

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “우유웨이프타이드를 이용한 골밀도 강화기능 식품소재화 기술개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 14 일

주관연구기관명 : 국민대학교

총괄연구책임자 : 임 지 영

연 구 원 : 노 경 현

연 구 원 : 오 주 경

연 구 원 : 김 선 철

연 구 원 : 김 희 수

연 구 원 : 박 우 람

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 김 세 현

요 약 문

I. 제 목

우유펩타이드를 이용한 골밀도 강화기능 식품소재화 기술개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우유는 풍부한 영양소와 함께 인체의 생리 기능을 조절할 수 있는 성분을 다량 함유하고 있는 기능성 성분의 보고로서 전 세계적으로 우유에 존재하는 기능성 성분들에 관한 다양한 연구가 진행되고 있다. 우유에서 발견된 기능성 성분 중 생리활성을 나타내는 펩타이드는 체내에서 일어나는 우유단백질의 소화과정이나 외부에서 단백질 분해효소를 첨가하여 인위적으로 우유단백질을 분해한 경우, 그리고 유제품의 발효과정에서 첨가된 미생물이 분비하는 단백질분해 효소에 의하여 생성될 수 있다.

우유 유래 기능성 펩타이드는 인체 생리기능의 조절 능력을 부여함으로써 제품에 활용 시 부가가치를 상승시킬 수 있으며 단백질에 비하여 흡수고 빠르고 알러지를 일으키지 않는 등 영양학적 장점을 가지고 있다. 또한 높은 용해도와 열안정성 및 고농도에서도 점도의 상승이 낮으므로 식품소재의 측면에서도 높은 응용성을 기대할 수 있다.

이미 고령화 사회에 진입한 우리나라는 노인인구가 증가함에 따라 다양한 사회적 문제 및 의료비 지출로 인한 국가적 손실이 급격히 증가하고 있으며 사회 복지 비용 중 상당 부분을 차지하는 의료비 부담을 줄이기 위해서는 식품을 통한 질병의 예방적 접근이 매우 중요한 시점이다. 본 연구에서는 가장 흔한 노인성 질환의 하나로써 빈번히 골절을 일으키는 질병인 골다공증을 예방할 수 있는 골밀도 강화 기능성 펩타이드 소재를 생산하고자 실시하였다. 골다공증은 폐경기 이후의 여성뿐만 아니라 젊은 여성 그리고 남성들에게서도 증가하는 추세를 보이고 있으므로 국민 보건의 향상에 기여할 수 있으며 고부가가치의 식품소재를 생산함으로써 낙농산업의 발전에 기여할 수 있다. 또한 기능성 성분의 식품소재화를 위하여 필수적으로 요청되는 기능성

성분의 생산 및 효율적 분리, 정제 기술 및 골대사의 조절 능력을 다각도로 평가하는 방법을 제시함으로써 식품 가공기술의 발전을 도모하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

주관과제 : 우유단백질의 효소가수 분해에 의한 가수분해물의 제조, 물리화학적 특성 구명 및 활성펩타이드의 대량 생산

- 분해효소의 작용 조건에 따른 우유단백질의 분해 특성
- 유청 단백질 가수분해물의 분리, 정제
- 미변성 유청단백질의 생산
- 활성 유청단백질 분해물의 제조공정 최적화
- 활성 유청단백질 분해물의 대량 생산 공정 정립
- 활성 유청단백질 분해물의 물리화학적 특성 구명
- 활성 유청단백질 분해물의 관능적 품질 향상
- 시제품의 생산 평가

협동과제 : 미생물 발효에 의한 우유단백질 분해물의 분별 및 생체 내·외에서의 골밀도 증진효과 검증

- 단백질 분해효소 생산 미생물 선발
- 유단백질 분해물 분별
- 유단백질 분해물의 생체 외(in vitro) 조골세포 성장에 미치는 효과 검증
- 유단백질 분해물의 생체 내(in vivo) 골밀도 증진 효과 검증

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

주관과제 : 우유단백질의 효소가수분해에 의한 가수분해물의 제조, 물리화학적 특성 구명 및 활성펩타이드의 대량 생산

우유단백질을 식품 생산에 적용이 가능한 다양한 효소로 분해한 후 분해물을 cation column chromatography로 분리하여 조골세포의 성장 및 분화를 촉진하는 활성 분획의 분리 및 정제를 실시하였다. 조사된 우유단백질 분해물 중 유청단백질을 Flavourzyme(5%, 단백질 함량 기준)로 분해하여 회수한 염기성 분획이 가장 높은 조골세포의 성장 촉진효과를 나타냈다. 기존의 보고(Takada et al., 1996)와 같이 가수분해 전 유청단백질 자체도 조골세포 성장을 촉진하는 효과를 나타냈으며 가수분해 후 정제 과정에 의하여 그 효과는 동일한 첨가수준에서 가수분해 전의 약 160% 수준으로 증가하였다.

가수분해 전 유청 분말의 단백질 함량이 높을수록 조골세포의 성장촉진 효과는 증가하는 경향을 나타냈으며 가수분해 후 효소의 가열 처리 조건에 따라 활성이 변화하였다. 반응표면 분석을 이용하여 예측한 최적 가수분해 조건은 54°C, 140분으로 나타났으며 확인 실험을 통하여 예측치의 적합성이 검증되었다. 최적 가수분해 조건에서는 유청단백질의 약 39%가 가수분해 되었으며 가수분해된 펩타이드의 수는 79개, 생성된 펩타이드의 평균 길이는 2.8로 추정되었다. 활성펩타이드는 pH 4의 산성 조건에서 85°C 5분의 가열처리에서도 수용액 상태로 존재하는 염기성 분획으로 나타났다.

유청단백질 가수분해물의 대량 생산 공정으로서 에탄올 침전 방법의 유효성을 조사한 결과 30%(w/w) 에탄올을 처리하고 회수한 수용성 용액층은 column chromatography에 의하여 정제된 염기성 분획과 동일한 세포증식 촉진 효과가 관찰되어 가수분해물의 신속한 정제 과정에 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 역상 HPLC chromatography를 이용하여 에탄올 침전과정에서 일어나는 변화를 분석한 결과 소수성이 강한 펩타이드가 제거되는 것으로 나타났다.

활성 유청단백질 가수분해물은 가수분해 전과 비교하여 다양한 pH 영역에서 용해도의 현저한 증가가 관찰되었으며 85°C 15분의 가열처리에서도 용해도의 감소가

일어나지 않았다. 혼탁도는 산성과 중성 영역에서 모두 가수분해 전과 비교할 때 높은 투명도를 유지하였으나 유화능력은 감소하는 경향을 나타냈으며 겔 형성 능력은 상실하였다.

활성 유청단백질 분해물의 관능검사는 시판 중인 아미노산 음료를 매질로 하여 52 명의 패널을 대상으로 실시하였다. 활성 유청단백질 분해물을 0.5%, 1%의 농도가 되도록 첨가한 결과 단맛, 짠맛, 쓴맛, 감칠맛에서는 대조구와 유의적 차이를 보이지 않았으나 신맛은 현저히 감소시키는 결과를 나타냈다. 이 결과는 활성 유청 단백질 가수분해물이 염기성 아미노산을 다량 함유하고 있기 때문으로 설명될 수 있으며 실제적으로 대조구에 활성 유청단백질을 관능 검사 시에 동일한 수준으로 첨가한 경우 pH의 상승이 관찰되었다.

활성 유청단백질을 4℃이하에서 저장하는 경우 4 주간의 저장기간 동안 활성의 유의적인 변화가 나타나지 않았으나 저장 온도가 높아짐에 따라 활성이 감소하는 것으로 나타나 활성 분획의 저장 시에는 냉장 또는 냉동 조건을 유지하는 것이 바람직한 것으로 생각된다.

새로운 생리조절성분을 이용하여 고부가가치 식품소재나 제품을 생산하려는 노력은 전세계 식품시장에서 공통적으로 나타나는 움직임이며 이미 식품관련 대기업은 물론이고 다국적 유통업체 및 제약업체도 적극적으로 건강기능식품의 참여 의사를 보이고 있다. 식품회사들은 과학적으로 검증된 기능성원료를 사용하여 통상적으로 제조되는 식품의 형태로 소비자에게 건강상의 유익을 제공하고 싶은 한결같은 바람을 가지고 있으나 현재 우리나라의 법적관리 체계하에서는 해결해야 할 문제점을 가지고 있다.

2003년 8월에 시행 된 건강기능식품법에 의하면 건강식품을 “인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조·가공한 식품”으로 정의하고 있다. 따라서, 일반식품에 있어서 기능성의 표시가 허용되지 않으며 앞서 언급한 형태의 식품으로써 식품의약품안전청장이 고시한 기준과 규격에 적합한 경우 적절한 절차에 의해 제품을 생산, 판매할 수 있다. 고시되지 않은 품목은 제조자가 개별인정형의 심의를 요청할 수 있도록 되어 있으며 기능성의 표시 방법의 경우 질병과 관련이 없는 인체의 구조-기능표시(structure function claim)만이 가능하므로 본 연구를 통하여 얻어진 기능성 펩타이드는 골다공증의 치료

가 아닌 골밀도의 강화소재로서 인증을 받을 수 있을 것으로 생각되며 개별인정형의 심의를 통과하기 위해서는 본 연구의 범위에 포함되지 않은 임상실험 등의 연구적 보완이 필요할 것으로 판단된다. 또 하나의 접근 방법은 현행 기준, 규격상 신소재를 제품화하기 어려운 경우 유사품목군으로 제조허가를 받아 건강식품으로 판매하는 방법을 고려하여 볼 수 있다.

협동과제 : 미생물발효에 의한 우유단백질 분해물의 분별 및 생체 내·외에서의 골밀도 증진효과 검증

다양한 근원에서 분리한 미생물 균주를 대상으로 단백질의 분해에 의해 생성되는 free amino nitrogen(FAN)과 효소 작용으로 생기는 non-protein nitrogen(NPN)의 정량 결과를 바탕으로 높은 단백질 분해 능력을 가진 것으로 판단되는 *Lactobacillus acidophilus* 4356, *Lactobacillus casei* 393, *Lactococcus* 449 등 3종의 유산균주를 최종 선별하였다. 세 가지 균종에 대하여 최적 배양 조건을 확립하기 위하여 다양한 SNF 첨가배지를 조사하였을 때 12% SNF, 37°C에서 15시간 배양시켰을 때 가장 높은 균주의 성장 활력이 관찰되었다. 선발된 세 가지 균주 *Lactobacillus acidophilus* 4356, *Lactobacillus casei* 393, *Lactococcus* 449를 대상으로 그 배양액을 원심 분리하여 상등액 시료를 농축하고 gel filtration G-50을 이용하여 분자량을 추정 한 결과 whey protein에서 볼 수 없는 새로운 1 kD의 peak가 공통적으로 확인되었다.

유청단백질 분해물 및 발효분해물이 조골세포의 세포 증식에 미치는 효과를 조사하기 위하여 효소분해물 및 미생물 분해물을 조골세포 배지에 1 mg/mL의 수준으로 첨가하고 시간의 경과에 따른 MTT 흡광도의 변화를 측정하였을 때 serum free media에서는 배양이 지속됨에 따라 세포의 증식이 점차 감소하였으나 가수분해 전 유청단백질과 유청단백질 효소분해물을 배지에 첨가 시에는 조골세포의 증식이 배양 시간과 함께 증가하였으며 효소분해물의 세포증식효과는 가수분해 전 유청단백질에 비하여 뚜렷이 높게 나타났다. 또한 미생물 발효분해물을 대상으로 조골세포의 증식에 미치는 영향을 평가하였을 때 *L. casei* 393 배양액의 조골세포 증식 촉진 효과는 대조구(100)와 비교하였을 때 130-160%로서 높은 것으로 나타났으며 *L. acidophilus*

4356, *Lactococcus* 449의 배양액은 그 증식 효과가 대조구의 80-120%로 유사하거나 낮았다. *L. casei* 393 배양액의 첨가효과는 농도에 따라 다소 차이를 보였지만 다른 발효분해물에 비하여 유의적으로 우수하였으며 100 ug/mL의 수준으로 첨가한 경우에는 효소가수물의 세포증식 촉진 효과와 유사한 것으로 나타났다.

효소분해물과 조골세포증식 촉진 효과가 우수하였던 *L. casei* 393 발효분해물을 조골세포에 첨가하여 배양한 후 세포의 성상을 광학 현미경으로 관찰한 결과 72 시간 배양 후 관찰한 세포의 성상은 효소분해물 및 발효분해물이 대조구에 비하여 더욱 치밀하고 높은 것으로 나타나 MTT assay에 의한 세포증식 평가 결과와 일치하였다.

조골세포증식의 촉진 효과가 확인 된 유단백질 효소분해물 및 발효분해물을 대상으로 조골세포의 분화에 미치는 효과를 조사하였을 때 조골세포가 분화하면서 발현되는 생화학적 표지인자인 ALP activity와 osteocalcin mRNA 발현량이 유의적으로 증가함을 근거로 할 때 유청단백질 효소분해물 및 발효분해물은 세포의 증식과 함께 조골세포의 분화과정을 촉진하는 효과를 가진 것으로 판단된다. 또한, TUNEL assay에 의한 조골세포의 자가사멸(apoptosis)을 측정하였을 때 효소분해물 및 발효분해물의 첨가는 조골세포의 사멸을 억제하는 것으로 나타났다.

흥미롭게도 *L. casei* 393 발효분해물을 조골세포에 첨가하여 배양한 후 특이적으로 발현이 변화되는 단백질을 동정한 결과 조골세포의 세포내 단백질 중 3개의 단백질(Eva6 protein, A630038 E17 Rik protein, Ankyrin repeat domain protein 10)의 발현이 특이적으로 3배 이상 증가하였으며 glutamate receptor-interacting protein 1의 경우 3배 이상 발현이 특이적으로 감소하였다. 이중 특히 Eva6 protein은 fibroblast growth factor receptor 3와 높은 homology를 가지는 것으로 보고 되었으며 FGF의 경우 MC3T3-E1의 성장을 촉진시키는 것으로 보고 있어 이들의 상관관계가 조골세포의 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다.

1, 2 차년도에서 실시된 다양한 생체 외 실험결과를 바탕으로 최종적으로 유청단백질 효소분해물(Whey protein hydrolysate, WPC-H)과 발효분해물(*Lactobacillus casei* ATCC 393 fermented milk, LC-393)을 선별하였으며 이들에 의한 골밀도 증진효능을 쥐를 이용한 동물 실험을 통해 생체 내에서 검증하고자 하였다.

1차 동물실험으로써 2% 농도의 유단백 분해물과 일반 사료를 첨가 하여 6주

간 급여 하였을 때 난소미적출군(Sham)과 난소적출군은 유의적 차이가 나타났으나 난소적출군은 6주간 급여 시 기본사료만을 투여한 OVX-control과 유청단백질 효소분해물(WPC-H)과 발효분해물(LC-393) 구간은 유의차가 없는 것으로 나타났다. 혈청내의 골형성과 관련되는 생화학적 표지인자의 함량변화를 측정된 결과 Sham군에서는 가장 낮은 ALP 농도를 보였으며 난소 적출 실험군 중 유단백 분해물 투여군이 유의적으로 높은 혈중 ALP 농도를 나타냈다. Creatinine, BUN, 칼슘 그리고 인과 같은 다른 지표인자는 유의적 차이를 보이지 않았지만 일부구간에서 난소미적출군과 유사한 함량 또는 증가하는 경향이 확인되었다. 골강도는 유청단백질 효소분해물과 발효분해물의 투여군에서 유의적 증가가 관찰되었다. 대퇴골의 무게와 골 미네랄 함량(Bone mineral contents)은 유단백 분해물을 처리한 구간이 유의적으로 높았다. 따라서 본 연구에 사용된 유청단백질 분해물인 효소분해물과 발효분해물은 골밀도 유지 및 향상에 기여할 수 있는 것으로 사료된다.

한편, 골 흡수의 생화학적 지표인 혈청 내 존재하는 collagen C-telopeptide type-1의 양은 유청단백질 효소분해물과 발효분해물의 급여군에서 유의적으로 낮았다. 그러므로 본 연구에서 사용된 유청단백질 효소분해물과 발효분해물은 조골세포의 증식에 기인한 골형성 기작의 증진효과 뿐만 아니라 골재흡수의 저하효과를 가진 것으로 판단된다.

유청단백질 효소분해물 및 발효분해물의 사료 내 첨가수준을 탐색하기 위해 1%, 2%, 4% 수준으로 유청단백질 분해물 및 미생물 분해물을 첨가하여 2차 동물실험을 실시한 결과 모든 첨가수준에서 골강도 증진의 효과가 확인되었으나 첨가수준에 따른 효과는 관찰되지 않았다. 그러므로 1%의 이하의 WPC-H와 LC-393의 급여수준에서도 충분한 골강도 증진 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

SUMMARY

Milk is a rich source of nutritional components and contains biologically active substances. In addition, various latent bioactivities of peptides are generated by digestion, enzymatic hydrolysis or fermentation. Physiological peptide derived from milk with scientific evidence have been described in the literature and some of them are available in the markets.

we have focused on the bioactivity related to bone health since osteoporosis is a major health problem in many countries including Korea. Therefore, this study has been conducted to develop processing technology for the production of bone density enhancing milk-derived peptide.

Among various enzymatic hydrolyates, basic fractions of whey protein hydrolysate produced by Flavourzyme (5% based on protein content) showed the highest growth promoting activity for osteoblastic MC3T3-E1 cells. The optimum hydrolysis temperature and time predicted by response surface methodology was 54°C and 140 min, respectively. At this hydrolysis condition, 39% of whey protein was hydrolyzed and 79 peptides were generated. The estimated average peptide chain length and 2.8.

Depending on the conditions for enzyme inactivation, the growth promoting activity for osteoblastic cells in whey protein hydrolysate was changed. The growth promoting activity in whey protein hydrolysate was heat resistant (85°C, 5 min) and remained in the soluble fraction at pH 4. The active peptide fraction was effectively recovered in the soluble fraction by ethanol precipitation (30%, w/w) and the recovered activity was close to that of basic fraction obtained by cation exchange column chromatography. Based on the result of reverse phase HPLC, ethanol treatment removed hydrophobic peptides from the hydrolyates. This results suggest that the active component can be concentrated by the treatment of heat and ethanol and can be used for rapid

large scale concentration process.

The whey protein hydrolysate showed excellent solubility and turbidity in wide ranges of pHs whereas it had reduced emulsifying activity. The sensory quality of whey protein hydrolysate (0.5 and 1%) was examined using commercial amino acid drink as a carrier. There were no significant differences in the intensities of sensory attributes including sweetness, bitterness, saltiness and umami. However, significantly reduced sourness was observed in the samples containing whey protein hydrolysate. This result was due to the basic amino acids contained in the samples and the samples containing whey protein hydrolysate showed significantly higher pH than that of control.

The growth promoting activity for osteoblastic MC3T3-E1 cells in whey protein hydrolysate were not significantly changed up to 1 month when the hydrolysate was stored at 4°C.

The proteolytic activity of various probiotic bacteria were examined and three probiotic strains (*Lactobacillus casei* ATCC 393, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and *Lactococcus* 449) were selected based on production of non-protein nitrogen (NPN) and free amino nitrogen (FAN). They showed high growth and proteolytic activity when they were incubated at 37°C for 15 hr in the medium containing 12% of SNF. At this condition, generation of small peptide about 1 Kda were observed.

The growth promoting activity of milk protein fermentation products for osteoblastic MC3T3-E1 cells was tested. Among the fermentation products, the products by *Lactobacillus casei* ATCC 393 (LC-393) showed the highest activity. The significantly higher levels of biochemical markers (alkaline phosphatase activity and osteocalcin mRNA expression) indicating enhanced osteoblastic cell proliferation and differentiation was found when the whey protein hydrolysate (WPC-H) or fermentation products were added. In addition, apoptosis of MC3T3-E1 cell were significantly inhibited in the presence of WPC-H or LC-393.

The changes in protein profiles of MC3T3-E1 by the exposure of LC-393 were examined by two dimensional gel electrophoresis. Total ten protein spots with three-fold increase or decrease were observed. Among them, four proteins were identified by MALDI-TOF. Especially, Eva6 protein exhibited high homology with fibroblast growth factor (FGF) receptor 3. Recent reports suggest that FGF was one of growth factors for inducing the proliferation of osteoblastic cells.

The effects of WPC-H or LC-393 on bone metabolism were investigated using the ovariectomized (OVX) rats. The final body weight, food intake and food efficiency did not show significant differences among treatment groups except sham group. The BMD (bone mineral density) and bone strength of ovariectomized rats were significantly improved ($p < 0.05$) by the supplementation of WPC-H (2%) or LC-393 (2%). The activity of bone biochemical markers also increased in the group containing either WPC-H or LC-393. The concentration of C-telopeptide collagen type I, the bone resorption marker was significantly decreased ($p < 0.05$) in the group containing either WPC-H or LC-393. Based on the result of dosage trial, less than 1% of WPC-H or LC-393 supplementation was enough to enhance bone density.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	14
1. Justification of research	15
2. Objective and scope of research	16
Chapter 2. Current status of technique	17
Chapter 3. Research contents and result	19
1. Production of milk protein hydrolysate, characterization of physicochemical properties and development of large scale process for active peptide preparation	19
2. Production and characterization of milk protein fermentation products and verification of bone density enhancing activity in vitro and vivo	101
Chapter 4. Achievements and contributions	151
1. Production of milk protein hydrolysate, characterization of physicochemical properties and development of large scale process for active peptide preparation	151
2. Production and characterization of milk protein fermentation products and verification of bone density enhancing activity in vitro and vivo	152
Chapter 5. Application	154
Chapter 6. International trend and scientific information	155
Chapter 7. Reference	156

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	14
제 1 절	연구개발의 필요성	15
제 2 절	연구개발의 목적 및 범위	16
제 2 장	국내외 기술개발 현황	17
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	19
제 1 절	우유단백질의 효소 분해에 의한 가수 분해물의 제조, 물리화학적 특성 구명 및 활성 펩타이드 제조를 위한 대량생산 공정의 개발	19
제 2 절	미생물 발효에 의한 우유단백질 분해물의 분별 및 생체 내·외에서의 골밀도 증진효과 검증	101
제 4 장	목표달성도 및 관련분야의 기여도	151
제 1 절	우유단백질의 효소 분해에 의한 가수 분해물의 제조, 물리화학적 특성 구명 및 활성 펩타이드 제조를 위한 대량생산 공정의 개발	151
제 2 절	미생물 발효에 의한 우유단백질 분해물의 분별 및 생체 내·외에서의 골밀도 증진효과 검증	152
제 5 장	연구개발결과의 활용 계획	154
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	155
제 7 장	참고문헌	156

제 1 장 연구개발과제의 개요

식품이 가지고 있는 고유한 기능 중 3차 기능으로 알려진 인체 내 생리활성의 조절 기능은 그 과학적 근거가 제시됨에 따라 소비자의 식품선택에 영향을 미치는 중요한 요소로 작용하고 있으며, 실제 식품을 생산하는 산업계에는 생리활성 성분을 이용한 고부가 가치의 식품을 생산함으로써 경제적 이윤을 창출하는데 많은 노력을 기울이고 있다. 기능성 성분의 식품소재화를 위해서는 식품이나 식품 소재로 활용할 수 있는 천연물로부터 기능성 성분을 확인하는 screening 기술과 기능성 성분을 효율적으로 분리 정제하는 기술 그리고 추출된 생체조절 기능을 다각도로 평가하고 산업적 적용을 위한 가공기술의 개발이 필수적으로 요청된다.

우유는 현재까지 인류가 발견한 다양한 생리적 기능성 성분을 가장 풍부하게 함유하고 있는 기능성 성분의 보고로서 전 세계적으로 우유에 존재하는 기능성 성분들에 관한 다양한 연구가 진행되고 있다. 우유에서 발견된 기능성 성분 중 생리활성을 나타내는 펩타이드는 체내에서 일어나는 우유단백질의 소화과정이나 외부에서 단백질 분해효소를 첨가하여 인위적으로 우유단백질을 분해한 경우, 그리고 유제품의 발효과정에서 첨가된 미생물이 분비하는 단백질분해 작용에 의하여 생성될 수 있다.

우유단백질에서 유래한 다양한 기능성 펩타이드는 Clare and Swaisgood (2000)이 보고한 바와 같이 대표적으로 항균펩타이드, 면역조절펩타이드, 혈압강하펩타이드, 항혈전펩타이드, 미네랄결합(운반)펩타이드, opioid 펩타이드 등으로 구분할 수 있으며 이들의 작용은 호르몬과 유사하게 표적세포의 특정 수용체와 결합하거나 생체 내 특정 효소의 활성을 저하 또는 촉진함으로써 생리적 작용을 나타낸다. 우유단백질 유래 기능성 펩타이드 중 혈압강하펩타이드, 항엘러지펩타이드, 미네랄결합펩타이드 등은 이미 일본 등에서 기능성 발효유제품 등의 형태로 상품화되어 시판되고 있으며 지속적으로 다양한 형태의 제품에 적용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 유청단백질 중 milk basic protein이라 명명된 미량단백질은 조골세포의 증식과 분화를 증식시키는 효과가 있는 한편 골의 흡수에 관여하는 파골세포의 생성을 억제할 수 있음이 보고되었으며 (Takada et al., 1996; Takada et al., 1997c) MBP란 상품명으로 다양한 유제품의 강화되어 일본을 비롯한 국내에서도 시판되고 있다.

제 1 절 연구개발의 필요성

우리나라의 65세 이상 노인인구는 전체 인구의 7.1%인 337만명(2,000년 기준)으로 이미 고령화사회로 진입했으며 2022년에는 전체 14%를 넘어 고령사회가 될 것으로 예측되고 있다. 골다공증은 가장 흔한 노인성 질환의 하나로 노령인구가 증가함에 따라 그 중요성이 점차 확대되고 있다. 또한 각종 인스턴트 식품의 범람과 환경호르몬 및 중금속등에의 노출로 폐경기 이후의 여성뿐만 아니라 남성들에게서도 골다공증 환자가 증가하는 추세를 보이고 있으며 골다공증의 발병 시 빈번하게 발생하는 골절로 인한 개인적 피해와 의료비 지출로 인한 국가적 손실은 사회적 문제로 대두되고 있다.

인체의 골은 지속적으로 형성과 재형성 과정을 거치게 된다. 이 과정은 조골세포(osteoblast)에 의한 골형성(bone formation)과 파골세포(osteoclast)가 형성된 골을 흡수하는 과정(bone resorption)으로 구분할 수 있으며 한 단계가 다른 단계를 자극하도록 고도로 연계되어 조골세포와 파골세포 활성의 균형을 통하여 항상성이 유지된다. 골다공증(osteoporosis)은 골의 화학적 조성에는 큰 변화가 나타나지 않지만 단위 면적 내 골량이 감소하여 약한 충격에도 쉽게 골절을 일으키게 되는 질환으로써 사람이 노화됨에 따라 조골세포와 파골세포 작용의 동기성에 차이를 나타냄으로 야기되는 것으로 알려져 있다(Parfitt, 1994).

골다공증을 발생시키는 원인은 다양하지만 특히 폐경기 이후에 일어나는 estrogen의 감소는 조골세포에서 국소인자의 발현저하를 유도하고 결과적으로 골흡수속도를 증가시킴으로써 골다공증을 유발하는 것으로 보고 되어 있다(Christenson, 1997). 식이적 요인으로서 칼슘과 비타민 D 부족, 과다한 동물성단백질, 소금, 카페인, 섬유질 섭취와 음주 등이 보고 되고 있으며(Agostino et al., 1995), 골의 대사에 관여하는 호르몬 결핍이나 장에서의 흡수 능력 저하 등도 골다공증의 원인으로 작용할 수 있다.

현재 골다공증의 예방과 치료를 위해서는 폐경성 골다공증의 경우 주로 호르몬 요법인 estrogen을 투여하거나 estrogen 유사 활성을 나타내는 phytoestrogen을 보충하는 방법이 사용되고 있으며 비 폐경성 골다공증의 경우에는 칼슘과 vitamin D, calcitonin 요법, 불소요법 등의 치료법이 행해지고 있다(Orcel and Krane, 2000). 그러

나 estrogen 요법의 경우 장기간의 치료가 필요하며 불규칙한 자궁출혈이나, 자궁내막염, 고혈압 등의 부작용이 나타날 수 있는 것으로 보고 되고 있으며 대부분의 약물 치료가 감소된 골량을 회복하기에는 효과가 미흡한 것으로 나타나 골다공증은 발병 후의 치료보다는 예방적 차원의 접근이 특히 강조되고 있다.

우유에 풍부하게 함유된 칼슘은 전통적으로 골다공증을 예방하는데 효과적인 것으로 알려져 왔으나 근래에 미국에서 실시된 12년간의 임상연구 결과에 따르면 우유의 섭취에 의한 칼슘공급에 의해 골다공증은 예방되지 않았으며, 오히려 골절의 위험성이 증가하는 것으로 보고 되었다(Feskanich et al, 1997). 그러나 이와 같은 연구 결과는 칼슘의 섭취가 부족하고 고단백질 식이의 섭취 수준이 서양과는 다른 국내의 현실을 고려할 때 동일한 적용은 불가능하나 단백질 섭취 수준이 증가하고 있는 현실을 고려할 때 중요한 시사점을 제공한다 할 수 있다.

제 2 절 연구개발의 목적 및 범위

본 연구에서는 유청단백질이 골밀도를 조절할 수 있는 단백질 성분을 가지고 있음에 주목하고 유청단백질의 가수분해를 이용하여 골대사를 효율적으로 조절하여 골밀도를 향상시킬 수 있는 우유단백질 유래 펩타이드를 제조하고자 하였으며 식품소재화를 위한 기능성 평가 및 이화학적 특성을 조사하였다.

펩타이드의 생산 방법으로는 다양한 food grade 단백질 분해효소를 이용한 효소적 분해법과 유산균을 이용한 발효과정을 이용하였으며 골대사와 관련된 biomarker들을 이용하여 우유단백질, 특히 유청단백질에 잠재적으로 존재하는 골밀도 강화 펩타이드를 선별하고자 하였다. 또한 활성펩타이드 생산을 위한 최적 조건을 통계적으로 예측 확인하였으며 세포 배양 실험을 통하여 확인 된 활성분획의 효능의 생체 내 발현여부를 동물실험을 통하여 구체적으로 검증하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재 골다공증 예방을 위한 식품소재는 서양의 경우 대두단백질 또는 대두 추출물에 국한되어 있는 실정이며 그 작용기전은 phytoestrogen 효과로 설명되고 있다(Arjmandi et al., 1996). 최근 홍차추출물이 난소절제 된 골다공증 모델에서 효과가 있었다는 보고가 발표되었으나 그 작용기전은 동일하였다(Das et al., 2005). 국내의 경우 역시 대두이소플라본과 또는 추출물의 골다공증 예방효과에 대한 연구가 주류를 이루고 있으며(Lee and Byun, 2001; Choi et al., 2001), 한방에서 전통적으로 생약재로 사용되어 오던 홍화씨(홍화씨 추출물)나 칩의 골다공증 예방 또는 치료효과를 검증하기 위한 연구가 수행된 바 있다(Kim et al., 2004; Kim et al., 2002). 또한 국내 다양한 자생천연 식용자원의 추출물들을 이용하여 조골세포의 증식과 분화에 미치는 효과를 조사한 결과 미역취 뿌리 추출물이 조골세포의 활성을 향상시켰다고 보고 되었다(Park et al., 2005).

한편, 축산자원의 경우, 유청단백질의 급여가 난소절제 된 쥐의 골강도와 골세포 대사 및 미네랄화를 조절하는데 관여하는 골기질 단백질 collagen의 구성성분인 hydroxyproline의 함량을 증가시킬 수 있음이 보고되었다(Takada et al., 1997a, 1997b). 또한 유청단백질이 세포배양실험에서 조골세포주의 증식을 향상시키는 반면(Takada et al., 1996), 파골세포의 골흡수를 감소시킬 수 있음이(Takada et al., 1997c) 확인됨에 따라 유청단백질에 존재하는 활성성분을 구명하려는 연구가 지속적으로 수행되었다.

Yamamura et al. (1999)은 조골세포의 증식을 촉진하는 유청단백질 성분은 분자량이 약 10 Kda에 해당하는 HMG1(high mobility group protein)일 것으로 추정하였으며 이 단백질은 양이온크로마토그래피의 정제과정에서 결합하였으므로 염기성 단백질(milk basic protein fraction, MBP)이라 하였다. 이 활성분획은 75-90℃에서 10분간의 가열조건에서도 활성을 잃지 않음으로써 열에 안정한 특성을 보였으며 소화효소에 의한 분해 및 in-vitro 소화시험에서도 분해 되지 않음으로써 경구투여에 의하여서도 소화기를 통과하여 기능을 발휘할 개연성이 있음을 시사하였다(Takada et al., 1996). MBP는 임상실험 결과 건강한 성인여성에서 골밀도와 골흡수를 저해하는 효과가 관찰되었으며(Aoe et al., 2001; Yamamura et al., 2002) 골흡수를 감소시

키는 원인은 파골세포가 cystein protease를 분비하여 bone matrix의 collagen을 분해하는 기작을 저해하기 때문이라고 하였다(Matsuoka et al., 2002).

위의 결과를 바탕으로 할 때, 유청에 미량으로 존재하는 염기성 단백질 분획이 골밀도를 강화시킬 수 있으므로 판단되며 따라서 우유는 단순히 뼈에 필요한 칼슘을 공급하는 기능 이외에 bone matrix의 형성에 관여함으로써 골다공증을 예방하는 데 중요한 역할을 할 수 있음을 의미한다.

한편 유청단백질의 가수분해물은 다양한 생리조절물질을 가지고 있으므로 최근에는 효소적 분해 방법을 이용하여 우유단백질로부터 펩타이드를 생산하고 분리 및 정제하여 식품이나 의약품에 특정한 용도를 부여하려는 노력이 급격히 증가하고 있다. 그러나 대부분의 경우 실험실적 연구 수준에 머무르고 있으며 실제 상업적으로 생산되어 판매되는 펩타이드의 종류는 casein phosphopeptide, glycomacropeptide, angiotensin converting enzyme inhibitory peptide(Ameal peptides) 등이며 골밀도를 강화하는 유청단백질의 가수분해물에 대한 보고는 없는 실정이다.

유단백질의 가수분해물이 다양한 생리적 기능 특성을 가지고 있음에도 불구하고 현재까지 국내에서 수행된 연구는 외국의 경우와 비교할 때 지극히 제한적으로 이루어져 왔음을 고려할 때 본 연구결과는 유청단백질의 생리활성 분획을 이용한 기능성 유제품의 생산에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 주관과제 :

우유단백질의 효소 분해에 의한 가수 분해물의 제조, 물리 화학적 특성 구명 및 활성 펩타이드 제조를 위한 대량생산 공정의 개발

1. 연구수행방법

가. 우유단백질의 가수분해

1) 시료

효소처리의 기질은 유청농축분말(whey protein concentrate, Alacen 878, New Zealand Milk Products Inc.), 유청분말(삼익유가공) sodium caseinate(삼익유가공)를 사용하였다. 사용된 시료의 단백질 함량은 각각 80%, 10%, 73%(w/w)였다.

2) 단백질분해효소

시료의 가수분해는 식품제조에 사용이 가능한 상업용 단백질 분해효소인 Flavourzyme, Protamex, Neutrase 0.8L, Alcalase 2.4L(Novo Nordisk)와 pepsin (Sigma)을 사용하였으며 각 효소의 특성 및 최적 처리 조건은 Table 1과 같다.

3) 우유단백질의 가수분해

가수분해를 위한 초기 기질의 농도는 가수분해 전 시료용액의 점도 및 가수분해물의 회수 효율을 고려하여 WPC는 10%(w/v), sodium caseinate의 경우는 5%로 설정하였으며 증류수에 시료를 환원시켜 시료 용액을 제조하였다. 가수분해는 Table 1에서 제시한 최적가수분해조건에 준하여 항온수조에서 교반하며 실시하였다. 가수분해 전 시료 용액의 pH는 6.2-6.5로써 pepsin을 제외한 다른 단백질 분해효소의 처리 시 pH 조정은 필요치 않았으며, pepsin을 이용한 가수분해의 경우 pH를 4.0으로 조정

한 후 기질 단백질 농도의 5% 및 10%에 해당하는 각 효소를 첨가하여 각각 30, 60, 120, 180, 240분간 반응시켰다. 가수분해 후 시료를 85℃에서 5분간 가열하여 효소를 실효시켰으며 얼음에 넣어 냉각시킨 후 4℃에서 원심분리(3,000 x g, 5 min)하여 침전 물을 제거하고 상등액을 가수분해물로써 회수하였다.

Table 1 Characteristics of proteases and hydrolysis conditions used in the experiment

Protease	Characteristics	Optimum condition	
		pH	Temperature (°C)
Flavourzyme	Fungal protease and peptidase complex	5.0-7.0	50 (50)
Protamex	Bacterial protease complex	5.5-7.5	35-65 (45)
Neutrase 0.8L	Bacterial endoprotease	5.5-7.5	45-55 (50)
Alcalase 2.4L	Bacterial endoprotease	6.5-8.5	55-70 (60)
Pepsin	Mammal protease	2.0-4.0	37 (37)

Optimum temperatures means suggested optimum temperatures by manufacturer. The actual hydrolysis was carried out at the temperature in parentheses.

4) 효소처리에 따른 가수분해율(degree of hydrolysis) 측정

시료의 가수분해정도는 Nielsen et al, (2001)의 방법에 따라 dithiotreitol의 존재 하에 일어나는 아미노기와 o-phthaldialdehyde(OPA)간의 발색반응을 이용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하였으며 전체 peptide 중 가수분해 된 peptide의 %로 표현하였다.

5) 효소처리에 따른 평균펩타이드의 수 및 펩타이드길이의 측정

가수분해정도 된 시료의 평균펩타이드의 수(average number of peptide bond)는 Spellman et al. (2003)의 방법에 따라 아미노기와 o-phthaldialdehyde (OPA)간의 발색반응

을 이용하여 측정하였으며 가수분해율은 아래의 식을 이용하여 단백질 분자 당 전체 peptide 중 가수분해된 peptide의 %로 표현하였다.

$$DH(\%) = (n / N) \times 100$$

DH: 가수분해율, n: 가수분해된 평균펩타이드의 수, N: 단백질분자의 전체펩타이드 수

$$n = (\Delta Abs \times M \times d) / \epsilon \times c$$

ΔAbs : 가수분해전 후 시료의 흡광도(340 nm) 차, M: 시료의 평균분자량(Da)

d: 희석배수, ϵ : 340 nm에서의 흡광계수(6,000 / mol cm), c: 단백질농도(g/L).

펩타이드의 길이(peptide chain length)는 다음의 공식에 의하여 계산하였다.

$$PCL = (N_t - N_0) / (N_h - N_0)$$

N_t , N_0 , N_h 는 각각 OPA 방법으로 정량한 전체, 가수분해 전, 가수분해 후 free amino group의 수

나. 효소처리 분해물의 분리 및 정제

1) 유청단백질 효소분해물과 milk basic protein(MBP)와의 분별특성 비교

꿀밀도 강화 기능을 가진 단백질로 보고 되어 있는 MBP의 분별 특성과 본 연구에서 제조된 유청단백질 분해물의 분별 특성 및 분자량을 비교하기 위하여 Yamamura et. al (1999)이 제시한 방법(pH 4.0 조정 → 열처리(80°C, 10 min → ethanol처리(30%) → 상등액회수)을 이용하여 시료를 처리하고 각 단계에서 나타나는 시료용액의 단백질 함량, profile 및 MBP로 추정되는 염기성이 강한 단백질 분획의 존재 여부를 조사하였다.

2) 단백질 함량 및 profile 변화

각 단계에서 수용액상으로 존재하는 단백질의 함량변화는 Folin-Lowry 방법 (Lowry et al., 1951)으로 측정하였으며, ethanol 처리 후 존재하는 단백질의 함량 변화의 측정 시에는 Rotary evaporator(Eyela N-1, Tokyo, Japan)를 이용하여 시료에 존재하는 ethanol을 휘발시킨 후 시료 용액의 부피를 증류수로 환원하여 측정하였다. 단백질의 profile을 조사하기 위한 SDS-PAGE는 Laemmli의 방법(1970)에 따라 Bio-rad mini gel apparatus를 이용하여 3.5% stacking gel, 12% separating gel을 제조하여 실시하였다.

