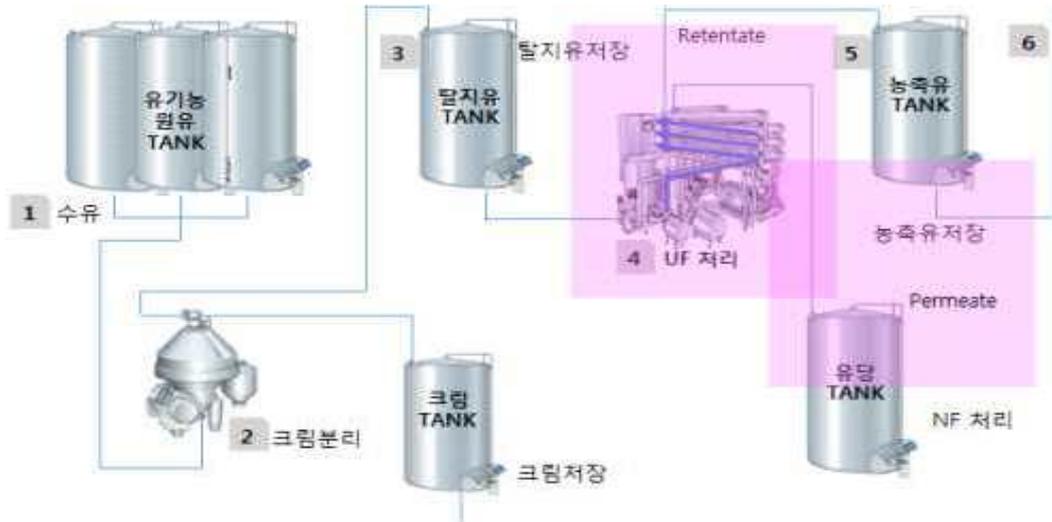


그림 35 유기농 원유 MF 및 UF 처리를 통한 대량유당 분리 공정도

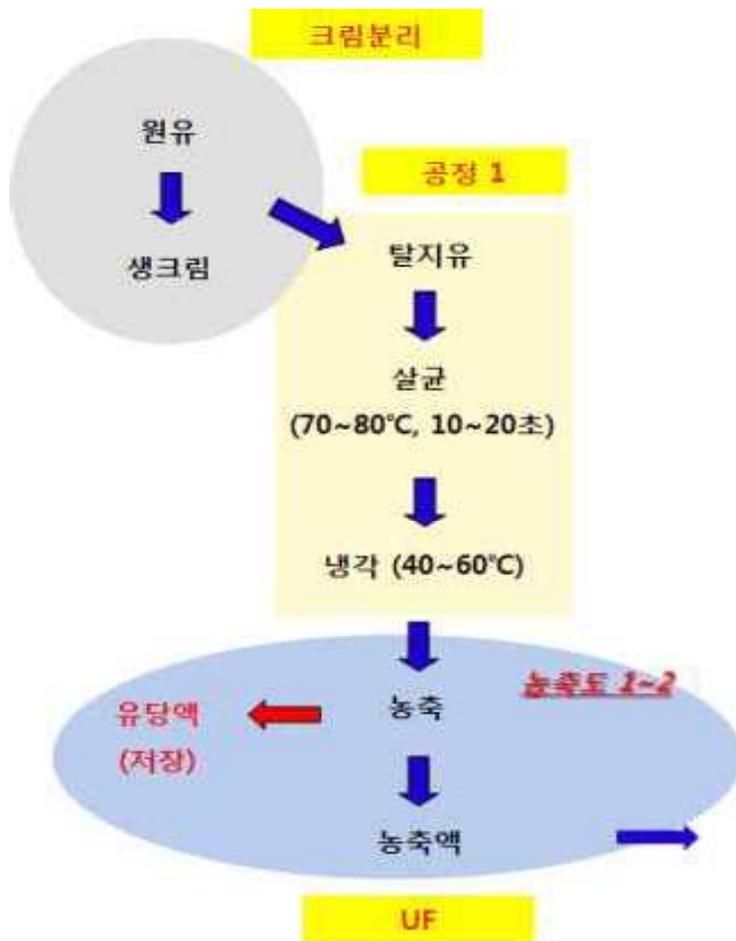


그림 36 탈지과정을 거친 유기농 원유에 대한 UF 처리 공정조건

분리된 탈지유는 70~80°C에서 10~20초 동안 살균하는 과정을 진행한 뒤, 40~60°C로 냉각하는 과정을 거친다. 냉각된 농축물을 대상으로 UF 처리를 하여 유당액과 농축액으로 분리된다.

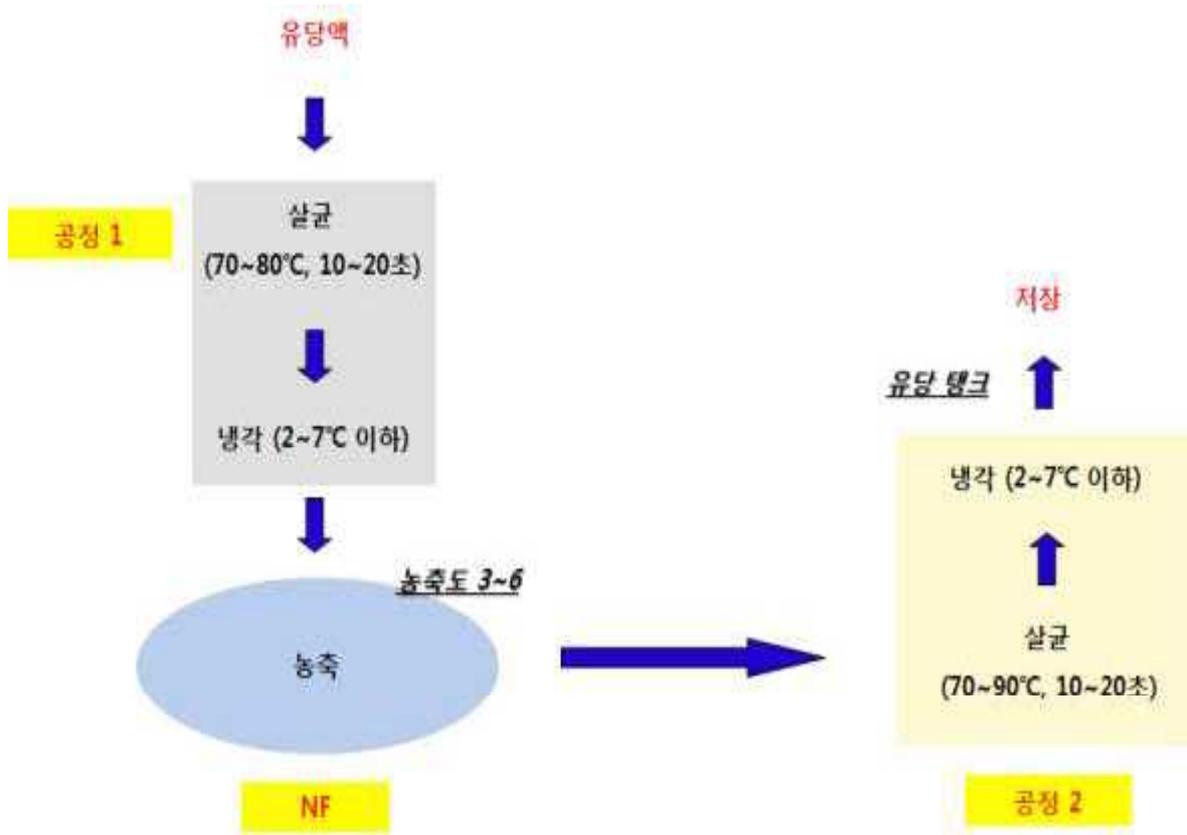


그림 37 유기농치즈부산물 유당액에 대한 NF 처리 공정조건

NF, UF 처리를 거쳐 분리된 유당액을 대상으로 70~80°C에서 10~20초 동안 살균하고 2~7°C 이하로 냉각하는 과정을 거친다.

농축도 3~6으로 농축된 농축물을 대상으로 NF 처리를 하여 보다 순도 높은 유당액으로 분리해냈으며, 분리된 이렇게 분리한 고순도 유당액을 70~90°C에서 10~20초 동안 살균하고 2~7°C 이하로 냉각하는 과정을 거친 뒤 저장하였다.

유기농 원유로부터 크림을 분리해내기 위한 분리조건은 1500~2100 rpm이고, 크림 살균조건은 104~111°C에서 3~8초 동안 살균공정을 거친 크림은 3~9°C 이하에서 저장하는 과정이 필요하다.

유기농 치즈 제조 과정 중 탈지과정을 거친 나머지 탈지유에 대한 이화학 검사 기준은 성상은 유백색 액체로 이미와 이취가 없는 산도는 0.10~0.20 이하로 관리되어야 하며, 주정은 70~90% 음성이어야 하며, 지방은 0.1~0.3 이하로 설정되고 비중

은 15°C에서 1.01~1.03이어야 한다.

이러한 기준을 만족하는 탈지유를 대상으로 UF와 NF 처리를 거쳐 유당을 분리하고 이를 살균 및 냉각하는 과정을 통하여 유당액을 저장하였다..

이후 저장된 유당액을 아산공장의 dryer 공정으로 전달하여, 차기 가공을 위한 보존성과 유통기한 증대를 위해서 분말화를 진행하였다.

공정	원료 및 조건	비고
원유 ↓ 크림분리 → 생크림저장	*유기농원유 *크림분리조건 1500~2100rpm *크림살균조건 104°C~111°C 3~8초 *크림저장온도 3~9°C이하	
탈지유 저장	*탈지유 검사 의뢰항 검사 성분 유액서 액체, 지방/유해 무 산도 0.10~0.20 이하 중량 70~90% 품질 지방 0.1~0.3이하 비중(15°C) 1.01~1.03	
1차 살균 ↓ 냉각 ↓ 농축 ↓ 2차 살균	*70~80°C 10~20초 *온도 40~60°C *UF filter (농축률 1~2) *70~80°C 10~20초	- 공형 1 - 공형 2

그림 38 유기농 치즈 제조 공정 중 UF 및 NF 처리를 통한 유당 분리 제조공정도

② 제품 현장 시생산

- 제품 아산공장 이관 후 조유 균일화



- 살균



- 원물 농축/저장



- 분말화



- 제품 포장



- 시제품 보관



최종 공장간 이관 및 생산된 제품은 아산공장에서 하기와 같이 규격 관리하고 있다.

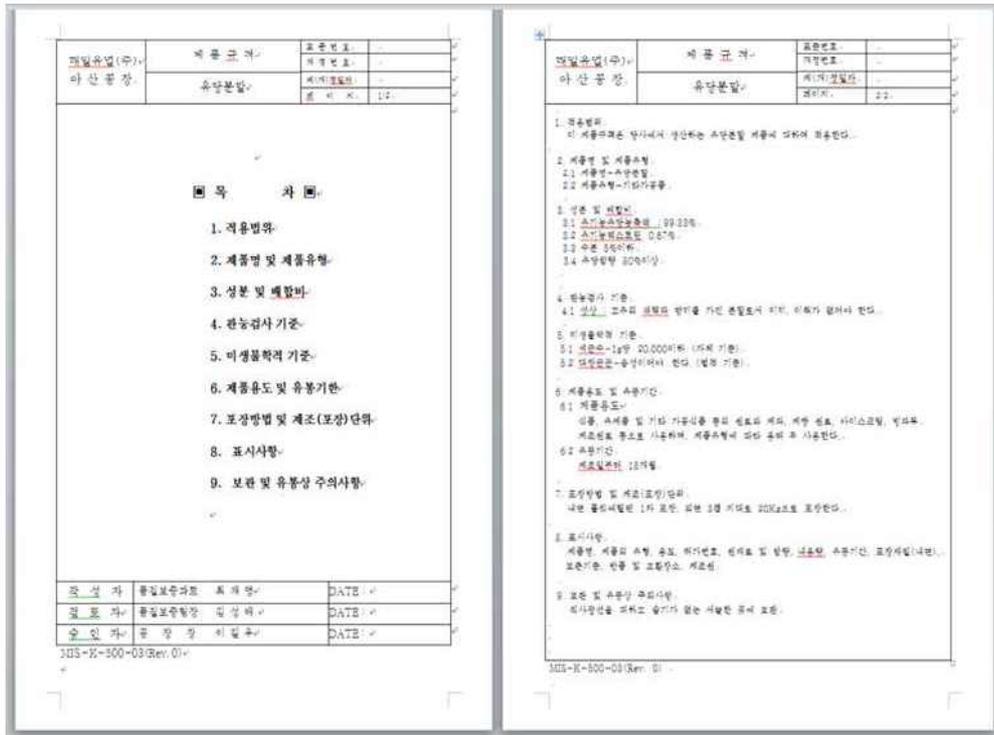


그림 39 NF/UF를 통해 분리된 유당분말 제품 규격서



그림 40 품질관리 유당 샘플

Maeil 매일유업주식회사

시험 성적서

제품명	유당분말		
제조사	매일유업(주) 아산공장	원산지	한국
제조일자	2016.05.10	종급사	매일유업(주) 아산공장
버티컬	아산공장 품질보증팀 400실	납품기관	20171118
의뢰목적	자기품질검사		

귀하가 시험 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

분석항목	단위	분석결과	기준규격	정량한계	단정
비율		적합	적용		적합
재정량검	CF,fg	$r1=0, r2=0, n1=0, n2=0, n=0, n=0$	$n=1, c=1, m=0, M=0$		적합

2016년 06월 08일

매일유업(주) 아산공장 품질보증팀

그림 41 자체분석결과

(나) 유기농치즈부산물 유청에 대한 유당 접종 (Lactose Seeding) 처리를 통한 유당 분리

유기농치즈부산물 유청에서 유당을 분리시키고자 할 때 β -lactose가 α -lactose로 전환되는 가역적 이성화의 최적 온도는 약 30°C이며, 냉장온도인 0~5°C에서는 매우 느리게 반응이 일어난다.

이성화가 일어나면 α -lactose 용액은 점점 과포화되며, 더 이상 과포화 되지 않을 정도로 용액 중에 유당이 적어질 때까지 결정화 과정이 지속된다.

그러나 유청은 온도가 낮아질수록 유당의 용해성이 떨어지기 때문에 다시 과포화 되며, 이 때 유청의 온도가 가역적 이성화가 일어나는 최적 온도보다도 훨씬 낮으면 β -lactose가 α -lactose로 전환되는 반응이 진행되지 않기 때문에 결정화는 거의 일어나지 않는다.

결정화 과정 중 결정핵이 신속하게 생성되는데 이 때 과포화 상태의 유청에 유당 결정을 넣어주게 되면 결정핵 생성이 빠르게 진행된다.

자사에서는 통상 300mesh의 유당을 사용하여 유당을 제거하고 있으며, 이러한 과정을 유당 접종 (lactose seeding)이라 부른다.

결정화가 계속되는 유청의 표면에 충분한 양의 미세입자를 공급하여 결정핵의 생성을 촉진시키는 것이며, 이 때 분쇄한 유당이나 결정이 잘 형성되었던 유청 분말을 미세입자로 사용하였다.

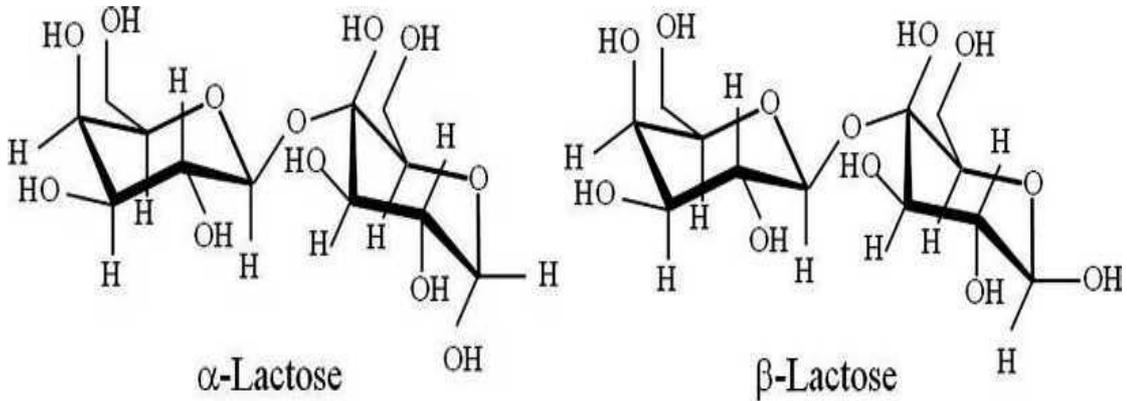


그림 42 가역적 이성화 (Mutarotation)가 발생하는 α -lactose와 β -lactose의 구조

해당하는 방법은 현재 lab 수준의 TEST를 진행하였으나 UF/NF 에 비해 상업적으로 개발하기엔 경제성과 수율이 좋지 않아 filtration 방식으로 양산화를 진행하였다.

다) 유기농 유청액을 이용한 유기농 유청분말 유기인증

확립된 제조공정에 따라 시험생산 결과를 바탕으로 BCS korea에 유기인증 심사 신청을 진행하였다.

유기인증 심사원이 참석하여 유기원료의 입고, 사용, 보관에 관한기록 제조, 가공 및 취급에 사용된 가공보조제 여부, 사용가능한 물질을 사용하였는지 점검, 인증품의 생산부터 취급(제품의 저장, 포장, 운송, 판매)까지 모든 기록을 확인하여 심사를 진행하였으며, 유기인증 심사 결과 특이사항 없이 유기인증 완료하였다.

2) 유기농치즈부산물로부터 분리된 기능성 원료로 부터 기능성 소재개발

가) 유기농치즈부산물로부터 분리된 유청단백으로 부터 단백질 가수분해물 개발

단백질 함량에 따라 WPC34(단백질 34% 함유), WPC80(단백질 80% 함유), WPI(단백질 90% 이상 함유) 등이 있으며 분유나, 스포츠 식품, 아이스크림 및 발효유, 제과 제빵 등 단백질 보충을 위한 고영양, 고품질 식품에 사용되고 있는 천연 유제품원료로 이용된다.

유청단백은 필수 아미노산을 풍부하게 함유하고 있으며, 소화가 용이하고 높은 단백질 효율비를 가지며, 티아민, 리보플라빈, 판토텐산, 비타민 B6와 B12 등 각종 비타민이 풍부하게 함유되어 있다.

유청단백의 식품학적인 기능성은 매우 다양하며 다양한 식품군 중에서도 단연 유제품, 특히 발효유와 아이스크림에 상당히 많이 사용된다.

○ 식품학적 기능성

- 영양가치의 증대: 우유단백질은 유제품에 탁월한 영양적 가치를 가지며, 단백질 첨가 외에도 유청은 칼슘과 가용성 비타민 공급
- 유화력 (Emulsification): 유청 원료의 유화력은 유제품의 유지방 분산을 돕고 효과적인 분산으로 일부 제품에서 지방 함량을 감소시키는 것을 용이하게 해주고 크림링, 응고 및 유분리 등의 결합 방지
- 수분결합 (Water binding): 유제품에서 수분결합력은 기계적성에 중요한 효과를 갖는다. 수분유지 역시 유제품의 조직에 영향을 주며, 요거트와 같은 제품에서 시네레시스(Syneresis, 젤(gel)이 내부의 액체를 방출하여 부피를 감소시키는 현상)의 감소는 소비자의 호감 증가
- 외관 향상 (Visual Appeal): 유청 원료는 유제품, 특히 저지방 제품에 크림미한 성상
- 휘핑 & 거품형성 (Whipping & Foaming): 유청단백이 가지고 있는 휘핑 & 거품형성력은 무스타입의 요거트, 웨이크타입의 요거트 음료와 같은 제품에 도움
- 식감 (Texture): 요거트에 윤활성과 지방과 같은 느낌을 주고, 유고형분을 가하여 보다 풍성한 식감을 형성하는 데 기여

○ 영양학적인 기능성

- 근육건강

유청의 아미노산 조성은 우리 몸의 골격근의 아미노산 조성과의 거의 일치함. 다른 단백질 공급원들 보다 100g 당 필수 아미노산의 함량이 높기 때문에 근육 내에서 빠른

속도로 단백질을 합성하며 또한 근육 대사에 중추적인 역할을 하는 것으로 알려진 분지사슬 아미노산(BCAAS)의 함량이 다른 공급원들에 비해 월등히 높아 근육피로를 빠르게 회복

- 면역력 강화

유청단백질에는 우리 몸의 면역시스템 유지를 위해 필수적인 시스테인이 다른 단백질 원에 비해 4배 이상 높아 면역력 강화에 효과적이며, 노약자나 일반인들의 운동으로 인한 면역반응 감소 등에 유청단백을 활용하면 면역성 강화

- 체중조절

유청 단백질은 섭취하면 혈중 지질 농도를 낮추고 인슐린/글루코스 신진대사를 개선함으로써 건강 증진 및 안전하고 효과적으로 초과체중의 감량을 촉진하며, 또한 근육 건강을 증진시켜 신진대사를 높여주어 신진대사 관련 위험요소 감소

유청단백은 종류에 따라 유당과 지방을 최소화 하고 다양한 미네랄과 비타민 등을 함유하고 또한 섭취 시 특유의 포만감이 있어 식이요법에 활용하면 효과적

유청단백질은 주로 거대 구형단백질로 되어 있고, 주요단백질들로서는 α -lactalbumin, β -lactoglobulin, bovine serum albumin(BSA), immunoglobulin(IgG) 등으로 이루어져 있으며, 거대 구형단백질로 구성된 유청단백질은 큰 분자량으로 인해 60°C 이상의 열에 민감하고, 변성정도는 전체 단백질의 solid 농도, pH, 온도 등에 결정됨

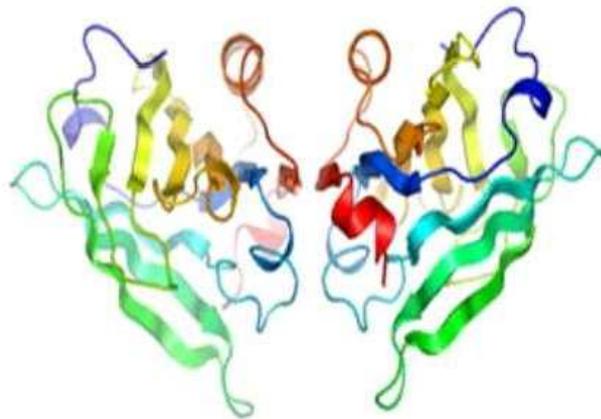


그림 44 베타 락토글로불린의 구조

단백질은 그 분자량에 따라 다양한 기능성을 나타내는 것으로 알려진 바 있어 특히 효모에서는 가수분해물의 분자량에 따라 성장촉진, 항스트레스, 항비만 등 분자량에 따른 기능성 연구가 선행된 바 있었다.

본 과제를 통해 치즈 부산물로부터 분리한 유청단백질의 최적 가수분해 조건을 설정하고, 분자량별 분획을 실시하여 분자량에 따른 단백질의 기능성을 확인하고자 하였다.

단백질의 분자량을 분획하는 기술 중 근래 각광 받고 있는 기술은 특정 크기의 막을 이용한 막 분리 기술이며(Ultra filtration system, Nano filtration system) 주로 제약 쪽에서 많이 이용되어 온 한외여과 기술은 단백질 분해물 중 특정 성분을 농축하는데 주로 이용한다.

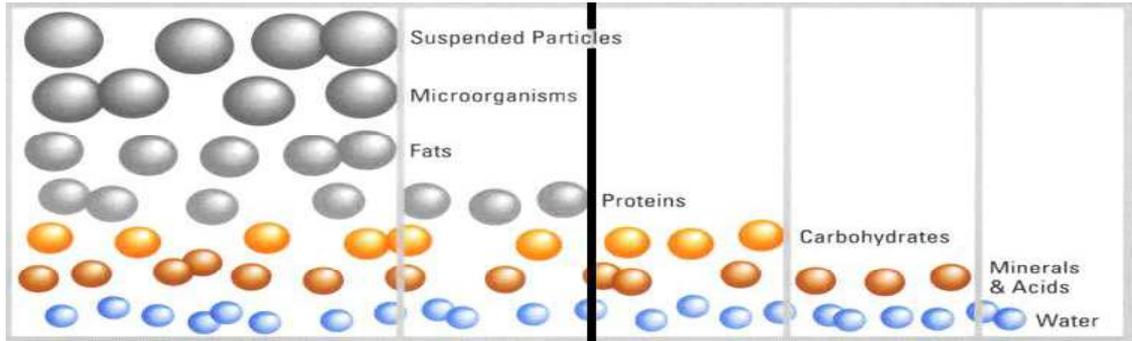


그림 45 한외여과 원리

네오크레마는 자체적으로 효모가수부내물을 개발하여 저분자에서 기능성을 규명에 성공하여 사업화에 성공한 기술을 바탕으로 유기농 유청단백가수분해물을 개발하고자 하였다.

(1) 유기농 유청단백 가수분해 최적효소 선발

(가) Endo 및 Exo type protease

매일유업으로부터 받은 치즈부산물로부터 분리된 유청단백을 가수분해하기 위한 최적의 효소를 선발하기 위해 특성이 다른 2가지 type의 효소를 탐색하였다.

Endo type과 Exo type의 효소는 효소를 분해하는 특성이 다른데, Endo type의 효소는 단백질을 대략적으로 분해한다고 알려져 있고, Exo type의 효소는 단백질의 말단부터 분해를 시작한다고 알려져 있다.

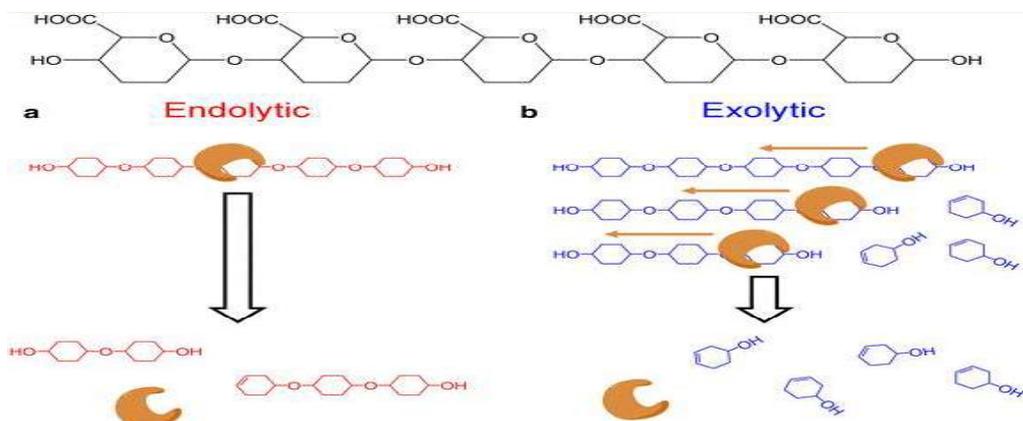


그림 46 Endo 및 Exo type protease 작용 기전

Endo type과 Exo type의 효소의 조합 및 가수분해 순서에 따라 가수분해의 특성이 달라지게 되며 본 실험에서는 Endo type protease 3종 과 Exo type protease 효소 2종을 선별하여 Endo - Exo 효소의 순서로 실험을 수행하였다.



그림 47 유청단백 가수분해 최적효소 처리 예상도

표 9 유청단백 가수분해 효소 1차선별 결과

가수분해 효소 Type	Protease Name	Origin	제조회사
Endo Type protease	Alcalase	Bacillus licheniformis	Novo Nordisk
	Neutrase 2.4L	Bacillus amyloliquefaciens	Novo Nordisk
	Protamax	Bacillus licheniformis	Novo Nordisk
	Foodpro Alkaline protease	Bacillus licheniformis	Dupont
Exo Type protease	Flavourzyme	Aspergillus oryzae	Novo Nordisk
	Prozyme 2000P	Aspergillus oryzae	Dupont

효소의 선별은 식품가공에 사용될 수 있는 효소들로 식품공전, 식품첨가물 공전 등 국내법에 근거하여 선별하였으며, 안정적인 공급이 가능한 제조사의 제품으로 선별하였다.

또한 효소의 활성과 수율 및 생산성을 고려하여 효소의 기초적인 특징인 열 안정성, pH 안전성, 등을 고려하여 선별하였으며 반응조건 별 효소 가수분해 반응을 수행하였다.

(나) 유청단백 가수분해물의 제조

■ 기본실험방법

유기농치즈부산물로부터 분리된 유청단백(whey protein)을 50°C 정도의 정제수에 10%(w/v) 되도록 녹여 slurry를 제조하였고, 80~85°C까지 승온하면서 NaOH를 이용하여 pH8.1~8.5 조절 후 50~55°C 효소반응을 진행하였다.



그림 48 유청단백가수분해 프로토콜

① 반응시간에 따른 Endo type protease의 선정

■ 1차 효소 반응실험방법(Endo type 효소)

먼저 1차 효소 반응을 위한 최적의 Endo type 효소를 선정하기 위해 Endo type 으로 알려진 가수분해효소 4종(Alcalase, Neutrase, Protamex, Foodpro Alkaline protease)을 이용하여 반응 시간에 따른 pH 변화를 측정하였고, 유청단백용액(10%)을 제조한 다음 효소를 기질농도대비 2%(w/v)를 투입하고, 반응온도 50~55°C에서 8시간 동안 반응하며 pH를 측정하였다.

반응온도와 시간의 설정은 효소의 최적 활성 조건을 고려하여 설정하였다.

■ 실험결과

유청단백가수분해 반응 실험을 수행한 결과 4개의 효소 모두 공통적으로 반응시간이 지남에 따라 pH가 떨어지는 것을 확인하였다.

이는 단백질의 분해에 따른 아미노산에 의해 pH가 낮아지는 것으로 판단되며 반응을 계속하여 유지하고자 한다면 pH를 조정하여 반응을 유지시킬 수 있다.

선정한 4개의 효소 중 Alcalase에서 특이적으로 반응시간이 2시간이 되는 시점까

지 pH가 가장 빠른 속도로 떨어지는 것을 확인하였으며 4시간째 부터부터 반응 종료 시점까지 pH가 유지되는 것을 확인하였다.

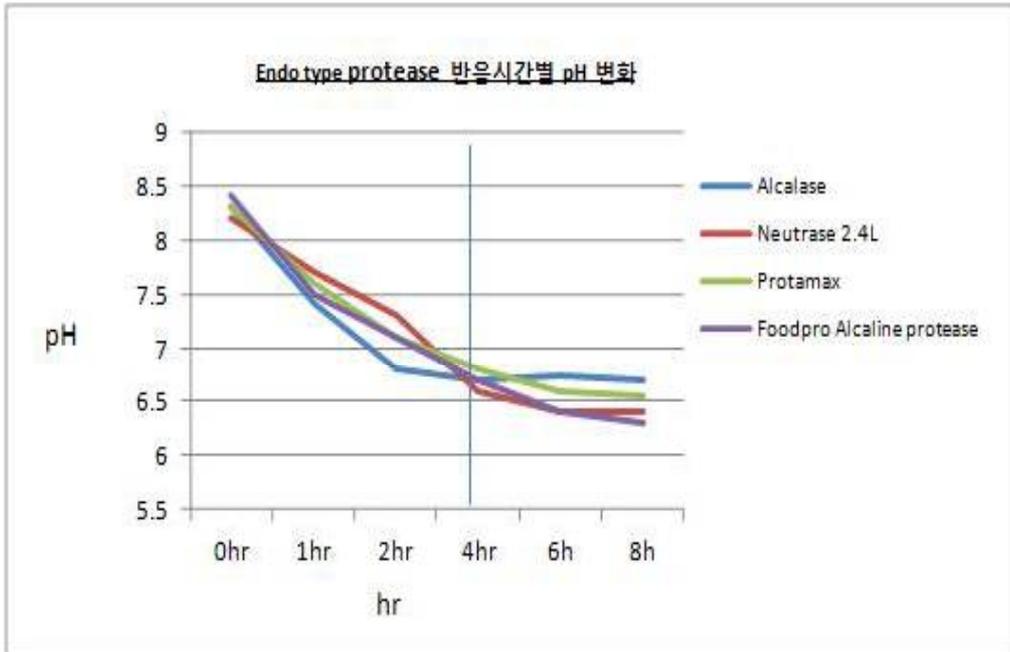


그림 49 Endo type protease 반응시간별 pH 변화

Endo type 이후에 있는 Exo type의 효소 반응을 위해 pH가 수렴되는 시점에서의 다음 효소투입이 중요한 요인으로 작용하기 때문에, 빠른 시간내에 일정한 pH를 유지하는 것으로 확인된 alcalase를 Endo type 적합 효소로 선정하였으며 Endo type 효소 반응을 이용한 1차 효소반응의 최적 반응시간은 4시간으로 선정하였다.

② 반응시간에 따른 Exo type protease의 선정

■ 2차 효소반응실험방법(Exo type protease)

앞서 선정한 Endo type의 효소인 Alcalase를 이용하여 50~55°C에서 4시간 동안 반응시킨 효소분해 1차 산물을 대상으로 Exo type 효소 선정을 위한 실험을 수행하였다.

2차 효소반응으로 10시간동안 반응을 수행하였으며, 효소 최종 선정 전 단백질 분자량 분석방법을 수립하여 반응 종료 후 가수분해도를 측정하였다.

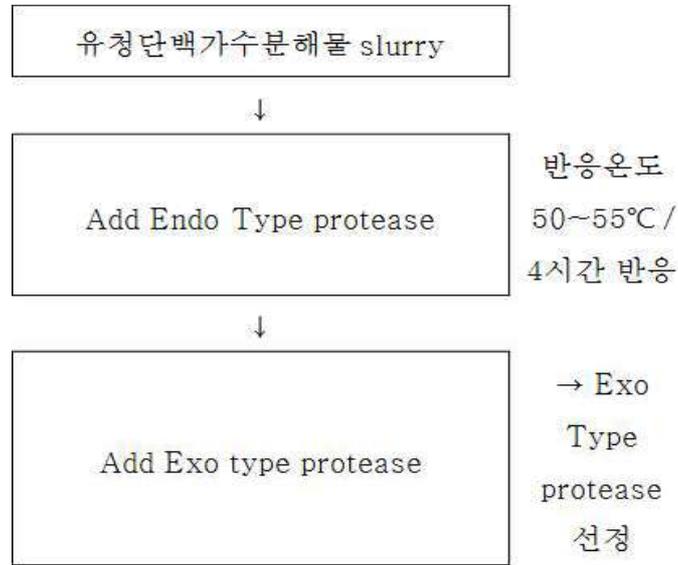


그림 50 가수분해 효소반응법

■ 가수분해도 측정

2차 효소반응을 통해 가수분해된 샘플의 가수분해도를 측정하여 최적의 효소를 선정을 위해 SDS-PAGE와 액체크로마토그래피를 이용하여 2차 효소반응물의 가수분해도를 측정하였다. 분자량 측정을 위해 분석방법을 수립하였다.

③ 유청단백 가수분해물의 분자량별 분석법 수립

유청단백질 및 단백질 가수분해물을 분석을 하기 위하여 유청단백질의 전기영동 패턴의 확인과 전기영동 패턴의 확인을 보완할 수 있는 HPLC 장비를 이용한 gel filtration 법을 통한 분자량분석을 수행하였다.

유청단백질의 전기영동 패턴 확인은 Lamni(1970)의 방법을 변형하여 SDS-PAGE에 의해서 측정하였으나, 유기농유청단백 가수분해물의 분자량이 넓게 분포하고 있어, 정확한 분자량 패턴분석을 위한 단백질 분자량 분석방법을 수립하였다.

■ 전기영동을 이용한 분자량 실험방법

일반적으로 가수분해물의 경우 분자량 10,000MW 이하로 가수분해가 되므로 본 연구에서는 저분자의 단백질들을 확인 할 수 있는 Tricine-PAGE gel(10~20%, komabiotech사) 을 이용하여 분석을 실시하였다.

■ HPLC를 이용한 분자량 실험방법

전기영동 패턴을 이용한 유청단백 가수분해물 분석을 최적화 하기 위하여 HPLC

system 을 이용하였고, 가수분해물에 대한 분자량별 분석을 위한 gel- filtration 컬럼은 phenomex사의 단백질 또는 저분자량 펩타이드 분석용 컬럼인 yarra 2000(3um, 300mm x 7.8mm) 컬럼을 사용하였다.

이동상은 100mM sodium phosphate pH6.8 ,pH6.0 을 이용하였고 검출은 UV 280nm 에서 분석을 진행하였다.

분자량별 표준품의 경우 Bovine Thyroglobin(670kDa), IgA(from human gamma Globulin(300kDa), IgG(from human Gamma globulin, 150kDa), Ovalbumin(44kDa), Myoglobulin(17ka), Uridine(0.244kDa) mixture 인 제품 (phenomenex 사)을 이용하여 분석을 실시하였다.

Tricine-PAGE gel 에서 확인한 바와 같이 유청단백가수분해물의 경우 분자량 10kDa 근방에서 가장 많은 가수분해물이 분포되어 있어 HPLC 컬럼은 gel filtration 컬럼을 사용하여 분석했다.

■ Tricine-PAGE gel 실험결과

Tricine-PAGE gel로 분석(그림)한 결과 반응하지 않은 유청단백 및 효소처리된 가수분해물은 분자량 분포가 3.4kDa 부터 100kDa 까지 넓게 퍼져 있어 정확한 분석을 하기 어려움이 있어 HPLC를 통한 정확한 패턴분석이 필요하다.

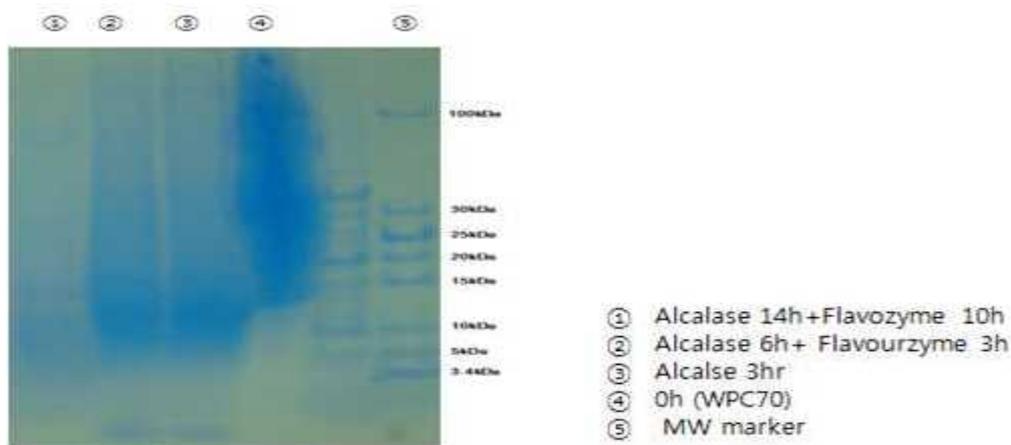


그림 51 Tricine-PAGE gel 을 이용한 단백질 분자량분석 결과

■ HPLC 를 이용한 분석 결과

HPLC 컬럼 용매의 pH 6.0 이었을 때는 표준단백질인 17k 와 0.224k 사이의 peak 면적이 작아 가수분해물의 분자량별 분포를 확인에 어려움이 있었지만 gel filtration column의 경우 용매의 pH에 따라 단백질들의 컬럼에서 elution 되는 시간이 달라지므로, 본 연구에서는 pH6.0 에서 pH를 서서히 상승시켜 표준품간의 Δt(time) 가 최대화 되는 용매의 pH는 6.8 로 조정하였을 때 가수분해물의 정확한 분포를 검출할 수 있었다.

표 10 단백질 표준품

Standard	분자량(KDa)
Bovine-Thyroglobin	670
IgA	350
IgG	150
Ovalbumin	44
Myoglobulin	17
Uridine	0.244

표 11 용매조건에 따른 단백질의 용출시간 테스트 조건(HPLC)

항목	조건
컬럼	Yarra 2000(3um, 7.8× 300 mm)
흡광도	280 nm
주입 용량	20 μ L
유속	0.5 mL/min
이동상 조건 1	시간(min.) Isocratic (40min)
	용매 100mM Na-phosphate pH 6.0
이동상 조건 2	시간(min.) Isocratic (40min)
	용매 100mM Na-phosphate pH 6.8

HPLC 용매의 pH를 조정하여 표준품의 용출시간을 변화 시킨 결과 pH6.0 에서 표준품 분자량 17kDa 의 용출시간과 0.244kDa 의 용출시간은 각각 20.383min 와 23.530min이였고 pH6.8일 때 17kDa 와 0.244kDa 의 용출시간은 각각 18.285min, 23.194min인 결과를 확인하였다.

분석하고자 하는 분자량의 분포는 17kDa 와 0.244kDa 사이에 주로 분포하고 있으므로, 정확한 17kDa 와 0.244kDa 사이의 분자량별 가수분해물의 분포를 보기 위하여, 표준품 간의 용출시간 간의 Δt 가 최대가 될 수 있는 조건을 수행한 결과, 최적 용출용매의 pH는 6.8일 때가 적절함을 확인하였고, 최종 분석용매의 조건으로 설정하였다.

표 12 HPLC 용매 pH에 따른 단백질 용출시간 비교

용매 조건	Retention Time(min)						비교
	Bovine Thyroglobin (670kDa)	IgA (350kDa)	IgG (150kDa)	Ovalbumin (44kDa)	Myoglobin (17kDa)	Uridine (0.244kDa)	
pH 6.8	10.577	11.641	13.40	15.843	18.285	23.194	Myoglobin(17k)와 Uridin(0.244k) 간격
pH 6.0	10.657	11.985	14.601	16.130	20.383	23.520	3.137min

가수분해물의 10kDa 이하 단백질들에 대한 한외여과 장치를 통한 단백질가수분해물 분획에 대한 분석을 Myoglobin(17k) 과 Uridine(0.244k) 사이의 표준단백질인 cytochrome c(6.5k) 를 이용하여 정확한 분자량분포의 확인을 수행하였다.

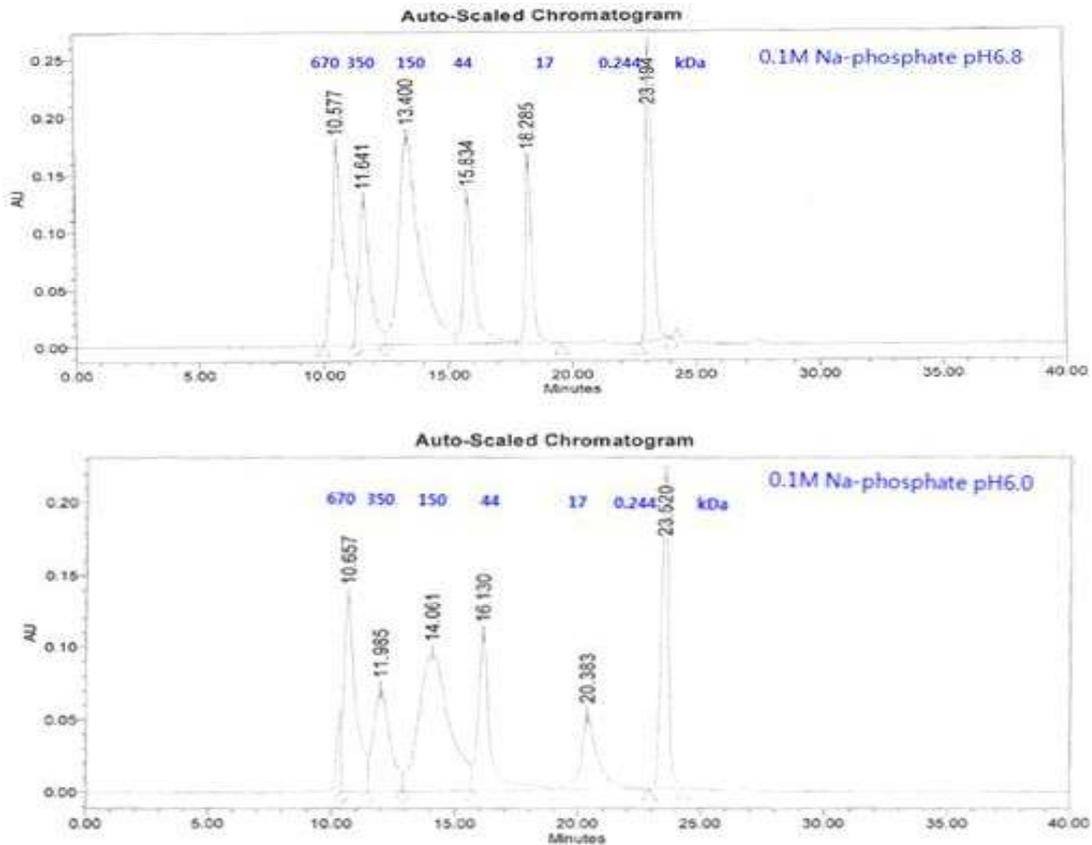


그림 52 HPLC 용매 pH 에 따른 단백질 용출시간

■ 2차 효소반응(Exo type protease) 실험 결과

Flavourzyme과 Prozyme의 2개 효소를 이용하여 2차 효소반응시킨 가수분해물의

분자량을 측정한 결과 Flavourzyme 이 Prozyme 2000P 보다 우수한 가수분해 활성을 나타낸 결과 Flavourzyme의 경우 Alcalase로 가수분해 단계 후 확인되는 분자량 670,000Da 부터 17,000Da 사이의 단백질을 대부분 가수분해 시켜 분자량 17,000Da 이하의 가수분해물들이 다량 생성된 것으로 확인되었다.

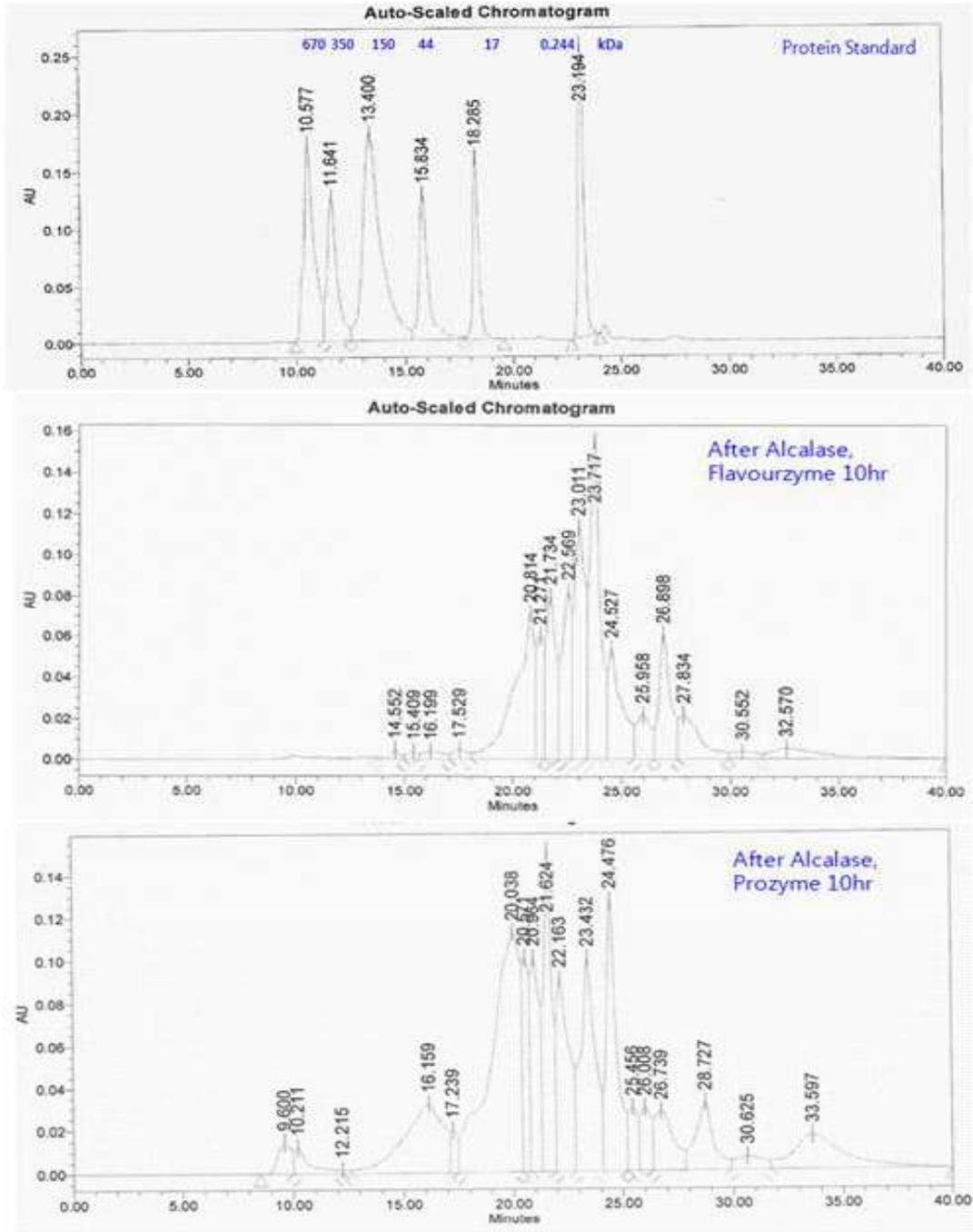


그림 53 Exo Type 효소별 가수분해 후 가수분해물의 분자량 분포

④ 최적 기질농도(유청단백)의 설정

Scale up 공정 및 산업화 공정에 적용하여 제조원가 및 단백질 가수분해물의 생산

량을 확보하기 위해서는 최적의 반응 기질 농도를 설정하는 것이 중요하며, 2가지의 최적 효소를 선정한 후 기질 농도에 따른 조건을 설정하기 위하여 다음과 같이 반응 기질의 농도에 따른 조건을 실험 진행하였다.

■ 실험방법

최적의 기질농도를 선정하기 위하여 위하여 50℃온도의 정제수에 유청 단백질을 10%(w/v), 20%(w/v), 30%(w/v) 의 다른 농도가 되도록 교반기를 이용하여 200 ~ 300rpm으로 교반하며 완전히 용해될 때까지 1시간 이상 교반 하였고, 교반 후 1차, 2차 효소 반응을 동일하게 실시하여 가수분해물의 분자량을 액체크로마토그래피를 이용하여 측정하였다.

■ 실험결과

먼저 육안으로 기질 농도에 따라 용해한 액상을 확인한 결과 기질(유청단백질) 농도가 10%인 것과는 달리 20%, 30% 의 농도에서는 유청 단백질간의 응집이 발생하는 것을 확인하였다.

교반기를 이용하여 교반을 실시하였으나, 10% 이상의 기질 농도에서는 효소반응을 할 수 없을 정도로 용해도가 좋지 않음을 확인하였다.

상기의 결과를 바탕으로 반응을 위해서는 10% 이상의 기질 농도는 적합하지 않으며, 10% 기질 농도를 대상으로 최적의 효소 비율을 결정하기 위한 실험을 수행하였다.

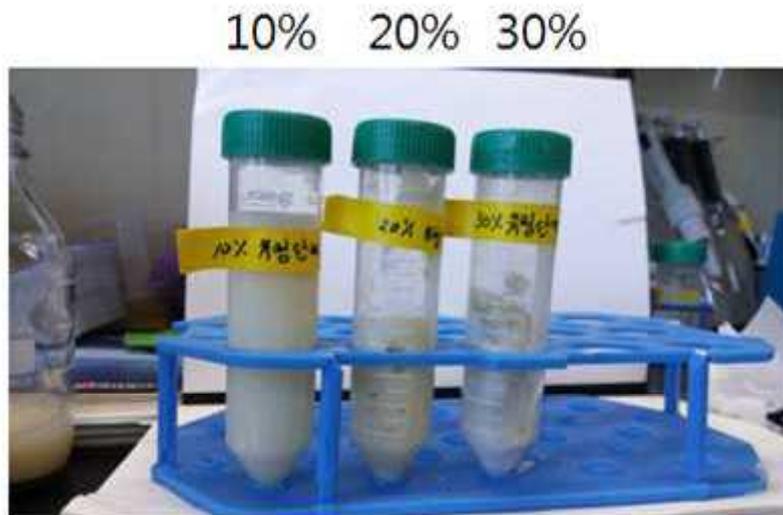


그림 54 기질농도에 따른 용해도 테스트 결과

⑤ 최적 효소 비율 선정 실험

앞서 선정된 최적 효소를 이용하여 효소 투입량을 선정하기 위해 10%의 기질 농

도를 대상으로 1% 효소 첨가 범위 내에서 앞서 선정된 2개의 효소의 비율을 달리 하여 실험을 수행하였다.

■ 실험방법

- 효소 투입량 설정

Endo type protease인 Alcalase 효소농도를 기질대비 1% → 0.5%로 조정 하고, Exo Type protease인 Flavourzyme 효소농도를 기질대비 1% → 0.2% 로 조정하였고 기질 농도를 10%, 반응온도 50℃로 설정하여 1차 반응시간 4시간, 2차 반응시간은 10시간으로 설정하여 반응을 진행하였다.

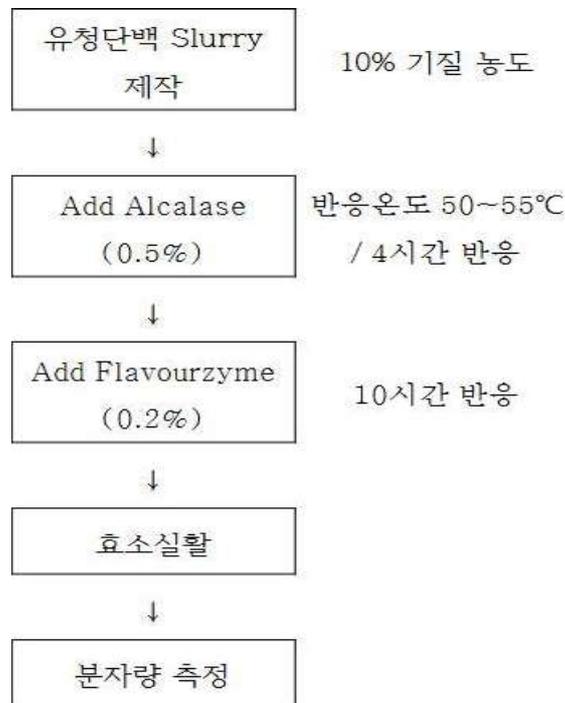


그림 55 1차효소농도 탐색 방법

■ 효소 투입량 설정 결과

1차, 2차 효소반응을 위해 앞서 선정된 최적의 효소, 반응시간, 기질농도로 반응을 수행하여 분자량을 측정한 결과 가수분해의 pattern과 정도가 유사하다는 결과를 내었다.

효소 투입량이 적은 샘플에서 가수분해정도가 유사하게 나타났으므로 가공비와 생산성을 고려하여 Alcalase와 Flavourzyme을 각각 기질대비 0.5%, 0.2%로 1차 선정하였다.

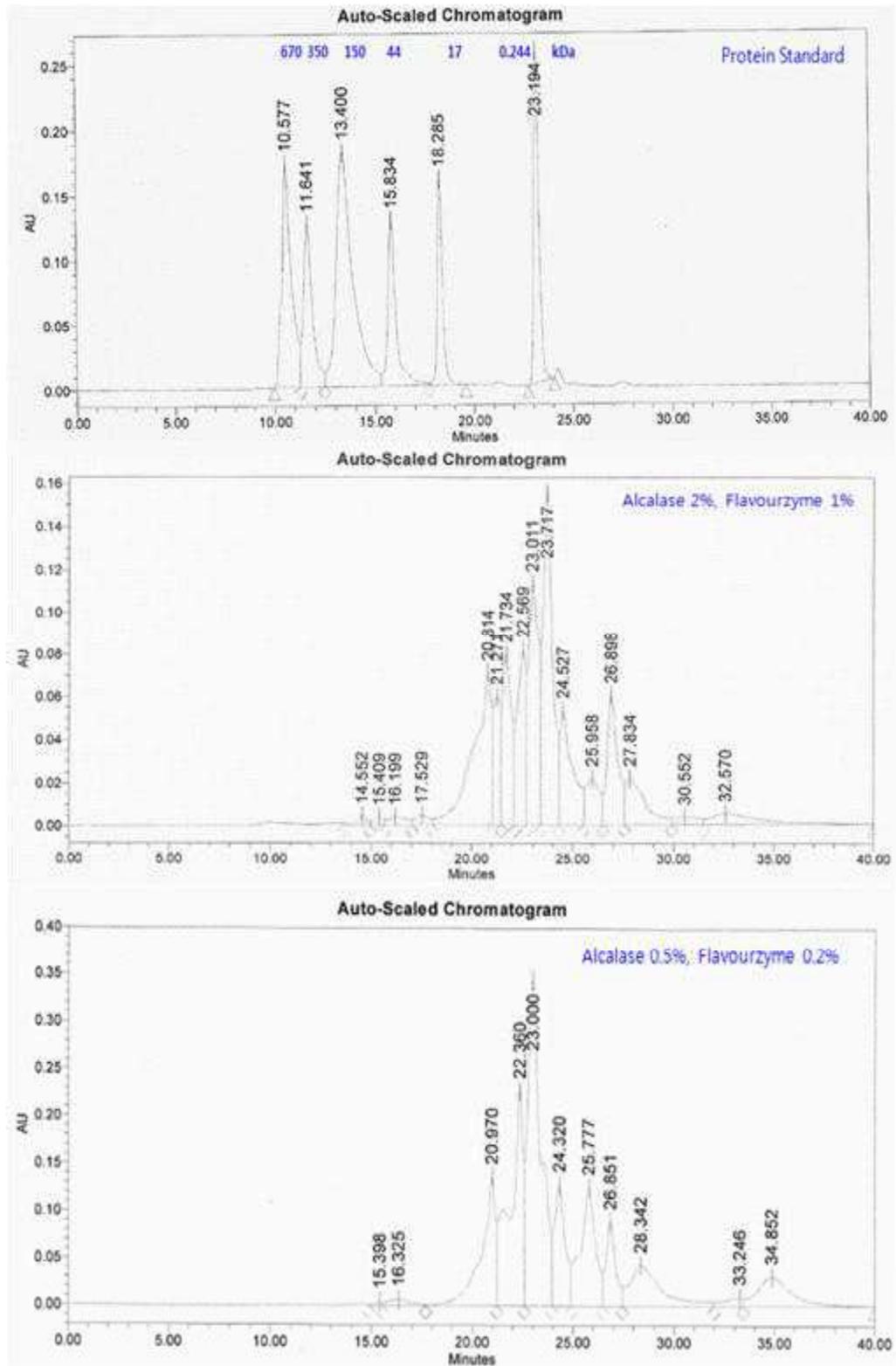


그림 56 효소 투입량에 따른 가수분해물의 분자량 분포

⑥ 최적 효소 투입량 설정 실험

상기 1차 효소 투입량 결과를 바탕으로 시생산 및 사업을 진행할 경우, 생산원가적인 측면에서는 일정한 비용절감이 가능할 것으로 판단되었으나, 추가 실험을 통하여 최적 효소 비율 선정을 통한 실험을 진행하였다.

최적 확인 된 10% 유청단백 기질농도를 대상으로, 전년도 선정한 1차가수분해 효소투입량 설정결과를 바탕으로 1차 투입효소인 Alcalase와 Flavourzyme 의 투입비율을 달리하여 실험을 수행하였고, 유청단백 가수분해정도를 확인하였다.

■ 실험방법

□ 최적 효소투입량 설정

Endo type protease인 Alcalase 효소농도를 기질대비 0.5% → 0.05%로 조정 하고, Exo Type protease 인 Flavourzyme 효소농도를 기질대비 0.2% → 0.05% 로 조정하였고 기질 농도를 10%, 반응온도 50℃로 설정하여 1차 반응시간 4시간, 2차 반응시간은 14시간으로 설정하여 반응을 수행하였다.

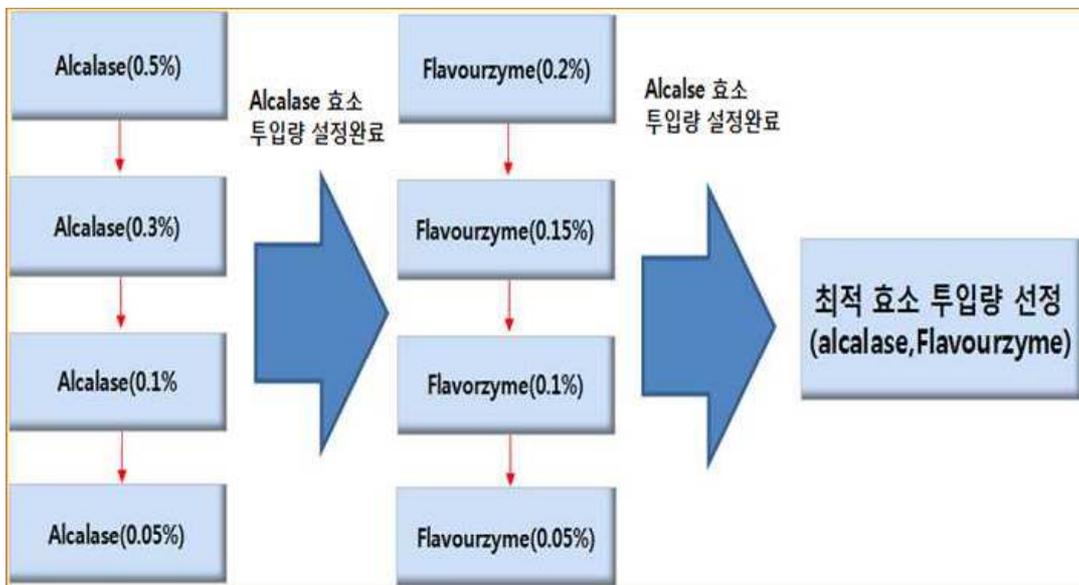


그림 57 최적효소 투입량 설정

■ 실험 결과

1차 가수분해 효소인 Alcalase를 기질대비 0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.02%를 투입하여 4시간동안 가수분해 시킨 결과 0.02%의 Alcalase 를 투입한 경우를 제외하고는 0.5%, 0.1%, 0.05% 투입량 모두 유사한 가수분해능을 나타내었다.

따라서 앞서 선정한 Alcalase 효소의 농도를 0.5%에서 0.05% 로 줄여, 생산단가 측면에서 비용을 줄일 수 있는 최적효소농도를 선정했다.