3) Cation exchange chromatography 분별 특성

MBP 및 가수분해물로부터 염기성 단백질 분획을 분리하기 위하여 시료를 SP-sepharose resin(Amersham pharmacia biotech.)이 충전된 column(15 x 100 mm, bed volume 15 mL)에 주입한 후 AKTA prime system(Amersham pharmacia biotech)에 연결하였다. 주입된 시료는 6.67 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)의 NaCl 농도를 1 M까지 직선적으로 증가시켜 4 mL/min의 속도로 용출하였으며 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Size exclusion chromatography에 의한 분별 특성

Cation exchange chromatography에서 용출된 염기성 단백질 분획의 분자량을 추정하기 위하여 일차적으로 시료를 Sephacryl S-100 gel filtration column(16 x 700 mm, bed volume 100 mL)에 주입하고 6.67 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 이용하여 0.5 mL/min의 속도로 AKTA prime system에서 용출시켰으며 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 가수분해 및 정제과정에서 일어나는 단백질 분자량의 변화를 보다 명확히 관찰하기 위하여 각 정제 단계 별 시료(1%, w/v)를 펩타이드의 분별이 가능한 Superdex 30 prep grade resin(Amersham pharmacia biotech.)이 충전된 column(16 x 450 mm, bed volume 90 mL)에 주입한 후 AKTA prime system(Amersham pharmacia biotech)에 연결하여 동일한 방법으로 가수분해된 단백질의 분포 범위를 측정하였다. 이 때 단백질 및 펩타이드의 용출은 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 이용하였으며 0.5 mL/min의 속도로 실시하였다.

5) Reverse phase HPLC에 의한 효소처리 분해물의 정제

유단백질가수분해물, cation exchange chromatography에 의해 정제된 염기성 분획, 용매침전으로 회수된 시료는 van der Ven et al. (2001)의 방법에 따라 역상 HPLC(Jasco, Japan)를 이용하여 정제하였다. Column은 HiQ sil C18W(4.6 x 250 mm, Japan), detector는 UV/Vis(2075 Plus, Jasco)를 사용하였으며 25°C에서 0.5 mL/min의 유속으로 시료를 이동시켰다. 이동상의 조성은 15 분간 100% buffer A(water, 0.13% TFA)로 시작하여 112분 후 buffer B(100% acetonitrile, 0.13% TFA)가 80%가 되도록 하였다. 각 시료의 단백질 농도는 6 mg/mL으로 조정하여 auto

sampler(AS 2055, Plus, Jasco)를 이용하여 20 μ L를 column에 주입하였다.

다. 미변성 유청단백질의 생산 및 단백질의 변성도 측정

초기 WPC 시료의 단백질 변성 여부가 유청 중에 존재하는 열기성 단백질 분획의 분리 및 회수에 미치는 영향을 조사하기 위하여 시료로 사용한 WPC(2%, w/v)에 인위적으로 열처리를 가하여 단백질의 변성도의 변화를 유도하고 변성유청단백질의 가수분해 시 일어나는 가수분해율과 열기성단백질 회수율의 변화를 측정하였다.

1) 미변성 유청단백질 농축물의 제조

Kee and Hong(1997)의 방법에 따라 신선한 살균유를 탈지 후 등전침전 및 pH 조정을 반복하여 casein을 완전히 제거한 후 ammonium sulfate를 포화상태가 될 때까지 첨가하여 유청단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질을 증류수에 용해하여 투석막(Sigma, MW 12,000)에 가한 후 냉장상태에서 투석하여 염을 제거하였다. 투석된 재료를 동결건조하여 미변성 유청단백질 농축물을 제조하였으며 단백질변성도 측정의 미변성유청단백질 대조구로 사용하였다.

2) 유청단백질의 변성도 측정

열처리에 따른 유청단백질 분말의 변성도를 측정하기 위하여 Donovan and Mulvihill (1987)의 방법에 따라 시료(2%, w/v)를 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시키고 가열처리(75, 85, 95 $^{\circ}$ C, 10 min)한 후 pH를 4.5로 조정하여 8000 x g에서 20 분간 원심분리(4 $^{\circ}$ C) 하였다. pH 조정 전 후의 상등액내 존재하는 단백질의 함량의 변화를 변성도(%)로 표현하였다.

3) 가열처리에 따른 가수분해율, 열기성단백질 분획의 변화

가열처리 후 가수분해율의 변화 및 cation exchange chromatography에 의한 분별특성의 변화는 앞서 제시한 방법으로 측정하였다.

라. 조골세포 성장 촉진 활성을 가진 유청단백질 가수분해물 생산 공정 정립

1) 초기시료의 단백질함량 및 변성도에 따른 활성변화

유청단백질 분해물 생산을 위한 초기시료의 형태로써 참여기업인 삼익유가공(주)에서 생산된 유청분말을 증류수에 환원한 후(5%, w/v) 한외여과(ultrafiltration)를 실시하여 단백질 및 유당, 염의 함량이 변화된 시료를 제조하였다. 한외여과는 Amicon ultrafiltration unit(Beverly, MA)을 이용하였으며 분자량 10,000의 membrane을 장착하고 4℃ 저온실에서 실시하여 농축과정에서 일어나는 시료의 변화를 최소화하였으며 최종적으로 초기시료의 2, 3, 4배가 되는 농축시료를 제조하였다.

2) pH와 열처리에 따른 활성 변화

pH와 열처리에 따른 단백질의 변성이 조골세포의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 시료(유청분말, 유청분말 농축액(4×), 유청농축분말(WPC))를 85℃에서 10, 20, 30분간 각각 가열하여 단백질 변성도가 다른 시료를 제조하고 조골세포(MC3T3-E1 osteoblast cell line)의 배양실험에 적용하였다. 또한 초기시료의 pH를 4로 조정 후 원심분리를 실시하여 회수된 상등액을 시료로 이용하여 세포 성장에 미치는 효과를 관찰하였다.

3) 반응표면분석(response surface methodology)에 의한 제조공정의 최적화

실험결과에 의거하여 Flavourzyme을 활성 유청단백질 분해물 생산을 위한 효소로 선정하고, 가수분해 온도 및 반응시간을 독립변수로 설정하여 반응표면 분석의 실험영역을 Table 2와 같이 5개의 수준으로 code화 하였다. 독립변수와 code를 이용하여 중심합성계획(central composite design)에 따라 11개 군의 가수분해 조건을 작성하였으며 가수분해도, 조골세포성장지표(MTT assay), 조골세포분화지표(ALP activity)가 최대로 나타나는 반응표면식(Y)은 다음과 같은 다중회귀식에 적용시켰다.

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_1X_1^2 + \beta_2X_2^2 + \beta_{12}X_{12} + \epsilon$$

Y: response variables, β_0 : intercept, β_1, β_2 : regression coefficient, X_1, X_2 : independent variables, ϵ : random error

Data 분석은 SAS system (Statistical analysis system, ver 6.08)을 이용하였으며 반응 표면분석은 RSREG procedure를, 회귀분석은 REG procedure를 각각 사용하였고, 3차원 반응도는 G3D procedure를 사용하였다.

Table 2. Levels of independent variables for experimental design

X _i	Independent variables	Levels				
		-1.414	-1	0	1	1.414
X ₁	Hydrolysis temperature (°C)	26	30	40	50	54
X ₂	Hydrolysis time (min)	27	45	90	135	154

최종적으로 선정된 최적 가수분해 조건의 확인을 위하여 선정된 조건을 포함한 가수분해 조건의 범위를 변화시키며 가수분해를 실시하여 최적가수분해 조건의 검증을 실시하였다.

4) 용매침전을 이용한 활성 유청단백질 분해물의 대량 정제 조건 설정

에탄올을 이용한 활성 유청단백질 분해물의 효율적 회수방법을 모색하기 위하여 반응표면분석법에서 설정된 최적조건에서 가수분해된 시료를 10-40%의 에탄올을 처리하여 냉장온도에서 1 시간 방치 후 원심분리(8000 × g, 20 min, 4°C)하여 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액에 존재하는 에탄올은 Rotary evaporator를 이용하여 40°C 이하에서 휘발시켰다. 에탄올의 휘발 후 회수된 단백질 함량과 peptide의 함량을 측정하였으며 조골세포의 성장에 미치는 영향을 측정하여 용매침전된 유청단백질 분해물의 활성을 측정하였다.

5) 효소 실험 방법에 따른 조골세포 증식 활성의 변화

최적조건에서 활성 유청단백질 분해물을 생산하고 다음에 제시한 실험 처리 조건의 변화에 따른 조골세포증식 활성의 변화를 측정하였다.

- ① 가수분해 → 동결건조
- ② 가수분해 → 에탄올 처리(30%, v/v, 30분) → 동결건조

- ③ 가수분해 → 효소실활(85℃, 5분) → 에탄올 처리(30%, v/v, 30분) → 동결건조
- ④ 가수분해 → pH 4.0으로 조정(4N, HCl) 후 효소실활(85℃, 5분) → pH 6.5로 조정(4 N, NaOH) → 에탄올 처리(30%, v/v, 30분) → 동결건조

마. 활성 유청단백질 가수분해물의 이화학적 특성

앞서 기술한 반응표면 분석을 통하여 얻어진 활성분획의 최적 제조 조건에서 조골 세포의 활성을 촉진하는 가수분해물을 제조하고 다양한 pH 및 가열처리 조건 (85℃, 15 min)에서 일어나는 이화학적 특성의 변화를 가수분해 전 WPC를 대조구로 하여 측정하였다.

1) 용해도(solubility)

용해도는 Mine(1997)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 실온에서 시료 (1%, w/v)를 pH 3-9의 완충용액(pH 3-5: acetate buffer(100 mM), pH 6-7: sodium phosphate buffer(100 mM), pH 8-9: Tris-HCl buffer(100 mM))에 넣고 동일한 교반 속도에서 30분간 교반한 후 15,000 × g의 조건에서 30분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 얻어진 상등액을 membrane filter (0.45 μm)로 여과한 후 원심분리 전 후의 시료 단백질의 함량 변화를 측정하여 아래의 식으로 용해도를 계산하였다.

용해도(%) = (원심분리 후 시료의 단백질함량 / 원심분리 전 시료의 단백질 함량) x 100
 시료의 단백질 함량은 Lowry 방법(Lowry et al., 1951)을 이용하여 측정하였다.

2) 혼탁도(turbidity)

시료의 혼탁도는 Matsudomi et al. (2004)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 시료를 다양한 농도(2-10 mg/mL)로 10 mM sodium phosphate buffer에 충분히 용해시킨 후 가열 전 후 500 nm에서 흡광도를 측정하여 혼탁도를 표현하였다. 시료의 가열은 밀폐된 유리 vial에서 80℃, 20분간 실시하였으며 가열 전 후 WPC의 혼탁도와 비교 관찰하였다.

3) 점도(viscosity)

시료(25%, w/w)를 앞서 제시한 다양한 pH의 buffer에 용해시킨 후 vacuum desiccator에서 거품을 제거하고 시료의 점도를 측정하였다. 점도는 60 mm dia cone

& plate geometry(angle 2°)를 사용하여 5-200 1/s의 층밀림속도(shear rate) 범위에서 rotational rheometer(AR 2000, TA Instrument사)를 이용하여 측정하였다. 각 시료들의 점조도지수(K)와 유동거동지수(n)등의 정상유동 특성값은 다음과 같이 Power law model로 해석하였다.

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

τ : 전단응력(shear stress, Pa)

$\dot{\gamma}$: 전단속도(shear rate, 1/s)

K: 점조도지수(consistency index, Pa · sⁿ)

n: 유동거동지수(flow behavior index, dimensionless)

4) 겔 조직감 특성(gelling properties)

시료의 겔 형성능력은 TA-XT2 Texture analyzer(Texture Technologies, Scarsdale, NY, USA)를 이용하여 측정하였다. 다양한 pH의 buffer에 용해된 시료(25%, w/w)로부터 거품을 제거하고 Jallatin casing에 넣어 밀봉한 후 80°C의 water bath에서 40 분간 가열하여 겔을 형성하였다. 시료의 가열 후에는 상온에서 30 분간 냉각하였으며 4°C에서 24 시간 저장한 후 절단하여 원통형(Dia. 30 mm x 20 mm)의 시료를 제작하였다. 조직감의 측정 시에는 75 mm의 직경을 가진 압축 probe사이에 놓고 0.5 mm/s의 일정한 속도로 30%의 변형이 일어나도록 2회 압축-복원을 실시하였다. 조직감 특성은 Texture Expert Software를 이용하여 계산하였다.

5) 유화활성(Emulsifying activity index) 및 안정성(Emulsion stability)

시료의 유화능력은 Emulsifying activity index (EAI) 방법(Pearce and Kinsella, 1978)을 일부 변형하여 측정하였다. 시료(1%, w/v)를 다양한 pH의 완충용액에 용해시킨 후 8 mL의 시료와 2 mL의 Corn oil(Sigma, USA)을 혼합하여 PH 91 homogenizer (EYELA, Japan)를 이용하여 18,000 rpm에서 1 분간 유화하여 유화물을 형성하였다. 유화물의 형성 즉시 0.1% SDS 용액으로 적절하게 희석 한 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였으며 다음의 EAI formula를 이용하여 유화능력을 표현하였다.

$$EAI (m^2/g) = 2T / \phi c$$

T: $2.303 \times OD_{500} \times \text{dilution factor}/0.01$ m light path

c: concentration of protein

ϕ : oil phase volume

유화안정성은 Moro et al. (2001)의 방법을 이용하였다. 유화물의 형성 즉시 유화활성을 측정하고(EAI₀) 80℃에서 30 분간 열처리 후 실온에서 24시간 방치하여 유화활성을 측정(EAI₈₀)하였으며 다음의 식으로 유화안정성을 계산하였다.

$$\Delta EAI = 100(EAI_0 - EAI_{80}) / EAI_0$$

바. 활성 유청단백질 분해물의 관능적 특성 평가

시료는 아미노산 음료를 시중에서 구입하여 대조구로 사용하였으며, 대조구 아미노산 음료에 활성 유청단백질 분해물을 첨가하여 음료 내 활성분해물의 농도가 0.5% 및 1%(v/v)가 되도록 시료를 제조하였다. 세 가지 시료는 3 단위 임의의 숫자를 부여하여 표시하였으며 투명한 유리컵에 50 mL씩 담아 동시에 제시하였다. 검사항목은 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 외관 기호도, 맛 기호도, 전반적 기호도, 단맛, 신맛, 쓴맛, 감칠맛 강도를 9점 척도로 평가하였다. 기호도의 경우 척도의 양끝을 매우 싫다(1)에서 매우 좋다(9)로 표시하였으며 강도 측정의 경우 매우 약함(1)에서 매우 강함(9)으로 지정하였다. 제시된 시료의 온도는 10℃를 유지하도록 하였으며 한 가지 시료의 평가가 끝날 때마다 물로 입을 헹구고 다음 시료를 평가하도록 하였다, 패널은 국민대학교의 학부 및 대학원생 52명(18-30세, 남 18, 여 34명)을 대상으로 하였으며, 펩타이드 음료임을 알려주고 평가를 실시하였다.

사. 저장 조건별 시제품의 활성 평가

활성 유청단백질 분해물 및 협동기관에서 생산한 발효분해물 시제품을 진공포장기(VAC-STAR, Switzerland)로 포장한 후 온도(4, 20, 30℃)와 저장기간(4 주)에 따른 조골세포 성장 촉진 효과의 변화를 MTT assay로 측정하였다. 성장 촉진 효과의 실험 시에는 조골세포를 4×10³ cells/well의 양으로 분주하였으며 시료를 배지 내에 각각 1 mg/mL 수준으로 첨가하였다.

아. 통계분석

모든 분석 실험은 3회 이상 반복 측정하였으며, 결과의 통계분석은 Minitab Ver. 13.1(Minitab inc., USA)을 이용하였다. 처리구간의 유의적 차이(p<0.05)는 일원분산분석(one-way ANOVA)와 Tukey의 다중비교 검정법을 이용하였다.

제품 : 펩타이드 음료

이름 :

성별 : 남 / 여

연령 :

외관 기호도 (색상, 탁한 정도, 침전물 등등)

매우싫다 매우좋다

맛 기호도 (색상, 탁한 정도, 침전물 등등)

매우싫다 매우좋다

전반적 기호도 (외관, 맛, 냄새, 기타)

매우싫다 매우좋다

단맛 (강도)

매우약하다 적당하다 매우강하다

신맛 (강도)

매우약하다 적당하다 매우강하다

쓴맛 (강도)

매우약하다 적당하다 매우강하다

짠맛 (강도)

매우약하다 적당하다 매우강하다

감칠맛 (강도)

매우약하다 적당하다 매우강하다

얼마나 자주 아미노산(스포츠) 음료를 드십니까? ()회/월

Fig 1. Ballot for sensory evaluation of whey protein hydrolysate product.

2. 연구개발수행내용 및 결과

가. 우유단백질의 효소적 가수분해

1) 단백질 분해효소의 종류에 따른 유청단백질의 가수분해 양상

재료 및 방법에서 기술한 방법에 따라 다양한 효소를 이용하여 WPC의 가수분해를 실시하고 분해 양상을 비교하였다. 최초 효소의 투입량은 효소의 제조사(Novo-Nordisk)에서 권장하는 충분한 단백질 분해(extensive hydrolysis)를 얻을 수 있는 수준(5 - 10%, 기질단백질농도기준)에 의하여 결정하였다.

가수분해도를 측정한 결과 fungal endoprotease와 exoprotease 활성을 함께 함유한 Flavourzyme에서 가장 높은 가수분해율 (37%, 180분)을 얻을 수 있었으며 180분 이상의 가수분해를 실시한 경우에는 효소투입량의 증가에 따른 가수분해율의 유의적 증가가 관찰되지 않았다. Bacillus protease complex로 구성된 Protamex를 10% 첨가하여 가수분해를 실시한 경우에는 180분 이상 가수분해 시 기질단백질의 20% 이상을 분해 시킬 수 있었다. 다른 단백질분해효소를 사용한 경우에는 기질 농도의 10%를 투여한 경우에도 기질의 가수분해도는 20%를 넘지 않았다.

Takada et al.(1997b)은 유청단백질내에 존재하는 골밀도 강화 물질이 위의 소화효소 pepsin 또는 pepsin/pancreatin에 의해 분해 되지 않는 물질이라는 점을 보고하였다. 이 연구 결과를 근거로 하여 Fig. 2의 실험 결과에서 pepsin의 30분 가수분해 조건과 유사한 가수분해율을 나타내는 시점을 일차적인 가수분해 조건으로 결정하였으며 과도한 가수분해 조건에서 생성된 가수분해물의 변화를 관찰하기 위하여 Flavourzyme의 경우에는 최대가수분해에 도달하는 시점을 가수분해조건으로 설정하고 Table 3에서 제시된 조건으로 실험을 지속적으로 진행하였다.

다양한 효소에 의하여 가수분해된 WPC 가수분해물의 분자량 분포를 size exclusion chromatography와 SDS-PAGE를 이용하여 조사하였다. 가수분해된 유청단백질은 사용한 효소의 종류에 따라 다른 분자량 분포를 나타내었다(Fig. 3). 가장 높은 가수분해도를 나타낸 Flavourzyme은 분자량이 약 5,000 dalton에 해당하는 저분자량의 펩타이드의 형성이 뚜렷하게 관찰되었으나 전기영동 결과 β -Lactoglobulin의 일부는 분해 되지 않고 남아 있었다.

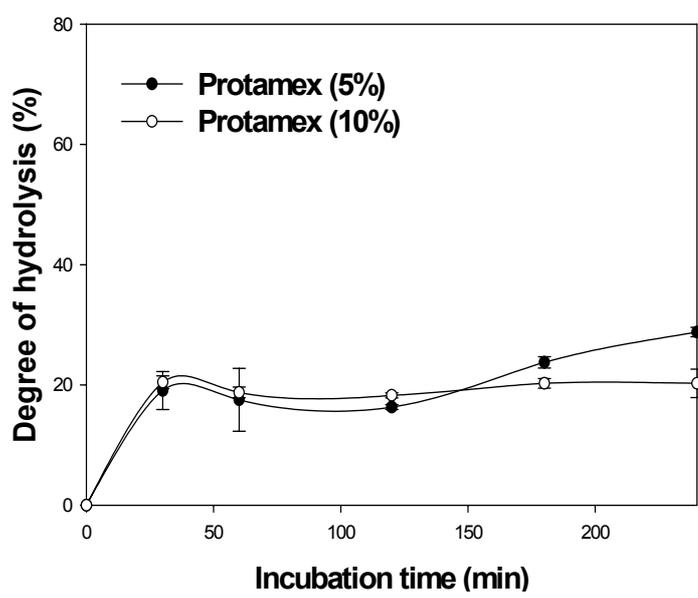
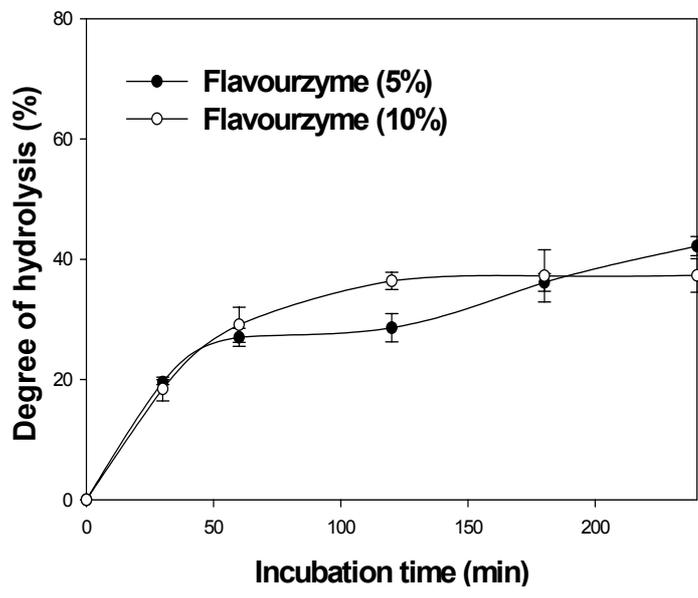


Fig. 2. Hydrolysis of whey proteins by various proteases.

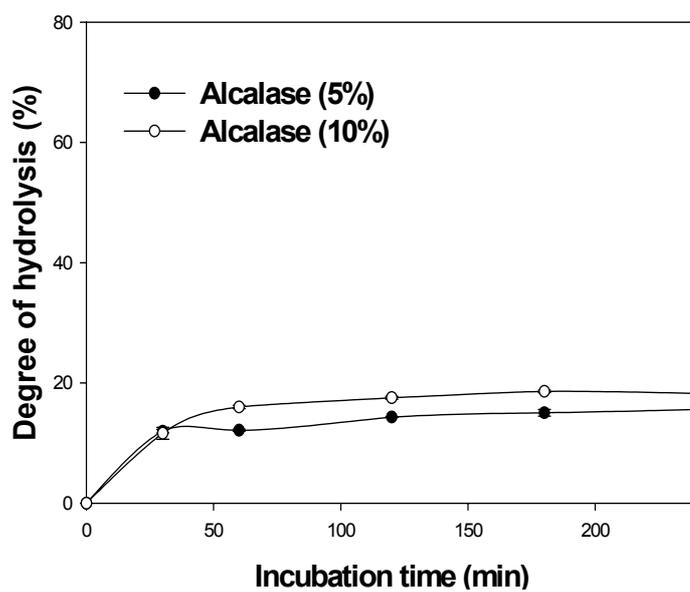
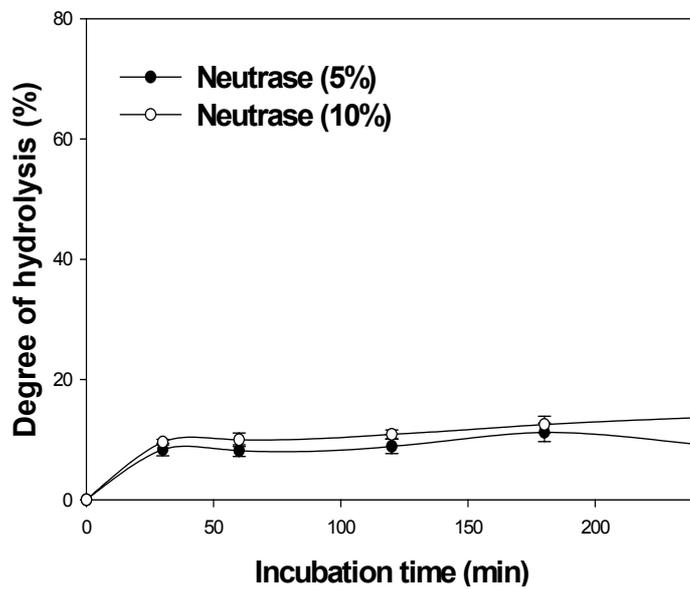


Fig. 2-continued. Hydrolysis of whey proteins by various proteases.

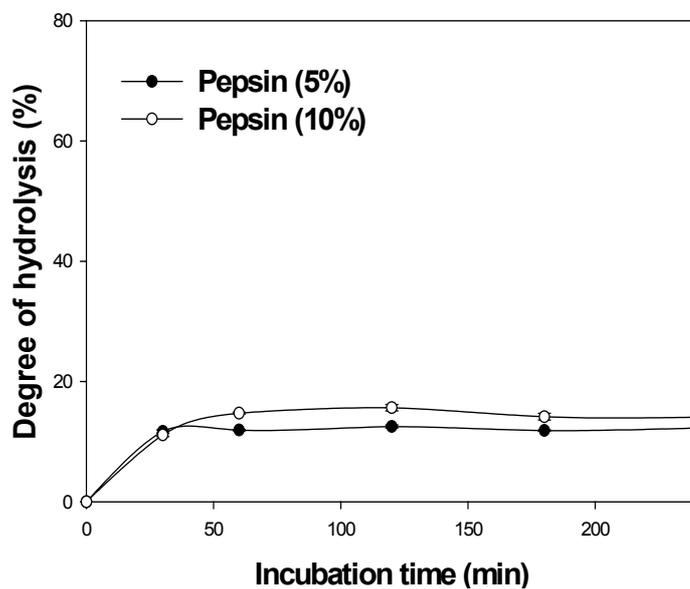


Fig. 2-continued. Hydrolysis of whey proteins by various proteases.

Table 3. Determined hydrolysis conditions based on the degree of hydrolysis

Protease	Concentration of enzyme (%) ^a	Incubation time (min)	pH	Temperature (°C)	DH ^b (%)
Flavourzyme	10	120	Not-Adj. ^c	50	36
Protamex	5	60	Not-Adj.	45	18
Neutrase 0.8 L	10	60	Not-Adj.	50	10
Alcalase 2.4 L	5	60	Not-Adj.	60	12
Pepsin	5	30	4	37	12

^a: based on protein content, ^b: degree of hydrolysis ^c: not adjusted.

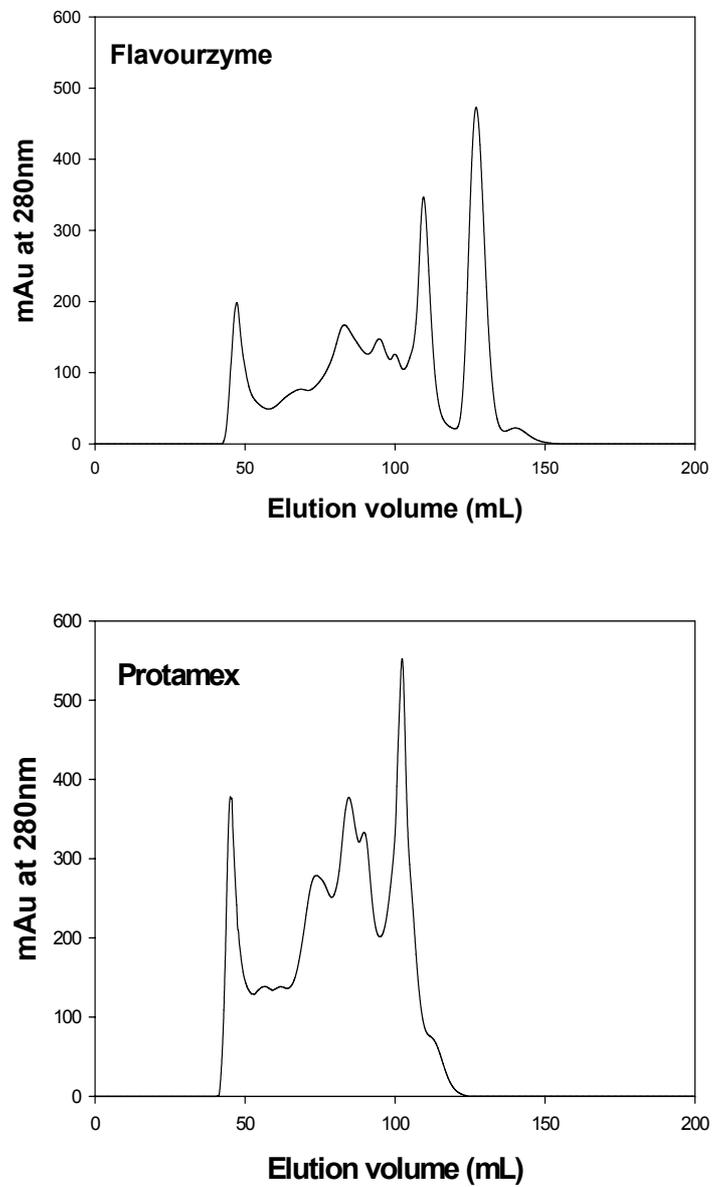


Fig. 3. Fractionation of whey protein hydrolysates using Sephacryl S-100 column chromatography. The conditions of hydrolysis were indicated in Table 3.

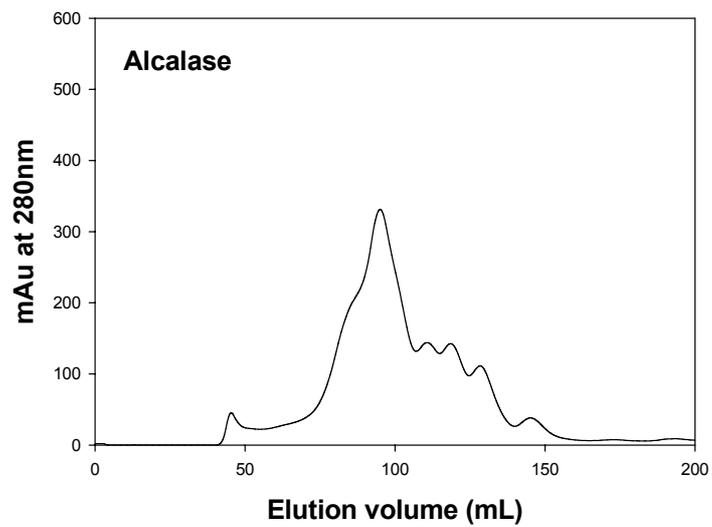
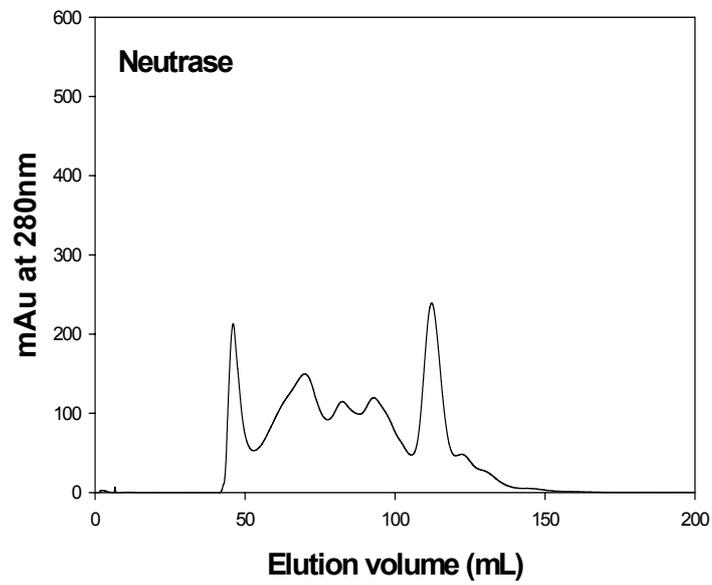


Fig. 3-continued. Fractionation of whey protein hydrolysates using Sephacryl S-100 column chromatography. The conditions of hydrolysis were indicated in Table 3.

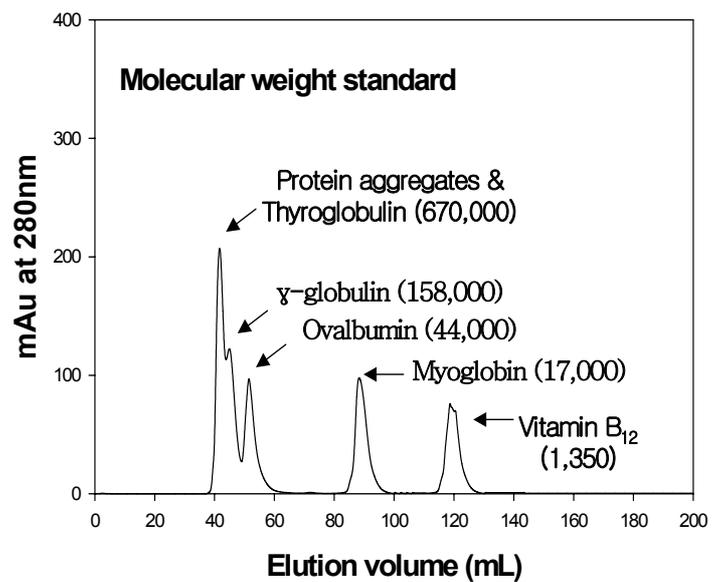
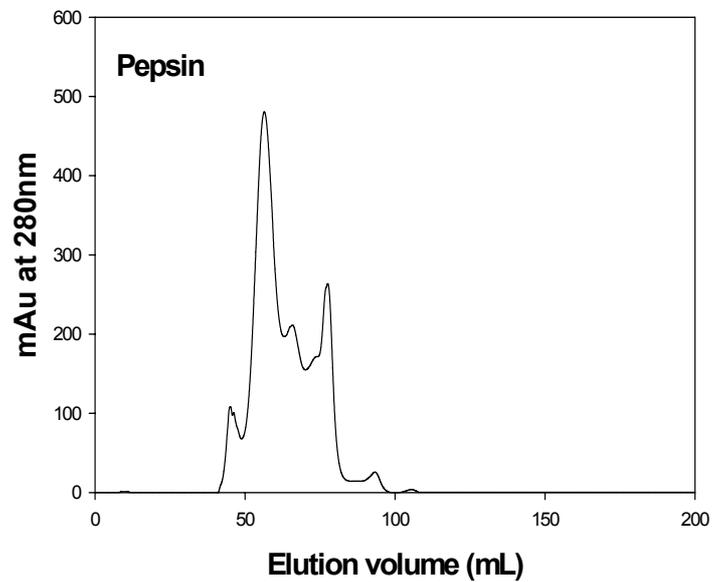


Fig. 3-continued. Fractionation of whey protein hydrolysates using Sephacryl S-100 column chromatography. The conditions of hydrolysis were indicated in Table 3.

Pepsin을 이용한 가수분해에서는 chromatography 용출 결과 저분자량의 단백질분획의 형성이 관찰되지 않았으며 β -Lactoglobulin의 대부분이 분해 되지 않는 것으로 나타났다. Protamex에 의하여 제조된 가수분해물은 pepsin에 의하여 제조된 가수분해물과 매우 유사한 단백질 분자량 pattern을 보였으나 대부분의 β -Lactoglobulin은 효소처리에 의해 분해 되는 것으로 나타났다.

Pepsin의 가수분해 시 저분자량의 단백질 분획이 나타나지 않는 이유는 효소 처리에 의한 가수 분해 후 효소의 실활을 위한 가열 처리 과정(85°C, 5 min)에서 제한적인 가수분해가 일어난 단백질 간에 응집체가 형성하기 때문인 것으로 판단되었으며 denaturing agent(SDS) 와 환원제(β -mercaptoetanol)를 처리한 전기영동의 결과에서 가수분해 전 관찰되지 않았던 저분자의 가수분해 된 단백질 분획이 확인되었다. 가수분해된 유청단백질의 응집체 형성 기작은 확실히 밝혀지지 않았으나 가수분해된 단백질의 unfolding으로 소수성영역이 노출되면 다른 단백질의 소수성 잔기 사이에 소수성 결합이 가능할 것으로 생각되며 특히 trypsin 처리에 의한 β -Lactoglobulin의 가수분해물은 응집체 형성에 관여하는 것으로 보고 되어 있다(Groleau, 2003).

Alcalase는 *B. licheniformis*에서 유래된 단백질 분해효소로서 Glu-X, Asp-X로 연결된 펩타이드 bond에 강한 분해활성을 가지고 있다. Alcalase의 처리 시에는 측정된 가수분해도는 pepsin과 유사하였으나 다른 단백질 분해 효소에 비하여 10,000 - 1,600 dalton의 WPC 분해물 생산이 많은 것으로 나타났으며 이 같은 결과는 Otte et al.(1997)이 보고한 결과와 동일한 경향을 나타내었다. Neutrase는 alkaline protease의 활성을 갖지 않는 *B. subtilis* 유래의 단백질 효소로서 Alcalase와 유사한 분해물의 분포를 나타내었으나 10,000 dalton 이하의 저분자량의 peptide의 구성비율은 Alcalase에 의한 가수분해물보다 적은 것으로 나타났으며 분해 되지 않고 남아있는 β -Lactoglobulin의 band가 전기영동 결과 관찰되었다(Fig. 4).

2) 단백질 분해효소의 종류에 따른 casein의 가수분해 양상

현재까지 casein 혹은 casein 분해물로부터 분리된 골밀도 강화 단백질 혹은 단백질 분획은 보고된 바 없으나 casein 가수분해물의 골밀도 강화 능력을 평가하기 위하여 WPC의 가수분해에 적용한 조건을 이용하여 sodium caseinate의 가수분해를 실시하였다(Fig. 5).

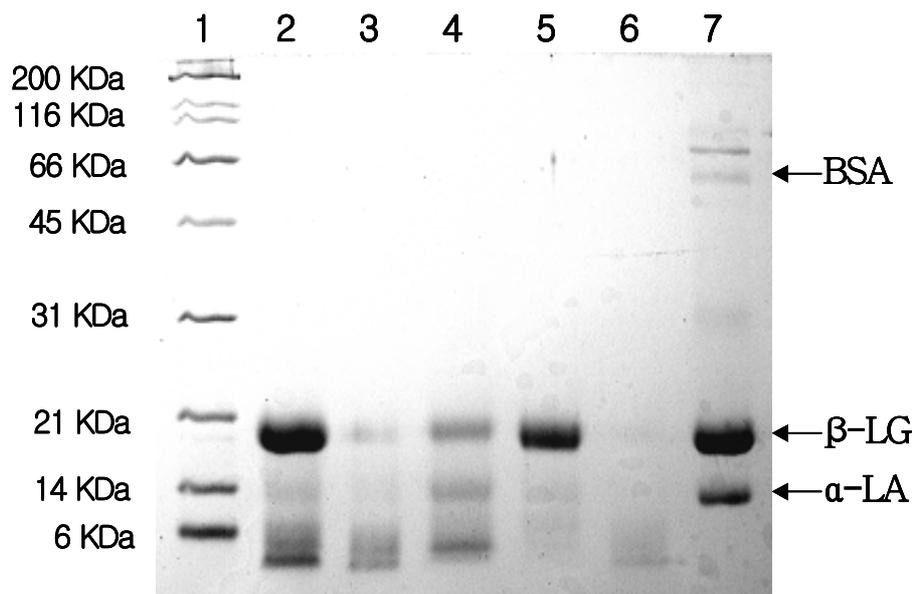


Fig. 4. Electrophoregram of various whey protein hydrolysates by SDS-PAGE.

Lane 1: Molecular wt. marker, Lane 2: Pepsin-hydrolysate, Lane 3: Protamex-hydrolysate, Lane 4: Neutrase-hydrolysate, Lane 5: Flavourzyme-hydrolysate, Lane 6: Alcalase-hydrolysate, Lane 7: WPC.

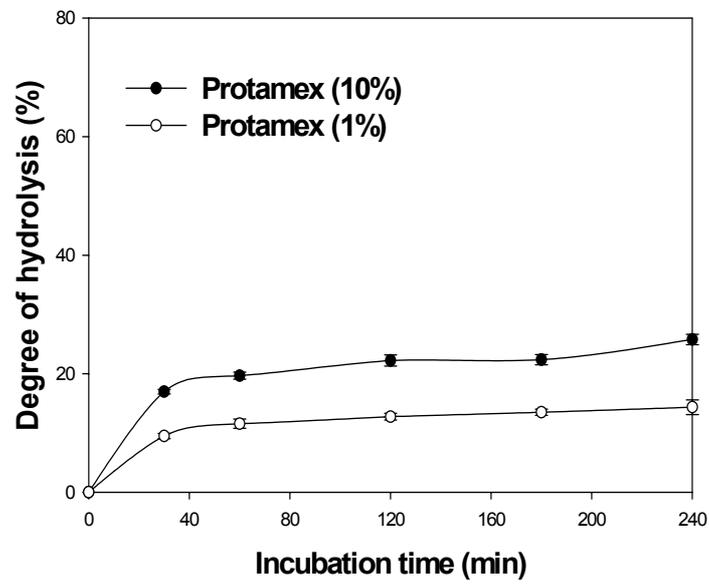
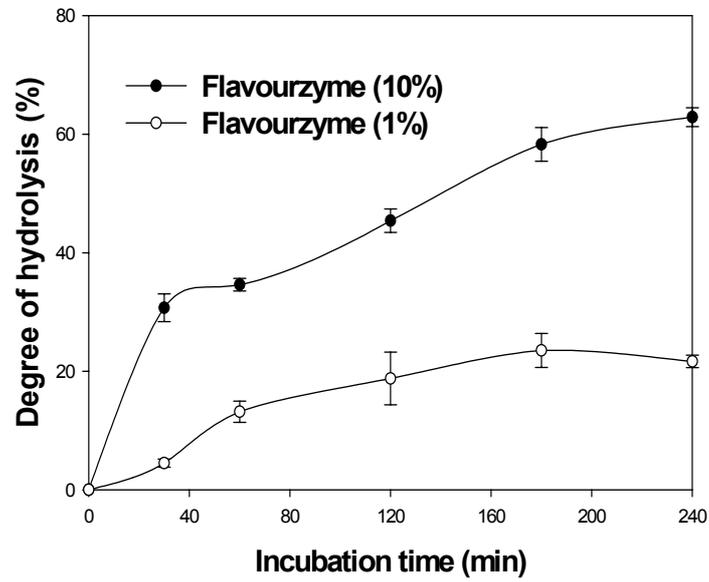


Fig. 5. Hydrolysis of caseins by various proteases.

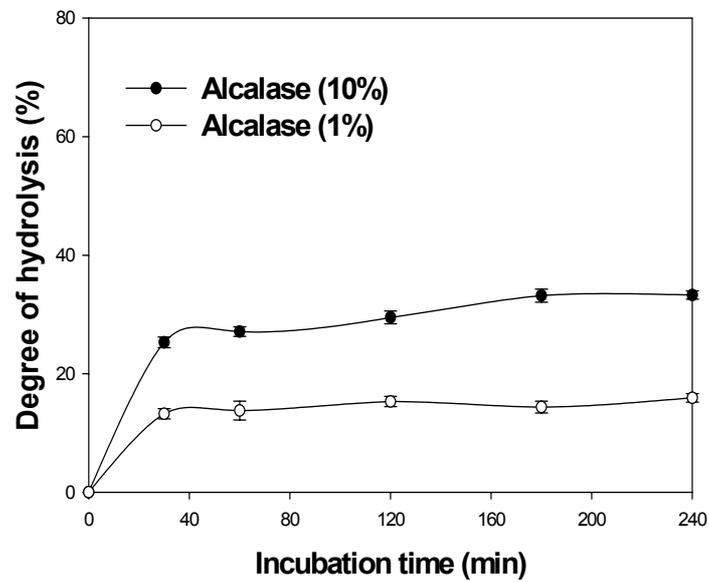
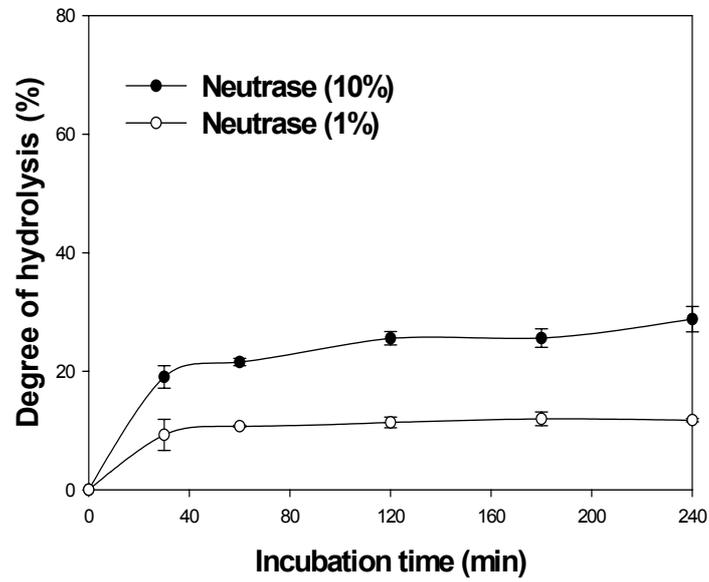


Fig. 5-continued. Hydrolysis of caseins by various proteases.

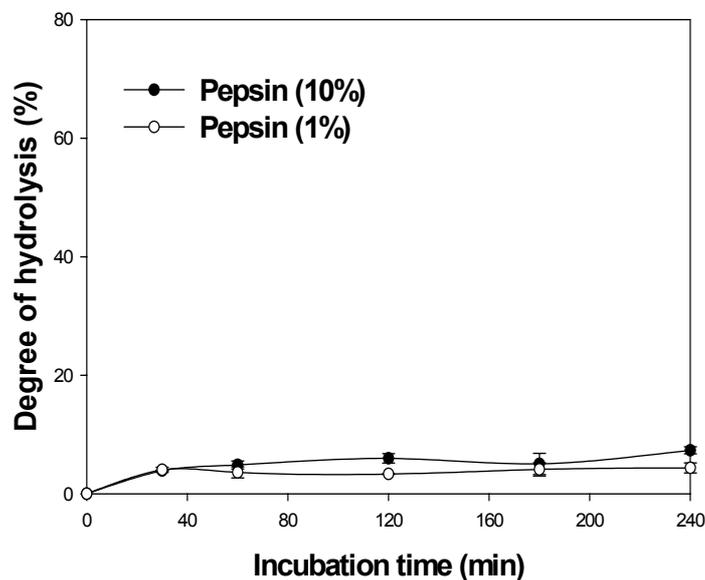


Fig. 5-continued. Hydrolysis of caseins by various proteases.

전반적으로 카제인은 WPC와 동일한 조건에서 가수분해를 실시한 경우 보다 높은 가수분해도를 나타내었으며 10%의 Flavourzyme으로 240 분간 가수분해 시 63% 정도의 펩타이드가 분해되었다.

앞서 제시된 가수분해 조건에서 유청단백질과 유사한 가수분해 수준(10% 내외)을 얻기 위해서는 기질단백질의 1% 수준의 효소 첨가가 필요하였으며 이 때 sodium casein의 가수분해도는 11-18%(pepsin의 경우 5%)로 나타났다.

카제인 가수분해물의 전기영동 결과 10%의 효소를 첨가 시에는 pepsin을 제외한 모든 효소처리 가수분해물에서 단백질의 band가 관찰되지 않았다(data 미제시). 이는 가수분해 된 저분자 펩타이드 혼합물이 넓게 혼재되어 있고 그 농도가 매우 낮아 본 실험에서 사용한 Commassie brilliant blue의 염색방법으로는 확인할 수 없기 때문인 것으로 생각된다.

한편 효소의 농도를 1%로 조절하여 가수분해를 실시하고 가수분해물의 단백

질분포를 SDS-PAGE로 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. Pepsin 처리를 제외한 나머지의 효소처리 시에는 α_s -, β -, κ -casein이 모두 저분자량의 peptide로 분해 되었으며 분자량이 6,000 dalton 이하의 다양한 분자량의 peptide band들이 뚜렷이 관찰되었다. Pepsin의 처리 시에는 β -casein의 대부분과 α_s -casein의 일부가 분해 되지 않은 상태로 존재하였다.

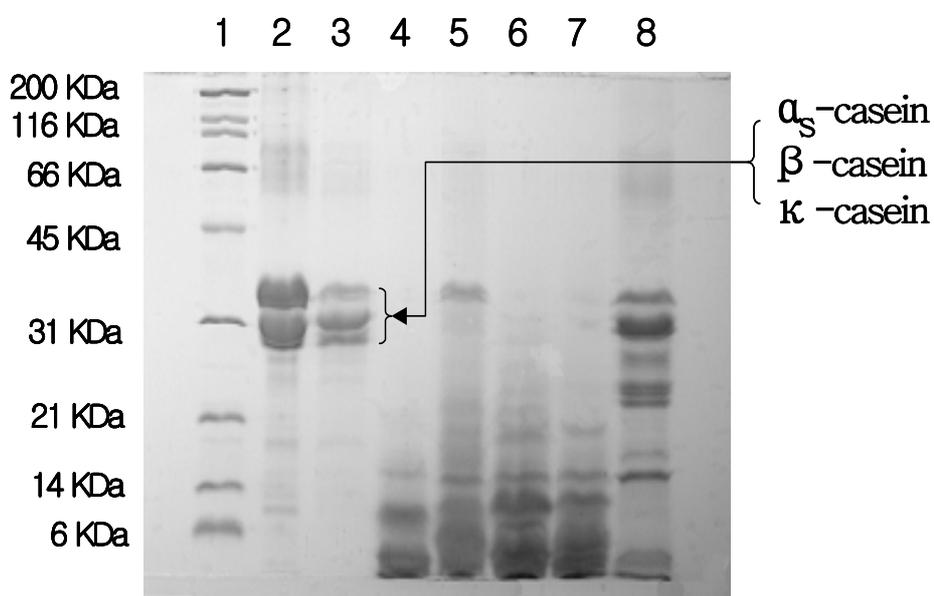


Fig. 6. Electrophoregram of casein hydrolysates by SDS-PAGE.

Lane 1: Molecular wt. marker, Lane 2: Sodium caseinate, Lane 3: Purified α_s -, β - and κ -casein Lane 4: Alcalase-hydrolysate, Lane 5: Flavourzyme-hydrolysate, Lane 6: Neutrase-hydrolysate, Lane 7: Protamex-hydrolysate, Lane 8: Pepsin-hydrolysate.

나. 유청단백질 분해물의 분리 정제

1) MBP(milk basic protein)의 제조과정 중 회수된 유청단백질의 변화 양상

Yamamura et al.(1999)은 골밀도 강화 기능성 단백질인 MBP는 WPC 용액(5%, w/v)의 pH 조절한 후(pH 4) 열처리(80℃, 10분)하여 얻어진 상등액에 ethanol(30%, v/v)을 첨가하여 침전하는 단백질을 제거하고 cation exchange chromatography에 의하여 회수된 열기성 단백질 분획이라고 보고하였다. 본 연구에서는 보고된 MBP의 제조 방법과 동일한 방법으로 시료를 처리하였을 때 회수되는 단백질을 조사하고자 다음의 실험을 실시하였다.

가) pH, 열처리 및 에탄올 침전 과정에서 일어나는 유청단백질의 함량 변화

유청단백질(w/v)을 다양한 pH 조건에서 용해시킨 후 열처리(80℃, 10분) 및 ethanol(30%, v/v) 침전과정에서 나타나는 단백질 함량의 변화를 조사한 결과는 Fig. 7 및 Table 4와 같다.

용액의 pH를 낮춰 pH 4.5 혹은 4.0으로 조정 한 경우 전체 유청단백질 중 약 20%가 침전하였으며 가열 처리 과정 후에는 pH 4.0에서는 약 45%, pH가 4.5인 경우에는 전체 유청단백질 중 24%가 용해된 형태로 존재하였다. 따라서 전 처리과정 중 산성 pH와 열처리의 조합은 일차적으로 열과 산에 안정한 단백질을 선별하는데 효율적인 방법으로 판단된다. 그러나 실험결과를 근거로 할 때 초기 시료의 pH 조정이 4.5일 경우 pH 4.0인 경우보다 보다 산과 열에 불안정한 단백질을 제거하는데 효과적인 것으로 나타났다.

전 처리 조건에서 회수된 시료에 ethanol을 첨가한 경우에는 pH 4.0 및 4.5에서 최종적으로 18%, 13%의 시료가 회수되었다. 가열처리 전 시료의 pH가 높은 경우 가열처리 및 ethanol 처리 후 회수되는 유청단백질의 양은 증가하였으며 시료의 pH가 7.0인 경우 전체단백질의 77% 가량이 ethanol 처리 후에도 수용액상에 존재하였다. 가열처리온도가 전 처리 과정에 미치는 영향을 조사하기 위하여 75, 85, 95℃에서 열처리를 실시하고 회수된 단백질 양의 변화를 조사한 결과는 Fig. 8과 같다. 가열처리 온도가 75와 85℃ 사이에서는 용해상으로 존재하는 단백질은 유의적으로 감소하였으나 95℃로 가열 시에는 85℃로 가열한 경우와 비교할 때 단백질 함량은 큰 변화를 나타내지 않았다.

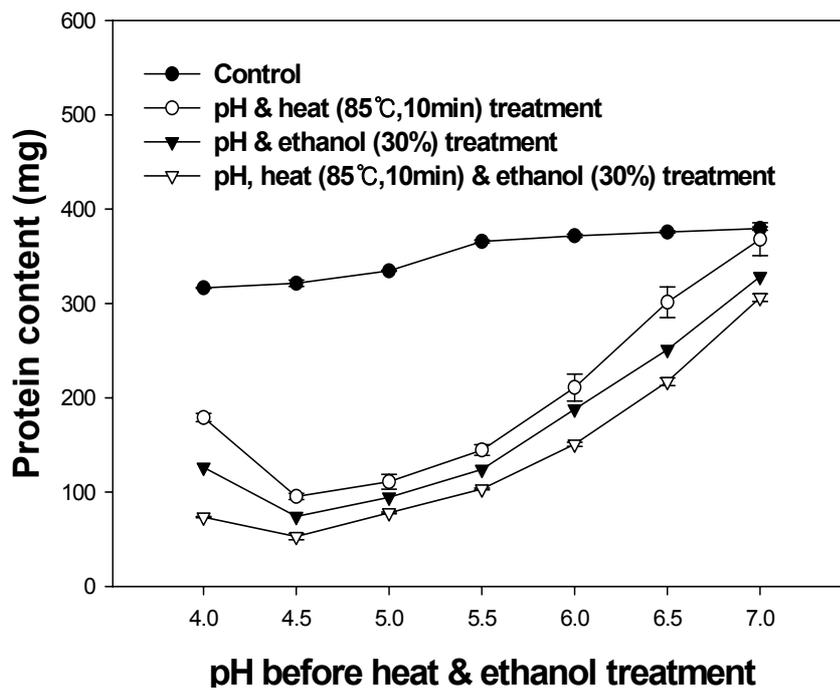


Fig. 7. Changes in soluble protein content of whey proteins during pH adjustment, heating and ethanol precipitation.

Table 4. Recovered soluble whey protein content (%) during the pH adjustment, heating and ethanol precipitation.

Protein content (%) remained in the sample after treatment							
Treatments	pH						
	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
pH adjustment	79.1	80.4	83.7	91.5	92.9	93.9	94.9
pH adjustment + heating (85°C, 10 min)	44.8	23.8	27.8	36.1	52.7	75.3	92.0
pH adjustment + heating + ethanol (30%)	18.4	13.2	19.5	25.8	37.7	54.3	76.5

Protein content remained in the sample was expressed as % of initial protein content.

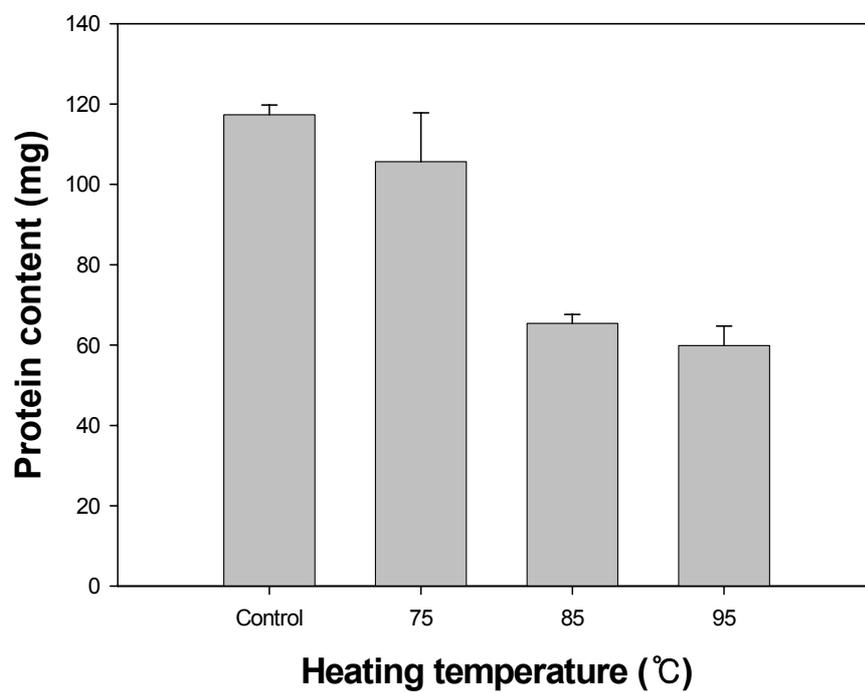


Fig. 8. Effect of heating temperature on recovered soluble whey protein content.

시료의 pH 및 가열 처리 후 정제 과정으로 사용한 ethanol의 농도가 회수된 유청단백질의 함량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 9와 같다. 처리된 ethanol의 농도가 30%에 도달하기 까지는 회수된 유청단백질의 양은 pH 조정 전(6.5)이나 pH를 4.0으로 조정 후 첨가한 모든 경우에서 감소하는 경향을 나타냈으나 30% 보다 더 높은 농도의 ethanol을 처리한 경우에는 실증적인 변화가 나타나지 않음으로써 전 처리 과정에서 사용한 용매(ethanol)의 농도가 30%가 적당한 것으로 판단된다.

나) pH, 열처리 및 에탄올 침전 과정에서 일어나는 유청단백질 profile의 변화

전반적인 전처리 과정 중 회수되는 단백질의 profile을 확인하기 위하여 각 단계별로 회수된 시료의 SDS-PAGE를 실시하였다(Fig. 10). 시료의 pH를 4.0으로 조정하고 열처리를 실시한 경우(Lane 4) 전기영동상에서 bovine serum albumin의 band가 관찰되지 않았으며 α -Lactalbumin band의 강도도 감소하였다. 열처리된 시료에 30%의 ethanol 처리를 실시한 후에는 α -Lactalbumin의 band도 사라졌으나 시료 중에는 상당량의 β -Lactoglobulin이 포함되어 있는 것으로 나타났다. 전기영동상의 결과로는 β -Lactoglobulin 이외에 뚜렷한 미량단백질의 존재여부는 확인되지 않았다.

2) Cation exchange chromatography를 이용한 MBP 및 효소분해물의 분별

전술한 MBP 제조 과정에서 회수된 유청단백질로부터 염기성 단백질 분획을 분리하기 위하여 SP-sepharose resin을 이용하여 Yamamura et al. (1999)이 제시한 조건으로 cation exchange chromatography를 실시한 결과는 Fig. 11과 같다. 회수된 시료를 주입 후 용출 buffer의 염의 농도를 직선적으로 증가시키며(0-1 M) 용출시킨 결과 주입된 시료의 대부분은 용출 buffer내 염의 농도를 상승시키기 전 용출되었으며 이 같은 결과는 시료 내 존재하는 단백질이 양이온교환수지와 결합하지 못하기 때문인 것으로 생각된다. 실제적으로 전 처리 후 전기영동 사진(Fig. 10)에서 나타난 바와 같이 resin과 결합하지 못한 상당량의 단백질은 β -Lactoglobulin인 것으로 판단된다. 용출 buffer 내 염의 농도가 약 0.6 M에 도달할 때 단백질로 추정할 수 있는 미약한 peak의 흔적이 관찰되었으나 Yamamura et al.(1999)이 보고한 염기성분획의 농도보다는 훨씬 낮은 농도로 존재하였다.

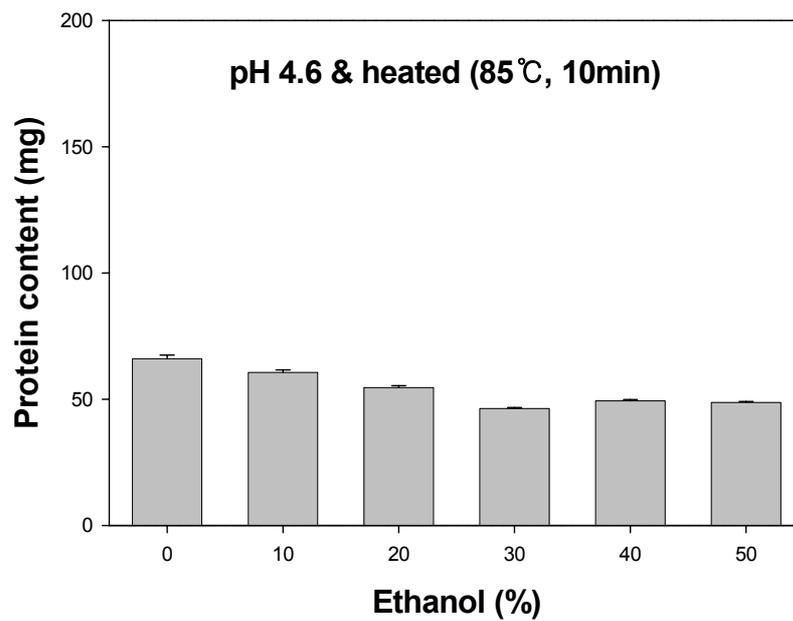
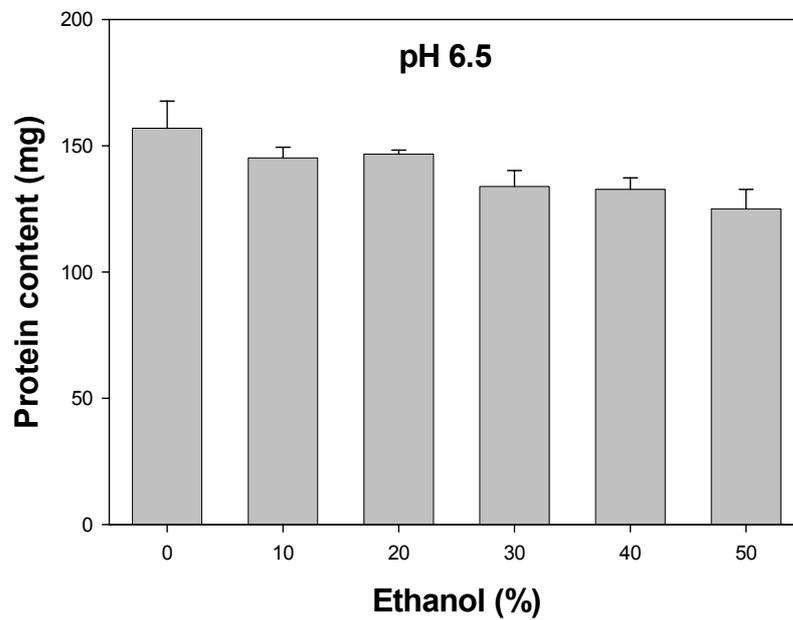


Fig. 9. Effect of ethanol concentration on recovered soluble whey protein content.

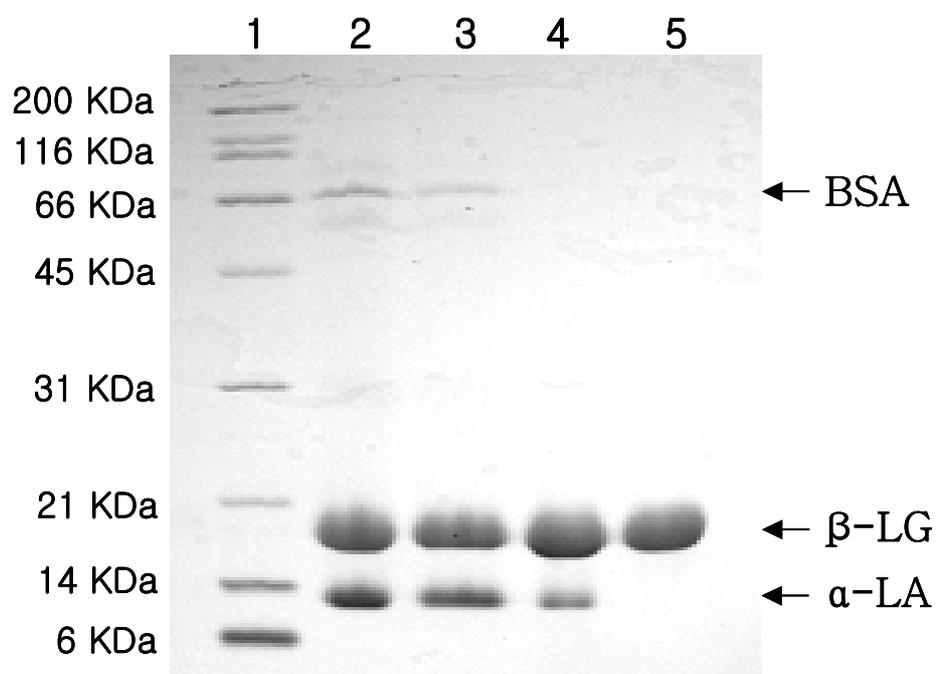


Fig. 10. Changes in protein profile of whey proteins during pH adjustment, heating and ethanol precipitation.

Lane 1: Molecular weight marker, Lane 2: WPC, Lane 3: pH adjusted WPC(pH 4.0) Lane 4: pH adjusted and heated (85°C, 10min) WPC Lane 5: pH adjusted, heated and ethanol(30%) treated WPC.

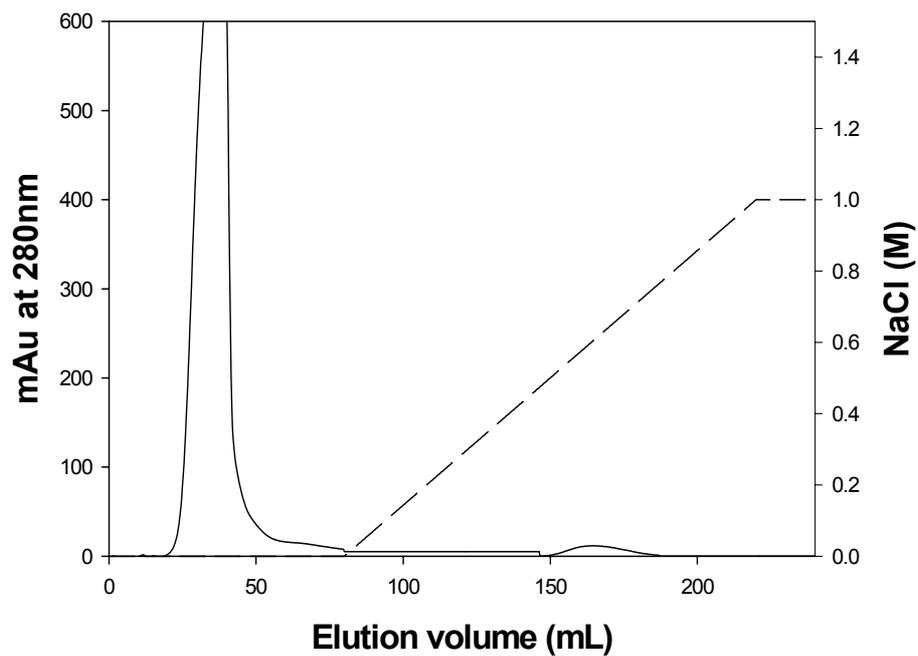


Fig. 11. Separation of basic whey proteins from the pretreated WPC using cation exchange chromatography.

한편, Table 3에 제시된 조건으로 제조된 WPC 효소분해물을 동일한 조건에서 cation exchange chromatography를 이용하여 분별한 결과는 Fig. 12와 같다. 효소분해물에서는 처리한 효소의 종류에 따라 분별된 염기성 분획에는 차이가 나타났으나 MBP 제조를 위한 전처리 과정에서 관찰되지 않았던 높은 농도의 염기성 단백질 분획이 관찰되었다.

Flavourzyme에 의한 WPC분해물은 용출 buffer의 염 농도가 0.6 - 1.0 M에 도달할 때 까지 넓은 단백질 분획이 나타났지만 뚜렷한 peak fraction은 관찰되지 않았으며 이 같은 결과는 과도한 가수분해도와 관련이 있을 것으로 추측된다. Neutralse 분해물에서는 보다 낮은 염농도(약 0.3 M)에서 용출되는 낮은 농도의 peak fraction이 관찰되었다. Alcalse와 Protamex에 의한 분해물은 공통적으로 0.6 M의 염농도에서 뚜렷한 단일 peak fraction으로 분리되는 매우 유사한 elution pattern을 나타냈으며 이는 Yamamura et al.(1999)이 보고한 MBP의 cation exchange chromatography에 의한 분별 특성과 유사하였다.

Pepsin에 의한 분해물은 0.4 M과 0.6M의 염농도에서 용출되는 두개의 염기성 단백질 분획으로 구분되었으며 각 분획의 농도는 다른 단백질 분해물에 비하여 상대적으로 높았다. 시료에 ethanol을 최종농도가 30% 되도록 첨가한 후 상등액으로 회수되는 단백질을 이용하여 cation exchange chromatography로 시료를 분리한 결과 Flavourzyme 분해물의 경우에만 peak fraction의 감소가 나타났으며 나머지 시료는 모두 ethanol 처리 전과 유의적인 차이를 보이지 않았다(data 제시 생략). 따라서 가수분해물 중 염기성 단백질 분획은 30%의 용매를 첨가한 경우 안정성을 잃지 않는 것으로 판단된다.

우유 유청에 존재하는 단백질 중 cation exchange에 의하여 분리되는 단백질은 많지 않으며 사용하는 수지의 특성에 따라 일부 차이는 있으나 용출 buffer의 염의 농도가 0.3 M에서는 lactoperoxidase, 일부 lactoglobulin과 immunoglobulin G 가 용출되며 1 M의 고농도에서는 lactoferrin이 용출되는 것으로 보고 되어 있다(Hahn, 1998). 현재까지 용출 buffer의 염의 농도가 0.6 M에서 용출되는 단백질은 MBP이외에 보고된 바 없다.

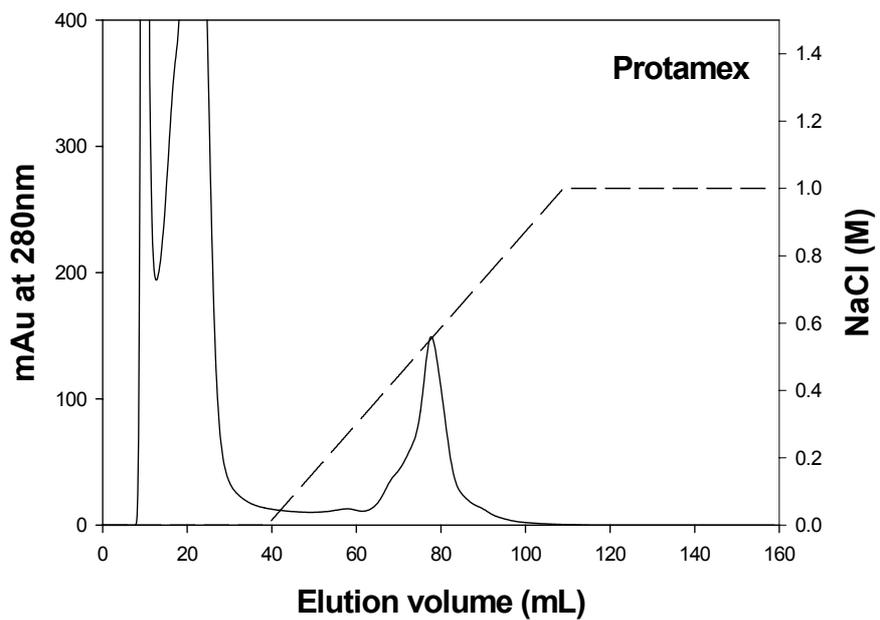
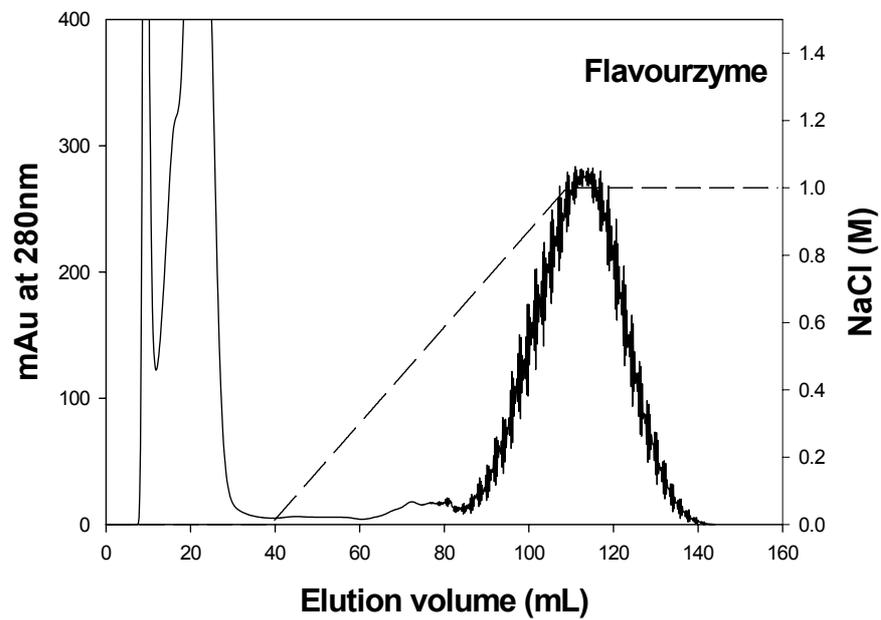


Fig. 12. Separation of whey protein hydrolysates using cation exchange chromatography.

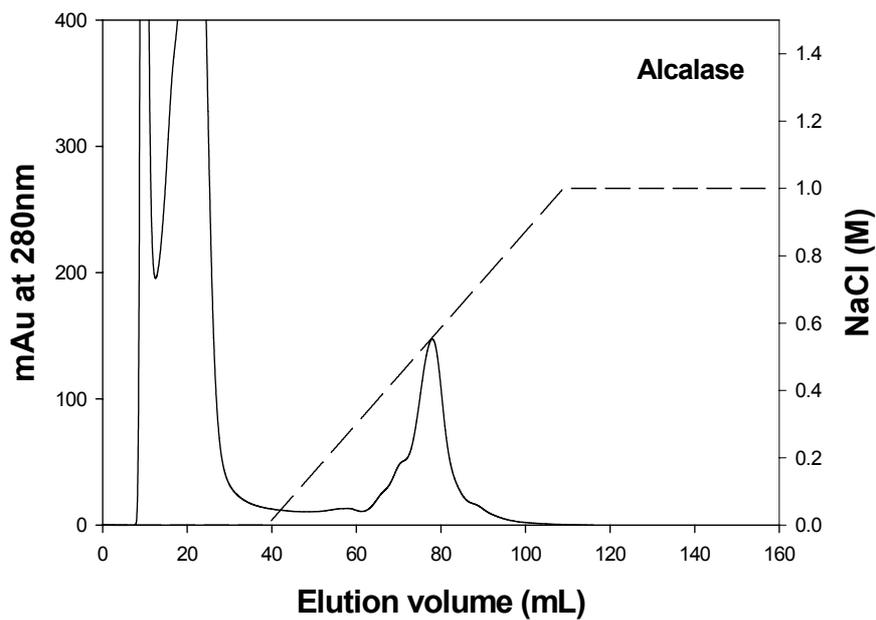
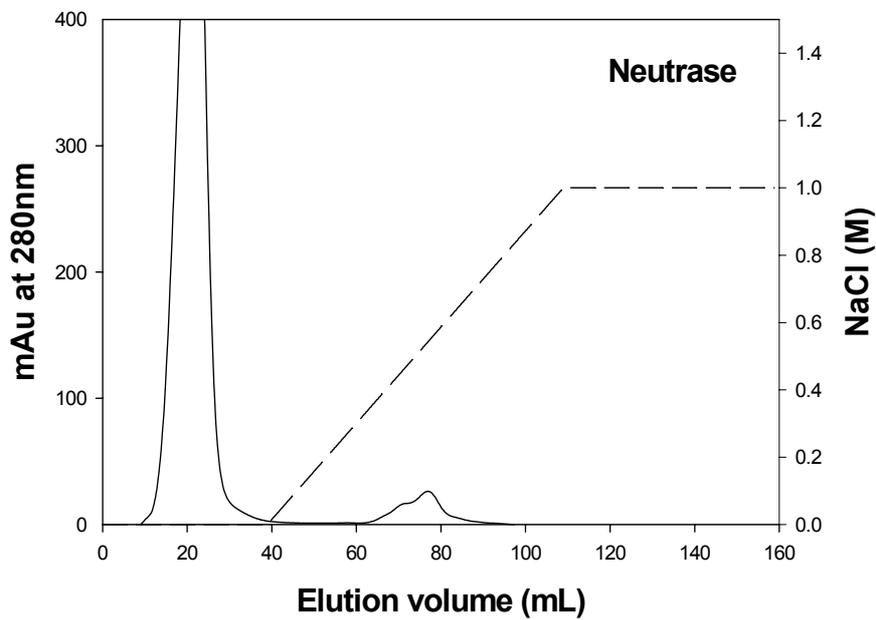


Fig. 12-continued. Separation of whey protein hydrolysates using cation exchange chromatography.

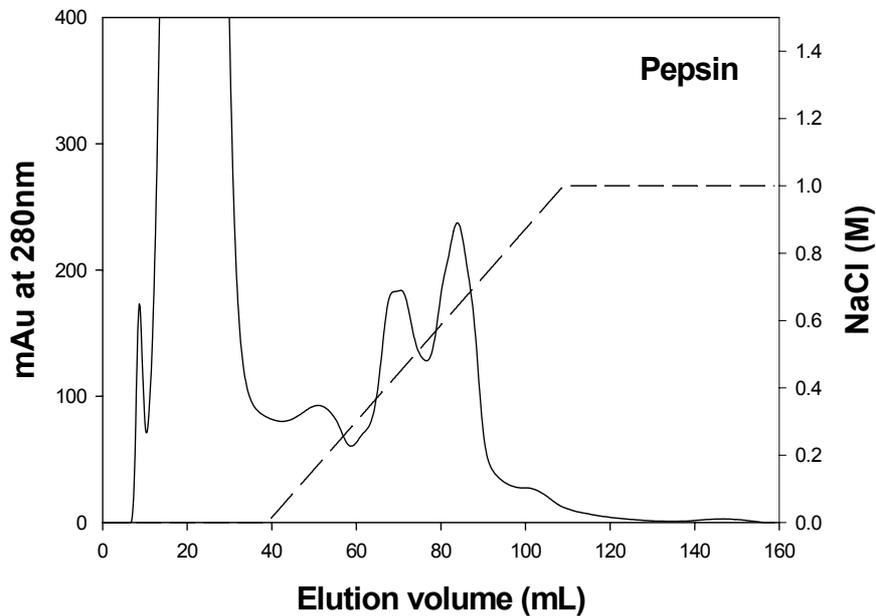


Fig. 12-continued. Separation of whey protein hydrolysates using cation exchange chromatography.

Cation exchange chromatography에 의하여 분리된 염기성 단백질 중 일차적으로 0.6 M의 염농도에서 용출되었던 단백질분획의 분자량을 조사하기 위하여 Protamax 및 Alcalase 유청분해물의 peak fraction을 수거하여 size exclusion chromatography를 실시한 결과는 Fig. 13과 다.

Alcalase 및 protamex 분해물로부터 회수한 염기성단백질 분획은 유사한 용출특성을 보였으며 85 및 100 mL의 buffer에서 용출되는 단백질 분획을 공통적으로 함유하였다. Protamex의 분해물에서는 120 mL에서 용출되는 보다 작은 분자량의 단백질 분획이 관찰되었으며 추정된 분자량은 8,000-13,000 dalton으로서 Yamamura et al.(1999)이 보고한 MBP의 분자량 10 KD와 유사하였다.