표 13 단백질가수분해물 분자량 분석 HPLC 조건

항목	조건
컬럼	Yarra 2000(3um, 7.8× 300 mm)
흡광도	280 nm
주입 용량	20 μL
유속	0.5 mL/min
분석용매	100mM Na-phosphate pH 6.8 (Isocratic (40min))

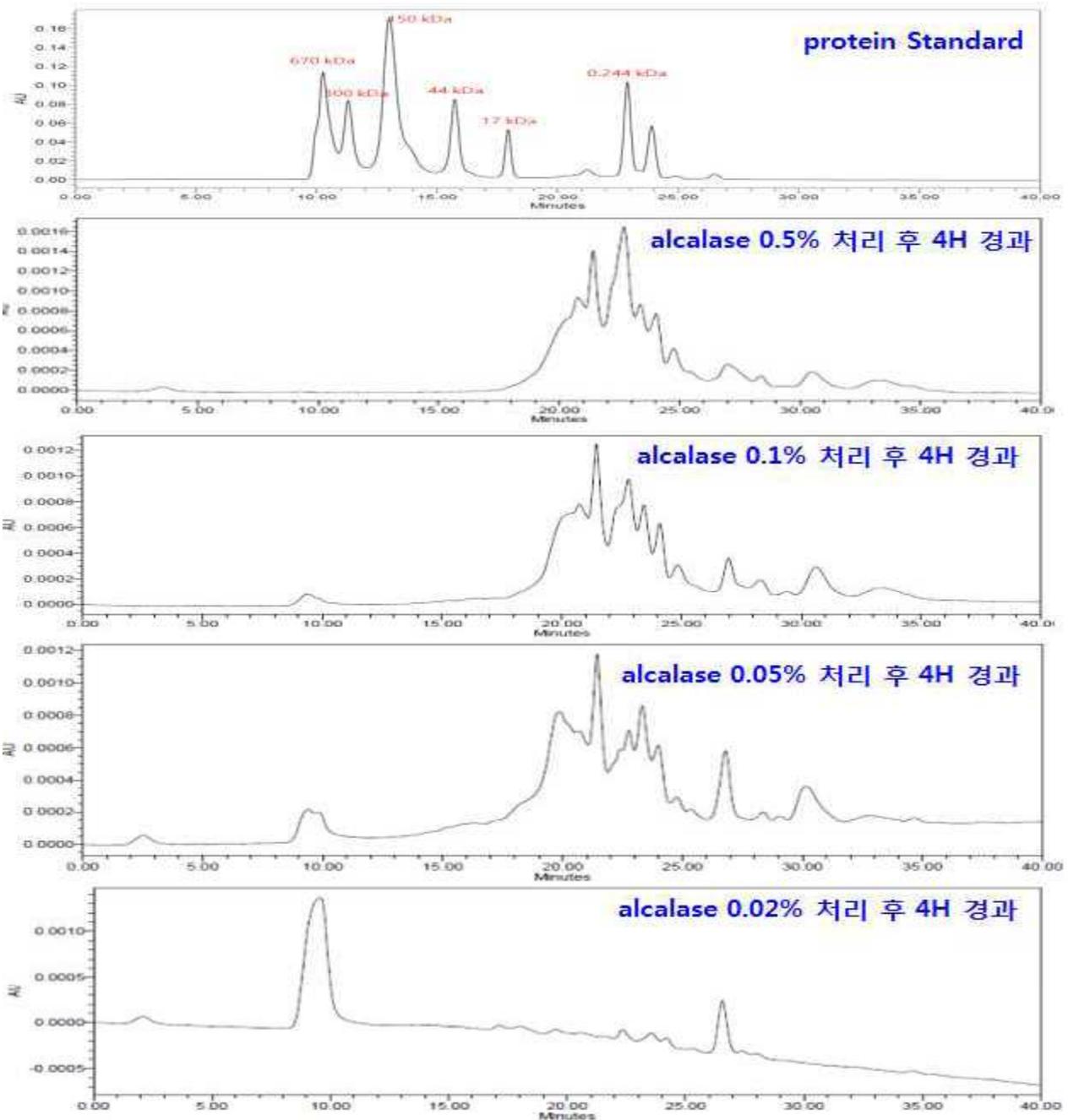
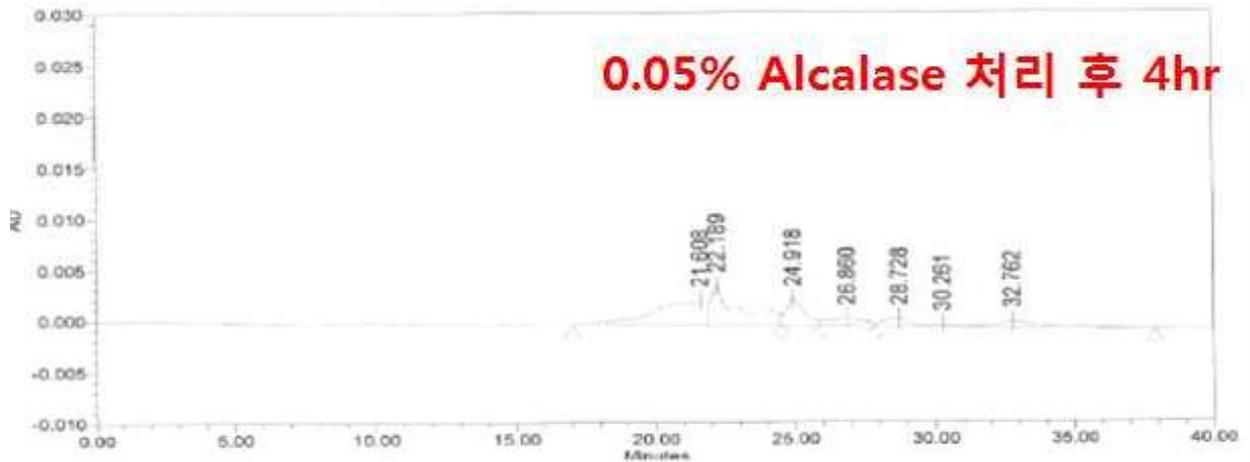
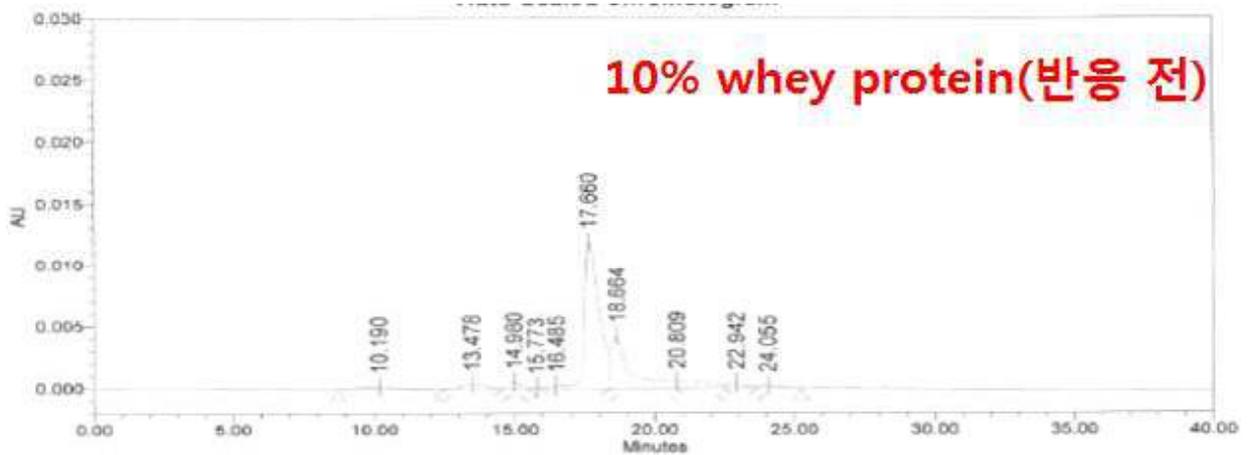
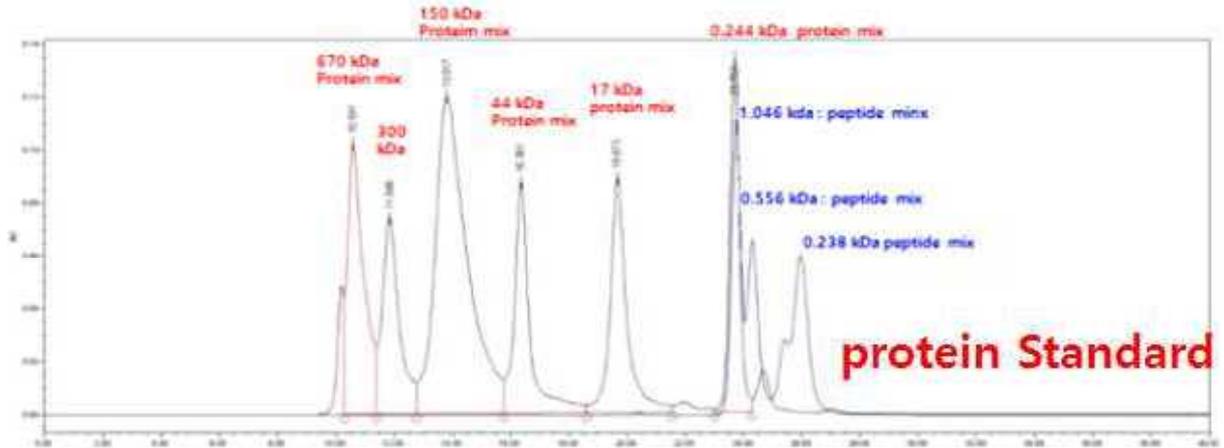


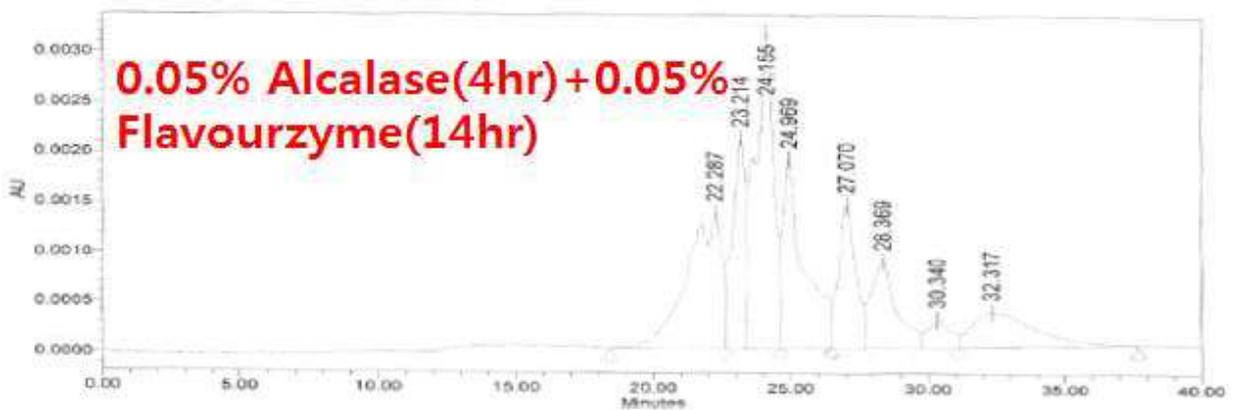
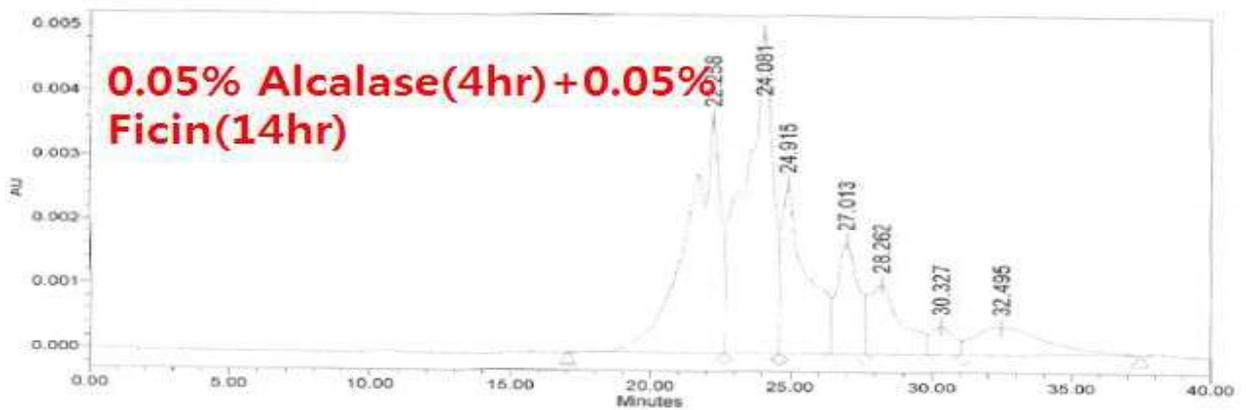
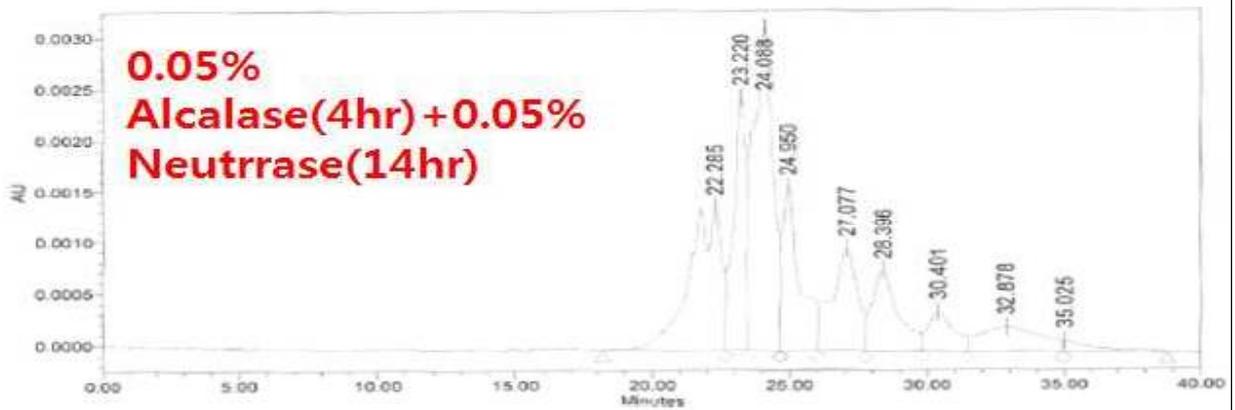
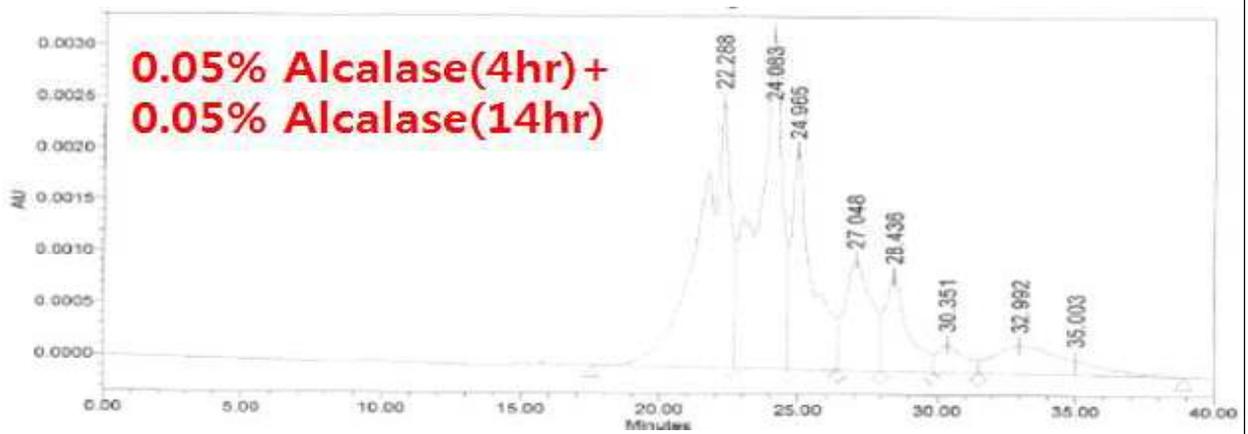
그림 58 1차 가수분해효소 농도별 가수분해 분석결과

⑦ 최적 효소 가수분해 조건 확립

■ 2차 효소가수분해 실험방법

최적확인 된 1차 가수분해효소인 alcalase의 효소를 기질대비 0.05% 투입한 다음, 4시간동안 반응시키고, 전년도 설정한 flavourzyme을 포함한 2차 가수분해 효소로서 protamax, neutrase, alcalase, ficin, collupulin, pancreatin를 0.05% 투입하여 14시간동안 가수분해를 실시하여 분자량 분석을 실시하였다.





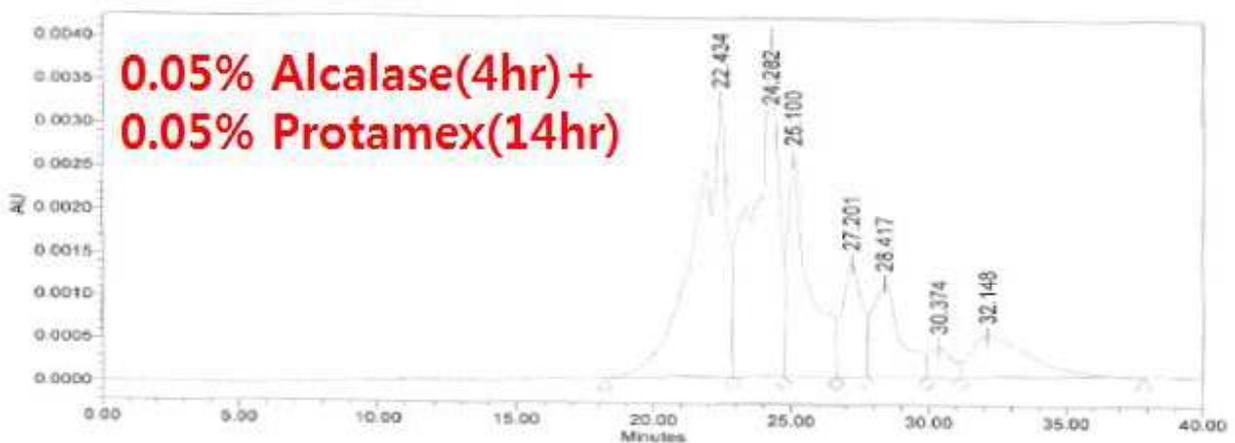
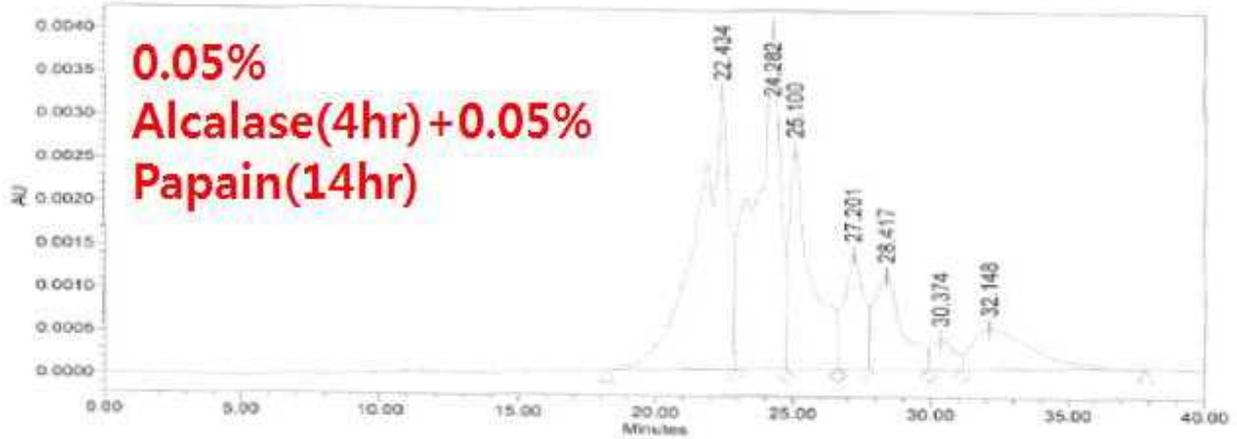


그림 59 2차 가수분해 효소 가수분해 결과

■ 실험결과

1차가수분해 및 2차가수분해를 하여 분자량분석을 수행한 결과 HPLC 상에서 유사한 가수분해 정도를 나타냈다.

⑧ 최종 단백가수분해물에 대한 분자량 분획설정

앞서 선정된 최적의 반응 조건으로 반응시킨 유청단백 가수분해물의 분자량 별 분획을 위해 (주)네오크레마에서 보유중인 pilot scale의 한외여과장치(UF machine, Sartorius)를 이용하여 분획을 실시하였다.

효소반응을 통해 대부분의 17,000da 이하로 가수분해 되는 것을 확인하였고, <10kDa, <5kDa, <2kDa 총 4종류의 분획에 대한 시험을 진행하였으며 성장촉진에 효과적인 분획물을 확인 후 최적 공정을 확립하였다.

랩스케일용 한외여과 장치에 UF 카세트를 장착한 다음 증류수를 이용하여 pH rk 중성 이 될 때 까지 pre-washing을 실시하였다.

UF 카세트에 적용되는 시료의 투입량/투입속도는 멤브레인 투과 압력(TMP :

Transfer membrane pressure)이 1bar 이하에서 운용을 실시했다.

TMP 의 계산은 [시료 투입시 압력(P) + Return 압력(P')]/2로 계산하여 1 이하가 되도록 밸브 및 유속을 조정하며, 카세트 장착 후 유량의 측정은 1분동안의 UF 카세트에 통과한 량에 대한 카세트의 평균 L/h/m² 값을 확인 후 제품의 spec 상의 유량 값 이하가 되도록 분자량별 한외여과(UF)를 실시했다.

표 14 TMP(Transfer membrane pressure)측정 방법

Standard	실험값
$10 \text{ l/h} : 1 \text{ m}^2 = X \text{ l/h} : 0.1 \text{ m}^2$ $1X \text{ m}^2 = 1 \text{ l/h}$ $1 \text{ l/h} = 0.0166 \text{ l/min} = 16.66 \text{ ml/min (at 1bar)}$	14.00 ml/min (at 0.8 bar)



그림 60 한외여과(UF) 장치



Cutoff	Sartocan cassettes, 0.7 m ² filter area
1 kD	3021460907E--SG
5 kD	3021462907E--SG
8 kD	3021463407E--SG
10 kD	3021463907E--SG
30 kD	3021465907E--SG
50 kD	3021465007E--SG
100 kD	3021466807E--SG
300 kD	3021467907E--SG

그림 61 분자량별 분획용 UF membrane

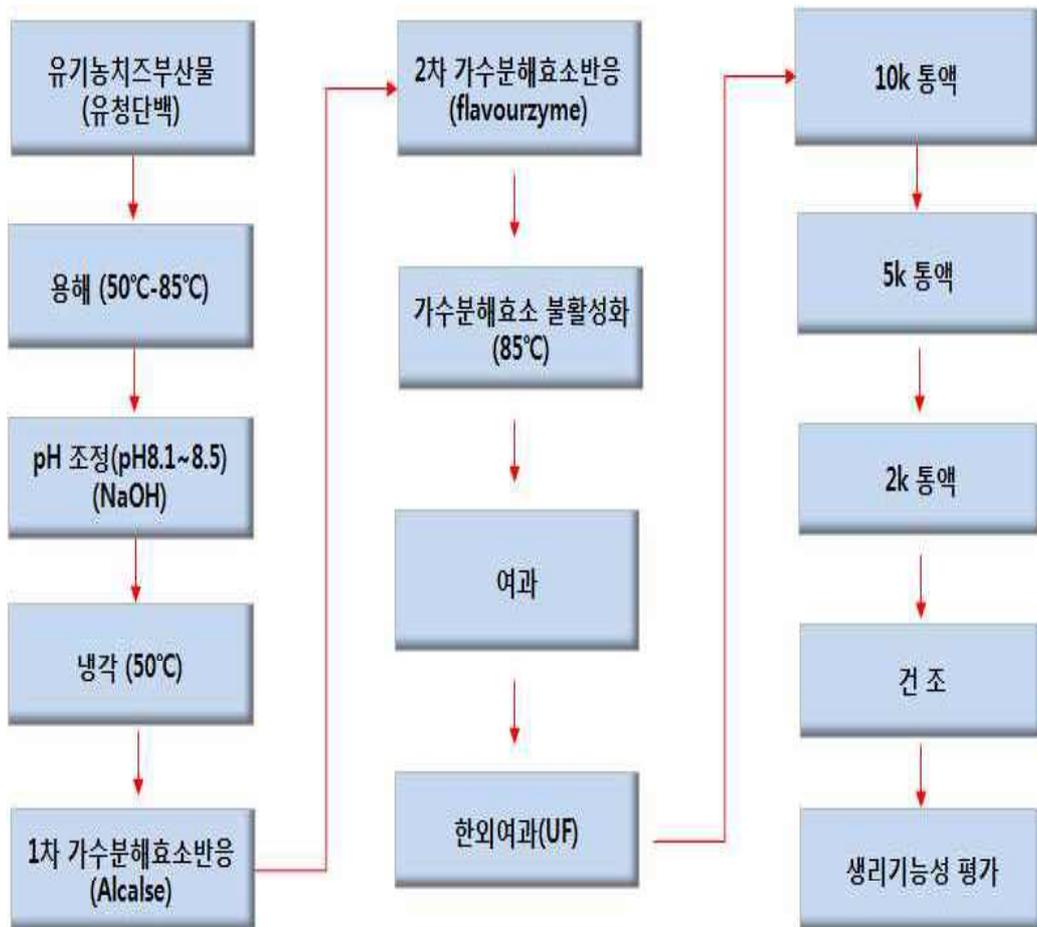


그림 62 유청단백가수분해물 예상 제조공정

■ UF 분획 예비실험방법

유청단백가수분해물을 <10kDa, <5kDa, <2kDa 총 4종류의 분획시험은 분자량별 분획여부 확인을 위해 <5kDa 분획단계 없이 10kDa, 2kDa를 UF cartridge 를 통과한 분획물과 UF cartridge 불통한 분획물 두 가지 시료의 분자량을 분석하여 분획물을 확인하였다.

<10kDa 분획물(통과액)을 이용하여 2kDa UF cartridge를 이용한 <2kDa 분획물을 비교하여 분자량의 변화를 확인하였다.

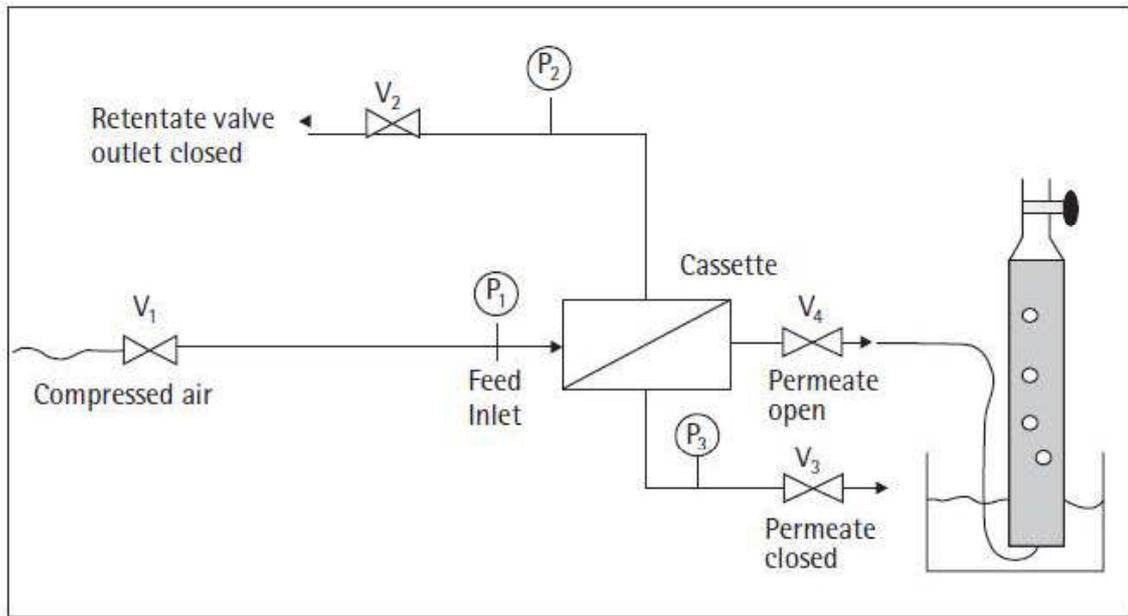
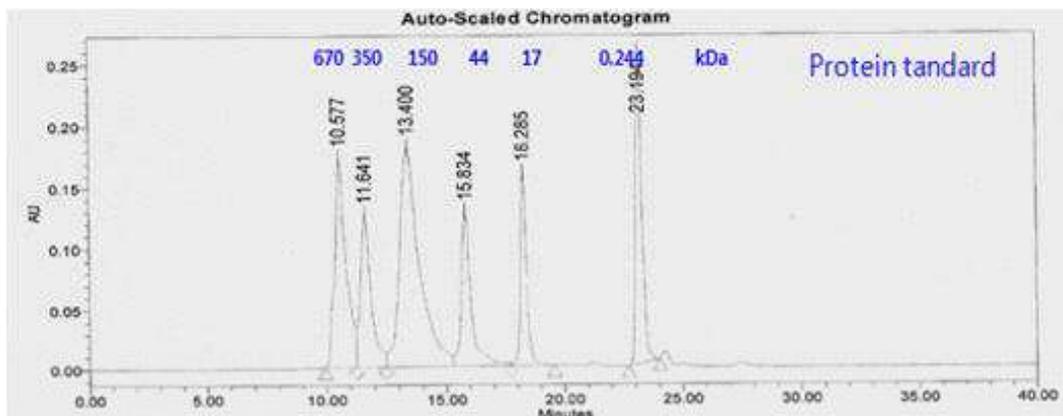


그림 63 한외여과기 운영시스템

10kDa와 2kDa cartridge 를 이용하여 단백질가수분해물의 분획물의 분자량을 비교한 결과 retention time 이 20~22min(분자량 17~0.244kDa 사이) 사이에서 용출되어 나오는 peak 면적을 확인하였을 때 <2kDa UF cartridge를 통과한 분획물의 peak 면적이 현저히 줄어들고 있음을 확인 할 수 있었다.



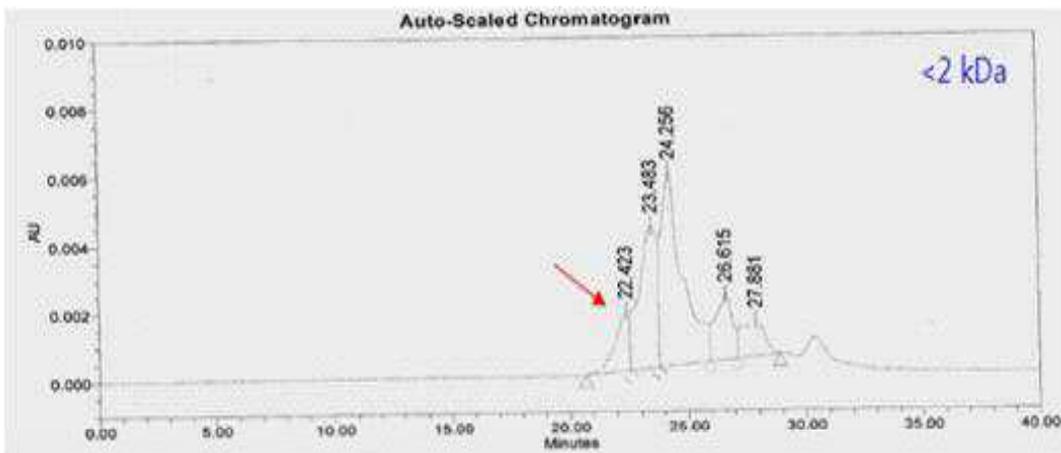
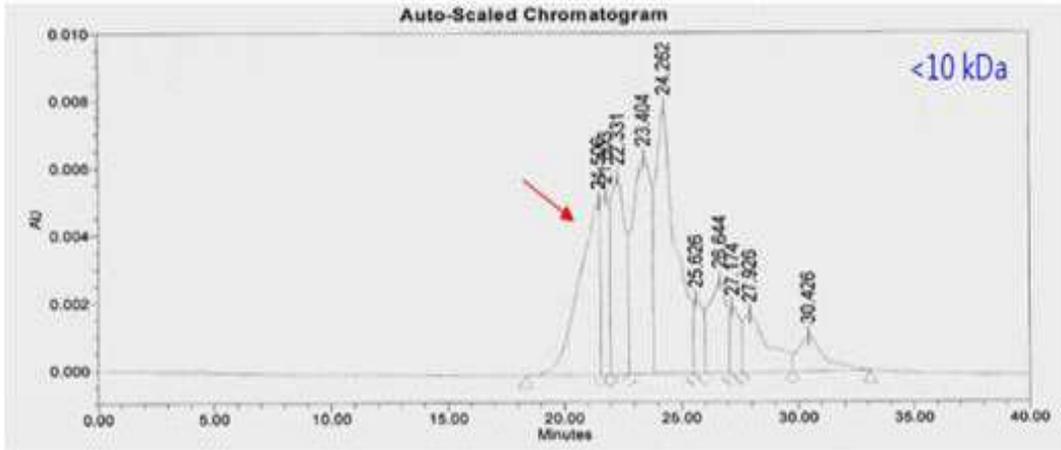
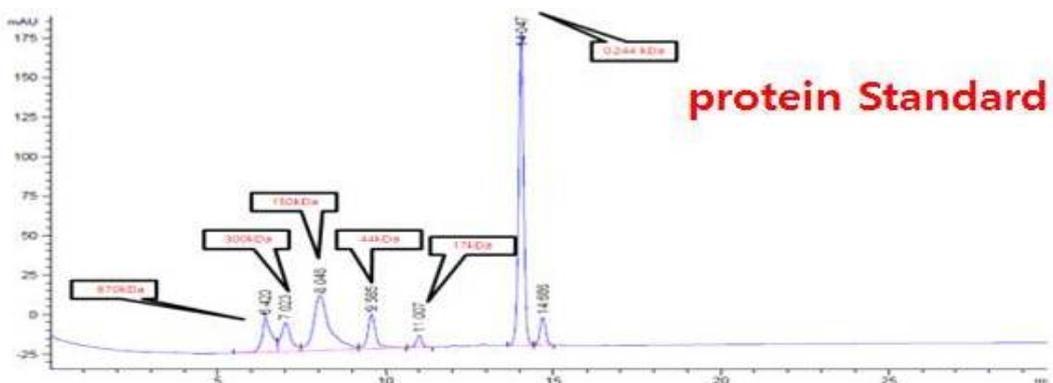


그림 64 유청단백가수분해물 UF 분획 실험 결과

■ 단백질가수분해물에 대한 분자량 분획 실험방법

유기농 유청단백 기질 10% 용액에 최종 선정된 1차가수분해 효소 alcalase 를 0.05% 를 투입하여, 4시간동안 효소반응 시키고, 2차 가수분해 효소인 protamax를 투입하여 14시간동안 추가 가수분해를 시킨 다음, 3 kDa UF cartridge 에 통과시키고 3k 이하 단백질 가수분해분획물을 회수하였다.

■ 효소가수분해 결과



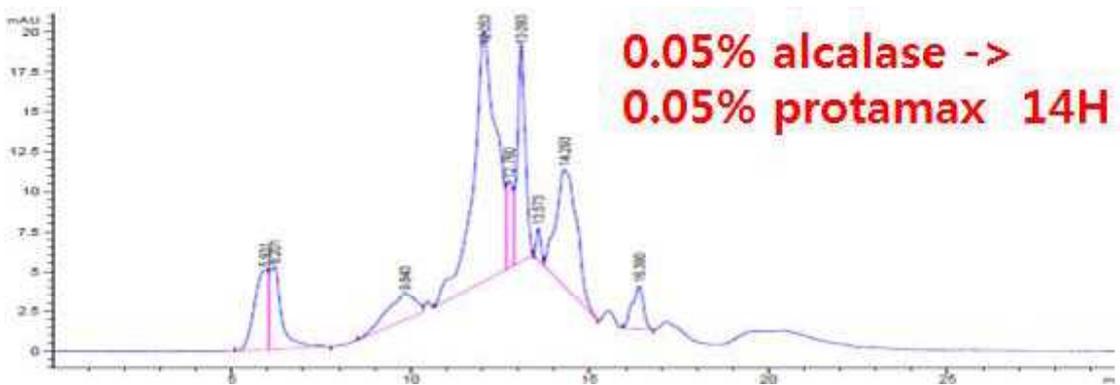
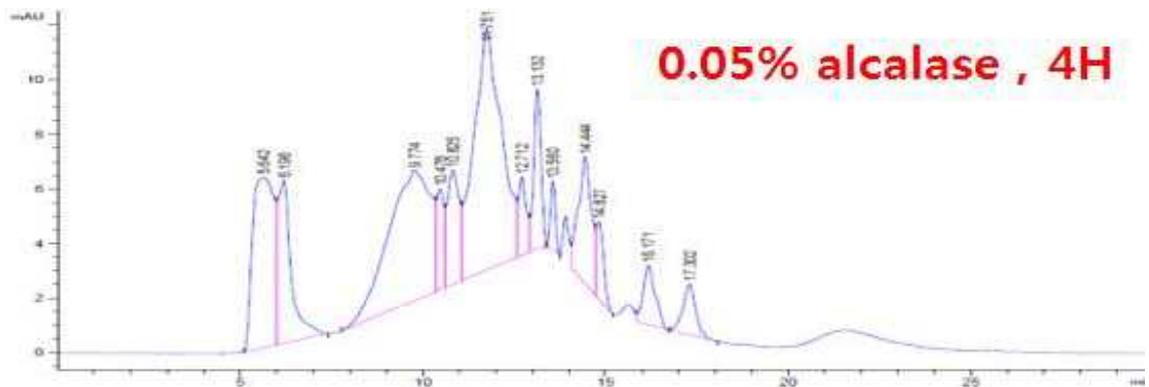
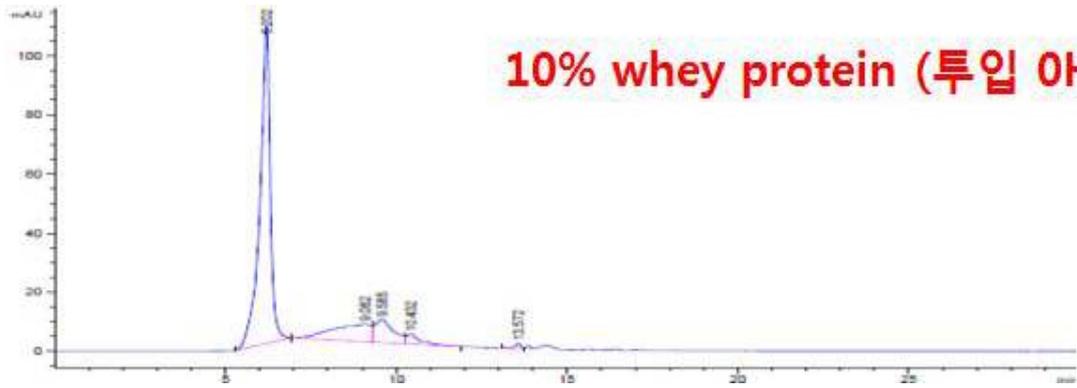


그림 65 1차가수분해 효소 및 2차가수분해 효소반응 결과

■ 3 kDa 분자량 분획 실험결과

3 kDa 분자량 분획 결과 3 kDa 보다 분자량이 많은 부분이 분획되었음을 확인할 수 있었으며, 분획된 가수분해물을 이용하여 성장기능성을 확인하였다.

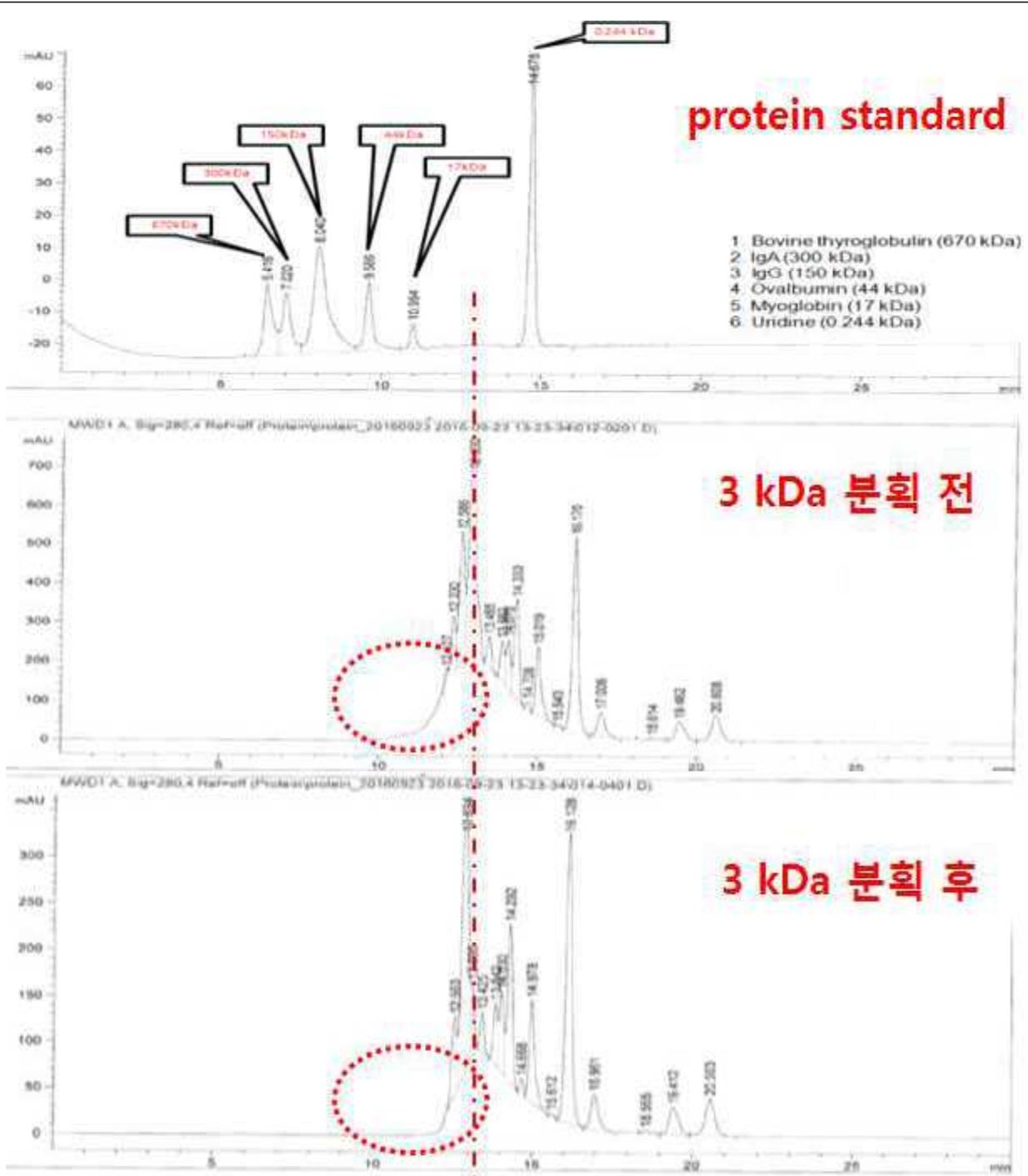


그림 66 3 kDa 분자량 분획 결과

⑨ 유기농유청가수분해물 최적공정 개발

앞서 수립된 유청단백가수분해물 제조 및 단백질가수분해물에 대한 UF(ultrafiltration) 분획에 대한 설정조건을 이용하여 성장 기능성이 있는 유기농 유청단백 가수분해물의 산업화를 위한 대량생산공정을 수립하고자 위한 시생산을 실시하였고, 이를 바탕으로 대량생산을 위한 생산표준작업(SOP) 설정을 진행했다.

■ 유청단백가수분해물 대량생산 위한 1차 시생산 (lap)

(주)네오크레마 연구소에서 보유하고 있는 한외여과장치를 이용하여 유청단백가수분해물 및 가수분해물 분획 생산을 랩스케일에서 수행하였고, 분무건조는 자사 장성공장에서 보유하고 있는 분무건조기를 이용하여 분말화를 시행하였다.

유기농유청단백의 공정순서는 “유청단백용해 → 1차 가수분해 효소투입 → 2차 가수분해 효소 투입 → 1차 여과 → 한외여과 → 농축 → 건조” 이고, 제조공정도를 확정하였음.

5kg 의 유청단백을 이용하여 시생산테스트를 수행한 결과 최종적으로 263g 의 유청단백 가수분해물 분말 0.263kg을 얻을 수 있었고, 원료대비 최종 수율은 5.26% 로 확인 되었다.



10% 유청단백 효소반응



규조토 여과



Ultra filtration(3kDa)



3kDa 분획물 농축



분무건조



유청단백가수분해물 분말 시제품

그림 67 유기농유청단백 가수분해물 생산

표 15 유청단백가수분해물 제조공정

제 조 공 정	세 부 조 건	비 고
용 해	유기농유청단백 + 기질대비 9배 청수 투입	
↓		
온도 조정	85℃ 까지 온도 상승 후 완전용해	
↓		
pH 조정	탄산나트륨 투입 후 pH 8.2~pH8.5 조정	
↓		
온도 조정	50~55℃	
↓		
1차효소 투입	기질대비 Alcalase 0.05% 4시간 반응	
↓		
2차효소 투입	기질대비 protamax 0.05% 투입	
↓		
효소실활	- 활성탄 1%, 60℃	
↓		
여과	75브릭스 이상	
↓		
한외여과	3 kDa	
↓		
농축		
↓		
건조	Spray Dryer Inlet temp: 160℃ Outlet temp : 890℃	
↓		
분 말		

■ 생산작업 표준 설정(SOP)

상기 1차 랩스케일 시생산 결과를 바탕으로 생산작업표준을 작성하였으며, 생산 작업 표준은 아래 같다.

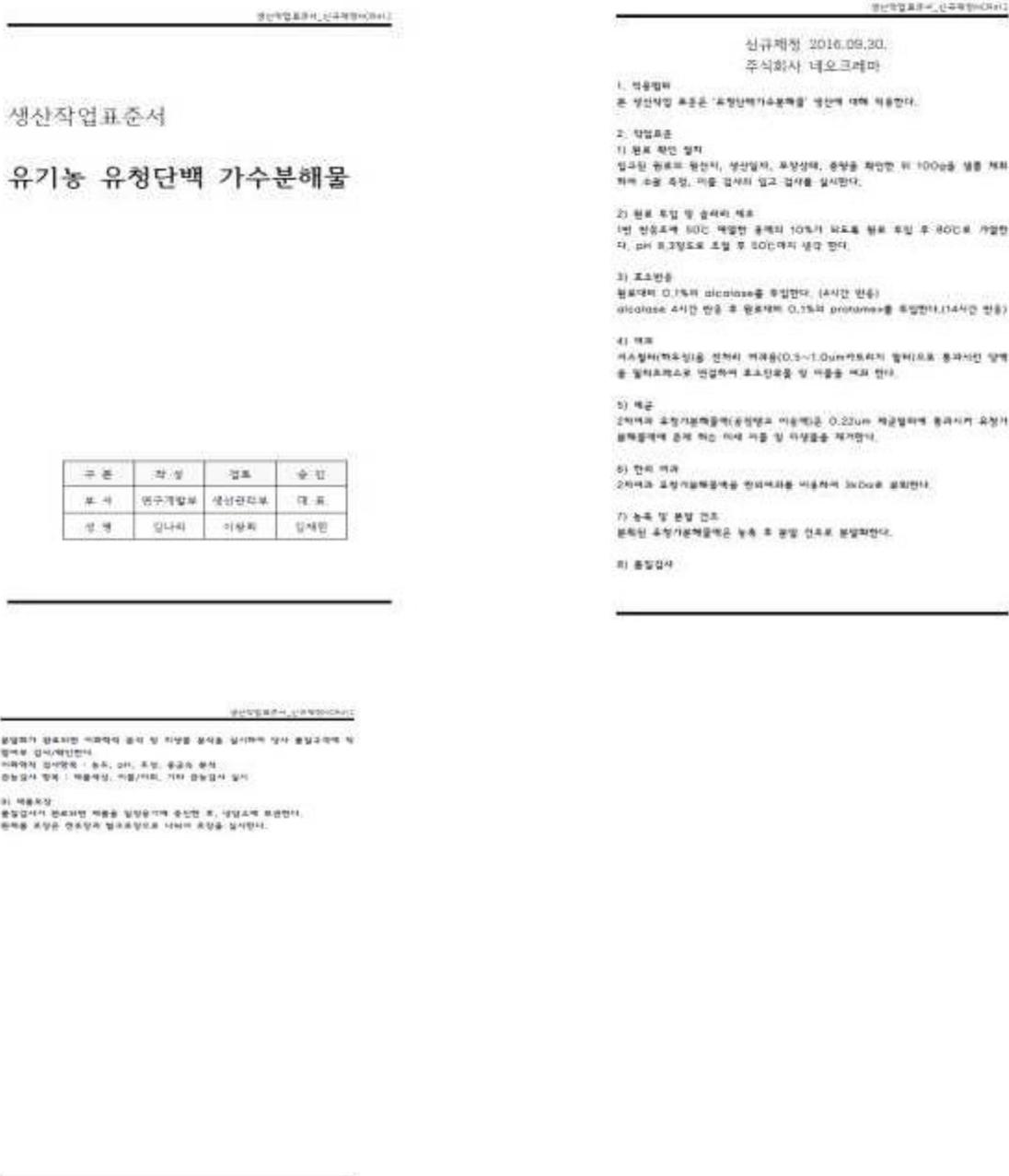


그림 68 유기농유청단백가수분해 분획물 생산작업표준서

■ 시생산 (WPC 80kg)

매일유업으로부터 제공받은 유기농 유청단백 80kg를 기준으로 확립된 SOP에 의거하여 시생산을 진행하였다.



그림 69 제조공정도



그림 70 시생산

표 16 유청단백가수분해물 시생산 결과

항목	생산결과	비고
생산원료	유기농유청단백	1) 원료 (유청단백) 사용량 : 80kg 2) 제품생산량 : 8.1kg 3) 생산수율 : 10 %
제품생산량	8.1kg	
제품색상 (육안관찰)	미황색	
생산수율	72%	
GOS함량 (%)	55.72%	
포장단위	8 kg	
		

(2) 유청단백가수분해물의 기호도 조사

본 과제로부터 개발된 유기농 유청단백가수분해물을 이용하여 유청단백가수분해물의 특성을 파악하고, 이를 바탕으로 제품개발을 하고자 관능평가를 진행하였으며, 관능평가를 통하여, 낮은 기호도를 가진 유청단백가수분해물들을 사이클로덱스트린 시럽을 통하여 기호도 개선 테스트를 진행하였다.

(가) 유청단백가수분해물 제품 설문지 개발

① 설문 목적

유기농 유청단백가수분해물의 제품화를 위하여, 유청단백가수분해물의 특성을 파악하여 이를 바탕으로 관능평가를 진행하였고, 유청단백가수분해물의 제품활용의 기초자료로서 사용하는데 그 목적이 있다.

② 조사대상 및 기간

본 설문지는 예비조사(2016년 9월)를 실시한 다음, 이를 토대로 설문지를 수정·보완하고 현장설문조사를 진행하여 2016년 9월 27일부터 2016년 9월 30일까지 실시하였다. 서울 및 수도권 지역에 거주하고 있는 20대-50대 성인 소비자를 대상으로 유효 표본 28부를 최종 분석에 사용하였다.

③ 사내용 및 방법

유청단백가수분해물의 관능은 효소처리 방식에 따라 다르므로 효소처리방식별로 ㉠ alcalase 단독 효소처리한 유청단백 가수분해물, ㉡ alcalase와 protamex 효소처리한 유청단백가수분해물, ㉢ alcalase와 protamex 효소처리 후 사이클로덱스트린시럽으로 포접한 유청단백 가수분해물 등 총 3개의 그룹으로 나누었고 설문 문항은 유청단백 가수분해물의 색, 향, 쓴맛, 이미, 이취, 기호도 등 총 6개의 항목을 대상으로 실시하였다.

평가는 리커트 5점척도를 사용하였다.

✓ 기호도, 색, 향

1: 매우 싫어한다, 2: 싫어한다. 3: 좋아하지도 싫어하지도 않다. 4: 좋아한다, 5: 매우 좋아한다.

✓ 쓴맛, 이미, 이취

1: 매우 약하다, 2: 약하다. 3: 강하지도 약하지도 않다. 4: 강하다, 5: 매우 강하다.

㉔ 자료의 통계처리 방법

본 연구에서 설문조사된 자료는 SPSS(Statistical Package for Social Science) Ver. 18.0 프로그램을 이용하여 평균과 표준편차 이용하여 계산하였다.

이를 바탕으로, 유기농 유청단백가수분해물의 홍보 활성화에 핵심이 되는 요인을 도출하기 위하여 IPA(importance performance analysis)를 실시하였다.

(나) 관능평가의 통계학적 특징 분석

① alcalase 효소처리 유청단백가수분해물 에 대한 조사결과

관능검사 결과 전반적인 기호도는 2.36로 나타났고, 색은 2.71, 향은 2.46, 쓴맛은 3.25 으로 나타났다. 또한 이미는 3.29로 나타났으며, 이취는 3.32으로 나타났다.

전반적인 기호도에서는 ‘매우 싫어한다’ 21.4%(6명), ‘싫어한다’ 39.3%(11명), ‘좋아하지도 싫어하지도 않는다’ 21.4%(6명), ‘좋아 한다’ 17.8%(5명), ‘매우 좋아한다’ 0%(0명)로 나타났다.

색깔에 있어서는 매우 싫어한다 0%(0명), 싫어한다 46.4%(13명) 좋아하지도 싫어하지도 않는다 39.3%(11명), 좋아한다 10.7%(3명), 매우 좋아한다 3.5%(1명)로 나타났다.

향에 있어서는, 매우 싫어한다 0%(0명), 싫어한다 60%(17명) 좋아하지도 싫어하지도 않는다 32.1%(9명), 좋아한다 7.1%(2명), 매우 좋아한다 0%(0명)로 나타났다.

쓴맛에서는 매우 싫어한다 0%(0명), 싫어한다 14.3%(4명) 좋아하지도 싫어하지도 않는다 46.4%(13명), 좋아한다 39.3%(11명), 매우 좋아한다 0%(0명)로 나타났다.

이미에서는 매우 싫어한다 0%(0명), 싫어한다 7.1%(2명) 좋아하지도 싫어하지도 않는다 64.3%(18명), 좋아한다 21.4%(6명), 매우 좋아한다 7.1%(2명)로 나타남.

이취에서는 매우 싫어한다 0%(0명), 싫어한다 10.7%(3명) 좋아하지도 싫어하지도 않는다 50%(14명), 좋아한다 35.7%(10명), 매우 좋아한다 3.5%(1명)로 나타났다.

표 17 alcalase 단독 효소처리된 유청단백가수분해물에 대한 관능검사 결과

	전반적인 기호도	색	향	쓴맛	이미	이취
평균	2.36±1.03	2.71±0.81	2.46±0.64	3.25±0.70	3.29±0.71	3.32±0.72

✓ 전반적인 기호도, 색, 향 :

1: 매우 싫어한다, 2: 싫어한다. 3: 좋아하지도 싫어하지도 않다. 4: 좋아한다, 5:

매우 좋아한다.

✓ 쓴맛, 이미, 이취 :

1: 매우 약하다, 2: 약하다. 3: 강하지도 약하지도 않다. 4: 강하다, 5: 매우 강하다.

■ 관능 테스트 결과

- 색에 대한 전반적인 기호도 : 싫어한다가 가장 많았다.
- 쓴맛에 대한 전반적인 기호도 : '강하지도 약하지도 않다' 가 가장 많았다.

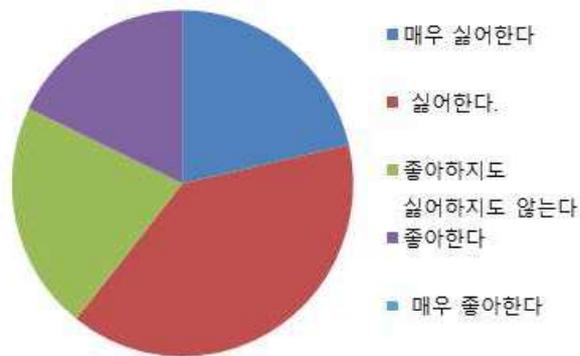


그림 71 Alcalase 단독처리된 유청단백 가수분해물의 관능테스트 결과(색)

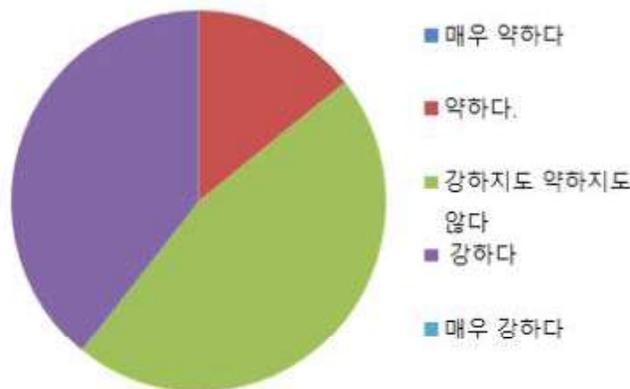


그림 72 alcalase 단독처리 유청단백 가수물에 대한 관능테스트 결과(쓴맛)

② alcalase와 protamex 효소처리 된 유청단백 가수분해물의 관능검사 결과

관능검사결과 전반적인 기호도는 2.89으로 나타났고, 색은 3.14, 향은 2.96, 쓴맛은

2.86으로 나타남. 또한 이미는 2.71로 alcalase와 protamex 효소처리 유청단백가수분해물 조사결과는 다음과 같다.

전반적인 기호도는 '매우 싫어한다' 3.5%(1명), '싫어한다' 28.5%(8명), '좋아하지도 싫어하지도 않는다' 42.8%(12명), 좋아한다 25%(7명), 매우 좋아한다 0%(0명)로 나타났다. 색에서는 매우 싫어한다 0%(0명), 싫어한다 25%(7명), 좋아하지도 싫어하지도 않는다 35.7%(10명), 좋아한다 39.2%(11명), 매우 좋아한다 0%(0명)로 나타났다.

향에서는 매우 싫어한다 0%(0명), 싫어한다 14.2%(4명), 좋아하지도 싫어하지도 않는다 45%(21명), 좋아한다 10.7%(3명), 매우 좋아한다 0%(0명)로 나타났다.

쓴맛에서는 매우 싫어한다 0%(0명), 싫어한다 21.4%(6명), 좋아하지도 싫어하지도 않는다 71.4%(20명), 좋아한다 7.1%(2명), 매우 좋아한다 0%(0명)로 나타났다.

이미에서는 매우 싫어한다 0%(0명), 싫어한다 39.2%(11명), 좋아하지도 싫어하지도 않는다 50%(14명), 좋아한다 10.7%(3명), 매우 좋아한다 0%(0명)로 나타남.

이취에서는 매우 싫어한다 0%(0명), 싫어한다 32.1%(9명), 좋아하지도 싫어하지도 않는다 50%(14명), 좋아한다 17.8%(5명), 매우 좋아한다 0%(0명)로 나타남.

표 18 alcalase와 protamex 효소 처리유청단백가수분해물의 관능검사 결과

	전반적인 기호도	색	향	쓴맛	이미	이취
평균	2.89±0.83	3.14±0.80	2.96±0.51	2.86±0.52	2.71±0.66	2.85±0.71

✓ 전반적인 기호도, 색, 향

1: 매우 싫어한다, 2: 싫어한다. 3: 좋아하지도 싫어하지도 않는다. 4: 좋아한다, 5: 매우 좋아한다.

✓ 쓴맛, 이미, 이취

1: 매우 약하다, 2: 약하다. 3: 강하지도 약하지도 않다. 4: 강하다, 5: 매우 강하다.

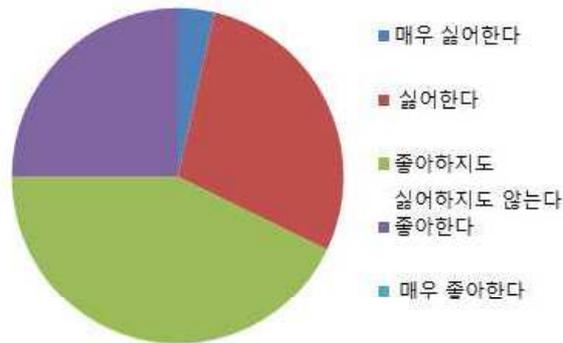


그림 73 alcalase+protamax처리된 단백질 가수분해물의 전반적인 기호도 테스트

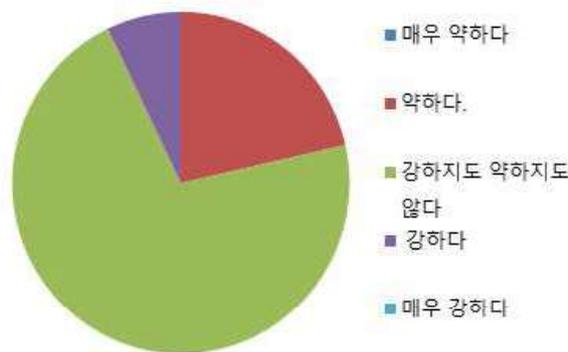


그림 74 alcalase+protamax 처리된 단백질 가수분해물의 쓴맛, 이미, 이취 기호도 테스트

(다) 유청단백 가수분해물의 기호도(관능) 개선 평가

낮은 기호도를 가진 개발된 유기농 유청단백가수분해물은 사이클로덱스트린 시럽을 통하여 기호도를 개선하기 위하여 당사의 감미개선 마스킹소재인 사이클로덱스트린 시럽 제품을 이용하여 관능개선 테스트를 진행하였다.

① Alcalase와 Protamex 효소처리 된 유청단백가수분해물과 사이클로덱스트린 시럽을 혼합 결과

- 전반적인 기호도는 3.14으로 나타났고, 색은 3.35, 향은 2.89, 쓴맛은 2.21으로 나타났다. 또한 이미는 2.46로 나타났으며, 이취는 2.67으로 나타났다.

- 전반적인 기호도에서는 매우 싫어한다 7.1%(2명), 싫어한다 21.4%(6명), 좋아하지

도 싫어하지도 않는다 32.1%(9명), 좋아한다 28.6%(8명), 매우 좋아한다 10.7%(3명)로 나타남.

색에서는 매우 싫어한다 0%(0명), 싫어한다 17.9%(5명), 좋아하지도 싫어하지도 않는다 35.7%(10명), 좋아한다 39.2%(11명), 매우 좋아한다 7.1%(2명)로 나타남.

향에서는 매우 싫어한다 3.5%(1명), 싫어한다 25%(7명), 좋아하지도 싫어하지도 않는다 50%(14명), 좋아한다 21.4%(6명), 매우 좋아한다 0%(0명)로 나타남.

쓴맛에서는 매우 싫어한다 14.3%(4명), 싫어한다 57.1%(16명), 좋아하지도 싫어하지도 않는다 21.4%(6명), 좋아한다 7.1%(2명), 매우 좋아한다 0%(0명)로 나타남.

이미에서는 매우 싫어한다 0%(0명), 싫어한다 64.3%(18명), 좋아하지도 싫어하지도 않는다 28.6%(8명), 좋아한다 3.5%(1명), 매우 좋아한다 3.5%(1명)로 나타남.

이취에서는 매우 싫어한다 0%(0명), 싫어한다 42.9%(12명), 좋아하지도 싫어하지도 않는다 46.4%(13명), 좋아한다 10.7%(3명), 매우 좋아한다 0%(0명)로 나타남.

표 19 alcalase와 protamex 효소처리된 유청단백 가수분해물에 사이클로텍스트린 처방된 혼합물의 관능 검사

	전반적인 기호도	색	향	쓴맛	이미	이취
평균	3.14±1.11	3.35±0.87	2.89±0.79	2.21±0.79	2.46±0.74	2.67±0.67

✓ 전반적인 기호도, 색, 향

1: 매우 싫어한다, 2: 싫어한다. 3: 좋아하지도 싫어하지도 않는다. 4: 좋아한다, 5: 매우 좋아한다.

✓ 쓴맛, 이미, 이취

1: 매우 약하다, 2: 약하다. 3: 강하지도 약하지도 않다. 4: 강하다, 5: 매우 강하다.

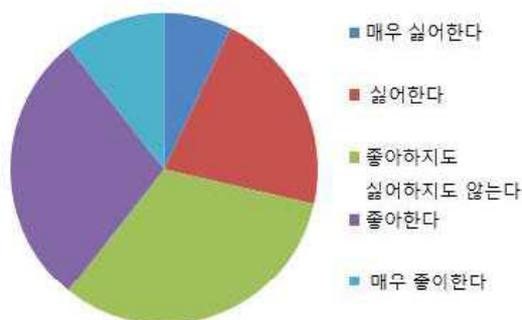


그림 75 alcalase와 protamex 효소처리된 유청단백 가수분해물에 사이클로텍스트린 처방된 혼합물의 전반적인 기호도

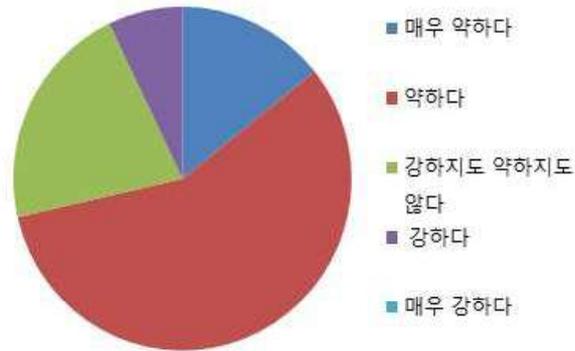


그림 76 alkalase와 protamex 효소처리된 유청단백가수분해물에 사이클로덱스트린 처방된 혼합물의 쓴 맛, 이미, 이취 에 대한 관능평가

(라) alkalase와 protamex 효소처리된 유청단백가수분해물에 사이클로덱스트린 처방된 혼합물에 대한 관능평가 결과

Alcalase만 단독으로 제조된 유청단백가수분해물과 alkalase와 protamex를 병행하여 처리한 유청단백가수분해물의 경우 강한 쓴 맛이 있어 기호도가 낮았으나, 마스킹 소재인 사이클로덱스트린 시럽을 처방한 결과 유청단백가수분해물의 쓴 맛을 크게 개선시킬 수 있었다.