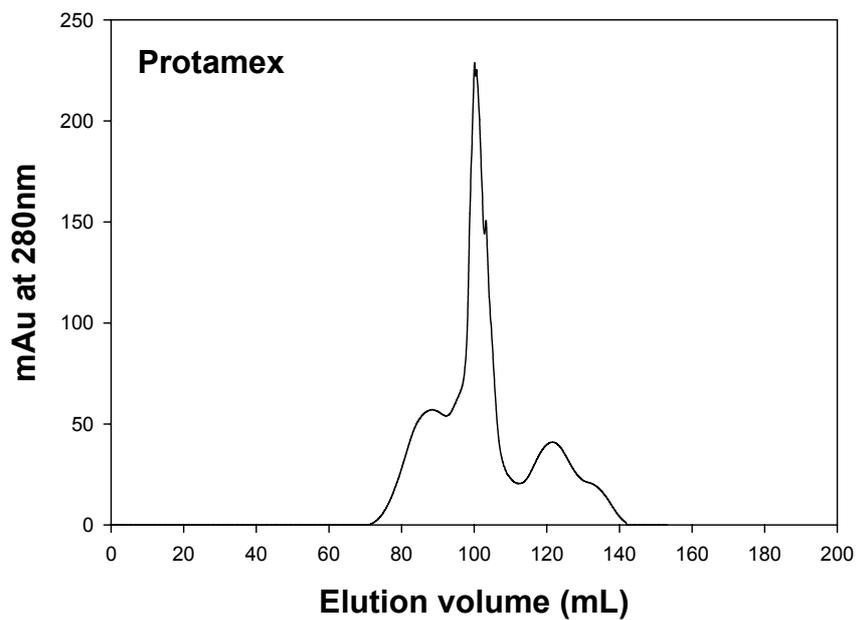
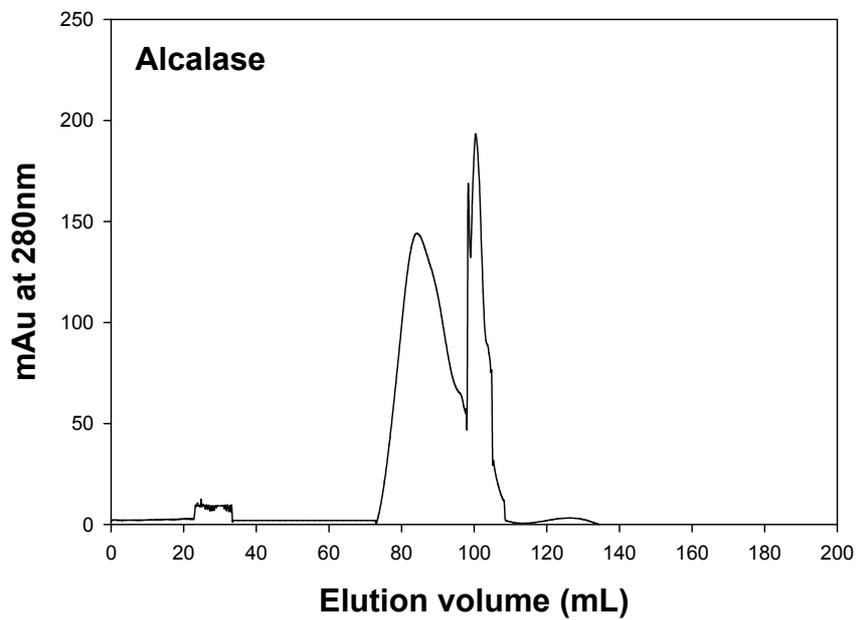


Fig. 13. Separation of basic protein fractions obtained from Alcalase and Protamex whey protein hydrolysates using size exclusion chromatography.

다. 미변성 유청단백질의 생산

1) 효소처리 전 기질의 분별 특성

시료의 초기 변성여부가 골밀도 강화 기능을 갖는 활성 유청단백질 분해물의 생산과정에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일차적으로 효소처리 전 기질로 사용한 WPC와 신선한 우유에서 분리한 acid whey, sweet cheese whey의 단백질 분별 특성을 비교하였다. Sephacryl S-100 resin으로 size exclusion chromatography를 실시하여 단백질의 분별 특성을 조사한 결과 Fig. 14에 나타난 바와 같이 WPC는 macroprotein, bovine serum albumin 등을 함유한 고분자량의 분획과 β -lactoglobulin과 α -lactalbumin을 함유한 3개의 단백질 분획으로 분별되었다.

WPC는 신선한 우유로부터 분리한 acid whey와 매우 유사한 용출 특성을 나타내었으며 WPC의 제조과정에서 고분자량의 단백질 응집체 형성과 같은 단백질의 뚜렷한 변성 흔적은 관찰되지 않았다. 모짜렐라 치즈의 생산 시 부산물로 얻게되는 감성유청(sweet cheese whey)의 경우에는 acid whey 및 WPC에서는 보다 높은 함량의 고분자량 단백질 분획이 관찰되었으며 이 단백질 분획은 casein에서 유래된 것으로 판단된다.

2) 유청단백질의 변성이 효소가수분해와 염기성 단백질 분획의 회수에 미치는 영향

유청단백질 분말은 분무건조를 통하여 제조되며 제품이 생산되기까지 유청에 존재하는 단백질이 열에 노출 되는 정도에 건조된 유청단백질의 변성도는 차이를 나타낼 수 있다. 치즈 생산의 부산물로 얻어지는 유청은 건조 전 농축 및 살균과정을 거치게 되며 살균된 유청액의 분무조건 조건에 영향을 미치는 주요 요인으로 투입되는 시료의 고형분 함량(feed solid content), 분무조건(atomization) 및 건조온도 등을 들 수 있다

일반적으로 산업적으로 이용되는 분무건조 조건은 처리 용량에 따라 차이를 보이나 시료의 투입량이나 분무조건은 대체로 고정되어 있으며, 건조 온도는 기온 등의 환경요인에 따라 일부 가변적으로 적용하고 있다 현재 건조 유제품의 생산 시 inlet temperature는 160-240°C, outlet temperature는 70-90°C가 사용되고 있으며 실제로 단백질의 변성에 크게 영향을 미칠 수 있는 조건은 outlet temperature로

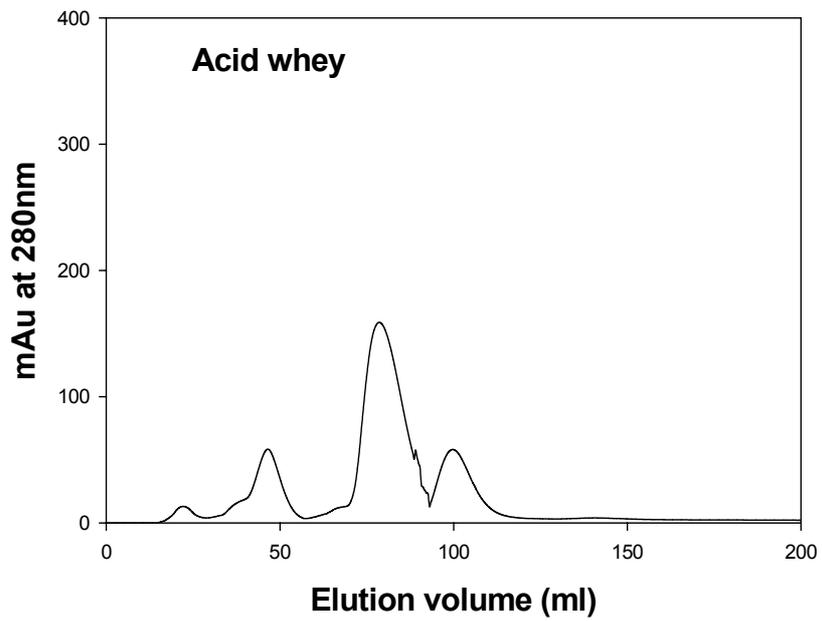
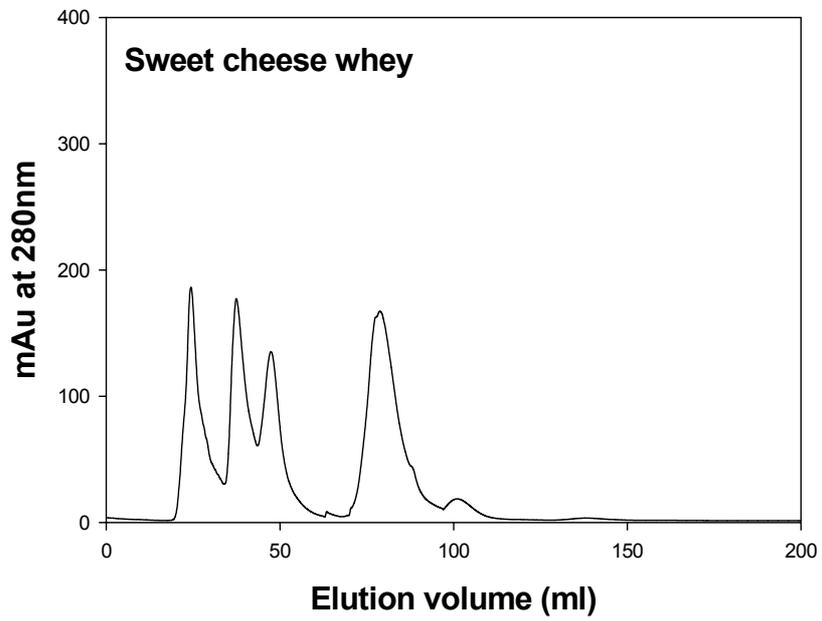


Fig. 14. Fractionation of sweet cheese whey, acid whey and whey protein concentrate using size exclusion column chromatography.

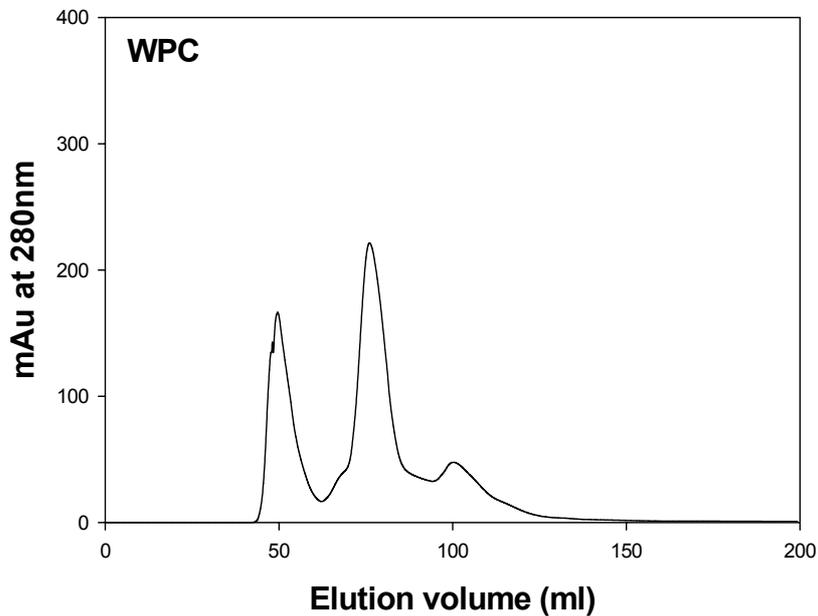


Fig. 14-continued. Fractionation of sweet cheese whey, acid whey and whey protein concentrate using size exclusion column chromatography.

생각되며 그 이유는 비교적 높은 온도 상태에서 높은 농도의 시료반응물, 예를 들어 단백질, 유당 등이 존재하기 때문이다. 유청단백질의 변성이 가수분해물 생산을 위한 공정 및 염기성 단백질 분획의 회수에 미치는 영향을 조사하기 위하여 WPC 용액을 75, 85, 95℃에서 10분간 열처리 한 후 pH 4.5로 조정 시 침전되는 단백질량을 기준으로 하여 측정 한 변성도는 Fig. 15와 같다.

살균유를 이용하여 동결건조에 의하여 실험실에서 제조한 유청단백질농축물을 미변성유청단백질로 간주하였을 때 건조 전 살균과정에서 약 유청단백질의 8% 정도는 변성되는 것으로 나타났으며 가수 분해 시 기질로 사용한 WPC는 약 13%의 단백질 변성도를 나타냈다. WPC를 85℃에서 10분간 가열 시 변성도는 급격히 증가하였으며 총 유청단백질의 50% 이상이 변성되는 것으로 나타났다.

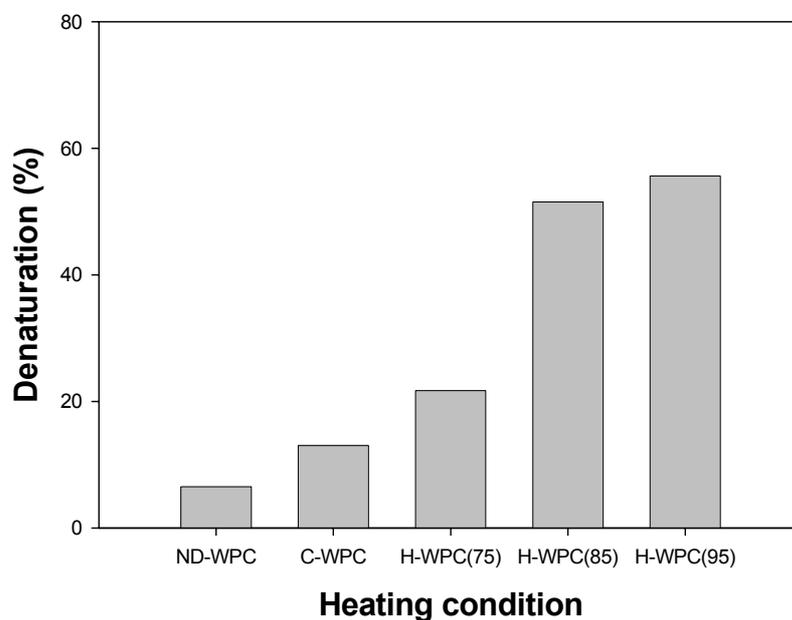


Fig. 15. Protein denaturation (%) of WPC and heated whey protein concentrates. ND-WPC: non-denatured WPC, C-WPC: control WPC, H-WPC(75): heated WPC(75°C, 10 min) H-WPC(85): heated WPC(85°C, 10 min), H-WPC(95): heated WPC(95°C, 10 min)

유청단백질의 변성이 효소처리 가수분해물의 제조에 미치는 영향을 조사하기 위하여 변성도를 증가시킨 WPC 용액(85°C, 10분 가열)을 이용하여 효소처리를 실시하였다. 효소 처리는 가열하지 않은 시료에서 염기성 단백질 분획의 분리가 용이하였던 세 가지 효소 Protamex, Alcalase, pepsin을 이용하였으며 효소의 첨가량(1%, 단백질 기준) 및 처리조건은 비가열 시료와 동일하도록 하였다.

가열처리에 의하여 단백질의 변성도가 증가된 시료는 Fig. 16에서 나타난 바와 같이 비가열 시료에 비하여 동일한 가수 분해 조건에서 가수분해가 더 높게 일어났으며 이 같은 현상은 세 가지 효소에서 공통적으로 발견되었다.

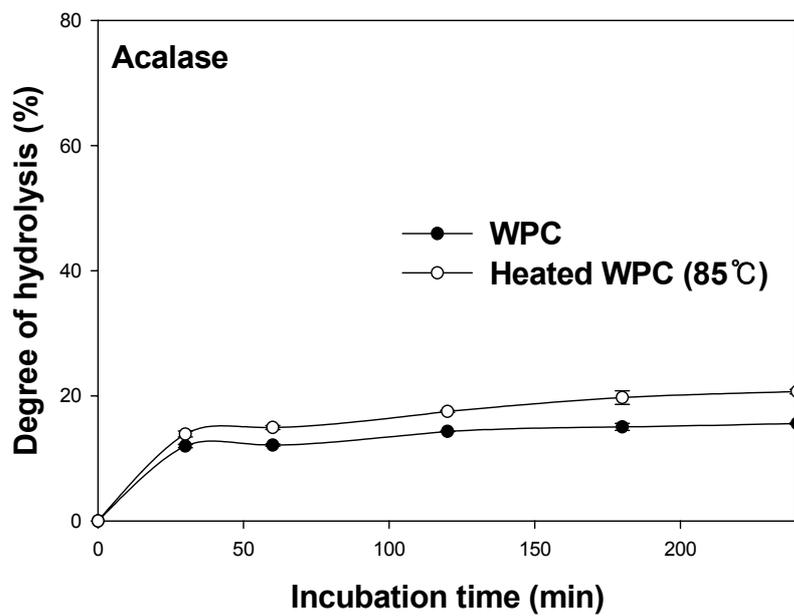
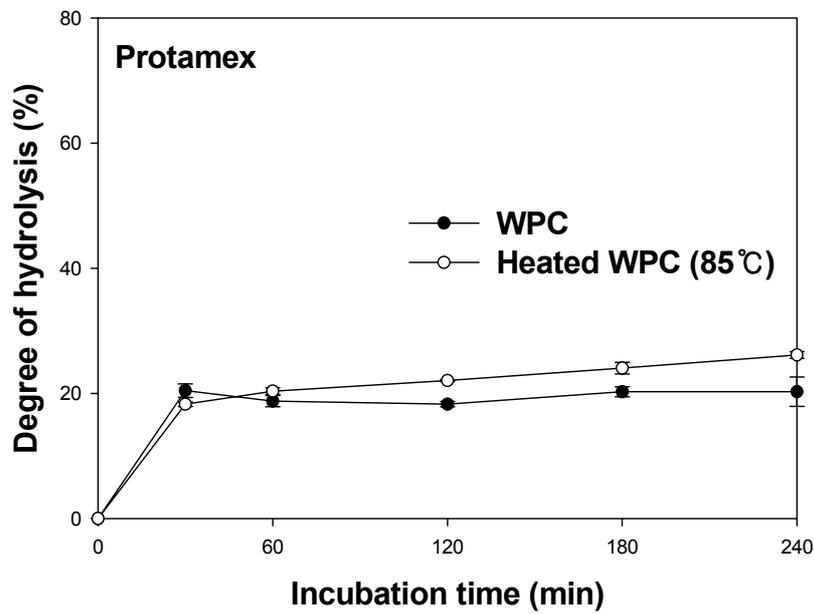


Fig. 16. Hydrolysis of whey and heated whey proteins by Alcalase, Protamex or pepsin.

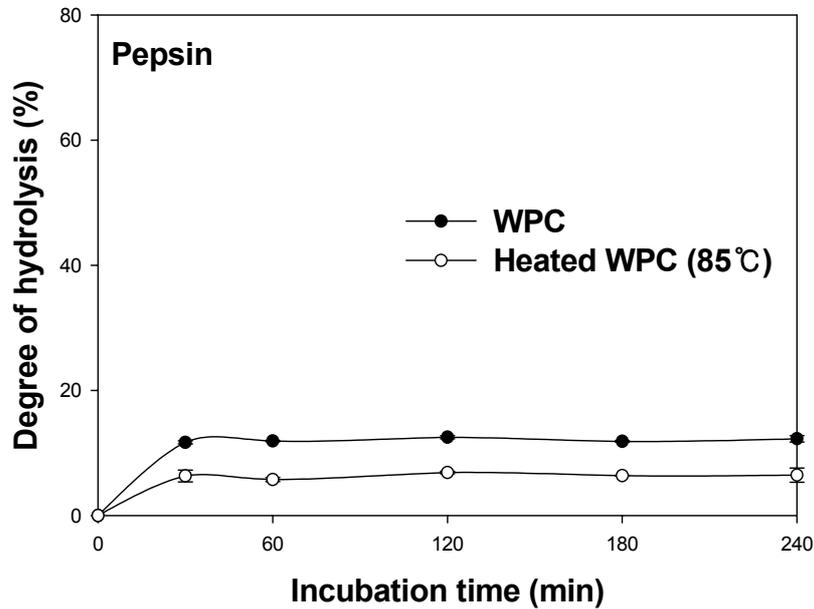


Fig. 16-continued. Hydrolysis of whey and heated whey proteins by Alcalase, Protamex or pepsin.

Fig. 16에서 변성도가 증가한 유청단백질 시료의 가수분해도가 높게 나타난 이유는 구상단백질인 유청단백질의 변성에 의하여 단백질의 unfolding이 일어남에 따라 효소가 기질에 보다 쉽게 접근할 수 있기 때문인 것으로 생각된다. 가열처리된 WPC의 가수분해물을 앞서 언급한 방법으로 cation exchange chromatography를 실시하여 염기성 단백질 분획을 분별한 결과는 Fig. 17과 같다. 분별된 염기성 분획의 용출 조건과 양은 비가열 WPC로부터 회수된 시료와 유사한 것으로 나타났으며 일부 차이는 초기 시료의 변성 때문이라기보다는 가수분해물의 제조 시 최종분해정도의 차이 때문에 나타나는 것으로 판단된다.

한편 분무건조기의 송풍온도를 170과 182°C, 배풍온도를 92°C로 조정하여 직접 제조한 유청분말의 변성도는 23%와 32%로서 가수분해 시 시료로 사용한 WPC와 비교할 때 약간 높은 수준으로 나타났으나 가수분해 정도에서는 유의적 차이가 관찰되지 않았다.

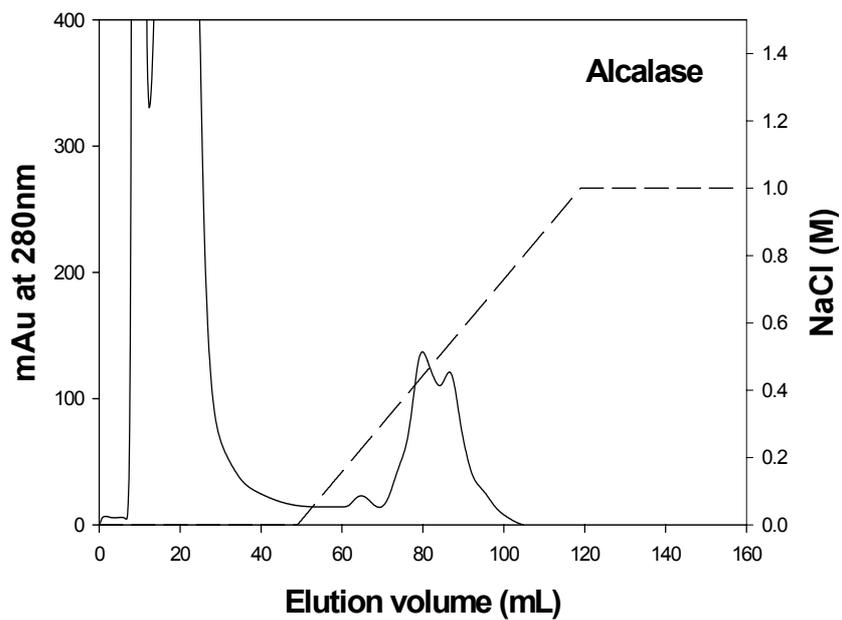
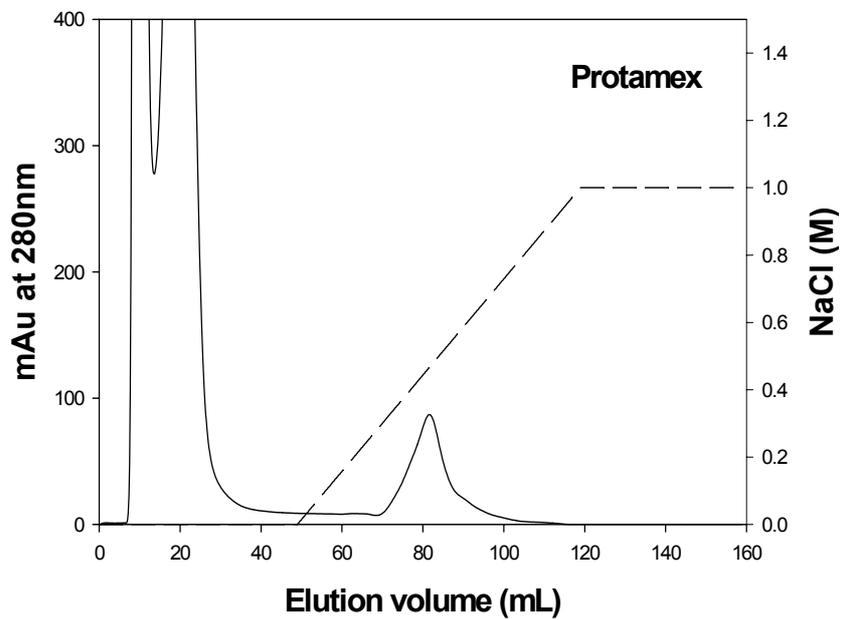


Fig. 17. Separation of hydrolyzed heated whey proteins (85°C, 10 min) using cation exchange chromatography.

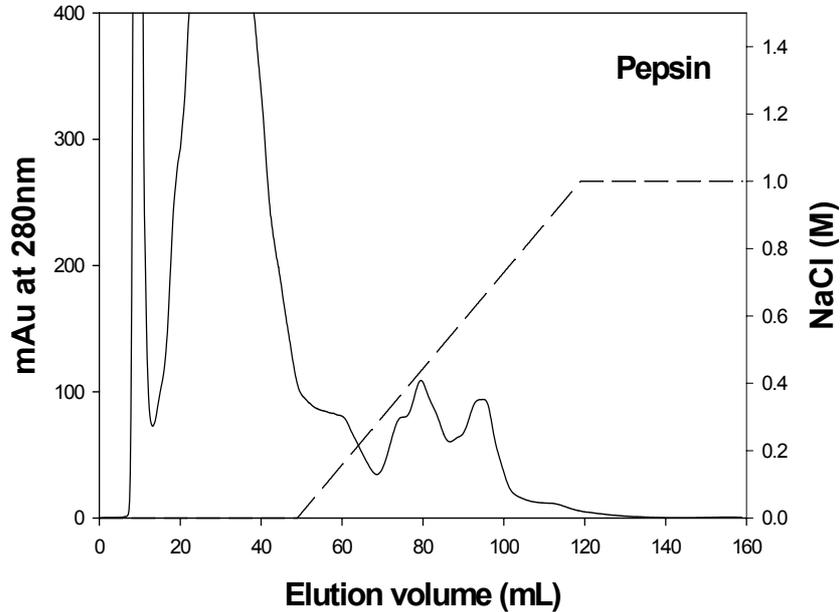


Fig. 17-continued. Separation of hydrolyzed heated whey proteins (85°C, 10 min) using cation exchange chromatography.

라. 조골세포 성장 촉진 유청단백질 가수분해물 생산공정의 최적화

1) 시료의 종류에 따른 활성유청단백질 분해물의 생산조건 설정

치즈생산이나 casein 제조과정 중 부산물로 얻게 되는 유청은 한외여과, 역삼투, diafiltration 등의 정제 과정을 거쳐 유당이나 염 등이 제거되고 단백질의 함량이 증가 된 농축유청단백질(WPC)이 생산된다. 본 연구에서는 유청단백질의 가수분해물로부터 조골세포의 증식과 분화를 촉진할 수 있는 활성펩타이드를 선별하고자 하였으며 초기 시료의 형태가 활성펩타이드의 생산과정에 미치는 영향을 조사하고자 시료의 단백질함량변화, 단백질의 변성도, pH 처리과정이 초기시료가 가지는 조골세포의 증식효과에 미치는 효과를 측정하였다. 참여기업에서 생산한 유청분말(10% 단백질)의 단백질함량이 조골세포주(MC3T3-E1 cell line)의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여

유청분말의 한외여과를 실시하고 조골세포의 증식을 72 시간동안 MTT assay로 평가한 결과는 Fig. 18과 같다. 동일한 양의 시료를 serum free media의 조골세포에 첨가하였을 때 세포의 증식을 나타내는 흡광도는 시료의 농축도가 증가할수록 증가하는 경향을 나타냈다. 이 같은 결과는 시료에 포함된 단백질 함량 증가가 조골세포의 증식을 증가시키는 것으로 생각할 수 있다. Takada et al. (1996)은 유청단백질이 조골세포(MC3T3-E1 cell)의 성장과 분화를 촉진시킬 수 있음을 보고하였으며 유청단백질을 단백질 분해효소(pronase)로 처리하였을 때 조골세포 증식의 촉진 효과가 감소하는 것을 근거로 조골세포의 증식을 촉진하는 성분의 본질은 단백질 성분임을 제시하였다.

Table 5는 WPC와 유청분말(whey powder)을 인위적으로 가열처리하여 단백질의 변성도가 다른 시료를 제조하고 단백질의 변성도가 조골세포의 증식에 미치는 효과를 조사한 결과이다. 가열처리 전 유청단백질의 변성도는 농축유청단백질이 30, 유청분말이 39%로서 농축유청단백질의 변성도가 상대적으로 낮은 것으로 나타났으며 가열 후에는 74에서 78%까지 변성도가 증가하였다.

미가열 처리의 시료를 동일한 단백질 수준으로 조골세포에 첨가하고 배양하였을 때 농축유청단백질의 조골세포 증식 촉진 효과가 유청분말 시료에 비해 상대적으로 우수하였으나 유청분말의 한외여과 시에는 농축유청단백질과 유사한 수준으로 상승하여 농축유청단백질과 유청분말의 세포증식효과 차이는 단백질의 변성도에 따른 영향보다는 단백질 이외의 성분에 따른 것으로 판단된다. 그러나 시료를 가열한 경우에는 농축유청단백질과 유청분말의 모든 시료에서 공통적으로 세포 증식 효과가 현저히 감소하였다. 이는 활성성분이 가열처리에 의해 변성되어 활성이 감소하거나 시료 내 단백질 혹은 다른 성분과 반응하여 활성의 소실이 일어나는 것으로 생각된다. 이상의 결과는 시료의 가열처리가 초기 시료의 활성을 저하시킬 수 있음을 의미하며 따라서 가수분해물의 생산 시 필요한 효소 실험 조건이나 건조 과정 중 세포 증식촉진 효과의 변화여부 관찰이 필요한 것으로 나타났다.

2) 유청단백질 분해물의 조골세포성장 촉진효과 검증

가수분해 후 양이온교환 크로마토그래피를 이용하여 회수된 염기성 분획은 투석에 의한 탈염과정을 거쳐 동결건조 후 조골세포의 성장에 미치는 효과를 관찰하였다. 양이온교환 크로마토그래피에 의해 분리된 가수분해물 분획 중 unbound peak는 세포

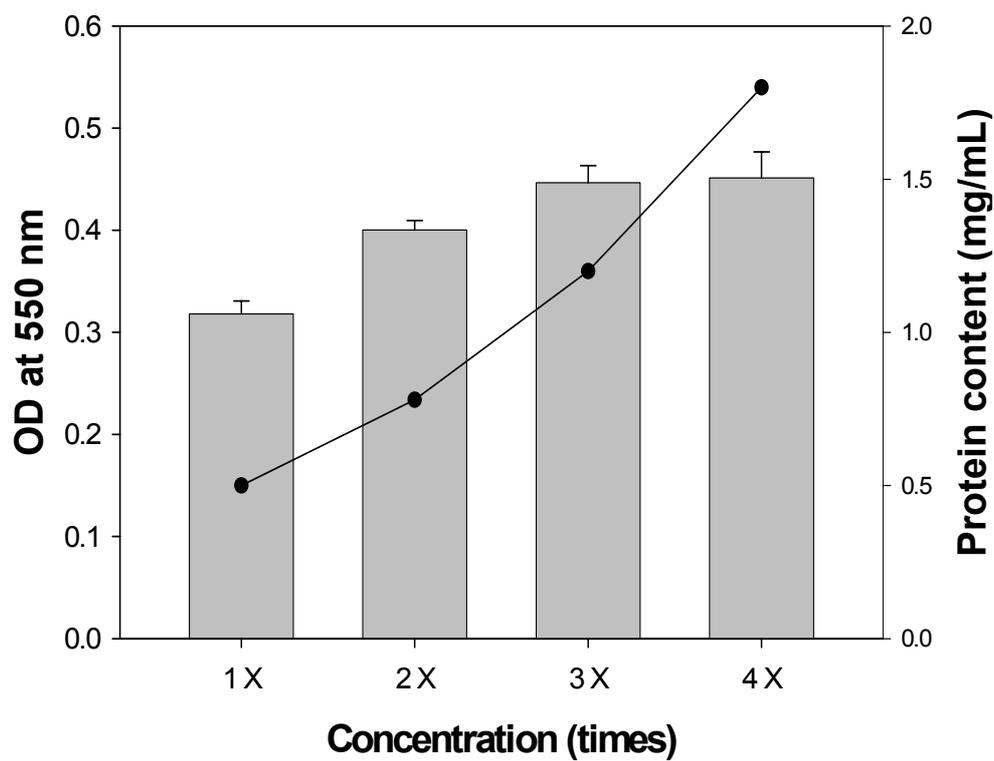


Fig. 18. Effect of protein content in whey powder on the proliferation of MC3T3-E1 cells by MTT assay.

The protein content of whey powder was adjusted by ultrafiltration. The proliferation of MC3T3-E1 cell at 72 hr was expressed as OD at 550 nm.

Table 5. Effect of heating on the proliferation of MC3T3-E1 cells by MTT assay

Samples	Heat treatment (°C, min)	Denaturation (%)	OD at 550 nm
Whey protein concentrate	None	30.0	0.437
	85, 10	71.4	0.301
	85, 20	73.9	0.349
	85, 30	73.7	0.233
Whey powder	None	39.6	0.347
	85, 10	68.6	0.243
	85, 20	71.6	0.189
	85, 30	78.1	0.105
Ultrafiltrated whey powder (4×)	None	38.4	0.451

The proliferation of MC3T3-E1 cell at 72 hr was expressed as OD at 550 nm.

증식 실험결과 매우 미약한 활성을 나타내었기 때문에 염기성 분획을 다량으로 제조하여 농도별로 조골세포의 증식에 미치는 영향을 평가하였으며 그 결과는 Fig. 19와 같다. 조골세포의 증식을 촉진하는 효과는 Flavourzyme에 의한 가수분해물이 가장 우수하였으며 가수분해 전 WPC의 세포증식효과를 대조구(100)로 하였을 때 첨가농도에 따라 차이가 존재하였으나 약 140-180%의 증식효과를 나타내어 다른 가수분해물에 비하여 유의적으로 높은 세포증식 촉진효과를 나타냈다.

Pepsin 가수분해물을 10 ug/mL, 100 ug/mL의 수준으로 첨가 한 경우에는 대조구와 유사한 효과를 보였으며 1 mg/mL의 수준에서는 대조구에 비하여 낮은 세포증식 효과를 보였다. 그러나 Neutrase와 Alcalase에 의한 유청단백질 분해물은 대조구에 비하여 현저히 낮은 세포증식 촉진 효과를 나타냈다.

조골세포의 증식을 촉진하는데 우수한 효과를 나타냈던 Flavourzyme과 pepsin의 가수분해과정 중 생성되는 펩타이드의 특성을 파악하기 위하여 가수분해 정도에 따른 펩타이드의 길이 및 생성량을 조사한 결과는 Fig. 20과 같다. Pepsin(5%, 기질단백질농도 기준)을 사용한 가수분해(40°C, 3시간)에서는 7-8%의 가수분해(degree of hydrolysis)가 일어났으며 생성된 펩타이드의 길이는 12.5-13, 가수분해된 펩타이드의 수는 16으로 나타났다. Endoprotease인 pepsin은 효소 농도를 증가시키고 가수분해 시간을 연장한 경우(10%, 4 시간)에도 11%의 가수분해도를 보여 유청단백질의 가수분해에 큰 변화를 일으키지 않았다. 이러한 유청단백질의 제한적 가수분해는 유청단백질의 대부분이 다량으로 함유한 disulfide bond와 관계가 있는 것으로 판단된다.

한편, endoprotease와 exoprotease의 활성이 함께 존재하는 Flavourzyme(5%)에 의한 가수분해(50°C)는 반응 시간의 연장에 따라 가수분해가 빠르게 진행되었으며 135 분의 가수분해 시 약 39%의 가수분해가 일어났다. 이 때 생성된 펩타이드의 길이는 2.8, 가수분해된 펩타이드의 수는 79로 나타났다. 위의 결과를 근거로 할 때 유청단백질의 부분적 가수분해 보다는 특이성이 적고 가수분해율이 높은 Flavourzyme에 의한 가수분해가 활성펩타이드의 생산에 효율적으로 판단되며 따라서 가수분해공정의 최적화는 Flavourzyme을 이용하여 진행하였다.

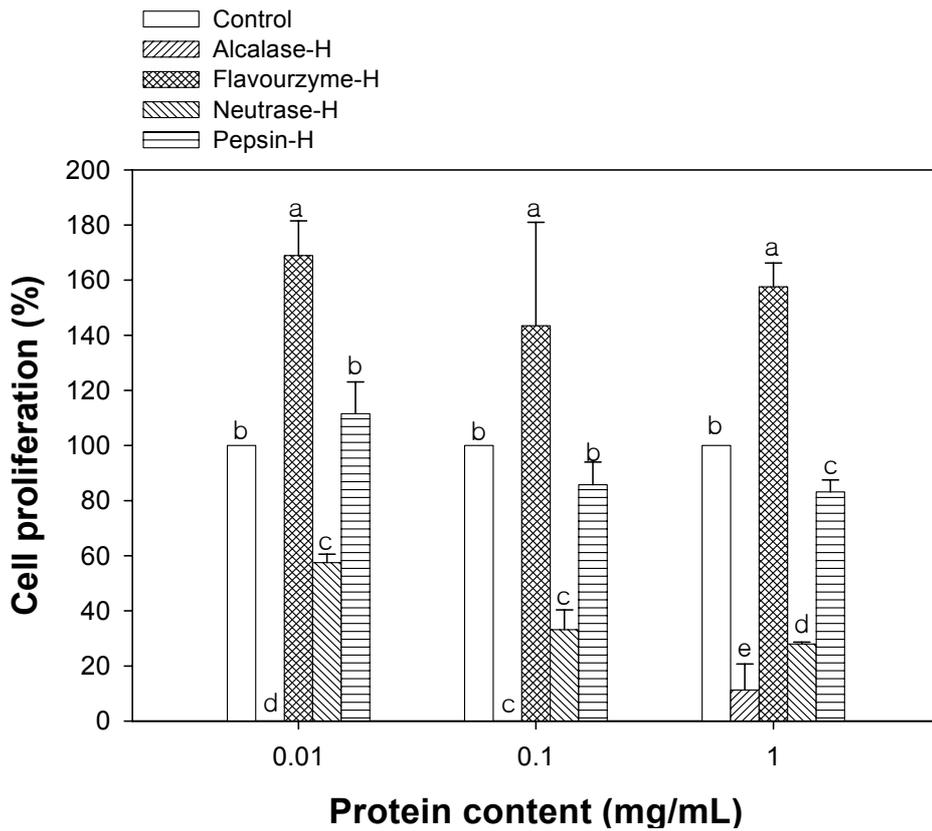


Fig. 19. Effect of whey protein hydrolysates produced by various proteases on the proliferation of MC3T3-E1 cells by MTT assay. The proliferation of osteoblast at 72 hr was expressed as relative percentage of control (WPC).

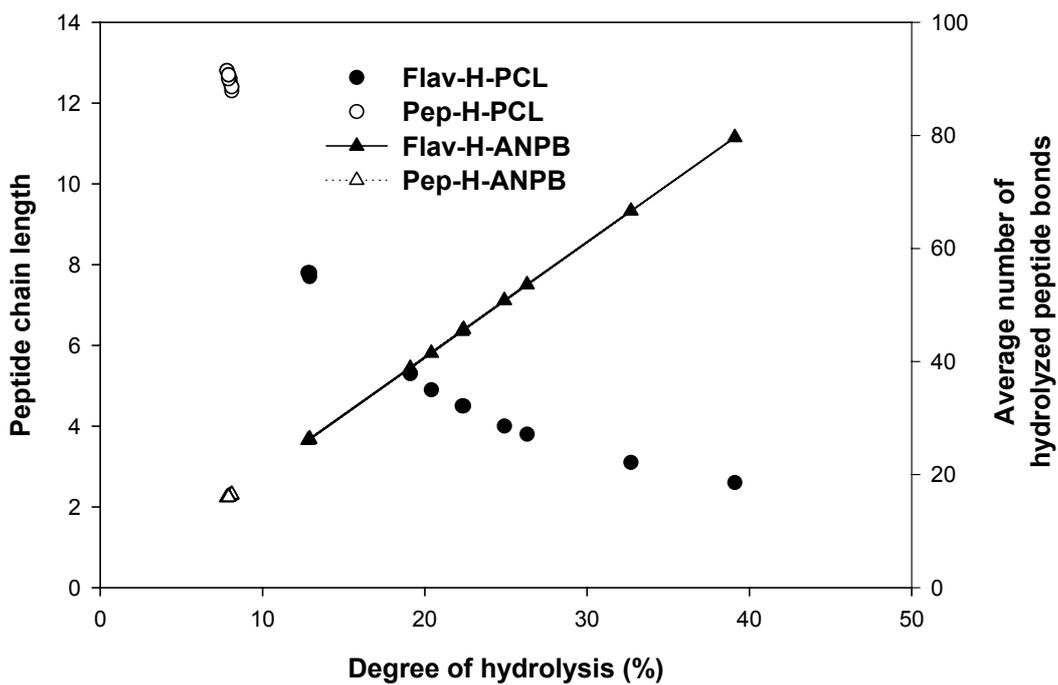


Fig. 20. Changes in peptide chain length (PCL) and average number of hydrolyzed peptide bond (ANPB) during the hydrolysis of whey protein either by Flavourzyme or by pepsin.

3) 반응표면 분석에 의한 가수분해 공정의 최적화

중심합성계획에 의한 11군의 가수분해 조건을 설정하고 반응변수로서 가수분해도, 조골세포증식(MTT assay), 조골세포분화(ALP activity)를 측정된 결과는 Table 6과 같으며 3차원 반응도는 Fig. 21에 나타내었다.

가수분해율은 온도와 시간이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였으며 54°C의 온도 조건에서도 높은 가수분해능력을 유지하여 시간의 증가에 따라 가수분해율의 지속적 증가를 나타냈다. 따라서 가수분해율을 증가시키기 위해서는 반응시간의 연장보다는 반응온도의 증가가 효과적인 것으로 판단된다(Fig. 21a).

MTT assay에 의한 조골세포의 증식 촉진 효과는 온도보다는 가수분해시간의 영향을 많이 받았다(Fig. 21b). 높은 온도의 경우에도 가수분해시간이 짧은 경우 세포 증식효과는 높게 나타나지 않았으며 고온에서 장시간 가수분해 시 가장 높은 조골세포증식 촉진효과가 뚜렷이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 Flavourzyme의 높은 가수분해 능력과 관련이 있을 것으로 생각된다. ALP activity는 MTT에 의한 조골세포 증식 촉진 효과와 거의 동일한 반응형태를 보였다(Fig. 21c). TT assay는 세포수에 따른 세포증식도를 나타낸다면 ALP 활성은 조골세포의 수적 증가보다는 기질성숙(matrix maturation)을 의미한다고 할 수 있으며 세포외기질에 인산칼슘을 침착시켜 석회화(crystalization)를 유도하는 기능을 가지는 것으로 알려져 있다. 그러므로 Flavourzyme 가수분해물은 조골세포수의 증식과 함께 조골세포의 분화도 촉진하는 효과를 나타내는 것으로 확인되었으며 시료의 첨가 수준이 다른 경우(100 ug/mL, 10 ug)에도 일관된 경향을 나타내었다(분석결과 미제시).

각각의 반응변수에 대하여 최적 조건을 구하고자 능선결과를 실시하여 예측한 최적 조건은 Table 7과 같다. 앞서 얻어진 결과의 좀 더 바람직한 모형화를 위하여 MTT response와 ALP response를 제곱근(square root) 변환하여 SQRT(MTT)와 SQRT(ALP)를 반응변수로 사용하고, 세 개의 반응변수 DH, SQRT(MTT)와 SQRT(ALP)를 동시에 최대화하는 종합바람직성 최대화 방법(composite desirability)을 이용하여 global solution을 구하였으며 이 global solution 조건을 가수분해의 최적화 조건으로 도출하였다(Table 8).

Table 6. Treatment combinations and their results

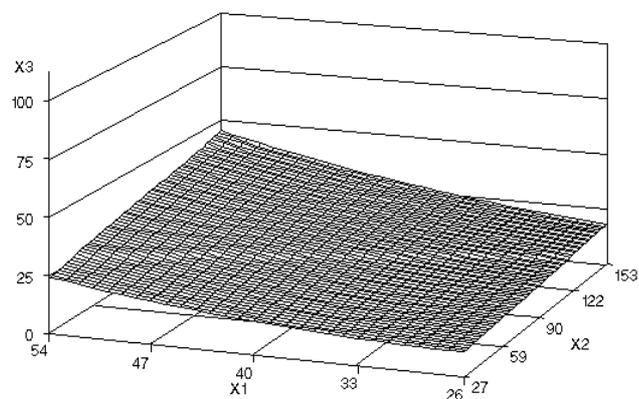
Experimental number ¹⁾	Hydrolysis temperature (°C)	Hydrolysis time (min)	DH ²⁾ (%)	MTT assay ³⁾ (OD at 550 nm)	ALP activity ⁴⁾ (nM/min/mg protein)
1	30 (-1)	45 (-1)	12.8	0.326	1.24
2	30 (-1)	135 (1)	20.4	0.526	5.68
3	50 (1)	45 (-1)	24.9	0.082	0.60
4	50 (1)	135 (1)	39.1	0.463	4.95
5	26 (-1.414)	90 (0)	12.9	0.316	2.10
6	54 (1.414)	90 (0)	32.7	0.585	5.83
7	40 (0)	27 (-1.414)	12.9	0.000	0.00
8	40 (0)	154 (1.414)	26.3	0.272	1.34
9	40 (0)	90 (0)	22.3	0.261	2.37
10	40 (0)	90 (0)	19.1	0.339	2.42
11	40 (0)	90 (0)	22.4	0.360	2.44

¹⁾ The number of experimental conditions by central composite design

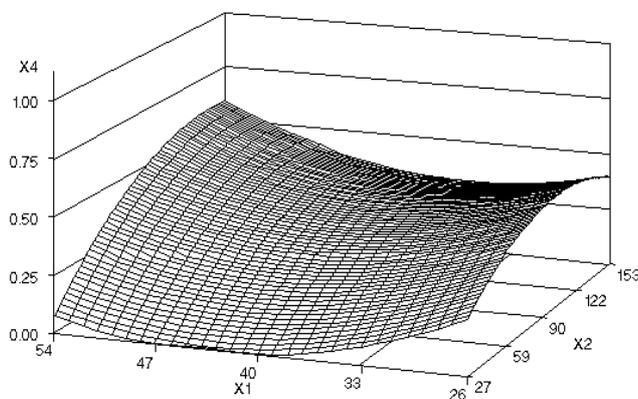
²⁾ Degree of hydrolysis

³⁾ MTT assay response at 72 hr to 1 mg/mL

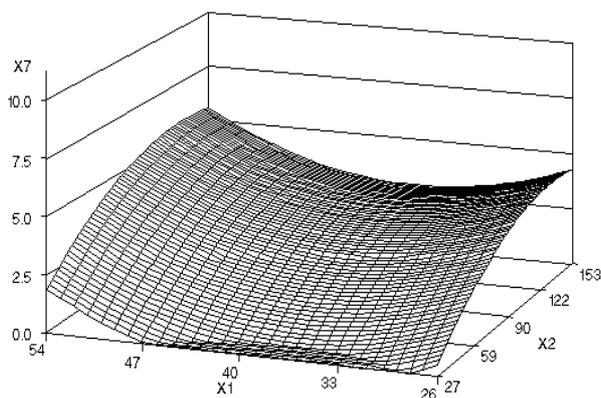
⁴⁾ Alkaline phosphatase activity at 72 hr to 1 mg/mL.



(a)



(b)



(c)

Fig. 21. Response surface for the effects of temperature (X1) and time (min; X2) on the (a) degree of hydrolysis (%; X3), (b) MTT absorbance (72 hr; 1 mg/mL, X4) and (c) alkaline phosphatase activity (72 hr; 1 mg/mL, X7).

Table 7. Predicted hydrolysis conditions for the maximum responses of variables.

Predicted responses	Standard error	Temperature (°C)	Time (min)	R ²	Maximum
Degree of hydrolysis (%)	3.56	57	133	0.96	46
MTT assay ¹⁾ (OD at 550 nm)	0.18	59	117	0.75	0.71
ALP activity ²⁾ (nM/min/mg protein)	2.39	59	106	0.68	7.44

¹⁾ MTT assay response at 72 hr to 1 mg/mL

²⁾ Alkaline phosphatase activity at 72 hr to 1 mg/mL

Table 8. Result of multi-response optimization.

Global solution	Predicted response
Temp = 54.0	DH = 42.9
Time = 140.5	MTT = 0.680
	ALP = 0.825

반응표면분석을 통하여 얻어진 최적 조건의 유효성 여부를 검증하기 위하여 Table 8에서 제시한 조건으로 확인 실험을 수행하였다. 확인실험에서는 최적가수분해 조건을 포함하여 가수분해 시간을 연장하였을 때 조골세포 성장 촉진효과의 개선 유무를 평가하였으며 그 결과는 Fig. 22와 같다. 3회의 반복 실험 결과 얻어진 가수분해도는 반복 실험에서 매우 유사하게 나타났으며 140분 이상의 가수분해를 실시한 경우에도 조골세포의 성장 촉진효과는 개선되지 않는 것으로 나타났다. 따라서 통계적 모형으로 도출한 가수분해 조건은 최적반응치를 적합하게 예측하는 것으로 판단된다.

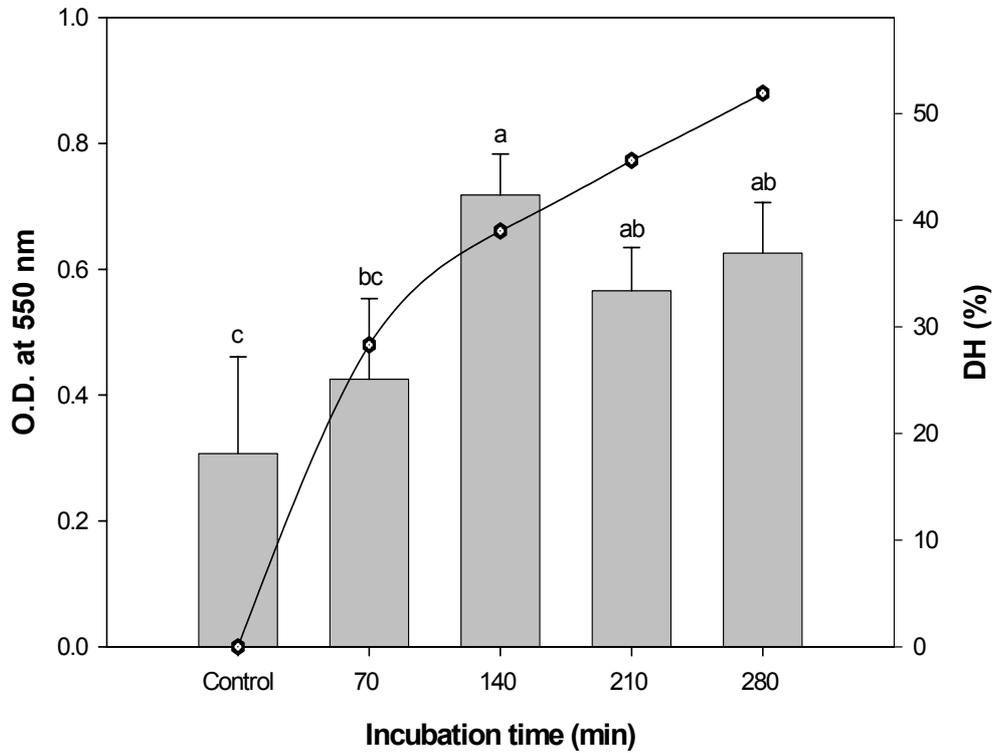


Fig. 22. Verification test for the growth promoting effect of whey protein hydrolysate on the proliferation of MC3T3-E1 cells.

4) 용매침전을 이용한 활성분획 대량 정제 공정 설정

일반적으로 단백질은 등전점에서 가장 낮은 용해도를 나타내지만 단백질의 가수분해물은 여러 가지 단백질, peptide, 아미노산의 혼합물이므로 각기 다른 등전점을 가지게 되며 pH 및 용매에 대한 용해도의 차이가 나타난다. 에탄올과 같이 물과 쉽게 혼합되는 유기 용매를 가하는 경우 물의 유전항수(dielectric constant)를 저하시켜 단백질 분자간의 정전기적 결합력을 감소시키게 되므로 결과적으로 단백질의 수화능력을 감소시켜 단백질의 분별 침전이 가능하다. 이때 일어나는 단백질의 용해도 감소는 온도 의존적이므로 단백질의 변성과 온도 변화에 의한 용해도 변화를 최소화하기 위해 0°C 이하의 냉장실에서 1 시간 동안 방치하여 용매침전을 실시하였다. 10% 농축유청단백질 150 mL을 도출된 최적가수분해조건(Table 8)으로 가수분해하여 효소분해물을 제조하고 에탄올의 농도를 달리하여 처리하였을 때 상등액으로 회수된 단백질 또는 펩타이드의 함량변화는 Table 9와 같다.

일반적으로 단백질은 40% 정도의 에탄올에 침전하지만 염기성 아미노산을 많이 함유한 단백질이나 펩타이드는 60-80% 에탄올에도 쉽게 침전하지 않으므로 용매의 농도를 40% 까지 증가시켰으며 용매침전 후 얻어진 단백질(펩타이드)의 양은 30%에탄올을 이용한 경우 가수분해직후 단백질 함량의 58%, 40% 에탄올 처리에서는 46%가 각각 용해된 상태로 회수되었다.

에탄올 침전에서 용해된 상태로 회수된 단백질을 감압상태에서 용매를 휘발시킨 후 동결건조 하여 분말화 된 시료를 각각 동일한 단백질 농도로(1 mg/mL) 첨가하여 조골세포증식 효과를 조사한 결과는 Fig. 23과 같다. 10% 와 20%의 에탄올 처리 후 회수된 펩타이드는 column chromatography에 의하여 정제된 염기성 분획과 비교할 때 유의적으로 낮은 세포증식 촉진 효과를 나타내었는데 이는 시료 내 존재하는 활성펩타이드의 상대적 비율이 낮기 때문인 것으로 생각된다.

30% 에탄올의 처리 시에는 column chromatography에 의하여 정제된 염기성 분획과 동일한 세포증식 촉진 효과가 관찰되었으나 40%의 에탄올의 처리 시에는 촉진 효과가 유의적으로 감소하여 40% 에탄올 처리과정에서 활성펩타이드의 일부가 소실되는 것으로 판단된다. 이상의 결과를 근거로 할 때 30% 에탄올처리는 chromatography와 유사한 정제 효과를 나타낼 수 있는 것으로 생각되며 대량 생산과정 처리 시 활성펩타이드의 신속한 부분정제에 활용될 수 있을 것으로 사료 된다.

Table 9. Changes of soluble protein content after ethanol precipitation.

Treatment	Soluble protein content (g)	Soluble protein (%)
Control ¹⁾	6.241	100
Ethanol 10%	5.139	82
Ethanol 20%	4.820	77
Ethanol 30%	3.623	58
Ethanol 40%	2.880	46

¹⁾: hydrolyzed whey protein concentrate before ethanol precipitation. The hydrolysate was produced using Flavourzyme at the optimized condition (refer to Table 8).

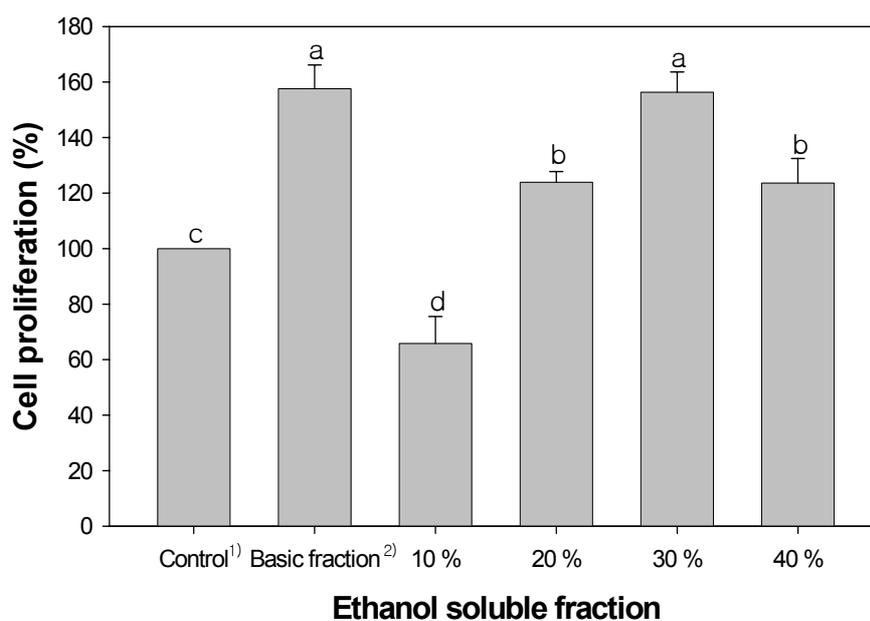


Fig. 23. Effect of ethanol soluble hydrolysate fractions on the proliferation of he proliferation of MC3T3-E1 cells. The proliferation of osteoblast at 72 hr was expressed as relative percentage of control (unhydrolyzed WPC).

5) 가수분해 후 효소실활 조건에 따른 유청단백질 분해물의 활성변화

앞서 기술한 바와 같이 시료의 가열처리와 pH 조절은 제조된 유청단백질 가수분해물의 조골세포 성장 촉진 효과에 영향을 미쳤으므로 효소 실활 처리 조건의 변화에 따른 가수분해물의 활성변화를 조사하였다.

Fig. 24에 나타낸 바와 같이 가수분해 후 효소의 실활 처리 과정 없이 시료를 동결 건조 하여 제조한 분해물은 에탄올 처리 공정의 유무에 관계없이 조골세포 성장 촉진 효과가 낮은 것으로 나타났다. 이 결과는 가수분해 후 활성펩타이드를 분리하는 공정이 필요함을 나타내며 특히 분자량이 상대적으로 커서 가열에 의해 쉽게 침전하는 펩타이드는 조골세포의 성장을 촉진하는 효과가 낮은 것을 의미한다고 할 수 있다. 또한 가수분해 후 효소의 실활 과정에서 pH를 4.0으로 조정하고 열처리를 실시한 경우 가수분해물의 활성이 가장 높은 것으로 나타나 활성 펩타이드는 산에 강한 성질을 가지고 있는 것으로 판단되며 85°C, 5분의 가열처리 조건에서는 침전하지 않고 용해된 상태로 남아 있는 것으로 확인되었다.

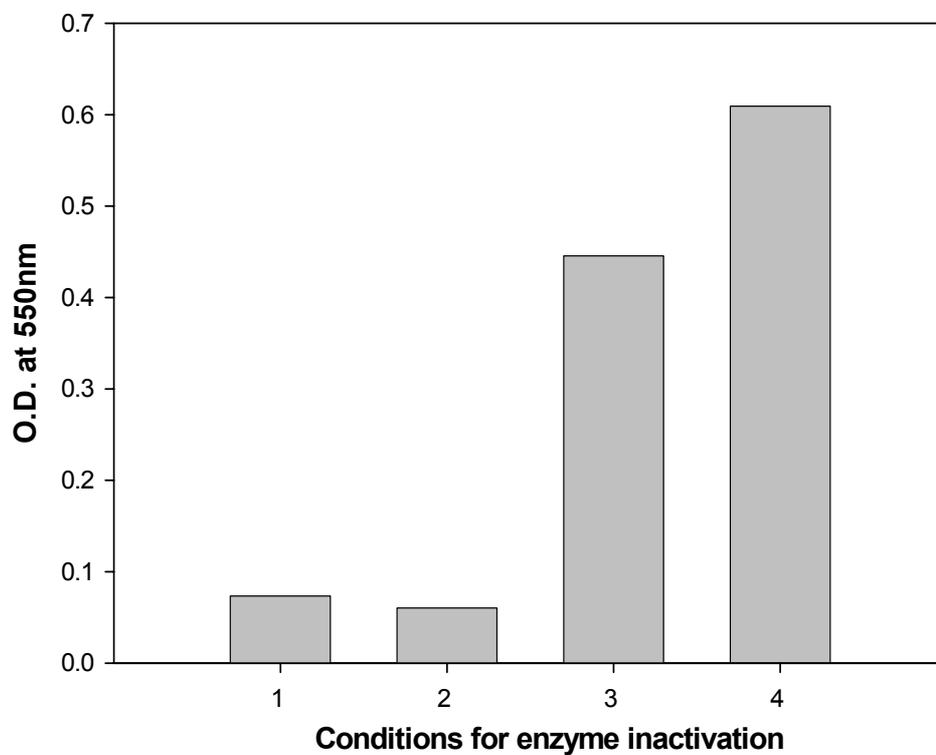


Fig. 24. Effect of conditions for enzyme inactivation on the proliferation of the proliferation of MC3T3-E1 cells.

1: Hydrolysis → Freeze-drying

2: Hydrolysis → ethanol precipitation (30%, v/v) → soluble fraction → Freeze-drying

3: Hydrolysis → heating (85°C, 5 min) → ethanol precipitation (30%, v/v) → soluble fraction → Freeze-drying

4: Hydrolysis → pH 4 → heating (85°C, 5 min) → pH 6.5 → ethanol precipitation (30%, v/v) → soluble fraction → Freeze-drying

6) 역상 HPLC(Reverse phase HPLC)를 이용한 활성펩타이드의 정제

역상 HPLC를 이용하여 유청단백질 가수분해물의 정제과정에서 일어나는 펩타이드의 변화를 측정하였다. 동일한 농도의 시료를 column(C18)에 주입하였을 때 초기 가수분해물(Fig. 25a)에서는 38, 44, 52, 56, 87분의 머무름시간(retention time, RT)에서 용출되는 5개의 major peak가 관찰되었다. 정제과정에서는 초기 가수분해물에서 공통적으로 가장 높은 농도로 존재하였던 87분에서 용출되는 peak intensity가 현저히 감소하는 것으로 나타났으며 이 같은 결과는 소수성이 강한 펩타이드가 정제 과정 중 제거되는 것을 의미한다(Fig. 25b and c). 에탄올 침전 시에는 초기 가수분해물의 분리양상과 매우 유사하였으며 cation exchange chromatography로 정제를 한 경우에는 극성이 강한 38분에서 용출되는 peak intensity의 증가가 뚜렷이 관찰되었다.

다음 단계로서 역상 HPLC로 분리된 펩타이드 중 활성분획을 확인하기 위하여 다량의 시료의 분리 정제가 가능한 preparation RP-HPLC(size: Φ 19 × 300 mm)를 이용하여 동일한 분석 조건에서 펩타이드의 분리를 실시하였다. Fig. 26에 나타난 바와 같이 preparation RP-HPLC에서는 분석용 HPLC와 비교할 때 펩타이드의 분리 능력은 현저하게 감소하여 peak fraction별 시료의 회수는 용이치 않았으므로 머무름시간을 기준으로 시료를 7개의 분획으로 나누어 회수하였으며 회수된 시료의 조골세포 성장 촉진 효과를 비교하였다. 분획 별 조골세포의 성장 촉진 효과는 대조구로 사용한 가수분해 전 WPC와 비교할 때 용출 초기에 회수된 시료분획(RT 1-17)에서 높게 나타났다(Fig. 27). 따라서 조골세포의 성장 촉진 효과는 친수성이 강한 펩타이드일 것으로 추측할 수 있다. 이 분획의 정한한 아미노산 서열의 구명을 위해서는 보완 연구가 필요할 것으로 생각된다.

마. 활성펩타이드의 대량생산을 위한 공정설계

우유로부터 생리적 기능성을 가진 미량단백질이나 단백질로부터 유래한 기능성 펩타이드를 분리하는 공정은 활성성분 분리를 위한 공정의 복잡성 또는 매우 제한된 물리적 총량 등의 요소 때문에 현재까지 국내에서 산업적 수준의 생산 공정은 확립되어 있지 않으며 pilot plant scale 수준의 생산규모를 설정하기 위한 초기단계의 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서 얻어진 결과를 토대로 pilot plant scale 수준의 활성펩타이드의 대량생산공정에 필요한 제안과 개요를 제시하면 다음과 같다(Fig. 28).

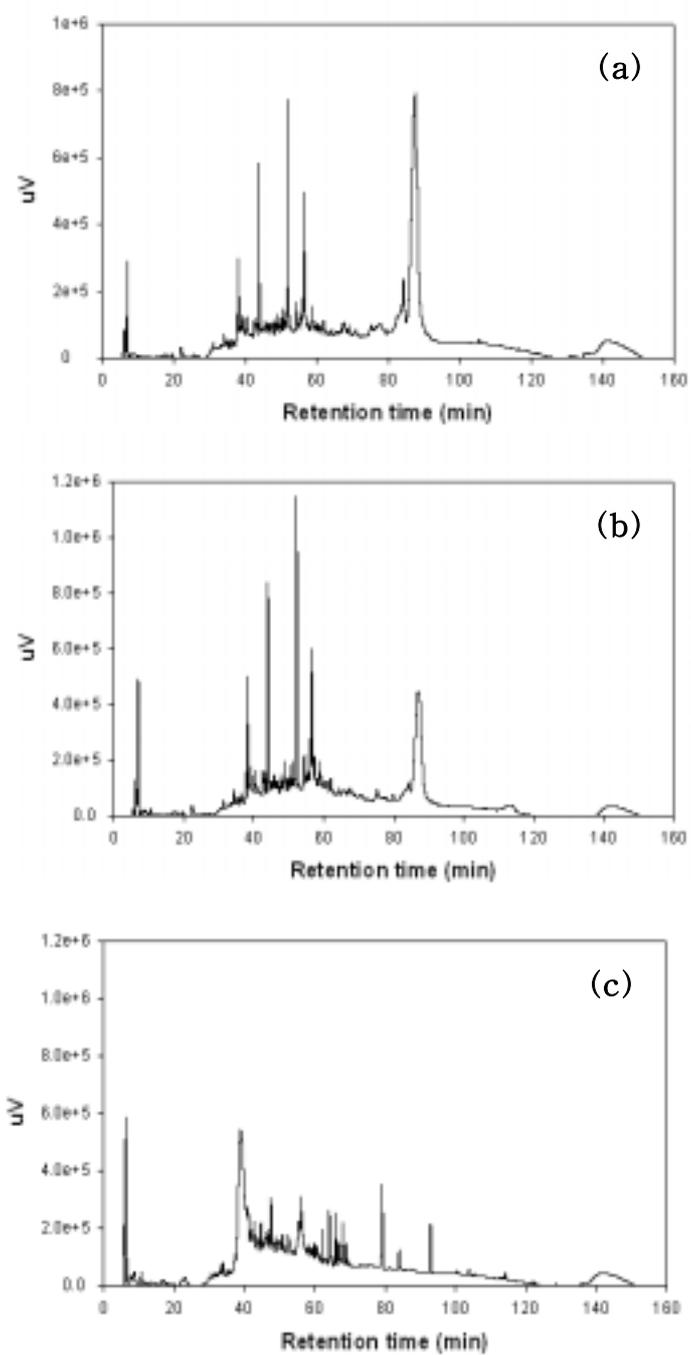


Fig. 25. RP-HPLC chromatogram of (a) Flavourzyme-hydrolysate, (b) its basic fraction and (c) its 30% ethanol soluble fraction.

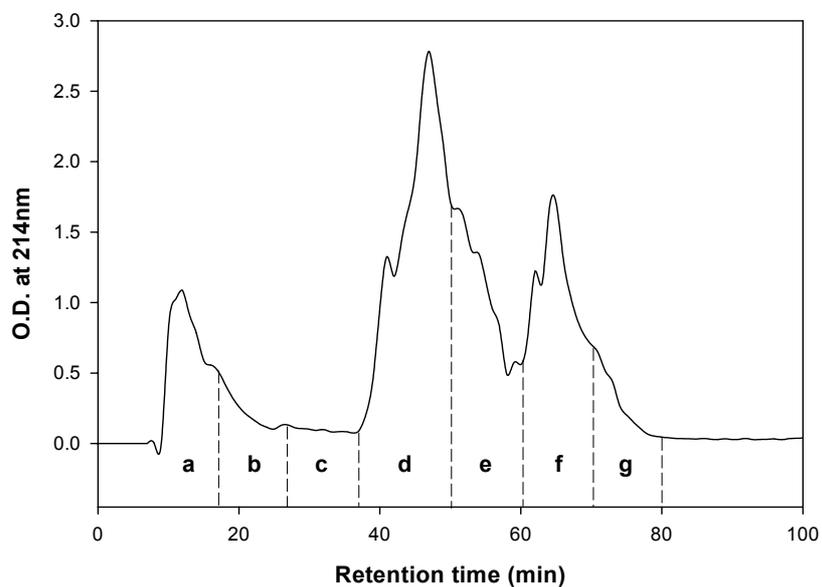


Fig. 26. Preparatory RP-HPLC chromatogram of Flavourzyme-hydrolysate.

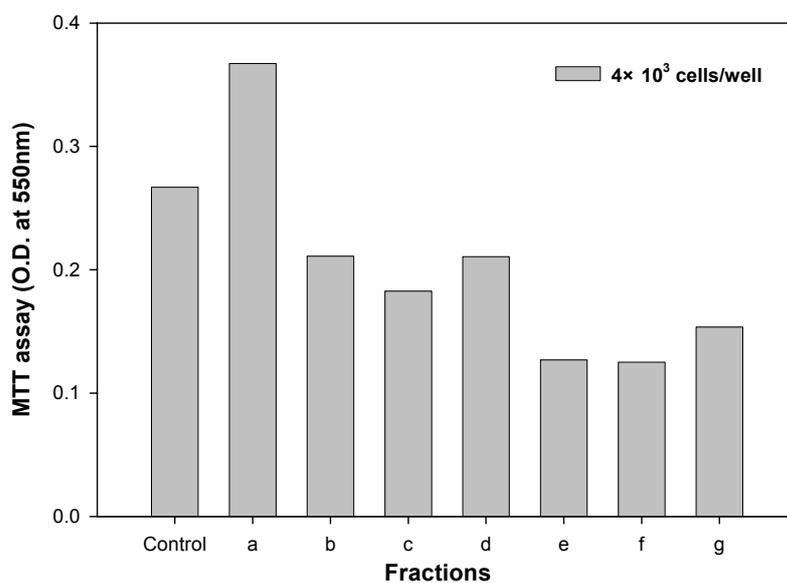


Fig. 27. Effect of hydrolysate fractions on the proliferation of MC3T3-E1 cells. Control: WPC, a: RT 1-17 min, b: RT 18-26 min, c: RT 27-37 min, d: RT 38-48 min, e: RT 49-59 min, f: RT 60-70 min, g: RT 71-80 min.

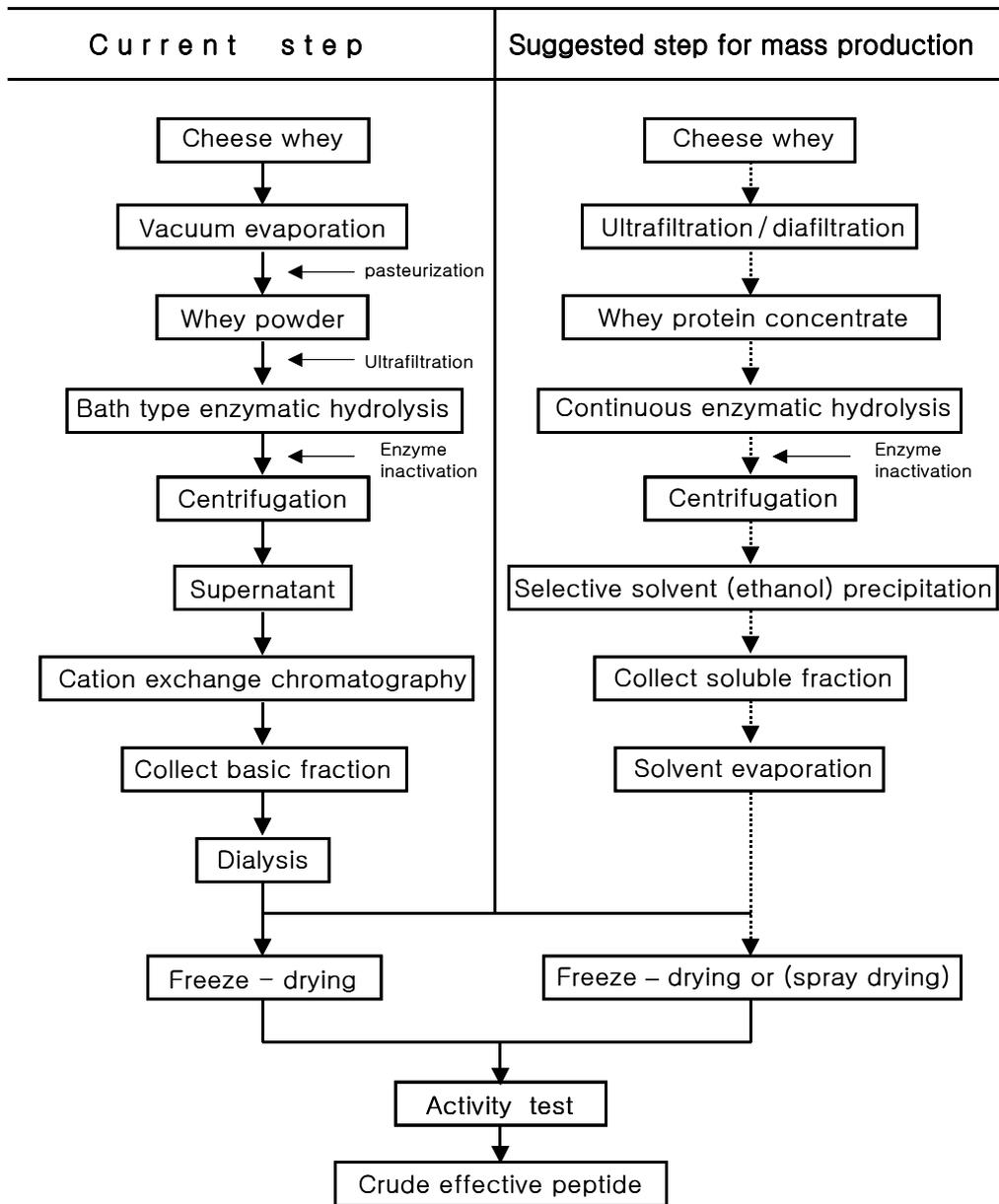


Fig. 28. Suggested steps for the production of osteoblast stimulating peptide.

본 연구에서 사용한 유청분말은 치즈생산 시 생산되는 유청을 진공 농축하여 공장으
로 이송한 후 살균 및 분무건조를 거쳐 생산된 시료로써 현재 생산에 적용되는 살균
이나 건조조건에서 일어나는 유청단백질의 변성 정도는 활성펩타이드의 생산에 크게
영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 앞서 제시한 결과와 같이 단백질의 변
성도가 증가할 경우 활성펩타이드 생산의 적합도가 감소하였다. 유청분말의 경우 단
백질의 함량이 낮고(약 10%) 유당의 비율이 높기 때문에 가수분해 공정을 진행하기가
용이하지 않았으며 대량 생산 공정을 위해서는 한외여과(ultrafiltration) 및 diafiltration
을 이용하여 초기 시료의 단백질 함량을 증가시키는 반면 점도 증가의 원인이 되는 유
당함량을 줄일 수 있는 막분리 시스템의 도입이 바람직한 것으로 판단된다.

효소적 가수분해를 이용한 단백질 분해과정은 사용되는 효소의 특이성 및 가
수분해정도에 따라 생성되는 펩타이드의 크기 및 구성아미노산의 종류가 달라지게 되
므로 적합한 효소의 선정과 가수분해 조건의 최적화가 필요하다. 본 연구에서는 일차
적으로 여러 가지 효소를 가지고 가수분해를 실시하여 활성펩타이드의 생성 여부를
조사하였으며 적합한 효소(Flavourzyme)를 선발하고, 활성펩타이드 생산공정의 최적
화 조건(온도와 시간)은 반응표면분석법을 이용하여 산출하였다. 이러한 효소적 가수
분해공정의 scale up을 위해서는 batch type의 membrane ultrafiltration reactor나
continuous type의 stirred-tank membrane reactor의 사용이 가능할 것으로 생각된다.

펩타이드의 정제과정에서는 일차적으로 원심분리를 이용하여 분해 되지 않은
단백질을 침전시켰으며, 대량연속생산의 경우 적정 molecular cut off를 가진 막을 이
용한 한외여과에 의한 농축을 고려할 수 있다. 이 후 얻어진 펩타이드를 직접 건조할
경우 순도가 낮은 분말을 얻을 수 있으며 순도를 높이기 위한 방안으로써 cation
exchange chromatography를 실시하여 펩타이드를 분획하고 활성이 높은 펩타이드 분
획을 제조하였다. 이 같은 펩타이드의 정제공정은 대량생산 공정의 실제적인
rate-limiting step으로서 효율적인 공정을 제시하고자 에탄올의 농도를 달리하여 펩타
이드의 용매침전을 시도하고 펩타이드 정제를 위한 유효성을 검토하였다. Fig. 24의
결과에서 나타난 바와 같이 30%의 에탄올 침전법을 이용한 경우 활성펩타이드의 효
율적인 회수가 가능한 것으로 나타났으며 따라서 에탄올 침전에 의한 활성펩타이드의
회수 방법은 활성펩타이드의 대량생산에 적용이 가능할 것으로 판단된다.

활성펩타이드 분획에 cation exchange chromatography를 사용하는 경우 활성분획

의 용출을 위해 염(NaCl)이 사용되기 때문에 용출된 펩타이드 분획으로부터 염을 제거하기 위한 desalting chromatography나 투석과 같은 공정이 필요하게 되며 용매침전의 경우 용매를 휘발하기 위한 농축장치가 요구된다.

농도 활성분획을 얻은 후에는 동결건조나 분무건조 방법을 이용하여 분말화가 가능하다. 투입된 초기 시료의 단백질 함량을 100%로 하고 각 단계별 회수된 단백질(펩타이드)의 수율(%) 변화를 나타낸 결과는 Fig. 29와 같다. 각 단계별 수율은 투입된 초기 시료의 양 및 연속공정의 설계 유무에 따라 차이가 나타날 수 있으나 현재 실험에 의해 ion exchange chromatography를 이용하여 정제한 경우 최종적으로 얻어진 수율은 초기 시료의 단백질 함량을 기준으로 1.7%였으며, 에탄올침전을 이용하여 활성분획을 회수한 경우 21%로 약간 높게 나타난 반면 활성에는 큰 차이가 없었다.

최종적으로 Pilot scale의 대량생산공정에 있어서는 처리해야 시료의 양이 증가함에 따라 time factor의 고려가 필수적이며 분리 및 정제가 실험실 규모에 비하여 명확치 않게 되는 점을 고려하여 그 처리 규모를 선택하여야 할 것으로 생각된다.

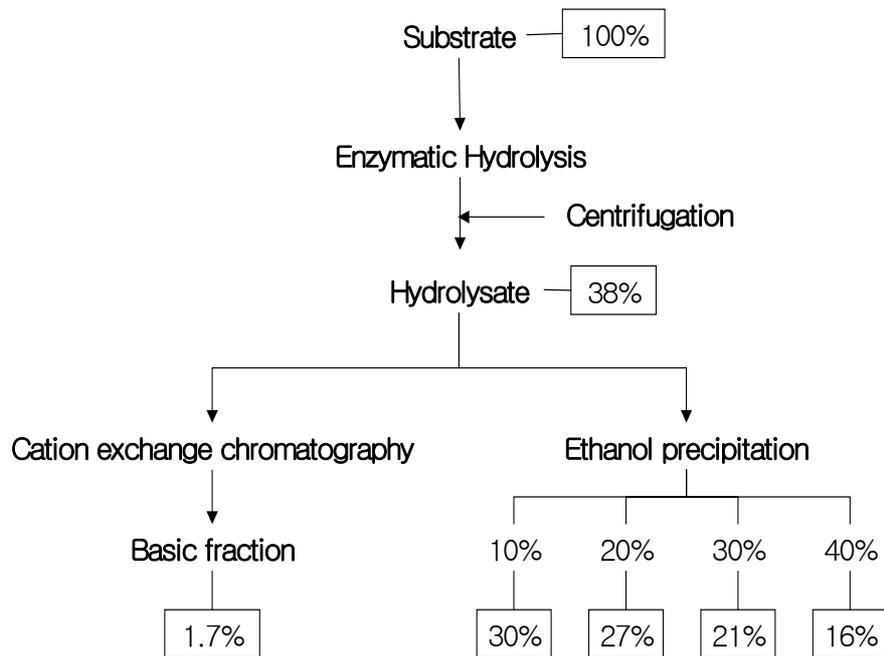


Fig. 29. Changes in yield during the preparation of osteoblast stimulating peptide.