이러한 결과는, 향후 유기농 유청단백가수분해물의 사업화에 큰 역할을 할 것으로 기대된다.

나) 유기농치즈부산물로부터 분리된 유당으로부터 유기농 갈락토올리고당 개발

본 과제로부터 개발될 갈락토올리고당의 원료인 유기농 유당은 참여기관인 매일유업(주)으로부터 제공 받았으며, 유기농치즈부산물로부터 분리 정제된 원료를 이용하여 50% 유기농 갈락토올리고당을 개발하였다.

당해 목표인 유기농 갈락토올리고당 50%를 개발하기 위하여 먼저, 유기농 유당 분획물의 정제상태를 확인하는 연구를 수행하였고, 수행한 연구내용은 기존 일반 유당(Lactose, extra fine grind edible 5030, Hilmar cheese company INC., USA)과의 비교 테스트를 수행하였으며 순도, 당전이율, 용해도 등을 확인하였으며, 기존 상업적으로 판매되고 있는 타사의 갈락토올리고당 제품 3점을 입수하여, 본 과제로부터 개발된 50% 유기농 갈락토올리고당 과의 당조성, 기호도, 물성Test 등을 수행하였다.

갈락토올리고당 당전이에 사용된 효소의 선정은, 현재 시판 중인 여러 종류의 상업 효소(β -galactosidase)를 대상으로 1) 국내 법규에 적합한 기원(식용 가능한 균주로부터 기원한 효소인가: origin)을 가지며, 2) 갈락토올리고당의 전환수율(conversion yield)이 가장 우수한 효소를 탐색하여 안정적인 효소수급 방안을 마련하고자 하여 연구를 진행했다.

선정된 효소의 최적 반응조건을 수립하기 위해, 실제 공정에서 가장 중요한 변수인 기질농도, 반응온도, 반응 pH 등을 기준으로 효소 반응조건을 확립하였다.

주관기관인 (주)네오크레마는 발효를 통한 갈락토올리고당의 고순도화에 대한 제법기술 및 이에 대한 지식재산권을 보유하고 있으며, 이 기술을 활용해 유기농 갈락토올리고당에도 접목시킨 연구를 추진하고자한다.

유기농 갈락토올리고당은 유기농 소재 특유의 색상, 성상이 있어, 기존 무색투명한 당액을 원하는 고객사의 성향을 고려하여, 본과제를 통해 개발될 유기농 갈락토올리고당의 탈색, 여과, 정제공정 등을 확립하고자 하며, 본 연구의 수행은 기존 전분당 업계에서 통용되는 공정을 참고하여 수행하였다.

(1) 순도 50% 이상의 유기농 갈락토올리고당 개발

(가) 매일유업(주)으로부터 제공 받은 유당의 원료 적합성 테스트

- 기존 갈락토올리고당 제조 시 사용 유당 (Lactose, 100%, extrafine grind edible 5030, hilmar cheese company INC., USA)과 비교 형식으로 진행하였으며, 테스트 항목은 색상, 입도테스트, 유당 용해능, 함량 등을 확인하였다.

① 색상 비교

표 20 유기농유당과 유당의 성상비교

구분	기존 유당	유기농 유당
성상1		
성상2 (냄새)	밝은 유백색 특유의 향	밝은 유백색 기존 유당과 비슷한 특유의 향
촉감	매우 고운 입자이며, 손가락으로 비볐을 때 거친 입자가 만져 지나 풀어진다.	약간 거친 입자이다.
용해도 차이 (50%(w/w) 투입, 80°C 열수, 1시간)	잘 녹으며, 특유의 노란 액상을 띤다.	기존 대비 잘 녹으며, 특유의 노란 액상을 띤다.
관능도 (2% 용액)	특유의 우유맛이 난다.	기존 대비 유사한 우유맛 난다.

② 입도 비교

표준체법은 구멍의 크기가 큰 것을 위에 놓고 순차적으로 작은 것을 아래에 배열하고 맨 위에 입자를 넣고 일정시간(10분) 동안 진탕하여 각각의 체에 남아있는 시료의 중량을 측정하는 방법이며, 이 방법은 간편하고, 단시간에 측정할 수 있는 장점이 있지만 입자가 뭉치거나 구멍을 막아서 체를 통과하지 못할 경우 오차를 초래할 수 있다.

표준체를 이용한 입도분포는 Nishita와 Bean의 방법에 따라 유당 100g을 20, 60, 80, 100, 120, 200mesh(0.84, 0.25, 0.177, 0.149, 0.125, 0.074mm)의 표준망체에 넣고 sieve shaker()를 이용하여 10분 간 진동한 후 각 표준망체에 잔류된 유당분말의 중량을 측정하여 입도 분포로 한다.



그림 77 sieve shaker

표 21 유당 및 유기농유당의 Mesh Size 별 통과정도

	Mesh size ^B						
	+20 ^C (0.84mm)	+60 (0.25mm)	+80 (0.177mm)	+100 (0.149mm)	+120 (0.125mm)	+200 (0.074mm)	-200 ^D (≤0.074mm)
기존유당	0	9.8	0.83	0.86	1.30	21.02	75.01
유기농 유당	0	4.4	18.81	15.21	4.09	13.72	43.77

표준체를 이용하여 측정한 입자 분포에서는 유기농 유당이 기존 유당에 비해 입도가 큰 경향을 나타내는 것으로 확인되었으며, 기존 유당 대비 유기농유당은 0.074mm 이상의 큰 입자가 더 많이 존재하는 것으로 나타난다.

- A) 10 분간 체질했을 때
- B) 2차 반복 실험 평균값
- C) + : mesh 통과못함
- D) - : mesh 통과분

③ 유당 용해 테스트

유당은 특유의 유리전이온도(Tg) 및 용해특성으로, 온도변화에 민감하여, 완전히 용해되지 않은 상태에서 과포화 용액에 도달 후 온도가 60℃ 이하로 떨어질 경우 모래알같은 불안정한 질감의 결정화를 유발하게 되므로, 유당 용해 과정은 갈락토올리고당의 제조 시에 중요한 공정이다.

갈락토올리고당 제조 시 유당의 용해는 유당 600-650g에 물 500mL을 가하여 80℃ 수욕 상에서 교반하여 굴절당도계(Refractometer)로 확인하였을 때 최종 50Brix가 될 때까지 교반하며 용해시킨다.

충분히 용해 시킨 후, 1) 육안 상으로 보이는 결정이 없는지와, 2) 용해 시 이물이 없는지 3)색상이 너무 진하여 최종제품에 영향을 미치지 않는지 UV-spectrophotometer를 이용하여 흡광도(A)로서 확인하였다.

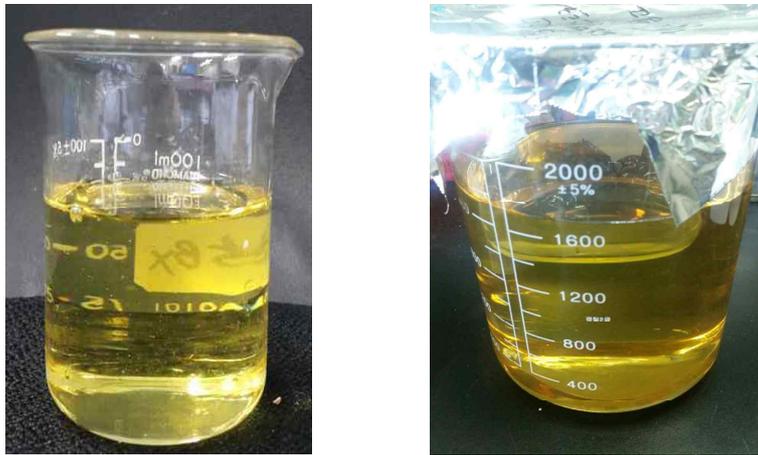


그림 78 (좌) 기존 유당 용해 , (우) 유기농 유당 용해

용해된 유당의 흡광도 특성은 식품공전 중 백/흑설탕 색도분석법을 참고하였으며, 각 유당을 고형분 50Brix로 동일하게 제조한 후, UV spectrophotometer 파장 420nm에서 0.03A 이하가 나오면 갈락토올리고당 제조용 유당으로 적합한 것으로 판정하였다.

Blank 용액은 증류수로 하였으며, 결과는 3회 실험결과의 평균치로 나타낸다.

표 22 기존 유당 대비 유기농 유당의 흡광도 분석 결과

샘플	기존유당	유기농유당
Brix %	50.0	50.0
O.D _{420nm}	0.019	0.025

④ 유당 함량분석

유당 함량 분석은 HPLC system을 이용하여 분석하였으며, 시료는 유당의 용해도 Test 후 냉각 후에 20배 희석한 용액을 0.22 μm syringe filter를 통과한 용액을 HPLC 분석용으로 사용하였다.

정량분석에 사용된 Lactose 표준품은 Sigma aldrich Korea에서 구매하였으며, HPLC 분석 조건은 아래 표와 같다.

표 23 HPLC 분석조건

HPLC-RID (Refractive Index detector)	
Column	YMC Polyamine II
Mobile phase	Acetonitrile 64%
Flow rate	1.0mL/min
Column Temperature	30°C
Detector Temperature	45°C
Pressure	Less than 1500 psi
Injection volume	20 μL

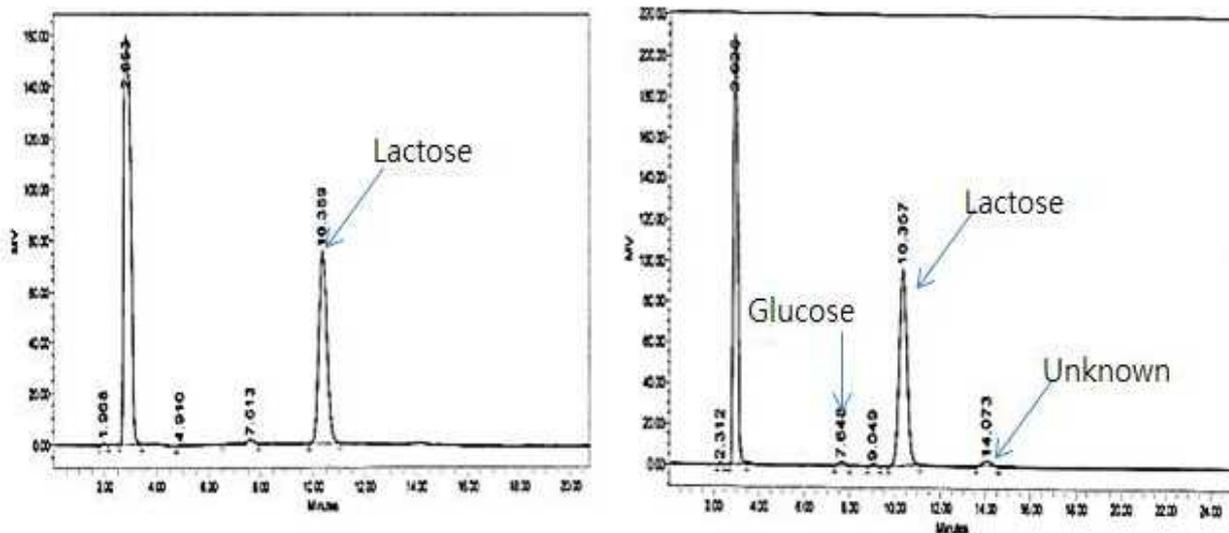


그림 79 유당 함량분석결과 (좌) 기준 유당, (우) 유기농 유당

유당 함량 정량 분석 결과, 기준 유당은 Lactose 100% 로 구성되어 있었으며, 유기농 유당의 경우 Lactose 96.2%에 Glucose 2.1%, 우유로부터 유래된 것으로 추정되는 미지 피크 1.7%가 있는 것으로 확인되었다.

앞선 성장, 입도테스트, 용해도 테스트 결과와 더불어 기존 유당은 extrapure(Purity 100%)급이었음을 고려하였을 때, 유기농 유당의 함량이 갈락토올리고당의 원료로서 충분히 적합한 것으로 판정되었다.

(나) 효소의 선정 및 반응조건 수립

본 실험에 사용된 유기농 유당은 매일유업(주)로부터 제공받은 유기농치즈부산물로부터 분리된 유당이며, 효소 전환을 비교를 위해 시판 유당 (Lactose, extrafine grind edible 5030, hilmar cheese company INC., USA)도 포함하여 연구를 수행하였다.

■ 실험방법

GOS 전환 효소 선정을 위해 LacT, Maxilactg LX 5000, Maxilact LG 5000, Maxilact LGi5000, Maxilact A4, Amano F 등을 시약재료 판매상으로부터 구입하여 사용하였으며, 사용한 효소들의 특징 및 최적반응조건은 다음과 같다.

표 24 β -Galactosidase 계 상업효소 기원 별 효소활성 특성

Enzyme	Main activity	Source	Optimum condition	
			pH	Temp (°C)
LacT		<i>B. circulans</i>	6.0-6.5	55-60
Maxilact LX5000		<i>K. lactis</i>	6.8	40-50
Maxilact LG5000	β -galactosidase	<i>K. lactis</i>	6.8	40-50
Maxilact LGi5000		<i>K. lactis</i>	6.8	40-50
Maxilact A4		<i>K. lactis</i>	6.8	40-50
Amano F		<i>A. oryzae</i>	4.5	45-55

표 25 효소들의 특성

	<i>K.lactis</i>	<i>B. circulans</i>	<i>A. oryzae</i>
Commercial name	Lactozym pure	Biolactase	Lactase F
Optimum temperature	40-50	30-50	45-55
Optimum pH	6.8	5.5	4.5
Activity	1320U/mL	550U/mL	93U/mL

유당으로부터 갈락토올리고당을 만들기 위한 효소반응은 유당 600-650g에 2차 증류수 500mL을 가하여 75°C 수욕 상에서 교반하여 굴절당도계(Refractometer) 로 재었을 때 최종 45~50° brix가 될 때까지 용해한다.

품온을 60°C로 냉각시키고, 0.1M HCl 또는 0.1M NaOH로 pH를 6.5로 맞춘 다음, LacT 효소를 유당 투입량 대비 0.08%(w/w)를 유당용액 일부에 풀어 pre-activation시킨 다음 전체 용액에 투입한다.

반응 플라스크는 60°C 항온수조에서 시간 별 효소반응을 체크하였으며, 샘플링 시마다 100°C에서 15분 동안 열처리를 하여 효소활성을 실패시켰으며, 6,000 rpm에서 원심분리한 상등액을 취하여 20배 희석 후 갈락토올리고당의 전환율을 확인하기 위한 HPLC 분석용으로 사용하였다.

다른 효소들의 경우, 최적 온도와 pH에 맞추어 효소반응을 진행하였고, 각 효소반응 후의 GOS 전환율을 확인하기 위한 HPLC 분석 조건은 아래와 같이 한다.

표 26 HPLC 분석 조건

HPLC-RID (Refractive Index detector)	
Column	YMC Polyamine II
Mobile phase	Acetonitrile 64%
Flow rate	1.0mL/min
Column Temperature	30°C
Detector Temperature	45°C
Pressure	Less than 1500 psi
Injection volume	20 μ L

(다) 효소 종류 별 GOS 전환 수율(%) 비교

효소 종류 별 GOS 전환수율을 비교한 결과는 아래 표와 같으며, 아래의 결과는 3회 반복실험의 평균 함량 값을 사용한다.

효소처리에 의해 전환된 갈락토올리고당의 HPLC 크로마토그램은 아래의 그림과 같은 양상을 나타냈고, 전환율 계산방식은 유당이 β -galactosidase에 의해 전환된 모든 당류를 갈락토올리고당으로 계산하였으며 표준품을 이용한 정량분석을 통해 재확인을 실시하였다.

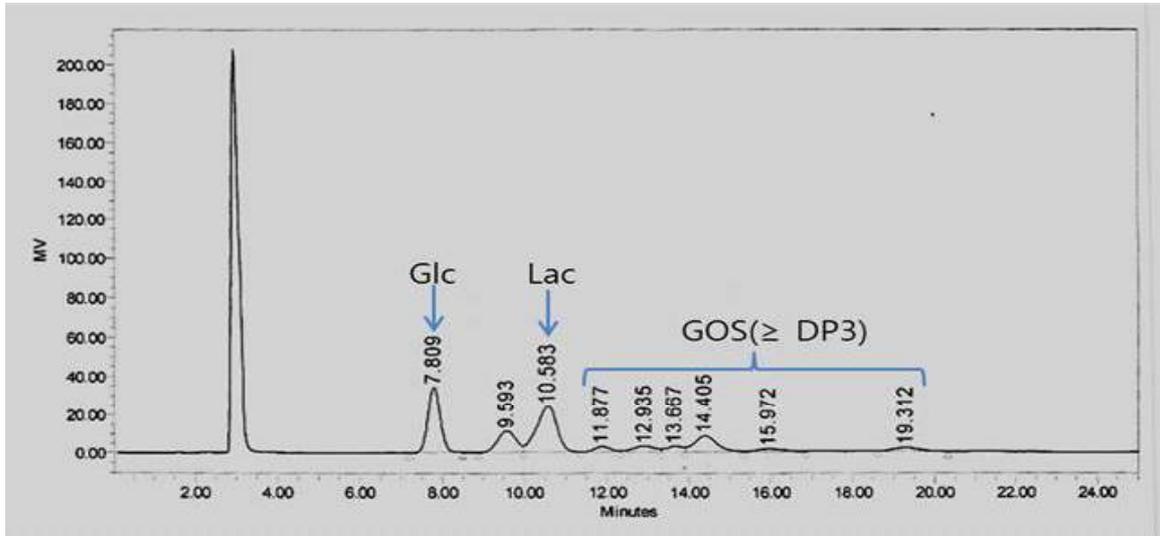


그림 80 유당에 효소처리 후 전환된 갈락토올리고당 HPLC chromatogram

표 27 효소 종류 별 GOS 전환율(%) 분석 결과

항목구분	Lac T	Maxilact LX5000	Maxilact LG5000	Maxilact LGi5000	Maxilact A4	Diazyme Y50L
효소현황	국내업체	해외 시판	해외 시판	해외 시판	해외 시판	해외 시판
제조국가	한국	덴마크	덴마크	덴마크	덴마크	덴마크
효소반응 후 당조성 (%) (24시간 반응)						
Glc+Gal	27.0	40.0	53.0	45.0	20.0	25.0
Allolactose	20.0	25.0	22.0	25.0	15.0	20.0
Lactose	22.0	18.0	15.0	20.0	35.0	40.0
Galactosyllactose (DP3)	27.0	16.0	10.0	9.0	20.0	14.0
Tetrasaccharides (≥DP4)	4.0	1.0	0.0	1.0	10.0	1.0
Total GOS	51.0	48.0	32.0	35.0	45.0	35.0

7개의 효소들 중 LacT 효소가 가장 우수한 전환율을 나타내었으며, 다음으로 Maxilact LX5000, Maxilact A4 등의 효소들의 전환율이 우수하였고, 1차 선발된 이들 3가지 효소를 반응시간 별, 농도 별 조건으로 2차 전환율 실험을 수행하였다.

각 효소 별 반응 최적 조건은 기존 효소 공급사가 제공한 정보에 따라, 아래표를 반영하여 설정하였으며, 기질반응 농도는 유당용액을 굴절당도계(Refractometer)로 재었을 때, 50.0 ° Brix(고형분의미)가 되도록 조정하여 사용하였다.

반응액의 pH는 각 효소들의 최적조건에 0.1M HCl 또는 0.1M NaOH를 이용하여 맞추었으며, 각 효소는 사용 전 5000 Unit/mL 으로 동일한 activity로 희석하여 보관하고, 유당 투입량 대비 0.1%(w/w), 0.125%(w/w)를 유당 용액 일부에 풀어 pre-activation 시킨 다음 전체 유당용액에 투입하였다.

반응 플라스크는 각 최적 온도 별 항온수조에서 14시간, 24시간 후 효소반응을 체크하였으며, 샘플링 시 마다 100°C에서 15분간 열처리 하여 효소활성을 실패시킨 후 6,000 rpm에서 원심분리를 수행하고, 상등액을 취하여 20배 희석 후 갈락토올리고당의 전환율을 확인하였고, 분석은 HPLC를 이용한다.

(라) 효소 최적 반응시간 및 갈락토올리고당 전환율(%) 확인결과

표 28 유기농갈락토올리고당 제조효소 반응시간 별, 농도 별 전환율, 생산수율 결과

반응종류	LacT (0.1%)		LacT (0.125%)		Maxilact LX5000 (0.1%)		Maxilact LX5000 (0.125%)		Maxilact A4 (0.1%)		Maxilact A4 (0.125%)	
	50.0 Bx		50.0 Bx		50.0 Bx		50.0 Bx		50.0 Bx		50.0 Bx	
	14hr	24hr	14hr	24hr	14hr	24hr	14hr	24hr	14hr	24hr	14hr	24hr
Glucose + Galactose	16.8	18.7	8.8	15.0	21.1	34.3	24.9	25.3	16.9	17.7	20.2	18.1
Allolactose	23.3	19.7	19.6	17.8	23.3	19.2	28.0	29.7	23.7	21.7	24.8	25.3
Lactose	30.1	23.0	31.8	31.7	27.8	26.2	25.1	24.1	29.4	25.4	30.2	27.3
Total GLs	32.6	39.5	34.7	32.0	18.3	19.5	20.2	18.3	26.3	31.8	22.3	27.5
Tetrasaccharides(≥ DP4)	3.3	4.1	5.2	3.5	0	0.8	1.8	2.6	3.7	3.5	2.5	1.8
Total GOS (%)	53.1	58.3	59.5	53.3	51.1	39.5	50.0	50.6	53.7	57.0	49.6	54.6
생산수율	122%		113%		90.6%		101%		111%		104%	

표 29 HPLC 분석조건

HPLC-RID (Refractive Index detector)	
Column	YMC Polyamine II
Mobile phase	Acetonitrile 64%
Flow rate	1.0mL/min
Column Temperature	30°C
Detector Temperature	45°C
Pressure	Less than 1500 psi
Injection volume	20 μL

3가지 효소 중 1) LacT 2) 0.1% 투입, 3) 24시간 반응시켰을 때 전환된 갈락토올리고당의 함량이 63.3%로 가장 높은 결과를 나타낸다.

갈락토올리고당 성분 중 가장 생리활성이 우수한 성분으로 알려져 있는 3당류인 Galactosyllactose 함량이 39.5%로 월등히 높게 전환된 것을 확인 할 수 있었다.

최적인 갈락토올리고당 제조효소는 LacT 효소로 선정하였으며, 이는 유기농 갈락토올리고당의 전환율(생산수율), 효소의 가격경쟁력, 효소 국내 수급 사정 등을 고려한 결과이며, 본과제의 당해 목표인 유기농갈락토올리고당 순도 50%의 제조 효소로 가장 적합하다고 판단되었다.

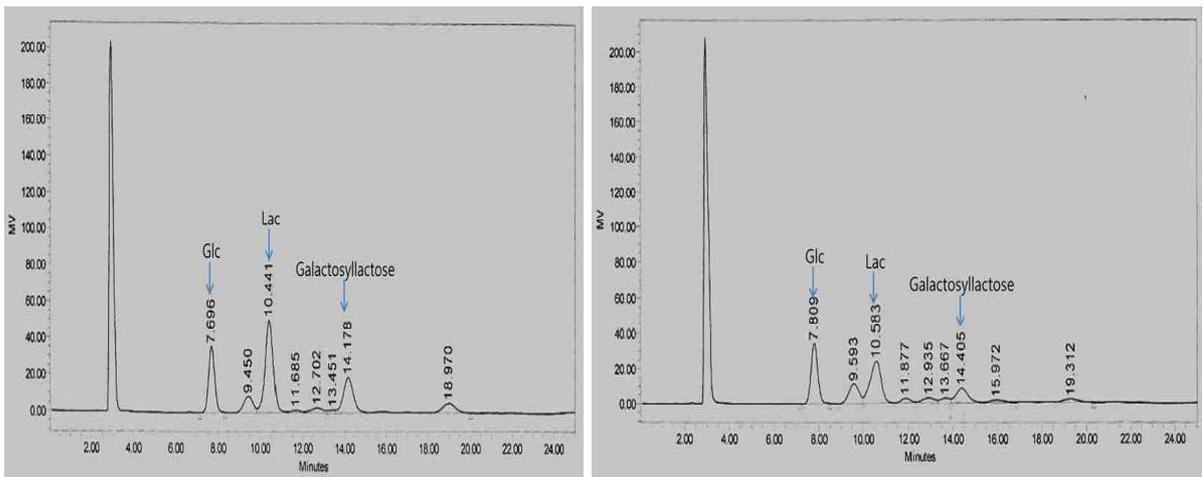


그림 81 LacT 0.1% 투입 반응 14시간 후(좌), 24시간 후(우) HPLC 크로마토그램

(마) 50% 유기농 갈락토올리고당 시험생산

유기농치즈부산물로부터 분리한 유당은 매일유업(주)로부터 300kg을 제공 받아 (주)네오크레마 장성공장에서 1차 시험생산을 수행하였으며, 당 정량분석 결과 및 HPLC 크

로마토그램은 아래와 같다.

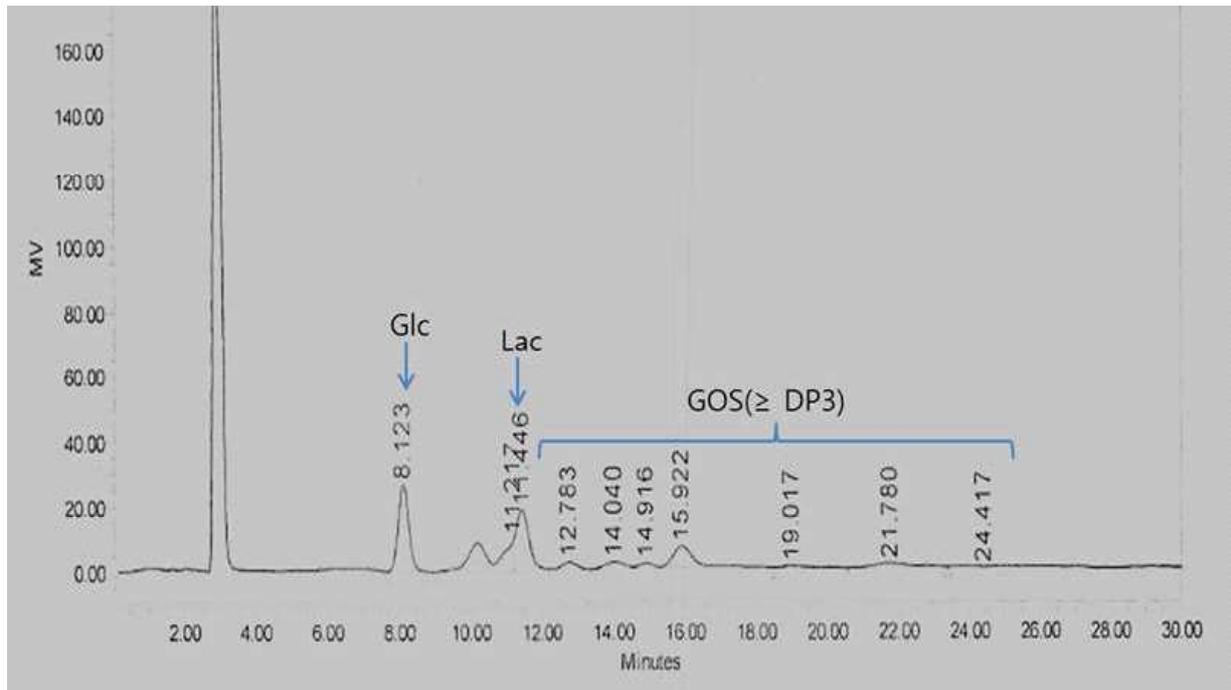
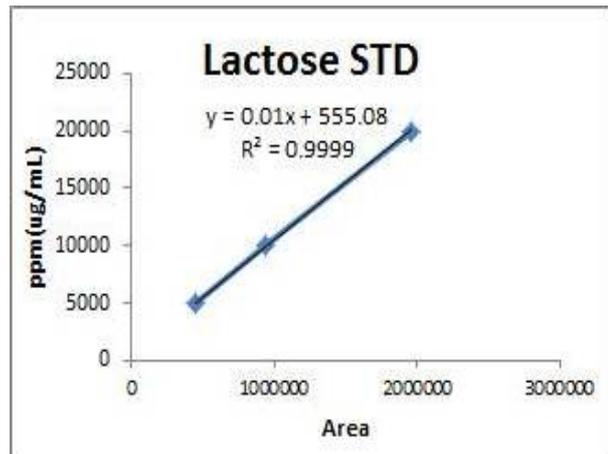
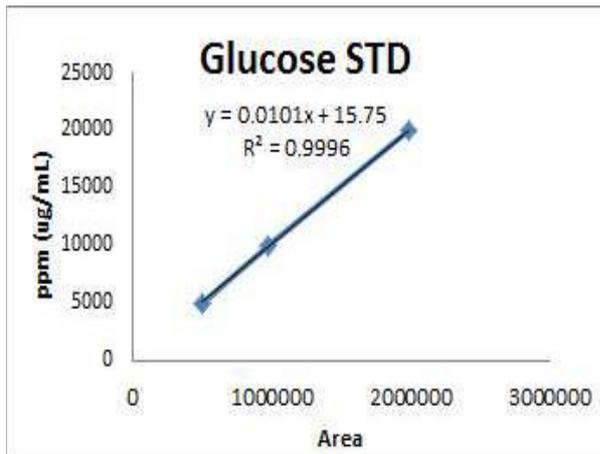


그림 82 50% 유기농 갈락토올리고당 시험 생산 결과



Glucose STD		Lactose STD	
PPM ($\mu\text{g/mL}$)	Area	PPM ($\mu\text{g/mL}$)	Area
5000	505850	5000	452802
10000	970855	10000	938979
20000	1984661	20000	1955788

그림 83 유기농 갈락토올리고당 생산 당분석 결과-HPLC 크로마토그램 및 정량데이터

표 30 유기농 갈락토올리고당 생산 당분석 결과

	Sample	Sample Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Area	Expected Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Contents (%)
Lactose (%)			468960	5244.68	21.78
Glucose (%)	유기농 갈락토올리고당	24080	540107	5416.82	22.50
Total GOS (%)				55.72	



그림 84 순도 50% 유기농 갈락토올리고당의 시생산 사진

표 31 유기농 갈락토올리고당 시험생산 결과

항목	생산결과	비고
생산원료	유기농 유당	
제품생산량 (kg)	216kg	1) 원료 (유당) 사용량 : 300kg 2) 제품생산량 : 약 216kg 3) 생산수율 : 72%
제품색상 (육안관찰)	약간의 미황색	4) 생산방법 :
고형분 (DB%)	78.5	
생산수율 (%)	72%	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; text-align: center;">유당용해</div> <p style="text-align: center;">↓</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; text-align: center;">효소반응</div> <p style="text-align: center;">↓</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; text-align: center;">여과/ 농축</div> <p style="text-align: center;">↓ 75 Brix</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; text-align: center;">포장 및 제품</div>
GOS 함량 (%)	55.72%	
포장단위 (Tin can)	24 kg	



유기농유당



유기농 GOS 시제품



유기농 GOS 시제품

(바) 50% 유기농 갈락토올리고당 생산 최종 공정 수립(SOP 설정)

앞서 수립된 효소반응 최적 조건을 이용하여, 유기농 갈락토올리고당 순도 50% 제조 및 산업화를 위한 대량생산공정을 수립했다.

타사의 경우, 유기농 소재의 갈락토올리고당을 제조하는 곳이 전무하다시피 할 뿐만 아니라, 갈락토올리고당의 경우 성분 중 생리기능성이 우수한 성분인 Galactosyllactose를 함유하고 있어 (주)네오크레마는 순도 50% 유기농 갈락토올리고당의 사업화 및 갈락토올리고당의 고급화 및 희소적 가치가 있을 것으로 판단하였다.

유기농 갈락토올리고당의 공정설계는 네오크레마 연구소 실험실에서 1차 Lab test (1kg)한 조건을 토대로 (주)네오크레마 장성공장에서 2차 pilot test (20kg) 후에 공장 생산환경에 맞추어 재설계 되었다.

공정 순서는 유당용해→ 당액온도 및 pH 조정→ 효소분해→ 당액여과→ 농축→ 제품 으로 결정하였고, 이온정제 및 탈색 등의 공정 추가는 추후 진행하기로 계획하였으며, 당사 장성공장의 생산환경에 맞게 최종 설계된 유기농 갈락토올리고당의 제조공정도는 아래와 같으며, 최종 확립했다.



그림 85 유기농갈락토올리고당 제조공정도

<p style="text-align: center;">  네이처스 GOS (유기농 갈락토올리고당) 생산 작업 표준서 2015.07 네오크레마 연구개발부  </p>	<p style="text-align: right;">생산작업표준서 - 신규제정</p> <p style="text-align: center;">생 산 작 업 표 준</p> <p>1. 적용범위 본 생산작업 표준서 '네이처스GOS (유기농 갈락토올리고당) 제품생산에 대해 적용된다.</p> <p>2. 작업기준</p> <p>1) 유당용액 공정 유당을 농정수(또는 이온교환수(RO수))로 희석시키는 공정으로서, 밀정량의 물수(70~80℃)를 반응탱크에 투입한 다음, 교반기를 작동하면서 유당을 반응탱크에 투입하여 유당을 완전히 용해시킨다.</p> <p>※ 유당용액 농도는 40~45Bx 범위내로 들어오도록 제어하는데, 예를들면 5분짜리 반응탱크를 사용할 경우에는 5분의 유당용 8분의 물수에 적으면 유당용액의 농도는 40~45Bx 범위내로 들어오게 된다.</p> <p>유당용액의 온도는 60~65℃가 적도록 냉각수 또는 물수를 사용하여 당액온도를 조정한다.</p> <p>2) pH조정 공정 유당을 완전히 용해시킨 다음에 당액의 pH가 pH 6.0~6.5 범위내에 들어올 수 있도록 가소소다(NaOH) 또는 염산(HCl)을 사용하여 pH를 조정한다.</p> <p>3) 효소투입 공정 반응탱크의 유당용액의 온도와 pH가 범위내에 들어오도록 조치를 취한 다음, 교반기를 작동하면서 물리교당 제조효소(분말형태)를 투입한다.</p> <p>제조효소는 당액 고형분 대비 0.1%(w/w)를 계량한 다음, 반응탱크에 투입하는데, 효소첨가가 끝났기 때문에 효소를 직접 반응탱크에 투입하지 않고 효소를 소량의 물이나 유당용액으로 희석시킨 다음에 반응탱크에 투입한다.(분말효소를 반응탱크에 직접 투입할 경우, 비산에 의해 효소가 당액에 투입되지 않고 일부는 반응탱크 내벽에 달라붙는 문제가 발생할 수 있기 때문에 반드시 효소를 용해시킨 다음에 반응탱크에 투입한다.)</p>
<p style="text-align: right;">생산작업표준서 - 신규제정</p> <p>※ 효소 계량방법 유당 사용량이 5톤일 경우, 효소 계량식은 아래와 같다. (이때 유당용액 농도는 반드시 40~45Bx 범위내에 있어야 한다)</p> <p>효소투입량이 0.2%일 경우 : 5,000kg × 0.002 = 10kg 효소 효소투입량이 0.3%일 경우 : 5,000kg × 0.003 = 15kg 효소</p> <p>4) 효소반응 공정 유당용액에 밀정량의 효소를 계량한 다음, 효소를 소량의 물이나 당액에 용해시킨 다음, 효소를 반응탱크에 투입한 다음, 효소반응을 진행한다. 효소반응 동안에 교반기는 10분/시각 씩 작동될 수 있도록 교반기 작동시간을 입력한다.</p> <p>※ 효소반응 시간은 24~48시간이며, 효소반응 중단시간은 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 당분석을 실시하여, 전체 올리고당 함량이 약 50~55%(DB%)가 되면 효소반응을 중단한다.</p> <p>효소반응 중단은 반응탱크의 당액온도를 승온시켜 효소불활(inactivation)을 유도하는 것이 아니라, 반응온도를 30~35℃로 낮춰서 효소반응이 더디게 진행시켜서 반응을 중단시킨다.</p> <p>5) 탈액/여과공정 (필요 시) 효소반응이 완료되면 반응탱크에 분말활성탄을 투입하여 당액의 미미, 이취 및 색상불균을 제거한다.(탈색공정) 탈색조리는 반응탱크의 당액온도가 70~75℃ 적도록 물수를 투입/순환시켜 반응탱크 온도를 상승시킨다. 탈색용액이 순환되면, 여기에 분말탄을 당액고형분(무수물 기준) 대비 0.5~1.0%(w/w)를 투입한다. 분말활성탄을 투입한 후, 교반기를 작동시켜 30분 동안 교반한다. 탈색공정이 끝나면 활성탄이 순환된 당액을 필터프레스로 여과하여 당액내 분말활성탄을 제거시킨다. 활성탄, 필터프레스에는 규조토로 코팅시킨 여과 플러이브를 사용하여 당액을 여과한다.</p>	<p style="text-align: right;">생산작업표준서 - 신규제정</p> <p>(비라리브를 여과조제도 사용하지 않 것 -> 미세 분말탄의 경우, 여과제 동력)</p> <p>6) 농축공정 이온교환수처리 처리한 당액은 농축기로 이송하여 원하는 농도로 당액을 농축시킨다.</p> <p>7) 포장공정 농축기로 농축한 당액은 제품 저장탱크로 이송하거나 농축기로부터 직접 당액을 포장용기에 투입한다.(캔포장/병포장)</p>

그림 86 최종 확립된 유기농 갈락토올리고당-네이처스 GOS 생산작업표준서

(사) 타사 갈락토올리고당 품질비교 테스트

전 세계적으로 갈락토올리고당의 주요 제조국은 크게는 일본과 유럽으로 양분화되어 있으며, 일본업체 3곳(Yakult Pharmaceutical industry, Nisshin Sugar manufacturing 등) 과 네덜란드 업체 1곳(Borculo Domo ingredients)이며, 특히 일본의 경우, 450 가지가 넘는 제품군에 다양하게 적용하는 등 갈락토올리고당 시장을 이끌고 있다.

세계 갈락토올리고당 제조업체 중 주요 업체는 아래의 표와 같으며, 본 연구에서는 타사 갈락토올리고당 3점을 입수하여 개발 중인 유기농 갈락토올리고당과의 성상, 함량 테스트 등을 수행 하였다.

표 36 세계 갈락토올리고당 주요 제조업체 리스트

Product	Oligosaccharide content	Enzyme source	Manufacturer
Oligomate 55 (Syrup)	> 55% solids	<i>A. oryzae</i> and <i>S. thermophilus</i>	Yakult Pharmaceutical Industry Co. Ltd. (Japan)
Oligomate 55P (Powder)	> 55%		
TOS-100 (Powder)	> 99%		
Cup-Oligo H-70 (Syrup)	75% solids	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Nissin Sugar Manufacturing Co. Ltd. (Japan)
Cup-Oligo P (Powder)	70%		
Vivinal Gos (Syrup)	73%	<i>Bacillus circulans</i>	Friesland Foods Domo (Zwolle, The Netherlands)
Bimuno (powder and syrup)		<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Clasado Ltd. (Milton Keynes, U.K.)
Purimune (powder)		<i>Bacillus circulans</i>	Corn Products Intl., Inc. (Ill., U.S.A.)
Promovita GOS (syrup)	>70% solids Total GOS component: 36.84% dm		First Milk (Paisley, U.K.)

① 성상 테스트

타사와의 비교를 위해 입수한 샘플은 일본 Y사 갈락토올리고당 액상(O*****55), 영국 C사 갈락토올리고당 액상(C* *** syrup), 국내 S사 갈락토올리고당(선****500)이었다.

본 과제를 통해 개발된 유기농 갈락토올리고당은 고순도 제품이 아님을 감안하여, 함량이 비슷한 제품들로 선별하였다.

성상을 확인한 결과는 아래의 그림과 같으며, 각 샘플의 고형분을 함께 표시하였고, 성상 및 색상을 평가 하는데에는 주관적인 요소가 작용하기도 하나, 통상 전분당업계에서 출시하는 정제 올리고당류의 무색, 투명함을 기준으로 하여 서술 평가하였다.

가장 우수한 성상, 색상을 나타낸 1) 일본 Y사의 갈락토올리고당은 매우 투명 무색한 색상을 띄었으며, 그 다음 순으로 2) 국내 S사 갈락토올리고당의 경우, 흐린 연갈 색상을 띄었고, 3) 갈락토올리고당 업계에서 유명한 업체인 영국 C사의 갈락토올리고당의 경우, 매우 노란 성상을 띄어 비교가 불가하였으며, 외관상 품질이 현저히 떨어지는 것으로 평가되었다. 4) 본 과제를 통해 개발된 유기농 갈락토올리고당은 유기농 제품인 점에 부각하여 탈색, 여과 처리를 하지 않아 유당의 카라멜화(Caramelization)에 의해 갈변된 색상이 그대로 남아, 타사 갈락토올리고당에 비해 다소 진한 황색의 성상을 띄고 있다.

이러한 이유로, 본 과제를 통해 기술개발된 유기농 갈락토올리고당은 ‘유기농’인 점에 집중하고자, 통상 전분당업계에서 사용되는 탈색, 이온정제 과정을 생략하였으나 기존 올리고당 시장의 소비자 정서 및 최종제품에 적용하였을 때 색상에 영향을 미칠 수 있는 점에 대비하여 유기농 갈락토올리고당의 탈색 과정에 대한 랩테스트를 진행하기로 하였다.



그림 87 타사 대비 본 과제를 통해 기술개발된 유기농 갈락토올리고당 정상 테스트

② 함량 분석 결과

각 갈락토올리고당의 함량분석은 HPLC system을 통해 확인하였으며, 20배 희석한 용액을 0.22 μ m syringe filter에 여과된 용액을 HPLC 분석용으로 사용하였다.

표 37 HPLC 분석조건

HPLC-RID (Refractive Index detector)	
Column	YMC Polyamine II
Mobile phase	Acetonitrile 64%
Flow rate	1.0mL/min
Column Temperature	30°C
Detector Temperature	45°C
Pressure	Less than 1500 psi
Injection volume	20 μ L

국내 S사 GOS (편****500)

Lactose (%)	32.27 %
Glucose (%)	14.7 %
Total GOS (%)	53.03 %

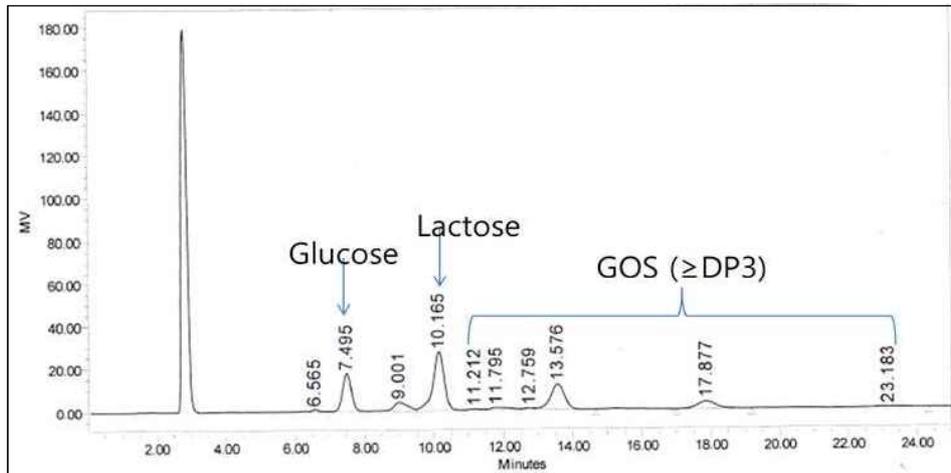


그림 88 국내 S사 GOS (편****500)함량분석결과

일본 Y사 GOS (O*****55)

Lactose (%)	22.56 %
Glucose (%)	28.62 %
Total GOS (%)	51.18 %

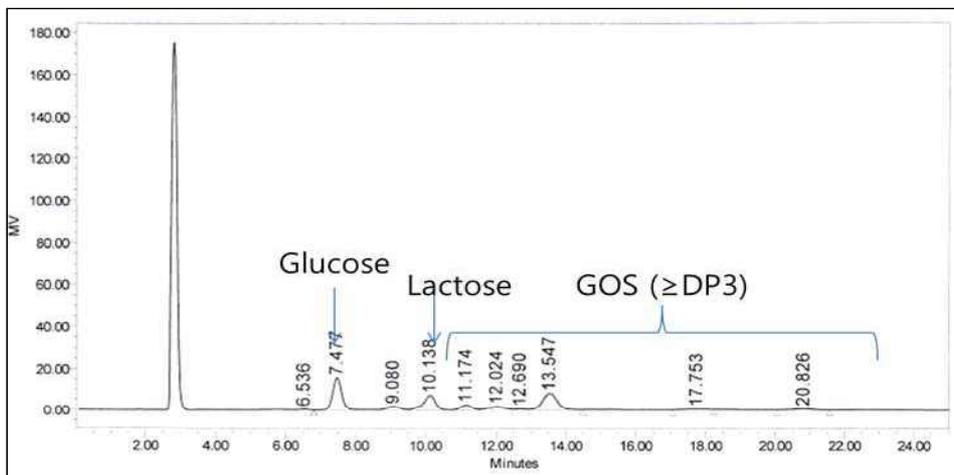


그림 89 일본 Y사 GOS (O*****55) 함량분석결과

영국 C사 GOS (C****)

Lactose (%)	11.68 %
Glucose (%)	32.05 %
Total GOS (%)	56.27 %

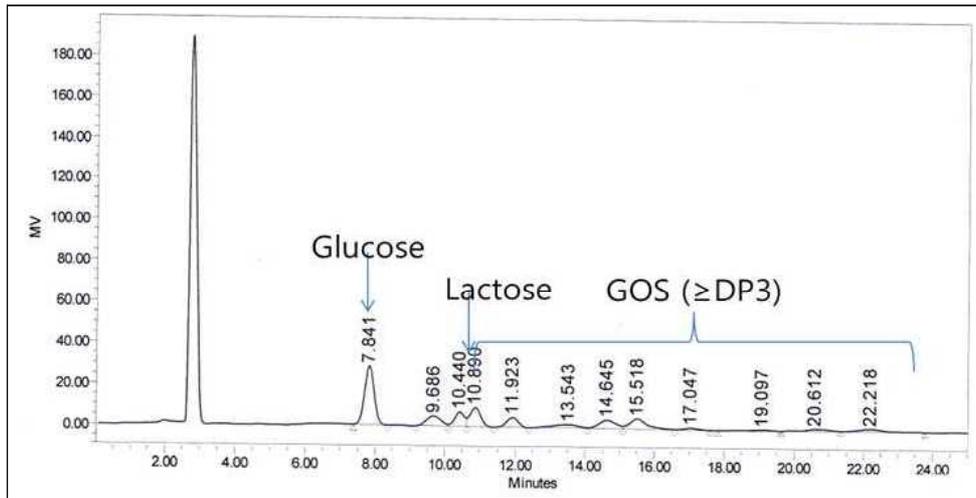


그림 90 일본 Y사 GOS (O*****55) 함량분석결과

개발된 유기농 갈락토올리고당

Lactose (%)	21.78 %
Glucose (%)	22.56 %
Total GOS (%)	55.72 %

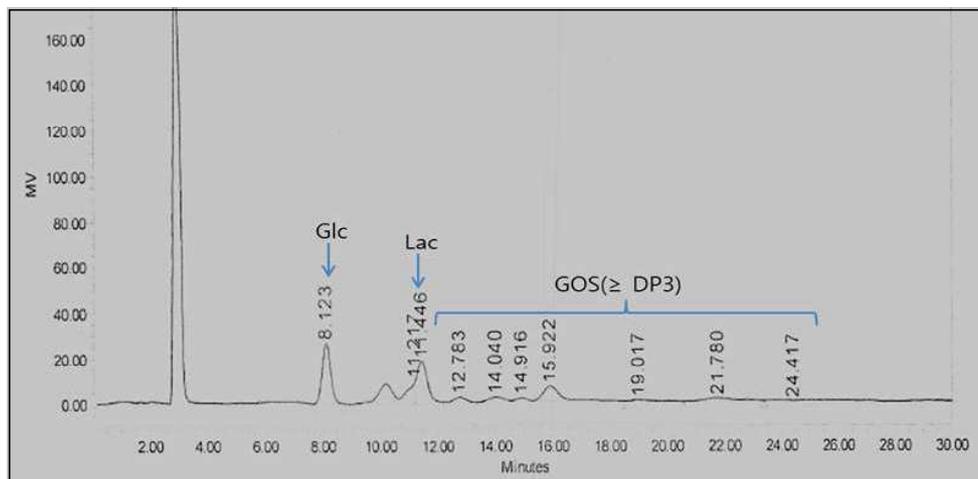


그림 91 개발된 유기농 갈락토올리고당 함량분석결과

함량분석 결과, 영국 C사의 갈락토올리고당이 56.27% 로 가장 높은 함량을 차지하였으며, 미비한 차이로 유기농 갈락토올리고당이 55.72%, 국내 S사 갈락토올리고당 53.03%, 일본 Y사의 갈락토올리고당이 51.18%로 분석되었다.

세부 당조성을 보았을 때, 영국 C사의 경우, 올리고당의 품질을 좌우하는 Glucose 함량(%)-(Glucose 함량이 높을수록 품질 열화가 빨리 발생될 수 있음) 이 매우 높고, 유기농 갈락토올리고당의 경우, 타사 대비 낮은 것으로 보아 당함량 및 당조성이 우수한 것으로 확인되었으며, 또한 Lactose 함량 역시 21.78% 가 나와 다소 까다로운 중국 GB(중국 국가표준규격, 중국의 식품공전 급)의 규격(중국 GB 상 갈락토올리고당의 규격: Lactose 함량 23% 이하)에 충족하여 가장 큰 중국시장을 타겟할 수 있는 가능성을 확보하였다.

본 과제를 통해 개발한 유기농 갈락토올리고당은 고순도 시장이기보다는 “세계 최초 유기농 갈락토올리고당”임에 집중하였으며, 함량 50% 대의 타사 갈락토올리고당과의 세부 당조성 비교 시, 우월한 결과를 나타내어 양 품질의 제품이 개발되었음이 확인될 수 있었다.

(2) 순도 60%이상의 유기농갈락토올리고당(Organic Galactooligosaccharide : GOS) 개발 연구

2차년도 목표인 60% 유기농 갈락토올리고당 개발은 1차년도에 선정된 효소 및 타 효소를 이용하는 방법과 미생물을 이용한 발효(fermentation)를 병행 이용한 방법을 검토하였으며, 이들의 갈락토올리고당 효소적 전환 시 최적 조건 등을 수립하고자 하였다.

세부(주관)기관인 (주)네오크레마는 기존에 발효를 통한 갈락토올리고당의 고순도화에 대한 제법기술 및 이에 대한 지식재산권을 보유하고 있으며, 이 기술을 활용해 유기농 갈락토올리고당의 함량증진을 추진하고자 하였다.

갈락토올리고당 당전이에 사용된 효소(lactase)의 선정은, 1차년과 동일하게 현재 시판 중인 여러 종류의 상업효소(β -galactosidase)를 대상으로 1) 국내 법규에 적합한 기원(식용 가능한 균주로부터 기원한 효소인가: origin)을 가지며, 2) 갈락토올리고당의 전환수율 (conversion yield)이 가장 우수한 효소를 탐색하여 안정적인 효소수급 방안을 마련하고자 하여 연구를 수행했다.

또한 발효를 하여 함량증진을 할 경우, 1) 최적 발효조건의 수립은 물론 2) 생성되는 특유의 발효취, 3) 관능상의 변화, 4) 성장 변화 등을 개선하기 위한 연구를 수행하였다.

이렇게 선정된 효소전환/발효공정의 최적 반응 조건을 수립하기 위해, 실제 공정에서 가장 중요한 변수인 기질농도, 반응온도, 반응 pH 등을 기준으로 최적 조건을 확립하였다.

1차년도에 개발된 유기농 갈락토올리고당(순도 50%)의 성공적인 사업화 결과를 바탕으로, 2차년도 목표인 순도 60%이상의 유기농 갈락토올리고당의 개발을 위해안정적인

수급과 가격적 측면에서 우수한 유기농 유당 여러 제품을 선별하여 원료테스트(성상, 순도, 당전이율, 용해도, 최종 제품 시 성상 등)를 실시하였다.

(가) 유기농유당으로부터 효소 및 효모반응을 이용한 최적반응 조건 개발

① 효소를 이용한 최적반응조건 개발

1차년도에 개발된 50% 유기농 갈락토올리고당의 개발을 위해 선정된 효소인 LacT를 이용하여 락토우스에서 갈락토올리고당으로의 전환이 최대 58%까지 되는 것을 확인하였으며, 이를 토대로 60% 갈락토올리고당 개발을 위하여 1) 미전환 유당을 분해하는 효소인 Lactase를 추가 투입하여 함량증진을 하는 방법과 2) 효모를 이용하여 갈락토올리고당 내 글루코스를 제거하여 함량의 증진연구를 수행하는 방법을 검토하였다.

■ Lactase 추가투입을 활용한 순도 60% 유기농GOS 개발

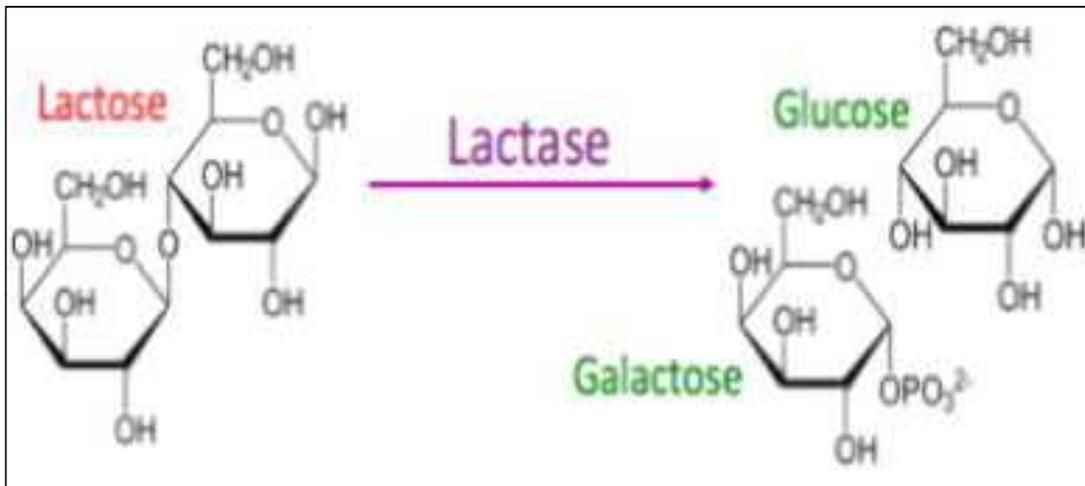


그림 92 Lactase의 작용 기작

■ 실험방법

60% 순도 유기농 갈락토올리고당 개발을 위해 검토된 Lactase 들은 다양한 경로를 통하여 구매하였으며, 사용한 효소들의 특징 및 최적반응조건은 다음과 같다.

표 38 Lactase 상업효소 기원 별 효소활성 특성

Enzyme	Main activity	Source	Optimum condition	
			pH	Temp (°C)
Fungal LacT		<i>A. oryzae</i>	5.5	60
Maxi LacT5000	Lactase	<i>A. oryzae</i>	5.8	55
AmanLacTF		<i>B. circulans</i>	6.0	60

LacT NL	<i>A. niger</i>	5.5	60
LacT NL 2.5X	<i>B. licheniformis</i>	6.2	55
Geno LacT	<i>A. niger</i>	5.5	55

유당으로부터 갈락토올리고당을 만들기 위한 효소반응은 유당 600-650g에 2차 증류수 500mL을 가하고, 75°C 수욕 상에서 교반하여 굴절당도계(Refractometer) 로 재측정하였을 때 최종 45~50 Brix가 될 때까지 용해한다.

용해된 당액의 품온을 60°C로 냉각시킨 다음, LacT 효소를 유당 투입량 대비 0.08%(w/w)를 유당 용액에 투입하였으며, LacT 효소 반응 중인 반응액의 온도를 각 제조사별 Lactase의 반응온도 조건들에 맞춘 다음, 유당 투입량 대비 0.1%~0.5%(w/w)를 반응용액에 투입하였다.

각 효소들의 최적 반응온도 조건은, 효소 공급사가 제공한 정보에 따라, 표 1과 같이 설정하였으며, 효소 반응에 적합한 기질 농도는 50.0 Brix가 되도록 조정하여 사용한다.

반응액 내 갈락토올리고당 함량분석은 반응액 샘플을 100°C에서 15분 동안 열처리를 통하여 효소 활성을 실활 시키고, 반응액 샘플 내 갈락토올리고당 함량분석을 위하여 6,000rpm, 15min 의 조건으로 실활 된 효소를 제거하고, 20배 희석 후 0.2um syringe filter 여과하여 HPLC 분석을 진행하였으며, 각 효소 반응 후의 GOS 전환율을 확인하기 위한 HPLC 분석조건은 다음과 같다.

표 39 HPLC 분석 조건

HPLC-RID (Refractive Index detector)	
Column	YMC Polyamine II
Mobile phase	Acetonitrile 64%
Flow rate	1.0mL/min
Column Temperature	30°C
Detector Temperature	45°C
Pressure	Less than 1500 psi
Injection volume	20 μL

■ 실험결과

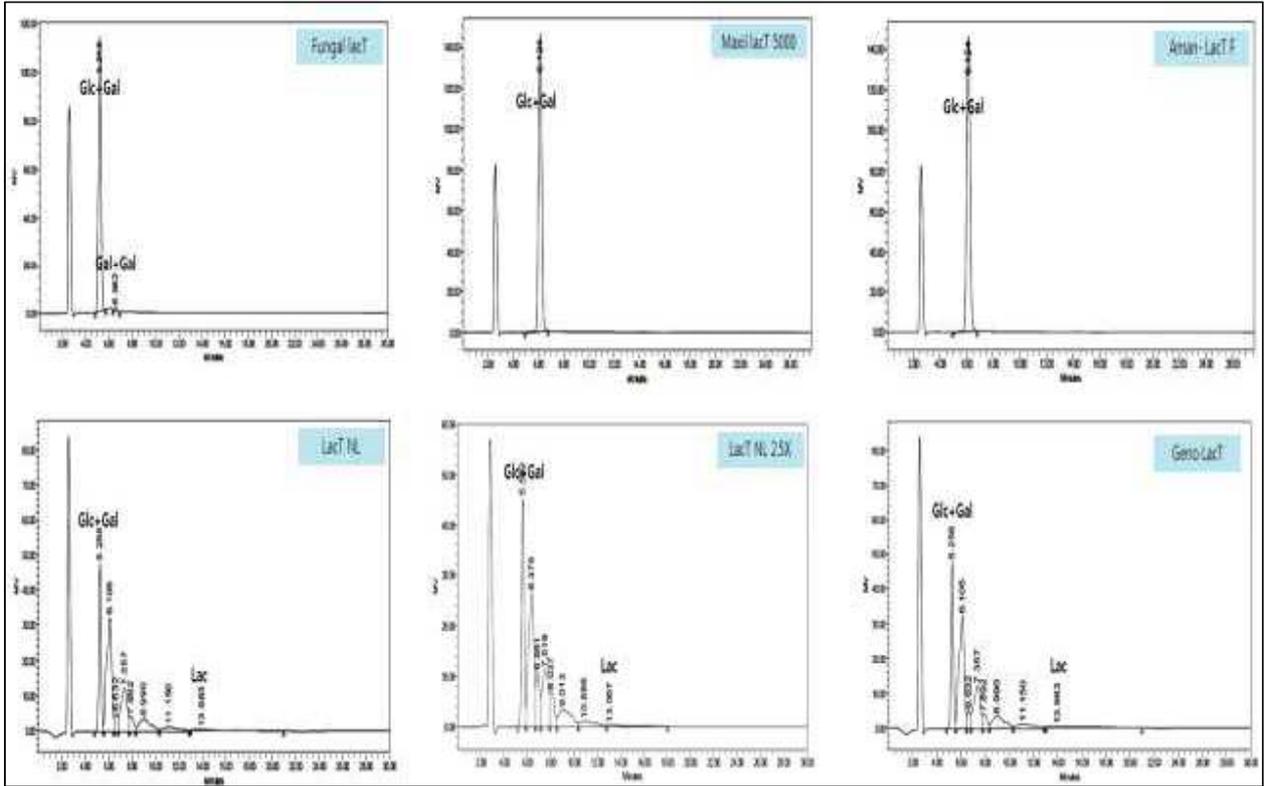


그림 93 시판 Lactase 6종을 이용한 유기농GOS 전환율(%) 분석 결과

표 40 시판 Lactase 6종을 이용한 효소반응 전/후 GOS 함량 (%)변화

항목구분	기존 유기농 GOS	Fungal LacT	MaxilacT 5000	Aman LacTF	LacT NL	LacTNL 2.5X	Geno LacT
효소반응 후 당조성 (무수물 %) (24시간 반응)							
Glc+Gal	17.7	98.6	100	100	21.1	20.2	18.7
Allolactose	9.7				13.3	12.6	10.2
Di-galactose	12.0	1.4			10.0	12.2	9.5
Lactose	25.4				27.8	30.2	18.0
Galactosyllactose (DP3)	31.8				18.3	16.3	38.3
Tetrasaccharides(≥DP4)	3.5				0	2.5	4.1
Total GOS	57.0	0.0	0.0	0.0	51.1	43.6	62.1
비고		거의 분해	모두 분해	모두 분해	최종산물 저해	최종산물 저해	-

β -galactosidase에 의해 미반응된 유당을 분해시켜 GOS함량을 높이기 위한 방법으로 Lactase의 추가 투입을 실시한 결과, 일부 Lactase의 경우는 갈락토올리고당 자체를 가수분해하여, GOS 함량을 낮추는 양상을 나타내었고, 1개의 Lactase 만이 미반응 유당을 선택적으로 자르는 것을 확인할 수 있었다.

4가지 Lactase 들 중 Geno LacT를 0.2% 투입하고 24시간 효소반응을 진행하였을 때, GOS의 함량이 53%에서 62%까지 증가 되는 것을 확인하였으나, 효소의 수급사정 및 실제 공정 적용 시 Lactase의 역반응 (공정 체류시간이 지체될 시 갈락토올리고당을 분해하여 함량이 낮아짐)으로 인한 위험부담이 있어 효소반응을 이용한 방법으로는 산업적인 60% 순도 갈락토올리고당의 사업화는 어려움이 확인 되었다.

② 효모발효를 이용한 순도 60% 유기농GOS 개발

(주)네오크레마는 기존에 발효를 통한 갈락토올리고당의 고순도화에 대한 제법기술 및 이에 대한 지식재산권을 보유하고 있으며, 이 기술을 활용해 유기농 갈락토올리고당의 함량증진을 추진하고자 하였다.

당사에서 보유하고 있는 기술인 갈락토올리고당의 함량증진에 쓰인 효모는 오랜 식경험이 있는 식용효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 이며, 이 효모 특성은 약 50°C에서도 생존이 가능한 효모이다.

표 41 *S. cerevisiae*의 발효 특성

당 류	발효 여부
단당류 (포도당, 과당, 갈락토오스, 자일로오스)	포도당
이당류(설탕, 유당, 맥아당)	설탕 및 맥아당 발효 가능
올리고당 (이소말토올리고당, 사이클로덱스트린, 말토올리고당, 프락토올리고당, 말토올리고당)	프락토올리고당, 말토올리고당 발효가능.

갈락토올리고당 내 함량을 증진 시키기 위하여 사용되는 효모는 단당류의 경우 포도당 및 갈락토오스를 발효시킬 수 있고, 이당류의 경우는 유당은 발효시키지 못하고 설탕 및 맥아당만 발효시키며 올리고당의 경우 프락토올리고당 및 말토올리고당을 발효시키는 특성이 있다.

■ 실험방법

개발된 유기농 갈락토올리고당 순도 50% 당액을 45 Brix로 희석하여 30°C로 낮추어 냉각

시킨 후, 반응용액 일부에 고형분 대비 생효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 10%, 5%, 2% (w/w)를 스페큘라로 풀어 pre-activation 시킨 후 전체에 투입 한다.

사용된 생효모는 일반 제빵업체에서 사용되고 있는 C사의 생효모-생이스트골드를 사용.

반응 플라스크는 30°C 항온수조에 두어 투입량 별 효모발효를 체크 하였으며, 샘플링 시마다 100°C에서 15분간 열처리하여 효모발효를 중단한다.