바. 활성펩타이드의 물리화학적 특성

단백질의 효소적 가수분해는 단백질의 구조와 형태를 변화시킬 뿐만 아니라 물리화학적 성질을 함께 변화시킨다. 일반적으로 단백질의 효소적 가수 분해 시 일어나는 특징적인 변화에는 분자량의 감소(및 그에 따른 항원성의 저감), 순 전하의 증가, 단백질의 내부에 위치하던 소수성 그룹의 노출 등이 있으며(Panyam and Kilara, 1996) 분해된 단백질의 구조 및 아미노산 조성 그리고 단백질의 분해 정도에 따라 단백질 효소분해물은 가수분해 전과 다른 물리화학적 특성을 나타낸다. 본 연구에서는 다양한 외부적 환경(pH, 온도)에서 일어나는 활성유청단백질 가수분해물의 물리화학적 특성을 가수분해 전의 WPC와 비교하여 조사하였다.

1) 용해도(solubility)

용해도는 식품소재로서의 활용도를 평가하는데 있어서 가장 기본적인 특성으로서 활성펩타이드를 음료 등의 다양한 pH를 가진 용액상의 매질에 응용할 경우 그 안정성을 예측하는데 중요한 지표가 된다. 활성 유청단백질 분해물의 제조에 기질로 사용된 WPC의 용해도는 Fig. 30에 나타난 바와 같이 용매의 pH에 따라 약 83-97%의 용해도를 나타냈으며 pH4-7 구간의 용해도는 나머지 구간에 비하여 유의적으로 낮았다($P < 0.05$).

일반적으로 단백질의 용해도는 등전점에서 최소이며 pH가 등전점에서 멀어짐에 따라 증가하는 경향을 나타내는데 유청단백질의 주성분인 β -lactoglobulin과 α -lactalbumin의 등전점이 5.2임을 고려할 때 일반적인 단백질의 용해도 변화와 일치하였다. 활성 유청단백질 분해물은 측정된 pH3-9의 전 구간에서 95% 내외의 높은 용해도를 나타냈으며 WPC의 용해도와 비교할 때 pH4-7의 구간에서는 유의적으로 높은 용해도를 보였다.

열처리하는 대부분의 식품 제조 공정에서 필수적으로 사용되므로 85°C에 10분간 가열 처리 후 일어나는 용해도의 변화를 조사하였다(Fig. 31). 가열 처리 후 측정된 WPC의 용해도는 pH 4에서 43%로 감소하여 최소의 용해도를 나타냈으며 pH가 증가함에 따라 가열 후 용해도는 유의적으로 증가하였다. 활성 유청단백질 분해물의 용해도는 최소의 용해도를 나타낸 pH 5 구간을 제외하고는 다른 처리구에서 유의적인 차이가 발견되지 않았으며 pH5 구간의 용해도 역시 약 90% 정도로 유지되어 가열 시에도 용해도는 매우 높게 유지되었다. 유청단백질은 70°C 이상 가열 시 비가역적인 단백질의 변성이 일어나며(Schmidt et al., 1984) 변성 과정에서는 단백질의 사슬의 풀림 단계 거쳐 단백질-단백질 간의 인력이 증가하는 응집

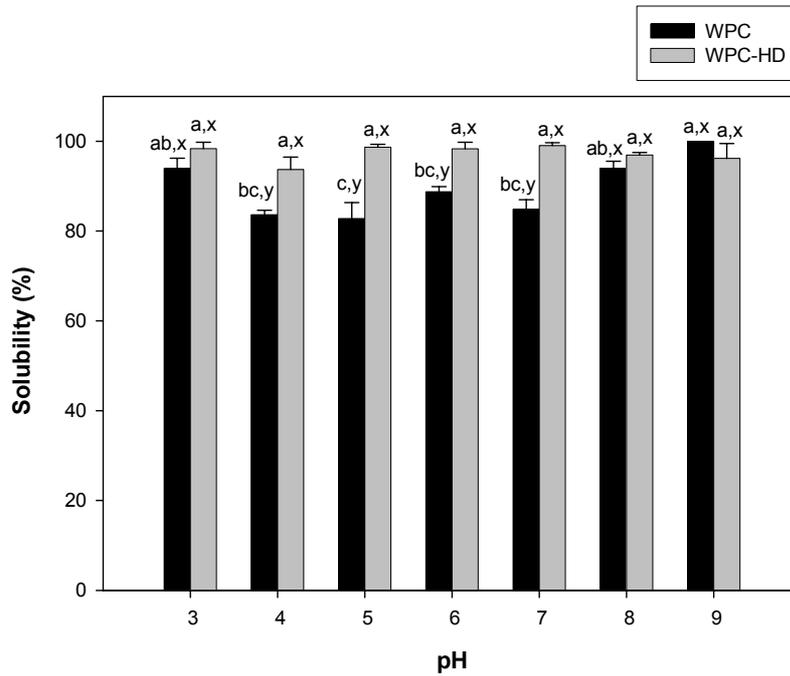


Fig. 30. Changes in solubility of whey protein hydrolysate.

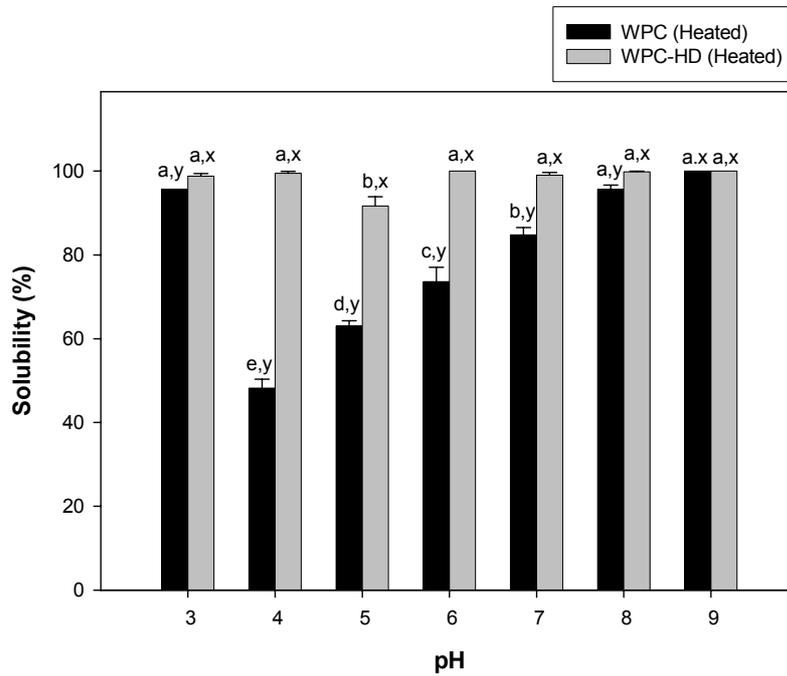


Fig. 31. Heat-induced changes in solubility of whey protein hydrolysate.

현상(aggregation)이 일어난다. 이러한 단백질의 응집은 단백질-수분 간의 상호작용을 감소 시킴으로써 용해도의 감소를 초래한다.

가열 된 WPC의 용해도와 비교할 때 활성 유청단백질 분해물에서 관찰 된 높은 용해도는 가수분해 시 생성 된 펩타이드의 전체 전하의 증가가 단백질간의 척력에 기여함으로써 펩타이드(단백질)간의 응집을 감소시키기 때문인 것으로 판단되며 이와 같은 결과는 열 변성된 WPI(whey protein isolate)를 trypsin으로 가수분해 시킬 경우 용해도의 증가가 일어난다는 보고와 유사한 경향을 보였다(Mutilangi et al., 1995). 이상의 결과를 근거로 할 때 활성유청단백질 분해물은 가열 전 후에 관계없이 pH 3-9의 영역에서 높은 용해도를 나타냄으로써 음료 등의 액상 제품에 높은 응용성을 가질 수 있는 것으로 판단된다.

2) 혼탁도(turbidity)

혼탁도는 시료 용액의 투명도(transparency)를 나타내는 기준으로 활용될 수 있다. 제품의 투명한 정도는 용액상의 제품을 투명한 용기에 넣어 판매하는 경우 소비자의 제품에 대한 선호도에 영향을 미칠 수 있으며 시료 내 함유하는 불용성 응집물의 양이 늘어남에 따라 증가하게 되므로 시료 농도의 증가에 따른 응집물의 형성 여부를 관찰할 수 있다. Fig. 32에 제시한 바와 같이 활성 유청단백질 분해물은 같은 농도의 WPC에 비하여 혼탁도가 유의적으로 낮은 것으로 나타났으며 시료의 농도 증가에 따른 혼탁도의 증가 경향도 매우 완만하였다. 시료를 가열한 경우에는(80°C, 20분) 두 종류의 시료에서 모두 혼탁도가 증가하는 경향이 나타났으며 pH 4에서 WPC를 가열한 경우에는 혼탁도가 급격히 증가하여 8 mg/mL 이상의 농도에서는 흡광도의 측정이 불가능하였다. 활성 유청단백질 분해물을 pH 4의 조건에서 가열한 경우에도 혼탁도는 가열 전의 WPC보다 훨씬 낮게 유지되어 높은 투명성을 보였다.

3) 점도(viscosity)

단백질 용액의 유동 특성은 단백질 구성성분(아미노산 조성), 분자량, 크기, 모양, 수화도 및 분자 간 상호작용 등 다양한 요인에 따라 변화하며 이러한 단백질 자체에서 기인한 요인들은 단백질 농도, 온도, pH, 이온강도, 가공 조건 등의 외적 요인에 따라 영향을 받는다(Tung, 1978).

WPC와 활성분획의 pH에 따른 유동 특성의 변화를 조사하기 위하여 power law 모델을 이용하여 점조성지수(consistency index)와 유동성지수(flow behavior index)를 측정하

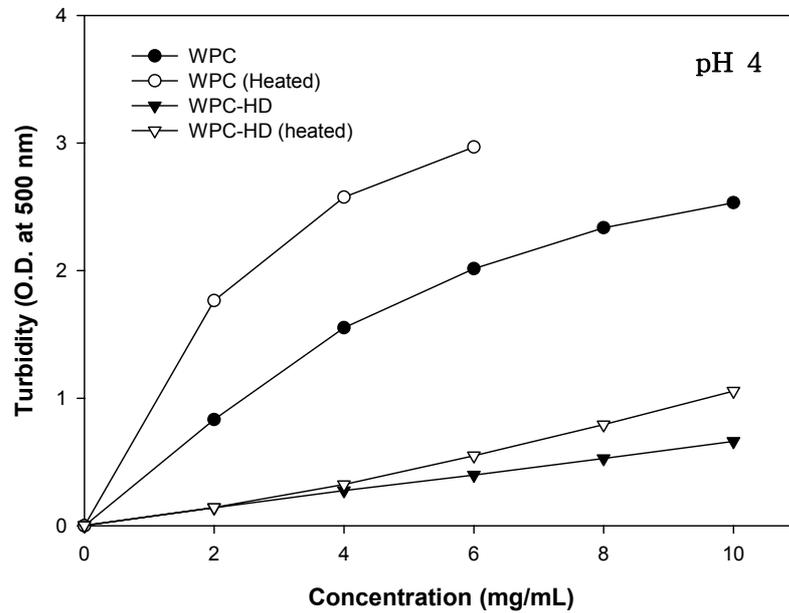
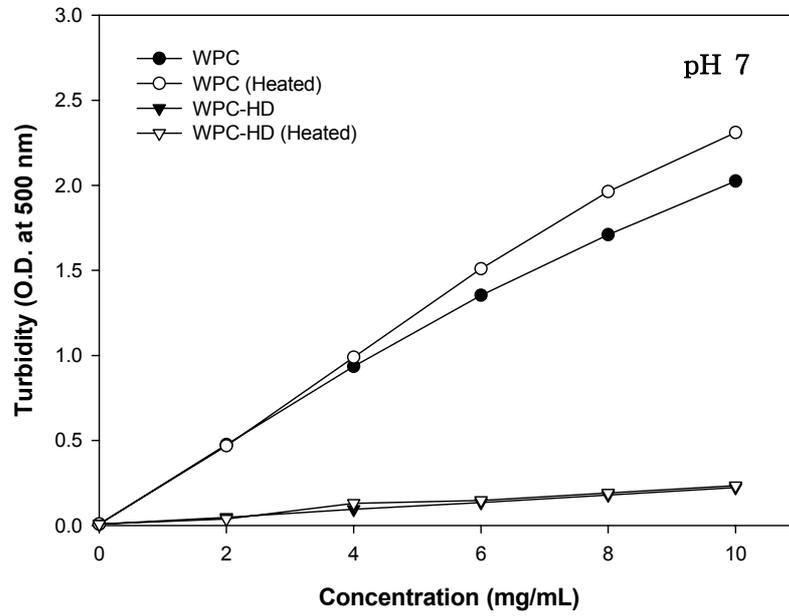


Fig. 32. Changes in turbidity of whey protein hydrolysate at pH 7 and pH 4.

였다. 두 시료는 모두 유동성지수가 1보다 작아 비뉴턴 유체 중 의사가소성(shear thinning)을 나타내었으나 WPC의 유동성지수는 0.9 이상으로써 실제적으로 뉴턴유체의 흐름에 근접한 유동 특성을 보였다(Fig. 33). WPC의 유동 특성은 pH의 변화에 따라 큰 차이를 보이지 않은 반면 활성 유청단백질 분해물의 경우 pH 6-7의 구간에서 유동지수의 뚜렷한 감소를 나타냄으로써 의사가소성이 증가하는 결과를 나타냈다.

일반적으로 단백질 농도 10% 이상에서 나타나는 의사가소성은 단백질 분자가 변형되어 흐름의 방향으로 점진적으로 재편성 되거나 수소결합이나 이온결합 등의 상대적으로 약한 화학결합이 붕괴되어 단백질 응집체 또는 network이 해리(dissociation)되는 데 기인한다고 할 수 있다(Bazinet et al., 2004). 의사가소성이란 층밀립변형력(shear force)이 증가할 때 점도의 감소가 일어나는 현상이므로 pH 6-7에서 일어나는 유동성지수의 감소는 pH 6-7 영역에서 친수성 펩타이드의 이온화 성향이 증가함으로써 척력을 발생시키기 때문인 것으로 추정할 수 있다.

WPC의 점조성지수는 pH 3에서 유의적으로 높은 것으로 나타났으며 나머지 pH 구간에서는 뚜렷한 변화를 나타내지 않았다(Fig. 34). pH 4 보다 낮은 산성 pH 영역에서 일어나는 WPC의 점도 감소는 Rattery and Jelani (1995)의 보고와 일치하였으며 이 같은 변화의 원인은 산에 강한 β -lactoglobulin과는 달리 pH 3.5 이하의 산성 pH 조건에서 α -lactalbumin으로부터 칼슘이 용해되어 변성되기 때문인 것으로 설명할 수 있다(Paulsson et al., 1985). 단백질의 변성은 빈번히 단백질 수화의 증가를 일으키며 소수성 아미노산의 표면 노출을 초래하여 궁극적으로는 greasy texture를 형성하는 것으로 보고 되어 있다(Rattery and Jelani, 1995).

활성 유청단백질 분해물의 경우에는 pH 6-7 영역에서 점조성지수의 유의적인 증가가 관찰되었으며 이 영역의 점조성 지수는 WPC와 유사하였다. 활성 유청단백질 분해물의 점조성지수 증가는 앞서 언급한 바와 같이 펩타이드의 이온화 경향이 증가함에 따라 수화능력이 증가하는 것과 관련이 있는 것으로 생각 된다.

4) 겔 형성능력(gelling property)

겔이란 기계적 강도와 점탄성을 가지는 구조적 network을 의미하며 3차원적인 network 내에 수분을 포집한 반고체 형태를 나타낸다. 겔의 형성은 가열, pH 또는 이온강도와 같은 외부 stress에 의하여 단백질-수분간의 상호작용은 감소하고 단백질간의 상호작용

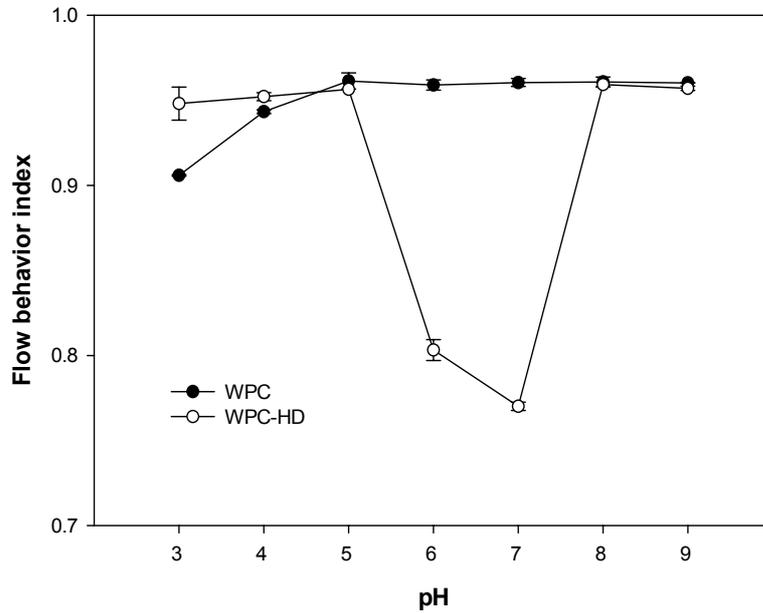


Fig. 33. Changes in flow behavior index of whey protein hydrolysate.

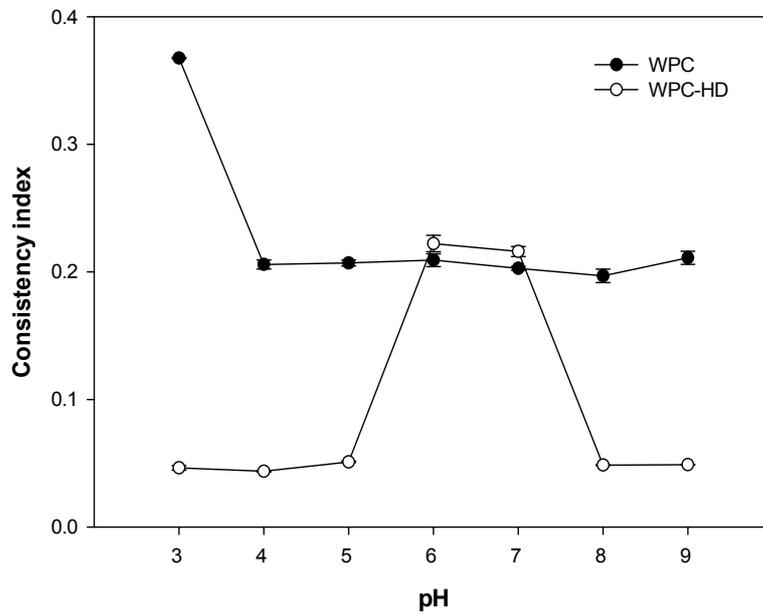


Fig. 34. Changes in consistency index of whey protein hydrolysate.

이 증가하여 형성되지만 과도하거나 불규칙한 단백질간의 상호작용은 탄력 있는 겔을 형성하지 못하고 단백질의 응고를 일으킨다((Panyam and Kilara, 1996).

Fig. 35는 pH 조건에서 WPC의 겔강도(hardness)와 탄성(elasticity)을 측정한 결과이다. WPC는 시료의 농도가 25%(w/w) 일 때 탄력 있는 겔을 형성하였으나 활성 유청단백질 분해물은 모든 pH 영역에서 겔 형성능력을 상실하였다. Mahmoud(1994)는 단백질의 가수분해 시 겔 형성 능력이 감소하는 이유는 가수분해물의 소수성이 저하되는 반면 증가된 가수분해물의 전하가 펩타이드간의 척력을 증가시키기 때문이라고 보고하였다. 또한 Ju et al. (1995)은 *Bacillus subtilis protease*를 이용하여 유청단백질을 제한적으로 가수분해 시킬 경우(DH=2.3%) 중성 pH에서 겔형성능력과 겔의 강도가 증가하나 가수분해율이 6.7%로 증가하였을 때 겔을 형성하지 못하였다고 보고하여 가수분해율이 증가함에 따라 겔 형성능력은 감소하는 것으로 판단된다.

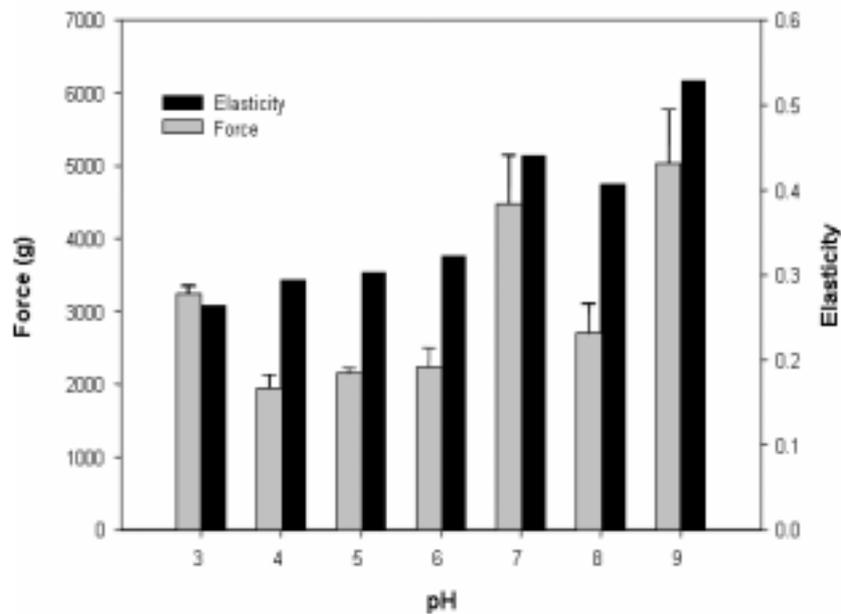


Fig. 35. Changes in hardness and elasticity of whey protein gels.

5) 유화활성(emulsion activity)

대부분의 식품은 지방을 함유하고 있으며 수중유적(oil in water) 유화물(emulsion)은 다양한 식품에서 발견되는 형태이다. 일반적으로 안정한 유화물을 만들기 위해 유화제를 사용하기도 하나 단백질을 구성하는 아미노산은 친수성과 소수성을 모두 가지고 있어 계면장력(interfacial tension)을 저하시킬 수 있으므로 유화능력을 나타낸다. 따라서 단백질의 유화능력은 식품소재로서의 단백질이 가질 수 있는 중요한 물리화학적 성질로 간주될 수 있다. 유화능력은 다양한 방법으로 측정할 수 있으나 아직 표준화된 방법은 없는 실정이며 본 연구에서 유화능력의 지표로 측정한 유화활성도(emulsion activity index)는 안정한 유화물에서 일정량의 단백질을 차지하는 계면의 면적을 표시하는 방법으로 유화활성도가 높으면 유화능력이 우수함을 의미한다.

Fig. 36은 각 pH 영역에서 WPC와 활성 유청단백질 분해물의 유화활성도를 조사한 결과이다. WPC는 pH 6 이상의 알칼리영역에서 산성 영역보다 유의적으로 높은 유화활성도를 나타낸 반면 활성 유청단백질 분해물은 pH에 따라 유화활성도의 유의적 변화가 관찰되지 않았으며 pH 3을 제외 하고는 모든 pH 영역에서 WPC 보다 낮은 유화활성도를 나타냈다. WPC와 활성유청단백질 분해물을 가열한 경우(85°C, 15분)에도 WPC와 활성유청단백질 분해물의 유화활성도는 가열 전의 경우와 매우 유사한 경향을 보였다(Fig. 37).

유화물은 열역학적으로 불안정한 상태이므로 시간이 경과함에 따라 안정성을 상실하게 되며 최종적으로는 수용액층과 기름층이 분리되는 상의 붕괴가 일어난다. 따라서 유화능력의 측정 시에는 유화활성과 함께 유화안정성의 측정이 필요하며 유화활성과 유화안정성은 반드시 비례적인 관계를 나타내지는 않는다. Fig. 38에 나타낸 바와 같이 WPC의 유화안정성은 WPC의 등전점인 pH 5 구간을 제외하고는 모든 영역에서 활성 유청단백질 분해물보다 우수하였다.

유화능력에 관여하는 단백질의 특성 및 기여도는 아직 명확히 설명되고 있지는 않지만 소수성, 단백질 구조의 성김 정도(flexibility), 아미노산 조성, 분자량 등이 관여하는 것으로 알려져 있다(Klemmaszewski et al., 1992). Chobert et al.(1998)은 trypsin을 이용하여 유청단백질의 제한적인 가수분해(DH ≤ 5.9%)를 실시한 경우 가수분해 전보다 유화활성이 향상된다고 하였으나 유화활성을 유지하기 위해서는 가수분해 된 단백질의 분자량이 최소한 5,000 Da 이상이였다고 보고하여 가수분해율이 증가됨에 따라 유화활성도는 감소함을 시사하였다. 또한 가수분해 시 사용 된 효소의 기질 특이성에 따라 생성 된 펩타이드의 profile이

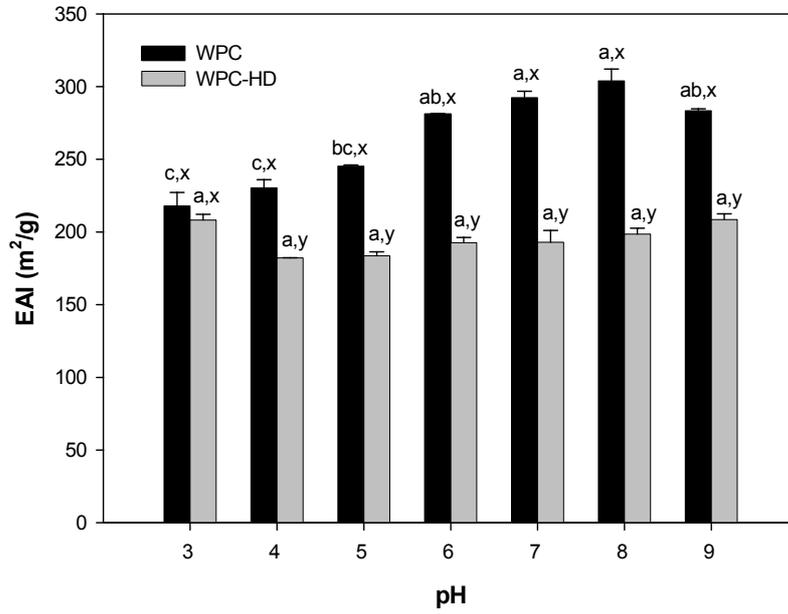


Fig. 36. Changes in emulsion activity of whey protein hydrolysate.

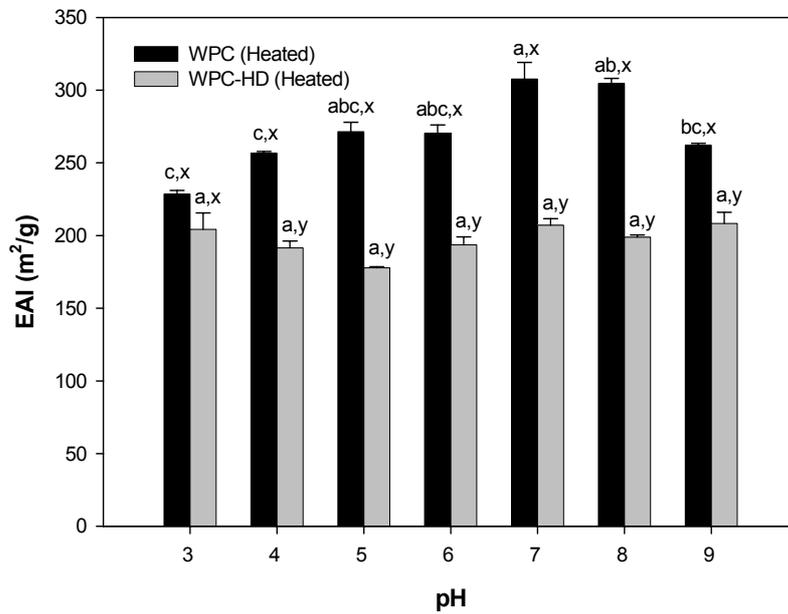


Fig. 37. Heat-induced changes in emulsion activity of whey protein hydrolysate.

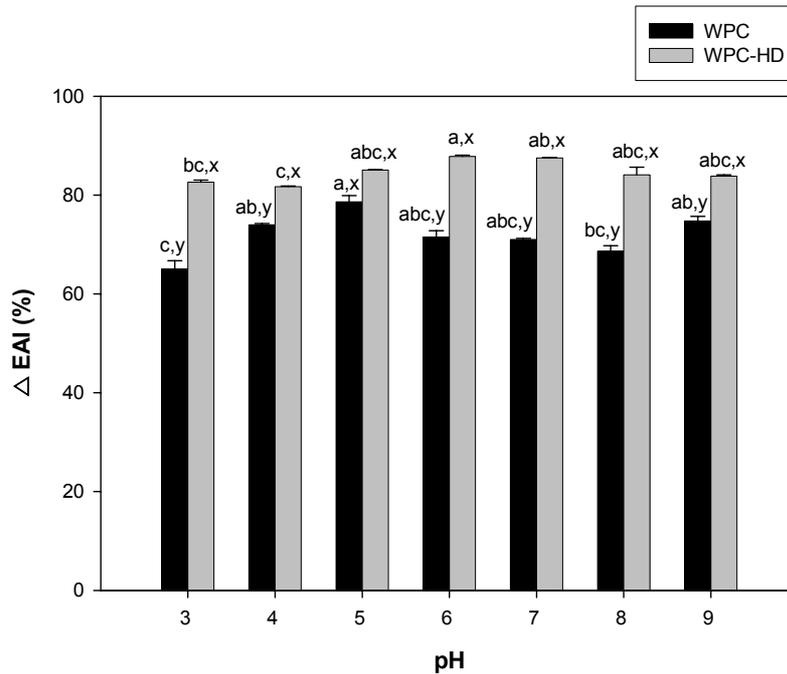


Fig. 38. Changes in emulsion stability of whey protein hydrolysate.

변화하게 되므로 가수분해 여부 및 분해율에 따라 생성된 펩타이드의 물리화학적 성질을 예측하고 일반화하기는 어려운 것으로 판단된다.

사. 활성펩타이드의 관능적 특성

효소에 의한 단백질분해는 분자량이 작은 펩타이드 및 유리아미노산(free amino acids)을 생성하므로 물리화학적 특성 이외에 관능적 특성을 변화시킨다. 따라서 펩타이드의 생리적 기능성 이외에 관능적 특성은 제품의 이용성에 중요한 영향을 미칠 수 있으므로 본 연구에서는 활성 유청단백질 분해물의 관능적 특성을 조사하였다. 관능검사는 국민대학교에 재학 중인 18-30세의 남녀 52명을 대상으로 하였으며 관능검사 방법을 충분히 숙지시킨 후 평가를 실시하였다.

관능검사를 위한 제품의 형태로서 시판되는 음료 중 맛의 강도가 가장 약

하며 색을 나타내지 않는 아미노산음료를 사용하였으며 아미노산음료에 0.5%, 1% 수준으로 활성분획을 용해시켜 기호도(외관, 맛, 전반적기호도) 및 맛의 강도(단맛, 쓴맛, 신맛, 짠맛, 감칠맛)를 9점 척도로 평가하였다.

Fig. 39에 나타난 바와 같이 아미노산음료에 활성 유청단백질 분해물을 첨가한 경우 기호도 항목은 첨가수준이 증가함에 따라 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$). 외관의 경우 활성유청단백질 분해물의 첨가가 색이나 음료의 성상에 전혀 영향을 미치지 않았으므로 기호도에 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상되는 요인은 혼탁도로 가정하고 대조구로 사용한 아미노산 음료에 관능검사 시와 동일한 수준으로 활성유청단백질 분해물을 첨가한 후 혼탁도의 변화를 관찰하였다(Fig. 40).

대조구로 사용한 아미노산 음료의 흡광도(500 nm)는 0.129로 나타났으며 활성유청단백질 분해물을 첨가한 경우 혼탁도가 각각 0.709와 0.799로 증가하여 혼탁도의 뚜렷한 증가가 관찰되었다. 한편 동일한 시료를 증류수에 용해시킨 경우의 혼탁도는 각각 0.137과 0.275로써 0.5% 수준의 첨가 시는 대조구로 사용한 아미노산 음료의 혼탁도와 유사한 수준으로 나타났다. 이와 같은 결과는 활성유청단백질 분해물의 첨가 시 대조구의 아미노산과 화학적인 반응이 일어나는 것으로 추측할 수 있으며 증류수 용해된 활성유청단백질 분해물의 흡광도가 기존 아미노산 음료 제품의 수준임을 고려할 때 외관기호도의 감소는 실제 제품에 활용 시 문제가 되지 않을 것으로 판단된다.

맛기호도의 감소요인을 설명하기 위하여 단맛, 신맛, 쓴맛, 짠맛, 감칠맛의 강도를 평가한 결과는 Fig. 41과 같다. 통계적 분석 결과 신맛을 제외하고는 다른 모든 맛에서 유의적인 변화를 보이지 않았다. 신맛의 경우 활성유청단백질 분해물의 첨가에 의해 신맛의 강도가 유의적으로 감소하였으며 그 감소 수준은 첨가되는 농도에 의존적인 변화를 나타냈다.

신맛 강도의 감소가 화학적인 변화와 연결될 수 있는지를 조사하기 위하여 각 조건에서 증류수와 대조구의 pH를 측정된 결과는 Fig. 42와 같다. 대조구의 pH는 3.5를 나타냈으며 활성 유청단백질 분해물을 첨가한 경우 시료의 pH가 유의적으로 증가하여 1% 수준으로 첨가한 경우 시료의 pH는 4.5로 상승하였으며 증류수에 활성 유청단백질 분해물을 첨가한 경우에는 보다 큰 pH의 상승이 관찰되었다. 신맛의 본질은 산의 맛으로 인정되는 바 관능검사에서 나타난 신맛 강도의 감소효과는 pH의 상승에

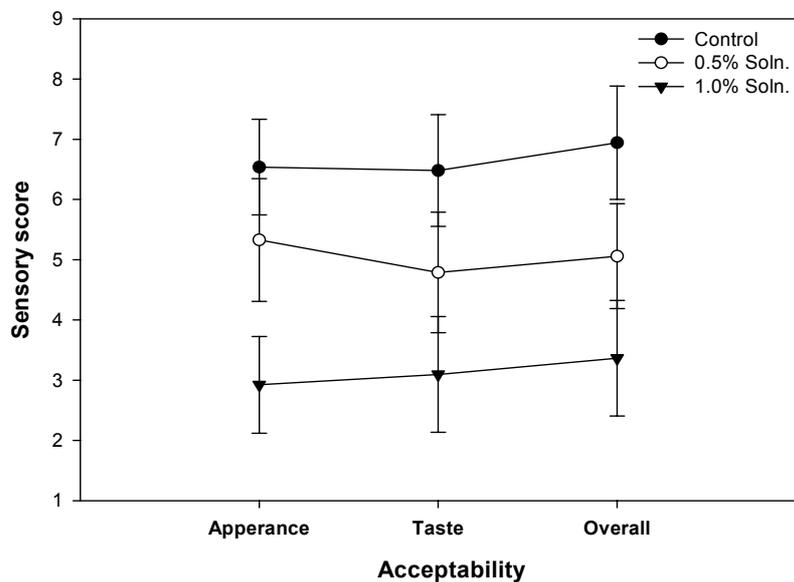


Fig. 39. Acceptability for whey protein hydrolysate beverage.

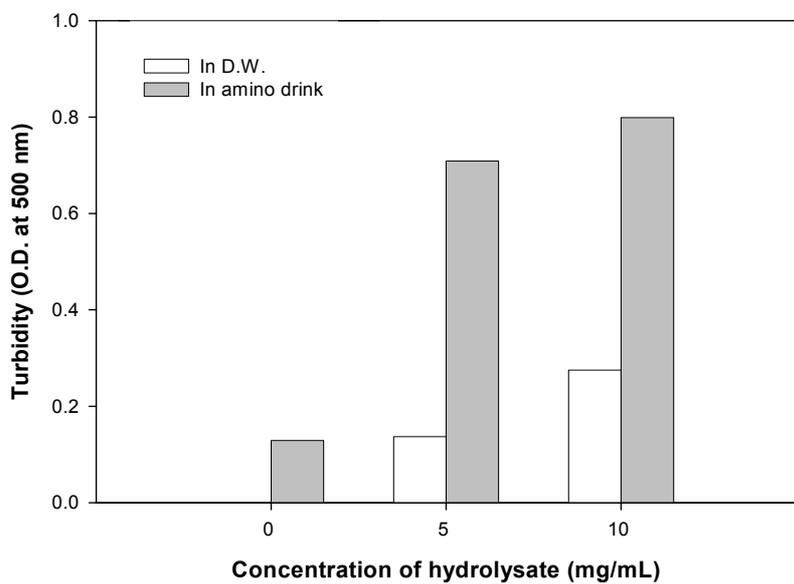


Fig. 40. Turbidity of tested whey protein hydrolysate beverage.

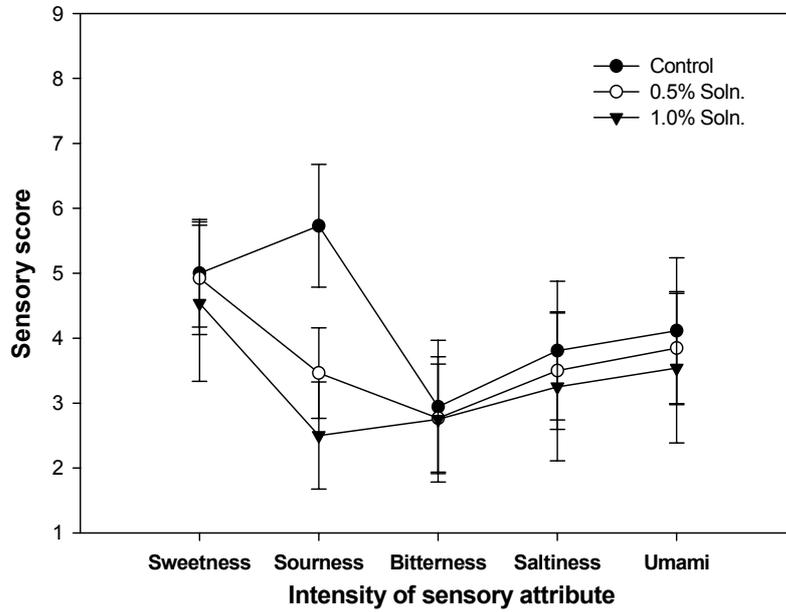


Fig. 41. Perceived intensity of sensory attributes for whey protein hydrolysate beverage.

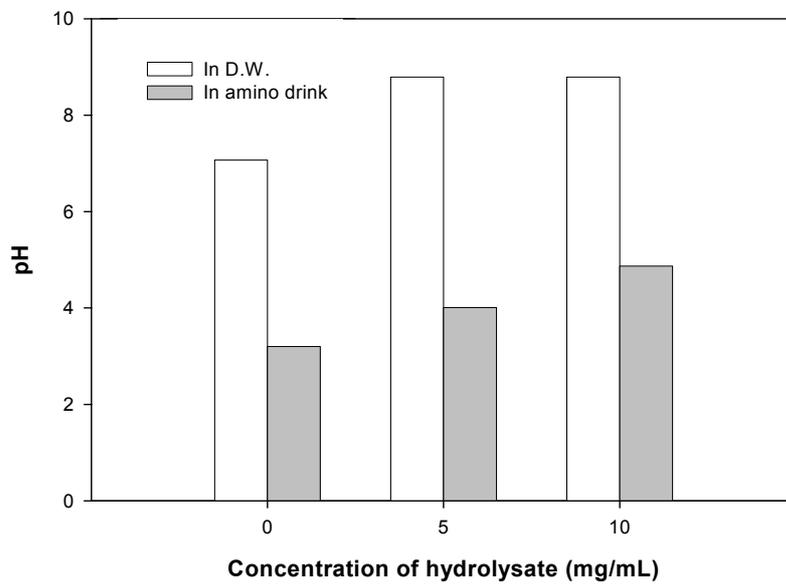


Fig. 42. pH of tested whey protein hydrolysate beverage.

기인한 것으로 설명할 수 있다. 또한 이 결과는 활성유청단백질 분해물이 염기성을 나타내는 아미노산을 많이 함유하고 있음을 의미한다고 할 수 있다.