모든 샘플은 20배 희석하여 0.22 μm syringe filter 여과한 후 HPLC 분석용으로 사용
발효 전/후 증가 되는 GOS의 함량은 효모에 의해 소진되는 Glucose를 정량(%)하여 증감율로 나타냈다

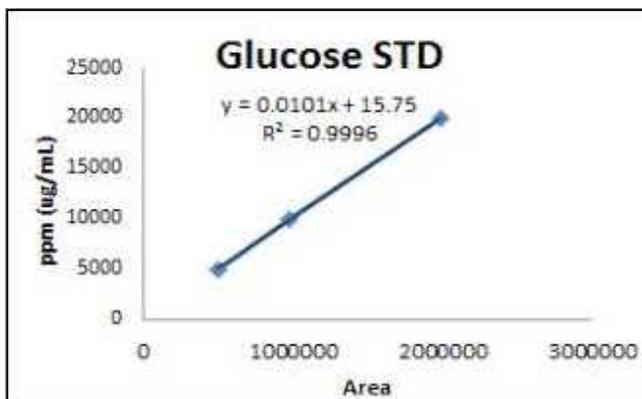
각 효모발효 후의 GOS 전환율을 확인하기 위한 HPLC 분석 조건은 아래와 같다.

표 42 HPLC 분석 조건

HPLC-RID (Refractive Index detector)	
Column	YMC Polyamine II
Mobile phase	Acetonitrile 64%
Flow rate	1.0mL/min
Column Temperature	30°C
Detector Temperature	45°C
Pressure	Less than 1500 psi
Injection volume	20 μL

■ 실험결과

표 43 Glucose 정량곡선



Glucose STD	
ppm (μg/mL)	Area
5000	505850
10000	970855
20000	1984661

표 44 발효전/후 대비 효모투입량 별 Glucose 정량분석에 따른 TGOS 함량(%)변화

발효 전			
Glucose (%)	29.27		
TGOS (%) (Total galactooligosaccharide)	54.71		
발효 후			
효모 투입량 별	효모 2%	효모 5%	효모 10%
Glucose (%)	23.34	13.72	0.8
TGOS (%) (Total galactooligosaccharide)	57.62	66.29	79.98
증감율	+2.91	+11.58	+25.27

기존 50% 순도 갈락토올리고당에 효모발효를 통해 순도 60%로 함량을 증진하고자 효모 투입량 별(10%, 5%, 2%)로 발효한 결과, 효모 투입량이 증가할수록 Glucose가 소진되어 상대적으로 TGOS(Trans-Galactooligosaccharide)의 함량이 증가되는 양상을 보였다.

효모 10% 접종 시의 경우, TGOS의 함량이 발효 전에 비해 25.27% 증가하여 TGOS의 함량이 대략 80% 달하는 결과를 나타냈으나, 효모발효 공정 추가 시 투입량에 따른 가격적 측면과 필터 공정의 어려움으로, 위 세가지 조건 중, 효모 5% 접종 (30°C, 24시간)이 가장 적합한 것으로 (TGOS: 66.29%)이 가장 적합한 효모투입량으로 선정하였다.

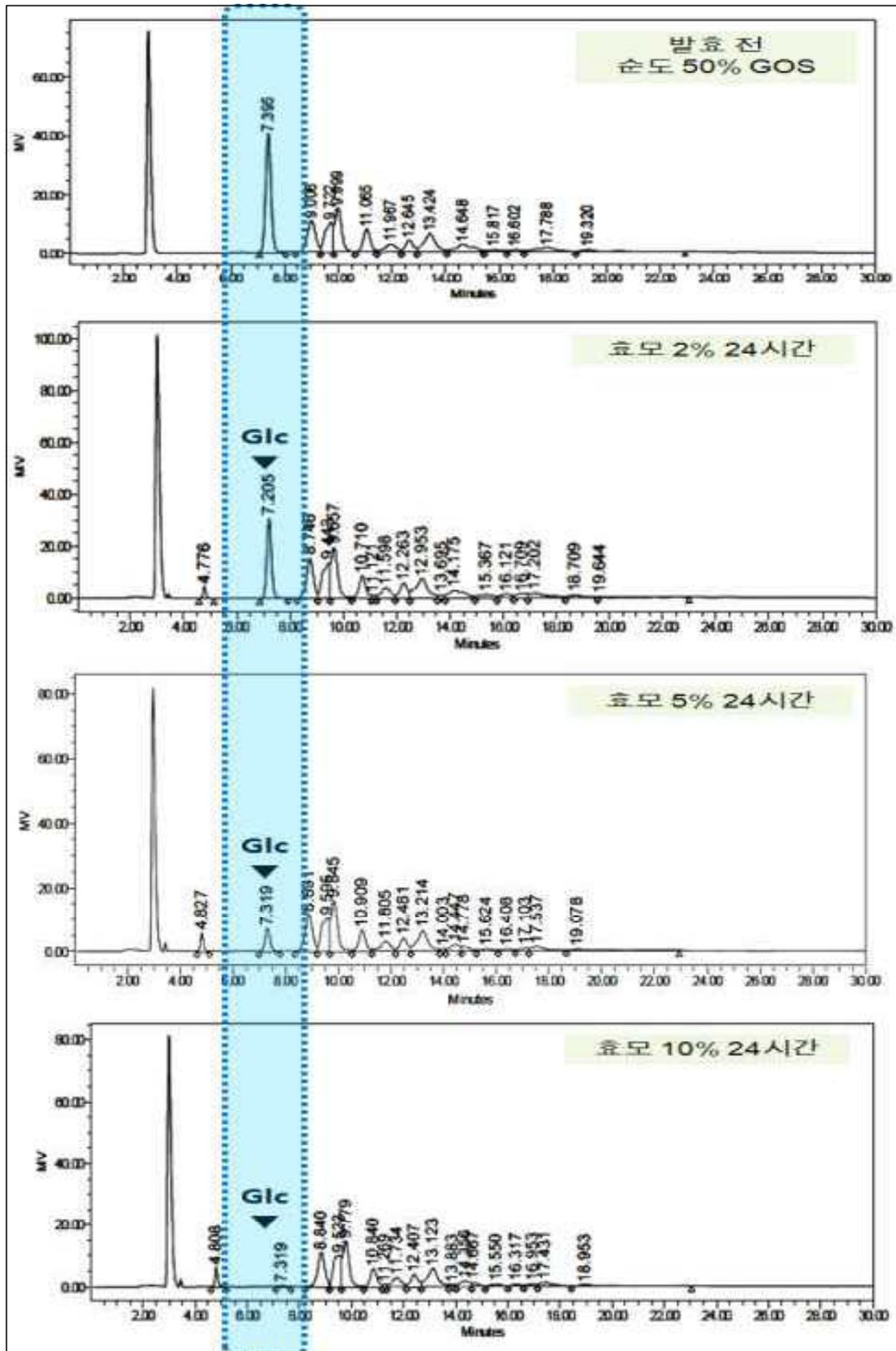


그림 95 효모 접종량에 따른 발효 후 Glucose 함량(%)의 변화

하지만 효모발효 후 순도는 향상 되었지만 효모 특유의 이미, 이취를 제거가 필요함을 확인했다.

이미,이취 제거를 위해 일반적으로 응용되는 이온교환수지(Ion exchange resin) 공정을 추가 하려 하였으나, 이온교환 수지의 경우 유기가공식품에서는 사용할 수 없는 공정으로 고순도 유기농 갈락토올리고당 개발에 있어 효모의 이미, 이취를 제거하는 문제가 검토 되었다.

■ 효모발효 후 이미, 이취 제거 실험

농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리지원에 관한 법률시행규칙에 따른 유기가공식품 가공시 허용 물질 내 이온수지가 없어 효모의 이미이취를 제거에 사용할 수 없는 물질로 확인되었고, 위 그림에서 이미 이취를 제거를 위한 유기가공 보조제를 탐색한 결과 구연산, 비타민C, 사과산 등이 적절할 것으로 확인되었는데 비타민C 와 사과산 등은 유기식품에 첨가물로서는 사용가능하나 가공보조제로서는 사용할 수 없는 것으로 확인되었다.

표 96-4 유기가공식품 허용 물질

가 식품첨가물 또는 가공보조제로 사용이 가능한 물질

영양분명	명칭(영어)	국제 단위(단위)	식품첨가물로 사용 시		가공보조제로 사용 시	
			허용 여부	허용 범위	허용 여부	허용 범위
프락토올리고당	Hydrogen MPKokko		○		○	식품 첨가물 대체 조미료
구연산	Citric gum	482	○	제한 없음	○	
구연산	Citric acid	330	○	제한 없음	○	제한 없음
구연산삼수염	Trisodium citrate	328(1)	○	소다, 산, 염기, 과일 맛료, 향료, 향미료, 과일향료	○	
구연산칼륨염	Potassium citrate	332	○	제한 없음	○	
구연산칼슘	Calcium citrate	333	○	제한 없음	○	
과산화수소	Diacetone acetyl peroxide		○		○	대용보조제
글리세린	Glycerin	427	○	제한 없음 (가공보조제로는 첨가물 사용이 불가하며, 첨가물 사용 시 사용 가능)	○	
글리세린올레산	Glycerin Oleate	989	○		○	향미료
락타제	Lactase	382	○	제한 없음(산, 염기, 향료, 향미료 사용 불가 및 고온에서 사용 불가)	○	
로카스트콩검	Locust bean gum	410	○	식품첨가물, 향료, 향미료	○	
루틴	Rutin	220	○	향미료	○	
루틴	Rutinose	904	○	향미료	○	
루틴	Rutin	559	○	향미료(oxidation 또는 oxidation제)	○	
루틴	Rutinone	558	○	향미료(oxidation 또는 oxidation제)	○	
비타민 C	Vitamin C	300	○	제한 없음	○	
DL-시드라산	DL-Malic acid	298	○	제한 없음	○	
오렌지	Orange	945	○	제한 없음	○	제한 없음

영양분명	명칭(영어)	국제 단위(단위)	식품첨가물로 사용 시		가공보조제로 사용 시	
			허용 여부	허용 범위	허용 여부	허용 범위
칸탄검	Xanthan gum	495	○	저산성, 과일 및 향료, 향미료, 과일 맛료, 향미료	○	
수산화나트륨	Sodium hydroxide	526	○	저산성	○	향미료, 과일 맛료, 향미료
수산화칼륨	Potassium hydroxide	526	○		○	향미료, 과일 맛료, 향미료
수산화칼슘	Calcium hydroxide	528	○	향미료	○	향미료
아라비아검	Arabic gum	494	○	저산성, 과일, 향료, 향미료	○	
알리신	Allyl isothiocyanate	400	○	제한 없음	○	
알리신나트륨염	Sodium allyl isothiocyanate	401	○	제한 없음	○	
알리신칼륨염	Potassium allyl isothiocyanate	400	○	제한 없음	○	
알미네이트	Magnesium carbonate	521	○	저산성	○	향미료
염화칼륨	Potassium chloride	508	○	저산성, 과일, 향료, 향미료	○	
염화칼슘	Calcium chloride	508	○	저산성, 과일, 향료, 향미료	○	향미료
오렌지수	Orange water		○		○	향미료, 과일 맛료, 향미료
이산화규소	Silicon dioxide	561	○	향미료, 향미료, 향미료	○	향미료, 과일 맛료, 향미료
이산화염소산수소	Chlorine dioxide	928	○		○	향미료, 과일 맛료, 향미료
이산화염소산수소	Hydrochloric Acid/Water		○		○	향미료, 과일 맛료, 향미료
이산화탄소	Carbon dioxide	250	○	제한 없음	○	제한 없음

영양분명	명칭(영어)	국제 단위(단위)	식품첨가물로 사용 시		가공보조제로 사용 시	
			허용 여부	허용 범위	허용 여부	허용 범위
염화나트륨	Sodium chloride (Mono-Cl- NaCl)	336 (20000)	○	가공보조제	○	
젖산	Lactic acid	270	○	저산성, 과일, 향료, 향미료	○	향미료, 과일 맛료, 향미료
젖산칼슘	Calcium Lactate	327	○	저산성	○	
제일인산칼슘	Calcium phosphate monobasic	341 (1)	○	향미료	○	
제일인산칼륨염	Potassium phosphate dibasic	340 (3)	○	향미료(산화제)	○	
중화마그네슘	Double Magnesium Chloride(Sea Water)		○	저산성	○	향미료
제일인산	Calcium salt	418	○	향미료	○	향미료, 과일 맛료, 향미료
L-트레오닌	L-Tartaric acid	334	○	향미료	○	향미료, 과일 맛료, 향미료
L-트레오닌칼륨염	Potassium L-tartrate	335	○	제일인산, 제일인산	○	제한 없음
L-트레오닌칼슘염	Calcium L-tartrate	336	○	제일인산, 제일인산, 제일인산	○	제한 없음
우유단백질	Ethanol/water extract		○	제한 없음	○	제한 없음
염소	Chlorine	541	○	제한 없음	○	제한 없음
카라기난	Carag gum	407	○	저산성, 과일, 향료, 향미료	○	향미료
카라기난	Karaya gum	488	○	제한 없음	○	
카세인	Casein		○		○	향미료, 과일 맛료, 향미료
타닌산	Tannic acid	181	○	향미료	○	향미료, 과일 맛료, 향미료
나트륨이산화탄소	Sodium carbonate	500 (1)	○	제일인산, 제일인산	○	향미료, 과일 맛료, 향미료

영양분명	명칭(영어)	국제 단위(단위)	식품첨가물로 사용 시		가공보조제로 사용 시	
			허용 여부	허용 범위	허용 여부	허용 범위
나트륨이산화탄소	Sodium bicarbonate	500 (1)	○	제일인산, 제일인산, 제일인산	○	
제일인산나트륨염	Sodium phosphate dibasic	300 (3)	○	제일인산, 제일인산	○	
제일인산칼륨염	Potassium phosphate dibasic	304 (1)	○	제한 없음	○	
제일인산칼슘	Ammonium carbonate	303 (1)	○	제일인산, 제일인산, 제일인산	○	
제일인산칼륨염	Ammonium phosphate dibasic	303 (1)	○	제일인산, 제일인산, 제일인산	○	
제일인산칼륨염	Potassium carbonate	501 (1)	○	제일인산, 제일인산, 제일인산	○	제일인산
제일인산칼슘	Calcium carbonate	170 (1)	○	제일인산, 제일인산, 제일인산	○	제한 없음
D-소르비톨	D-Sorbitol (concentrated solution)	308	○	제일인산, 제일인산, 제일인산	○	
제일인산칼슘	Triglycerin gum	473	○	제한 없음	○	제일인산
제일인산칼슘	Benzoic acid	440	○	저산성, 과일, 향료, 향미료	○	제일인산
제일인산칼슘	Adipic acid		○		○	제일인산
제일인산칼슘	Sulfuric acid	573	○		○	향미료, 과일 맛료, 향미료
제일인산칼슘	Calcium ascorbate	396	○	제일인산, 제일인산, 제일인산	○	향미료
자연향료	Natural flavoring substances and preparations		○	제한 없음 (식품첨가물, 가공보조제로는 사용 불가하며, 식품첨가물 사용 시 사용 가능)	○	

그림 96 「농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」에 따른 유기가공식품 가공시 허용물질

하지만 구연산 추가하여 이미 이취를 제거하였을 때, 갈락토올리고당 특유의 단맛이 경감되는 단점이 있었다.

여과보조제로 사용되는 활성탄은 유기가공보조제로써 사용 가능한 것을 확인할 수 있어 본 연구에서는 유기가공보조제로서 허용되는 활성탄을 이용한 이미, 이취 제거 제조공정을 우선 탐색했다.

앞서 기술하였듯이, 제당산업에서는 주로 당액 중 이온물질 흡착, 제거 및 청징 등의 목적으로 이온교환 크로마토그래피를 이용한 이온 정제공정을 필수로 삽입하나, 유기가공식품의 경우, 이는 식품첨가제/혹은 가공보조제로서 허가되지 않는 항목이다.

효모 발효는 당액 중의 포도당을 소모하여 이산화탄소, 알코올과 유기산류를 생성해 당액의 성상 및 관능을 변화시키며, 문제는 일반 올리고당에서 이질적으로 느껴질 수 있는 특유의 시큼한 맛(유기산)과 이취(올리고당에서 맥주 냄새가 나는 경우)가 난다.



그림 97 효모발효(알코올 발효) 시 생성 물질

표 45 유기능 GOS의 효모 발효 전/후 pH 및 유기산 함량 변화

구분	효모발효 전	효모발효 후
pH	5.48	4.18
유기산 함량 (mg/g)	불검출	0.53

■ 실험방법

유기가공식품 제조상 허용되는 물질/방법으로서 효모발효 후 당액 내 이미, 이취를 개선시키고자 하였다.

허용가능 한 항목 중 1) 활성탄(activative carbon), 2) 규조토(diatomite), 3) pH에 따른 유기산 해리효과 등 검토되었다.

활성탄 처리는 고흡분 대비 0.1%, 0.5%, 1.0% 투입 후 70°C 반응조에서 30분, 1시

간, 2시간 별로 반응시킨다.

규조토(백색 또는 회백색, 미세한 조류의 화석으로 규산이 주성분임. 입자에 다수의 조그만 구멍있어, 불순물 흡착 목적으로 쓰임) 여과 방식은, 여과조제(filter aid)로서, 규조토를 증류수에 적당량 풀어 SS여과기 순환시킴으로써 여과막에 0.5~1cm의 케이크 층을 형성시킨 후, 여기에 활성탄 처리 반응 당액을 여과하였다.

여과된 당액을 고형분 75% 가 될 때까지 진공 농축 후, 성상, pH, 탁도 및 발효취 잔존유무 등을 확인한다.

■ 실험결과

표 46 활성탄 처리 별 성상, 탁도 pH, 발효취 변화

투입 전 (발효 직후)				
	성상	O.D ₄₂₀ , 50Brix	pH	발효취
가열 시간 (70°C)		≥ 1.0A	4.78	특유의 발효취가 있음
활성탄 투입 0.1%				
가열 시간 (70°C)	성상	O.D ₄₂₀ , 50Brix	pH	발효취
30분		0.688A	4.71	개선안됨.
1시간		0.209A	4.62	개선안됨.

2시간		0.087A	4.57	개선안됨.
-----	-----------------------------------------------------------------------------------	--------	------	-------

활성탄 투입 0.5%				
가열 시간 (70°C)	성상	O.D ₄₂₀ , 50Brix	pH	발효취
30분		0.163A	4.83	개선안됨.
1시간		0.084A	4.23	개선됨.
2시간		0.052A	4.08	개선됨.

활성탄 투입 1.0%				
가열 시간	성상	O.D ₄₂₀ , 50Brix	pH	발효취
30분		0.064A	4.59	발효취가 약간 있음.
1시간		0.024A	4.28	개선됨.
2시간		0.008A	4.18	개선됨.

각 활성탄 투입량 (0.1%, 0.5%, 1%) 및 70°C 반응조에서 열처리 시간 (30분, 1시간, 2시간) 별로 반응시킨 후 성상, 탁도, pH 및 발효취 잔존 여부를 확인한 결과는 위 표와 같았다.

확인결과, 활성탄 투입량(%)의 증가 및 열처리 시간이 길수록 효모 발효에 의한 특유의 이미,이취가 개선 도미을 알 수 있었다.

또한, 열처리 시간이 증가할수록 발효에 의한 시큼한 맛과 효모취가 개선되는 것을 확인하였는데, 이는 1) 활성탄 처리에 의해 반응액의 pH가 낮아질수록 유기산이 이온화(해리)되는 경향이 낮기때문에, 유기산에 의해 시큼한 맛이 덜 느껴지는 것과 2) 활성탄에 유기산이 흡착 및 제거됨으로서 생기는 효과일 것으로 사료된다.

생산비용 측면(활성탄의 가격, 공정 운용비용), 당액의 색상(유기농의 이미지와 어울리는가, 당액의 탈색정도), 관능(맛, 냄새) 등을 고려하였을 때, 활성탄 0.5% 투입하여 70°C에서 1시간 이상 반응하는 것이 가장 적당할 것으로 판단되었다.

③ 순도60% 유기농갈락토올리고당 제조공정 확립

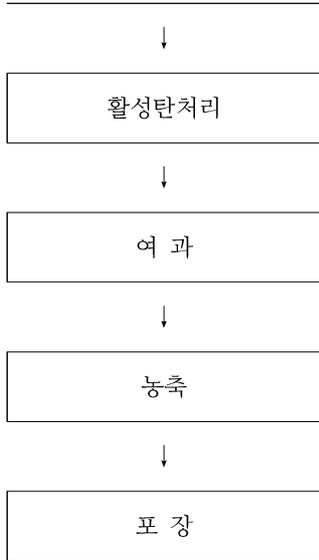
앞서 수립된 효소/효모반응 및 탈색/ 여과 최적 조건을 이용하여, 유기농 갈락토올리고당 순도 60% 제조 및 산업화를 위한 대량생산공정을 수립하였다.

유기농 갈락토올리고당의 공정설계는 네오크레마 연구소 실험실에서 1차 Lab test (1kg) 한 조건을 토대로 매일유업(주)에서 제공받은 유기농 유당으로 (주)네오크레마 장성공장에서 2차 pilot test (300kg) 후에 공장 생산환경에 맞추어 재설계 되었으며, 공정 순서는 유당용해→ 당액 온도 및 pH 조정 → 효소분해 → 효모발효→ 당액여과→ 활성탄처리 → 여과→ 농축의 순서로 계획하였다.

당사 장성공장의 생산환경에 맞게 최종 설계된 유기농 갈락토올리고당의 제조공정도는 아래와 같으며, 최종 확립된 제조공정은 아래 표와 같다.

표 49 순도 60% 유기농 갈락토올리고당 제조공정도

제 조 공 정	세 부 조 건	비 고
용해	정제수(80℃ 이상) 300kg, 500 L 청수	거의 투명한 정도로 실시, 약 44brix
↓		
온도 조정	55℃ 까지 유당용액 품온조정	
↓		
효소반응	효소투입 0.15%(원료기준) :	
↓	55℃,	
효소반응 종료	효소반응 24시간 종료	
↓		
온도조정	30℃ 까지 반응용액 온도 하강	
↓		
효모반응	효모 5% 투입(원료기준)	-
↓	30℃,	
효모반응 종료	효모반응 24시간	
↓		
여과	규조토여과	



- 활성탄 0.5%, 70°C

공정 별 GOS 함량

시간 별 효소반응 및 효모발효 후 각 함량의 변화는 아래의 표와 같음.

표 50 공정 별 GOS 함량

구분	반응시간	GOS	Lactose	Glucose
효소반응시간 23시간	23	53.2	22.1	24.7
효모투입(5%)후 5시간	48	56.2	24.3	19.5
17시간	60	58.6	23.8	17.6
21시간	64	58.7	24.5	16.8
22시간	65	60.1	25.6	14.3
효모발효 종료 24시간	68	68.2	20.8	11.0
활성탄 (0.5%) 처리	2시간 (70°C)	변화없음	변화없음	변화없음
규조토 처리		67.3	21.8	10.9



그림 98 도 60% 유기농 GOS 시생산 현장(장성공장) 사진

□ 시생산 결과

항목	생산결과	비고
생산원료	유기농 유당	
제품생산량 (kg)	354kg	1) 원료 (유당) 사용량 : 300kg 2) 제품생산량 : 약 354kg 3) 생산수율 : 118%
제품색상 (육안관찰)	약간의 미황색	4) 생산방법 :
고형분 (DB%)	77.2	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">유당용해</div> <p style="text-align: center;">..... ↓</p>
생산수율 (%)	118%	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">효소반응</div> <p style="text-align: center;">↓</p>

GOS · 함량 (%)	68.32%	효모반응 ↓ 여과/ 농축 ↓ 7.5 Brix ↓ 포장 · 및 · 제품
포장단위 (Tin can)	24 kg	



□ 시생산 제품의 함량분석 결과

- 제1협동기관인 매일유업(주)로부터 제공받은 유기농유당으로 만들어진 순도 60% 유기농 갈락토올리고당의 함량분석 결과는 아래와 같이 68.34% 로 분석된다.

표 56 HPLC 분석조건

HPLC-RID (Refractive Index detector)	
Column	YMC Polyamine II
Mobile phase	Acetonitrile 64%
Flow rate	1.0mL/min
Column Temperature	30°C
Detector Temperature	45°C
Pressure	Less than 1500 psi
Injection volume	20 μL

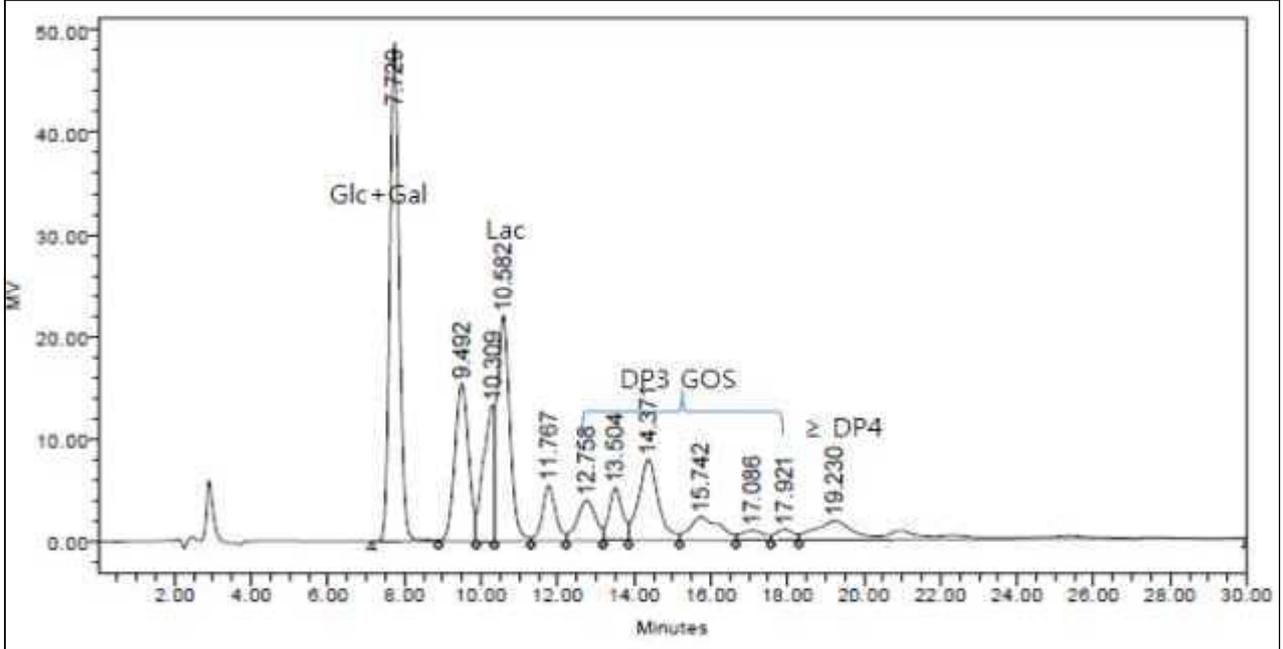
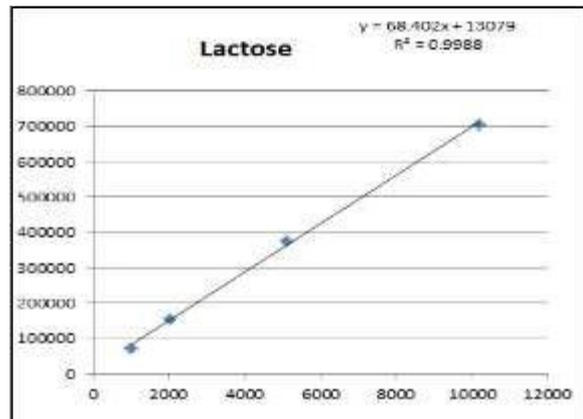
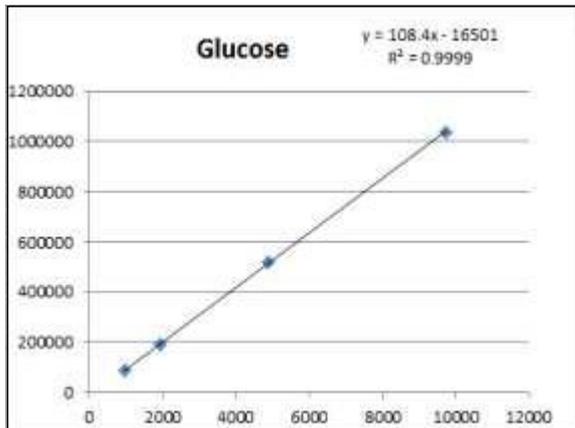


그림 99 순도 60% 유기농 갈락토올리고당 HPLC 크로마토그램



Glucose STD		Lactose STD	
PPM ($\mu\text{g/mL}$)	Area	PPM ($\mu\text{g/mL}$)	Area
974.6	87518	1020.4	73386
1949.2	193492	2040.8	155339
4873	516710	5102	374887
9746	1037857	10204	705063

그림 100 유기농 갈락토올리고당 생산 당분석 결과-HPLC 크로마토그램 및 정량테이터

표 57 순도 60% 유기농갈락토올리고당 시험생산- 함량분석 결과

Sample	Sample Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Expected Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Contents (%)
Lactose (%)		10653	13.85
유기농 Glucose (%) 갈락토올리고당	24080	136964	17.81
Total GOS (%)		68.34	

④ 유기농 갈락토올리고당의 안전성을 위한 규격 설정

아래의 양식은 자사의 내부 분석 의뢰에 대한 결과 성적서의 양식이며, 갈락토올리고당에 해당하는 법적 규격과 자사에서 필요로 하는 규격 항목이 나열되어 있다.

HMR-15-0110-1430



시험 성적서

제품명	갈락토올리고당		
제조사		원산지	
제조일자		공급사	
의뢰인		유통기하	
의뢰목적	자재검사		

귀하가 시험 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

분석항목	단위	분석결과	기준규격	정량한계	판정
납	mg/kg		100이하	0.02	적합
비소	mg/kg			0.02	적합
수은	mg/kg			0.01	적합
카드뮴	mg/kg			0.02	적합
대장균군	CFU/g				적합
일반세균수	CFU/g				적합
리스테리아모노사이토제네스	정성				적합
바실러스세레우스	CFU/g				적합
살모넬라	정성				적합
클로스트리디움퍼프린젠스	정성				적합
황색포도상구균	정성				적합
134Cs + 137Cs	Bq/kg		1000이하	1	적합
131I	Bq/kg		3000이하	1	적합
방사선조사	kGy				적합
멜라민	mg/kg		2.5 이하		적합
효모	CFU/g				적합
곰팡이수	CFU/g				적합
장출혈성대장균	정성				적합

그림 103 분석요청 항목 시험성적서

■ 영유아용 제품 적용을 위한 유기농 갈락토올리고당의 기준규격의 설정

앞서 해당하는 규격 항목은 국내 식품공전상의 올리고당류> 갈락토올리고당에 해당하는 기준규격인 함량과 중금속 규격 외 식품등의 공통기준 규격이 포함되어 있다. 또한 영유아용 제품을 제조하는 제조사의 특성을 반영하여 보다 강화된 내부 기준규격을 적용하여 향후 발생 가능한 이슈를 사전에 방지하고자 하며, 강화하여 적용하는 기준 규격은 다음과 같이 방사능, 중금속, 멜라민, 미생물 규격 등이 해당한다.

* 영유아용에 의한 기준 규격 추가 적용 항목 법규 사항(식품공전 발체)

5) 중금속 기준

(4) 가공식품의 중금속 기준

대상식품	납(mg/kg)	비소(mg/kg)
○ 식용유지류	0.1 이하	0.1 이하
○ 영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식, 영·유아용 특수 조제식품, 조제분유, 조제우유, 성장기용 조제분유, 성장기용 조제우유, 기타조제분유, 기타조제우유	0.01 이하 [분말제품의 경우 희석하여 섭취하는 형태(제조사가 제시한 섭취방법)를 반영하여 기준적용]	-

7) 방사능 기준

핵종	대상식품	기준(Bq/kg, L)
¹³¹ I	영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식, 영·유아용특수 조제식품	100 이하
	유 및 유가공품	100 이하
	기타 식품*	300 이하
¹³⁴ Cs + ¹³⁷ Cs	모든식품	370 이하

* 기타식품은 영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식, 영·유아용특수조제식품, 유 및 유가공품을 제외한 모든 식품을 말한다.

15) 멜라민(Melamine) 기준

대상식품	기준
○ 특수용도식품 중 영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식, 특수의료용도등식품	불검출
○ 「축산물의 가공기준 및 성분규격」에 따른 조제분유, 조제우유, 성장기용 조제분유, 성장기용 조제우유, 기타조제분유, 기타조제우유	
○ 상기 이외의 모든 식품 및 식품첨가물	2.5 mg/kg 이하

16) 6개월 미만의 영·유아가 섭취할 수 있도록 제조·판매하는 식품에서는 타르색소가 검출되어서는 아니되고 미생물 기준·규격은 다음과 같이 적용한다.

(1) 세균수 : n=5, c=2, m=1,000, M=10,000(액상제품은 n=5, c=1, m=10, M=100)

(2) 대장균군 : n=5, c=0, m=0

(3) 엔테로박터 사카자키[*Enterobacter sakazakii*(*Cronobacter* spp.)] : n=5, c=0, m=0

■ 갈락토올리고당의 기준규격 설정결과

원료규격(일반규격)

검사항목		자사규격				법적규격				필수여부	비고
		질적특성	하한	상한	단위	질적특성	하한	상한	단위		
미물	미물	적합				적합				■	식품공전참고

* 질적특성 - 유무/검출불검출/양성음성 * 필수여부 - 법적항목+α

원료규격(안전규격)

검사항목		자사규격				법적규격				필수여부	비고
		질적특성	하한	상한	단위	질적특성	하한	상한	단위		
수분	수분	적합		25	%					□	
회분	회분	적합		0.1	%					□	
순도시험	액성	적합	4.5	7.0	PH					□	30%용액 기준
유해물질	멜라민(MELAMINE)	불검출				적합		2.5	MG/KG	■	식품공전참고
유해물질	방사선	비조사				비조사				■	식품공전참고
중금속	납(PB)	적합		1.0	PPM	적합		1.0	PPM	■	식품공전참고
중금속	비소(AS)	적합		0.3	PPM					□	
중금속	중금속	적합		5	PPM					□	
미생물	대장균군(COLIFORM)	음성								■	
방사능	I-131	적합		100	BQ/KG	적합		300	BQ/KG	■	식품공전참고, 배합비 기준, 완제품 1 Bq/kg 수준 관리
방사능	CS-134+CS-137	적합		100	BQ/KG	적합		370	BQ/KG	■	식품공전참고, 배합비 기준, 완제품 1 Bq/kg 수준 관리

* 질적특성 - 유무/검출불검출/양성음성 * 필수여부 - 법적항목+α

원료규격(영양성분)

검사항목		자사규격				법적규격				필수여부	비고
		질적특성	하한	상한	단위	질적특성	하한	상한	단위		
용량	함량	적합	50.0		%		10.0		%	■	식품공전 참고

* 질적특성 - 유무/검출불검출/양성음성 * 필수여부 - 법적항목+α

그림 104 갈락토올리고당의 기준규격

■ 개발될 유기농 갈락토올리고당 품질관리 규격

주관기관인 (주)네오크레마는 유기농치즈부산물로 만든 순도 50% 갈락토올리고당의 품질관리 규격을 설정하였다. 1차적 규격 설정은 식품공전 상의 갈락토올리고당 (식품공전 제5. 식품별 기준 및 규격▶ 10.올리고당류 ▶ 4)-(3)갈락토올리고당)의 규격에 의거하여 설정하였으며, 2차적으로 세부 규격(함량, 고형분, 미생물,pH)을 추가 설정하였다.

식품공전	
제 5. 식품별 기준 및 규격 ▶ 10. 올리고당류	
공전 원문 PDF 파일	
10. 올리고당류	
1) 정의	
올리고당류라 함은 당질원료에서 얻은 당액을 가공한 것으로 프락토올리고당, 이소말토올리고당, 갈락토올리고당, 말토올리고당, 자일로올리고당, 겐티오올리고당 등을 말한다.	
2) 원료 등의 구비요건	
3) 제조·가공기준	
4) 식품유형	
(3) 갈락토올리고당	
당질원료를 이용하여 효소를 작용시켜 얻은 전이갈락토올리고당액 또는 사탕무, 대두 등에서 추출한 라피노스, 스타치오스의 당액을 여과, 정제, 농축한 액상 또는 분말상의 것을 말한다.	
5) 규격	
(1) 올리고당 함량(%)	
① 프락토올리고당, 이소말토올리고당, 갈락토올리고당, 자일로올리고당, 겐티오올리고당은 각각 해당 올리고당 10 이상	
② 말토올리고당 : 40 이상	
③ 기타올리고당 : 개별올리고당 함량 이상이어야 한다.	
(2) 납(mg/kg) : 1.0 이하	

그림 105 식품공전 중 갈락토올리고당의 정의 및 규격

품질규격

품 명		네이저스GOS		
품질 규격 항목				
항 목	단 위	규 격	비 고	
①	성상	-	약간의 미황색이 있는 점조성 액상.	관능검사(육안색상)
②	수분	%	25.0 이하	100 - Brix
③	고형분	Brix	75.0 이상	Refractometer
④	pH (10% 용액)	-	4.0 ~ 7.0	pH meter
⑤	전체 갈락토올리고당 함량	DB%	50.0 이상	HPLC
⑥	비스	ppm	0.1 이하	식품공전
⑦	납	ppm	1 이하	식품공전
⑧	이물	%	불검출	식품공전
⑨	회분	%	0.1 이하	식품공전
⑩	일반세균	cfu/g	3000 이하	식품공전
⑪	진균수	cfu/g	50 이하	식품공전
⑫	대장균군	cfu/g	음성	식품공전
1. 신고 번호 :		2. 식 용 유 형 : 갈락토올리고당		
3. 원 재 료 명 : 유기농 유당		4. 유통 기 한 : 제조일로부터 2년까지		
위와 같이 검사 결과를 통보합니다.				
검 사 자		책 임 자		

 <p>CREMAR ㈜ 네오크레마</p>	<p>판 매 원 본사</p> <p>㈜네오크레마 경기도 성남시 중원구 둔촌대로 484 (상대원동, 시콕스타워 118호) Tel. 031) 732-4080~2 Fax. 031) 732-4083</p>	<p>제 조 원 공장</p> <p>㈜네오크레마 전남 장성군 남면 삼태로 147-22 210호(시콕스타워) Tel. 061) 392-1862 Fax. 061) 392-1863</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

그림 106 유기농갈락토올리고당의 품질규격

① 성상 항목은 관능검사(육안검사) 법으로 실시하며, 1)검액이 담긴 비커 아래 백지를 깔고 위에서 아래로 내려보았을 때, 2)비커 반대쪽에 글씨를 비춰보았을 때, 왜곡이나 흐릿함이 없는지를 확인. 올리고당의 특성상 태양광 등에 노출되었거나, 유통, 보관

시 갈변이 자연 발생할 수 있어 햇빛이 비취지지 않는 암소에서 밀봉 보관 중인지도 체크

② **수분 항목**은 당도굴절계(Refractometer)로 검액을 측정하였을 때 나온 고형분 함량(DB%)값을 100(%)에서 빼준 값(%)으로 하고, 필요에 따라 식품공전 제9. 일반시험법▶1.1.1.1건조감량법(105°C)을 참고하여 검사.

③ **고형분 항목**은 상온에서 당도굴절계(Refractometer)로 검액을 측정하여 나온 결과값을 읽고, 측정마다 증류수로 영점(autozero)을 보정.

④ **pH 항목**은 검액을 증류수에 10% 용액(w/w)으로 조제한 값을 pH meter 기로 측정하여 나온 결과값을 읽고, 사용하는 증류수의 pH range 는 pH 5.5~7.0

⑤ **전체 갈락토올리고당 함량 항목** 은 HPLC system을 이용하여 측정한다. 분석조건은 아래의 표와 같으며, 계산방식은 100(%)에서 비(非)갈락토올리고당 성분인 Galactose, Glucose, Lactose의 정량된 함량(%)을 뺀 값으로 함.정량선 작성에 필요한 Galctose, Glucose, Lactose의 표준품은 Assay ≥98.0이상의 고순도 제품을 사용.

⑥ **비소 항목**은 식품공전 제 9. 일반시험법▶ 7.1.2.3 비소(As)을 참고하여 검사하며, 공인분석기관에 6개월에 한 번씩 의뢰. 공인분석기관의 선택은 식약처에서 고시한 자가품질검사 대행 권한이 있는 공인분석기관에 의뢰

⑦ **납 항목**은 식품공전 제 9. 일반시험법▶ 7.1.2.1 납(Pb)을 참고하여 검사하며, 공인분석기관에 6개월에 한번씩 의뢰. 공인분석기관의 선택은 식약처에서 고시한 자가품질검사 대행 권한이 있는 공인분석기관에 의뢰

⑧ **이물 항목**은 식품공전 제 9. 일반시험법▶ 9.2.1 일반이물 나. 여과법을 참고하여 검사하며 타겟하는 이물에 따라 식품공전 내 다른 검사법을 이용

⑨ **회분 항목**은 제 9. 일반시험법▶ 9.1.1.2 회분을 참고하여 검사하며, 필요에 따라 열을 가해 예비탄화

⑩ **일반세균 항목**은 제 9. 일반시험법▶ 9.3.5.1. 일반세균수를 참고하여 검사하며, 모

든 검사는 한 희석배수당 2개씩 진행하고, 반드시 공시험을 수행. 검체의 샘플링은 위생 조건 하에서 완제품의 상부, 중부, 하부에서 25~30g씩 샘플링. 필요에 따라 식품공전에 등재되어 있는 건조필름을 이용.

⑪ **진균 항목**은 제 9. 일반시험법▶ 9.3.10. 진균수(효모 및 사상균수)을 참고하여 검사하며, 모든 검사는 한 희석배수당 2개씩 진행하며, 반드시 공시험을 수행. 필요에 따라 식품공전에 등재되어 있는 건조필름을 이용. 검체의 샘플링은 위생 조건 하에서 완제품의 상부, 중부, 하부에서 25~30g씩 샘플링.

⑫ **대장균군 항목**은 제 9. 일반시험법▶ 9.3.7.1. 대장균군 정성시험을 참고하여 검사하며, 추정시험에서 양성이 나왔을 경우, 2차 추정시험과 확정시험을 동시 진행. 추정시험 단계에서 대장균군 양성이 나왔을 경우, 유통 또는 보관 중인 제품의 수거, 반품 조치.

■ 유기농갈락토올리고당의 분석법 재확립

기존 설정된 유기농갈락토올리고당 분석법은 100(%)에서 비(非)갈락토올리고당 성분인 Galactose, Glucose, Lactose의 정량된 함량(%)을 뺀 값이다. 보다 정확한 갈락토올리고당 분석을 실시하기 위하여 미국 갈락토올리고당 분석법인 AOAC 2001.01 방법을 modify 하여 분석을 실시하였다. AOAC 2001.02 법은 갈락토올리고당 중의 유당 혹은 유당과 유사한 분자구조를 가지고 있는 갈락토올리고당 성분의 결합구조인 β -1,4-D-glycosidic linkage를 자르는 효소인 β -Galactosidase를 이용한 방식으로써 β -Galactosidase 효소처리 전의 갈락토스 함량과 효소처리 후의 galactose의 함량의 차를 이용하여 구하는 방식으로써, 효소처리전(Assay1)의 갈락토스, 효소처리 후(Assay2) 갈락토스 그리고 효소처리 후 유리 lactose 의 함량을 각각 구한다음 AOAC 2001.02법에 제시된 공식에 대입한다. 함량계산공식과 분석조건은 다음과 같다.

- 상수(K) : $(180+162n)/180n$ (n=갈락토스 moiety, 평균 중합도-1)
 - L_b : 유리 락토스 (효소처리전 갈락토올리고당 내 락토오스 함량)
 - G_t : (효소처리전 갈락토스/유리 갈락토스) = Free lactose/1.9
 - G_b : 유리 갈락토스 (효소처리전)
 - G_t : 총 갈락토스
- (유리갈락토스 + 락토스유래 갈락토스 + 갈락토올리고당유래 갈락토스, 효소 처리후)
- G_g : $G_t - G_b - GL_t$

-GOS 함량 : $G_g \times K$

표 58 HPLC 분석조건-1

HPLC-RID (Refractive Index detector)

Column	YMC Polyamine II
Mobile phase	Acetonitrile 64%
Flow rate	1.0mL/min
Column Temperature	30°C
Detector Temperature	45°C
Pressure	Less than 1500 psi
Injection volume	20 μ L

표 59 HPLC 분석조건-2

HPLC-RID (Refractive Index detector)	
Column	BIO Rad 42A
Mobile phase	Water
Flow rate	0.5mL/min
Column Temperature	80°C
Detector Temperature	45°C
Pressure	Less than 1500 psi
Injection volume	20 μ L

유기농 갈락토올리고당의 HPLC 분석 결과는 다음과 같으며, GOS 함량 분석결과는 100(%)에서 비갈락토올리고당의 정량된 함량을 뺀 값과 동일한 값을 확인할 수 있었으며, 추후 AOAC를 응용한 분석법을 적용할 예정이다.

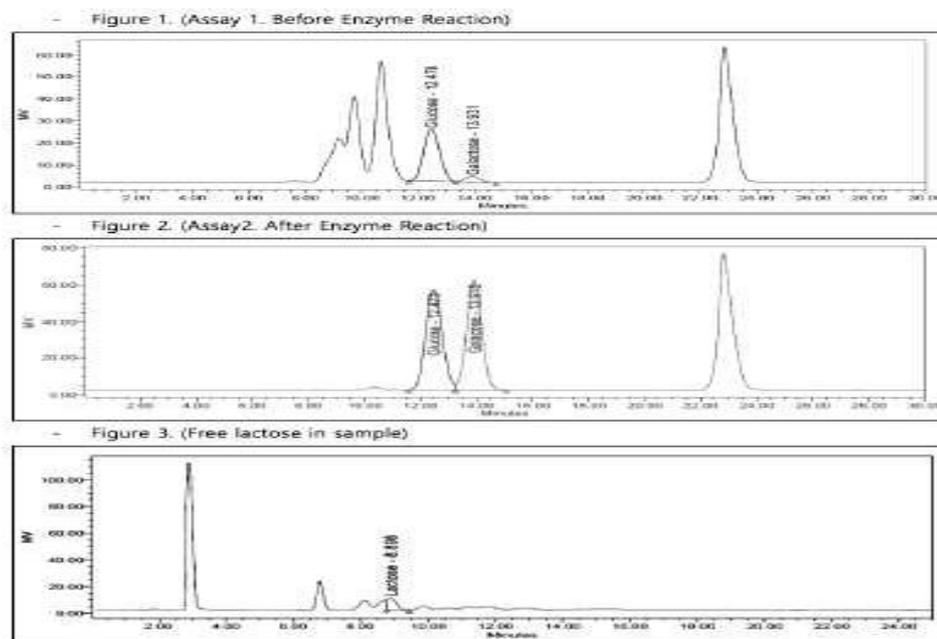


그림 107 AOAC 2001.02 법을 이용한 HPLC data

(3) 유기농갈락토올리고당 중국수출용 제품개발

전체 분유시장의 상당 부분을 차지하는 중구시장에 수출을 위해 갈락토올리고당의 품질을 확인한 결과 갈락토올리고당,포도당,유당,갈락토오스의 순도와 pH에서의 규격차이를 극복하여야 함.

低聚半乳糖

中文名称	低聚半乳糖	
英文名称	Galacto-Oligosaccharides	
基本信息	来源：牛乳中的乳糖 结构式： $\text{CH}_2\text{OH}-\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2\text{O}-[\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2\text{O}]_n-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2\text{O}-\text{CH}_2\text{OH}$ $\text{CH}_2\text{OH}-\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2\text{O}-[\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2\text{O}]_n-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2\text{O}-\text{CH}_2\text{OH}$ 分子式： $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ n为2-8 分子量：300-2000	
生产工艺简述	以牛乳中的乳糖为原料，经β-半乳糖苷酶催化水解半乳糖苷键，生成半乳糖和葡萄糖，并通过转半乳糖苷的作用，将水解下来的半乳糖苷转移到乳糖分子，生成低聚半乳糖。	
使用范围	婴幼儿食品、乳制品、饮料、焙烤食品、糖果	
食用量	≤15克/天	
质量要求	性状	无色透明或淡黄色粉末
	低聚半乳糖含量(半乳低聚二糖到半乳低聚八糖)(以干基计)	≥57.0%
	无水乳糖含量(以干基计)	≤23.0%
	无水葡萄糖含量(以干基计)	≤22.0%
	干物质	74.0-76.0%
	PH	2.8-3.8

그림 108 중국 국가표준규격 (GB)

(가) 중국규격에 적합한 유기농갈락토올리고당 개발

확립된 유기농갈락토올리고당 제조공정에서 반응조건을 조절하여 중국규격에 적합한 당조성을 확인할 수 있었음.

또한 또한 pH조절을 위한 유기가공식품의 첨가물료 확인 결과 구연산만이 사용가능하여 구연산으로 pH를 조절하여 규격 설정 하였음.

표 60 반응조건조절 후 당조성

효소반응 시간(hr)	GOS(%)	Galactose(%)	Glucose(%)	Lactose(%)
12	33.6	0.17	10.5	55.73
16	39.5	0.36	15.4	44.74
20	48.6	0.41	18.3	32.69
24	53.7	0.56	20.6	25.14
28	55.3	0.65	21.4	22.65
32	57.9	0.72	20.3	22.08
36	58.8	0.87	21.6	18.73

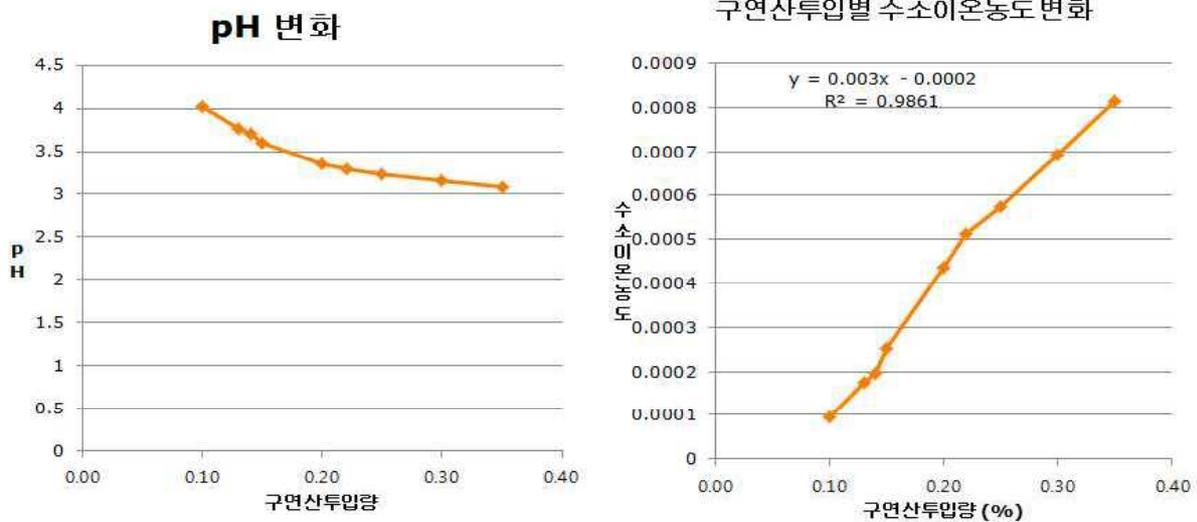


그림 109 구연산 투입량에 따른 품질변화

(4) 유기농갈락토올리고당 분말의 개발

제형의 다양성과 적용확대성을 위한 유기농갈락토올리고당의 분말화를 검토 하였음. 당류의 특성과 갈락토올리고당의 높은 흡습성으로 분말화에 많은 어려움이 있었으나, 적정 부형제 투입과 분부량 조절로 분말화에 성공함.

구분	부형제 0%	부형제 10%	부형제 20%	부형제 30%	부형제 40%
성상					
	편득한상태	편득한상태	조금 편득한상태	분말화되었으나 수분이 높음	분말화성공

그림 110 분말화 테스트 결과

다) 유기농 갈락토올리고당을 이용한 안전성평가(급성/아급성 독성 평가)

■ 실험방법 : *In vivo* cell study

(1) 실험동물 및 사육조건

시험동물은 중앙실험동물에서 생산된 SPF(특정 병원체 부재) Sprague-Dawley(SD)계 랫드를 분양 받아 순화시킨 후 평균 체중에 가까운 동물을 선택하여 온도 23°C±3°C, 상대습도 50%±10%, 조명시간 12시간(오전 7시~오후 7시) 및 조도 150-600 Lux로 전 시험기간 동안 폴리 카보네이트 사육상자(240 W x 390 L x 175 H mm)에 5마리씩 넣어 시험하였고, 시험기간 동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121°C에서 15분간 멸균하여 사용 하였고, 물과 사료는 자유 섭취시킨다.

(2) 시험물질

시험물질인 유기농 올리고당은 (주)네오크레마로 부터 제공 받아 사용한다.

(3) 급성/아급성독성 평가

급성 평가는 실험군은 2군으로 각각 무처리군, 실험 평가군으로 나누었으며, 무처리군은 생리식염수, 실험 평가군은 5,000 mg/kg의 고용량을 경구 투여하였다. 14일 후의 혈액학적 및 병리학적 변화를 측정하고, 아급성 독성시험은 4군으로 나누어 진행하였다. GOS 1,000 mg/kg 투여군, 생리식염수 투여군으로 14일 동안 투여 후 변화를 측정하였다.

(4) 혈액생화학적 검사

복부대동맥에서 채혈한 혈액중 일부를 혈액학적 검사로 이용하고 나머지 혈액은 4℃ 냉장 보관한 후 원심 분리 (3000 rpm, 10 min)하여 자동 생화학검사기(Express 550)를 이용하여 TPROT(total protein), ALB(albumin), TBILI(total bilirubin), AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase), ALP(alkaline phosphate), GLU (glucose), CHOL(cholesterol), TRIG(triglyceride), CREAT(creatinine), BUN(blood urea nitrogen) 등을 측정하였다.

(5) 혈액학적 검사

부검 전 1일간 절식시킨 후, ether로 마취시켜 복부 대동맥에서 채혈하였고, 채혈한 혈액은 항응고제로 EDTA-2K가 함유된 채혈병에 넣어 자동혈액검사기기를 이용하여 혈액학적 WBC(white blood cell), RBC(red blood cell), HGB(hemoglobin), Hct(hematocrit), BLP(blood platelet), MCV(mean corpuscular volume), MCH(mean corpuscular hemoglobin), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentration) 등을 측정 하였다.

(6) 통계처리

연구결과 얻어진 자료를 SPSS 통계 프로그램을 사용하여 하위그룹 각각의 기술 통계치(mean, SD)를 산출하였다. 사후 검증은 Tukey를 적용하였고 $p < 0.05$ 수준에서 유의 수준을 검증하였다.

■ 실험결과

(1) 체중 및 식이섭취량의 변화

GOS 에 대한 독성 실험을 진행한 결과, 체중증가량, 식이섭취의 변화에 control 과 실험 평가군 사이에 유의적인 차이가 없었다.

표 61 체중 및 식이섭취량 비교

	Group for acute toxicity ^a		Group for subacute toxicity ^b	
	Control	GOS	Control	GOS
Female				
Body weight gain (g)	77.67±8.87	67.23±6.52	58.16±11.16	43.40±17.12
Food intake (g/day)	21.52±4.42	19.37±4.93	16.50±0.79	15.87±1.95
Male				
Body weight gain (g)	87.31±9.81	69.06±15.35	70.8±12.0	60.9±20.4

Food intake (g/day)	20.26±5.22	19.37±4.93	21.810±0.87	20.89±2.17
---------------------	------------	------------	-------------	------------

(2) 전혈에서 변화

GOS 를 경구 투여후의 전혈(whole blood)에서의 혈액지표들을 평가한 결과 모든 Hematological parameters 에서의 control 과 실험군 사이에 유의적인 차이는 없었고, 이러한 결과는 acute 및 subacute test 에서 모두 동일하게 나타났다. 안전성이 확보되어 있음을 의미한다.

표 62 전혈의 혈액지표

Hematological parameters	Group for aute toxicity ^a		Group for subacute toxicity ^b	
	Control	GOS	Control	GOS
Female				
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	8.67±0.27	8.44±0.44	7.65±0.50	8.31±0.48
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	3.62±0.27	3.53±1.14	3.07±0.78	4.60±1.96
Hct (%)	53.60±0.42	50.55±1.41	47.73±2.11	50.68±4.14
Hgb (g/dl)	17.20±0.57	15.85±0.60	14.57±0.86	15.92±1.06
MCV (fl)	61.80±1.41	59.95±2.39	62.47±1.69	60.92±1.84
MCH (pg)	19.85±1.20	18.75±0.74	19.03±0.21	19.18±0.30
MCHC (g/dl)	32.10±1.27	31.28±0.32	30.47±0.57	31.46±0.75
Platelets ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	959.00±73.54	970.00±195.09	959.00±182.76	937.80±468.08
Male				
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	8.61±1.07	7.70±0.12	8.14±0.37	8.29±0.23
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	7.50±0.98	7.19±5.41	4.51±1.37	4.27±0.88
Hct (%)	59.60±8.45	51.23±2.46	54.15±2.05	54.90±0.85
Hgb (g/dl)	17.43±2.12	15.13±0.61	16.25±0.62	16.25±0.35
MCV (fl)	69.15±1.35	66.57±2.21	66.55±0.54	66.30±2.83
MCH (pg)	20.25±0.33	19.60±0.50	19.98±0.17	19.55±0.92
MCHC (g/dl)	29.28±0.76	29.50±0.26	30.00±0.24	29.55±0.21
Platelets($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1290.33±247.84	1049.33±245.40	1116.00±96.61	1235.00±94.04

(3) 혈액학적 변화

GOS를 경구 투여후의 혈액에서의 glucose, BUN, total protein, AST, ALT 등을 결과 Acute test 결과 male group에서의 Total protein의 수치에서 GOS 실험군의 수치가 control과 유의적인 차이를 보였으나, 정상범위내의 수치이므로 독성과는 무관한 듯 보이며, 다른 혈액학적 지표는 유의적인 차이가 없었다.

Subacute test에서도 모두 혈액학적 지표에서 GOS군과 control군 사이에 유의적인 차이가 없었으며, 혈액학적 지표의 경우 acute와 subacute test에서는 독성이 관찰되지 않았다.

표 63 혈액학적 지표

Blood biochemical parameters	Group for acute toxicity ^a		Group for subacute toxicity ^b	
	Control	GOS	Control	GOS
Female				
Glucose (mg/dl)	76.25±24.73	86.00±39.60	78.00±42.88	77.00±29.20
BUN (mg/dl)	20.30±2.21	19.90±0.28	21.18±3.84	21.18±5.15
Creatinine (mg/dl)	0.70±0.08	0.60±0.21	0.66±0.13	0.68±0.05
Total protein (g/dl)	6.78±0.15	6.65±0.21	6.38±0.31	6.80±0.08
Albumin (g/dl)	4.80±0.20	4.70±0.00	4.40±0.16	4.63±0.15
Total bilirubin (mg/dl)	0.65±0.21	0.85±0.07	0.66±0.24	0.48±0.05
AST (U/l)	79.25±13.96	91.50±17.68	109.40±18.09	97.25±26.54
ALT (U/l)	20.50±2.08	19.00±1.41	16.80±3.90	19.00±6.88
Male				
Glucose (mg/dl)	110.50±21.92	127.33±38.48	119.00±20.86	137.67±45.39
BUN (mg/dl)	18.08±2.57	17.13±3.10	18.76±2.48	17.10±2.65
Creatinine (mg/dl)	0.58±0.10	0.53±0.06	0.58±0.15	0.60±0.10
Total protein (g/dl)	6.65±0.17	6.30±0.10*	6.58±0.19	6.43±0.15
Albumin (g/dl)	4.48±0.10	4.37±0.06	4.26±0.21	4.17±0.10
Total bilirubin (mg/dl)	0.45±0.06	0.43±0.12	0.42±0.11	0.47±0.31

AST (U/l)	86.25±19.79	74.67±8.08	105.60±14.15	86.00±11.14
ALT (U/l)	19.00±11.17	16.67±3.06	18.00±3.81	15.00±1.00

(4) 장기의 무게변화

GOS 를 경구 투여후의 장기의 무게변화를 측정한 결과 간, 신장, 심장, 비장 등의 무게 변화는 control 과 실험군 사이에 유의적인 차이는 없었으며, Male 과 female 에서의 변화 역시 유의적인 차이가 없었음. 이는 GOS 안전성이 확보되어 있음을 의미한다.

표 64 장기 무게 변화

Relative organ weight (g/100 g of body weight)	Group for acute toxicity ^a		Group for subacute toxicity ^b	
	Control	GOS	Control ⁹	GOS
Female				
Liver	3.43±0.21	3.18±0.11	2.92±0.36	3.10±0.24
Kidney	0.77±0.01	0.75±0.03	0.72±0.05	0.70±0.05
Spleen	0.29±0.03	0.28±0.02	0.28±0.06	0.27±0.02
Heart	0.49±0.03	0.44±0.04	0.43±0.04	0.41±0.05
Male				
Liver	3.22±0.35	3.31±0.26	3.18±0.32	3.08±0.27
Kidney	0.75±0.08	0.78±0.07	0.76±0.08	0.76±0.05
Spleen	0.26±0.03	0.24±0.02	0.25±0.03	0.24±0.02
Heart	0.41±0.04	0.49±0.05	0.41±0.04	0.46±0.04

이상의 결과에 의하면, 유기농 갈락토올리고당(GOS)은 기존에 식품 원료로 사용되고 있는 소재로 이미 안전성이 확보되어 있고, Acute 과 subacute test 결과 독성이 없는 것으로 사료된다.

라) 유기농치즈부산물로부터 분리된 유당으로부터 유기농 락툴로스의 개발

락툴로스는 효소 또는 화학적인 이성화(Isomerization)반응에 의하여 생성되는 ketone 형태의 이당류로 이루어져 있고, 장 내 비피더스균을 증식시켜 정상효과를 일으키는 유당에서 유래한 밀크올리고당으로서 과당(fructose)과 갈락토스(galactose)로 구성된 무색 무취의 액상 및 분말로서 용해도가 높고 산뜻한 단맛을 내는 것으로 알려져 있다.

락툴로스는 특히, 장에서 베타갈락토시다제에 의해 분해되지 않고 대장에 도달하여 비피도 박테리움을 포함한 여러 유산균에 의해 이용되어 대장의 pH를 저하시켜 유해한 균의 성장을 억제하고 대장 내 균총을 유익한 방향으로 개선하는 효과를 나타내는 특징을 가지고 있다.

락툴로스는 비소화성 당이어서 수용성 식이섬유로 작용을 하며 변비와 만성 간질환으로 인한 뇌질병의 치료에 이용되고 있다고 알려져 있다.

이를 바탕으로 개발된 유기농락툴로스는 유기농제품에 적용되면 유기농갈락토올리고당과 함께 정상효과에 우수한 효과가 있을 것으로 기대되어 본 연구를 수행했다.

유기농락툴로스 개발을 위한 유기농 유당은 본 과제를 함께 수행하고 있는 제2협동기관인 매일유업(주)으로부터 전달받아 개발을 진행하였다.

(1) 순도 30% 이상의 유기농 락툴로스 개발

일반적으로 락툴로스는 화학적 이성화방법과 생화학적 이성화 반응을 통하여 얻어질 수 있는데, 화학적방법을 이용한 유기농 소재를 개발하기에 앞서 유기가공식품에 사용 가능한 식품첨가물에 대하여 조사를 실시 한 다음, 이를 바탕으로 화학적 이성화반응을 수행하였다.

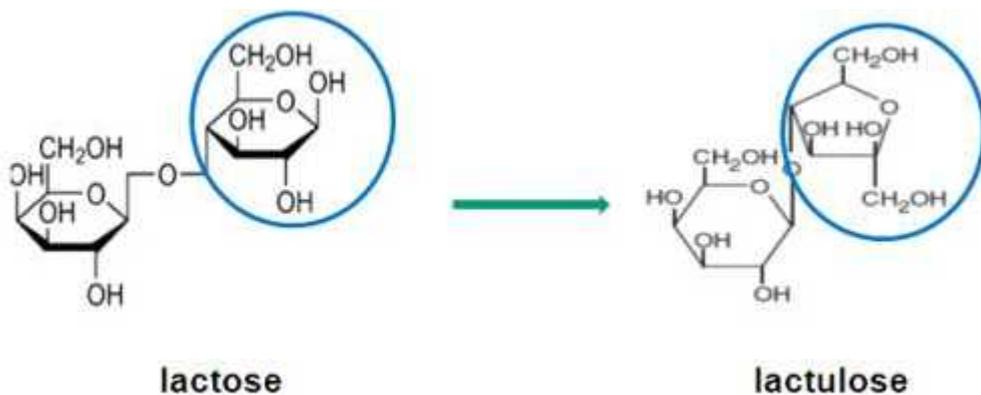


그림 111 락툴로스 이성화 모식도

(가) 유기가공식품 허용가능 식품첨가물

표 65 유기가공식품 허용가능 식품첨가물

명칭	국제분류 번호	식품첨가물 사용 시		가공보조제로 사용 시	
		허용 여부	허용 범위	허용 여부	허용 범위
수산화나트륨 (NaOH)	524	허용	곡류	허용	설탕 가공 중의 산도 조절제, 유지가공
수산화칼륨	525	허용불가	-	허용	설탕 및 분리대 두단백
수산화칼슘	526	허용	토르티야	허용	산도조절제
탄산나트륨	500(i)	허용	케이크,과자	허용	설탕가공 및 유 제품 중화제
탄산칼슘	170(i)	허용	식물성제품, 유제품 (탄산칼슘을 착색료로는 사용하지 말 것)	허용	제한 없음

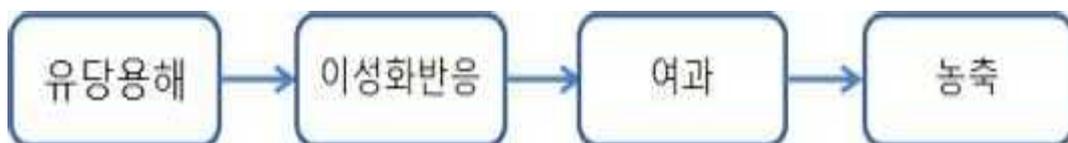
상기의 식품첨가물들 중, 락툴로스를 이성화시키는 원료인 유당에 사용 가능한 식품 첨가물은 탄산나트륨과 탄산칼슘이었다.

락툴로스의 화학적 생산 공정은 당분자가 갖고 있는 알데하이드(R-CHO)와 케톤(R-C=O) 반응기에 알칼리약품을 반응 촉매(catalyst)로 사용하여 알데하이드와 케톤기를 이성화(isomerization)시키는 방법으로 생산하고 있다.

(나) 유기농 락툴로스 반응조건 수립

본 실험에 사용된 유기농 유당은 매일유업(주)로부터 제공받은 유기농치즈부산물로부터 분리 정제된 유당이며, 전환률 비교를 위해 시판 유당(Lactose, extrafine grind edible 5030, hilmar cheese company INC., USA)도 포함하여 연구를 수행하였다.

■ 유기농 락툴로스 전환률 확인시험 방법



기질농도 : 20~60° brix

반응온도 : 65~85℃

반응시간 : 30~180min

반응촉매 : 탄산나트륨

(다) 반응조건별 유기농유당 적합성 실험

반응조건 별, 유당 제조사별 락툴로스 순도를 비교한 결과는 아래와 같으며, 결과는 3회 반복실험의 평균 함량 값을 사용하였다.

순도 계산방식은 유당이 탄산나트륨에 의해 전환된 락툴로스를 계산하였으며 표준품을 이용한 정량 분석을 실시하였으며, 분석조건은 아래 표와 같다.

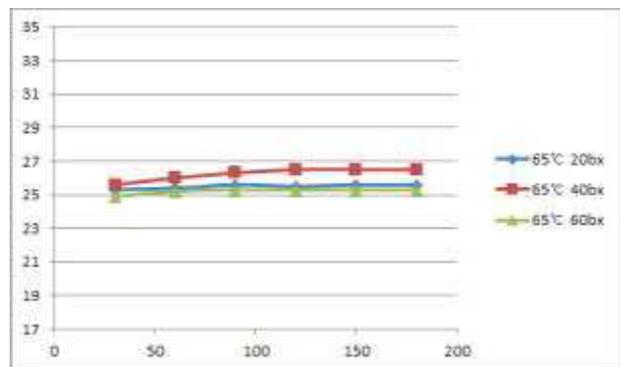
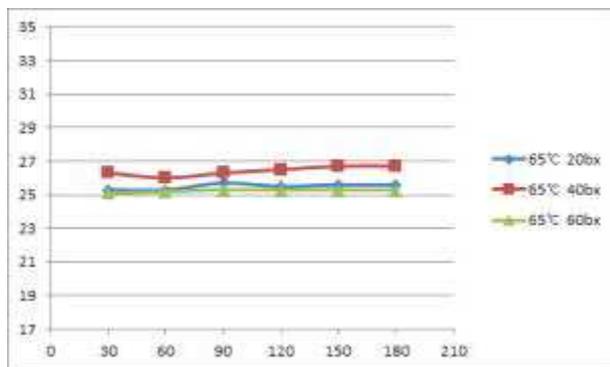
표 66 HPLC 분석조건

HPLC-RID (Refractive Index detector)	
Column	YMC Polyamine II
Mobile phase	Acetonitrile 64%
Flow rate	1.0mL/min
Column Temperature	30°C
Injection volume	20 μ L
Detector Temperature	45°C

< x축 : 반응시간(min) , y축 : 락툴로스 순도(%) >

매일유업(주) 제공 치즈부산물분리 유당

시판유당



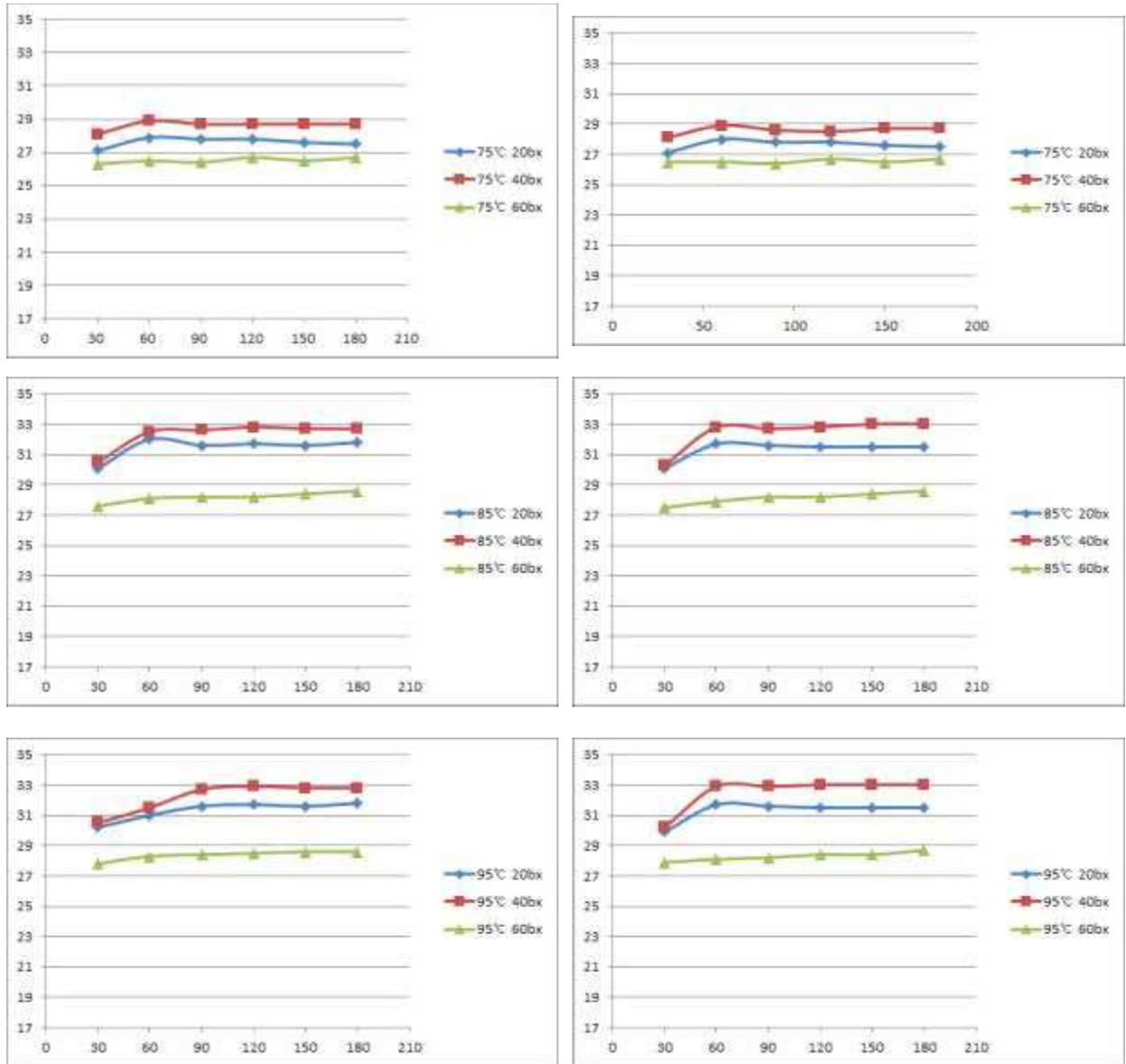


그림 112 반응조건별 락툴로스 순도 비교

원료의 적합성 확인은 본과제 제2협동기관인 매일유업(주)으로부터 제공받은 유기농유당과 시판 유당의 락툴로스 순도를 비교하여 적합성을 판단할 수 있었고, 실험결과 생성된 락툴로스의 순도는 시판중인 락툴로스와 차이가 없어, 치즈부산물로부터 분리된 유당이 락툴로스 제조용으로 적합한 것으로 판정하였다.

기질인 유당의 반응농도에 있어 기질농도가 20~40° brix에서 순도 30% 이상의 전환율을 확인 하였으며 기질농도가 높을수록 반응이 저해되는 경향을 보인다.

따라서, 시생산 및 상업화에 적절한 생산수율을 고려하여 적정 기질농도는 40° brix로 결정하였으며, 60분 이후의 반응시간에 따른 락툴로스 순도 변화는 미비하여 적정 반응 시간은 60분으로 설정했다.

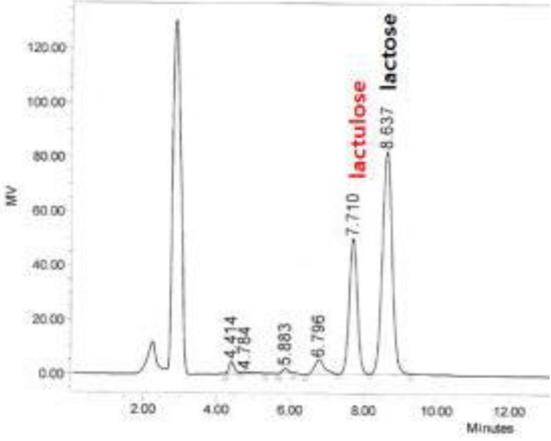
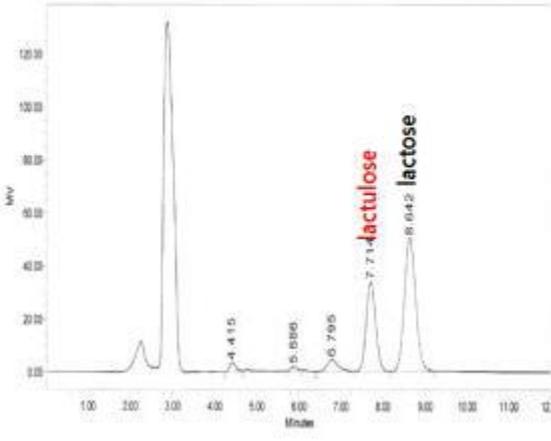
반응 온도	85℃	95℃
성상		
분석 결과	 <p style="text-align: center;">락툴로스 32.8% 확인</p>	 <p style="text-align: center;">락툴로스 33% 확인</p>

그림 113 온도에 따른 순도 변화

(라) 최적 이성화 반응 조건 실험

락툴로스 이성화반응 시 최적 반응온도 확인하기 위해 65~ 95℃까지 반응온도를 상승시키며 이성화반응을 진행한 결과 반응온도가 높을수록 락툴로스 순도가 높아지는 경향은 확인하였지만 반응 종료 후 진한 색상을 나타내는 성상은 이온교환수지를 이용한 탈색공정이 필요한데, 유기 가공에서는 사용할 수 없기 때문에 성상 변화와 순도의 관계가 많이 벗어나지 않은 제품이 적절하다고 판단되었고, 락툴로스 순도는 85℃의 반응온도에서 32.8%로 확인되어 적절한 반응조건으로 설정하였다.

■ 실험방법

온도별, 기질농도별, 반응시간별 락툴로스 전환률을 비교한 결과 85℃, 반응시간 60분, 기질농도 40° brix로 반응조건을 결정함.

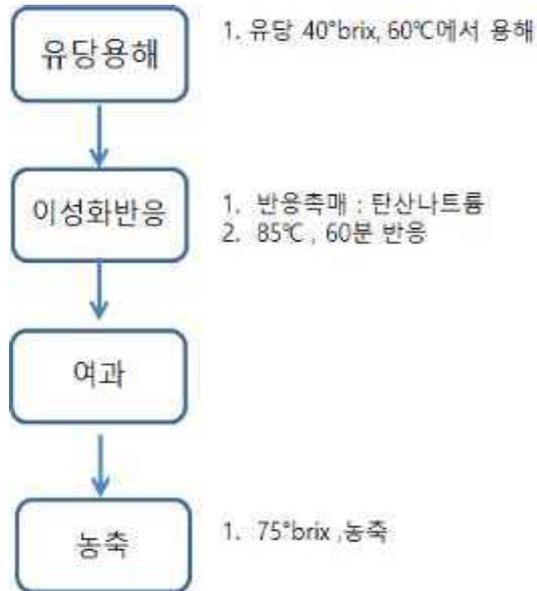


그림 114 1차 반응 조건

■ 실험결과

실험 결과를 바탕으로 상기와 같이 반응 조건을 설정하였으나, 상업화를 위한 안정성 및 저장성 확인을 위해 상온에서 보관 후 성상변화를 관찰한 결과 침전물이 형성됨을 확인할 수 있었다.



그림 115 1차반응 테스트 후 보관테스트 결과 : 침전물 발생

당액상등액과 침전물을 분석한 결과 당액상등액 내 유당 함량이 감소하였으며, 당액 침전물에서는 유당과 동일 RT값이 확인되어 유당 제거를 위한 반응조건 변경이 필요하였다.

(마) 락툴로스 분석방법

이성화반응 후 생성된 락툴로스를 분석은 HPLC를 이용하여 실시하였고, 당분석에 적합한 검출방법인 RI(refractive index) 디텍터를 이용하여 락툴로스를 검출하였다.

[표20] HPLC 분석조건

HPLC-RID (Refractive Index detector)	
Column	YMC Polyamine II
Mobile phase	Acetonitrile 64%
Flow rate	1.0mL/min
Column Temperature	30°C
Injection volume	20 μL
Detector Temperature	45°C

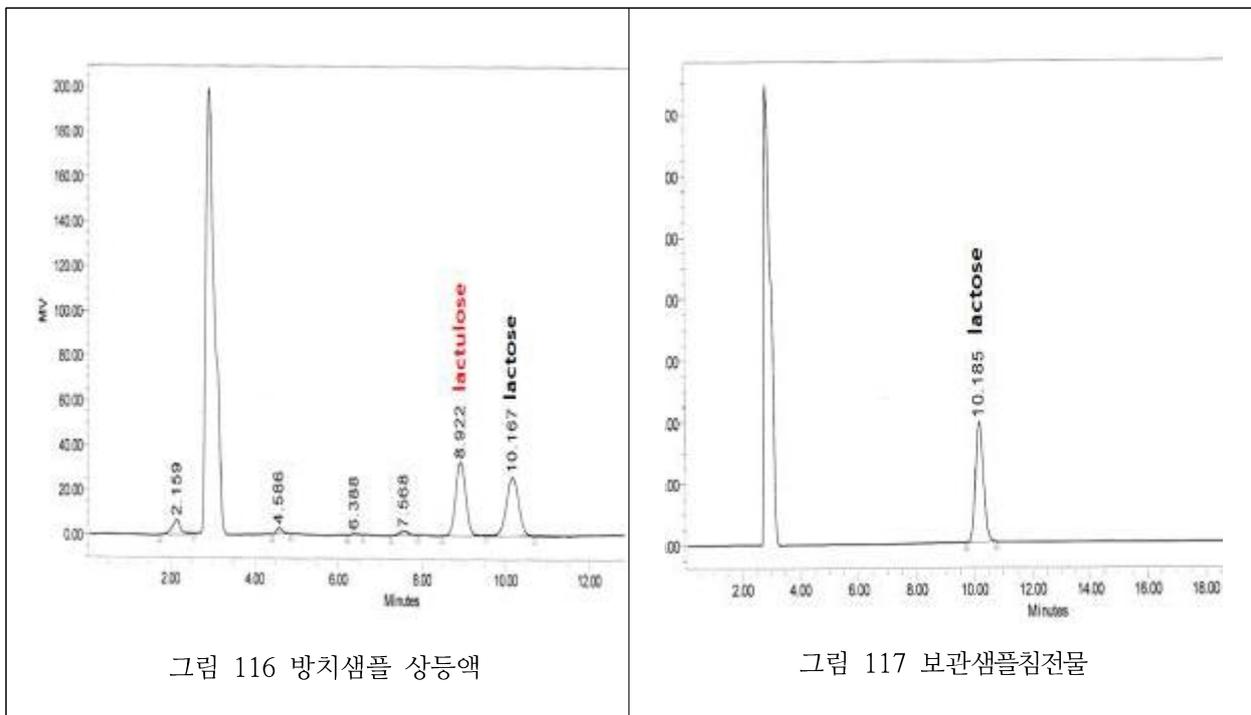


그림 116 방치샘플 상등액

그림 117 보관샘플침전물

(바) 락툴로스 반응 후 당액 내 유당제거

유당으로부터 락툴로스로의 이성화 반응 종료 후 유당제거를 위한 ① 효소적방법 과 ②필터프레스를 이용한 여과 방법 그리고 ③ 연속식 원심분리 방법을 검토하여 실험을 수행했다.

① 효소적 방법을 이용한 당액내 미반응 유당 제거

유당이 침전물로 발생하기 전 당액 내 유당 제거를 위해 1차년에 연구한 갈락토올리고당을 생성효소인 lactase를 이용하여 부산물인 유당 제거 실험을 실시하였다.

▶ 실험 방법

효소반응은 검출된 유당량 대비 0.1%(w/w) β -galactosidase를 투입하여, 50°C에서 24시간 반응을 진행했다.

▶ 실험결과

이성화반응 종료 이후 HPLC 분석을 수행한 결과 잔여유당의 대부분은 갈락토올리고당으로 전환이 되는 것을 확인 할 수 있었다.

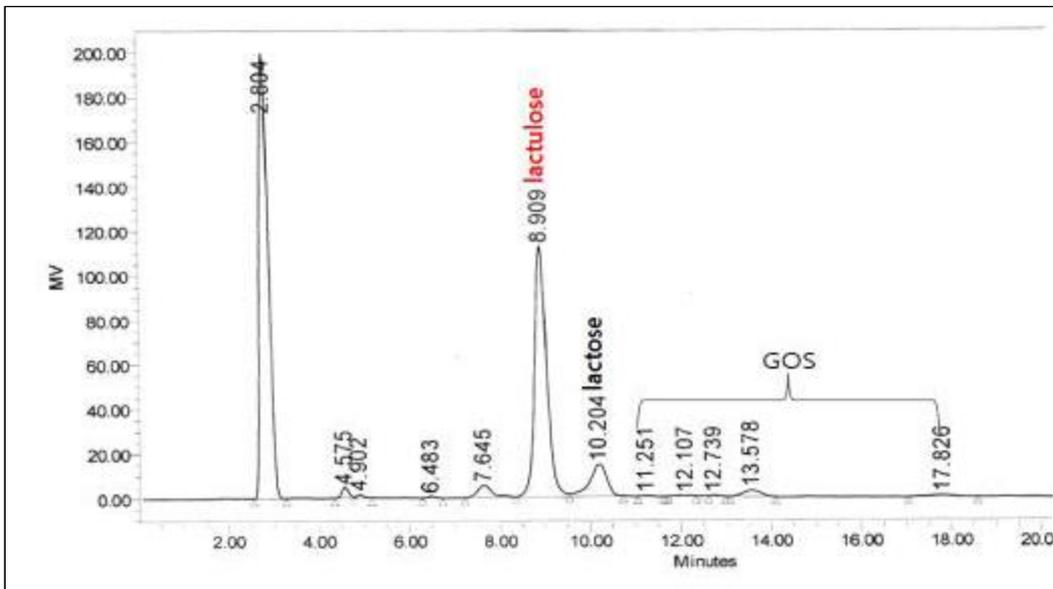


그림 118 이성화 반응 후 효소반응

② 필터프레스를 이용한 미반응 유당제거

필터프레스는 가압식 여과장치로써 슬러지가 여과포를 통과하면서 가압력에 의해 액체와 고체가 분리되는데, 유당결정을 유도하기 위하여 농축하여 반응당액 내 고형분 함량을 높여 포화농도를 넘어선 유당결정을 필터프레스를 통과시켜 제거하였다.

이때 반응 당액의 온도는 20°C 이하로 유지 시켜 유당결정이 발생할 수 있도록 유도하였다.

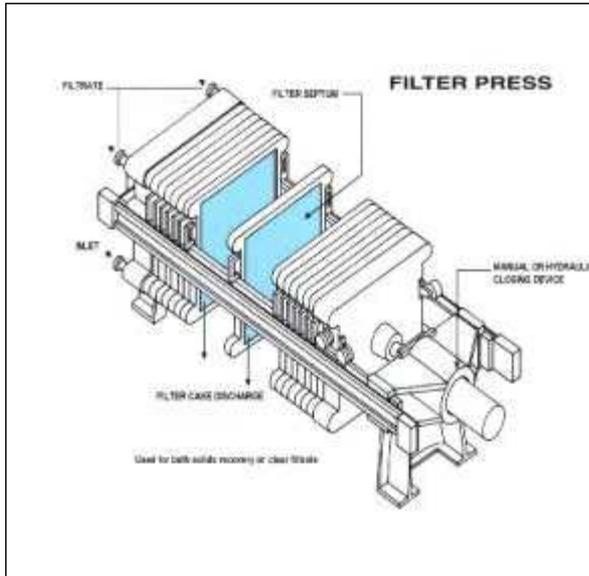


그림 119 필터프레스

반응 종료 이후 분석한 결과 이성화 반응 이 후 반응액내 남아있던 미반응유당이 결정 생성으로 제거 되는 것을 확인 할 수 있었으며 실제 상업화 시 중요한 안정성 및 저장성 확인을 위해 실온, 4℃ 방치 실험을 진행하였다.

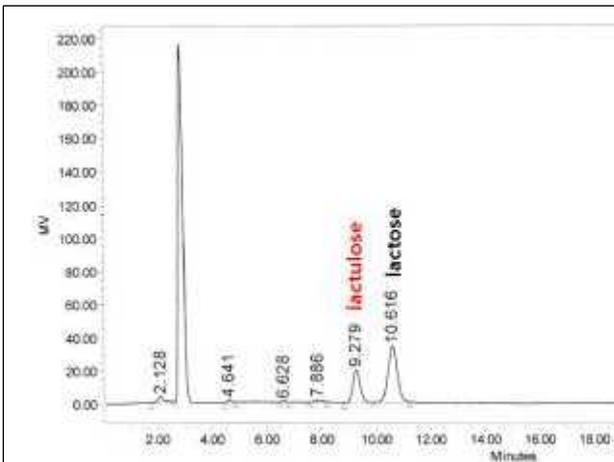


그림 120 필터프레스전반응액

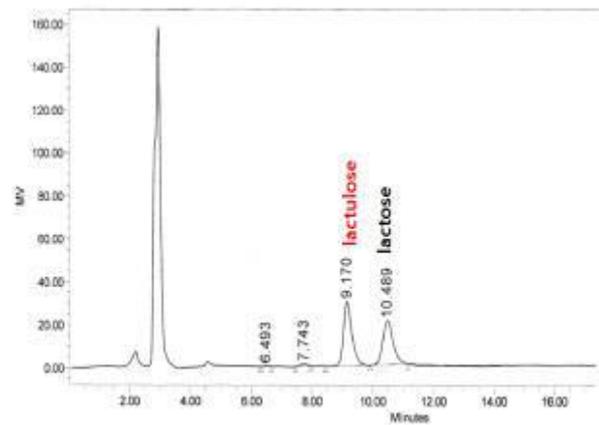


그림 121 필터프레스 후 반응액

③ 연속식 원심분리기를 이용한 미반응 유당제거

- 연속식 원심분리기는 섞이지 않는 액체간 또는 액상의 혼합물을 완벽히 단계별 연속적으로 분리할 수 있는 장비로서, 결정으로 생성된 당액을 원심분리기의 심장부에 해당하는 드럼 내부로 투입시키고 비중이 큰 물질은 중립 홀 밖으로 배출시키고, 무거운 잔류물은 침전물 구역에 축적되어 당액과 결정 유당을 분리하였다.



그림 122 연속식원심분리기

실험결과, 유당결정 석출을 위한 당액자체의 높은 브릭스에서의 점도와 3000rpm의 낮은 회전력으로 인하여 당액과 유당의 분리가 원활히 진행되지 못해 분리된 당액 내에 여전히 유당이 남아있는 것을 확인할 수 있었다.

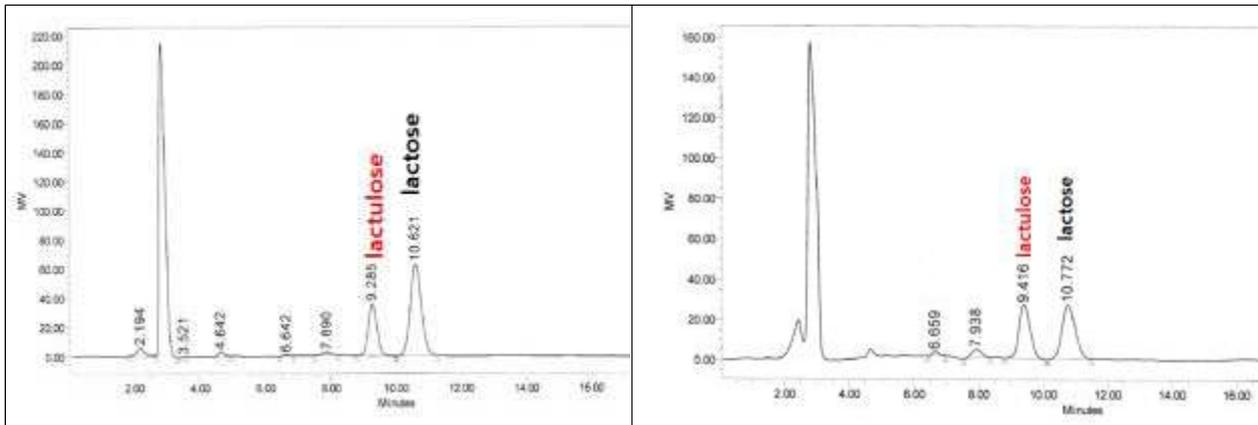


그림 123 연속식 원심분리기 여과 전 후

방치 테스트 결과 이성화 반응이후 당액내 남아 있는 미반응 유당 제거를 위해서 효소반응을 이용한 유당제거 방법은 추가로 투입되는 효소와 공정비용이 발생하지만 추가적인 유당 결정이 생성되지 않았고, 필터프레스와 연속식 원심분리기를 이용한 여과 방식은 결정이 생성 된 후 많은 결정석출을 위한 농축과 당액 냉각을 위한 장비설치 및 비용이 추가적으로 발생하였으며 여전히 당액내 유당이 침전되는 것을 확인되었다.

결과적으로 이성화 반응 후 효과적인 유당 제거를 위해서는 유당량 대비 0.1%(w/w) β -galactosidase를 이용한 공정과 반응 중 발생할 수 있는 유당 침전물 제거를 위해 필터프레스 여과 공정을 수행하는 것이 적합함을 알 수 있었다.



효소반응 후



필터프레스여과 후



원심분리기여과 후

그림 124 유당 제거 실험후 방치테스트 결과

▣ 대량생산을 위한 최적공정 개발

앞서 수립된 순도 30% 락툴로스 이성화반응 설정조건을 이용하여 순도 30%의 유기농락툴로스 제조 및 산업화를 위한 대량생산 공정을 수립하고자 최적공정 개발을 수행하였다.

락툴로스는 현재 Canlac group의 Abbott Products Inc.社의 Solactis를 비롯하여, 이탈리아의 Fresenius Kabi 社의 Lactulose solution, 일본 Morinaga 社에서 제조하고 있으며 국내는100% 수입에 의존하고 있어, 유기농락툴로스의 사업화는 수입대체의 효과를 기대하고 있는 것을 목표로 한다.

대량 생산을 위한 최적 공정 개발은 앞서 실험한 결과를 바탕으로 (주)네오크레마 연구소에서 5kg의 유당을 이용한 lab test 후 외부기관에 락툴로스 순도확인 실험을 의뢰함.

외부기관의 분석확인 결과 1차 test 결과에서 얻어진 락툴로스의 순도는 38.4%임을 확인하였고, 재현성 실험을 위해 2차 test를 수행하여 만들어진 락툴로스 순도는 37.5%로 확인되었다.

이성화 반응 후 당액 내 유당 제거를 위해 효소반응 진행하였고 공정 중 발생한 결정 유당을 제거를 위해 필터프레스 여과공정을 진행한 결과 최종 락툴로스 순도가 단순 이성화 반응 시 보다 상승되었다.

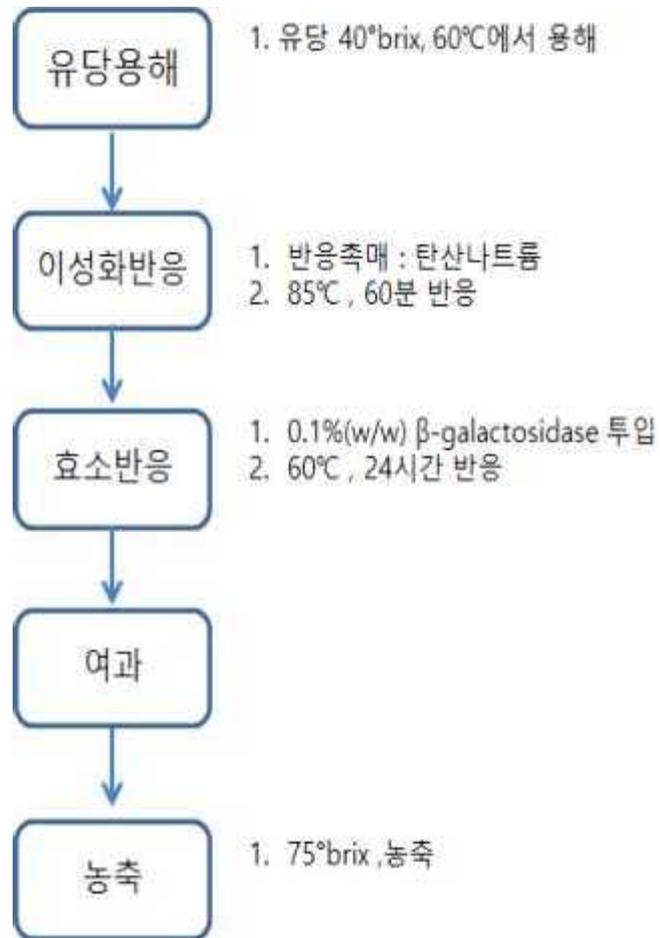
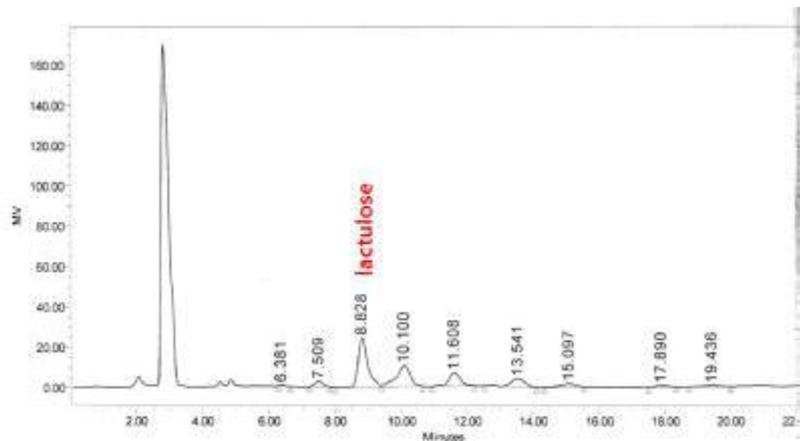


그림 125 유기농락톨로스 제조공정도

▶ 1차 락툴로스 제조 test 결과



성상



HPLC chromatogram



시험 · 검사성적서

발행번호	R20160721-0003	접수번호	160100840-001	
검사완료일	2016-07-21	접수완료일	2016-07-08	
제품명	30% lactulose (고형분 33%) A			
(품목)제조번호				
유형 · 재질 · 목적명	기타기준규격외			
제조(수입)일	유형(품질유사)기함			
프리카	성명			
	소재지			
제조명	입체명	제조국		
	소재지			
시험 · 검사목적	식품(기타)참고용(식품)			
시험 · 검사 항목 및 결과				
시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
락투로스(N)	기준없음	36.40(합분부로서)	상기사항확인함	

출발장소 : 상기사항확인함

시험실사명 : 장진영

시험검사책임자 : 김영희, 성진영

비고 :

※ 위 판정은 최하위 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 ※ 시험이 부패된 경우 시험 · 검사 항목 및 결과일은 별지로 작성 가능합니다.
 ※ 검사결과를 광고하거나 표기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.
 ※ 식품 · 의약품분야 시험 · 검사 등에 관한 법률 제11조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제4항제3호에 따라 위와 같이 시험 · 검사성적서를 발급합니다.

2016년07월21일

주식회사 다이이분석센터



11675-경기도 파평부서 가동로 92,3-4 용가동동 주식(합법)

T:031-836-5123

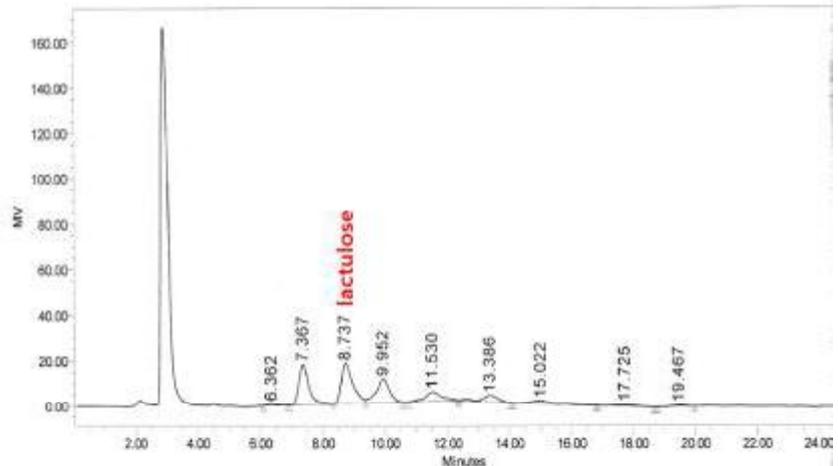
F:031-836-5124



본 시험 성적서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통해서 어떤지 여부를 확인할 수 있습니다. <http://sms.mfds.go.kr> Page 1 of 1

[그림39]외부기관 성적서

▶ 2차 락투로스 제조 lab test 결과



생산작업 표준서

유기농 락툴로스

구분	작성	검토	승인
부서	연구개발부	생산관리부	대표
성명	김나리	이창희	김재환

계균필터를 통과한 당액은 농축기로 이송하여 당액을 농축시킨다
(당액의 농축농도 : 75Bx 이상)

- 7) 품질검사
농축이 완료되면 이화학적 분석 및 미생물 분석을 실시하여 당사 품질규격에 적합 여부 검사/확인한다
이화학적 검사항목 : 당액농도, pH, 당소성, 중금속 분석
미생물 검사 항목 : 세균총상, 이물/이취, 기타 관능검사 실시
- 8) 계통모양
품질검사가 완료되면 계통을 일정용기에 충전한 후, 당당소에 보관한다.
관계를 모양은 원모양과 별크로양으로 나누어 포장을 실시한다

신규제정 2016.09.30,
주식회사 네오크레마

1. 적용범위
본 생산작업 표준서 "유기농 락툴로스" 생산에 대해 적용한다
2. 작업표준
 - 1) 원료 확인 절차
입고된 원료의 원산지, 생산일자, 포장상태, 중량을 확인한 뒤 100g을 샘플 채취 하여 수분 측정, 이물-검사의 입고 절차를 실시한다
 - 2) 원료 투입
1번 반응조에 유당 반응액이 40.0±2.0%가 되도록 원료 투입을 한다.
 - 3) 이설침반응
투입된 유당반응액의 농도를 85%로 유지시킨 후 유당의 1% 탄산나트륨을 투입한다.(1시간 반응)
반응 종료후 당액중량을 재확인하여 HPLC 분석장치를 이용하여 당소성 분석을 실시한다
 - 4) 효소반응
당소성 확인 후 당액내 극당당을 계산하여 유당을 0.1% (w/w) β-D-galactosidase(계통명 Lactozyme-B 제조사 제노포커스)를 투입하여 60°C에서 24시간 반응한다
반응 종료후 당액중량을 재확인하여 HPLC 분석장치를 이용하여 당소성 분석을 실시한다
 - 5) 여과
서스펜션(하수종)을 견적리 여과용(0.5~1.0mm카로리지 필터)으로 통과시킨 당액을 필터프레스로 연결하여 효소잔류를 및 이물을 여과 한다.
 - 6) 계관/농축
2차여과 당액(공정탱크 미수당액)은 0.22um 계균필터에 통과시켜 당액에 존재하는 미세 이물 및 미생물을 제거한다.

[그림41] 30% 락툴로스 생산작업표준서

(2) 순도 40% 이상의 유기농 락툴로스 개발

확립된 순도 30% 이상이며 유기농 락툴로스 고정을 기반으로 순도 향상을 목표로 하였다.

시생산 결과 37~38% 이상의 락툴로스 생산에 성공하였으며 미반응 유당제거로써 락툴로스의 순도 향상을 기대하였으며, 유당제거방법으로 ①효소적 전환과 ② 효모발효 ③ 미반응 유당 결정화를 검토 하였다.

(가) 순도 향상을 위한 미반응 유당 제거방법 개발

① 효소적 전환

유당이 침전물로 발생하기 전 당액 내 유당 제거를 위해 2차년에 연구한 갈락토올리 고당을 생성효소인 β -galactosidase를 이용하여 부산물인 미반응 유당 제거 실험을 위해 효소양을 증가시켜 실시하였다.

■ 실험방법

- 반응용액 농도 : 25.0~30.0Bx
- 반응온도 범위 : 60~65°C
- 반응 pH 범위 : pH 6.0~6.5
- 사용 효소 종류 : 베타-갈락토시다제 (beta-galactosidase)
- 효소사용량 : 반응용액의 고형분 대비 0.1~0.2%

■ 실험결과

표 73 효소반응결과

구분	효소				
	0.1%	0.12%	0.15%	0.17%	0.2%
과당	4.2	4.9	4.8	4.7	4.5
포도당+갈락토즈	16.1	15.4	15.2	13.6	14.4
락툴로스	35.1	35.2	34.8	35.6	35.3
갈락토올리 고당	15.2	13.6	14.1	13.5	14.2
유당	27.4	30.9	31.1	32.6	31.6

효소량 증가에 따른 락툴로스 순도 향상은 효소 0.1% ~ 0.2%투입과의 큰 차이를 보

이지 않았으며, 생성된 GOS와 단당류들이 반응을 억제하여 더 이상 유당이 분해되거나 전환되지 못함을 알 수 있었다.

② 효모발효

발효실험의 목적은 발효를 이용한 단당류 제거를 통해 상대적으로 락툴로스 도향상을 위한 제조기술이다.

발효물질로는 유기가공에 사용가능하며 자사의 기술력이 확보된 효모로 선택하였다. 단당류는 효모발효에 의해 제거되지만, 락툴로스 효모발효를 하지 않는 비발효성 당성분이기 때문에 상대적으로 락툴로스의 순도증가를 기대하였다.

유당으로부터 락툴로스를 제조하고 효소 반응 후 생성되는 단당류(포도당)를 제거하기 위해 발효공정을 추가하였으며, 단당류 발효를 위한 효모는 맥주, 와인, 빵 등에 사용되고 알코올발효능력이 뛰어난 *Saccharomyces* 속의 *cerevisiae* 효모를 제조사에 따른 비교실험을 진행 하였다.

■ 실험방법

- 반응용액 농도 : 25.0~30.0Bx
- 반응온도 범위 : 30~35°C
- 반응 pH 범위 : pH 6.0~6.5
- 사용 효모 종류 : *Saccharomyces cerevisiae*
- 효모사용량 : 반응용액의 고형분 대비 0.1~0.5%
- 반응시간 : 24시간

표 74 효소반응 후 효모반응 결과

구분	효모				
	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%
과당	4.35	5.3	5.2	6.2	5.8
포도당+갈락토스	9.6	8.5	7.2	5.9	1.1
락툴로스	34.26	36.1	35.9	36.5	40.8
갈락토올리고당	13.662	14.1	14.9	15.2	15.7
유당	38.13	36	36.8	36.2	36.6

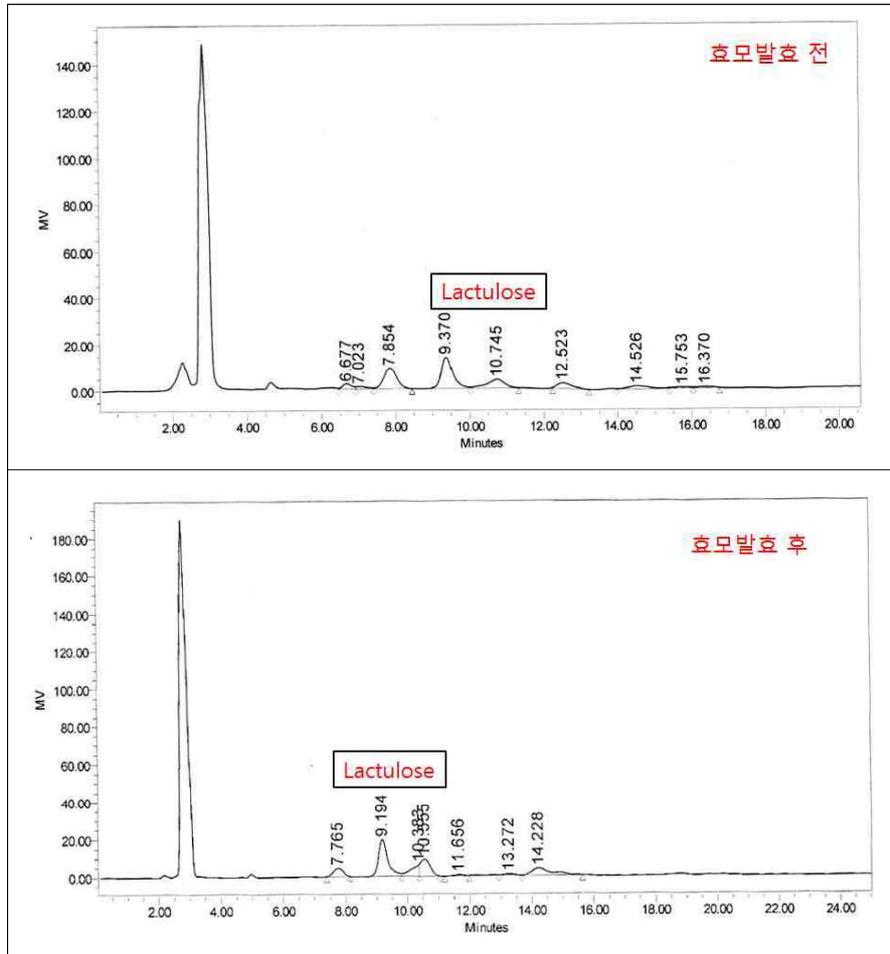


그림 128 효모발효 전 후비교

효소반응 이후 효모 0.5%이상 투입시 락툴로스 순도 40%이상을 확인 할 수 있었다.

하지만 단당류가 발효를 통해 감소한 결과 상대적으로 다른 당조성비율도 상승하여 유당의 함유량이 높아져 75° 농축 후 방치결과 유당석출이 일어났다. 효소반응 이후 효모발효를 수행 할 경우 상대적 락툴로스의 순도는 증가 될 수 있으나, 제품 품질 저하 문제가 생겨 유당제거를 위한 다른 방법을 모색하였다.



그림 129 효모발효 이후 방치 결과

③ 미반응 유당 결정화

이성화 반응 이후 락툴로스 순도 향상을 위해 미반응 유당제거를 위한 결정화방법을 선택하였다.

결정화에는 Seeded 결정화와 unSeeded 결정화의 두가지 방법으로 나누어진다.

Seeded 결정화는 seed 결정을 투입하고 seed를 성장시키는 방법이며, unSeeded결정화는 용액의 온도를 불안정영역까지 낮추어 자연적으로 seed를 형성시켜 성장시키는 방법이다.

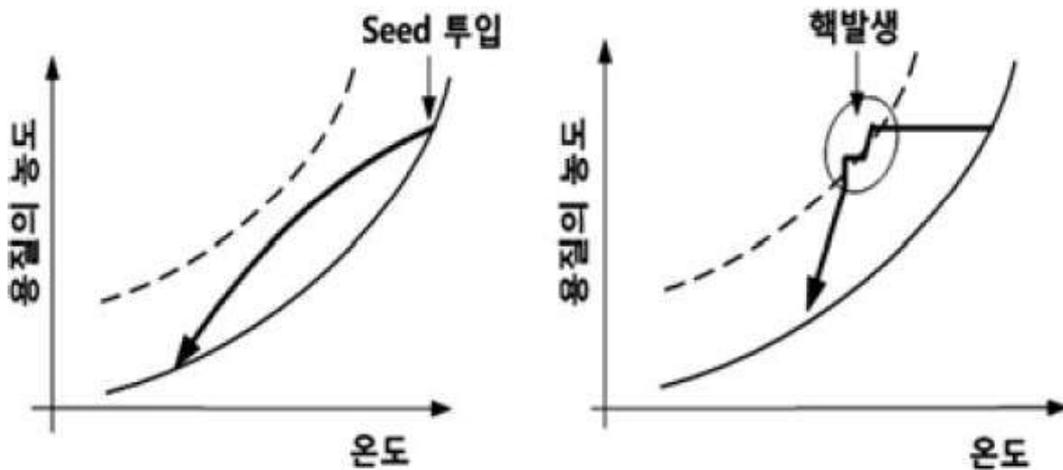


그림 130 Seeded 결정화(좌)와 unSeeded 결정화(우)

일반적으로 unSeeded 결정화가 가능하며 유당결정은 과포화 상태에서 60℃ 이하의 온도 조절에 의해 잘 형성되며 형성된 유당 결정은 원심분리기 및 필터프레스에 의해 제거가 가능하다.



그림 131 미반응유당 결정화

결정화를 통한 락툴로스의 순도 향상은 42.3% 확인되어 순도가 향상된 락툴로스가 받은 성공하였다.

하지만 연속적 결정화를 여러 번 반복해야 하는 공정상의 번거로움과 생성된 여과된 결정유당의 활용에 있어서 검토가 필요하다.



유당결정형성



유당결정



여과후 락툴로스

그림 132 유당결정화를 통한 락툴로스

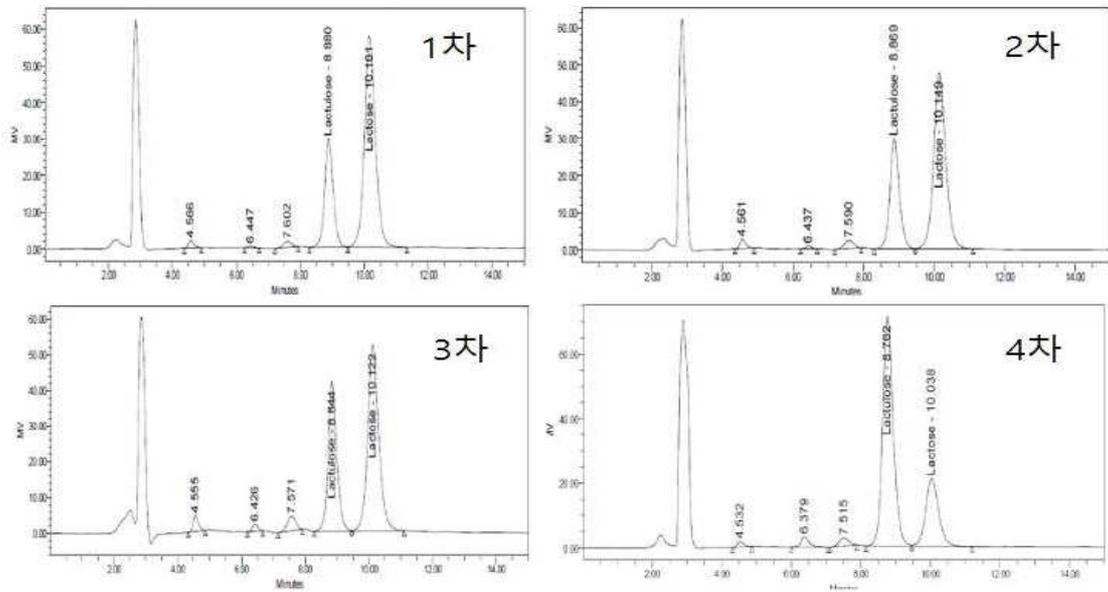


그림 133 반복결정화를 통한 락툴로스 제조

표 75 빈복 유당 결정화 결과

당조성(%)	미반응 유당 결정화 (60°C이하)			
	1차	2차	3차	4차
과당	0	0.2	0.6	0.7
포도당 + 갈락토즈	0.5	1	2.7	3.5
락툴로스	22.1	31.8	37.7	42.3
유당	75.0	68.4	55.9	46.2

(3) 유기농 치즈부산물 기능성소재에 대한 기능성평가

(가) 유기농 갈락토올리고당의 유산균 증식작용

① 50% 갈락토올리고당(GOS)의 *in vitro*에서의 유산균 증식 평가

■ 실험방법

배지에서 당 이용능 판별하는 당 이용능 검색 배지 modified-Peptide-Yeast-Fields medium(m-PYF)를 선정하였으며, 50% 갈락토올리고당(GOS)를 0.22 μ m membrane filter로 제균 후 0, 0.5, 1, 2, 4% 첨가한 당이용 검색배지 제조하였다.

Probiotic 유산균으로 *Lactobacillus acidophilus*, *casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *longum*을 선정하였으며, 이틀간 12시간마다 배양액의 흡광도를 분광광도계 660 nm 파장에서 측정 및 3번의 반복실험을 통해 평균을 구하였다.

■ 실험결과

배지에 함유된 50% 갈락토올리고당(GOS)의 함량에 따라 유산균의 증식효과를 분석하였다.

유산균 *Lactobacillus acidophilus*의 경우 50% 갈락토올리고당(GOS)가 1.0, 2.0, 및 4.0% 함유된 배지에서 비슷한 경향의 증식효과를 나타내었다.

유산균 *Lactobacillus casei*에서는 4.0%의 50% 갈락토올리고당(GOS)가 함유되었을 때 가장 높은 증식효과를 나타냈으며, 0.5, 1.0 및 2.0%가 함유된 배지에서는 비슷한 경향의 증식효과를 나타낸 결과를 얻었다.

또한, 유산균 *Bifidobacterium bifidum*의 경우에는 50% 갈락토올리고당(GOS)가 1.0, 2.0, 및 4.0% 함유된 배지에서 유사한 증식효과를 나타내었다.

유산균 *Bifidobacterium longum*에서는 4.0%의 50% 갈락토올리고당(GOS)가 함유되었을 때 가장 높은 증식효과를 나타냈으며, 1.0 및 2.0% 함유된 배지에서는 비슷한 증식효과를 나타내었다.

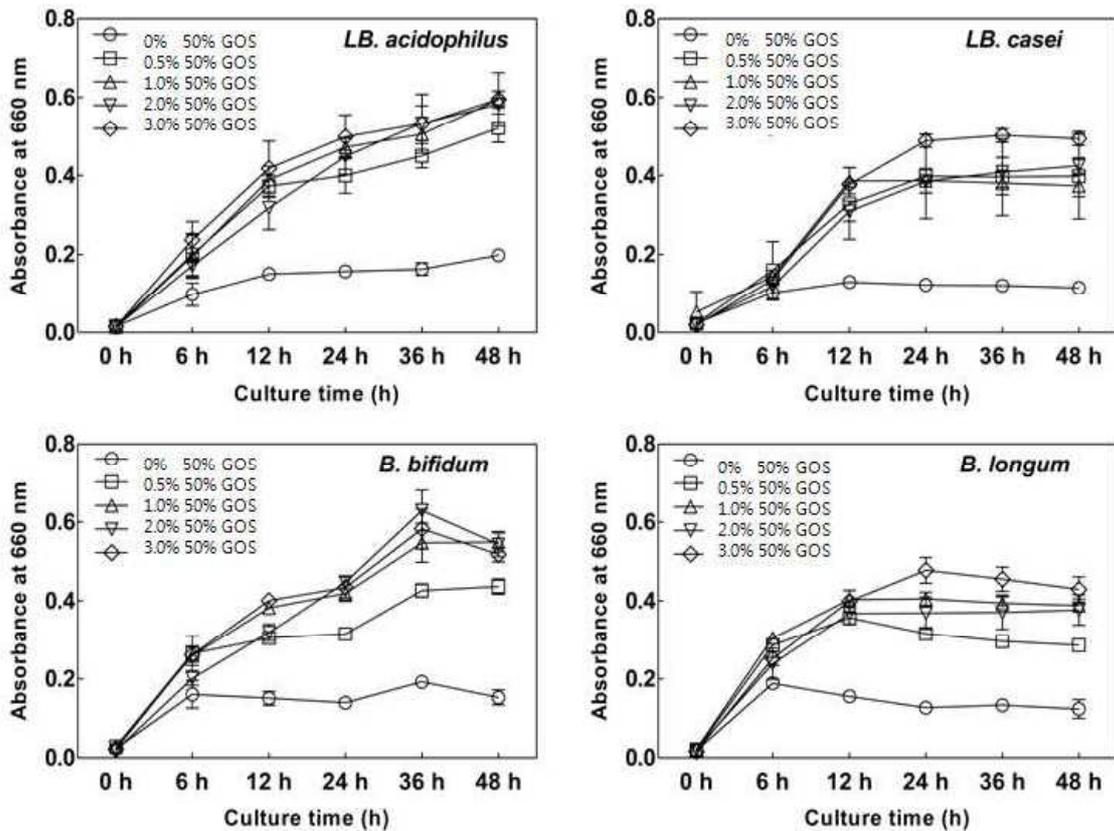


그림 134 유산균증식평가

② 유기농분유 시제품을 이용한 *in vivo*에서의 유산균 증식 평가(SD rat)

■ 실험방법

(1) 실험동물의 처치

실험동물로는 SD rat 수컷을 사용하였다. 실험군은 두 가지로 정상대조군과 분유 섭취군으로 나뉘었다. 동물 사육실 환경 온도는 $21 \pm 1^\circ \text{C}$, 상대습도는 50 ~ 55%, 명암은 12시간 주기로 조절하였고 음수와 사료는 자유급식으로 하였다. 분유 섭취군은 분유(Mail사 ‘엠플루트’)를 0.7 g/mL 농도로 하루 2 회 2 mL씩 일주일 동안 경구투여하고 24 시간 후 이산화탄소로 마취하여 희생하였다.

(2) 맹장 내 변의 균 수 측정

적출한 맹장에서 변을 1 g씩 채취하여 Peptone buffer로 10^{-1} 부터 10^{-9} 까지 희석하였다. 비선택 배지: LB (Luria-Bertani), 선택 배지: BL, MRS 를 멸균(121°C , 15 분)한 후 100 π 페트리 디쉬에 20 mL씩 분주하여 평판배지를 제조하였다. 적정 colony 개수(25 ~ 250)가 측정되는 농도를 $10^{-1} \sim 10^{-9}$ 중에서 선택한 후, 3 반복하여 100 mL씩 평판배지에 도말하였다.

호기성균과 혐기성균 모두 24 시간 동안 37°C 에서 배양 하였으며 혐기성균은 BD

GasPak™EZ로 혐기 환경을 조성해주었다.

■ 실험결과

분유섭취에 따른 균 수의 변화를 확인하기 위해 호기성 총균, 혐기성 총균, 유산균, Bifidus균의 colony 개수를 유기농분유섭취군과 정상대조군 사이에서 비교해보았다.

호기성균의 총균수는 normal과 유기농분유 섭취군 사이에 유의적인 차이는 없었으나, 정장작용에 커다란 영향을 미치는 유산균의 총균에서는 차이를 보였다 ($p < 0.001$). 유기농분유 섭취군에서 lactic acid bacteria, Bifidobacteria 에서의 균수가 유의적으로 증가하였다($p < 0.01$).

또한 혐기성 총균수 역시 유기농분유 섭취군에서 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.001$). 따라서 매일유업에서 제공한 유기농분유 시제품 섭취 시 정장작용에 큰 영향을 미치는 균수의 증가효과를 기대할 수 있을 것이다.

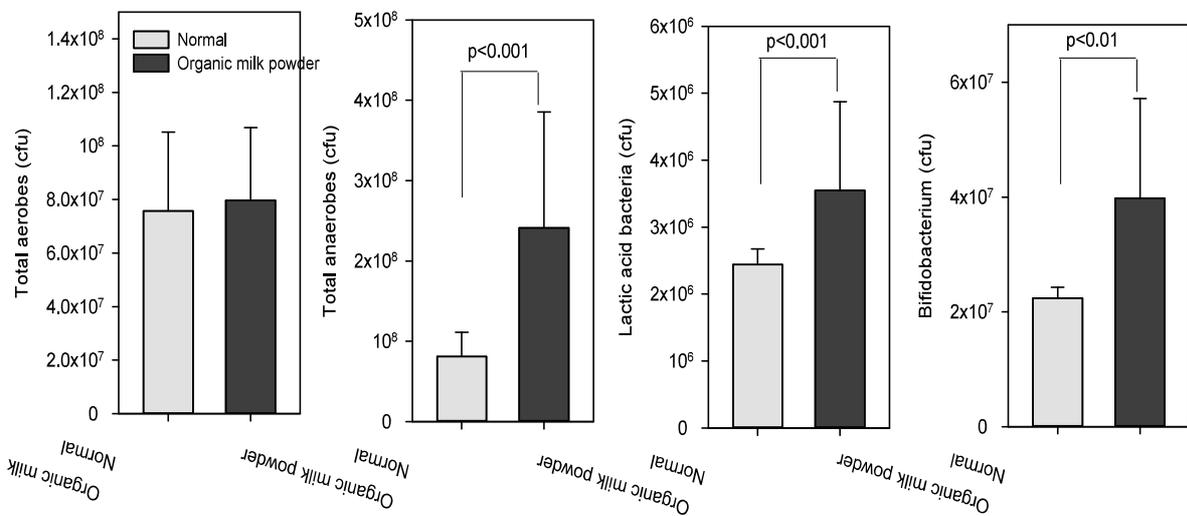


그림 135 유기분유에서의 총균수

(나) 유기농 갈락토올리고당의 변비개선 효과

① Loperamide로 유도된 변비모델에서의 변비개선 활성평가

■ 실험방법

㉞ 실험동물 및 시약

실험에 사용한 동물은 생후 6 주령된 평균 체중 170 g의 Sprague-Dawley (n=24)를 대한바이오링크(DBL)로부터 제공받아 사용하였으며, 실험 동물은 5일동

고 변 중량과 건 중량의 차이를 변 중량으로 나누어 계산하였다.

㊤ 맹장에서의 단쇄지방산 (Short Chain Fatty Acid, SCFA) 함량 측정

맹장에서의 단쇄지방산 함량을 측정을 위해 채취한 맹장 추출물 1 g을 5 mL의 메탄올 용액이 담긴 Conical tube에 넣어 잘 섞은 후 -60°C 에 보관하여 사용하였고, 표준물질을 같은 농도로 제조하였다.

메탄올 용액에 잘 녹인 맹장 추출물 시료는 $0.45\ \mu\text{m}$ Millipore filter를 사용하여 여과하고, 여과액 $1\ \mu\text{L}$ 은 GC system (YL-6100 GC system, HT300 autosampler, Autochro-2 data analysis soft)을 이용하여 분석하였다

분석에 사용한 column은 DB-FFAP 123-3253($50\ \text{m} \times 0.32\ \text{mm} \times 0.50\ \mu\text{M}$), 분석 조건은 injector temperature 200°C ; carriergas: nitrogen $1.4\ \text{mL}/\text{min}$ (split1:10), hydrogen $30\ \text{mL}/\text{min}$, air $300\ \text{mL}/\text{min}$; GC oven temperature profile: $100^{\circ}\text{C}(0.5\ \text{min})$, $180^{\circ}\text{C}(1.0\ \text{min})$, $200^{\circ}\text{C}(5.0\ \text{min})$ flame ionization detector temperature 240°C 로 분석을 실시하였다.

㊤ 혈액분석을 통한 lipid profile, AST, ALT, glucose 등 biomarker 평가

혈청 중 lipid profile, AST, ALT, glucose 등의 함량을 분석하기 위하여 실험 최종일에 실험동물을 마취시킨 후, 개복하여 복대정맥에서 혈액을 채취하였고, 채취한 혈액으로부터 원심분리 한 혈청은 자동혈청분석기(Dri-chem 3500i, Fujifilm, Japan)를 이용하여 분석을 실시하였다.

㊤ 장 통과시간, 통과속도 및 장 길이 측정

활성탄 식이 이동 효과를 조사하기 위하여 8% 활성탄을 실험 동물에 경구투여 한 후, 30분 뒤에 희생시켜 위장관을 적출하였다.

장의 길이는 소장과 대장(맹장 제외)의 길이를 잴 후 절개하여 측정하였고, 소화관 이동률은 활성탄 식이의 전체 장관거리를 이동거리로 나누어 산출하였다.

$$T (\%) = B/A \times 100$$

T : 투여한 활성탄의 소화관 이동률

A : 소화관 전체 길이

B : 활성탄의 최선단부까지의 이동거리

㉞ Alcian Blue staining을 통한 점액질의 분비세포 관찰[3]

대장을 조직처리 과정을 거친 후, 파라핀으로 embedding하여 절편을 제작하였고 alcian blue(pH 2.5)로 염색 후 광학현미경으로 점액질 분비 세포를 관찰하였다.

■ 실험결과

㉟ 식이 섭취량 및 음수량 측정

실험기간동안 식이섭취량은 1주일에 1번, 음수량은 2-3일에 한 번씩 측정 하였다.

Loperamide를 투여한 그룹에서 대조군에 비해 식이섭취량은 감소하였지만, 배설량의 감소가 식이섭취량의 감소보다 훨씬 큰 차이를 보이므로, 이는 식이섭취량의 감소로 인해 배설량이 줄어든 것이 아니라 loperamide의 투여로 변비증상을 나타냈다고 판단할 수 있었다. 변비유발 후 음수량 섭취는 그룹별로 차이를 나타내지 않았다.

표 76 식이 섭취량 및 음수량

	Food intake (g/day)		Water intake (mL/day)	
	Before constipation	After constipation	Before constipation	After constipation
NOR	28.93 ± 1.26	28.28 ± 0.94 ^a	34.71 ± 1.03 ^{ab}	41.45 ± 1.90
CON	28.89 ± 1.38	26.16 ± 1.46 ^{ab}	35.67 ± 1.54 ^a	41.17 ± 2.43
L-OD	25.38 ± 0.80	23.83 ± 0.82 ^b	30.98 ± 1.23 ^b	39.03 ± 0.39
H-OD	26.94 ± 0.63	24.70 ± 0.64 ^{ab}	31.73 ± 0.81 ^{ab}	39.36 ± 1.31

Data are mean ± SE values (n = 6). Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

OD :50% GOS

㊱ 변의 개수, 변 중량, pH 및 변의 수분 함량 결과

분변의 지표로서 변의 개수와 무게, 수분함량과 pH를 측정한 결과이며, loperamide를 투여한 후의 분변의 개수 변화정도를 나타내었다.