이상의 결과를 맛과 전반적 기호도의 감소요인과 연관지어 볼 때 다음의 고찰이 가능하다. 먼저 단맛이나 기타 향미성분이 강하지 않은 스포츠음료 또는 아미노산 음료의 경우 신맛의 강도 변화는 전반적인 맛 기호도와 전반적인 기호도에 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각되며 신맛이 감소함에 따라 음료의 청량감이 떨어질 수 있으므로 맛과 전반적인 기호도의 감소가 나타난 것으로 판단된다. 이와 같은 문제점은 음료 제품의 개발 시 구연산 등을 첨가하여 신맛 감소를 제어하는 경우 맛과 전반적 기호도의 향상을 기대할 수 있으며 더불어 아미노산이 포함되지 않은 대조구를 이용하여 정확한 관능 특성의 분석이 필요할 것이다.

일반적으로 단백질 가수분해를 실시한 경우 가장 빈번하게 나타나는 바람직하지 않은 관능적 특성의 변화는 쓴맛의 생성이다. 쓴맛 생성의 원인은 단백질 내부에 위치하던 소수성 아미노산이 단백질이 분해 됨에 따라 외부로 노출되기 때문인 것으로 알려져 있으며(Ishibashi et al., 1988) 유리아미노산 보다는 펩타이드의 경우 쓴맛을 빈번히 발생시킨다. 활성 유청단백질 분해물은 관능적 특성의 분석 결과 유의적인 쓴맛의 생성이 나타나지 않는 것으로 나타나 쓴맛 생성을 억제하기 위한 별도의 공정은 불필요하였다. 만약 쓴맛의 강도를 억제하고자 할 경우에는 인산 등을 제품에 첨가하여 쓴맛을 감추는 방법을 사용하거나 활성탄 등을 이용하여 소수성 아미노산 등을 흡착하는 방법을 이용할 수 있다. 그러나 전자의 경우 침전을 일으킬 수 있는 위험성이 있으며 후자의 경우는 펩타이드의 생리적 기능성의 감소를 초래할 수 있다. 앞서 제시한 쓴맛의 평가 결과에서와 같이 활성 유청단백질 분해물은 1%의 첨가수준에서도 쓴맛이 대조구와 매우 유사한 수준으로 유지되었다.

아. 저장기간 중 시제품의 활성변화

최적화된 생산 공정으로 활성 유청단백질 분해물 시제품을 제조하고 다양한 온도에 저장하며 저장 기간에 따른 활성의 변화를 측정된 결과는 Fig. 43과 같다. 조골 세포의 성장 촉진 활성은 4℃에서 저장 시에는 저장 기간 동안 변화가 나타나지 않았으며 약 90%의 활성을 유지하였다. 활성 유청단백질 분해물을 20℃에서 저장 시에는 2주 경과 후부터 활성이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며 30℃로 저장

온도가 높아짐에 따라 시제품 활성 감소의 폭은 증가하였다($P < 0.05$).

협동기관에서 생산한 발효분해물을 저장한 경우에도 조골세포 성장 촉진 활성은 저장 온도가 높아짐에 따라 유의적으로 감소하여 활성 유청단백질 분해물과 유사한 변화를 나타냈다(Fig. 44). 그러므로, 활성 유청단백질 분해물과 발효분해물의 상온 저장은 바람직하지 않은 것으로 판단되며 4°C 이하의 온도에서 저장하거나 -20°C 이하의 초 저온 냉동저장 방법을 사용하면 활성 감소를 효율적으로 방지할 수 있을 것으로 생각된다.

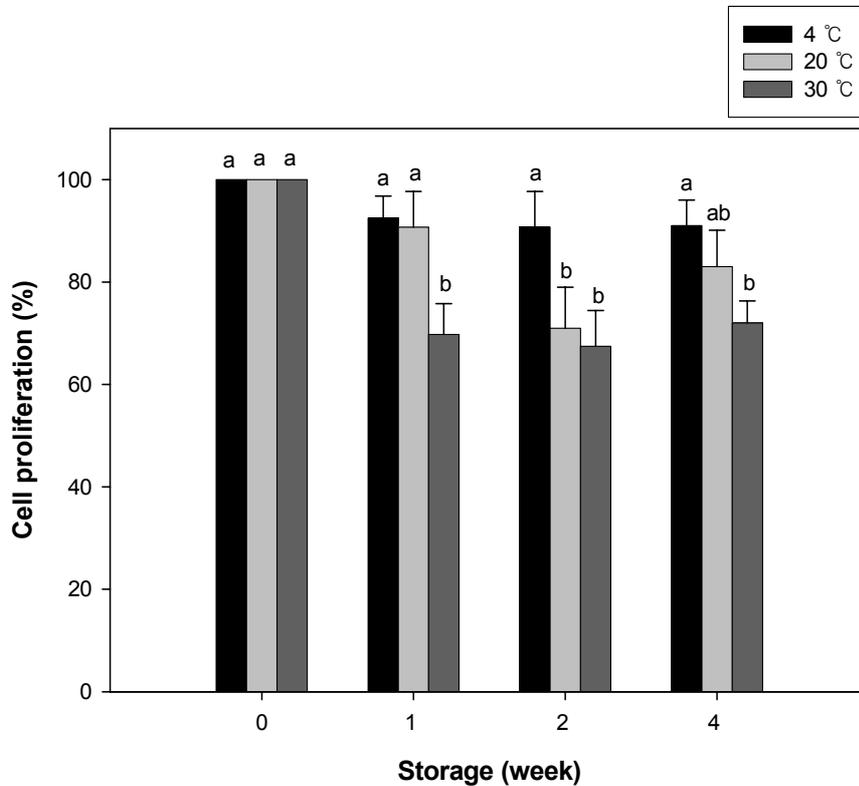


Fig. 43. Changes in osteoblastic cell proliferation stimulating activity of whey protein hydrolysate during storage.

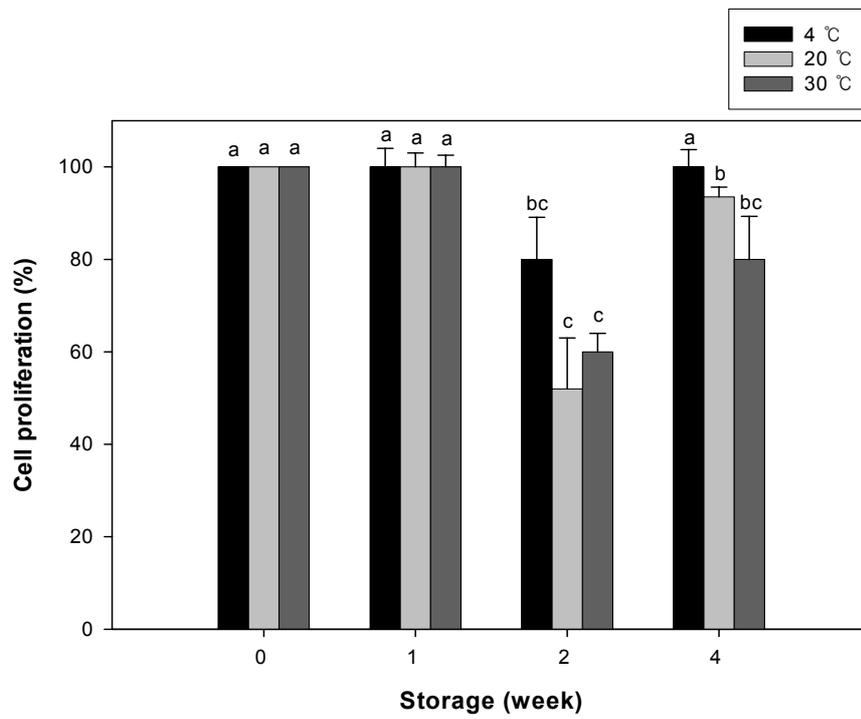


Fig. 44. Changes in osteoblastic cell proliferation stimulating activity of *L. casei* 393 fermented products during storage.

제 2 절 협동과제

: 미생물발효에 의한 우유단백질 분해물의 분별 및 생체 내·외에서의 골강도 증진효과 검증

1. 연구수행 방법

가. 단백질 분해효소 생산 미생물의 선발 및 유단백질 분해물의 분별

1) 사용 균주

단백질 분해 효소를 생산하는 미생물 선발을 위하여 사용된 유산균과 효모 균주는 총 33종으로 Table 10과 같다. 모든 균종은 접종 전 2대 계대 배양하였으며 10% 환원탈지유에 성장 촉진 인자인 2% glucose, 1% mineral solution을 첨가하여 제조된 배지에 2% 접종하여 24 시간 동안 배양하였다.

2) 유단백질의 정량

시료의 단백질의 농도는 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하여 Folin-Lowry 방법(Lowry et al., 1951)으로 측정하였다.

3) 펩타이드 농도의 측정

가) Free amino nitrogen (FAN)

사용된 균주의 단백질 분해 효소 작용으로 인한 단백질 분해도를 측정하기 위하여 free amino nitrogen(FAN)을 정량하였다. 배양 후 원심분리를 실시하여 얻은 상등액 시료 2 ml를 각각 2개씩 cap tube에 분주한 후 1 mL의 ninhydrin solution(3.94 g Na₂HPO₄, 6 g KH₂PO₄, 0.5 g ninhydrin, 0.3 g fructose / 100 ml)을 첨가하고 16 분 동안 끓는 물에서 중탕 가열하였다. 가열 후 20 분 동안 냉수에 방냉 후 5 mL의 dilution solution(2 g KIO₃, 400 ml, 96% ethanol 600 ml)을 tube에 첨가한 다음 완전히 혼합하고 30 분 이내에 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 질소 함량은 standard curve를 작성하여 측정하였으며 NH₄OH 표준용액(10%)은 29.7%

Table 10. Bacterial strains used in this study

	<i>acidophilus</i>	A4
	"	GP2A
	"	GP4A
	"	GP1B
	"	NCFM
	"	107A
	"	30SC
	"	606
	"	4356
	"	4962
	"	43121
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	M5
	"	393
	"	910
	"	9018
	<i>helveticus</i>	L.H
	"	LO518
	"	1042
	<i>plantarum</i>	B-1
	"	EH2
	"	LP
	"	M-2
	"	11931
	<i>rhamnosus</i>	7469
<i>Lactococcus</i>		449
	<i>lactis ssp. lactis</i>	11454
<i>Leuconostoc</i>		K1
		W20
<i>Saccharomyces</i>	<i>fragilis</i>	C1
	"	C2
	<i>cerevisae</i>	IFO1661
<i>Kluyveromyces</i>	<i>fragilis</i>	C-1041
	"	Y-1156

NH₄OH 50.5 ml와 증류수 99.5 ml를 혼합한 후 10⁴배로 희석하여 제조하였다.

나) Non-protein nitrogen (NPN)

효소의 분해 작용에 의해 생성되는 NPN의 함량은 24% TCA 용액을 사용하여 측정하였다. 배양 후 원심분리를 통해 얻어진 상등액 시료 2 ml를 24% TCA 용액과 혼합한 후 30분 동안 정치하고 Whatman No. 42로 여과하여 시료를 준비하였다. Folin 시약은 상업용 2 N phenol 시약을 2배 희석하여 사용하였고 alkaline copper 시약은 0.1 N NaOH 용액에 sodium carbonate를 용해시켜 solution I을 제조하고 2% sodium citrate 용액과 1% cupric sulfate 용액을 조제하여 사용 직전에 1 : 1 비율로 혼합하여 solution II를 만든 후 solution I과 solution II를 각각 50 : 1로 혼합하여 사용하였다. 제조된 alkaline copper 시약 5 mL와 시료 0.25 ml, 증류수 0.25 mL를 혼합하여 15 분간 정치한 후 1 N phenol 시약 0.5 mL를 첨가하여 혼합한 후 30 분간 발색 반응을 유도하였다. 발색 반응 후 750 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

4) 최적 배양 조건 설정

단백질 분해 효소 생성이 높은 균종을 대상으로 SNF(solid not fat)의 농도를 8, 10, 12, 15%로 조절하였고 32, 37, 42°C의 온도 조건 하에서 24시간동안 배양하면서 적정 시간 간격으로 pH, 총균수를 측정하여 최적의 SNF 함량과 배양온도를 조사하였다.

5) Gel filtration chromatography에 의한 펩타이드의 분별

단백질 분해 효소 생성이 높은 균종을 최적 배양 조건에서 배양한 후, 배양 물을 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액에 NaOH를 이용하여 pH를 7.5로 조절한 후 35% (NH₄)₂SO₄ 와 60% (NH₄)₂SO₄을 순차적으로 가하여 단백질의 침전을 유도하였다. 원심분리하여 회수된 침전물을 투석하여 염을 제거한 후 동결 건조하여 시료를 제조하였다. 시료는 1×PBS (pH 7.5)에 용해하여 Sephadex G-50 gel filtration column (0.9×95cm)에 주입하고 tube 당 2 mL씩 20 mL/hr 의 속도로 용출하였다. 표준물질로는 thyroglobulin(분자량, 670,000), bovine gamma globulin(158,000), ovalbumin(44,000), myoglobin(17,000), vitamin B-12(1,350) 등 6종의 단백질이 함유

되어 있는 gel filtration standard(Bio-rad)를 사용하였으며 spectrophotometer를 이용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. 유단백질 분해물의 생체 외에서 조골세포 성장에 미치는 효과 검증

1) 미생물 배양에 의한 유단백질 분해물의 생산

높은 단백질 분해력을 나타낸 *Lactobacillus acidophilus* 4356, *Lactobacillus casei* 393, *Lactococcus* 449를 1%의 whey protein concentrate(WPC, Alacen 878)를 함유한 탈지분유배지(12% SNF)에 접종하고 37°C에서 18시간 배양한 후 원심분리 하여 상등액을 얻었다. 회수된 상등액의 pH를 6.8로 조정하여 48 시간 투석(MWCO 3,500)하고 동결건조 하여 유단백질 발효분해물을 제조하였다.

2) 조골세포주

다양한 우유단백질 분해물이 조골세포의 증식에 미치는 효과는 조골세포주 (MC3T3-E1 osteoblast cell line, ATCC, Manassas, VA)를 이용하여 조사하였다. 세포주는 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, USA), 50 unit/mL penicilin, 50 μ g/ml streptomycin이 포함된 α -minimum essential media(α -MEM, Gibco BRL, USA)의 37°C, 100% 습도조건에서 5%의 CO₂를 지속적으로 공급하며 배양하였으며 세포의 충분한 증식이 보일 때까지 2-3일 간격으로 배지를 교환하였다.

3) MTT assay

유단백질 분해물의 조골세포 증식 효과는 Seth et al. (2004)이 제시한 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) method를 이용하여 측정하였다. 96-well plate(Nalgene, USA)에 2.0×10^3 cell/well의 농도로 세포를 분주하고 24 시간 배양하여 세포부착을 확인한 후 다양한 농도의 유단백질 분해물을 serum free media에 혼합하여 각 well에 200 μ L씩 넣고 37°C, 5% CO₂ 공기혼합 배양기에서 72 시간 동안 배양하였다. 배양한 세포배지에 MTT working solution을 50 μ L 첨가하여 4 시간 동안 동일한 조건에서 다시 배양하고 MTT가 처리된 배지의 200 μ L를 제거한 후 dimethyl sulfide(DMSO) 150 μ L를 각각의 well에 분주한 후

ELISA plate reader(VERSAmax microplate reader, Molecular devices, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다. 각 실험은 4회 반복 실시하여 조골세포주의 증식 활성도를 측정하였다.

4) TUNEL assay

유단백질 분해물이 조골세포의 사멸 보호에 대한 효과를 검증하기 위하여 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) assay(Gorozyca et al., 1993)를 실시하였다. Glass slide에 부착된 조골세포를 4% formaldehyde를 10 분간 처리하여 고정시키고 PBS(Phosphate-Buffered Saline)로 세척하였다. Permeabilization buffer인 0.1% Triton-X 100 μ L를 처리하여 2 분간 배양한 후 PBS로 다시 세척하고 TdT가 포함되어 있는 TUNEL assay reaction mixture 50 μ L를 가하여 37°C에서 1 시간동안 반응시켰다. 반응 후 cover slip으로 시료를 보관하였으며 형광 현미경을 이용하여 조골세포의 사멸 정도를 관찰하였다.

5) Alkaline phosphatase activity (ALP activity)

조골세포 골기질 초기 분화의 생화학적 지표로서 Toon et al. (1999)의 방법으로 alkaline phosphatase activity를 측정하였다. 유단백질 분해물을 첨가하여 일정한 시간동안 배양된 세포에 trypsin-EDTA를 처리하여 상등액을 제거한 후 0.2 mL의 멸균된 증류수를 첨가하여 초음파분쇄기로 현탁 하였다. 각 세포 현탁액 0.1 mL에 0.1 M glycine NaOH buffer(pH 10.4) 0.2 mL, 15 mM의 p-nitrophenyl phosphate (pNPP ; Sigma, USA) 0.1 mL, 0.1% triton X-100 0.1 mL, 멸균된 증류수 0.1 mL를 잘 혼합하여 37°C에서 30 분간 배양한 후, 0.1 N NaOH 0.6 ml 첨가하여. 반응 종료시켰다. ALP의 activity는 nM/min/mg of protein으로 표현하였다.

6) Osteocalcin expression

조골세포의 분화능력을 검증하기 위한 두 번째 생화학적 지표로서 RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction)을 이용하여 Huang et al.(2004)의 방법으로 osteocalcin의 mRNA 발현량을 측정하였다. 일정 시간 배양한 조골세포로부

터 RNA를 추출하고 역전사 완충액과 random primer를 가하여 42°C에서 1.5시간 동안 반응시켰다. 반응된 역전사용액 5 µL를 취한 후 13 µL 증류수, 준비된 각각의 primer 1 µL 씩 넣어 총 부피를 20 µL로 만들어 PCR을 실시하였다. PCR 과정 중 denaturation은 94°C에서 1분, annealing은 45°C에서 1분, extension은 72°C에서 1분으로 하여 30 cycles로 증폭하였으며 primer((주)바이오니아)는 다음과 같이 합성하여 사용하였다.

	Forward primer	Reverse primer
Osteocalcin	5'-AGGGAGGATCAAGTC CCG-3'	5'-GAACAGACCTCGGCGCTA-3
β-actin	5'-CCCTGTTGCTGTAGCCGTA-3'	5'-CCGGTGCTGAGTATGTCG-3'

증폭된 산물은 동량의 gel loading 용액 (0.02% bromophenol blue, 0.02% xylene cyanol)을 첨가하여 1.5 % agarose gel 상에서 전기영동 하였으며 1D image analyzer (KODAK Co., USA)로 density를 구해 osteocalcin mRNA/β-actin mRNA (%)로 나타내었다.

7) 이차원 전기영동을 이용한 조골세포(MC3T3-E1 cell line)의 증식 효과 검증

가) 단백질 시료의 준비

조골세포주인 MCT3T3-E1 cell을 10% FBS가 포함된 성장배지 (α-MEM)에서 배양시킨 후 *L. casei* 393 발효분해물을 첨가한 처리구와 첨가하지 않은 대조구를 각각 3 시간 배양 시켜 처리하였다. PBS로 3회 세척 후 Trypsin-EDTA로 cell을 떼어내고 원심 분리하여 cell을 회수하였다. 회수된 cell pellet은 다시 washing buffer (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5)로 3회 세척을 실시하고 최종적으로 lysis buffer(7 M urea, 2 M thiourea, 40 mM Tris-HCl, 4% CHAPS, 50 mM DTT, 2% ampholyte, protease cocktail)와 동일한 부피의 glass bead를 넣고 vortex하여 세포 내 단백질을 유출시켰다. 얻어진 단백질부위는 Microcon™(Millipore, USA)를 이용하여 탈염 및 농축을 실시하며 최종적으로 얻어진 단백질은 modified Bradford assay

(Ramagli, 1999)를 이용하여 정량 후 500 µg씩 분주하여 -80℃에서 실험 전까지 보관하며 단백질 시료로 사용하였다.

나) 이차원 전기영동

이차원 전기영동은 O'Farrell의 방법(1975)에 준하여 실시하였다. 준비된 500 µg의 단백질 시료는 최종 부피가 320 µL가 되도록 rehydration buffer(8 M urea, 2% CHAPS, 100 mM DTT, 0.2% ampholyte, 0.0001% bromophenol blue)에 혼합한 후 ReadyStrip(17cm, non linear, Bio-Rad, USA)을 이용하여 20℃에서 12-17시간동안 재수화 하였다. 이후 Isoelectric focusing apparatus(Bio-Rad)를 이용하여 250 V에서 30분, 500 V에서 30분, 1,000 V에서 30분, 8,000 V에서 3시간, 8,000 V에서 25,000 Vh, 500V에서 30분간 focusing을 실시하고 평형화를 위해 equilibration buffer I과 equilibration buffer II (Bio-Rad protocol)에 각각 15분간 침지한 후 .12.5% SDS-PAGE (20×20cm)에 옮기고 agarose gel로 sealing한 후 gel 당 20 mA으로 4℃에서 12시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 완료된 후 1시간동안 고정한 (20% methanol, 10% phosphoric acid)한 후 Candiano et al.(2004)의 방법에 따라 Coomassie blue G-250으로 구성된 blue silver solution으로 염색을 실시하였다.

다) 이미지 분석 및 단백질 identification

염색된 gel은 UMAX scanner를 이용하여 scan을 실시한 후 PDQuest image analysis software(Bio-Rad)를 이용하여 최소 3배 이상 발현이 증가되거나 감소하는 spot을 탐색하였다. 선정된 spot은 Oh et al.(2004)의 방법을 이용하여 추출하였으며 trypsin solution(10-15 µg/mL, sequencing grade, Promega, USA)과 C18 ZipTip Millipore)를 이용하여 분해, 농축을 실시하고 α-cyano matrix 0.5 µL와 혼합한 후 Voyager DE STR system(Perseptive Biosystem Inc., Framingham, MA, USA)를 이용하여 최종적으로 MALDI-TOF/ MS 분석을 실시하였다. MALDI-TOF/ MS의 결과를 바탕으로 MASCOT(<http://matrixscience.com>)의 database에서 murine subset으로 단백질 identification을 실시하였다.

다. 유단백질분해물의 생체 내에서의 골강도 증진효과 검증

1) 1차 동물실험 : 난소 절제된 rat을 모델로 이용한 유청단백질 효소분해물과 발효분해물의 골강도 증진효과 검증

가) 실험사료

실험사료는 NIH-31M rodent diet를 샘타코 바이오 코리아로부터 구입하여 사용하였다. 유단백 분해물과 효소분해물의 첨가수준은 사료의 2% 수준으로 하고, 대조구의 사료는 유단백 분해물과 효소분해물 중 단백질 함량이 높은 유단백 분해물을 기준으로 하여 아미노산과 미네랄을 첨가하여, 실험사료와 같은 단백질, 에너지, 미네랄 함량을 가지도록 하였다. 대조구 사료에 첨가된 아미노산 혼합물과 유단백의 영양소 성분은 Table 11과 같다. 대조구에 첨가된 아미노산은 필수 아미노산을 첨가한 후 나머지 비 필수 아미노산은 glutamic acid를 첨가하였다.

나) 실험 동물

10주령의 Sprague-Dawley 암컷을 샘타코 바이오 코리아로부터 구입하여 사용하였다. 구입된 rat은 4일간의 환경 적응 후 난소를 절제하였다. 난소 절제 시 rat은 ketamin과 rompun을 1:1로 혼합한 마취제를 100 uL씩 복강 내 주사하여 유도하였다. 마취 유도 후 rat의 등쪽을 척추를 기준으로 약 7 mm 떨어진 곳을 각각 절개하였다. 절개 후 양쪽의 난소는 난관을 cat gut으로 두 번 묶어주어 출혈을 방지하고 난소를 절제하였다. 봉합 시 근육 부분은 cat gut으로 단단히 봉합한 후, 피부조직은 silk를 이용하여 봉합하였다. 수술부위의 소독을 위하여 포비돈으로 수술부위를 세척한 후 각각의 stainless cage로 이송하였다. 수술 후 실내 온도를 25℃로 유지하여 회복을 빠르게 하였다. 난소 비적출군은 난소 적출군과 같은 stress를 주기 위하여 개복 후 난소를 복강 외부로 노출 시킨 후, 난소 적출 시 소요되는 시간이 경과 후 다시 봉합하였다. 수술 후 4일간 회복기간을 후 난소 적출구와 난소 비적출구는 각각의 처리구에 배치되었다. 총 50두의 난소 적출구와 15두의 난소 미적출구를 수술하여, 그중 회복이 늦은 처리구 9두를 실험에서 제거 하였다.

Table 11. Nutrient profile of WPC and amino acid mixture (%)

Nutrient	WPC	Amino acid mixture
Lactose	8	8
Fat	8	8
Amino acids		
Alanine	3.8	-
Argine	1.6	-
Aspartic acid	8.4	-
Cysteine	1.8	-
Glutamic acid	13.0	39.6
Glycine	1.4	-
Histidine	1.7	1.7
Isoleucine	4.5	4.5
Leucine	8.4	8.4
Lysine	7.5	7.5
Methionine	1.5	1.5
Phenylalanine	2.6	2.6
Proline	4.5	-
Serine	3.7	-
Threonine	5.6	5.6
Tryptophan	1.6	1.6
Tyrosine	1.4	-
Valine	4.5	4.5
Total	77.5	77.5
Calcium	0.75	0.75
Phosphorus	0.20	0.20

다) 실험처리

총 4개의 처리구로 하여 각 처리구당 14두를 배치하였다.

대조구 1 (OVX) : 난소 적출 rat + 일반사료(98%) + 2% amino acid mixture

대조구 2 (Sham) : 난소 미적출 rat + 일반사료(98%) + 2% amino acid mixture

처리구 1 (WPC-H) : 난소 적출 rat + 일반사료 (98%) + 2% 유청단백질 효소분해물

처리구 2 (LC-393) : 난소 적출 rat + 일반사료 (98%) + 2% 유청단백질 발효분해물

라) 사료급여

사료는 매주 배합하여 냉장고에서 보관 하였다. 매주 3회에 걸쳐 사료를 급여하였고, 급여 시 잔량을 측정하였다. 7일 간격으로 매주 사료 섭취량을 측정하였다.

마) 실험기간

총 실험기간은 46일로 수술후 회복기간 4일과 실험기간 6일로 구성하였으며 실험 디자인과 실험실 환경은 각각 Fig. 45, 46과 같다.

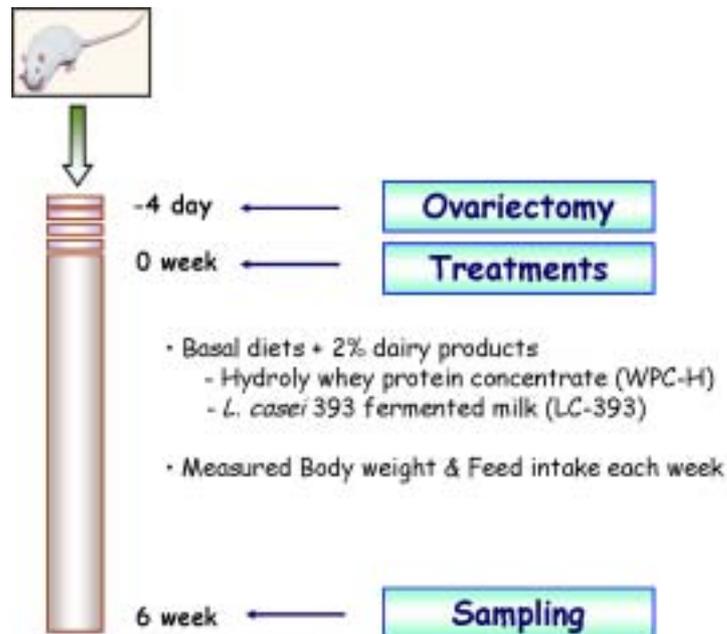


Fig. 45. Schematic diagram of experimental design.



Fig. 46. Animal experimental room.

바) 측정항목

매주 rat의 체중과 사료 섭취량을 측정하였으며 실험 마지막 날(day 42)에는 혈액과 뇨를 채취하였다. Rat을 마취 후(ketamin : rompun = 1: 1) 주사기(5 mL)를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 serum separating tube (BD bioscience, USA)에 옮긴 후 4℃에서 12시간 보관 후 20분간 4℃에서 3000 x g로 원심분리 하여 serum을 분리하였다. 분리된 혈액은 200 uL씩 분주하여 -20℃에서 분석시 까지 보관하였다. 혈액분석기를 이용하여 serum에 존재하는 alkaline phosphase, creatinine, Ca, P의 함량을 측정하였으며, 골 재흡수 인자인 C-telopeptide type I collagen fragment는 Ratlaps™ ELISA(Nordic Bioscience Diagnostics, Denmark) kits를 이용하여 측정하였다. 혈액 채취 후에는 경추 분리 하여 rat을 희생시키고, femur를 채취하였으며 110℃ dry oven에서 3일간 건조하였다. Femur의 무게와 길이는 저울과 vernier calipers를 이용하여 측정하였으며 BMD(bone mineral density)와 BMC(bone mineral content)는 Dual energy X-ray absorptiometry(DEXA, NORLAND, USA)를 이용하여 측정하였다. 골강도는 Texture analyser(Stable micro system, USA)를 이용하여 측정하였다.

2) 2차 동물실험 : 난소 절제된 rat을 모델로 이용한 유단백 분해물과 유산균의 사료내 첨가 수준 탐색

가) 실험사료

실험사료는 NIH-31M rodent diet를 샘타코 바이오 코리아로부터 구입하여 사용하였다. 유단백 분해물과 유산균의 첨가수준은 사료의 1, 2, 4% 수준으로 하고, 대조구의 사료는 유단백 분해물과 유산균 중 단백질 함량이 높은 유단백 분해물을 기준으로 하여 아미노산과 미네랄을 첨가하여, 1차 실험과 동일하게 실험사료와 같은 단백질, 에너지, 미네랄 함량을 가지도록 하였다. 대조구에 첨가된 아미노산은 필수 아미노산을 첨가한 후 나머지 비 필수 아미노산은 glutamic acid를 첨가하였다. 각 처리구에 첨가된 LC-393과 WPC-H의 양은 Table 12와 같다. LC-393, WPC-H, 아미노산 혼합물을 이용하여 1차 혼합 후 사료 내 혼입하였다.

Table 12. Composition of experimental diet

Treatment	Basal diet	Amino acid mix.	LC-393	WPC-H
OVX	96	4	-	-
Sham	96	4	-	-
LC-393 1%	96	3	1	-
LC-393 2%	96	2	2	-
LC-393 4%	96	0	4	-
WPC-H 1%	96	3	-	1
WPC-H 2%	96	2	-	2
WPC-H 4%	96	0	-	4

나) 실험 동물

12주령의 Sprague-Dawley 암컷을 샘타코 바이오 코리아로부터 구입하여 사 용하였다. 난소 적출은 실험 1과 같은 방법으로 실시하였다. 총 68두의 난소 적출구와 11두의 난소 미적출구를 수술하여, 그중 회복이 늦은 처리구 7두를 실험에서 제거 하였다.

다) 실험처리

총 8개의 처리구로 하여 각 처리구당 9두를 배치하였으며 각 처리구는 다음 과 같다.

대조구 1 (OVX) : 난소 적출 rat + 일반사료(96%) + 4% Amino acid mixture (AAM)

대조구 2 (Sham) : 난소 미적출 rat + 일반사료(96%) + 4% AAM

처리구 1 (LC-393 1%) : 난소 적출 rat + 일반사료 (96%) + 3% AAM + 1% LC-393

처리구 2 (LC-393 2%) : 난소 적출 rat + 일반사료 (96%) + 2% AAM + 2% LC-393

처리구 3 (LC-393 4%) : 난소 적출 rat + 일반사료 (96%) + 0% AAM + 4% LC-393

처리구 4 (WPC-H 1%) : 난소 적출 rat + 일반사료 (96%) + 3% AAM + 1% WPC-H

처리구 5 (WPC-H 2%) : 난소 적출 rat + 일반사료 (96%) + 2% AAM + 2% WPC-H

처리구 6 (WPC-H 4%) : 난소 적출 rat + 일반사료 (96%) + 0% AAM + 4% WPC-H

라) 사료급여

사료는 매주 배합하여 냉장고에서 보관 하였다. 매주 3회에 걸쳐 사료를 급여하였고, 급여 시 잔량을 측정하였다. 7일 간격으로 매주 사료 섭취량을 측정하였다.

마) 실험기간

총 실험기간은 46일로 수술 후 회복기간 5일과 실험기간 6일로 구성하여 1차 실험과 같은 기간동안 진행하였다.

바) 측정항목

매주 체중과 사료 섭취량을 측정하였고, 실험 마지막날(day 42)에는 혈액과 뇨를 채취하였다. 측정항목은 1차 실험과 동일하였다.

2. 연구개발수행 내용 및 결과

가. 단백질 분해 효소 생산 미생물의 선발 및 유청 단백질 분해물의 분별

1) 발효에 의해 분해된 펩타이드 농도 측정

대상 균종의 단백질의 분해에 의해 생성되는 free amino nitrogen (FAN)과 효소 작용으로 생기는 non-protein nitrogen(NPN) 정량의 결과는 Table 13과 14에 제시하였다. 염산을 이용하여 제조한 acid whey의 경우 NPN은 12.3 ± 0.27 mg/L로 다소 높은 수치를 보였는데 이는 pH 조절을 위해 사용한 염산의 영향으로 단백질이 분해된 것으로 추측되며 *Lactobacillus acidophilus* 4356, *Lactobacillus casei* 393, *Lactococcus* 449를 제외한 대부분의 균주들은 free amino nitrogen의 함량이 10 mg/L 이하로서 단백질 분해도가 높지 않은 것으로 나타났다.

단백질 분해도가 높게 나타나는 균주들은 각기 다른 균속 중에서 나타나는 것으로 보아 균속에 따른 단백질 분해도의 차이는 보이지 않았다. NPN의 경우도 FAN의 결과와 유사한 경향을 보이는데 단백질 분해에 의해 생기는 free amino nitrogen의 함량이 다른 균종보다 높은 것으로 나타나는 위 3가지 균주의 NPN 함량이 다른 균종에 비해 높은 함량을 보이는 것으로 나타났다.

Table 13. Changes in free amino nitrogen content after fermentation¹⁾

Samples	FAN (mg/l)		
Acid whey (adjusted pH 4.6)	12.3 ± 0.27		
<i>acidophilus</i>	A4	8.21 ± 0.35	
"	GP2A	7.56 ± 0.43	
"	GP4A	8.32 ± 0.56	
"	GP1B	5.43 ± 0.39	
"	NCFM	4.29 ± 0.26	
"	107A	5.56 ± 0.34	
"	30SC	6.71 ± 0.42	
"	606	8.39 ± 0.53	
"	4356	15.8 ± 2.74	
"	4962	7.94 ± 0.09	
"	43121	4.92 ± 0.34	
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	M5	6.84 ± 0.41
"	"	393	13.1 ± 1.46
"	"	910	5.93 ± 0.23
"	"	9018	6.66 ± 0.54
"	<i>helveticus</i>	L.H	7.94 ± 0.42
"	"	LO518	8.56 ± 0.29
"	"	1042	7.56 ± 0.18
"	<i>plantarum</i>	B-1	6.89 ± 0.11
"	"	EH2	5.95 ± 0.08
"	"	LP	7.24 ± 0.22
"	"	M-2	6.85 ± 0.39
"	"	11931	9.54 ± 0.37
"	<i>rhamnosus</i>	7469	7.59 ± 0.43
<i>Lactococcus</i>	"	449	16.4 ± 1.27
"	<i>lactis ssp. lactis</i>	11454	5.63 ± 0.78
<i>Leuconostoc</i>	"	K1	4.54 ± 0.33
"	"	W2O	6.73 ± 0.41
<i>Saccharomyces</i>	<i>fragilis</i>	C1	3.21 ± 0.72
"	"	C2	4.07 ± 0.69
"	<i>cerevisae</i>	IFO1661	3.56 ± 0.54
<i>Kluyveromyces</i>	<i>fragilis</i>	C-1041	2.25 ± 0.39
"	"	Y-1156	3.29 ± 0.27

¹⁾All values are expressed as mean ± SD.

Table 14. Changes in non-protein nitrogen content after fermentation¹⁾

Samples		NPN (mg/ml)
Acid whey (adjusted pH 4.6)		14.1 ± 2.76
	<i>acidophilus</i> A4	4.43 ± 0.86
	" GP2A	3.66 ± 0.75
	" GP4A	3.44 ± 0.46
	" GP1B	4.11 ± 0.54
	" NCFM	3.26 ± 0.83
	" 107A	2.95 ± 0.32
	" 30SC	3.68 ± 0.56
	" 606	3.21 ± 0.35
	" 4356	8.13 ± 1.02
	" 4962	3.41 ± 0.76
	" 43121	3.19 ± 0.37
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i> M5	3.83 ± 0.61
	" 393	7.06 ± 0.96
	" 910	4.53 ± 0.78
	" 9018	4.42 ± 0.34
	<i>helveticus</i> L.H	3.27 ± 0.78
	" LO518	3.84 ± 0.43
	" 1042	2.79 ± 0.19
	<i>plantarum</i> B-1	3.13 ± 0.13
	" EH2	4.16 ± 0.17
	" LP	6,27 ± 0.26
	" M-2	5,21 ± 0.24
	" 11931	4.04 ± 0.43
	<i>rhamnosus</i> 7469	5.01 ± 0.52
<i>Lactococcus</i>	449	8.24 ± 0.85
	<i>lactis ssp. lactis</i> 11454	3.87 ± 0.49
<i>Leuconostoc</i>	K1	3.59 ± 0.31
	W20	4.11 ± 0.21
<i>Saccharomyces</i>	<i>fragilis</i> C1	3.06 ± 0.36
	" C2	3.13 ± 0.45
	<i>cerevisae</i> IFO1661	2.98 ± 0.51
<i>Kluyveromyces</i>	<i>fragilis</i> C-1041	3.07 ± 0.36
	" Y-1156	3.19 ± 0.25

¹⁾All values are expressed as mean ± SD.

즉 FAN과 NPN 함량이 높은 *Lactobacillus acidophilus* 4356, *Lactobacillus casei* 393, *Lactococcus* 449 세 균주들에 대하여 단백질 분해도가 높은 것으로 판단된다.

2) 유단백질 분해를 위한 최적 배양 조건 설정

FAN과 NPN 정량 결과로 미루어 단백질 분해도가 높은 것으로 보이는 *Lactobacillus acidophilus* 4356(Fig. 47), *Lactobacillus casei* 393(Fig. 48), *Lactococcus* 449(Fig. 49) 이상 세 가지 균주에 대하여 최적 배양 조건을 확립하기 위하여 8, 10, 12, 15% SNF 함량에 따른 pH와 총균수를 측정하였다. pH는 배양 시간이 경과됨에 따라 유산 생성으로 인하여 점차 감소하는 경향을 나타냈다. 총균수는 15-18 배양 시간대에 가장 높은 수를 보였는데 12% SNF 함량 배지와 8, 10, 15% SNF 함량 배지에서 배양한 균주의 총균수를 확인하였을 때 전체적으로 12% SNF 함량 배지가 8, 10, 15% SNF 함량 배지보다 보다 높은 총균수를 나타냈다. 이러한 경향은 세 균주에서 모두 유사하게 나타났다. 이러한 결과를 미루어 볼 때 12% 함량 배지가 균주 성장 조건에 더 유리한 것으로 사료된다.

각기 다른 SNF 함량 조건에서 배양된 *Lactobacillus acidophilus* 4356을 대상으로 24시간 배양이 끝난 후 단백질 분해로 인하여 생성되는 free amino nitrogen(FAN)과 효소 작용으로 생기는 non-protein nitrogen의 함량을 측정하였다 (Table 15). Fig. 49에서 나타난 성장 곡선에 비례하여 배양 후 생성된 FAN과 NPN 또한 유사한 경향을 보이는 것으로 나타났다. 즉 동일 배양 시간대에 총균수가 높게 조사된 12% SNF 함량 배지에서의 FAN과 NPN 함량은 8, 15% SNF 함량 배지에서의 배양된 것보다 높은 함량을 보였으며 10% SNF 함량 배지에서의 배양된 것과는 유의적인 차이로 높은 함량을 나타내는 것으로 조사되었다. *Lactobacillus casei* 393, *Lactococcus* 449 균주에 대해서도 위와 같은 방법으로 FAN과 NPN 함량을 측정하였다 (Table 16, 17).