NOR그룹에서는 변의 개수의 차이를 보이지 않았고, 변비를 유발한 그룹에서 유의적으로 분변의 개수가 감소하였으며, 유의적이지는 않지만 50% GOS(OD)를 섭취한 그룹의 분변 개수 변화가 적음을 확인되었다.

변의 무게 또한 loperamide를 투여한 그룹에서 감소하였으며, 낮은 농도의 50% GOS(OD)를 섭취한 그룹에서 Normal group과 비슷한 변화량을 보였다.

변비 유발 전에는 높은 농도의 50% GOS(OD)를 섭취한 그룹에서 가장 높았지만 변비를 유발한 후에는 낮은 농도를 섭취한 그룹에서 분변의 수분함량이 가장 높게 나타났다.

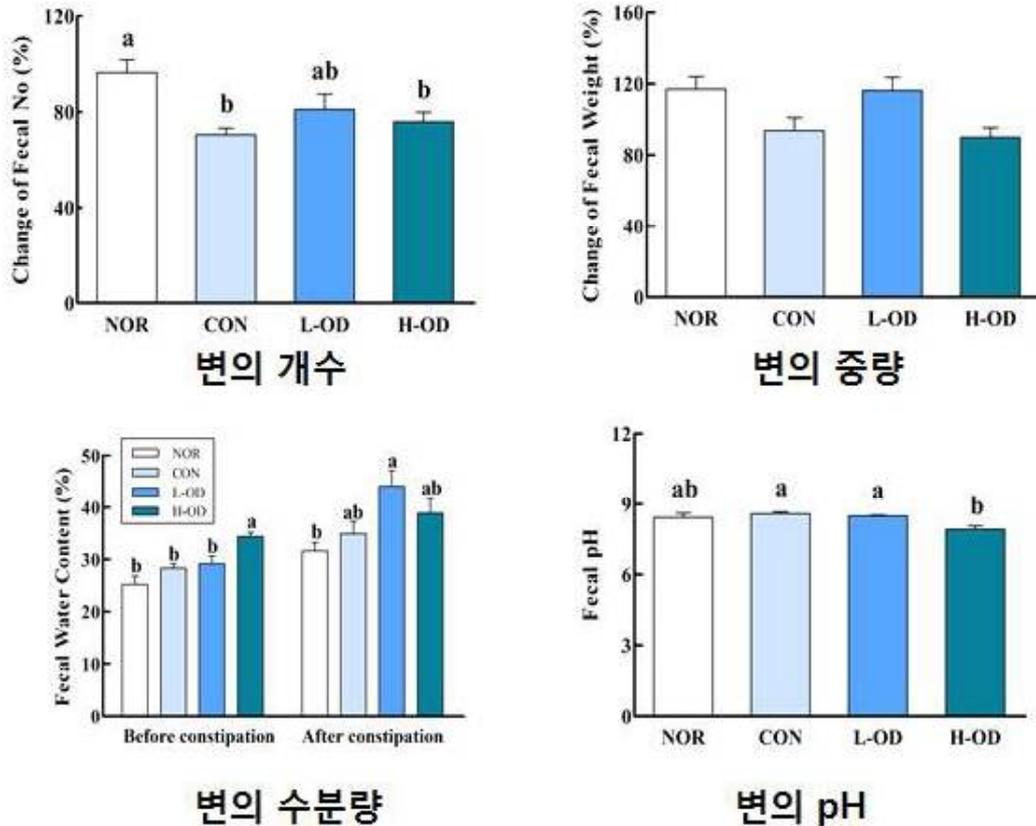


그림 137 loperamide유도 전후 변의지표 변화

분변의 pH에서는 CON group이 가장 pH가 높았으며 높은 농도의 50% GOS(OD)를 섭취한 그룹의 pH가 가장 낮았으며, 이러한 biomarker를 통해 loperamide로부터 변비가 유발된 것과 Sample의 변비 예방 효과를 확인했다.

㊤ 맹장에서의 단쇄지방산 (Short Chain Fatty Acid, SCFA) 함량 측정

분변의 pH가 가장 낮았던 H-OD그룹에서 가장 높게 나올 것으로 예상했지만, total SCFA를 보면 L-OD그룹이 가장 높게 나타났으며, 이는 분변으로 측정된 것이 아니라 맹장에 들어있던 변을 추출한 것이기 때문에 차이를 보였을 것으로 예상된다.

또한 각각을 비교할 때 L-OD그룹에서 CON군과 대비하였을 때 증가하는 경향을 띄는 것으로 보아 낮은 농도의 50% 갈락토올리고당(OD)이 장운동을 촉진하여 변비 개선에 효과가 있을 것으로 사료된다.

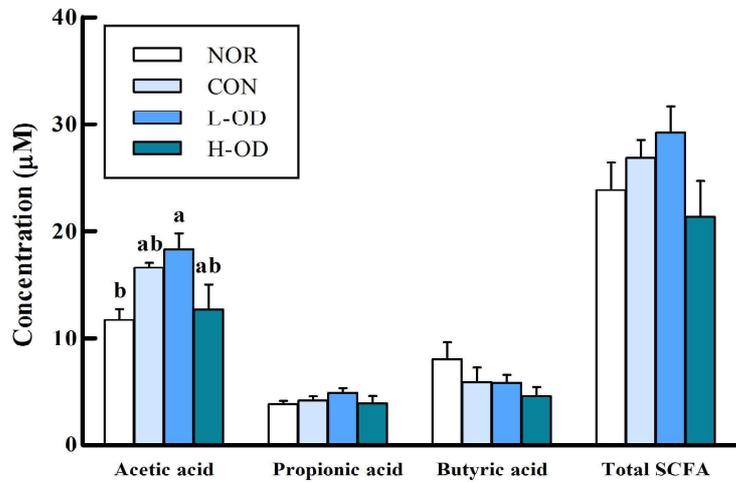


그림 138 SCFA 농도

Values are the means \pm standard error of the mean (SEM) for each group. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$. * OD : 50% GOS

㉔ 혈액분석을 통한 lipid profile, AST, ALT, glucose 등 biomarker 평가

Sample의 안전성을 평가하기 위하여 혈청을 분석한 결과로써, Total cholesterol 과 ALP를 제외한 다른 항목에서는 차이가 없었음을 확인하였다.

변비상태가 지속되면 체외로 배출되어야할 콜레스테롤과 지방 등이 밖으로 나가지 못하고 장내 체류시간이 연장되어 그 흡수량이 많아지면 체내의 콜레스테롤과 지방이 증가되어 동맥경화를 일으키고 고혈압과 심장 비대 등의 원인이 될 수 있다고 보고되어 있는 상황이다.

변비유발군에서 유의적으로 Total cholesterol의 양이 증가함에 비해 50% GOS(OD)를 섭취한 그룹에서 유의적으로 감소한 것을 확인하였으며, 이는 sample이 담즙산의 재흡수 방지효과를 통해 체내의 콜레스테롤 양을 낮춘 것으로 생각된다.

표 77 혈청분석결과

	NOR	CON	L-OD	H-OD
Total cholesterol (mg/dL)	87.20 ± 5.2 ^{ab}	94.40 ± 5.33 ^a	72.33 ± 6.49 ^{ab}	68.83 ± 4.65 ^b
HDL cholesterol (mg/dL)	37.20 ± 2.9	44.20 ± 4.0	40.50 ± 3.18	42.50 ± 2.88
Triglyceride (mg/dL)	97.20 ± 17.23	96.00 ± 9.02	91.20 ± 4.58	75.50 ± 5.82
Albumin (g/dL)	3.66 ± 0.23	4.22 ± 0.17	3.38 ± 0.27	3.57 ± 0.14
Total protein (g/dL)	5.62 ± 0.31	6.32 ± 0.22	5.67 ± 0.24	5.82 ± 0.09
Total bilirubin (mg/dL)	0.38 ± 0.06	0.36 ± 0.04	0.32 ± 0.05	0.30 ± 0.03
GOT (AST, U/L)	184.80 ± 36.76 ^a	89.80 ± 16.55 ^b	81.00 ± 3.18 ^b	91.00 ± 8.53 ^b
GPT (ALT, U/L)	52.60 ± 14.47	34.40 ± 7.89	33.17 ± 4.69	31.8 ± 5.06
Glucose (mg/dL)	312.20 ± 43.93	346.40 ± 40.83	223.33 ± 20.44	279.17 ± 41.42
BUN (mg/dL)	22.66 ± 0.95	23.98 ± 1.07	20.40 ± 0.68	22.87 ± 1.17
Creatinine (mg/dL)	0.30 ± 0.03	0.36 ± 0.09	0.27 ± 0.02	0.32 ± 0.03
ALP (U/L)	985.40 ± 95.43 ^{ab}	1070.20 ± 66.97 ^a	868.00 ± 81.62 ^{ab}	705.00 ± 42.23 ^b

HDL, high density lipoprotein; AST, aspartate aminotransferase; GPT, glutamate pyruvate transaminase; BUN, blood urea nitrogen; ALP, alkaline phosphatase. Data are mean ± SE values (n = 6). Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$. *OD :50%GOS

㉞ 장기무게 측정

Sample의 안전성을 평가하기 위하여 장기무게를 분석한 결과로써, 간·비장·신장·심장 그리고 장의 무게가 모두 유의적인 차이가 없음을 확인하였다.

표 78 장기무게

Organ weight (g/100g of body weight)	NOR	CON	L-OD	H-OD
Liver	3.62 ± 0.12	3.68 ± 0.16	3.33 ± 0.23	3.25 ± 0.08
Spleen	0.18 ± 0.00	0.20 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.19 ± 0.01
Kidney	0.70 ± 0.03	0.76 ± 0.04	0.71 ± 0.06	0.67 ± 0.03
Heart	0.36 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.34 ± 0.01
Intestine	3.54 ± 0.30	3.75 ± 0.20	3.60 ± 0.10	3.59 ± 0.27

Data are mean ± SE values (n = 6). Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

*OD :50%GOS

㉞ 체중변화 측정

낮은 농도의 50% GOS(OD)를 섭취한 그룹에서 다른 그룹에 비해 몸무게가 조금 적었지만 유의적인 차이는 없었다.

이를 통해 변비를 유발한 후 식이섭취가 감소하였지만 몸무게에는 영향을 주지 않고 분변지표가 감소하였으므로 loperamide로부터 변비가 유발되었음을 확인하였다.

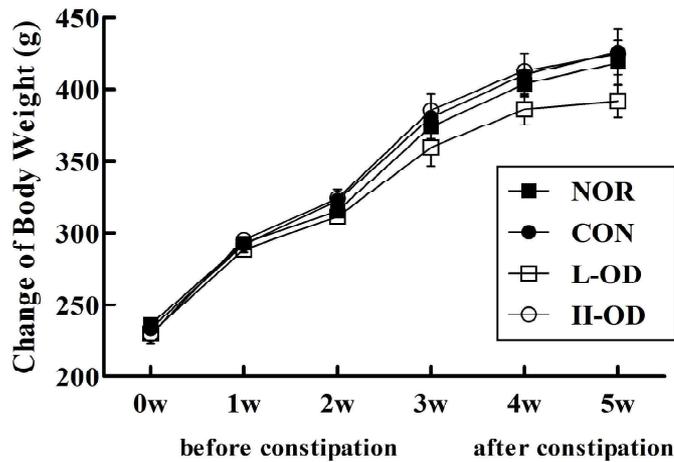


그림 139 Loperamide에 의해 유도 된 변비 모델에서 체중의 변화에 대한 lactulose (OD)의 영향 각 군에 대한 평균 ± 표준 오차 (SEM)이다. (P <0.05 * OD : 50 % GOS에서 유의적 차이를 보임)

㉟ 장 통과시간, 통과속도 및 장 길이 측정

장 이동을 확인하기 위해 희생하기 20분 전 활성탄을 경구 투여하였으며, 해부 하여 확인한 결과 활성탄이 이동한 길이는 변비를 유발한 CON group에서 가장 짧았으며, 높은 농도의 50% GOS(OD)를 섭취한 그룹에서 유의적으로 가장 많이 이동하였다.

장의 길이도 H-OD그룹이 가장 길었으며, 각 개체에서 이동의 비율을 계산한 결과 NOR 그룹대비 CON group의 이동률이 가장 낮았고 Sample을 섭취한 그룹에서 유의적으로 높았다.

표 79 변비 쥐에서 장내 통과 비에 50 % GOS (OD)가 미치는 영향

	NOR	CON	L-OD	H-OD
Intestinal transit length (cm)	45.40 ± 9.88 ^b	31.58 ± 3.50 ^{ab}	47.92 ± 8.77 ^{ab}	65.42 ± 7.15 ^a
Intestinal length (cm)	100.14 ± 3.72 ^b	116.10 ± 1.69 ^a	114.00 ± 4.03 ^a	118.92 ± 3.10 ^a
Intestinal transit ratio (%)	44.70 ± 8.34 ^{ab}	27.38 ± 3.37 ^b	42.56 ± 8.20 ^{ab}	54.77 ± 5.47 ^a

평균 ± SE values (n = 6). $P < 0.05$.

㊸ Alcian Blue staining을 통한 점액질의 분비세포 관찰

crypt epithelial cell이 alcian blue로 강하게 염색된 것을 확인할 수 있으며 이것은 crypt cell이 sulfomucin을 포함한 acid mucin을 생산한 것을 나타내며 장점막 표면이 acid mucin layer로 덮여 있다.

변비 유발 control그룹에서는 표면의 뮤신 분비가 감소하였으며, 변비에 걸릴 경우 장점막에서 점액분비의 기능이 감소한다는 것으로 알려져 있어,

이를 통해 loperamide를 투여한 결과로 control그룹에서 대장 내용물의 이동에 저해를 주었을 것으로 예상되며, 50% GOS(OD)를 섭취한 모든 군에서 control그룹보다 유의적으로 crypt epithelial cell이 증가되었음을 확인하였다.

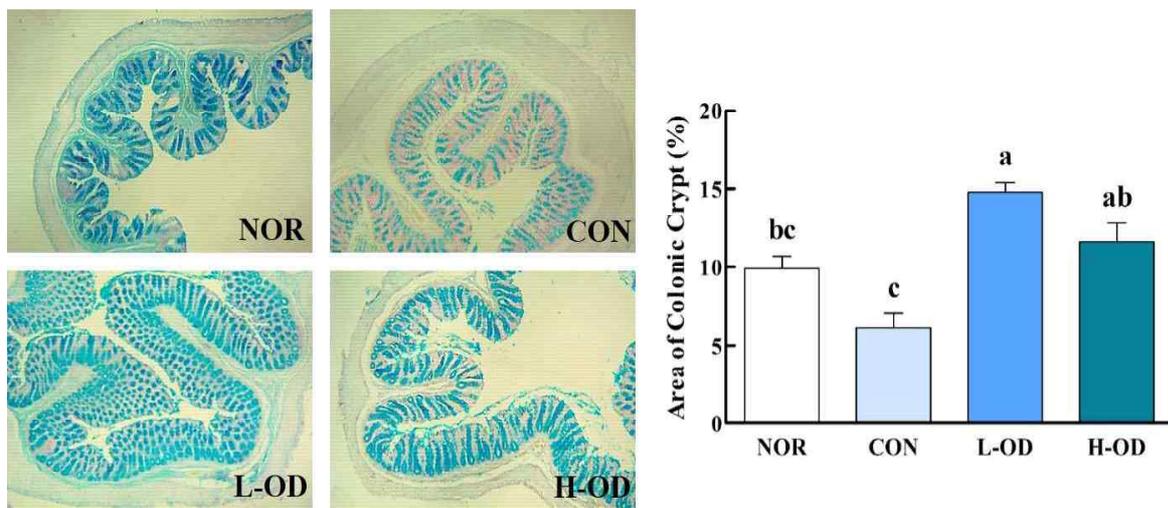


그림 140 loperamide 유발 변비 모델에서 lactulose의 점액질분비세포에 미치는 영향
 Samples were stained with Alcian blue at a pH of 2.5 (x40 magnification)
 ± standard error of the mean (SEM) for each group. ($P < 0.05$.)

(다) 유청 단백질 가수분해물의 성장 촉진 확인 연구

① 유청 단백질 가수분해물의 *in vitro* 성장 촉진 확인 연구

■ 실험방법

㉠ 세포배양

ATCC에서 mouse calvaria osteoblast cell 인 MC3T3-E1 세포를 분양받아, α -MEM 배지 (Gibco BRL, Grand islane, N. Y., USA)에 10% FBS(Gibco)와 1% penicillin(Gibco)를 첨가하면서 37°C, 5%의 CO₂incubator에서 2-3일마다 배지를 교환하면서 실험에 사용하였다.

분화유도를 위해 5 mM β -glycerol phosphate(Sigma Chem. Co., St. Louis. MO., USA)와 50 mg/ml의 vitamin C(Sigma Chem. Co., St. Louis. MO., USA)를 첨가하여 분화유도 배지로 사용하였으며, 3일마다 배지를 교환하였다.

㉡ 세포증식 유도

시료의 농도별 처리에 따른 조골세포이 세포 증식은 MTT assay 방법에 따라 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT, sigma) 시약의 환원 정도를 측정하는 방법을 사용하였다.

MC3T3-E1 세포를 0.4% trypan blue 염색법을 이용하여 세포 수를 1×10^5 cell/ml로 조정하여 96 well plate에 plating 한 후, 농도 별로 준비된 유청단백질과 유청단백질 분획물을 2 μ l씩 첨가하여 37 °C, 5% 의 CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 이때 대조군으로는 샘플 대신 DW을 2 μ l를 첨가하여 동일하게 배양하였다. 24시간 배양 후 MTT(5 mg/ml) 시약을 100 μ l 씩 각각의 well에 첨가하고 37°C, 5%의 CO₂ incubator에서 2시간 더 배양 하였다. 배양 후 배지를 제거하고 SDS(sodium dodecyl sulfate) 를 100 μ l씩 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해 시킨 뒤 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포 증식률은 유청단백질과 유청단백질 가수분해물의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

㉢ 아미노산 정량

다양한 효소로 처리한 후 얻은 상등액의 유리 아미노산 함량은 2,4,6-trinitrobenzensulfonic acid(TNBS)법을 이용하여 측정 하였다.

시료 0.125 mL에 0.212 M phosphate buffer(pH 8.2) 1 mL와 0.1% TNBS 1 mL를 가하고, 혼합물 을 50°C에서 60분간 암소에서 반응시켜 100 mM HCl 2 mL 를 가하고 20분간 방치 후에 증류수 4 mL를 가하고 10분 방치 후 340 nm에서 흡광도를 측정하여 L-leucine 표준곡선과 비교하여 상대적인 아미노산 양

을 측정하였다.

㉔ Alkaline phosphatase (ALP) 활성

배양된 MC3T3-E1 세포를 1×10^5 cell/ml로 조정하여 12 well plate에 plating한 후, 농도별로 준비된 Whey protein을 첨가한 후 37°C, 5%의 CO₂ incubator에서 15일간 배양하였다. 그 후 PBS로 2회 세척하고 0.1% Triton X-100을 1mL 씩 넣은 다음 lysis 하였다. Lysis된 cell의 상등액은 원심분리를 통하여 상등액을 회수 하였고, 상등액은 단백질 정량과 ALP측정에 사용되었다[6]. 세포수의 차이가 ALP 활성도에 영향을 미칠 수 있으므로 총 단백질 양을 측정하여[7] 나누어 줌으로써 단위 세포 수에 대한 ALP 활성도를 계산하였다.

㉕ 골석회화 형성도 측정

배양한 MC3T3-E1 세포를 1×10^5 cell/ml로 조정하여 plate 에 배양한 후 석회화 유도를 위해 분화유도 배지와 Whey protein 분획물 을 농도별로 첨가하여 15일간 배양하였다. 배양 후 formalin으로 상온에서 30분 세포를 고정시켰다. Alizarin-Red(AR) solution은 10 ml 증류수에 40 mM이 되도록 농도를 맞춘 후 pH 4.2로 조정하였다. 세포 고정 후 AR solution(1 ml/well)으로 20분간 염색한 후 PBS로 2-3회 세척하여 염색되지 않는 부분은 PBS로 세척하였다. 표면이 마르지 않도록 PBS로 적셔 주면서 현미경으로 관찰하였고, MATLAB 프로그램을 이용하여 칼슘의 염색 정도를 RGB 값으로 나타 내었고, 10 mM sodium phosphate(10% cetylpyridinium chloride, pH 7.0)을 1 ml/well 첨가하여 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

㉖ 실시간 정량적 중합효소 연쇄반응을 이용한 분자생물학적 분석(PCR)

유전자 발현을 측정하고자 전자 발현을 측정하고자 세포를 1×10^3 cells/cm²로 조정하여 분주하고 10% FBS가 첨가된 α -MEM 배지에 배양하였다. Confluence monolayer에 도달하게 되면 분화배지로 교환하여 37°C 인큐베이터에서 48시간 배양하였다. 그 후 다양한 농도의 시료가 혼합된 분화배지로 교환하여 37°C 인큐베이터에서 15일간 배양하였다. 분석은 세포로부터 Trizol(Takara Bio, shiga, Japan)을 이용하여 RNA를 분리하고, cDNA 합성은 SuperScript® III Reverse Transcriptase(Invitrogen, Calsbad, CA, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 시행하였다.

㉗ Western blot

세포를 RIPA완충액(50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM

EDTA, 1% NP-40, 0.25% sodium-deoxycholate)에 protease inhibitor cocktail(Roche, Mannheim, Germany)과 phosphatase inhibitor 1(p2580; Sigma, St Louis, MO, USA)과 phosphatase inhibitor 2 (p5726; Sigma, St Louis, MO, USA)를 혼합한 용액으로 용해시킨 후 14,000 × g로 4°C에서 20분 간 원심분리 하였다. 단백질 정량 후, 20-40 μ g의 단백질을 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동을 시행하였고, transfer 완충액(25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol)을 넣고, 300 mA에서 2시간 동안 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. Membrane을 5% skin milk가 포함된 TBST(Tris-buffered saline: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl; 0.1% Tween 20) 용액에서 1시간 blocking 시킨 후, TBST용액에 각각의 1차 항체 (GAPDH, BMP-2, ALP, BSP, COL, 1 : 1000)를 첨가하여 4°C에서 12시간 이상 반응 시켰다. Membrane에 5% skin milk 용액과 2차 항체를 1차 항체와 같은 농도로 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. Membraine을 GE Healthcare ECL Western Reagent(RPN2232; GE Healthcare, buckinghamshire, UK)용액으로 감광시켜 Fluorchem E System (Protein Simple, California, USA)를 이용하여 밴드를 확인하였다.

㉔ 통계처리

연구결과 얻어진 자료를 SPSS 통계 프로그램을 사용하여 하위그룹 각각의 기술 통계치(mean, SD)를 산출하였다. 사후 검증은 Tukey를 적용하였고 $p < 0.05$ 수준에서 유의 수준을 검증하였다.

■ 실험결과

㉕ 다양한 효소를 이용한 유청단백질 가수분해

유청단백가수분해물을 효소처리 하지 않은 control의 유리 아미노테질소 함량은 62.85 ± 0.48 mg/g이었으며, 이 유청단백질을 각각의 효소처리를 이용하여 유리아미노산 함량을 측정한 결과, *Bacillus licheniformis* 유래의 endoproteinase로 알려진 Alcalase에 Neutrased, Protamex, Flavoyzyme 세가지의 효소를 추가 처리한 경우, 처리 전보다 유리 아미노산의 함량이 유의적으로 증가하였다.

Neutrased는 *Bacillus amyloliquefaciens*로부터 얻어진 endoproteinase이며, Protamex는 *Bacillus protease complex*로 알려져 있고, Flavourzyme은 *Aspergillus oryzae*에서 생산된 효소로 endoproteinase와 exoproteinase의 혼합 효소라고 알려져 있다. 식품영역에서는 다른 proteases를 사용해서 단백질을 분해하는 경우 쓴맛이 생기는 반면, flavourzyme은 소수성 잔기를 제거하여 다른 효소들에 비해 쓴맛이 생기지 않는다고 알려져 있는 상황이다.

표 80 가수분해물의 아미노산 농도

Enzyme	Source	Contents of amino acid (mg/g)
Control	-	62.85 ± 0.48 ^f
Alcalse (4 hr)	<i>Bacillus</i> sp	165.10 ± 3.16 ^e
Alcalse (14 hr)	<i>Bacillus</i> sp	234.21 ± 6.85 ^b
Neutrase	<i>B. amyloliquefaciens</i>	281.41 ± 7.46 ^a
Protamex	<i>Bacillus</i> sp.	267.13 ± 5.20 ^a
Flavoyrzyme	<i>Asp. oryzae</i>	268.12 ± 6.15 ^a
Collupulin	<i>Caruca papaya</i>	232.65 ± 5.67 ^b
Ficin	<i>Ficus carica</i>	232.12 ± 4.52 ^b
Papain	<i>Caruca papaya</i>	206.18 ± 3.21 ^c
Hydrolysis	-	180.00 ± 1.93 ^d

Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's multiple range tests.

㉔ 세포생존율

MTT assay는 노란색의 가용성 tetrazolium 염이 살아있는 세포의 미토콘드리아 succina dehydrogenase에 의해 파란색의 불용성 formazan 생성물로 환원되는 원리는 이용한 실험 방법으로 formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 된다. 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하는 것으로 미토콘드리아 활성의 지표로 사용되고 있다.

MTT는 세포 독성도 조사로 시험물질에 어느 정도 독성을 나타내는지 미토콘드리아의 활성을 측정하는 실험으로 시험물질이 독성이 있어 미토콘드리아가 파괴되면 흡광도 값이 낮게 나타난다. MC3T3-E1 세포에 유청단백질과 유청단백질 가수분해물들을 처리한 경우에는 시료를 처리하지 않은 세포(100%) 비교 하였을 때 시료를 처리한 군에서 독성을 나타내지 않았다.

이에 세포에 처리하는 샘플 적정 농도를 50 mg-6.25 mg으로 정하였고, Protamex효소 처리를 한 세포에서는 유의적으로 세포의 수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

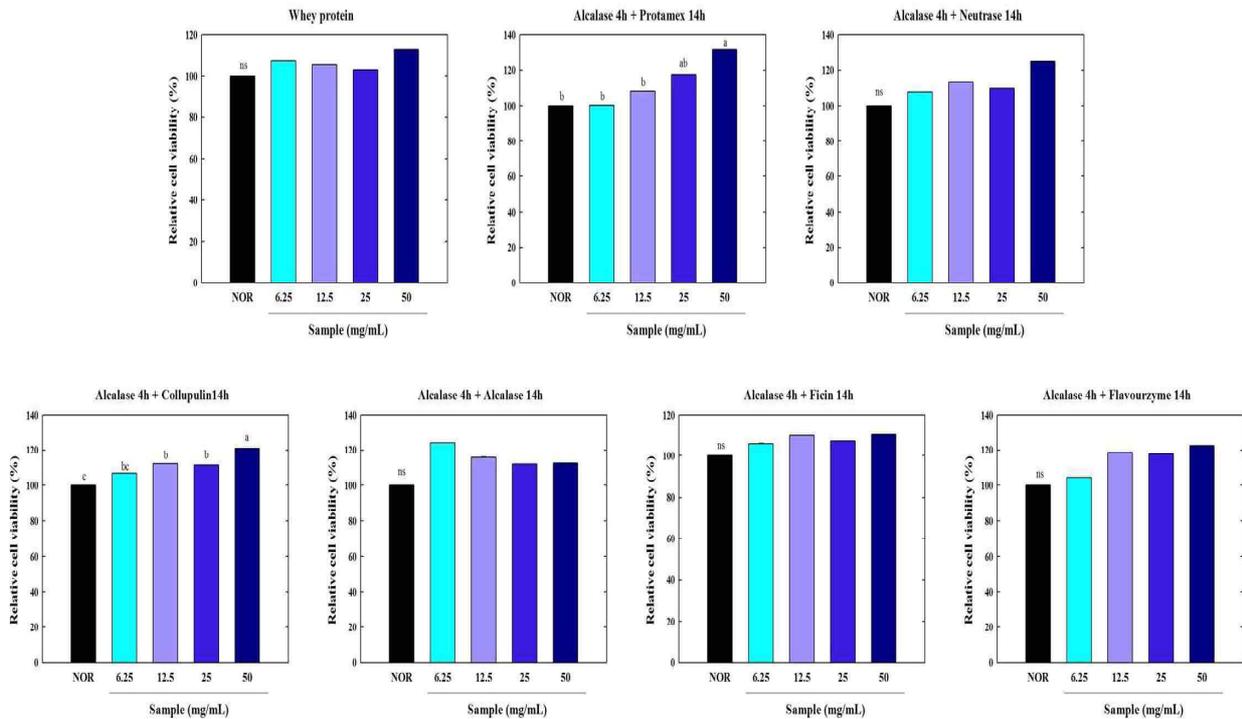


그림 141 MC3T3-E1세포내 세포증식

The cells were cultured in differentiation medium (a-MEM containing 10% FBS, 10 mM b-GP, and 50 μ g/mL L-AA) with various concentrations of sample for 2 days. Cell proliferation was measured using the MTT assay. Values are means \pm SD (n=3): Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's multiple range tests.

㉔ ALP 작용 및 무기질화에 대한 유청단백질 가수분해물의 효과

뼈와 연골은 특수 연결 조직이다. 연골은 뼈의 일반적인 형태 내에 분비되어 세포간(주로 길이) 및 병렬(주로 너비) 성장으로 자란다. Bellows은[9] ALP가 조골세포의 표현형 중 하나로 무기질화에 필수적인 효소라고 하였다. 조골세포의 표현형 형성은 두 단계가 요구된다.

첫번째는 기질 성숙 단계로 ALP와 같은 골 세포 표현형과 관련된 특이 단백질이 검출된다. 두번째 단계에서 기질은 칼슘에 의해 무기질화된다. 결과적으로 해면골은 기존 연골 주위에 형성되게 되고 후에 발달 과정에서 해면골간의 공간은 골 기질로 채워져 치밀골을 형성하게 된다.

따라서 ALP 작용은 초기 분화 지표로 작용되고 세포내 칼슘 함량은 후기 분화의 지표로 작용함으로 ALP 작용과 세포내 칼슘 함량을 15일동안 조골세포에 대한 유청단백질 가수분해물의 효과를 연구하기 위해 조사하였다. ALP 작용은 유청단백질 가수분해물 중 Protamex와 Papain 그리고 Flavourzyme 효소샘플에서 50 ~ 6.25 mg/mL 처치시 유의하게 증가되었으며 또한 50 mg/mL 농도에서는 대조군에 비해 높은 것으로 나타났다.

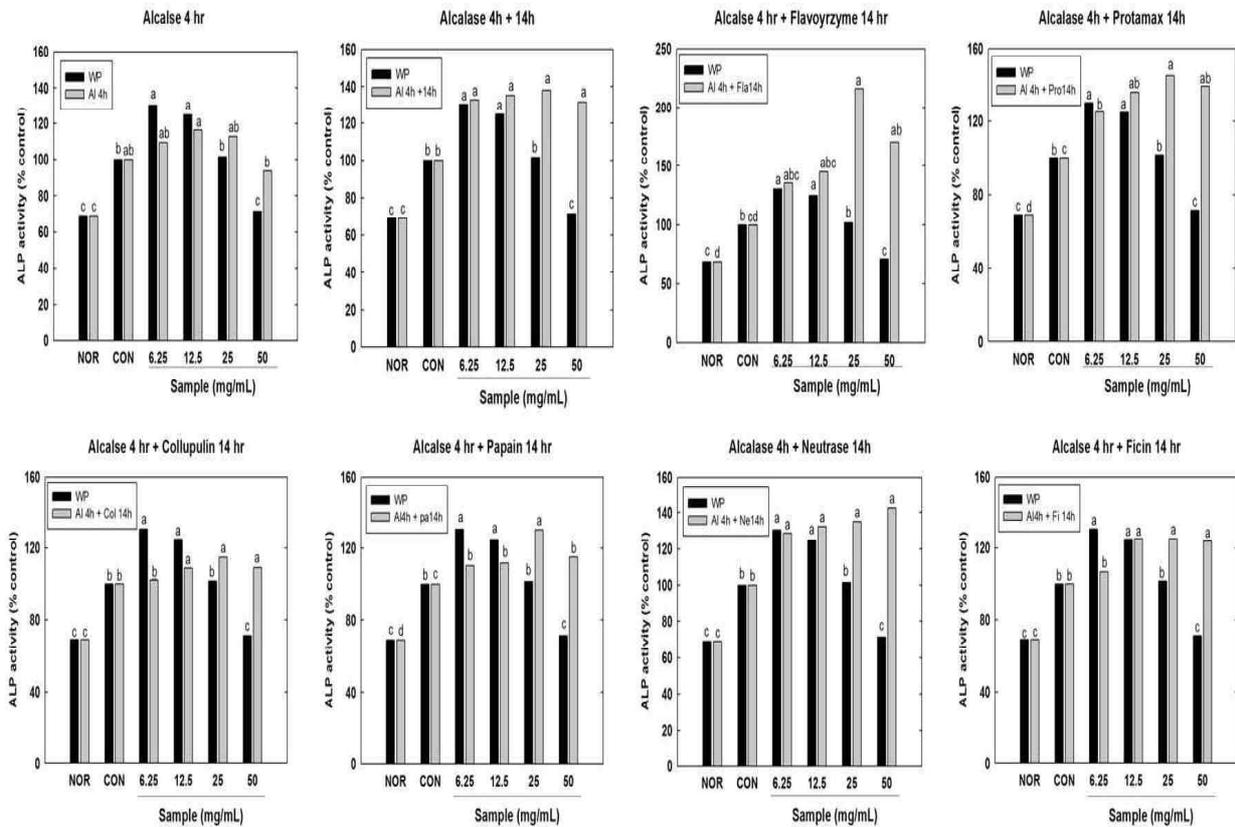


그림 142 유청단백 가수분해물의 ALP 자극 효과

The cells in 12-well plates were cultured in differentiation medium (α-MEM containing 10% FBS, 10 mM β-GP, and 50 μg/mL L-AA) with various concentrations of sample for 15 days. Values are means±SD (n=3) : Means with different superscript letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's multiple range tests.

세포내의 칼슘 착상을 측정하기 위해 Alizarin red S staining이 이용되었다. 칼슘에 대해 Alizarin red S에 의한 주황-적색의 염색하여 칼슘이 증가한 것은 MATLAB 프로그램을 이용하여 염색정도를 RGB 값으로 나타내어 결과를 도출하였다.

유청단백질 가수분해물은 50 ~ 6.25 mg/mL에서 유의하게 칼슘양이 증가하였으며 유청단백질 가수분해물 중 protamax 50mg/mL 처치시 대조군에 비해 161.39±5.12 %의 칼슘이 증가된 것으로 나타났다. 이 결과를 토대로 ALP와 염색에서 가장 효과가 좋은 효소는 protamax처리 효소로 정해져 유전자레벨 및 Western blot 에서 효과를 확인하였다.

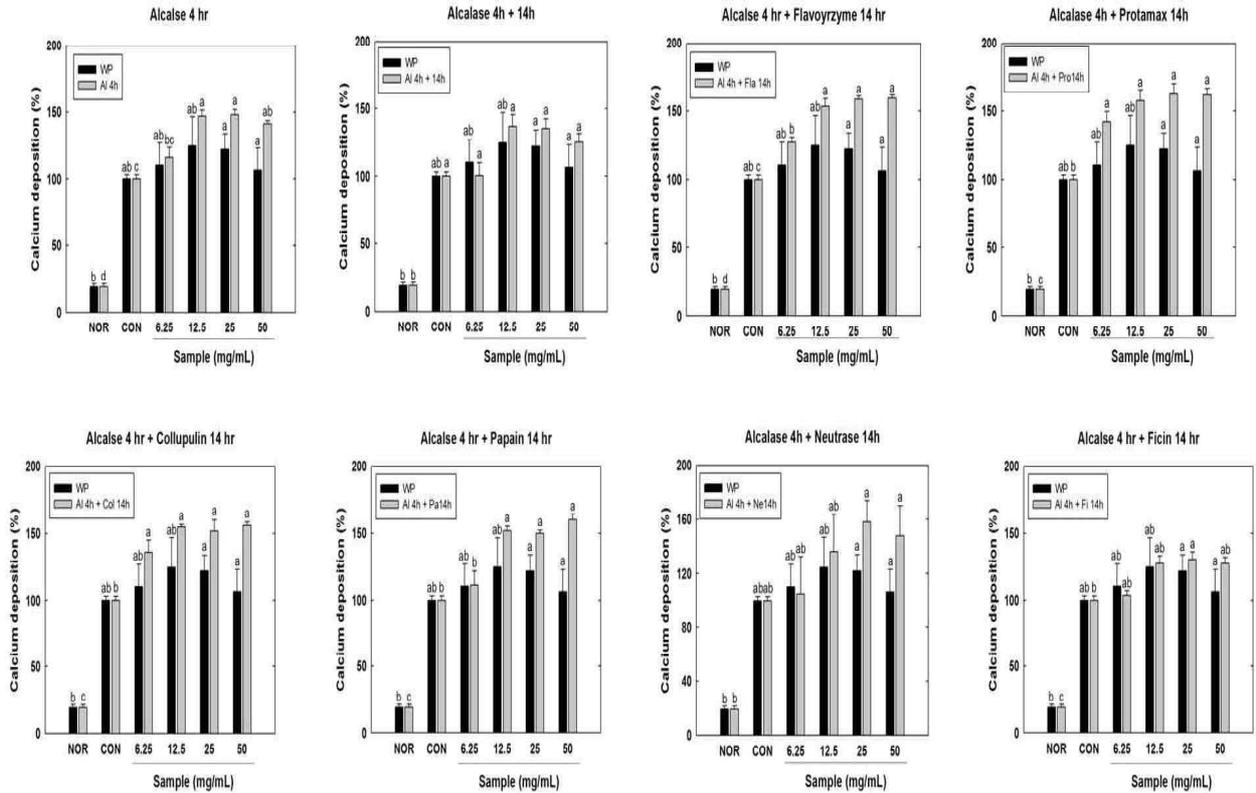


그림 143 유청가수분해물의 무기질화 효과

The cells were cultured in 12-well plates in differentiation medium (α -MEM containing 10% FBS, 10 mM β -GP, and 50 μ g/mL L-AA) at various treatment concentrations of samples for 15 days. Mineralization was determined by Alizarin red S staining for evaluation of calcium contents. Alizarin red S stain was released from the cell matrix by incubation in 10% cetylpyridinium chloride, and the intensity was determined by measuring the MATLAP. Values are means \pm S.D. (n=3): Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's multiple range tests.

㉔ 조골세포 분화 관련 골기질 유전자 발현

골 형성과 관련한 세포의 경우들은 조골세포 전구체의 증식 및 분화 과정을 거친다. 간엽 다능성 세포(mesenchymal pluripotent cells)의 골형성 분화는 여러 용해성 단백질에 의해 조절된다. 증식, 기질 성장, 무기질화는 조골세포의 분화의 순차적 과정이다. 전조골세포는 ALP, BMP, BSP, COL 등의 세포외 기질 단백질을 생성한다.

BMP는 간엽세포(mesenchymal cells)에서 조골세포 계열의 분화를 촉진하는 물질로 처음에 발견되었다. 이는 BMP가 조골세포 관련 지표들(ALP, OP, OC)의 발현에 영향을 줄 수 있음을 의미한다.

Collagen은 골조직의 유기물 중 부분을 차지하여, 이것이 적절히 생성되지 못하는 조건에서는 골조직의 석회화가 일어나 지 않고 ALP 활성도와 osteocalcin의 생성이 매우 낮은 것으로 나타났다.

실제로 collagen 유전자의 돌연변이는 osteogenesis imperfecta 및 osteochondrodysplasias 등을 일으키는 것으로 알려져 있는데[17, 18], ALP는 세포막에 붙어 있는 당단백질로 여러가지 isozyme 형태로 존재한다[19]. 석회화에 ALP가 국소적으로 인의 농도를 증가시켜 미네랄 침착을 증가시킨다고 하는 가설[20]이 제시된 후, ALP를 억제하는 levamisole이 분화 과정에 있는 골아세포의 ALP를 차단하면 석회화가 일어나지 않고 석회화가 시작된 후 차단하면 효과가 없는 것으로 나타나므로[9] ALP는 골 형성에 아주 중요한 요소임을 알게 되었다.

결과적으로 조골세포는 칼슘을 축적시키므로[13], 유청단백질 가수분해물에 의한 무기질화의 향상에 대한 기전을 확인하기 위해 15일 동안 유청단백 가수분해물 중 가장 높은 ALP와 칼슘의 양을 보여주었던, Protamex 효소를 선택하였다.

이에 15일동안 Protamex 효소처리 한 샘플을 MC3T3-E1 세포에 처치하여 조골세포 분화 관련 지표의 Western blot과(그림 10) 유전자 발현(그림 11)을 조사하였다.

그 결과 단백질 레벨에서 ALP, BMP, BSP, COL2는 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 mRNA레벨에서는 ALP는 유의적으로 증가하는 경향을 보여주었고, BMP와 BSP또한 유의적인 증가를 보여주었다.

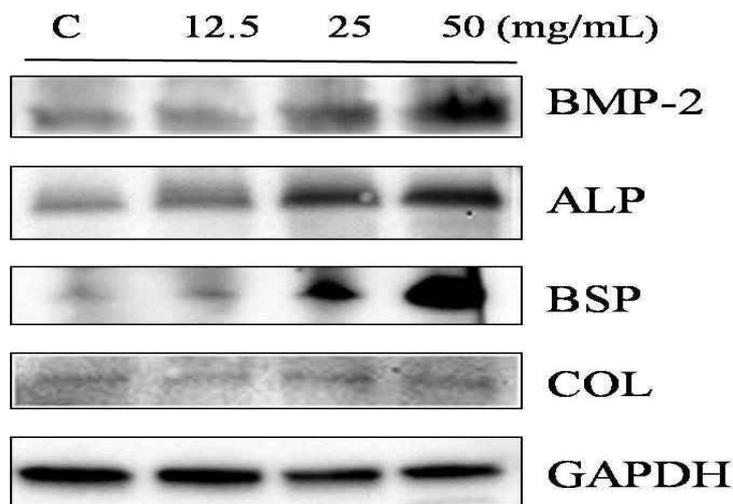


그림 144 MC3T3-E1의 발현 촉진

하지만 COL1의 경우 유의적이지는 않지만 농도가 높아짐에 따라 유전자 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 단백질 레벨에서의 ALP, BSP, COL, BMP의 발현은 유전자레벨과 동일한 양상을 보여주었다. 이에 샘플의 농도가 높아짐에 따라 MC3T3-E1세포의 분화 및 성장에 영향을 미치는 것으로 확인하였다.

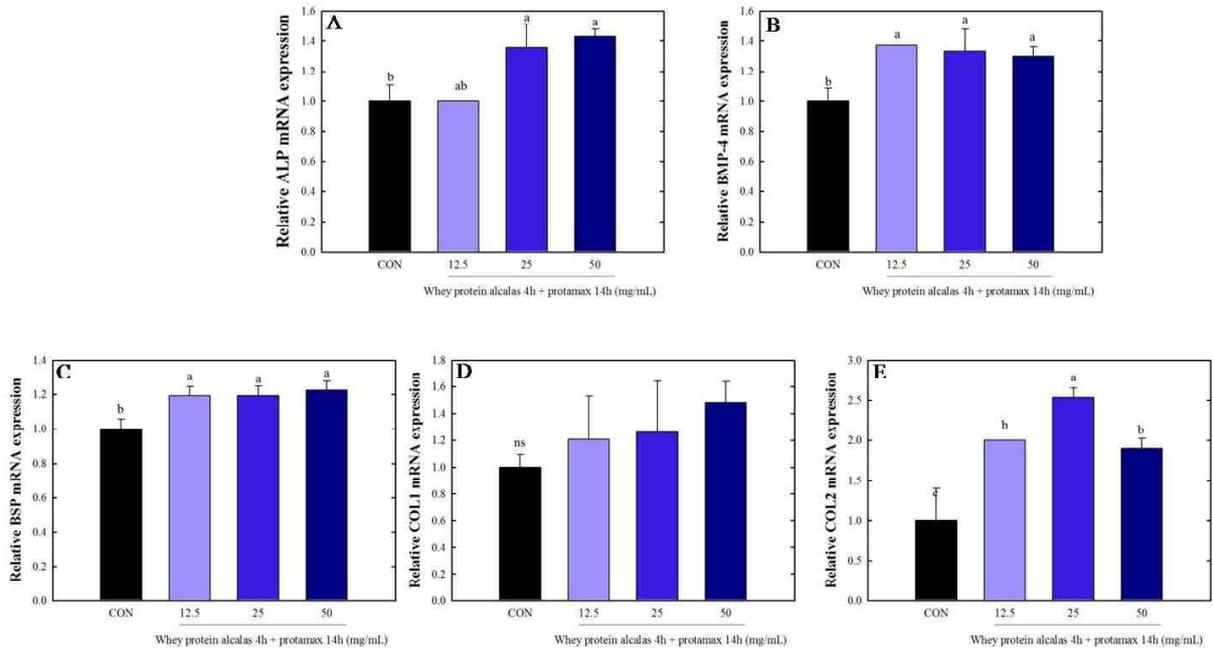


그림 145 MC3T3-E1 세포내 mRNA 자극

The cells were cultured in 6-well plates in differentiation medium (α-MEM containing 10% FBS, 10 mM β-GP, and 50 μg/mL L-AA) at various treatment concentrations for 15 days. Values are means ± SD. (n=3). Means with different superscript letters within a row are significantly different at $P < 0.05$ by Tukey's multiple range tests.

㉞ 유청가수분해물의 분자량별 분획물에 대한 활성평가 결과

유청단백질 중 가수분해가 가장 좋았던 protamax로 가수분해한 유청단백질 가수분해물을 가지고 분자량별 분획 결과를 살펴 보았다. protamax의 효소의 선택은 앞 선 결과에 따라 ALP 및 골 석회화 결과 그리고 유전자적 레벨에서의 가장 좋은 효과를 보여 실험을 진행하였다.

MC3T3-E1세포에 protamax 가수분해물을 3 kDa이상과 이하로 분획을 하여 세포에 처리를 하였을 때의 결과를 나타내었다. 이는 유청단백질 가수분해물과 분획의 결과에 있어 분자량에 따라 효과를 보여줄 것을 기대 하였으나, 분획을 통하여 세포의 ALP 및 골 석회화에 대한 결과를 유의적으로 얻지는 못했다.

이는 유청단백 가수분해물은 성장 및 골 석회화에는 영향을 미치지만 분자량별 샘플에서는 유의적인 차이가 없다는 것으로 결과를 도출 하였다. 이에 분자량별 분획을 더 세밀하게 나누어 분자량별 샘플을 얻을 필요가 있다고 사료 된다.

Whey protein UF 비교

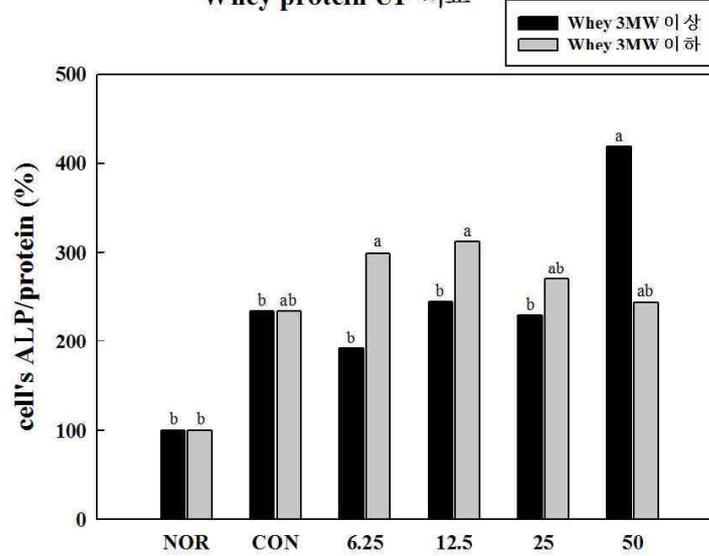


그림 146 유단백가수분해물분획물별 활성평가

The cells in 12-well plates were cultured in differentiation medium (a-MEM containing 10% FBS, 10 mM b-GP, and 50 µg/mL L-AA) with various concentrations of sample for 15 days. Values are means±SD (n=3) : Means with different superscript letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's multiple range tests.

골석 회화 형성도 측정

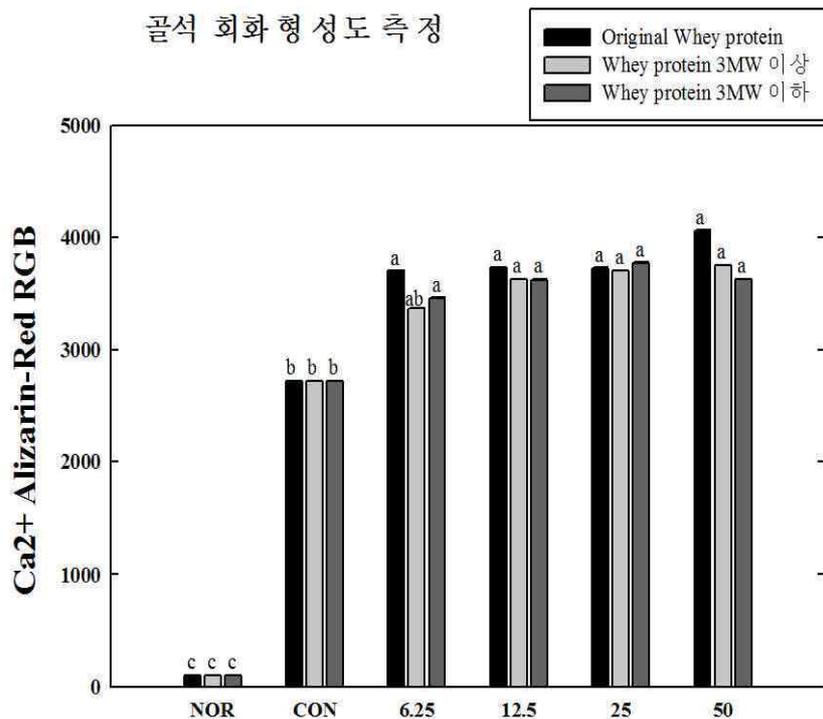


그림 147 골석 회화형성도 측정

② 유청 단백질 가수분해물의 *in vivo* 성장 촉진 확인 연구(SD rat)

■ 실험방법

㉠ 실험동물

3주령의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 중앙 연구소 동물(서울, 한국)에서 채취하였다. 쥐를 6 마리의 동물로 구성된 4 그룹으로 나누었고 3 마리의 흰 쥐를 플라스틱 케이지에 넣었다. 실험 중 실내 온도는 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 대기 습도는 $60 \pm 5\%$, 가벼운 사이클(12 시간 / 12 시간)이 유지되었다. 체중과 식이 섭취량을 매주 2회 모니터링했다.

㉡ 실험적 설계

적용 기간 후에 실험군을 4 군으로 나누었다. NOR; 정상적인 식단 그룹 Whey; 유청 단백질식이 요법 군(600 mg / kg); WPH-L : 유청 단백질가수분해물(Protamex) 식이 군 (300 mg / kg); WPH-H : 유청 단백질가수분해물(Protamex) 식이 군(600 mg / kg) 총 4 그룹의 동물을 4 주 동안 매일 경구 투여 하였다. 사료 섭취량, 물 섭취량, 체중 및 정강이뼈 길이를 3 일마다 측정하였다. 4 주 후 유청 단백질과 유청 단백질 가수 분해물의 성장 촉진 효과는 혈지수와 정강이뼈를 주된 지표로 설정하여 희생시킴으로써 확인되었다.

㉢ 희생과 채혈

실험적 치료 기간의 끝에서, SD-rat들은 희생하기 전에 12 시간 동안 금식되었다. 흰 쥐는 이산화탄소로 안락사 시켰으며 호르몬 수준과 혈액 화학 분석을 위해 하대 정맥에서 채혈 하였다.

수집 된 혈액 샘플을 4°C 에서 10 분간 $3,000 \text{ rpm}$ 으로 원심 분리 하였다. 상등액을 수거하고 여러 개의 분취 액으로 분리 된 튜브로 나누고 분석까지 -80°C 에서 보관했다.

㉣ 생화학적 지표

혈청 내 Insulin like Growth Factor -1 (IGF-1)의 수준은 Rat용 IGF-1 (Insulin like Growth Factor -1) ELISA kit (fine test ER0030 Wuhan Fine Biological Technology Co., KOR)를 사용하여 제조업체 안내서를 참조하였다.

혈청 내 트리글리 세라이드 (TG), 포도당 (Glu), 총 콜레스테롤 (TCHO) 및 고밀도 지단백 콜레스테롤 (HDL)의 함량은 혈청분석기 (Dri-chem 3500i, Fuji Photo Co., Osaka, Japan)를 통해 관찰하였다.

총 칼슘 (Ca)과 Alkaline Phosphatase (ALP)는 혈청분석기(Dri-chem 3500i, Fuji Photo Co., JPN)로 측정 하였다.

㉔ 뼈 분석

해부 된 정강이 뼈를 PIXImus 농도계(GE Lunar, Madison, WI)를 사용하여 스캔 하였다.

장비의 교정 및 정밀도를 확인하기 위해 데이터 수집 중에 제조업체가 제공 한 sample을 매일 스캔했고, 정강이 뼈를 스캔하기 전에 실온으로 유지하였다.

단일 동물의 모든 뼈를 동일한 조건에서 검사하였다. 정강이뼈는 왼쪽 뼈에 대해 유사한 방향을 얻기 위해 장비 제조업체가 제공 한 7mm 두께의 Plexiglas 플랫폼에서 수동으로 공기 중으로 배치되었다.

한 시료를 스캔하는데 걸린 시간은 약 5분이었다. 소프트웨어로 잘못 식별 된 뼈를 제외하고 각 뼈를 개별적으로 분석하기 위해 수동으로 관찰 영역을 조정하여 관찰하였다. 뼈의 위치를 다중 선형 회귀 분석으로 설명했다.

조정 알고리즘은 회화 전에 PIXImus 필드 내의 다양한 위치에서 뼈의 세트를 스캔하여 개발되었으며, BMD는 계단식 다중 회귀 분석에 의해 모델링되었고, 최종 모델은 회화에 의한 광물 함량, 스캐닝 필드 내의 X 좌표 및 스캐닝 필드의 Y 좌표가 중요한 독립 변수로서 포함된다.

스캐닝 필드의 중심으로부터의 거리는 중요한 독립 변수가 아니라 전체 R2 값은 0.95이고 X와 Y 좌표를 조정하여 얻은 D R2는 각각 0.027과 0.003이다.



그림 148 경골 및 경골성장판의 방사선 사진

㉕ 뼈 조직 및 성장판 염색

절개 된 경골은 48 시간 동안 4 % para-formaldehyde에서 고정시키고, 24 시간 동안 10 % ethylene diamine tetra acetic acid에 담금으로써 탈회를 수행 하였다(Sigma Chemicals Co, USA). 30 % sucrose 용액에 담가 이를 동안 탈수시켰다.

각 샘플은 sliding-microtome으로 40 μ m의 두께로 종 방향으로 절개되어 슬라이드로 제조되었다. 이후 cresyl-violet을 사용하여 시료의 성장판에서 연골 세포를

염색 하였다.

슬라이드를 3 분 동안 증류수에, 5 분 동안 cresyl-violet solution, 3 분 동안 50 % ethanol, 3 분 동안 75 % ethanol, 3 분 동안 90 % ethanol, 3 분 동안 100 % ethanol 및 10 분 동안 xylene에 침지시켰다.

절편에 사용 된 0.5 % cresyl-violet solution은 다음과 같이 제조 하였다. cresyl-violet은 Sigma(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)로부터 구매하였다. cresyl-violet 2.5 mg 증류수 300 ml, 1 M Sodium acetic acid(13.6 g / 92 ml 30 ml) 및 1 M acetic acid(170 ml의 빙초산 / 170 ml의 증류수)를 7 일 동안 교반시켜 사용하였다.

permount 용액과 커버 글래스. 성장판 높이는 3 개의 섹션 각각에 대해 Image J 소프트웨어(미국 NIH)를 사용하여 샘플 당 3 개의 다른 영역에서 측정하고 평균값을 계산 하였다.



그림 149 경골성장판 조직형태

㉔ 통계 분석

결과는 평균 \pm 표준 편차로 나타내었다. 필요한 경우 그룹 간 비교를 위해 분산 분석 (ANOVA)을 수행하고 Statistical Package for Social Sciences version 12.0(SPSS Inc., Chicago IL, USA)을 사용하여 Tukey의 다중 범위 테스트를 사용하여 샘플 간 차이를 조사하였다.

■ 실험결과

㉕ 성장기 쥐의 체중, 음식 섭취량 및 음수량

실험 그룹의 실험 기간 동안 체중 변화, 음식물 섭취량 및 음수량을 아래표에

나타내었으며, 실험 그룹의 흰쥐는 비슷한 평균 초기 체중을 가졌다.

유청 처리 군(Whey, WPH-L 및 WPH-H)은 대조군에 비해 체중 증가가 증가하는 경향이 있었다. 유의 한 차이는 관찰되지 않았다. WPH-H(8.24 g / 일)를 투여 한 랫트는 28 일 후에 대조군(7.21 g / 일)의 쥐보다 유의하게($p < 0.05$) 더 많은 가중치를 얻었다.

그러나 Whey(7.70 g / day)와 WPH-L(8.09 g / day) 사이의 체중 증가에는 유의 한 차이가 없었다. 음식 섭취량과 음수량은 4 개 그룹간에 차이가 없었다.

이를 토대로 유청단백질과 유청단백질 가수분해물은 SD-rat의 성장에 효과가 있었음을 확인하였다.

표 81 체중,음식물 섭취 및 음수량

	NOR	Whey	WPH-L	WPH-H
Weight gain (g/day)	7.21 ^b ±0.63	7.70 ^{ab} ±0.09	8.09 ^a ±0.11	8.24 ^a ±0.51
Food intake (g/day)	19.93 ^{ns} ±0.31	19.91 ± 0.48	19.34 ± 0.32	19.49 ± 0.62
Drink volume (mL/day)	23.86 ^{ns} ±0.10	23.08 ± 1.78	23.67 ± 0.48	24.59 ± 0.85

NS ; not significant. Values are mean ± SEM (n=6). Means with different superscript letters with a row are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range tests. NOR; normal control, Whey; Whey protein 600 mg/kg/day, WPH-L; Whey protein hydrolysates 300 mg/kg/day, WPH-H; Whey protein hydrolysates 600 mg/kg/day

Ⓢ 기관 무게 및 혈청 지질

각 실험 군에 대한 기관 무게를 아래표에 나타내었다. 4 군의 신장 무게는 다른 군과 약간 달랐으나 이러한 차이는 유의하지 않았다.

심장, 간, 비장 무게는 4 군 간에 유의 한 차이가 없었다. Whey, WPH-L 및 WPH-H 그룹 내에서 기관 비대 및 수축과 같은 비정상적인 변화는 관찰되지 않았다 (데이터는 표시되지 않음).

이러한 결과는 Whey, WPH-L 및 WPH-H 그룹에 투여 된 식수의 경구 투여가 안전하다는 것을 알 수 있다.

NOR과 실험 군(Whey, WPH-L, WPH-H)에 대한 혈청 지질 수치 변화는 표 11에 요약되어있다. 혈청 지질(TG, TC, HDL- 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤) 수준은 NOR와 실험 그룹(Whey, WPH-L 및 WPH-H)간에 유의미한 차

이가 없었다.

장기 체중과 혈청 지질 수준의 차이에 근거하여 유청 단백질과 유청 단백질 가수 분해물은 흰 쥐에 독성이 없다고 결론지었다.

표 82 각 조직무게

Organ (g)	Normal	Whey	WPH-L	WPH-H
Heart	1.2507 ^{ns} ±0.15	1.2800 ± 0.15	1.2539 ± 0.08	1.2601 ± 0.12
Liver	11.4748 ^{ns} ±0.96	11.8443 ± 0.92	10.8250 ± 0.83	11.5789 ± 0.67
Kidney	2.4160 ^{ab} ±0.16	2.5623 ^a ±0.18	2.3087 ^b ±0.13	2.5028 ^a ±0.19
Spleen	0.7002 ^{ns} ±0.10	0.7299 ± 0.09	0.7709 ± 0.05	0.7396 ± 0.04

표 83 혈청지질농도

Parameter	Normal	Whey	WPH-L	WPH-H
HDL-cholesterol (mg/dL)	56.83 ^{ns} ±7.14	53.17 ± 5.34	50.67 ± 5.28	56.83 ± 9.62
Total-cholesterol (mg/dL)	102.83 ^{ns} ±10.42	93.17 ± 9.45	90.83 ± 11.13	97.83 ± 15.16
Triglyceride (mg/dL)	107.33 ^{ns} ±23.91	88.17 ± 22.76	80.00 ± 16.65	90.67 ± 14.62

㊤ 혈청 칼슘(Ca)과 알칼리성 인산 가수 분해 효소(ALP)

혈청 칼슘, ALP 활동은 널리 사용되는 뼈 형성의 지표이다.

최근 혈청 ALP 측정에 대한보다 구체적인 면역 측정법의 출현과 함께 몇몇 상황에서 혈청 ALP가 ALP 측정보다 골 형성의 더 좋은 지표를 제공할 수 있다는 연구가 있다.

뼈와 연골은 특별한 결합 조직이다. 연골은 그것이 될 뼈의 일반적인 형태로 분비되며, 간질(주로 길이)과 동격(주로 폭)으로 자란다.

ALP는 조골 세포의 성장 및 골화 전 영역에 필수적인 효소로 보고되었다.

골아 세포 표현형은 두 단계로 수집되며, 제 1 단계에서, 기질이 성숙하고 골 세포 표현형(예 : ALP)과 관련된 특정 단백질이 검출된다.

두 번째 단계에서, 기질은 칼슘 침적에 의해 무기화 된다.

결과적으로 해면골 층이 원래 연골 주변에 형성되고 개발 중에 해면상 뼈 사이의 공간은 뼈대로 채워지고 뼈가 된다.

시료 처리 군(Whey; 12.67 mg / dL, WPH-L; 12.73 mg / dL, WPH-H,

12.20 mg / dL)은 NOR(13.60 mg / dL)에 비해 혈청 칼슘 농도가 감소하는 경향이 있다.

하지만 이 차이는 유의하지 않았다. 시료 처리군의 혈청 내 ALP농도는 NOR에 비하여 높은 경향을 보였지만 이 차이는 유의하지 않았다.

ALP와 칼슘 농도를 관찰했을 때 유의적인 차이를 보이진 않았지만 SD-rat의 성장에 유청단백질과 유청단백질 가수분해물이 좋은 영향을 끼치는 경향성을 보이는 것으로 사료된다.

표 84 혈청ALP,칼슘 및 포도당 수치

Parameter	Normal	Whey	WPH-L	WPH-H
ALP (U/l)	1231.00 ^{ns} ± 115.29	1277.67 ± 252.52	1316.33 ± 75.75	1401.33 ± 57.71
Calcium (mg/dL)	13.60 ^{ns} ± 0.36	12.67 ± 0.06	12.73 ± 0.12	12.20 ± 0.35
Glucose (mg/dL)	287.33 ^{ns} ± 52.32	255.00 ± 6.93	259.33 ± 16.62	263.33 ± 49.12

NS ; not significant. Values are mean ± SEM (n=6). Means with different superscript letters with a row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range tests. NOR; normal control, Whey; Whey protein 600 mg/kg/day, WPH-L; Whey protein hydrolysates 300 mg/kg/day, WPH-H; Whey protein hydrolysates 600 mg/kg/day

㉔ Serum Insulin like Growth Factor-1(IGF-1)

IGF-I은 성장 호르몬에 의한 자극에 따라 간 및 기타 기관에서 합성되고 분비된다. 이것은 골아 세포 및 연골 세포에서 성장, 분화 및 기질 합성 활성을 촉진한다.

또한 IGF-I은 긴 뼈의 성장과 하악과 일의 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다.

IGF-I의 국소 투여 후 하악 과립에서 유도 된 조직학적 변화는 3 주에서 12 주 사이의 쥐에서 차이가 있었다. 흥미롭게도, IGF-I의 국지 투여 후, 12 주된 쥐의 성숙한 턱뼈의 조직학적 구조는 젊은 성장 단계와 유사하게 변했다.

혈청 IGF-1 농도를 표 14에 나타내었고 그룹 간의 차이를 그림 17에 나타내었다. 혈청 IGF-1은 NC (1575.71 pg / mL)보다 유청군 (Whey; 1580.21 pg /

mL, WPH-L, 1658.61 pg / mL, WPH-H, 1683.28 pg / mL)에서 약간 더 높았지만 유의차는 없었다.

혈청 내 굉장히 적은 양으로 검출이 되었고 유의차는 존재하지 않았지만 이 역시 대조군에 비해 유청단백질과 유청단백질 가수분해물이 경향성을 보였으며 특히 가수분해물이 IGF-1의 분비에 효과적인 것으로 사료된다.

표 85 인슐린성장인자 수치에 대한 혈청 성장 호르몬

NOR	Whey	WPH-L	WPH-H
1575.71 ^{ns} ± 123.18	1580.21 ± 79.55	1658.61 ± 107.72	1683.28 ± 92.36

NS ; not significant. Values are mean ± SEM (n=6). Means with different superscript letters with a row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range tests. NOR; normal control, Whey; Whey protein 600 mg/kg/day, WPH-L; Whey protein hydrolysates 300 mg/kg/day, WPH-H; Whey protein hydrolysates 600 mg/kg/day

Insulin growth factor-1

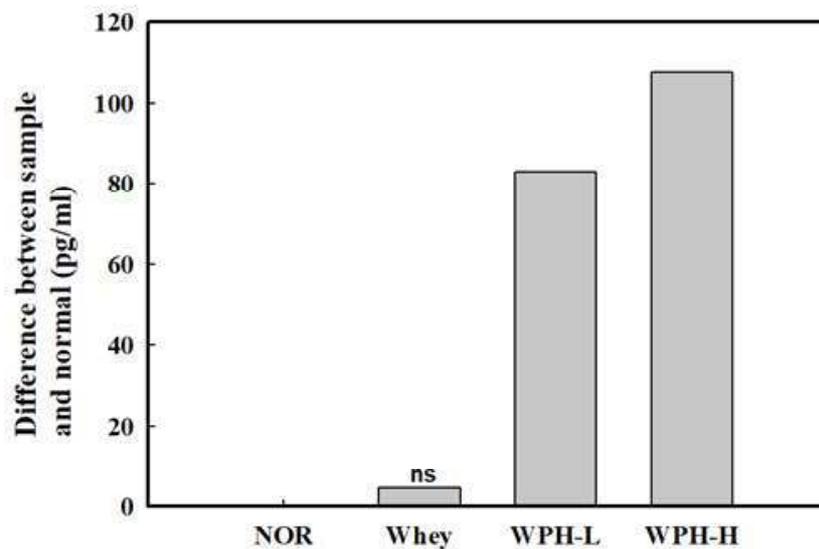


그림 150 Insulin like Growth Factor-1(IGF-1) 분비

㉞ 정강이 뼈 성장 및 성장판 증가

Whey 그룹에 유청 단백질 (600 mg/kg/day)을 투여하고 WPH 그룹에 4 주간 유청 단백질 가수 분해물 (WPH-L, 300 mg/kg/day, WPH-H, 600 mg/kg/day) 각 그룹에 대한 종 방향 뼈 성장의 증가에 대해 시료 처리 군과

NOR 군의 차이점은 아래 그림에 나와 있습니다.

Whey, WPH-L, WPH-H 그룹의 경우 정강이 뼈 성장 증가 값은 각각 39.10, 39.65, 40.63mm 였고 NC 그룹의 경우 38.18mm이었고, 유의 한 차이가 있었다. ($p < 0.05$) NC 군에 비해 처리 군 (Whey, WPH-L, WPH-H)의 증가가 나타났다.

성장판은 휴식 구역에서 시작하여 증식 및 비대화 구역을 통해 확장되는 네 개의 별개의 조직학적 구역으로 구성된다.

성장판 높이가 신체 성장 속도와 상관되기 때문에. 흰 쥐의 성장판 높이를 측정하였다.

Whey, WPH-L, WPH-H 군은 NC 군에 비해 성장판의 높이가 유의하게 높아졌다($p < 0.05$)

Whey, WPH-L 및 WPH-H의 성장판 높이는 345.86, 353.32, 399.23 μm 이었다. NOR 그룹의 경우 289.66 μm 였다.

위의 결과는 Whey, WPH-L 및 WPH-H가 SD-rat에서 성장판의 성장을 촉진한다는 것을 보여준다.

성장 장애는 주로 연령의 증가와 관련된 지연의 형태로 나타난다. 자연 성장은 성장판에서의 연골 세포의 증식과 연골 세포의 골화를 통한 뼈 성장으로의 전환의 결과이다.

유청 단백질과 유청 단백질 가수 분해물 처리 모두 쥐의 성장판과 경골의 성장을 촉진시켰다.

표 86 성장판 길이

	NOR	Whey	WPH-L	WPH-H
Growth plate (μm)	289.66 ^c ± 39.59	345.86 ^b ± 32.96	353.32 ^b ± 30.30	399.23 ^a ± 21.59

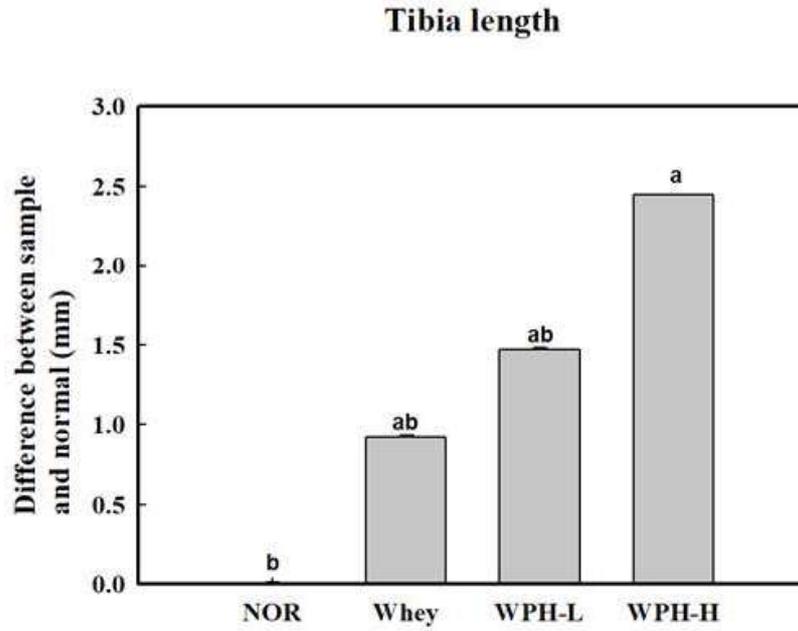


그림 151 경골길이 차이

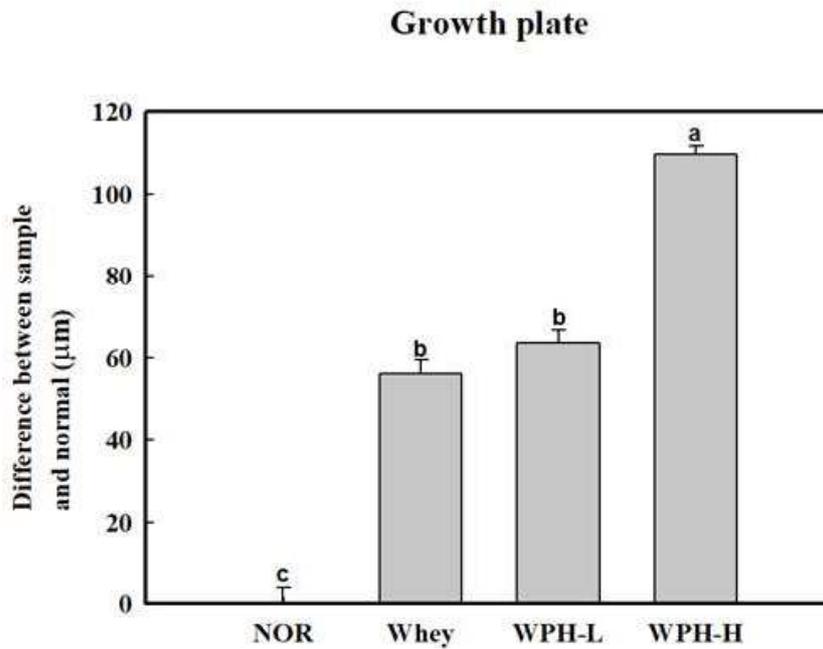


그림 152 성장판 길이 비교

㉠ 뼈 분석

*L. helveticus*로 발효 된 우유는 SHR에서 뼈에 유익한 효과를 보였으며 BMD를 증가시키고 BMC를 물 및 탈지 우유보다 더 많이 축적 하였다. 우유 발효에서 형성된 펩타이드 유형은 사용 된 박테리아에 달려있다.

락토바실러스 헬 베티 쿠스(*Lactobacillus helveticus*)에 의한 발효는 프로틴 함유 펩티드 이소올루실 프릴 - 프롤린 (IPP) 및 발리 - 프롤린 - 프롤린 (VPP)을 생산한다.

IPP와 VPP와 마찬가지로 *B. subtilis*와 함께 배양 된 발효 물은 BMD와 BMC를 증가시키는 알려지지 않은 성장 인자를 생산할 수 있다.

Whey, WPH-L 및 WPH-H는 NOR 군에 비해 BMC의 증가를 나타내는 경향이 있었지만, 이 차이는 유의하지 않았다. BMD는 일반적으로 시료 처리 군에서 BMC와 동일한 경향을 보였으나, NOR 군은 가장 높은 수치를 보였다.

BMD는 BMC를 Bone Area 값으로 나눈 값인데, Bone Area 값이 NOR에서 가장 낮기 때문에 BMD가 NOR 군에서 가장 높은 수치를 보였다. Whey, WPH-L, WPH-H 그룹의 BMC 값은 각각 298.60, 306.13, 317.35 g이었고 NOR 그룹의 BMC 값은 296.55 g이었다. BMD 수준은 각각 176.58, 176.15 및 179.83 g / cm² 였고, NOR 군의 BMD 수준은 181.25 g/cm²였으나 유의차는 없었다.

표 87 4주후 분석 결과

Parameter	NOR	Whey	WPH-L	WPH-H
BMC (mg)	296.55 ^{ns} ± 7.26	298.60 ± 27.72	306.13 ± 24.10	317.35 ± 27.70
BMD(mg/cm ²)	181.25 ^{ns} ± 8.78	176.58 ± 8.59	176.15 ± 7.41	179.83 ± 10.40
Bone Area (cm ²)	1.59 ^{ns} ± 0.07	1.69 ± 0.12	1.74 ± 0.13	1.76 ± 0.05
Bone Volume (cm ³)	0.18 ^{ns} ± 0.00	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.02
Bone length (mm)	38.18 ^b ± 1.00	39.10 ^{ab} ± 1.41	39.65 ^{ab} ± 1.25	40.63 ^a ± 0.30

다. 사업화 실적

- 유기농 올리고당 소재의 사업화

(주)네오크레마는 세계적으로 개발 실적이 없는 유기농 갈락토 올리고당의 판촉을 위해 “NATURE’S OLIGO” 브랜드를 론칭하였으며 세부 브랜드로 “NATURE’S GOS”를 론칭하였다.



그림 153 유기농올리고당브랜드

세계의 유기농 식품 시장은 2009년부터 빠르게 성장하여 연평균 8.1%의 성장률을 나타내고 있고, 특히 2013년 한 해 동안 748억 1만 6,000 달러의 수익을 기록하였으며 아시아태평양 시장에서는 연평균 성장률 13.8%로 44억 350만 달러의 수익을 낸 것으로 보고되었다.

2013년 이후로 유기농 식품 시장은 시장이 안정화되기 시작하여 2018년 유럽과 아시아 태평양 시장 각각 약 401억 450만 달러, 64억 6,790만 달러의 시장이 형성될 것으로 예상되고 있다. 세계 유기농 시장에서 식품유형별 점유율 중 유제품이 17.5%를 차지하고 있는 것으로 보고되어 있고, 국내 유기농 식품시장의 경우 유기농 완제품이 아닌 유기농 소재식품군으로 확대되어 가고 있는 상황이다.

갈락토올리고당의 경우 대표적인 prebiotic 으로서 Baby food 및 건강기능식품 등 다양한 분야에 사용되어 있는 기능성 올리고당으로 알려져 있다. 하지만 유기농 기능성 올리고당 개발이 미비하여 전 세계적으로 유기농 소재로서의 prebiotic 은 제한된 실정이었다.

(주)네오크레마는 전년도 본 과제를 통하여 개발된 순도 50% 이상의 유기농 갈락토올리고당에 대하여, 유기가공제품 생산을 위한 유기가공인증을 획득하였으며, 또한 전세계 6500억 달러 시장규모를 가지고 있는 할랄식품시장에 진출하기 위하여 할랄인증을 받은 상황이다.

(주)네오크레마는 이를 바탕으로 국내외 홍보 등을 통하여 수출확대에 힘쓴 바, 312톤의 수출계약을 성공시켰으며, 현재 유기농분유 제품을 생산하는 호주업체인 ‘Bellamy’s organic’ 사 및 ‘Tatura’ 사에 3,561,600달러(USD) 의 해외수출계약을 맺었다.

그리고, 본 과제를 통하여 개발된 유기농갈락토올리고당은 세계최초로 개발된 유기농 갈락토올리고당 으로서, 본 과제의 협동기관인 매일유업과 협업하여, 영유아식 유기농 유제품 중국시장 및 세계시장에 진출할 수 있는 토대 또한 마련하였다.

1) 유기농갈락토올리고당 유기가공식품인증 획득

본 과제를 통하여 개발된 유기농 갈락토올리고당을 유기농갈락토올리고당으로서 생산하여 사업화하기 위하여 (주)네오크레마는 전남 장성에 있는 자사공장을 대상으로 유기가공인증신청을 수행한 결과 유기가공인증을 획득하여 국내외 유기농제품 수출의 토대를 마련하였다. 또한 중국은 국내유기가공인증과 동등성이 인정되지 않아 별도의 인증을 획득하였다.

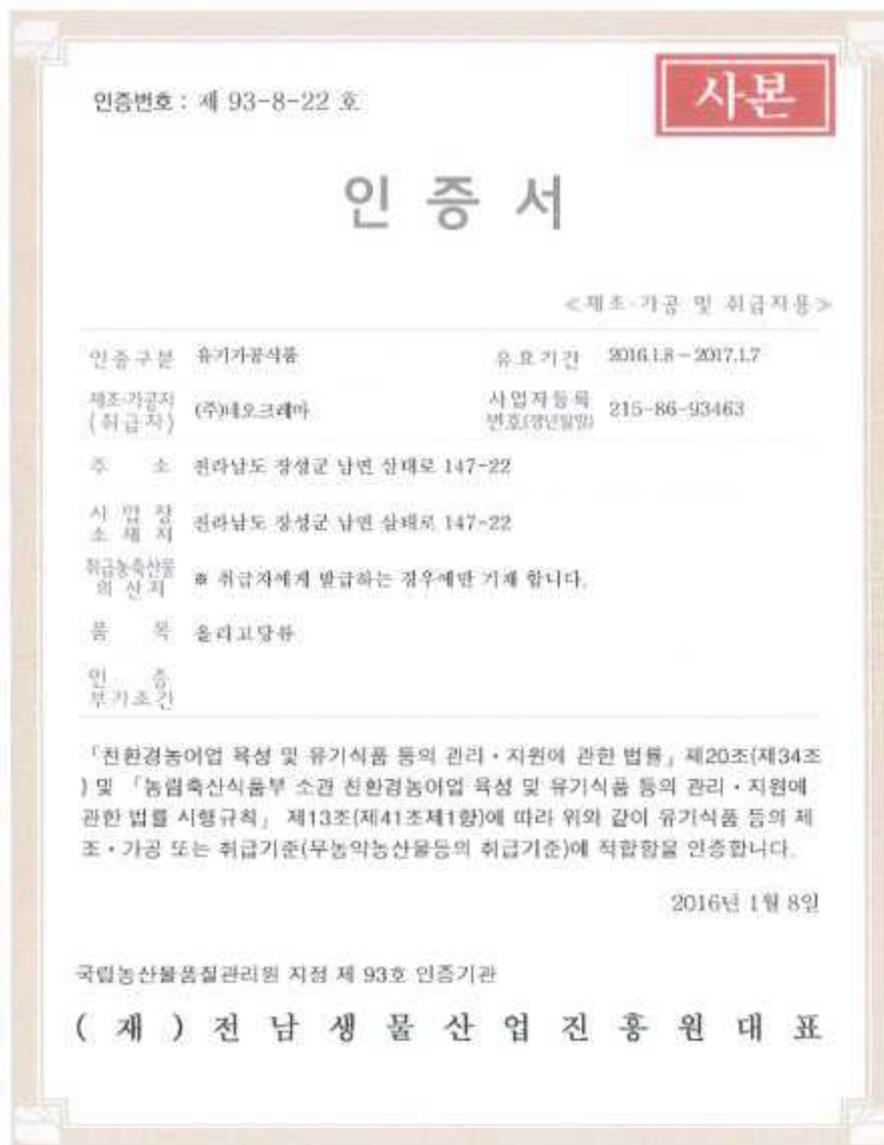


그림 156 유기가공인증서

ORGANIC



Certificate No.: B15OP1700178

ORGANIC PRODUCT CERTIFICATE

Certificate Holder: Neo Cremar Co., Ltd.
 Address: A-714, Hyundai Knowledge center, 11, Beobwon-ro 11-gil, Songpa-gu, Seoul

Processor: Neo Cremar Co., Ltd.
 Address: A-714, Hyundai Knowledge center, 11, Beobwon-ro 11-gil, Songpa-gu, Seoul

Category of certification: Processing

Standards
 GB/T19630.2-2011 Organic Products: Processing
 GB/T19630.3-2011 Organic Products: Labelling and Marketing
 GB/T19630.4-2011 Organic Products: Management System

Product	Product description	Manufacturer name	Manufacturer address	Quantity
Organic galacto-oligosaccharide-CL	Organic galacto-oligosaccharide-CL	Neo Cremar Co., Ltd.	No.210, 123, Namsosadan-ro, Namsosyon, Jangseong-gun, Jeollanam-do, Korea	100T
Organic fructo-oligosaccharide	Organic fructo-oligosaccharide			500T

This is to certify that the above products and the related processing procedures are in compliance with the above standards and "Rules for Implementing the Certification of Organic Products."

Date of first issue: Mar 31 2017
 Date of issue: Mar 31 2017
 Valid until: Mar 30 2018
 Name of U.E. Hangzhou WTI Assessment Co., Ltd
 Address: 13th-14th Floor, 1 Building, Sunyaz Mansion, No.1750 Jianghong Road, Binjiang District, Hangzhou, China
 Tel: +86-571-87961898



그림 157 중국유기인증서

2) 유기농갈락토올리고당 할랄인증획득

할랄이란 아랍어로 '법적으로 허용된(lawful)'이라는 의미로서 크게는 이슬람 법 기준에 맞는 물체의 행동을 뜻하고, 일반적으로 이슬람법에 따라 생산된 식품들을 일컫는 용어였으나 현재는 그 범위가 의약품, 화장품들에 까지도 확대되어 쓰이고 있으며 기본적으로 할랄식품은 돼지고기와 알코올을 포함하지 않고, 이슬람의 다비하법

(Dhabiha)에 따라 도살된 가축(소,양,닭)만 사용가능 하다.

전세계 할랄식품 시장규모는 ‘World Halal Forum’ 과 ‘Halal focus’ 에 따르면 전 세계 할랄식품 시장은 2009년 기준 세계식품시장 규모는 6,320억 달러에 이르며, 유럽시장규모는 3350억달러에 달하고, 특히 인도네시아의 경우 785억달러로 세계최대 시장이며 인도가 240억달러, 러시아 및 중국이 각각 210억 달러에 달하여 할랄식품 인증획득 필요성이 증가 되는 상황이다.

이러한 국제 할랄식품 시장에 진출하기 위하여, (주)네오크레마는 본 과제를 통하여 개발된 유기농갈락토올리고당에 대하여 할랄인증을 취득한 상황이다.



그림 158 할랄인증서

3) 전시회 참가

(주)네오크레마는 본과제를 통하여 1차년도 개발된 유기농 갈락토올리고당의 국내외 판촉을 위해 론칭한 “NATURE’S OLIGO” 브랜드와 세부브랜드로 “NATURE’S GOS” 를 이용하여 국내전시회인 2016국제식품대전 과 미국 애너하임에서 개최한 ”2016, 미국 애너하임 자연식품 박람회“, ”2016스위스 비타푸드박람회“, ”2016 상해FIA전시회”에 참가하여 국

내외 홍보를 수행하였고 시장조사를 진행하였다.

론칭한 브랜드를 바탕으로 해외 전시회에 제품을 출시하여 세계 시장에 유기농 기능성 올리고당 소재로 “NATURE’S GOS”를 소개한바 있다. 2015년 4개의 전시회에 제품을 출시하고 전시한 결과 유기농으로서 최초로 소개된 제품이라는 점에서 큰 관심을 받은 바 있다.



2015 서울국제식품전시회



2015 FIA - Shanghai



2015 FIA-Thailand



2015 HI Japan

그림 159 015 국내외 전시회 참가 현황

- 2016 ,2017 미국애너하임 자연식품 박람회 참가
- 일 시 : 2016.03.11. ~ 2016.03.13.
- 일 시 : 2017.03.10. ~ 2016.03.12.
- 장 소 : 미국 애너하임



그림 160 애너하임 자연식품박람회 참가 및 유기농제품 시장조사 사진

- 2016 스위스 비타푸드 박람회 참가
- 일 시 : 2016.05.10.~2016.05.12.
- 장 소 : 스위스 제네바



그림 161 2016 스위스 비타푸드 박람회 참가 및 시장조사

- 2016 상해식품원료 첨가물박람회 참가(상해 FIA)
 - 일 시 : 2016.06.21.~2016.06.23.
 - 장 소 : 중국 상해



그림 162 유기농올리고당 중국브랜드 및 전시회 브로셔

- 2016 국제식품산업대전
 - 일 시 : 2016.05.10.~2016.05.12.
 - 장 소 : 일산킨텍스



그림 163 2016국제식품전시회 참가사진

4) 유기농 갈락토올리고당 포장 요구도 관련 형태 연구

▣ 갈락토 올리고당의 포장 요구도

올리고당은 단당류가 2~10개 결합한 것으로서, 유당을 원료로하여 생산된 갈락토 올리고당은 열안정성(160°C까지)과 pH 안정성(pH 3까지)이 뛰어나(Torres 등, 2010) 가공 상의 장점과 함께 포장유통에서도 어느 정도의 저장 안정성을 갖는다. 포장을 위한 갈락토 올리고당의 특성을 측정하여 정리하면 표 29과 같다.

대표적으로 점성이 높은 액체로서 용기에 충전될 수 있는 것으로 보인다. 보존성은 높은 당도에 의한 낮은 수분활성도에 기인하는 것으로 생각되며, 필요한 경우 영양세포(vegetative) 세균, 효모, 곰팡이의 사멸을 위한 저온살균이 이루어질 수 있을 것으로 생각된다.

표 88 갈락토 올리고당의 특성

항목	특 성
색택	얇은 황색/정제에 따른 투명
pH	6.30±0.09(자사 유통의 일반적 제품의 경우에 한함)
수분활성도	0.735±0.001
당도(° Bx)	75.5±0.1
점도(cp)	1166±202

pH 범위가 광범위하면서(표 1에서는 중성 범위) 수분활성도가 약 0.74인 갈락토 올리고당은 비교적 미생물적 저장 안정성이 있는 것으로 평가할 수 있다. 품질보존과 수송 용이성을 위하여 생각할 수 있는 포장의 요구도를 식품포장의 기능의 측면에서 생각하면 다음 표 2와 같이 정리할 수 있다.

이 제품이 B2B 제품인 점을 고려하면 품질보존성과 함께 수송 및 취급 편의성을 고려하는 것이 중요한 것으로 생각된다. 비교적 큰 포장단위로 업체 간에 거래가 이루어지는 점을 고려하면, 컨테이너를 통한 수송에서 지게차 및 트럭 등의 운반수단과의 조화를 고려할 필요가 있으며, 이 과정에서 안전성이 확보되면서 포장 및 수송 비용이 과도하게 발생하지 않아야 할 것이다.

제품의 수송과정에서 기계적 보호성이 확립됨과 아울러 제조 후 최종 제품의 사용 시 까지 품질변화가 억제될 수 있는 빛 차단성, 산소 차단성, 수분 차단성 등이 요구된다. 특히 자사에서 생산중인 조제분유의 경우 생산이 대량으로 이루어지는 만큼 자재의 보

관기간이 길고 대량발주로서 자재가 관리되어지고 있다. 큰 포장 단위에서 중간 소재제품으로서 갈락토 올리고당을 포장하고 필요시 사용하기 위하여 포장에 주입하고 배출하는 데에 어려움이 없어야 할 것이다.

그리고 제품을 덜어내는 때에 잔존량이 없이 내용물이 완벽하게 배출되게 하는 장치가 필요할 것이다. 생산현장에서 고점도의 제품인 만큼 개량 및 자재 투입시 작업자의 어려움이 있기 때문에 가운을 하여 투입을 할 수 있으며 최종 포장지에 열수를 투입하여 용해시킬 수도 있기 때문에 이에 따른 포장재에 대한 고려 또한 필요하다.

제품의 사용까지 적재하는 공간에서의 적재 효율성과 취급의 편리성이 아울러 검토될 필요가 있다. 제품의 사용상의 필요를 도와주는 사용안내 및 제품생산의 이력을 알려주는 정보가 제공되면 좋을 것이다. 그리고 포장의 사용 후 폐기에 대한 안내, 그리고 재사용가능 포장의 회수 방법 등에 대한 안내가 포장에 표기되거나 정보기술을 통하여 최종 사용자에게 안내될 필요가 있다.

표 89 포장의 기능성의 측면에서 검토된 갈락토 올리고당 포장의 요구도

포장의 기능	포장 요구도
보관수송	공급체인에서의 운반수단과의 조화성, 배송컨테이너에서의 적재공간효율성, 수송시 안전성, 포장비용의 절감
보호성	내용물과 외부와의 차단성과 용기 형태를 보존할 수 있는 기계적 강도, 제품의 갈변 방지 기능, 수분 차단성, 빛 차단성, 산소 차단성
편의성	취급과 사용에서의 편리함, 초기 제품 주입의 편리성, 제품 사용에서의 제품 배출의 용이성, 사용 중 및 사용 후 용기 적재 및 취급의 편리성
정보전달	제품정보 제공, 생산정보, 사용용도 정보, 재사용 포장의 경우 재사용 정보, 1회 사용 포장의 경우 폐기 정보

■ 가능한 포장 방법의 발굴 및 검토

위의 표의 요구조건을 만족시키면서 B2B 액상 제품으로서 공장에서 대량으로 사용하기에 편리한 포장형태를 현실적으로 만족할 수 있는 방안을 발굴하여 검토하였다.

자사에서는 20L 용량을 기본으로 사용하나, 제품을 운영하는 제조사의 입장에서는 사용의 용도와 형편에 따라 포장의 용량은 20 L에서부터 1,000 L의 범위에 있을 수 있으며, 표 3에서는 포장 형태별 장단점을 간단히 비교 정리하였다.

플라스틱 층으로 코팅된 판지 박스는 폐기, 수송 및 가격 면에서는 무난하지만, 내구성과 재사용 면에서는 한계를 가지고 있다. 플라스틱 백은 경량이어서 수송비용면에서는 양호하지만, 수송저항성과 재사용 면에서는 약간의 한계를 가지고 있으며, 폐기 시에 환경적 부담을 갖게 하는 최근의 사회적 분위기와 태도가 존재한다. 성형 플라스틱 용기는 재사용과 수송 저항성에서는 양호하지만 가격에서의 부담과 사용 후 폐기에서의 환경적 부담을 가진다. 금속캔이나 드럼은 내구성, 수송 안정성, 재사용 가능성 면에서는 매우 양호하지만, 무게와 가격에서 어느 정도의 부담을 준다.

표 90 액상 올리고당의 포장 요구도를 만족시킬 수 있는 B2B 포장의 방법과 그 특성

포장의 형태	재사용	폐기	무게	내구성	수송 저항성	가격	수송 비용
코팅판지(fiber)박스	무난	매우 양호	매우 양호	무난	무난	매우 양호	매우 양호
플라스틱 백	양호	무난	매우 양호	양호	양호	양호	매우 양호
성형 플라스틱 용기	매우 양호	무난	양호	양호	매우 양호	무난	양호
금속 캔 혹은 드럼	매우 양호	매우 양호	무난	매우 양호	매우 양호	무난	무난

액상 올리고당의 포장 요구도를 만족시킬 수 있는 B2B 포장의 방법과 그 특성인 위 표에서 일부 포함되지만 충분히 다루어지지 않은 포장은 fiber 드럼이나 플라스틱 드럼 형태의 포장이 있다. Fiber 드럼은 fiber board의 다수 층과 플라스틱 및 알미늄 호일로

적층되어 제조될 수도 있고, 플라스틱 드럼의 경우는 사출성형이나 blow-moulding 되어서 제조된다. 플라스틱 드럼은 그 이용 면에서는 성형 플라스틱 용기와 특성과 이용 면에서도 비슷한 면이 많다. Fiber 드럼은 액체 식품의 보관 저장을 위해서는 폴리에틸렌 필름층이나 알미늄 호일 층을 내부에 적층 포함시켜서 내수성과 기체차단성을 향상시키고 있다. 그리고 이러한 드럼은 주로 실린더 형태이지만 최근에는 네모난 바닥을 갖는 형태로 제조되어 사용되기도 한다. 대형 드럼과 함께 갈락토 올리고당과 같은 소재 액체 식품의 포장에 사용될 수 있는 포장기법의 하나가 Bag-in-Box 포장으로서 내부에 플라스틱 봉지에 액체식품을 충전하여 사용되기도 한다.

■ 품질보존성 향상을 위한 포장기법 발굴 및 검토

○ 포장의 차단성

현재 올리고당에서 미생물적 품질의 제어는 제조과정에서의 미생물 제어와 함께, 무균적 환경에서의 충전으로 제어되고 있다. 미세공 여과 등을 통하여 제품에서의 미생물 제어가 된다고 하더라도, 포장재에서의 미생물 오염을 확실히 제어하는 기술의 확립과 적용이 필요할 것이다. 필요시 포장용기를 사전에 열적 살균, 화학적 소독, 방사선 살균에 의하여 무균적 상태로 유지하는 것이 필요하다. 특히 대기중에 있는 크로노박터 사카자키균에 취약한 영유아를 위한 분유 제품에서는 완제품에서의 규격에서 철저히 미생물 규격에 대한 관리를 요구하고 있다. 통상적으로 자사에서 원료에서부터 관리를 진행하고 있어 원물이 오염되지 않도록 완제품에 규격 요청하며, 입고시 제품에 대한 검사를 진행하고 있다.

(주)네오크레마에서 생산되는 유기농 갈락토올리고당 제품 제조공정과 포장용기 공급의 문제로서 충분히 확립된 공정으로 이루어지는 것으로 전제하고 본 연구부분에서는 포장재 선정과 제품 포장단계에 대해서만 검토하였다. 위의 전제 하에 갈락토 올리고당의 품질변화는 산화를 포함한 화학적 갈변에 의하여 주로 진행되며, 이를 방지하는 포장적 수단으로는 빛 차단, 산소 차단이 가장 중요하게 취급되어야 한다. 물론 제품의 특성 보존을 위하여 수분함량의 일정한 유지가 중요하기 때문에 수분 차단성도 함께 고려되어야 할 것이다.

빛 차단성의 확보를 위해서는 금속 용기를 사용하거나 플라스틱 소재에 알미늄층을 적층시키거나 증착시키는 방법이 가장 바람직하다. 알미늄층의 사용은 빛 차단성의 제공과 함께 수분 및 산소에 대한 차단성도 증가시키는 역할을 한다. 단순 플라스틱 용기를 사용하는 경우에는 투명 소재 대신에 착색 소재를 사용하는 것이 방안이 될 것이다.

어떤 포장형태를 사용하든지 충분한 품질보존성을 위해서 산소 및 수분에 대한 차단성을 갖는 것이 필요하며, 특히 플라스틱을 백이나 성형용기로 사용하는 경우에 이에 대한 고려가 매우 중요하다. 이러한 목적을 위하여 표 4에서는 플라스틱 소재에 대한 산소 및 수분 차단성을 정리하였다.

표 91 올리고당의 품질보존성을 고려하기 위한 플라스틱 소재의 산소 및 수분 차단성

플라스틱	투과도($\text{cm}^3 \text{ mm m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ atm}^{-1}$)	
	산소	수증기
EVOH	0.01-0.04	0.5-2
재생 셀룰로즈	0.1	0.4
Nylon 6	0.6	3
Nylon 66	0.6	5
Nylon	1.5	1
Polycarbonate	100	3
PEN	1.5	0.75
PET	2	0.6
HDPE	100	0.2
LDPE	250	0.5
LLDPE	200	0.4
EVA	300	3
PP	90	0.2
OPP	60	0.1
PS	120	3
비가소화 PVC	7	1
가소화 PVC	140	5
PVDC	0.05	0.1
PVA	0.05	30
Polyamide	8	2

■ 올리고당의 품질보존성을 고려하기 위한 플라스틱 소재의 산소 및 수분 차단성을 고려한다면, 현재 갈락토 올리고당의 포장에 사용되고 있는 플라스틱 포장 필름의 소재인 폴리프로필렌(PP)이나 고밀도폴리에틸렌(HDPE)의 산소 투과도가 높아서 충분한 산소

차단성을 부여할 수 없는 점이 있기 때문에 공압출 등의 가공방법으로 다른 차단성 소재와 적층이나 결합하여 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 특히 필름소재를 Bag-in-Box 포장에 적용하는 경우 등과 같이 필름 두께가 얇을 때에는 이에 대한 고려가 필요할 것이다.

○ 포장의 산소 제거 방법

■ 산소의 존재가 갈변 등의 여러 품질변화에 영향을 줄 수 있기 때문에 초기 포장 및 제품에 존재하는 산소를 제거하는 것이 중요하다.

■ 기계적 탈기를 포장 작업 시에 초기 산소를 제거하면, 있을 수 있는 잔존 곰팡이 포자에 의한 곰팡이 변패를 막을 수 있는 점에서도 유용하다. 진공포장이나 불활성기체치환포장도 산소 제거에 유용할 수 있다.

■ 여러 측면에서 포장공정에서 산소의 존재를 최소화하고, 저장 중 투과되는 산소를 제거하는 포장소재를 추가적으로 검토할 수 있을 것이다. 과거 납품되던 올리고당의 소포장의 경우 내부의 TS변화나 물로 인하여 미생물, 특히 곰팡이류의 오염에 취약하였으며, 이로 인하여 QA에서의 제품 반품 문제가 발생하고는 하였다.

■ 따라서, 포장재, 혹은 완제품으로부터 기인되는 곰팡이류의 포자 부분에 대해서는 군사체가 확장되지 않도록 사전에 제품 관리 및 포장재 내 오염관리가 필수적이라 할 수 있다. 이외에 오염의 문제에서는 앞서 설명한 바와 같이 결국 잔존산소에 따른 발아 조건이므로 이 부분에 관리 방안을 확인하고자 하였다.

■ 산소제거제로 사용되는 제품과 그 원리를 보여주고 있다. 이러한 포장공학적 접근은 추후의 제품화시 검토하고, 가능한 방법을 제조사에 요청하고자 한다. 산소 제어를 위하여 산소 흡수제를 뚜껑 부분에 포함시키거나 플라스틱에 합입된 형태로 결합시킬 수 있는 포장 시스템을 설계할 수 있을 것이다.

■ 그 밖에 가장 간단하게 포장재 내 잔류 산소를 제거할 수 있는 방법은 고온의 상태에서 충진을 하는 방법이다. 이 경우 냉각시 탈기가 일어나 포장재 내 진공이 발생한다. 해당 방법을 사용하기 위해서는 포장재에 대한 내열성 요구와 고열에 의한 위해물질의 용출이 일어나서는 안된다. 통상적으로 쉽게 사용할 수 있는 방법이나 포장재 내 압력을 견딜 수 있는 방안이 동시에 이루어 져야 한다.

표 92 식품포장에 사용되는 산소 흡수제의 종류

형태	기작	상업적 제품의 예
건조상태 혹은 젖은 철 분말을 담은 봉지, 라벨, patch	촉매나 수분 공급 조건에서 산화	Mitsubishi 화학의 Ageless™(일본), Multisorb Technologies의 FreshMax™와 FreshPax™ (미국), EMCO Packaging의 ATCO™(영국), Lipmen의 Everfresh™(한국), TPG의 O ₂ -Zero(한국)
고분자(필름, 트레이 벽, 병의 뚜껑 및 내부 liner) 에 철분을 함유한 형태	수분에 의한 철의 산화	Toyo Seikan의 Oxyguard™(일본), Ciba Specialty Chemicals의 Shelfplus O ₂ ™(스위스), Standa Industrie의 Oxycap™(프랑스), M & G의 ActiTUF™(이탈리아)
유기 산화성 기질(ascorbates, sulfites, catechol, gallic acid, 불포화지방산)을 포함시킨 봉지, 라벨, 고분자 소재	금속 촉매에 관계하여 유기물의 산화	W.R. Grace의 Darex OST™ (미국), Chevron Philips Chemical의 OSP™(미국)
반응성 고분자	금속촉매(코발트)와함께 고분자 성분의 산화	Cryovac Sealed Air의 OS™(미국), ColorMatrix의 Amosorb™(미국), Mitsubishi Gas Chemical의 MXD-6 nylon(일본), CMB Technologies의 Oxbar™(프랑스)
광민감성 염료/고분자 매체의 유기물	자외선에 의한 anthraquinone 염료의 산화	Food Science Australia 의 ZerO ₂ ™(호주)
고정화 효소	산화성 기질, 포도당, 에탄올과 접촉되는 산화효소	Bioka의 Bioka™(핀란드)
고분자 표면에서 나노결정성 TiO ₂	Titanium의 광촉매성 활성화에 의한 휘발성유기물질의 산화	

○ 현실적인 포장 대안

■ 위의 여러 면을 고려하여, 현실적으로 갈락토 올리고당의 포장에 사용할 수 있는 형태는 표 34으로 정리할 수 있다. 현재 사용되고 있는 폴리프로필렌 필름 봉지를 격자용 상자에 담아 사용하는 것은 Bag-in-Box포장의 개념으로서 사용할 수 있을 것이다.

■ 각 대안은 장단점이 있기 때문에 포장의 구조와 형태, 표33의 산소 흡수 제거의 기능성 포장요소의 결합, 저장기간에 따라서 최적의 선택은 달라질 수 있을 것이며, 향후 이를 구체적 경제성, 품질보존성 등을 고려하여 선정할 필요가 있다. 그리고 가능한 대안에 대해서는 포장을 제조하여 저장실험을 수행하여 품질보존성 효과를 평가할 수 있을 것이다.

표 93 액상 올리고당의 현실적 포장 대안의 비교

포장 형태	용량	장점	한계점
HDPE 용기	18~200 L	용기의 재사용 가능성, 소형으로 필요량만큼 사용가능	뚜껑부분 밀봉에서 산소제거에서 특별한 조작 필요
Bag-in-Box (PP 필름 /외부 box)	200~1000 L	제품 취급의 용이성, 가격 경쟁력	산소 차단성을 위해서 증착 혹은 알미늄 호일 필름 사용 필요
Fiber 드럼	200~1000 L	우수한 산소차단성, 기계적 강도 우수	비교적 높은 가격, 수송시 공간사용 효율성에서 제한, 재사용에서 제한

5) 유기농 기능성 소재의 사업화

가) 유기농분유 내 첨가된 유산균 생육에 적절한 올리고당 비율조건 확립 연구

분유 내 최적 올리고당 비율을 설정하고자 GOS (Galacto-oligosaccharide), FOS (Fructo-oligosaccharide), HMO (Human-milk-oligosaccharide) 등에 대한 연구 논문 등을 조사하고 이를 바탕으로 최적의 올리고당 비율을 설정하고자 한다.

M. Saminathan 등 (2010)의 논문에 따르면 10가지의 상업적으로 사용이 가능한 올리고당을 대상으로 닭의 장관으로부터 분리해낸 *Lactobacillus* 11가지 균주의 성장을 *in vitro*로 비교하였다.

실험에 사용한 상업적으로 판매되고 있는 올리고당은 Galacto-oligosaccharide (GOS), fructo-oligosaccharide (FOS), mannano-oligosaccharide (MOS), isomalto-oligosaccharide (IMO), xylo-oligosaccharide (XOS), gentio-oligosaccharide (GTO), 락툴로스, Raftilose P95, Raftilose L60, Raftiline LS 이다.

이러한 10가지의 올리고당을 MRS 배지에 1% (v/v)로 첨가하고 *Lactobacillus*를 접종한 뒤 37°C의 혐기성 조건 하에서 24 시간 동안 배양한다. 배양이 끝난 뒤 30초 동안 고무 섞어주어 박테리아 세포들을 분산시키고 각 균주의 성장을 620 nm에서의 흡광도 (Optical density, OD) 값을 통하여 측정한다.

<i>Lactobacillus</i> strain	Relative growth ¹									
	IMO	GOS	GTO	FOS	XOS	Lac	L60	MOS	P95	LS
<i>L. reuteri</i> C 1	****	****	****	*	*	****	*	*	*	*
<i>L. reuteri</i> C 16	****	****	***	*	*	***	**	*	**	*
<i>L. reuteri</i> C 10	***	****	**	*	*	****	*	*	*	*
<i>L. salivarius</i> I 24	**	****	*	****	*	*****	*	*	*	*
<i>L. gallinarum</i> I 16	****	***	*****	****	*	***	***	**	*	**
<i>L. gallinarum</i> I 26	****	***	****	***	*	***	***	**	*	*
<i>L. brevis</i> I 25	***	**	**	**	*****	*	*	*	*	*
<i>L. brevis</i> I 12	***	**	**	**	*****	*	*	*	*	*
<i>L. brevis</i> I 211	***	**	**	**	*****	*	*	*	*	*
<i>L. brevis</i> I 218	***	**	**	**	*****	*	*	*	*	*
<i>L. brevis</i> I 23	***	**	**	**	*****	*	*	*	*	*

¹Relative growth (growth of strain on oligosaccharides relative to its growth on glucose); no symbol represents relative growth of < 20%; * relative growth of 21- 40%; ** relative growth of 41- 60%; *** relative growth of 61 to 80%; **** relative growth of 81- 100%; ***** relative growth of > 100%; values were calculated from values shown in Table 1. IMO = isomaltoligosaccharides, FOS = fructooligosaccharides, GOS = galactooligosaccharides, GTO = gentiooligosaccharides, XOS = xylooligosaccharides, MOS = mannooligosaccharides, L60 = Raftilose L60, P95 = Raftilose P95, LS = Raftiline LS, Lac = lactulose.

그림 164 10가지 올리고당 종류별 *Lactobacillus* 11가지 균주의 성장 비교도

측정한 OD값을 바탕으로 10가지 올리고당 종류별의 *Lactobacillus* 11가지 균주의 성장

정도를 비교한 결과, IMO의 경우가 11가지 균주 모두에서 가장 좋은 성장을 나타내었다. 이어서 GOS와 GTO, FOS의 경우에도 *Lactobacillus* 11가지 균주에서 좋은 성장을 나타내었다. Raftilose L60, Raftilose P95, Raftiline LS, 그리고 MOS의 경우, 부실한 성장을 나타내었다.

Strain	Growth (OD ₆₀₀) ^{1,2}										
	Substrate										
	Glucose	GOS	P95	L60	LS	Lactulose	XOS	IMO	FOS	GTO	MOS
<i>L. reuteri</i> C 1	1.56 ±0.02 ^{12a}	1.47±0.02 a	0.39 ±0.01 ^{12b}	0.64 ±0.04 ^{2b}	0.35 ±0.01 ^{12b}	1.36 ±0.02 ^{12a}	0.36 ±0.02 ^{2b}	1.37 ±0.03 ^{12a}	0.44 ±0.03 ^{2a}	1.29 ±0.02 ^{12a}	0.48 ±0.00 ¹²
<i>L. reuteri</i> C 16	1.60 ±0.02 ^{12ca}	1.51 ±0.01 ^{12b}	0.82 ±0.01 ^{12a}	0.71 ±0.01 ^{12c}	0.41 ±0.00 ^{12a}	1.24 ±0.00 ^{12a}	0.34 ±0.01 ^{12b}	1.36 ±0.01 ^{12a}	0.54 ±0.00 ^{12a}	1.23 ±0.01 ^{12a}	0.42 ±0.01 ^{12a}
<i>L. reuteri</i> C 10	1.55 ±0.01 ^{12ca}	1.45 ±0.02 ^{12b}	0.25 ±0.01 ^{12ca}	0.57 ±0.02 ^{12a}	0.24 ±0.00 ^{12b}	1.44 ±0.00 ^{12a}	0.19 ±0.01 ^{12a}	1.02 ±0.03 ^{12a}	0.43 ±0.02 ^{12c}	0.69 ±0.00 ^{12a}	0.41 ±0.02 ^{12c}
<i>L. salivarius</i> 124	1.85 ±0.02 ^{12a}	1.77 ±0.01 ^{12a}	0.25 ±0.01 ^{12ca}	0.61 ±0.02 ^{12a}	0.65 ±0.00 ^{12a}	1.81 ±0.01 ^{12a}	0.19 ±0.00 ^{12a}	0.63 ±0.01 ^{12a}	1.56 ±0.01 ^{12a}	0.45 ±0.01 ^{12a}	0.22 ±0.01 ^{12a}
<i>L. gallinarum</i> 118	1.52 ±0.01 ^{12a}	1.19 ±0.01 ^{12c}	0.36 ±0.01 ^{12b}	0.65 ±0.01 ^{12a}	0.77 ±0.00 ^{12a}	0.14 ±0.00 ^{12c}	0.42 ±0.01 ^{12b}	1.47 ±0.02 ^{12a}	1.24 ±0.01 ^{12c}	1.56 ±0.02 ^{12a}	0.74 ±0.01 ^{12a}
<i>L. gallinarum</i> 126	1.65 ±0.02 ^{12a}	1.30 ±0.02 ^{12a}	0.45 ±0.00 ^{12a}	0.96 ±0.01 ^{12a}	0.42 ±0.01 ^{12a}	0.14 ±0.00 ^{12c}	0.40 ±0.01 ^{12b}	1.51 ±0.01 ^{12a}	1.31 ±0.00 ^{12a}	1.56 ±0.02 ^{12a}	0.36 ±0.00 ^{12a}
<i>L. brevis</i> 125	1.41 ±0.02 ^{12a}	0.81 ±0.00 ^{12c}	0.28 ±0.01 ^{12ca}	0.34 ±0.01 ^{12a}	0.45 ±0.00 ^{12a}	0.22 ±0.01 ^{12b}	1.46 ±0.01 ^{12a}	0.96 ±0.02 ^{12a}	0.59 ±0.00 ^{12a}	0.68 ±0.00 ^{12a}	0.31 ±0.01 ^{12a}
<i>L. brevis</i> 112	1.40 ±0.01 ^{12a}	0.60 ±0.01 ^{12ca}	0.27 ±0.01 ^{12ca}	0.37 ±0.00 ^{12a}	0.50 ±0.00 ^{12c}	0.21 ±0.00 ^{12c}	1.44 ±0.01 ^{12a}	0.98 ±0.01 ^{12a}	0.58 ±0.01 ^{12a}	0.71 ±0.00 ^{12a}	0.25 ±0.01 ^{12a}
<i>L. brevis</i> 123	1.36 ±0.01 ^{12a}	0.81 ±0.01 ^{12c}	0.23 ±0.00 ^{12c}	0.37 ±0.01 ^{12a}	0.46 ±0.00 ^{12c}	0.19 ±0.00 ^{12c}	1.49 ±0.02 ^{12a}	0.93 ±0.01 ^{12a}	0.65 ±0.01 ^{12a}	0.63 ±0.00 ^{12a}	0.31 ±0.00 ^{12a}
<i>L. brevis</i> 1211	1.38 ±0.01 ^{12a}	0.81 ±0.00 ^{12c}	0.28 ±0.01 ^{12ca}	0.34 ±0.01 ^{12a}	0.53 ±0.00 ^{12c}	0.18 ±0.00 ^{12c}	1.44 ±0.00 ^{12a}	0.92 ±0.01 ^{12a}	0.56 ±0.01 ^{12a}	0.68 ±0.00 ^{12a}	0.34 ±0.01 ^{12a}
<i>L. brevis</i> 1218	1.38 ±0.02 ^{12a}	0.80 ±0.02 ^{12c}	0.30 ±0.00 ^{12a}	0.35 ±0.01 ^{12a}	0.45 ±0.02 ^{12c}	0.21 ±0.00 ^{12c}	1.46 ±0.02 ^{12a}	0.96 ±0.01 ^{12a}	0.63 ±0.01 ^{12a}	0.65 ±0.01 ^{12a}	0.31 ±0.00 ^{12a}

그림 165 상업적으로 이용 가능한 10가지 올리고당 종류별 *Lactobacillus* 11가지 균주의 성장 정도 측정 OD값

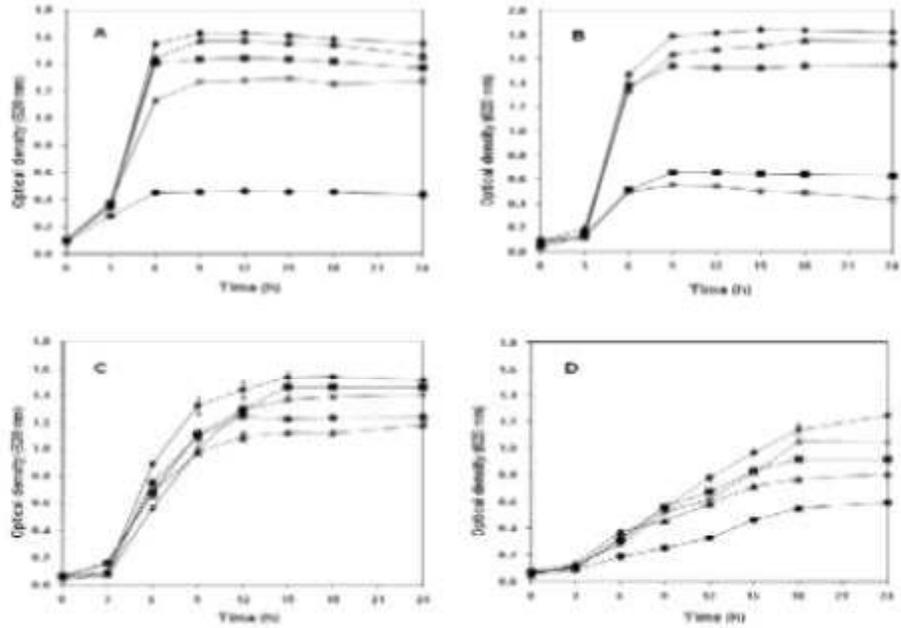


Figure 1. Growth curves of probiotic *L. reuteri* C 1 (A), *L. salivarius* I 24 (B), *L. gallinarum* I 16 (C) and *L. brevis* I 25 (D) in basal MRS medium supplemented with 1% (w/v) glucose (control) (●), IMO (■), GOS (▲), FOS (◆) or GTO (◊). Results are the means from three experiments. Vertical lines represent standard deviations (SD).

그림 166 대조군 Glucose와 IMO, GOS, FOS, GTO의 *Lactobacillus* 4가지 균주의 시간별 생장 곡선

추가적으로 10가지 올리고당 종류에 대한 *Lactobacillus* 11가지 균주의 성장을 측정 한 결과 중 가장 높은 성장을 나타낸 조합은 *Lactobacillus salivarius* I 24와 FOS로 나타났다 .

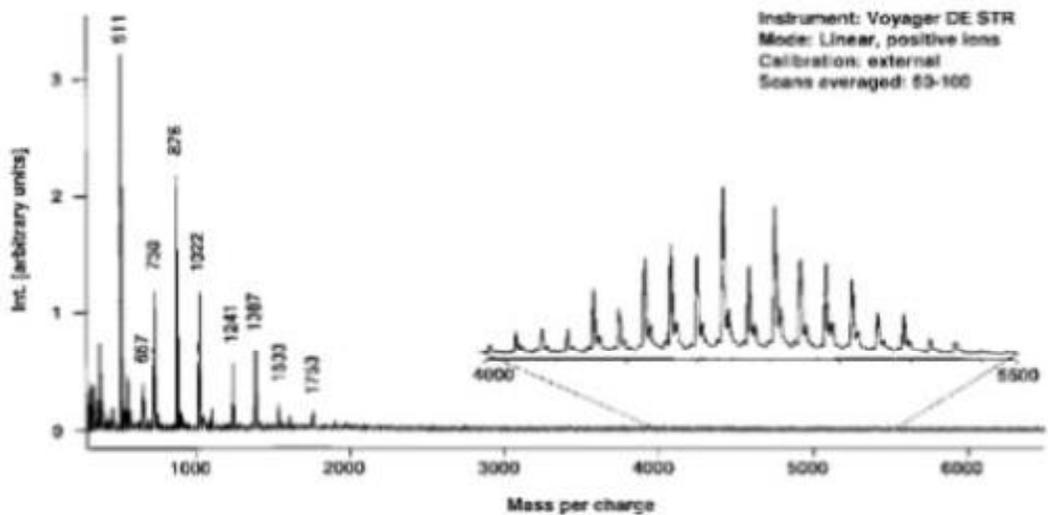


그림 167 MALDI-MS를 이용하여 측정한 유당을 제거한 모유 올리고당의 질량 스펙트럼

최초로 GOS와 FOS의 혼합에 대한 연구를 진행하였던 G. Boehm 등 (2003)의 논문

에 따르면, 유당을 제거한 모유 올리고당의 질량 스펙트럼을 MALDI-MS를 통하여 측정된 결과가 그림 59와 같았으며, 이러한 모유 올리고당의 질량 스펙트럼 fraction과 비슷한 형태를 나타내는 GOS와 FOS의 조합을 찾고자 하였다.

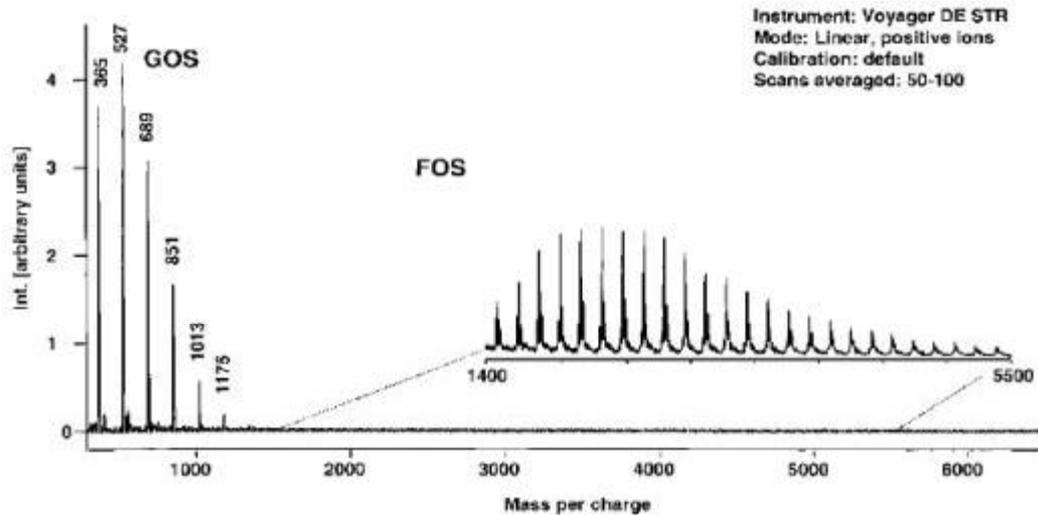


그림 168 MALDI-MS를 이용하여 측정된 GOS와 FOS의 질량 스펙트럼

그 결과 90%의 GOS와 10%의 FOS를 혼합하는 것이 모유 올리고당의 MALDI-MS fraction 분석 결과와 비슷한 형상을 나타내어, 모유에 가까운 올리고당으로서 GOS와 FOS가 9:1의 비율로 존재하는 것으로 나타난다.

Scholten 등 (2014)에 따르면, GOS와 FOS가 9:1의 비율로 혼합된 영유아용 조제 분유를 대상으로 실험을 진행한 결과, 변의 농도와 빈도에 긍정적인 효과를 나타내는 것으로 나타났다.

		Treatment groups		
		Experimental	Control	Breast-fed
Bifidobacteria	n	17	16	20
	mean (SD)	9.75 (1.0)	9.14 (1.2)	9.73 (1.1)
	median	10.14	9.56	10.0
	mean % (SD) of total	78.1 (44.7)	61.7 (42.3)	74.3 (38.1)
Lactobacilli	n	8	15	7
	mean (SD)	8.06 (0.6)	7.79 (0.8)	7.91 (0.8)
	median	8.11	7.91	7.95
	mean % (SD) of total	3.6 (7.7)	3.2 (8.1)	1 (1.3)
Enterobacteriaceae	n	20	20	18
	mean (SD)	8.28 (0.6)	8.63 (0.6)	8.07 (0.9)
	median	8.49	8.71	7.99
	mean % (SD) of total	6.9 (18.4)	15.2 (21.9)	5.5 (12.1)
Clostridia	n	14	12	10
	mean (SD)	7.59 (1.1)	8.26 (1.2)	8.22 (1.1)
	median	7.23	8.54	8.00
	mean % (SD) of total	3.1 (6.7)	9.4 (11.7)	5.6 (8.4)
Bacteroides	n	9	3	7
	mean (SD)	8.06 (0.7)	7.78 (0.5)	7.85 (1.4)
	median	8.3	7.65	8.0
	mean % (SD) of total	1.9 (2.9)	1.3 (1.3)	3.5 (6.9)

n = number of infants, standard deviation = SD

¹bacterial count = log colony-forming units/g as determined by fluorescence in-situ hybridisation

그림 169 GOS/FOS가 9:1로 포함된 분유 (Experimental)와 포함되지 않은 대조군 (Control) 그리고 모유수유 그룹의 장 내 균총 변화 결과

Vivatvakin 등 (2010)의 논문에서도 GOS/FOS가 9:1의 비율로 혼합된 조제분유를 섭취하는 경우 장 내 Bifidobacteria가 유의적으로 증가하였다 (그림61). 전체 박테리아의 수는 모든 그룹에서 비슷한 모습을 보였다. 그 중 가장 우점종인 Bifidobacteria는 실험군 (GOS/FOS 비율 9:1)에서 78.1%의 높은 비율을 나타내었고, 모유수유 그룹에서 74.3%, 그리고 대조군에서 63.7%를 나타내었다.

전체 분석 가능하였던 샘플의 수가 적었음에도 불구하고, 실험군에서 대조군에 비하여 모유 수유 그룹과 비슷하게 Bifidobacteria가 높고 Clostridia와 Enterobacteriaceae가 낮게 나타나는 결과를 보였다.

	Treatment Group								
	Control formula			Experimental formula			Breast-fed		
Stool Consistency	n	mean (%)	SD	n	mean (%)	SD	n	mean (%)	SD
Hard	69	7.5*	13.6	67	0.7*	3.9	75	0.6	3.1
Soft	69	82.3**	20.8	67	90.8**	18.8	75	73.1	33.9
Rumy	69	10.2	18.0	67	8.5	18.5	75	26.3	33.8

* $p < 0.001$, ** $p = 0.0112$, n = number of infants, SD = standard deviation
 †The data here has been re-classified since certain categories for stool consistency registered few entries. This re-classification was as follows: Hard = Small hard + Hard lumps + Hard cracked and Soft = Sausage like + Soft + Loose, and did not alter interpretation of the results.

그림 170 GOS/FOS가 9:1로 포함된 분유 (Experimental)와 포함되지 않은 대조군 (Control) 그리고 모유수유 그룹의 변의 농도 결과

또한 GOS/FOS가 9:1로 포함된 분유를 섭취한 변이 무르게 나타나는 현상을 보였다. 대조군과 실험군의 변의 농도에 유의적인 차이가 나타났으며, 변의 빈도는 대조군에 비하여 약간의 높은 빈도 (0.8 vs 0.7 회/일)를 나타내었으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

Holscher 등 (2012)의 논문에도 GOS/FOS가 9:1의 비율로 혼합된 조제분유를 섭취한 6개월의 아기의 장 내 Bifidobacteria 균총이 모유 수유그룹과 비슷하게 증가하였다.

GOS와 FOS의 혼합에 대한 비율로 9:1이 제시되어 있는 것을 바탕으로, 영유아의 GOS 및 FOS의 안전한 섭취량을 GRAS Notices와 EFSA (European Food Safety Authority), FSANZ (Food Standards Australia New Zealand)를 통하여 조사한 결과, 조제분유 및 아동용 분유의 GOS와 FOS의 9:1 비율로 혼합 첨가 시 최대 가능한 함량은 8 g/L인 것으로 나타났다. 이러한 경우 각각 GOS는 7.2 g/L, FOS는 0.8 g/L 까지 안전하다는 것으로 해석한다.

이러한 논문 결과를 바탕으로, 조제분유 내 적용하는 것에 적합한 올리고당 원료로 상업적인 환경을 고려하여 GOS, FOS를 분유 내 최적 올리고당 조건 확립에 검토하고자 하였다.

그러나, 최근 해외 조제분유에 함유 올리고당 (Human Milk Oligosaccharide, HMO) 성분으로 2'-FL (2'-Fucosyllactose)을 적용한 사례가 있다. 2'-FL란 모유 내 풍부한 올리고당 성분으로, 모유에서 물을 제외하고 지방과 탄수화물 다음인 세 번째로 풍부한 영양소이다. Morrow AL. 등 (2004)에 따르면 2'-FL이 모유 내 HMO 중 30% 이상을 차지한다.

Prasoon C. 등 (2000)의 논문에서 조사한 수유한지 1년이 된 시점에서의 12명의 참가자로부터 얻은 모유를 분석한 결과는 그림 8와 같다. 전체 모유 올리고당의 함량은 7.20 ± 0.62 g/ L이다. 모유 내 올리고당을 구분하는 방법 중 하나로 Fucosyl- α -1,2 결합의 유무로 구분하기도 하는데, 푸코실화된 올리고당으로 주로 2'-FL, lacto-N-fucopentaose, lacto-N-difucohexaose 등으로 구성되어있다.

Trivial Name (abbreviation)	Structure	μL <i>n</i> = 54
Fucosyl α1,2 linkages present:		
2'-Fucosyllactose (2'-FucLac)	Fuc α (1-2) Gal B(1-4)Glc	2.43 \pm 0.26
Lactodifucotetraose (LDFT)	Fuc α (1-2) Gal B(1-4)Glc Fuc α (1-3)	0.43 \pm 0.04
Lacto-N-difucohexaose-I (LDFH-I)	Fuc α (1-2) Gal B(1-3)GlcNAc B(1-3) Gal B(1-4)Glc Fuc α (1-4)	0.50 \pm 0.06
Lacto-N-fucopentaose-I (LNF-I)	Fuc α (1-2) Gal B(1-3)GlcNAc B(1-3) Gal B(1-4)Glc	1.14 \pm 0.18
Fucosyl α1,2 linkages absent:		
3-Fucosyllactose (3-FucLac)	Gal B(1-4)Glc Fuc α (1-3)	0.86 \pm 0.10
Lacto-N-fucopentaose-II [*] (LNF-II)	Gal B(1-3)GlcNAc B(1-3) Gal B(1-4)Glc Fuc α (1-4)	0.77 \pm 0.07
Lacto-N-fucopentaose-III [*] (LNF-III)	Gal B(1-4)GlcNAc B(1-3) Gal B(1-4)Glc Fuc α (1-3)	0.09 \pm 0.01
Lacto-N-difucohexaose-II (LDFH-II)	Gal B(1-3)GlcNAc B(1-3) Gal B(1-4)Glc Fuc α (1-4) Fuc α (1-3)	0.09 \pm 0.01
Others measured:		
Lacto-N-tetraose (LNT)	Gal B(1-3)GlcNAc B(1-3) Gal B(1-4)Glc	0.55 \pm 0.08
Lacto-N-neotetraose (LNneoT)	Gal B(1-4)GlcNAc B(1-3) Gal B(1-4)Glc	0.17 \pm 0.03
Monofucosyllacto-N-hexaose-III (MFLNH-III) [*]	Fuc α (1-3)GlcNAc B(1-6)Gal B(1-4)Glc Gal B(1-3)GlcNAc B(1-3)	0.11 \pm 0.02
Difucosyllacto-N-hexaose-a (DFLNHa) [*]	Fuc α (1-3)GlcNAc B(1-6)Gal B(1-4)Glc Gal B(1-4)Fuc α (1-2) Gal B(1-3)GlcNAc B(1-3)	0.15 \pm 0.04
Average total oligosaccharides		7.20\pm0.62

그림 171 전체 모유 내 올리고당 (HMO)의 종류, 구조 및 함량

모유의 HMO의 경우, Morrow AL. 등 (2006), Newburg DS. 등 (2004)에 따르면 Bifidobacteria의 성장을 돕고 병원균에 의한 감염을 막아주는 것으로 알려져 있다. 또한 Morrow AL. 등 (2004)에 따르면 아픈 산모의 모유 내 2'-FL의 비율이 낮은 경우, 모유수유를 받은 아기가 더욱 높은 비율로 설사를 나타내는 것과 연관성이 있는 것으로 나타났다.

이러한 최신의 상황을 고려하여 분유 내 최적의 올리고당 비율 조사로 유기농GOS와 유기농 FOS 뿐만 아니라 HMO까지도 고려하여 비율 TEST를 진행할 예정에 있다.

(2) 개발된 유기농소재가 첨가된 유기농분유의 제작

네오크레마에서 개발 완료된 유기농 갈락토올리고당을 이용하여 자사에서 16년 제품리뉴얼에 선 적용하기로 합의, 제품 개발을 진행하였다. 총 3개 제품, 2회에 거친 시험생산을 진행하였으며, 유기농 갈락토올리고당의 제품 적용성과 제품 규격 이상유무, 제품의 안전성 검증 등을 순차적으로 진행하였다.

입우의뢰서

제안	제안일	제안장
유기농	2024.04.15	김민준

보고서

제안	제안일	제안장	작성승
유기농	2024.04.15	김민준	김민준

발주처명	자사	요청사항	선
소재명	유기농 분유 (100%)	제정일자	2024.04.15
제정일자	2024.04.15	제정처	자사
주 소	유기농 분유 (100%)에 갈락토올리고당을 첨가하여 2024년 4월 15일 기준 40%를 함유한 분유를 제조하여 공급해 주시기 바랍니다.		
제안처	유기농 분유 (100%)에 갈락토올리고당을 첨가하여 2024년 4월 15일 기준 40%를 함유한 분유를 제조하여 공급해 주시기 바랍니다.		
비 고	유기농 분유 (100%)에 갈락토올리고당을 첨가하여 2024년 4월 15일 기준 40%를 함유한 분유를 제조하여 공급해 주시기 바랍니다.		

발주처명	자사	발주처명	자사
소재명	유기농 분유 (100%)	제정일자	2024.04.15
제정일자	2024.04.15	제정처	자사
주 소	유기농 분유 (100%)에 갈락토올리고당을 첨가하여 2024년 4월 15일 기준 40%를 함유한 분유를 제조하여 공급해 주시기 바랍니다.		
제안처	유기농 분유 (100%)에 갈락토올리고당을 첨가하여 2024년 4월 15일 기준 40%를 함유한 분유를 제조하여 공급해 주시기 바랍니다.		
비 고	유기농 분유 (100%)에 갈락토올리고당을 첨가하여 2024년 4월 15일 기준 40%를 함유한 분유를 제조하여 공급해 주시기 바랍니다.		

생산된 제품에 대해서는 조제분유 규격에 맞추어 검사를 진행하였으며, 영양성분 및 위해 항목등에 대해 자사 내부의 분석을 진행하였다. 해당하는 항목은 다음과 같이 내

부의 전산 시스템상에 있는 성적서로 같음한다.

전항목에 대하여 특이사항은 없었으며, 조제분유류, 성장기용 조제식에 해당하는 법적규격 내에 적합한 제품이 생산되었다. 이외에 자사 규격에 해당하는 항목등에 대해서도 특이점은 찾을 수 없어 정식 출시를 결정하여 제품을 개발 완료 하였다

* 시험생산 내역 확인 외에 주요 정보는 내부 보안 자료로서 삭제


매일유업주식회사

시험 성적서

제품명	유기농 콩 4단계 시험생산 제품(중)		
제조사	매일유업(주) 농작공장		
공급사	매일유업(주)		
제품유형	성장기콩조제식	원산지	한국
제조일자	2016.07.13	유통기한	20180112
의뢰목적	시제품검사	의뢰인	모유연구팀 이지우

귀하가 시험 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

분석항목	단위	분석결과	기준규격	정량한계	판정
나이아신	ug/100kcal		250이상		적합
비오틴	ug/100kcal		150이상		적합
비타민A	ugRE/100kcal		75-225		적합
비타민B1	ug/100kcal		400이상		적합
비타민B12	ug/100kcal		0.15이상		적합
비타민B2	ug/100kcal		600이상		적합
비타민B6	ug/100kcal		450이상		적합
비타민C	mg/100kcal		80이상		적합
비타민D	ug/100kcal		10-30		적합
비타민E	mg α-TE/100kcal		0.5이상		적합
비타민K1	ug/100kcal		400이상		적합
엽산	ug/100kcal		400이상		적합
관포당산	ug/100kcal		3000이상		적합
나트륨	mg/100kcal		20-85		적합
마그네슘	mg/100kcal		600이상		적합
아연	mg/100kcal		0.5이상		적합

분석항목	단위	분석결과	기준규격	정량한계	판정
열소	mg/100kcal		55이상		적합
요오드	ug/100kcal		5.00이상		적합
인	mg/100kcal		60이상		적합
철	mg/100kcal		1.00이상		적합
칼륨	mg/100kcal		600이상		적합
칼슘	mg/100kcal		90이상		적합
망간	ug/100kcal				적합
구리	ug/100kcal				적합
플레스테롤	mg/100mL				적합
루테인	ug/100mL				허당사합없음
연공감미료 3종	mg/kg		불검출		적합
식카민니프롤	mg/kg		불검출	0.5	적합
아세실알칼론	mg/kg		불검출	0.5	적합
아스파탐	mg/kg		불검출	0.5	적합
포도당	g/100kcal		3.0-5.5		적합
타르색소	중성		불검출		적합
¹³⁴ Cs - ¹³⁷ Cs	Bq/kg		100이하	1	적합
방사선	kGy		70이하		적합
상모델라	중성		음성		적합
환색포도당구균	중성		음성		적합
리스테리아모노사이토제네스	중성		음성		적합
장출혈성대장균	중성		음성		적합
납	mg/kg		0.01이하	0.01	적합
멜라민			불검출		적합
아플라톡신(M1)	ug/kg		0.025이하	0.02	적합
131I	Bq/kg		1000이하	1	적합
비소	mg/kg			0.02	허당사합없음
수은	mg/kg			0.01	허당사합없음
카드뮴	mg/kg			0.02	허당사합없음
당류 3종	g/100mL				적합
과당	g/100mL			0.1	허당사합없음
글루코스	g/100mL			0.1	허당사합없음
자당	g/100mL			0.1	허당사합없음
맛당	g/100mL			0.1	허당사합없음
유당	g/100mL			0.1	허당사합없음
GMO성분(정성검사)	중성				허당사합없음

분석항목	단위	분석결과	기준규격	정량한계	판정
GMO성분(밀)	정성				허당사할업용
GMO성분(옥수수)	정성				허당사할업용
GMO성분(대두)	정성				허당사할업용
간류농약 331성분	mg/kg				적합
일반세균수	CFU/g				허당사할업용
박실러스세레우스	CFU/g				허당사할업용
대장균군	CFU/g				허당사할업용
엔테로박터사카자키	정성				적합
효모수	CFU/g				허당사할업용
곰팡이수	CFU/g				허당사할업용
폴린	mg/100kcal				허당사할업용
뉴클레오타이드	mg/100ml				적합
타우린	mg/100ml				적합
이노시톨	mg/100ml				적합
L-카르니틴	mg/100ml				허당사할업용
아질산염	mg/kg			0.5	허당사할업용
질산염	mg/kg				허당사할업용
알레놀	ug/100kcal		9.0이하		적합
클로스트리디움퍼프민헨스	정성		음성		적합
리놀렌산	mg/100kcal		3000이상		적합
알파리놀렌산	mg/100ml				적합
ARA	mg/100ml				적합
EPA	mg/100ml				적합
DHA	mg/100ml				적합
벤조피렌	ug/g		1.0이하	0.05	적합

2016년 08월 08일

매일유업(주) 식품안전연구센터

3/3 page

■ 자사 애플루트 유기농 궁 제품에 유기농 갈락토올리고당 적용

2016년 9월 자사 애플루트 조제분유를 리뉴얼하며 애플루트 유기농 궁 제품에 국내 최초로 유기농 갈락토올리고당을 적용하여 출시하였다. 사용되어진 유기농 갈락토올리고당은 유기농 치즈 부산물이 아닌 자사에서 별도로 제공하는 유기농 유당으로 네오크레마에서 제작되어 제품에 적용하였다.

추가로 개발완료된 유기농가수분해물에 대해서도 완료시 내부 협업을 통하여 제품에 적용 가능성을 타진해 보고자 한다.



그림 177 유기농올리고당 적용 분유완제품

애플루트 업그레이드 기념

NEW 애플루트 아기평가단 대모집



Maell

애플루트

간간맘 김나영과 함께하는

애플루트 유기농 궁³

안심 평가단 대모집



모집기간

2016.10.17 ~ 2016.11.2
신청마감일: 2016.11.20

모집대상

0~15개월 유아맘
100명

매일유업 애플루트 분유 3종 '모유 수준' 리뉴얼

[96호] 2016년 09월 13일 (화) 16:19:02

관리인뉴스팀 ☎ info@lemonde.com



▲ 매일유업이 유아식 전문 브랜드 애플루트 분유 제품 3종을 영양성분과 함량을 모유 수준에 가깝게 개선했다고 지난 12일 밝혔다.

매일유업의 유아식 전문 브랜드 애플루트는 분유 제품 3종의 영양성분과 함량을 모유 수준에 가깝게 개선했다고 지난 12일 밝혔다.

새롭게 선보인 제품은 ▲명작 ▲유기농 궁 ▲센서티브다. 매일아시아모유연구소에서 모유와 아기똥을 기반으로 성장에 필요한 영양성분 다섯 가지 항목을 연구한 '애플루트 영양시스템'을 적용했다.

리뉴얼 제품들은 DHA와 ARA(아라키돈산), 3대 영양소(탄수화물·단백질·지방)의 함량과 비율이 모유에 가깝게 설계됐다. 특히 명작과 유기농 궁에는 망막 구성 성분인 루테인과 칼슘 흡수와 지방 대사에 도움을 주는 우유유래 OPO(베타팔미틴산)를 첨가했다.

또 위생적인 사용이 가능하도록 국내 최초로 분유 캡과 스푼 일체형 클린캡을 도입했다. 분유스푼을 위생적으로 보관할 수 있고 분유스푼을 찾기 위해 분유를 뒤적여야 했던 번거로움을 없앴다.

매일유업 애플루트 관계자는 "아기에게 필요한 핵심 영양성분을 과하거나 부족하지 않도록 모유 수준에 딱 맞게 설계했다"며 "더 좋은 유아식을 찾고자 하는 엄마들에게 희소식이 될 것"이라고 말했다.



[매일유업, 애플루트, 업그레이드 기념 2만명 규모 제품 평가단 모집](#)

아시아경제 2016.09.22, 네이버뉴스 [📄](#)

모유에 더욱 가까워진 제품 경험 기회 [매일유업의 유아식 전문 브랜드 애플루트는 업그레이드 출시를 기념하여 2만명의 대규모 아기평가단 모집을 진행한다고 22일 밝혔다. 이번 평가단 모집은 기존 애플루트 제품으로...

▶ [매일유업, 애플루트, 업그레이드 기...](#) 파이낸셜뉴스 2016.09.22, 네이버뉴스



[매일유업, 애플루트, 업그레이드 기념 아기평가단 대모집](#)

일간스포츠 2016.09.23, 네이버뉴스 [📄](#)

[매일유업의 유아식 전문 브랜드 애플루트는 업그레이드 출시를 기념해 2만명의 대규모 아기평가단 모집을 진행한다고 22일 밝혔다. 이번 평가단 모집은 기존 애플루트 제품으로 수유해온 엄마와 아기가...



[매일유업, 애플루트 분유 3종 '모유 수준' 리뉴얼 르몽드](#)

2016.09.13, [📄](#)

매일유업 애플루트 관계자는 "아기에게 필요한 핵심 영양성분을 과하거나 부족하지 않도록 모유 수준에 딱 맞게 설계했다"며 "더 좋은 유아식을 찾고자 하는 엄마들에게 희소식이 될 것"이라고 말했다.



[매일유업, 애플루트, 분유 3종 리뉴얼... "모유 수준으로 개선"](#)

뉴스1 2016.09.12, 네이버뉴스 [📄](#)

개선된 매일유업 애플루트 제품 3종, (사진제공=매일유업)© News1 명작 유기농궁·센서티브 3종 매일유업의 유아식 전문 브랜드 애플루트는 분유 제품 3종의 영양성분과 함량을 모유 수준에 가깝게 개선했다고 12일...

▶ [매일유업, 애플루트 분유 3종 "모유...](#) 브레이크뉴스 2016.09.12,

▶ [매일유업, 애플루트 분유 3종, 모유...](#) 뉴데일리 2016.09.12,

▶ [매일유업, 애플루트 분유 3종 업그...](#) 에너지경제 2016.09.12,

▶ [매일유업, 애플루트 명작궁·센서티...](#) 브릿지경제 2016.09.12,

[관련뉴스 12건 전체보기 >](#)



[매일유업, '애플루트 명작 액상분유' 출시](#)

뉴스웨이 2016.08.29, [📄](#)

사진=매일유업 제공 매일유업이 '애플루트 명작 액상분유'를 출시한다고 29일 밝혔다. 이번에 선보인 '애플루트 명작 액상분유'는 생후 6개월 이상 자녀를 둔 엄마들의 의견을 반영해 아기 월령별 1회 권장...

▶ [매일유업, 애플루트 명작 액상분유...](#) 브릿지경제 2016.08.29,

▶ [매일유업, 애플루트 명작 액상분유...](#) 일간스포츠 2016.08.29, 네이버뉴스

▶ [매일유업, '애플루트 명작' 액상분유...](#) 아시아경제 2016.08.29, 네이버뉴스

▶ [매일유업, '애플루트 명작 액상분유'...](#) NSP통신 2016.08.29,

[관련뉴스 10건 전체보기 >](#)

6) 매출실적

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	64 억원	
			향후 3년간 매출	300 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	400 억원	
			향후 3년간 매출	2,000억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 100 % 국외 : 100 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 100 % 국외 : 100 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 30 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 50 % 국외 : 50 %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			1위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			1위

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호 D-06

가. 연구성과목표

성과목표	지식재산권		논문		학술발표	사업화	기술인증	신규채용	보고서	홍보전시	
	출원	등록	SCI	비SCI							
1차년	목표			1	1			1	1	1	
	성과			1	1			1	1	4	
2차년	목표	1		1	1	2		1	2	1	
	성과	1		1	1	2	2	1	1	4	
3차년	목표		1	1		2	2	1	1	1	
	성과			1	1	2	2	1		1	
소계	목표	1	1	2	2	5	2	1	3	4	3
	성과	1		2	3	5	2	3	4	4	9

나. 연차별 목표달성도

구분 (연도)	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	목표의 달성도
1차년 (2014.12.17.~2015.12.16.)	유기농치즈부산물로부터 유기농 기능성 원료 분리	<ul style="list-style-type: none"> 유기농 원유 내 카제인을 분리시킨 후 유청/유당액 분리 조건 확립 	100
	기능성원료로 부터 기능성 소재개발 (유청단백가수분해물 개발)	<ul style="list-style-type: none"> 유기농 유청 단백질분획물의 생화학적 가수분해 공정 개발 막여과(UF/NF) 방식을 이용한 분자량별 유기농 단백질 가수분해물 분획물 개발 기존 수입 단백질가수분해물과의 기능, 성분, 기호도 비교 분석 단백 가수분해물의 최적 반응조건 수립(기질농도, 효소농도, 반응온도, 반응시간 등) 단백 가수분해물의 쓴 맛 성분 확인 및 저감을 위한 개선 연구 	100

	분리된 기능성 원료로부터 기능성소재 개발 (갈락토올리고당의 개발)	<ul style="list-style-type: none"> • 순도50%이상의 갈락토올리고당 개발 • 기존 수입 갈락토올리고당과의 기능, 성분, 기호도 비교 분석 • 유기농 유당 분획물로부터 갈락토올리고당으로의 전환을 위한 생화학적 공정의 개발 • 올리고당 제조 효소 및 촉매의 최적 반응조건 수립(기질농도, 효소농도, 반응온도, 반응시간 등) • 효소를 통한 당질 합성 및 단백질 분리, 정제 기술조건 확립 • 개발된 올리고당의 탈색, 여과, 정제공정 개발 	100
	유기농 기능성 소재의 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 유기농 올리고당 spec 확립 	100
	유기농 기능성 소재의 기능성 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 장내 미생물인 Lactobacillus, Bifidobacterium에 대한 in vitro에서의 증식작용 • GOS, GOS/유산균, 투여에 따른 biomarker 분석 • Biomarker: 변의 무게, 변의 수분함량, 분변내의 유산균수, 장통과시간, 장통과속도, 등 biomarker 평가 	100
2차년 (2015.12.17.~2016.12.16.)	유기농치즈부산물로부터 분리된 유기농 기능성소재의 원료표준화 및 규격설정	<ul style="list-style-type: none"> • 유기농 치즈부산물인 유기농유당의 원료표준화 및 규격 설정 • 유기농 치즈부산물인 유청단백의 원료표준화 및 규격설정 	100
	유기농 기능성 소재를 활용한 유기농 기능성소재의 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 순도 60% 이상의 유기농갈락토올리고당 개발 • 순도 30% 이상의 유기농락툴로스 개발 • 단백질수분해물의 최적생산조건 확립 • 단백질수분해물의 SOP 설정 • 단백질수분해물의 시생산 	100
	유기농 기능성 소재의 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 유기농 올리고당을 이용한 급성/아급성 독성 평가 	100

	유기농 기능성소재의 기능성 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 유기농분유 시제품을 이용한 SD rat에서의 유산균 증식작용 • 유청 단백질 가수분해물의 <i>in vitro</i> 성장 촉진 확인 	100
	유기농 갈락토올리고당 포장 요구도 관련 형태 연구	<ul style="list-style-type: none"> • 갈락토 올리고당의 포장 요구도 조사 • 가능한 포장 방법의 발굴 및 검토 • 품질보존성 향상을 위한 포장기법 발굴 및 검토 	100
	유기농 기능성 소재의 사업화	<ul style="list-style-type: none"> • 유기농분유 내 첨가된 유산균 생육에 적절한 올리고당 비율조건 확립 • 개발된 유기농소재가 첨가된 유기농분유의 시제품제작 • 개발된 유기농 올리고당의 사업화 	100
3차년 (2016.12.17.~2017.12.16.)	유기농 기능성 소재를 활용한 유기농 기능성소재의 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 순도 40%이상의 락툴로즈 개발 • 유기농 유당 분획물로부터 락툴로스로의 전환을 위한 화학적 공정의 개발 • 올리고당 제조 효소 및 촉매의 최적 반응조건 수립(기질농도, 효소농도, 반응온도, 반응시간 등) • 발효를 통한 올리고당의 함량 증진방법 개발 	100
	유기농 기능성 소재의 사업화	<ul style="list-style-type: none"> • 유기농 올리고당이 첨가된 유기농 분유 제품 개발 • 개발된 유기농 올리고당의 사업화 	100
	유기농 기능성 소재의 기능성 평가 유청 단백질 가수분해물의 <i>in vivo</i> 성장 촉진 확인	<ul style="list-style-type: none"> • SD rat model을 통해 성장 촉진 효과 • 체중증가량 및 뼈 길이 성장 확인 • 성장판 길이 측정 • 혈액분석을 통한 growth hormone 측정 	100

다. 관련 기여도

유기농치즈부산물인 유청을 이용하여 기능성소재를 개발하여 분유에 적용함으로써 경제적 이익을 창출함.

개발된 기능성소재를 이용한 성장,유산균증식효과 작용기전 등에 대한 *in vivo*, *in vitro* 연구결과는 국내외 관련 SCI 저널에 투고함

본 연구개발로 “유기농 갈락토올리고당이 고함량으로 포함된 혼합당 조성물의 제조방법” 특

허출원으로서 산업재산권을 확보함.

국내에서 이루어지고 있지 않던 유기농 갈락토올리고당과 락툴로스 개발은 최초로써 의미를 가지면 특히 추후 사업화 예정인 락툴로스는 수입품대체 효과를 기대할 수 있음.

5. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

○ 유기농 치즈 부산물로부터의 기능성 제품 개발의 신시장 창출 효과

- 본 과제를 통해 저가로 소량 유통되는 유기농 치즈 부산물로부터 얻고자 하는 기능성원료의 신시장 창출 효과를 다음과 같이 분석하였다.
- 우선, 국내 갈락토올리고당 및 락툴로스의 시장 현황과 규모는 안정적인 시장을 형성하고 있는 일본과는 달리 다소 답보적인 상태를 유지하고 있으며 품질 개선 및 용도 개발 역시 국내에서는 연구개발 활동이 다소 미흡하다
- 특히 유기농 올리고당을 생산하는 업체는 전 세계적으로 전무하며, 프리바이오틱으로서의 효과를 가지고 있는 기능성 당류인 갈락토올리고당과 락툴로스 역시 유기농으로 생산하는 업체는 없는 실정이였다.
- 본 과제의 핵심은 유기농 부산물로부터 유기농 올리고당을 개발하여 경쟁이 없는 블루오션에 진입하고자 하는 목적을 가지고 있으며, 본 기술 개발을 통해 중국을 포함한 동남아/미주지역에 Turnkey base의 수출이 가능하며 기능성 식품 시장 참여로 인한 매출 증대 등의 효과가 예상된다
- 상기와 같은 독보적인 시장 확보가 가능한 이점은 생산 원가에 대한 부담을 덜어주며, 신시장 창출 효과가 기대된다
- 본 연구를 통해 유기농 우유가공제품 및 소재화 기술 확보하였으며, 국내유기가공인증 및 중국유기인증, 할랄,코셔등을 획득하여 수출시장에서 더욱 큰 매출이 기대 된다.
- 영유아를 대상으로 배변, 아토피개선 등 생리활성이 증진된 유기농 식품 소재 개발 및 산업화 가능하다.
- 유기농분유 제조 시 다양한 부재료가 첨가되는데 이 때 중요한 것이 유산균증식에 관여하는 올리고당인데 아직까지 올리고당의 유기농화는 부진한 상태이다.
- 연구개발을 통해 개발된 락툴로스와 갈락토올리고당은 유기농원료를 활용함에 따라 유기농제품에 첨가 시 유기농 소재의 함유 비율을 높여줌으로 타제품과의 차별성부여가 가능하며, 분유 외에 다양한 유가공품의 조제로 활용이 가능하다
- 유기농 치즈 부산물로부터 가공품 제조 시 발생하는 부산물인 유청을 활용기술이 확보됨

에 따라 락툴로스 외의 다양한 올리고당의 개발이 가능하며, 유청에 함유된 단백질 역시 유기농 소재화가 가능하다

- 매일유업은 우유 및 다양한 이유식 등을 생산하는 제조사로서 본 과제를 통해 개발된 제품과 소재는 자사 생산 공장을 통해 양산가능하며 현재 관련 제품을 요구하는 다양한 니즈에 수용할 수 있을 것으로 사료된다.
- 특히 출원 1건과 등록 1건, SCI급 논문 2건, 비 SCI급 논문 2건을 게재하여 개발된 기술의 객관적 과학 근거를 확보함.
- 장기적으로 개발된 유기농제품 및 소재 개발기술은 다양한 천연물에 적용하여 기술확대 및 품목 다양화를 시도할 것이다.
- 개발된 기술은 본 연구팀에서 지금까지 연구해오던 많은 천연물 소재에 접목시켜 향산화 및 항암증진 등 다양한 새로운 형태의 식품 트렌드를 주도할 수 있을 것이라 사료된다.

○ 유기농 갈락토올리고당을 적용한 유기농 분유 사업화

▣ 유기농 갈락토올리고당을 적용한 유기농 분유 판매 전략

- 2016.09월에 리뉴얼한 '앱솔루트 유기농 궁'은 자사가 기존에 보유하고 있던 '앱솔루트 명작', '앱솔루트 유기농 궁'을 모유연구를 통해 아기에게 적합하게 설계한 분유라는 컨셉(Right for baby)으로 리뉴얼한 제품으로 95% 이상 유기원료를 이용하여 주요영양소와 기능성 성분을 모유 성분의 함량과 기능에 맞추어 설계하였다.
- 제품의 디자인은 유기농 제품이라는 이미지를 고급화하여 청정, 깨끗함, 자연의 이미지에 추가로 아기의 장내균총 개선을 위한 유기농 갈락토올리고당을 적용하였다. 이러한 제품은 아기에게 깨끗한 음식을 주고 싶은 엄마들을 위한 프리미엄 제품으로 다가갈 수 있도록 디자인 하였다.



그림 184 신규 유기농분유

- 현재 분유 제조업체에서 생산하는 유기농 제품에 갈락토올리고당 현황은 아래와 같다. 유기농 분유의 경우 유기함량 95% 이상으로 설계를 해야 유기인증이 가능한 제품으로 영유아가 필요한 단백질, 탄수화물, 지방, 미네랄, 비타민 등 영양성분을 함유한 제품을

만들기 위해서는 일반 제품에 비해 갈락토올리고당, DHA, ARA 등과 같은 기능성 원료를 첨가할 수 없는 실정이다.

- 현재 국내에서는 매일유업과 같은 유가공 업체에서 제조하여 판매를 하고 있으며 해외에서는 Hipp(유럽), Holle(유럽), Abbott(미국) 등이 제조하여 판매하고 있다. 국내 분유의 경우 갈락토올리고당, 가수분해유청단백이 모두 첨가되어 있지만, 유기농 갈락토올리고당을 첨가한 제품은 매일유업에서 생산한 '유기농 궁' 제품밖에 없다. 아래 표와 같이 갈락토올리고당을 사용한 유기농 분유는 거의 없는 상황이며, 대부분 영유아에게 꼭 필요한 영양성분으로 설계하여 제조, 판매를 하고 있다.

표 99 유기농 분유의 갈락토올리고당 사용 여부

제조사	국내	해외		
	매일	Hipp	Holle	Abbott
제품	유기농 궁	Hipp	Holle	Advance Organic
제품이미지				
용량	800 g	600 g	400 g	658 g
GOS	O (유기농)	X	X	X
가수분해 유청단백질	O(비유기농)	X	X	X

- 해당 과제를 통해 국내 최초로 유기농 유청을 이용하여 제조한 유기농 갈락토올리고당을 적용한 분유 개발 및 출시하였다.

▣ 유기농 갈락토올리고당을 적용한 유기농 분유 판매 현황

- 국내 분유 시장에 가장 영향을 주는 출생아 수는 약 10년간의 통계자료를 분석한 결과, 2016년에 가장 낮게 나타났고 2017년도에는 2016년보다 더 감소하였다.
- 분유 시장은 신제품 출시가 빈번하지 않은 정적인 시장이지만, 최근 출생아 수 감소에 따라 제품 컨셉을 다양화 하고, 소비 대상자 측면에서 카테고리, 제형 등을 다각화 하여 소비자를 공략하고 있다. 또한 분유 시장의 주요 소비대상인 부모들은 소득/교육수준과는 무관하게 예산이 초과하더라도 고급브랜드를 선호하는 경향이 높아지고 있는 상황이다.
- 유기농 분유에 유기농 갈락토올리고당을 적용 한 리뉴얼 제품에 대하여 판매 현황을 조사한 결과, 2016년도에 비하여 신생아 수(전년대비 약 12.3% 감소)가 줄어들어 국내 전체 분유시장 성장률이 감소(전년대비 약 10.9% 감소)함에도 불구하고, 전체 분유시장 중



- 그림 185 최근 10년간 출생아 수 및 합계 출산율
- 유기농분유 시장 점유비는 12.6%로 유지하였다. 특히 자사 제품의 점유율은 2016년 약 7.4%에서 2017년 약 9.5%로 증가하였고(그림 ##), 국내 분유 중 브랜드 만족도에서 가장 높았다.



그림 186 국내 유기농 분유 시장 점유율

- 따라서 향후 과제를 통해 개발된 원료인 유기농 가수분해유청단백도 유기농 분유에 적용하여 일반분유에 자주 사용되는 ‘부드러운 소화’컨셉을 추가적으로 활용하면 판매가 더욱 증대할 것으로 보인다.

▣ 유기농 분유의 시장개척을 위한 국외 유기농분유 시장 조사

- 본 연구에서 최종 개발된 유기농 분유 제품이 국내뿐만 아니라 국외 시장에서도 경쟁력을 가질 수 있도록 국내·외 유기농분유 시장현황을 조사하였고, 유기농 분유 시장과 더불어 유기농식품 전체 시장 관련 보고서는 별도로 작성하여 제출할 예정이다.

- 21세기 들어가면서 우리나라를 포함한 OECD 국가에서 환경오염 및 잔류 농약 등의 문제로 유기합성농약과 화학비료의 사용을 줄이는 친환경 농업정책을 적극 추진하고 있다. 이러한 정책과 더불어 소비자들의 소득수준 향상과 건강에 대한 관심이 급증하면서 안전한 먹거리, 즉 유기농산물을 포함한 유기식품에 대한 수요가 크게 증가하여 지속적으로 성장하고 있으며, 미래의 성장 동력을 보유하고 있는 시장으로 각광받고 있다.
- 또한 국내에서는 최근 저탄소 녹색성장이 국가발전의 패러다임으로 추진되면서 친환경농업의 확산이 농업부문의 대표적인 저탄소농업 정책과제로 제시되고 있고, 유기농식품산업 육성을 위하여 유기농산물 재배면적 및 유기농식품산업 시장규모 확대 목표를 가지고 생산기반 구축, 기술개발, 유기농식품 관리체계 과제를 추진하고 있다.
- 세계적으로 맞벌이 부부의 증가와 간편식 소비의 증대로 인하여 영/유아식 시장은 꾸준히 상승하고 있고, 특히 유기농 식품 시장의 증가는 내 아이를 위한 고품질, 안정성에 대한 선호를 우선순위로 하는 것을 볼 수 있다.
- 세계 주요 영/유아식 제조업체는 네슬레(Nestle)와 하인즈(Heinz)가 각각 36.4%, 15.4%를 차지하고 있고, 유럽 제조업체들이 강세를 보이고 있다. 다논(Danone)은 4가지 사업군 중 하나로 영/유아식(Early Life Nutrition)이 있고, 힙(Hipp)은 영/유아식 전문제조업체로 힙 올가닉(Hipp Organic) 브랜드의 영/유아식을 생산하고 있다.
- 미국 영·유아식(baby food) 시장은 20세기 초반 산업화와 맞물려 본격적으로 생성되어 성장하기 시작하였다. 최근 들어 영유아식 제조업체들은 이국적인 맛과 새로운 패키지를 도입한 제품들을 출시하고, 퀴노아, 블루베리 등의 슈퍼 푸드나 유기농 재료들로 만들 제품들의 제품군을 늘리고 있다.
- 영·유아식 시장에서는 다양한 유기농 제품들이 출시되었기 때문에 많은 업체들이 유기농 하나만으로는 소비자들에게 선택받기엔 부족하다고 느끼고 있다. 이에 따라 영·유아식품 업체들은 유기농에 새롭거나 참신함, 활동용(on-the-go), 글루텐프리(gluten free), 진정성 등의 트렌드를 접목하여 제품을 출시하고 있는 실정이다.
- 부문별로 유기농 포장 및 조리식품의 매출은 2014년 36억 달러를 넘어섰고, 특히 유기농 이유식 및 유아용 식품은 농약이나 성장 호르몬, 항생제, GMO에 대한 우려로 인하여 해마다 시장규모가 커지고 있다. Euromonitor International에 따르면 2014년 유기농 이유식 시장의 매출은 전년 대비 무려 13.1% 증가한 6억 7,310만 달러를 기록하였다.
- 영·유아식 시장에서 유기농 조제분유는 비록 전 세계적으로 조제분유 판매량의 작은 부분을 차지하고 있지만, 유기농 원료에 대한 욕구가 증가하면서 2011년부터 2016년까지 64%의 판매량이 증가하였으나, 주로 선진국에서 판매되고 있다. 2016년에는 미국에서 전체 유기농 아기 식품 중 유기농 분유가 약 14%를 차지하였고, 신흥국 및 개발도상국에서 주로 판매되었다. 특히 중국이 92%를 차지하였다.
- 최근 미국에 기반을 둔 Future market insight의 연구 결과에 따르면, 유기농 분유 시장의 가치는 향후 10년간 30억 달러를 넘어설 것으로 예상된다고 보고하였다. 이는 식품안전에 대한 우려와 영양성분에 대한 관심의 증가로 인하여 소비자들이 유제품 구입에

있어서 계속 향상된 제품을 원하기 때문이라고 분석하였다. 유기농 분유 시장은 2016년에 약 17억 5천만 달러의 가치가 있었고, 2017년 현재시점에서 약 2027년 까지 5.4%의 평균 성장을 기록할 것이라고 예상하고 있다.

- 또한 다른 연구결과에 따르면 2016년 유기농 분유의 전 세계 생산량은 2%에서 2.5% 증가하여 유기농 우유 생산량 성장보다 0.5% 앞선 것으로 나타났다. 전 세계적으로 112,000톤의 유기농 분유가 소비될 것으로 예상 했는데, 이는 신체에 필수 영양소를 공급할 때 유기농 분유의 역할에 대한 긍정적인 소비자 인식에 의한 것으로 나타났다.
- 조제분유의 주요 시장은 미국, 호주, 프랑스와 같은 선진국이지만 앞으로는 개발도상국 중 하나인 중국은 유기농 조제분유 시장 성장에 중요한 나라가 될 것이라고 보인다.

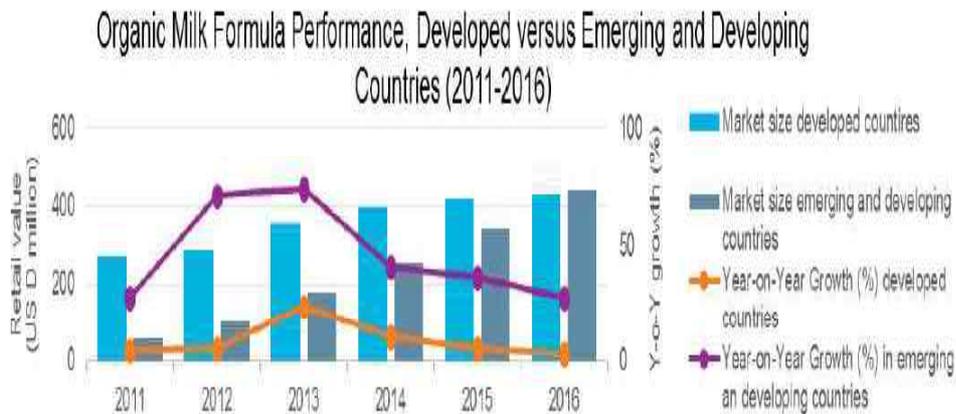


그림 187 2011-2016년 유기농 조제분유 성장률 비교



2016-2021년 유기농 조제분유 성장률 비교

- 일반적으로 글로벌 유기농 조제분유 시장은 선진국의 건강에 관심 있는 소비자 증가와 같은 다양한 요인에 의하여 움직이고 있고, 유기농 조제분유 시장의 성장은 개발도상국의 소비자 사이에서의 생계 수단 강화가 중요한 요인이다. 또한 유기농 조제분유 시장은 영양부족 가능성을 최소화하기 위하여 세계보건기구(The World Health Organization, WHO)와 식량농업기구(Food & Agriculture Organization, FAO)의 강한 주도로 인하여 탄력 받고 있다.

- 글로벌 유기 유아용 조제 시장의 주요 업체는 신제품 개발에 대한 투자를 확대하고 제품 라인을 확장하기 위해 100 % 유기농 성분을 사용하여 제품 제형을 개선하는 데 주력하고 있다.
- 글로벌 유기농 조제분유 시장에 대한 성장 가능성은 아시아 태평양 지역에 집중되어 있다. 아시아 태평양 지역은 1인당 이용 가능한 소득과 유기농 조제분유의 건강상의 이점에 대한 소비자 인식의 증가가 유기농 조제분유의 판매를 촉진 할 것으로 예상되기 때문에 유기농 조제분유에 대한 막대한 잠재력을 가지고 있다. 특히 인도와 중국은 2017 ~2023년 동안 유기농 조제분유시장 점유율에 대한 거대한 잠재력을 보여줄 것이라고 기대된다.
- Food Bev.는 중국 유아용 조제 식료품 시장이 2016년~2021년에 5.4% 성장할 것이라는 Mintel의 예측을 발표하였으며, 이와 함께 유기농 옵션은 가장 빠르게 성장하게 될 항목으로 선정하였다. Mintel은 중국 국가의 신흥 중산층 논쟁의 여지가 있는 ‘한 자녀 정책’을 단계적으로 중단하기로 결정함에 따라 조제분유의 물량이 증가하고 있다고 밝혔다.
- 또한 AC닐슨(AC Nielsen: 시장조사 전문업체)의 예측에 따르면, 2017년을 전후로 중국의 유기농 분유 시장의 규모는 30억을 돌파할 것으로 예상된다고 보고하였다.
- 중국의 경우, 산모의 75%가 아기에게 유기농 조제분유를 먹고 있는 것으로 추정되고 있고, 제품의 품질과 부모가 자녀의 영양 및 성장에 소비할 금액이 소비자 구매행동의 주요 결정 요인으로 조사되었다. 특히 25~34세 어머니 중 79%가 유기농 제품을 사용하고 있는 것으로 나타났다. 중국의 새로운 중산층은 또한 유기농 조제분유를 훨씬 더 많이 사용하고 있었고, 10명 중 9명이 유기농 분유를 구입한다고 조사되었다.
- 2014년 중국 내 유기농 분유 제품 현황을 조사해본 결과, Top 10에 해당하는 분유 제품은 대부분 유럽, 미국 브랜드 제품이었다



그림 189 2014년 중국 내 유기농 분유 제품 현황

- 따라서 자사에서 개발한 유기농 분유는 국내뿐만 아니라 국외시장에서도 성장 가능할 것으로 보이고, 현재 국내 분유제품이 많이 수출되는 중국시장의 경우 지속 가능한 성장 동력원이 될 것으로 보인다.

○ 해외 판로 확보를 위한 마케팅 전략 수립 및 추진 계획

- 2014년 해외마케팅 활동은 자사 생산 갈락토올리고당(상품명: Mother's Oligo)과 자사 생산 단백질수분해물(상품명: Eatless) 중심으로 시장 개척 전개
- 특히 신규, 틈새시장 개척을 위한 다수의 바이어 미팅과 해외 박람회 참가로 수출 증진
- 해외 수출 전망

▷ 기능성 식품 시장 변화 : 일본 원전 사고 이후 일본 및 동남아 지역에서 일본 식품을 대체할 안전한 기능성 소재의 수요가 증가하고 있어 수출 전망이 밝음.

▷ 중국 내수 시장의 성장 : 중국 내수 시장은 크게 증가하고 있으며, 내수 역시 저품질의 중국 제품보다는 해외 제품을 선호. 저가의 중국 제품과 차별화하여 안전성과 기능성의 고품질 원료로 신시장 개척

▷ 유기농 시장의 성장 : 유기농인증동등성협약(Organic Equivalence Agreement)의 체결로 각기 다른 나라의 유기농 인증이 동등성이 있다고 인정하여 유기농 인증 장벽 제거 및 유기농 제품의 국제교역이 획기적으로 증대될 예정(2014년부터 시행)

- 해외 마케팅 세부 추진

▷ 해외 박람회 참가 : 중국 또는 동남아시아 지역 해외 박람회 참가 1회

▷ 해외 지사화 사업 : 중국 또는 동남아시아 지역 1개사 추진

▷ 해외 마케팅 성과 분석 및 수요조사 : 2회

○ 개발 제품의 국산 유제품 활용 방안

- 개발 소재의 제품적용은 1협동인 매일유업 제품 중 영유아를 타깃으로 한 분유 제품에 적용될 예정임.
- 매일유업의 일반분유로 '엡솔루트 센서티브' 4단계, '엡솔루트 궁' 4단계, '엡솔루트 명작' 4단계, '매일맘마 QT' 4종 및 '매일맘마 오리지널' 3단계로 다양한 제품군을 형성하고 있으며 본 과제를 통해 개발된 소재는 상기 제품 적용을 통해 사업화를 이룰 예정이다.

■ 기대성과

가) 기술적 측면

- 유기농 치즈분산물을 이용한 유청 단백질과 유당의 분리·정제 기술개발을 통해 기존의 효소공학 기술을 이용한 일반적인 제품개발이 아니라, 제품을 구성하고 있는 성분 중에서

생리활성이 없는 성분을 특수한 효소반응 기술을 이용하여 생리활성 기능을 갖도록 하는 modified enzyme engineering technology를 접목시켜 제조하는 제품이며, 또한 효모발효 기술을 이용하여 필요 없는 성분을 제거 하므로써 생리기능성을 최대한 부여시킨 제품임.

- 이와 같이 본 제품개발에 필요한 key technology인 효소공학 기술과 효모발효 기술이 접목된 융합기술을 이용하여 제품을 개발할 예정이며, 이러한 융합기술을 이용하여 다른 여러가지 제품 개발에 유용하게 이용될 것으로 예상되는 바, 식품산업 전반에 걸쳐 이용될 수 있는 기술적 측면에서 유용한 효과를 기대할 수 있을 것으로 예상되어 짐.

나) 경제산업적 측면

- 유기농가공식품 시장의 확대: 2008년 2,158억원, 2012년 4,355억원이었으며, 2020년에는 6,817억원으로의 시장 확대가 예상된다
- 고용창출효과 기대: 시장 확대에 따른 고용창출 효과를 기대할 수 있으며, 고용창출 효과가 기대된다
- 중국의 내수시장을 진출에 따른 부가가치 창출 효과 기대: 중국가공식품에서 가장 높은 비중을 차지하는 품목은 유제품으로 2011년 약 412달러에서 2015년 666억달러 규모까지 성장할 것으로 추산됨. 따라서 국내 시장뿐만 아니라 중국시장 진출시 부가가치 창출 효과가 기대 된다
- 중국 내수시장 중 영유아식품 중에 유기농분유 등 고가분유시장에서 기회가 있을 것으로 전망 된다
- 본 연구개발 내용은 이미 보고된 소재를 활용한 단순한 유기농제품뿐만 아니라 소재를 개발함에 따라 소비자의 욕구와 소비 트렌드를 주도할 수 있을 것으로 사료 된다
- 부산물을 활용할 수 있는 기술이 확보됨에 따라 폐기물의 발생이 최소화되며, 다양한 유청 관련 소재의 개발이 가능할 것이다
- 제품군의 특성상 제품의 기술개발 등에 시간적, 금전적 투자가 필요하고, 진입 장벽이 높기 때문에 시장의 선점 효과는 매우 클 것으로 예상 된다

○ 갈락토올리고당의 향후 시장 확대 및 유당 공급방안

전 세계 유기농 유제품 시장은 꾸준히 성장하고 있으며 2016년~2022년까지 연평균 11.73%가 성장할 것으로 예상된다.

따라서 많은 제품군에 갈락토올리고당의 적용 및 활용이 이용 될 것으로 예상되어 지며, 특히 미국과 유럽시장 성장은 물론 중동시장은 2016년~2022년까지 연평균 11.88% 로 더 빠르게 성장하고 있어, 할랄인증, 코셔인증을 획득으로 수출 확대가 기대된다.



그림 190 중등 유기농 유제품 시장 현황

또한 유제품 시장이 성장하고 있다는건 유청의 부산물인 유당도 많이 생산됨을 알 수 있다. 현재 미국의 3개회사와 유럽의 2개회사와 유기농 유당을 연간 3,000톤 공급 가능함을 확인하였으며 루미아노 외 2개 회사와 연간 공급 계약을 체결함으로써 제한적 원료인 유당 공급에 있어 대체 방안을 수립하였다.

갈락토올리고당은 유제품은 물론 일반식품, 건강기능식품등에 모두 적용가능하며 특히 프리바이오틱스로써 탁월한 효과를 가지고 있어 시장확대가 기대된다.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
------	------

해당사항없음

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
------	------

해당사항없음

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)		

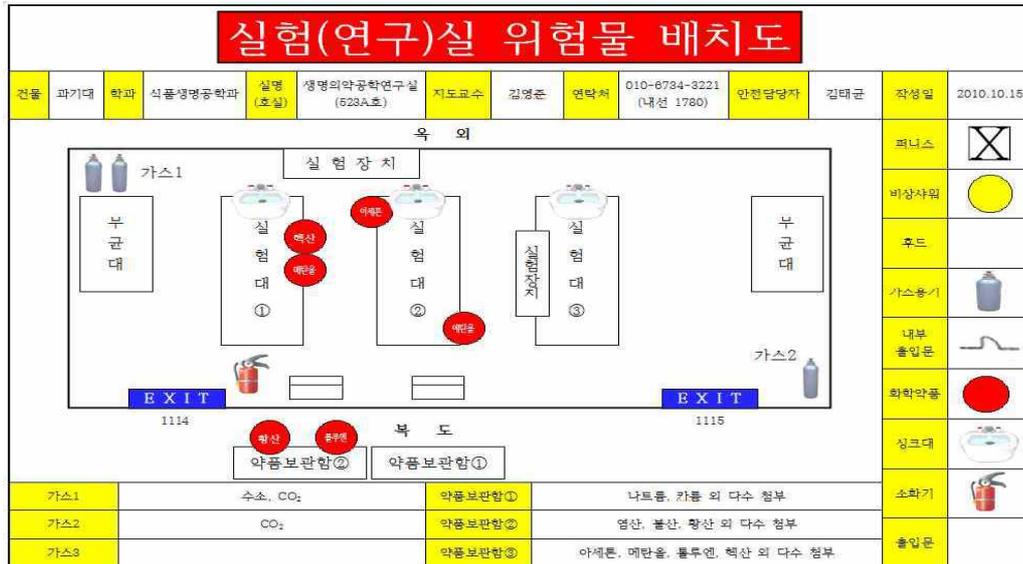
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
○네오크레마		
가. 연구실 안전관리 체계		
1. 연구실 안전점검 및 정밀안전진단		
○ 교육과학기술부의 “연구실 안전점검 및 정밀안전진단에 관한 지침”에 따라 일상점검, 정기점검 및 특별안전점검을 시행함		
☑ 일상점검: 매일 1회 이상/ 연구 활동 종사자 점검		
☑ 정기점검: 연 1회 이상/ 기계안전, 전기안전, 화공안전, 소방안전, 사업위생 등 부문별 안전 관리자 점검		
2. 연구실 내 위험물 관리		
○ 모든 연구실 및 실험실의 출입허가제를 운영하며, 안전관리 규칙을 어길 시 출입권한을 박탈함		
○ 화학약품을 취급하는 연구실 및 실험실에 안전설비로써 분말소화기와 세안대 등을 설치하고 관리함		
○ 주요 위험관리 기자재는 소모성 부품교환 주기에 맞추어 순회 안전점검 실시		
○ 실험실 내 보호장비(장갑, 고글 등) 구비		
나. 연구자 안전관리 체계		
1. 참여연구원 교육훈련 및 건강검진 실시		
○ “연구실 안전환경 조성에 관한 시행규칙 제 9조”에 따라 반년에 6시간 이상의 정기 교육을 실시함		
○ 온라인교육을 실시할 경우 반드시 평가과정을 거쳐 교육 이수시간을 인정하여야 함		
○ “연구실 안전환경 조성에 관한 시행규칙 제 10조”에 따라 “국민건강보험법”에 따른 건강검진기관에서 1년에 1회 이상 일반건강검진을 실시함		
2. 상해보험가입		
○ “연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제 14조”에 따라 보험가입을 의무화하고 “시행령 제 14조 제 1항 제 1호”와 같이 연구주체의 장은 연구활동 종사자의 보험 가입에 필요한 비용을 매년 예산에 계상하여 실시함		
○ 그 외 과제 참여 기업체 연구원들은 “산업재해보상보험”에 가입되어 있음		
[제1협동기관 : 매일유업]		
가. 연구실 안전관리 체계		
1. 연구실 안전점검 및 정밀안전진단		
○ 교육과학기술부의 “연구실 안전점검 및 정밀안전진단에 관한 지침”에 따라 일상점검, 정기점검 및 특별안전점검을 시행함		
☑ 일상점검: 매일 1회 이상/ 연구 활동 종사자 점검		
☑ 정기점검: 연 1회 이상/ 기계안전, 전기안전, 화공안전, 소방안전, 가스안전, 사업위생 등 부문별 안전 관리자 점검		
☑ 특별안전점검		

- “연구실 안전환경 조성법 제 9조”에 의거 연구실 정밀안전진단을 2년에 1회 실시함

2. 연구실 내 위험물 관리

- 모든 연구실 및 실험실의 출입허가제를 운영하며, 안전관리 규칙을 어길 시 출입권한을 박탈함
- 화학약품을 취급하는 연구실 및 실험실에 안전설비로써 긴급 샤워기와 세안기 등을 설치하고 관리함
- 주요 위험관리 기자재는 소모성 부품교환 주기에 맞추어 순회 안전점검 실시
- 실험실 내 보호장비 보관함 및 구급함 구비



나. 연구자 안전관리 체계

1. 참여연구원 교육훈련 및 건강검진 실시

- “연구실 안전환경 조성에 관한 시행규칙 제 9조”에 따라 반년에 6시간 이상의 정기 교육을 실시함
- 온라인교육을 실시할 경우 반드시 평가과정을 거쳐 교육 이수시간을 인정하여야 함
- “연구실 안전환경 조성에 관한 시행규칙 제 10조”에 따라 “국민건강보험법”에 따른 건강검진기관에서 1년에 1회 이상 일반건강검진을 실시함

2. 상해보험가입

- “연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제 14조”에 따라 보험가입을 의무화하고 “시행령 제 14조 제 1항 제 1호”와 같이 연구주체의 장은 연구활동 종사자의 보험 가입에 필요한 비용을 매년 예산에 계상하여 실시함
- 그 외 과제 참여 기업체 연구원들은 “산업재해보상보험”에 가입되어 있음

[제2협동기관 : 고려대학교]

가. 안전점검 및 정밀안전진단

- 점검대상 : 자연계, 이공계열 모든 대학원 연구실 및 연구소(센터)
 - 점검목적 : 안전사고 예방 및 안전의식 고취

- 점검안내 : ①포털 공지 ②그룹 메일 ③SMS 문자 전송

○ 안전점검

- 일상안전점검 : 연구활동 종사자 매일 점검 → 매월 4일 안전점검의 날
- 정기안전점검 : 년 1회, 4~5월 실시(유자격자 또는 업체 위탁점검)
- 특별안전점검 : 연구주체의 장이 필요하다고 인정하는 경우 실시

○ 정기안전점검 범위

- 연구실 일반관리, 소방, 기계, 산업위생, 화학약품, 생물, 전기, 가스

○ 정밀안전진단

- 진단시기 : 2년 1회, 4~5월 실시
- 진단분야 : 일반안전관리, 소방안전, 기계안전, 산업위생, 화공안전, 생물안전, 전기안전, 가스안전

나. 안전교육

- 교육대상자 : 연구활동 종사자(학부생, 대학원생, 연구원)
- 온라인 안전교육 : 전반기 6시간, 후반기 6시간
- 자체교육 : 실험·실습 수업 전 5분 자체 안전교육실시(지도교수 또는 조교의 지도하에 당해 실험 주의사항)
- 온라인교육 이수 홈페이지 : <http://kusafe.korea.ac.kr> (365일 교육수강 접속可)

◇ 교육영상 분류(풀에서 원하는 동영상 취사선택 / 지속 업데이트)
<ul style="list-style-type: none"> ■ 기계분야(9개) ■ 전기분야(11개) ■ 화공분야(36개) ■ 소방분야(8개) ■ 가스분야(2개) ■ 보건(위생)분야(5개) ■ 생물분야(5개) ■ 생활안전(43개) ■ 기타분야(5개)

다. 상해보험 가입

- 대상: 자연계 연구활동 종사자(학부생, 대학원생, 연구(보조)원)
- 보상기준 및 내용

구 분		내 용
보상 기준		-연구실에서 발생한 사고로 연구활동 종사자가 부상, 질병, 신체장애, 사망 등 생명 및 신체상의 손해발생시 보상
보상 내용	사망	1인당 1억원
	후유장애	1억원을 한도로 후유장애등급별 정액 보상
	상해의료비	1천만원 한도로 1인당 상해등급별 정액 및 실손 보상

라. 건강검진

- 대상 : 자연계 연구활동 종사자(학부생, 대학원생, 연구(보조)원)
- 시행 : 매년 3~4월, 교내에서 지정한 장소(2곳)

마. 추가 연구실 안전시설 안전성 확보

- 위험물 저장소 설치
 - 설치 : 생명과학대학(2), 이과대학(1), 공과대학(1)
 - 효과 : 실험실내 안전성 향상
- 비상샤워기 및 세안기 설치
 - 설치 : 유해 위험한 시약을 취급하는 모든 실험실 또는 실험실 복도

- 효과 : 유해 화학물질 접촉 시 긴급한 세척으로 피해예방
- 가스누설경보기 설치
 - 대상 : 가연성, 독성가스를 사용하는 모든 실험실 → 75개소
 - 효과 : 가스 누설 시 자동차단으로 인명과 재산피해 예방 및 감소
- 가스용기 전도방지 고정장치 설치
 - 대상 : 가스용기를 사용하는 모든 실험실(스텐드식 → 78개소 등)
 - 효과 : 가스용기 전도예방 및 안전성 확보 등
- 안전보호구함 제작
 - 목적 : 안전보호구의 위생적 보관 및 관리
 - 효과 : 안전보호구 착용 및 안전의식 고취
- 안전관리팀 전담부서 설치
 - 목적 : 교내 안전관리 체계화 도모 및 전담부서 신설 추세.
 - 분장 : 연구실, 환경

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	유기농 갈락토올리고당이 고함량으로 포함된 혼합당 조성물의 제조방법	(주)네오크레마		대한민국		2016.10.14.	단독사사	10-2016-0133393
2	논문	Evaluation of prebiotic effects of high-purity galactooligosaccharides in vitro and in vivo	Department of Public Health Sciences, Graduate School, Korea University	교신	Food Technology and Biotechnology	0.891	2016.02.03	단독사사	SCI

3	논문	Effect of dual-type oligosaccharides on constipation in loperamide-treated rats	Department of Public Health Sciences, Graduate School, Korea University	교신	Nutrition Research and Practice	1.679	2016.09.09	단독사사	SCI
4	논문	Complex-oligosaccharide composed of galacto-oligosaccharide and lactulose ameliorates loperamide-induced constipation in rats	Department of Public Health Sciences, Graduate School, Korea University	교신	Food Science and Biotechnology	0.699	2018.01.05	단독사사	SCI
5	논문	유기농 유청 단백질 가수분해의 최적 효소 선발	Department of Public Health Sciences, Graduate School, Korea University	주	The Korean Journal of Food and Nutrition	0.598	2017.06.30	단독사사	SCI
6	논문	유기농 유당으로부터 유기농 Galactooligosaccharide 생산	Department of Public Health Sciences, Graduate School, Korea University	공동	Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition	1.13	2017.11.16	단독사사	SCI
7	학술대회	Improvement of Gastrointestinal Transit Ratio by Organic Galacto-oligosaccharides in Loperamide Induced Constipation Rat Model	의생명융합 과학과, 고려대학교	교신	한국영양학회		2015.11.06	단독사사	밀레니엄 서울힐튼호텔, 대한민국

8	학술 대회	Preparation of whey protein hydrolysate for stimulation of osteoblastic differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells	의생명융합 과학과, 고려대학교	교신	식품과학 회 국제심포 지움2016		2016.08.17	단독사사	대구엑스포, 대한민국
9	학술 대회	Differentiation and Mineralization of Protamex Hydrolysate in MC3T3-E1 Cell	의생명융합 과학과, 고려대학교	교신	한국식품 영양과학 회 국제심포 지움 2016		2016.10.31	단독사사	제주국제컨 벤션센터, 대한민국
10	학술 대회	Growth promoting effect of protamex hydrolysates on adolescent SD-Rat	의생명융합 과학과, 고려대학교	교신	한국식품 영양과학 회 국제심포 지움 2017		2017.11.9	단독사사	경주화백컨 벤션센터, 대한민국

11. 기타사항

			코드번호	D-13	
1.전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)					
번호	유형	행사명	전시품목	장소	활용년도
1	전시회	FIA-Thailand	유기농 GOS 외	태국	2015년
2	전시회	국제식품전시회	유기농 GOS 외	대한민국	2015년
3	전시회	FIA-Shanghai	유기농 GOS 외	중국	2015년
4	전시회	HI Japan	유기농 GOS 외	일본	2015년
5	전시회	애너하임	유기농 GOS 외	미국	2016년
6	전시회	비타푸드	유기농 GOS 외	스위스	2016년
7	전시회	국제식품전시회	유기농 GOS 외	대한민국	2016년
8	전시회	FIA-Shanghai	유기농 GOS 외	중국	2016년
9	전시회	애너하임	유기농 GOS 외	미국	2017년
10	전시회	유기농전시회	유기농 GOS 외	중국	2017년

12. 참고문헌

		코드번호	D-14
1. 친환경농식품의 생산, 소비실태와 시장전망 정책보고(2011) 2. 친환경농업육성법 3. 박성훈. 2008. 유기식품 시장동향 2008. 한국식품연구원 4. 유기가공식품 소비실태분석 정책연구보고2011 5. Agriculture and Agri-Food Canada, Packaged Food Sales in China 2012. 6. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685 7. Cheese and fermented milk foods, Kosikowski(1997)			

8. Glass and Hekric(1977)
9. 낙농진흥회 홈페이지 국내통계 part 원유생산, 원유검사현황(<http://www.dairy.or.kr>)
10. Chapter 3 Lactose content of milk and milk products. In : Am J Clin Nutr 1988;48:1099-1104.
11. Alcalase에 의한 유청단백질 가수분해물의 항원성 저감 효과 :농업광학연구 40(4),2013, 359 - 365
12. 유단백질 가수분해에 의해 생성된 저분자 Peptides의 항산화 활성 :한국축산식품학회지 29(5),2009,663-639
13. Nishita, K.D. and Bean, M.M.: Grinding methods: Their impact on rice flour properties. Cereal Chem., 59, 46 (1982))
14. 국립농산물품질관리원,aT한국농수산물유통공사 2014.12. 「알기쉬운 유기 가공식품인증제」
15. Trend in Food Science and Technology Vol 18 no 7 pp 356-364 (2007); Enzyme and Microbial Technology Vol 38 no 4 pp 903-908 (2006)).
16. Wintola OA, Sunmonu TO, Afolayan AJ. 2010. The effect of Aloe ferox Mill. in the treatment of loperamide-induced constipation in Wistar rats. *BMC Gastroenterol* 10: 95.
17. Remesy C, Demigne C, 1976. Partition and absorption of volatile fatty acids in the alimentary canal of the rat. In: *Ann Rech Vet*, 39-55.
18. Roediger W. 1982. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* 83: 424-429.
19. Habeeb ASA: Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical biochemistry* 1966, 14(3):328-336.
20. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 1983, 65(1-2):55-63.
21. Jun S, Jung E, Kang D, Kim J, Chang U, Suh HJ: Vitamin C increases the fecal fat excretion by chitosan in guinea-pigs, thereby reducing body weight gain. *Phytotherapy Research* 2010, 24(8):1234-1241.
22. Fischer T, Elenko E, McCaffery JM, DeVries L, Farquhar MG: Clathrin-coated vesicles bearing GAIP possess GTPase-activating protein activity in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999, 96(12):6722-6727.
23. Pommer K: New proteolytic enzymes for the production of savory ingredients. *Cereal Foods World* 1995.
24. Bellows C, Aubin J, Heersche J: Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone and*

mineral 1991, 14(1):27–40.

25. Logan RA: The role of osteoblasts and osteoclasts in osteogenesis. *American Journal of Orthodontics and Oral Surgery* 1942, 28(9):561–566.

26. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ: An Alizarin red–based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical biochemistry* 2004, 329(1):77–84.

27. Aubin J, Liu F, Malaval L, Gupta A: Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 1995, 17(2):S77–S83.

28. Stein GS, Lian JB: Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine reviews* 1993, 14(4):424–442.

29. Delany AM, Canalis E: Basic fibroblast growth factor destabilizes osteonectin mRNA in osteoblasts. *American Journal of Physiology–Cell Physiology* 1998, 274(3):C734–C740.

30. Kim K, Chang U, Kang D, Kim J, Choi Y, Suh HJ: Yeast hydrolysate reduces body fat of dietary obese rats. *Phytotherapy Research* 2004, 18(11):950–953.

31. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS: Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal of cellular physiology* 1990, 143(3):420–430.

32. Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ: Mutations in collagen genes: causes of rare and some common diseases in humans. *The FASEB journal* 1991, 5(7):2052–2060.

33. Olsen B: Mutations in collagen genes resulting in metaphyseal and epiphyseal dysplasias. *Bone* 1995, 17(2):S45–S49.

34. Harris H: The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clinica Chimica Acta* 1990, 186(2):133–150.

35. Robison R: The Possible Significance of Hexosephosphoric Esters in Ossification. *Clinical orthopaedics and related research* 1991, 267:2–7.

36. Jung Min Kim, Seong–Yeong Kim, Eun–Young Jug, Son Hwan Bae, Hyung Joo Suh. 2008 Yeast hydrolysate induces longitudinal bone growth and growth hormone release in rats. *Phytotherapy Rearch* 23: 731–736.

37. Franco GEL, O'neil TK, Litscher SJ, Urban–Piette M, Blank RD. 2004. Accuracy and precision of PIXImus densitometry for ex vivo mouse long bones: comparison of technique and software version. *J Clin Densitom* 7: 326–333.

38. Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Okubo A, Yamazaki S, Takano T. 1995.

Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J Dairy Sci* 78: 777-783.

39. Mulder L, Koolstra JH, de Jonge HW, van Eijden TM. 2006. Architecture and mineralization of developing cortical and trabecular bone of the mandible. *Anat Embryol (Berl)* 211: 71-78.

40. Yan Q, Tomita N, Ikada Y. 1998. Effects of static magnetic field on bone formation of rat femurs. *Med Eng Phys* 20: 397-402.

41. Deitch, A. D. and Moses, M. J. 1957. The nissl substance of living and fixed spinal ganglion cells. *Biophysical and biochemical cytology*, 3(23): 449-456

42. Humason, G. L. 1983. Animal tissue techniques, San Francisco, Freeman and Company

43. Bancroft G, Sikavitsas V, Van Den Dolder J, Sheffield T, Ambrose C, Jansen J, Mikos A. 2002. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 12600.

44. Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N., 1991. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone and Mineral* 14, 27-40.

45. Logan, R.A., 1942. The role of osteoblasts and osteoclasts in osteogenesis. *American Journal of Orthodontics and Oral Surgery* 46, 561-566.

46. Behr W Fau - Barnert J, Barnert J. Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by precipitation with wheat-germ lectin: a simplified method and its clinical plausibility.

47. Nilsson A, Isgaard J, Lindahl A, Peterson L, Isaksson O. 1987. Effects of unilateral arterial infusion of GH and IGF-I on tibial longitudinal bone growth in hypophysectomized rats. *Calcif Tissue Int* 40: 91-96.

48. Skottner A, Clark R, Robinson I, Fryklund L. 1987. Recombinant human insulin-like growth factor: testing the somatomedin hypothesis in hypophysectomized rats. *J Endocrinol* 112: 123-132.

49. Maor G, Laron Z, Eshet R, Silbermann M. 1993. The early postnatal development of the murine mandibular condyle is regulated by endogenous insulin-like growth factor-I. *J Endocrinol* 137: 21.

50. Matar C, LeBlanc JG, Martin L, Perdigon G. 2003. Biologically active peptides released in fermented milk: role and functions. *Handbook of fermented functional foods*: 177 - 201.