Lactobacillus casei 393의 8, 15% SNF 함량 배지배양 후 FAN과 NPN의 함량은 10, 12% SNF 함량 배지의 그 함량보다 낮게 나타났고 10, 12% SNF 함량 배지의 FAN과 NPN 함량은 차이가 없었다. *Lactococcus* 449의 경우 8, 15% SNF 함량 배지 배양 후 분석된 FAN과 NPN은 10, 12% SNF 함량 배지의 그 함량보다 낮게 나타났으며 12% SNF 함량 배지에서의 분해도가 10% SNF 함량 배지에 비해 높은

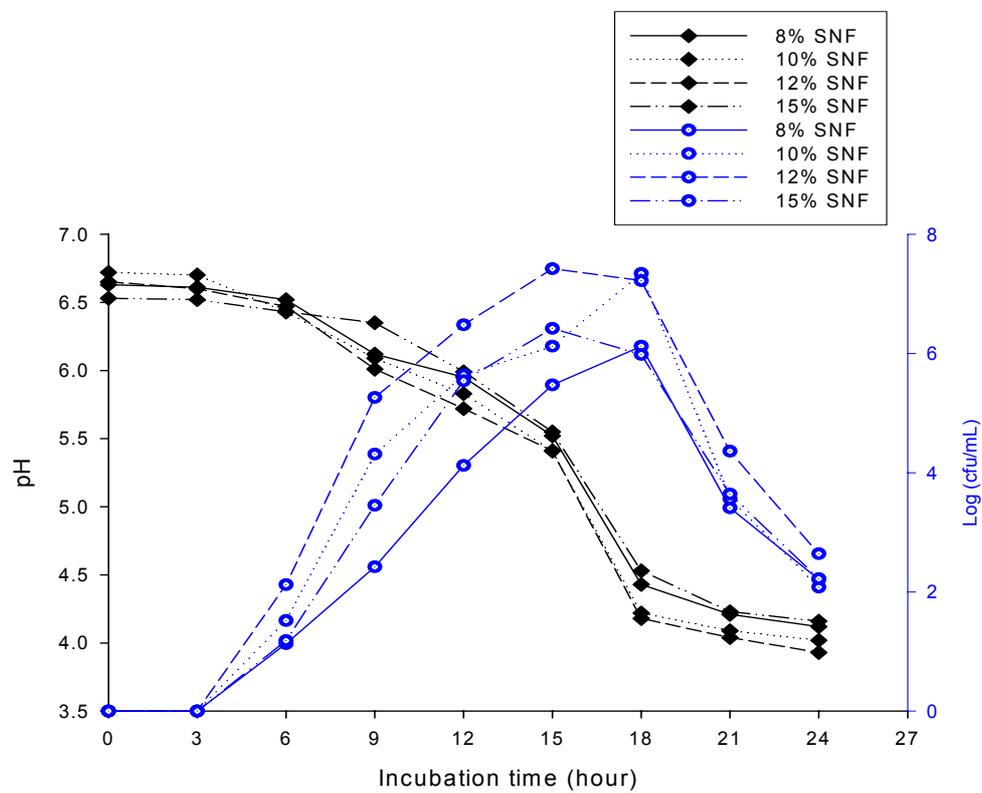


Fig. 47. The changes of pH and total bacterial count during fermentation with *Lactobacillus acidophilus* 4356 at 37°C.

The black lines indicate pH and the blue lines indicate that total bacterial count.

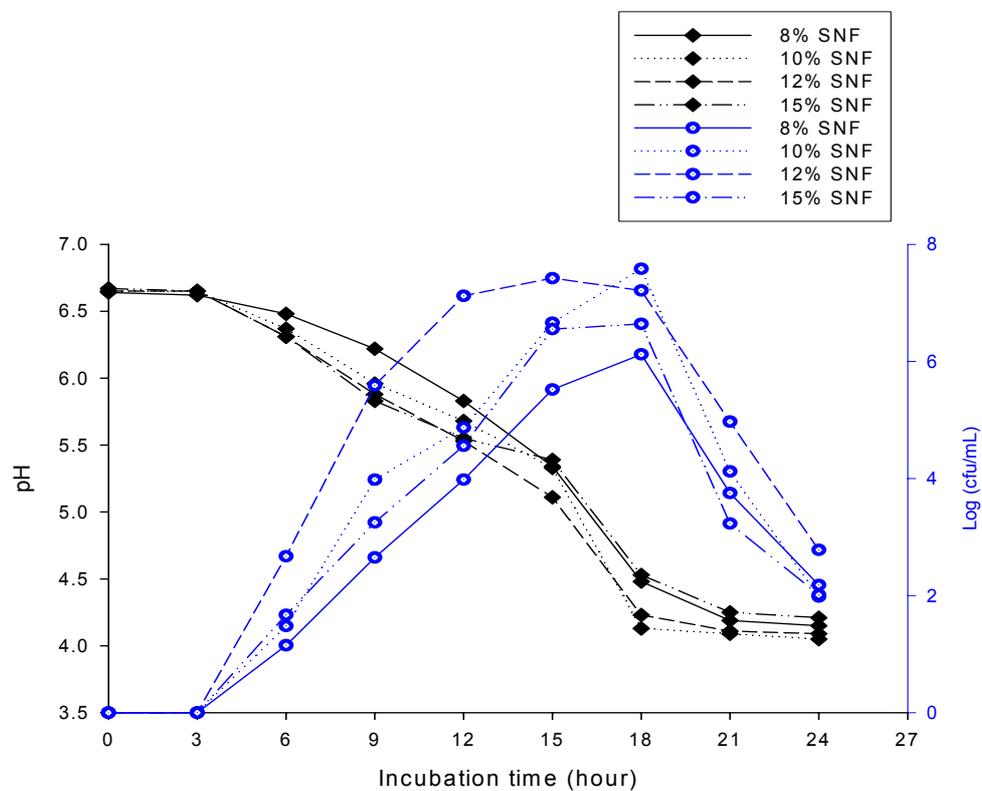


Fig. 48. The changes of pH and total bacterial count during fermentation with *Lactobacillus casei* 393 at 37°C.

The black lines indicate pH and the blue lines indicate that total bacterial count.

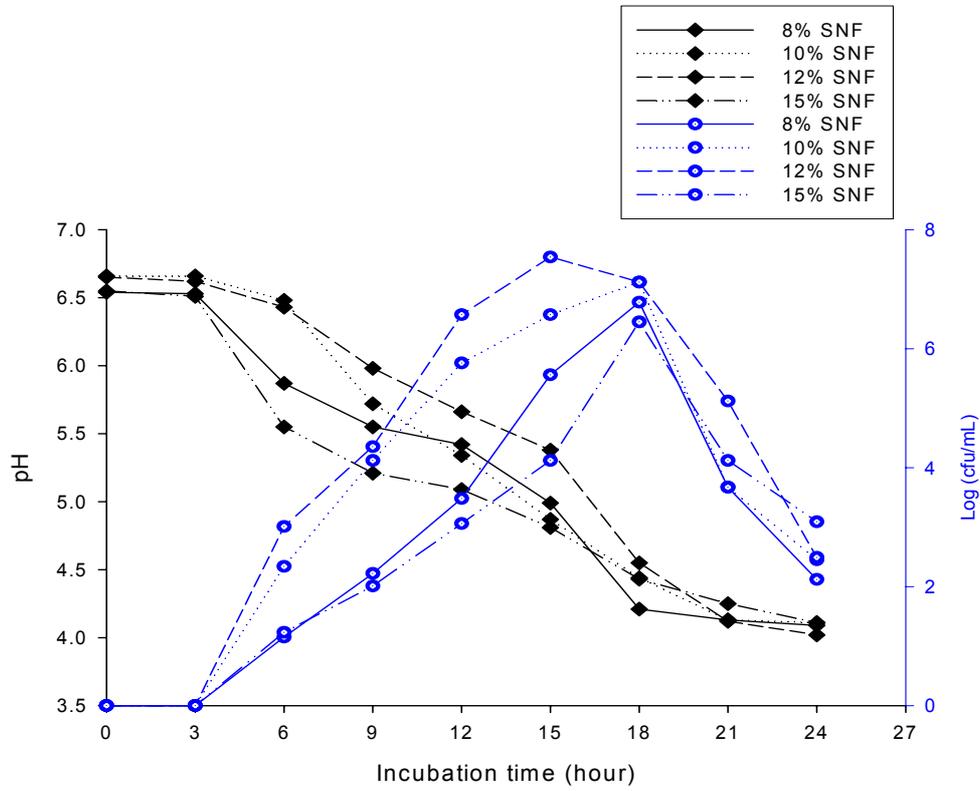


Fig. 49. The changes of pH and total bacterial count during fermentation with *Lactococcus* 449 at 37°C.

The black lines indicate pH and the blue lines indicate that total bacterial count.

Table 15. Free amino nitrogen and non-protein nitrogen content at different SNF content after fermentation with *Lactobacillus acidophilus* 4356¹⁾

SNF content (%)	FAN (mg/L)	NPN (mg/mL)
8	11.3 ± 1.56	6.98 ± 1.24
10	15.8 ± 2.74	8.13 ± 1.02
12	16.9 ± 1.82	8.95 ± 0.42
15	12.5 ± 1.12	6.89 ± 0.78

¹⁾All values are expressed as mean ± SD.

Table 16. Free amino nitrogen and non-protein nitrogen content at different SNF content after fermentation with *Lactobacillus casei* 393

SNF content (%)	FAN (mg/L)	NPN (mg/mL)
8	10.1 ± 0.79	5.78 ± 0.95
10	15.1 ± 1.46	7.97 ± 0.46
12	14.8 ± 1.33	7.95 ± 0.51
15	9.67 ± 1.45	5.23 ± 0.36

Table 17. Free amino nitrogen and non-protein nitrogen content at different SNF content after fermentation with *Lactococcus* 449

SNF content (%)	FAN (mg/L)	NPN (mg/mL)
8	11.6 ± 0.67	5.86 ± 0.45
10	16.4 ± 1.27	8.24 ± 0.85
12	17.2 ± 1.21	9.12 ± 1.01
15	13.5 ± 1.12	7.12 ± 0.43

것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 SNF 함량이 배양 균주의 성장과 단백질 분해효소 생성에 영향을 미칠 수 것으로 의미한다. 본 연구에서는 동일 시간대에 높은 생장을 나타내는 12% SNF 함량 배지에서 배양된 대상 균주의 FAN과 NPN이 높은 것으로 보아 단백질 분해효소 생성에도 유리한 것으로 나타났다.

37°C에서 배양한 세 균주의 최적 SNF 함량은 12%인 것으로 판단되며 이를 바탕으로 최적 배양 온도 조건을 알아보기 위해서 32, 37, 42°C에서 배양을 실시하였다(Fig 50, 51, 52). 32, 37, 42°C에서의 배양 조건에서 총균수를 비교하였을 때 37°C 배양 조건에서는 총균수가 10^7 cfu/ml까지 도달하였으나 그 외의 다른 온도에서는 이보다 낮은 10^6 cfu/ml에 머물렀다. 그 활력 또한 동일 배양 시간동안 느리게 나타났으며 그에 비해 37°C 에서의 배양은 더 높은 성장 활력을 보이는 것으로 나타났다.

세 가지 다른 온도 조건에서 배양된 각 균주의 단백질 분해도를 알아보기 위하여 FAN과 NPN의 함량을 측정된 결과는 Table 18, 19, 20에 나타난 바와 같다. 조사된 세 가지 균주는 모두 37°C에서 배양되었을 때 FAN과 NPN의 함량이 증가하였다. 세 균주는 모두 37°C에서 가장 높은 생장을 나타냈으며 단백질 분해 효소의 분비에 있어서도 가장 적합하였다. 이는 앞의 결과와 유사하게 총균수가 높을수록 단백질 분해 효소 생성 또한 높게 나타나는 결과와 일치하였다.

3) Gel filtration chromatography에 의한 분해물의 분별

12% SNF 함량 배지에서 37°C 배양 온도를 최적 배양 조건에서 하여 단백질 분해 효소 생성이 높은 것으로 나타난 세 가지 균주 *Lactobacillus acidophilus* 4356, *Lactobacillus casei* 393, *Lactococcus* 449를 대상으로 그 배양액을 원심분리하여 상등액 시료를 농축하여 gel filtration G-50을 이용하여 분별하고 분자량을 추정하였다.

Lactobacillus acidophilus 4356의 배양 상등액의 분별 결과 여러 peak가 나타났는데 670 kD 이상의 분자량을 보이는 peak와 44 kD의 peak가 나타났으며 1 kD으로 보이는 peak가 많이 나타난다 (Fig. 53). 일반적으로 알려진 유청 단백질의 분자량은 α -lactalbumin (M.W. 14,200), β -lactoglobulin (18,400-36,800), serum albumin (69,000), immunoglobulin (160,000) 로서 1 kD으로 추정되는 위치에서 보이는 peak는 단백질 분해물로 추정된다.

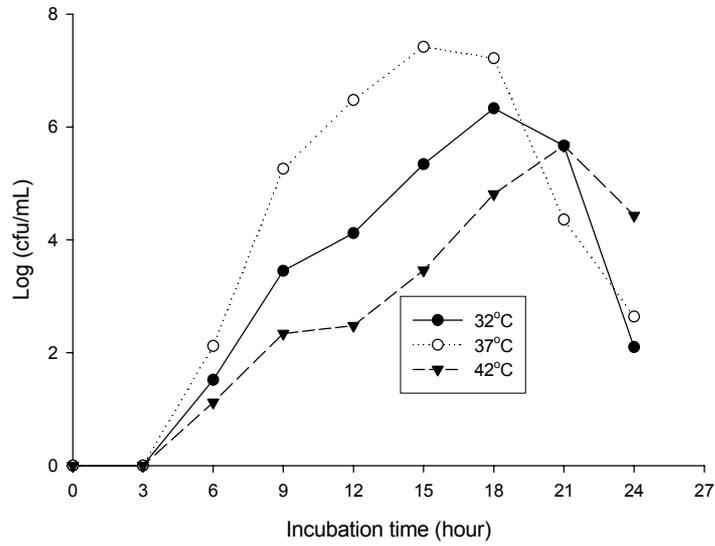


Fig. 50. The changes of total bacterial count during fermentation with *Lactobacillus acidophilus* 4356 at different incubation temperatures.

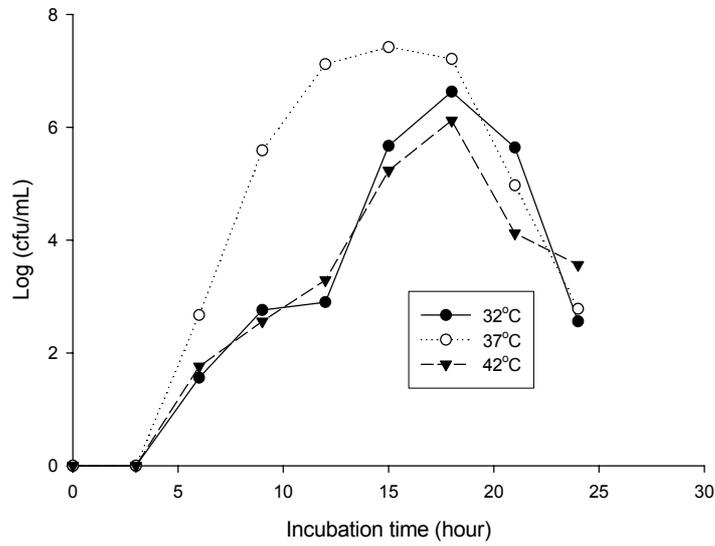


Fig. 51. The changes of total bacterial count during fermentation with *Lactobacillus casei* 393 at different incubation temperatures.

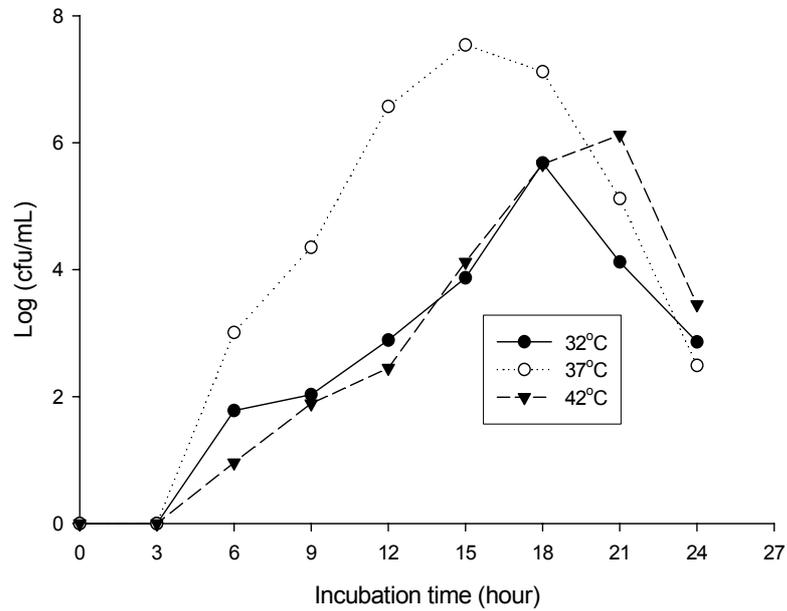


Fig. 52. The changes of total bacterial count during fermentation with *Lactococcus* 449 at different incubation temperatures.

Table 18. Free amino nitrogen and non-protein nitrogen content after fermentation with *Lactobacillus acidophilus* 4356 at different incubation temperatures¹⁾

Incubation temperature (°C)	FAN (mg/L)	NPN (mg/ml)
32	14.3 ± 1.34	7.11 ± 0.95
37	16.4 ± 1.25	8.45 ± 0.36
42	12.5 ± 1.30	6.05 ± 0.76

¹⁾All values are expressed as mean ± SD.

Table 19. Free amino nitrogen and non-protein nitrogen content after fermentation with *Lactobacillus casei* 393 at different incubation temperatures¹⁾

Incubation temperature (°C)	FAN (mg/L)	NPN (mg/ml)
32	12.2 ± 1.14	5.82 ± 0.72
37	15.1 ± 1.55	7.95 ± 0.51
42	13.4 ± 1.19	6.99 ± 0.45

¹⁾All values are expressed as mean±SD.

Table 20. Free amino nitrogen and non-protein nitrogen content after fermentation with *Lactococcus* 449 at different incubation temperatures¹⁾

Incubation temperature (°C)	FAN (mg/L)	NPN (mg/ml)
32	13.7 ± 1.34	7.04 ± 1.07
37	17.7 ± 1.16	9.12 ± 1.01
42	12.1 ± 1.25	5.93 ± 0.75

¹⁾All values are expressed as mean±SD.

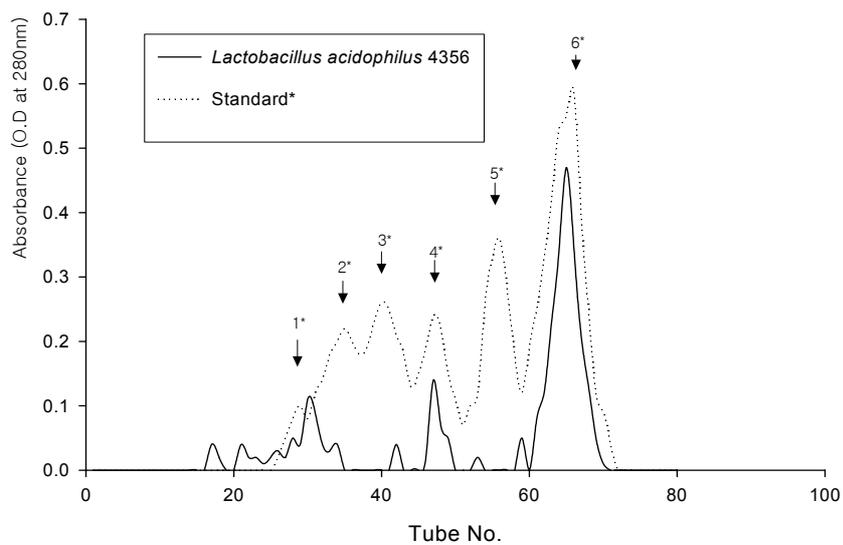


Fig. 53. Elution profile of supernatant after fermentation with *Lactobacillus acidophilus* 4356 media using Sephadex G-50 gel filtration chromatography.

*The number of arrow on the peak indicate following molecular weight.

1: void volume, 2: thyroglobulin (670,000), 3: bovine gamma globulin (158,000),
4: ovalbumin (44,000), 5: myoglobin (17,000), 6: vitamin B-12 (1,350).

Lactobacillus casei 393의 배양액을 원심분리하여 상등액 시료를 농축하여 gel filtration G-50을 이용하여 분별하고 분자량을 추정된 결과는 Fig. 54와 같다. *Lactobacillus acidophilus* 4356의 배양액을 분별한 결과와 비교해볼 때 1 kD의 작은 물질이 많이 보이는 peak가 보였으며 분자량이 높은 peak가 여러 보이는 차이점이 발견되었다. 17 kD의 분자량으로 추정되는 peak는 분해의 영향을 덜 받은 유청 단백질로 사료된다.

Lactococcus 449의 배양액을 원심분리하여 상등액 시료를 농축한 후 G-50 gel filtration chromatography를 이용하여 분별하고 분자량을 추정된 결과는 Fig. 55와 같다. 앞에서 분별한 결과와 유사하게 1 kD으로 추정되는 분해물의 peak를 확인할 수 있었으며 44 kD의 peak를 확인하였는데 이는 분해되지 않는 단백질 중 하나로 사료되며 whey protein인 α -lactalbumin(14 kD)과 비슷한 분자량을 가지는 부근의 peak도 확인할 수 있었다. 따라서 세 균주를 배양한 배양액에 대하여 분별한 결과 일반적으로 whey protein에서 볼 수 없는 1 kD의 peak가 공통적으로 확인되었다.

나. 유청 단백질 분해물의 생체 외에서 조골세포 성장에 미치는 효과 검증

1) 유단백질분해물이 조골세포(MC3T3-E1 osteoblast cell line)의 증식에 미치는 효과

유단백질 분해물이 조골세포의 세포 분열에 미치는 효과를 조사하기 위하여 주관연구기관에서 의뢰한 효소분해물을 조골세포 배지에 1 mg/mL의 수준으로 첨가하고 시간의 경과에 따른 MTT 흡광도의 변화를 측정하였다. Fig. 56에서 나타난 바와 같이 serum free media에서는 배양이 지속됨에 따라 세포의 증식이 점차 감소하였다. 반면 가수 분해 전 유청 단백질 농축물과 유청 단백질 효소분해물을 배지에 첨가 시에는 조골세포의 증식이 배양시간과 함께 증가하였으며 효소분해물의 세포증식 효과는 가수분해 전 유청 단백질에 비하여 뚜렷이 높게 나타났다.

단백질 분해 능력이 높은 *Lactobacillus acidophilus* 4356, *Lactobacillus casei* 393, *Lactococcus* 449를 이용하여 발효분해물을 제조하고 조골세포의 증식에 미치는 영향을 평가한 결과는 Fig. 57과 같다. *L. casei* 393 배양액의 조골세포 증식 촉진 효과는 대조구(100)와 비교하였을 때 130-160%로서 높은 것으로 나타났으며 *L. acidophilus* 4356,

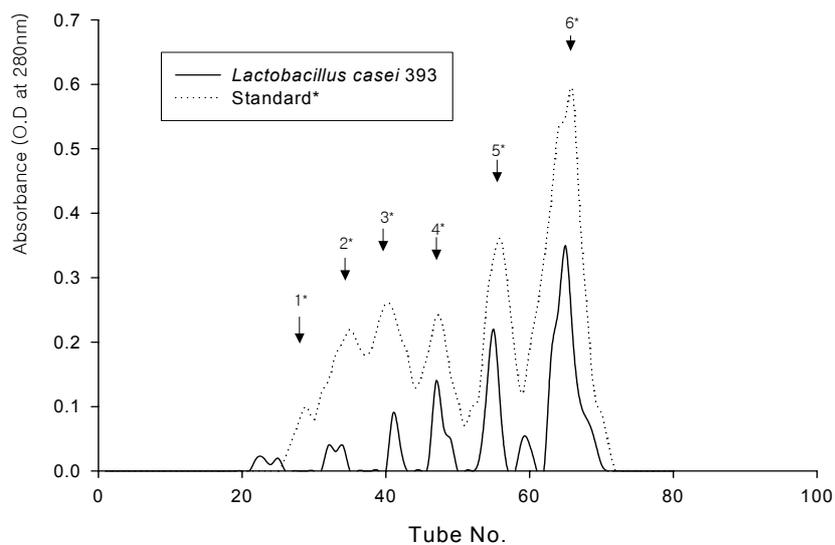


Fig. 54. Elution profile of supernatant after fermentation with *Lactobacillus acidophilus* 393 media using Sephadex G-50 gel filtration chromatography.

*The number of arrow on the peak indicate following molecular weight.

1: void volume, 2: thyroglobulin (670,000), 3: bovine gamma globulin (158,000), 4: ovalbumin (44,000), 5: myoglobin (17,000), 6: vitamin B-12 (1,350).

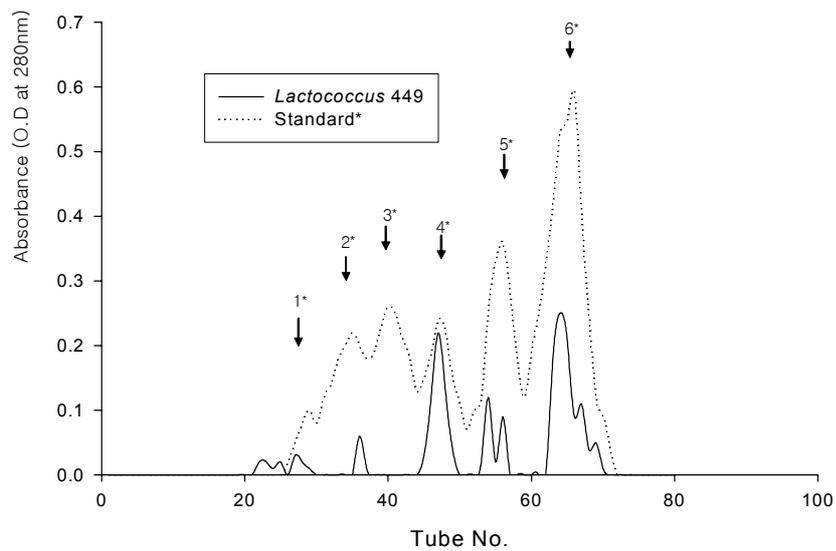


Fig. 55. Elution profile of supernatant after fermentation with *Lactococcus 449* media using Sephadex G-50 gel filtration chromatography.

*The number of arrow on the peak indicate following molecular weight.

1: void volume, 2: thyroglobulin (670,000), 3: bovine gamma globulin (158,000), 4: ovalbumin (44,000), 5: myoglobin (17,000), 6: vitamin B-12 (1,350).

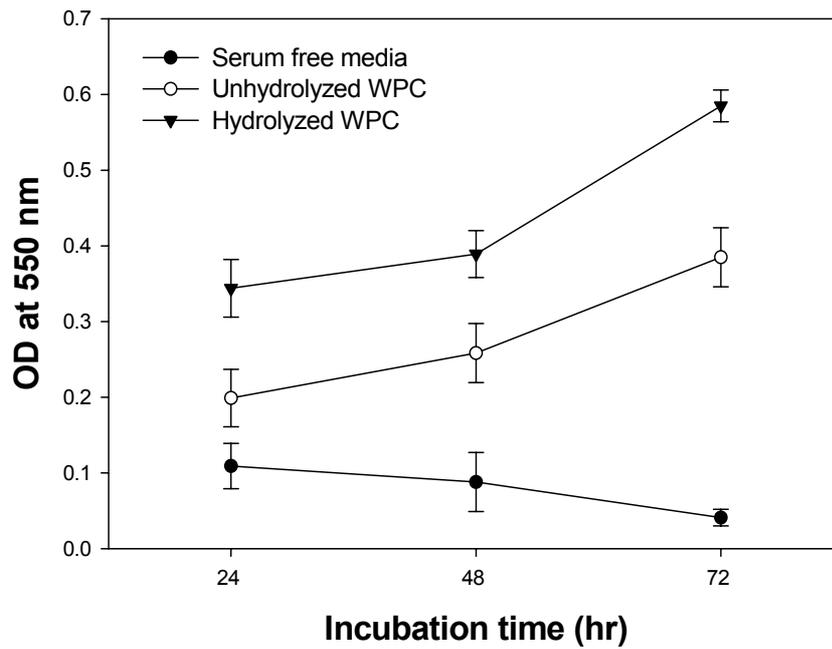


Fig. 56. Effect of whey protein hydrolysate on the proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. The hydrolysate was produced by Flavourzyme at the optimized hydrolysis condition.

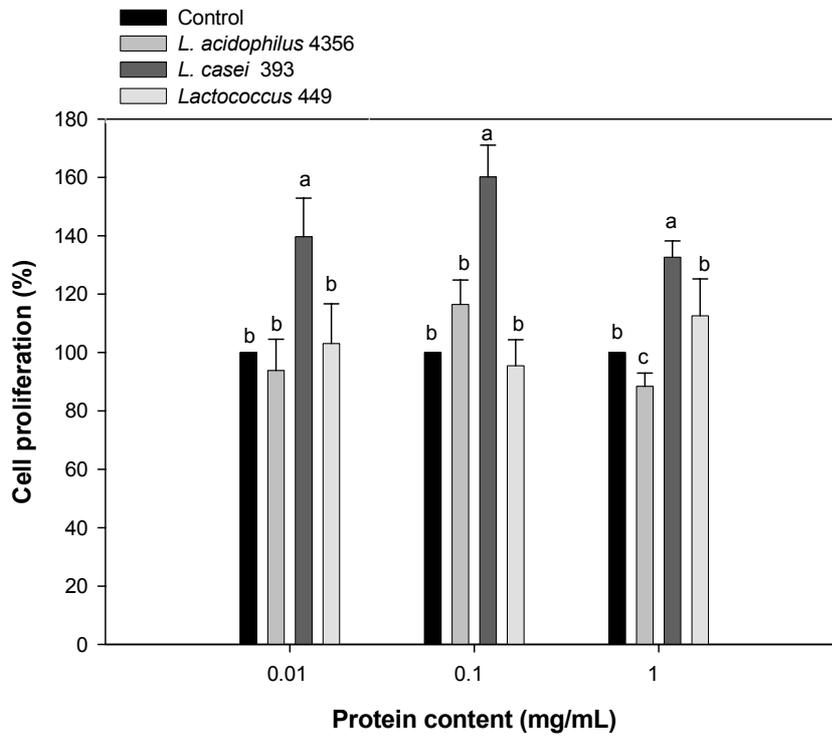


Fig. 57. Effect of culture broth produced by various lactic strains on proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. The proliferation of osteoblast at 72 hr was expressed as relative percentage of control (WPC).

acidophilus 4356, *Lactococcus* 449의 배양액은 그 증식 효과가 대조구의 80-120%로 유사하거나 낮았다. *L. casei* 393 배양액의 첨가효과는 농도에 따라 다소 차이를 보였지만 다른 발효분해물에 비하여 유의적으로 우수하였으며 100 ug/ml의 수준으로 첨가한 경우에는 효소가수물의 세포증식 촉진 효과와 유사한 것으로 나타났다.

유청 단백질 효소분해물과 조골세포증식 촉진 효과가 우수하였던 *L. casei* 393 발효분해물을 조골세포에 첨가하여 배양한 후 세포의 성상을 광학 현미경으로 관찰하였다. 72 시간 배양 후 관찰한 세포의 성상은 효소분해물 및 발효분해물이 대조구에 비하여 더욱 치밀하고 높은 것으로 나타나 MTT assay에 의한 세포증식 평가 결과와 일치하였다(Fig. 58).

2) 조골세포의 분화 능력의 검증

Alkaline phosphatase(ALP)는 조골세포의 분화와 골기질 성숙에 중요한 역할을 담당한다(Robey *et al.*, 1992). 조골세포의 증식과 분화에 작용하는 인자 중 bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OCN)과 같은 비교원성 단백질은 골기질의 성숙과 석회화에 중요한 역할을 수행하기 때문에 BSP, OCN mRNA를 조골세포 분화의 생화학적 지표로서 이용할 수 있다 (Wang *et al.*, 1999).

앞서 조골세포증식의 촉진 효과가 확인 된 유청단백질 효소분해물 및 발효분해물을 대상으로 조골세포의 분화에 미치는 효과를 조사하였다(Table 21). 조골세포의 성장 배지에 50 ug/mL ascorbic acid와 10 mM β -glycerol phosphate를 첨가함으로써 분화를 유도하고 제시된 방법으로 ALP activity의 변화를 측정된 결과 조골세포가 분화하면서 발현되는 ALP activity는 조골세포의 증식이 촉진된 실험구에서 대조구보다 높게 나타나 유청 분해단백질의 효소분해물 및 발효분해물은 세포의 증식과 함께 뼈의 석회화과정을 도모하는 효과를 가진 것으로 판단된다.

조골세포에 의해 합성되는 osteocalcin은 뼈에 존재하는 특이적인 단백질로 뼈와 혈장에 축적되어 조골세포의 활동성 및 골형성 정도를 평가하는 생화학적 지표이다. 일반적으로 골형성이 활발해 질 때 ALP와 함께 그 합성이 증가하는 것으로 알려져 있으나(Bowless *et al.*, 1996) ALP 활성도가 미세한 골의 대사변화를 구체적으로 반영하기에는 미흡한 점이 있기 때문에 보다 직접적인 증거로서 osteocalcin의 mRNA발현 양상을 10일 동안 배양하며 관찰하였다(Fig. 59).

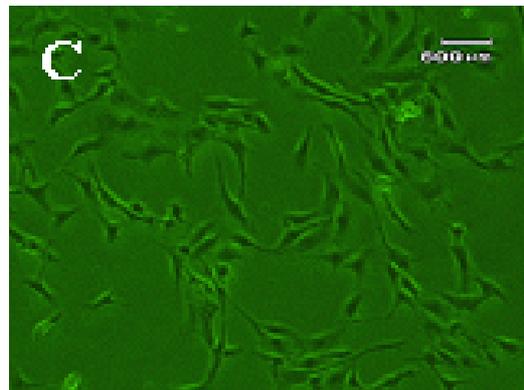
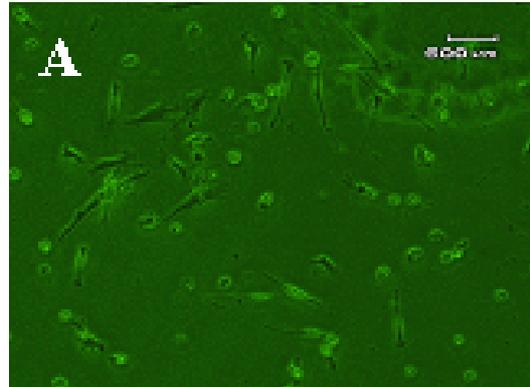


Fig. 58. Morphological characteristics ($\times 40$) of osteoblastic MC3T3-E1 cells. (A) control (unhydrolyzed whey protein), (B) hydrolysates produced at the optimized hydrolysis condition (C) culture broth produced by *L. casei* 393.

Table 21. Cell proliferation and alkaline phosphatase activity of whey protein hydrosate and cell culture broth.

Samples	Cell proliferation ¹⁾ (%)	ALP activity ²⁾ (nM/min/mg protein)
Control	100	3.14
Whey protein hydrolysate ³⁾	152	5.83
Culture broth ⁴⁾	132	5.55

¹⁾The proliferation of osteoblast at 72 hr was expressed as relative % based on control (unhydrolyzed whey protein)

²⁾Alkaline phosphatase activity at 72 hr to 1 mg/mL of samples

³⁾Hydrolysates produced at the optimized hydrolysis condition

⁴⁾Culture broth produced by *L. casei* 393.

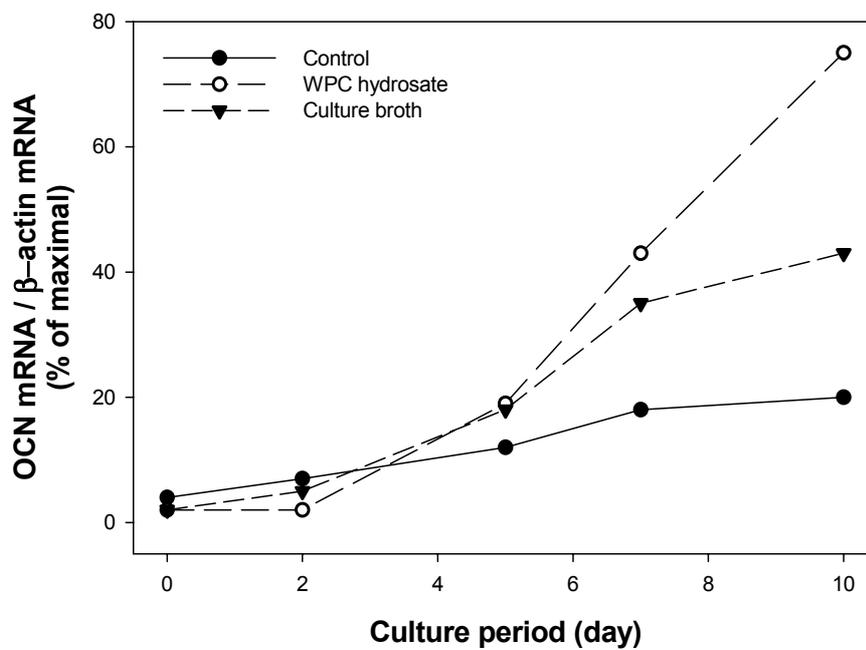
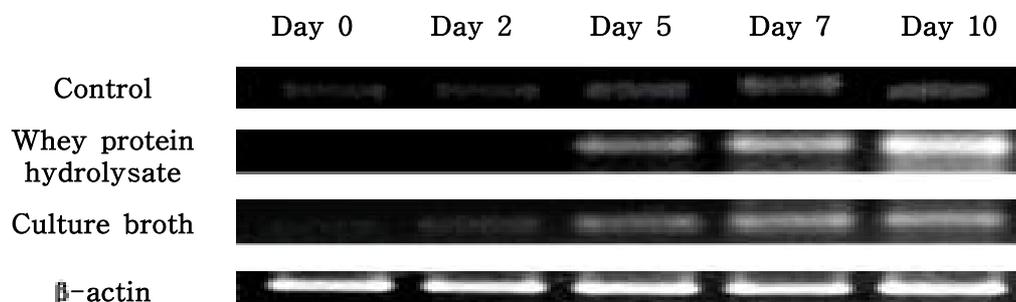


Fig. 59. Messenger RNA expression of osteocalcin during differentiation.

Fig. 59에서 나타낸 것과 같이 분화 유도 2일 경과 후부터 osteocalcin mRNA의 발현이 시작되었고 5일 경과 후에는 대조구와 가수분해물간에 차이가 관찰되었으며 분화 유도 10 일 경과 후에는 발현된 가수분해물의 mRNA 양이 β -actin 대비 75%와 43%로 각각 증가하는 것으로 나타났다. 발효분해물의 경우 효소분해물보다는 낮은 발현량을 나타냈으나 대조구와 비교할 때 약 15% 정도 높은 mRNA의 발현량을 보였다. 앞서 제시한 ALP 및 osteocalcin mRNA 발현량의 평가결과를 근거로 할 때 유청단백질 효소분해물과 발효분해물은 조골세포의 분화 과정을 촉진하는 효과를 가지고 있는 것으로 판단할 수 있다.

3) 유청 단백질 분해물에 의한 조골세포의 사멸 억제 기능 검증

세포는 외부 환경 조건이나 스트레스 등으로 인해 자체적으로 사멸의 과정을 거치게 되는데 이 중 능동적인 기전에 의한 사멸을 apoptosis라 하며 수동적인 기전에 의한 것을 necrosis라 한다. Apoptosis의 과정에서는 DNA 응축현상으로 인한 DNA 절편화(fragmentation)가 일어나며 DNA 절편화 현상은 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL assay) 방법으로 측정할 수 있다.

Fig. 60은 유청단백질 효소분해물과 발효분해물에 의한 조골세포의 사멸 억제 기능을 평가한 결과로서 0.5 uM Dexamethasone(DEX) 처리 시 apoptosis를 일으킨 세포는 갈색으로 염색되어 나타났다. 대조구를 배지에 첨가한 조골세포에서는 상당수의 어두운 갈색의 apoptic body가 관찰된 반면 유청단백질 효소분해물과 발효분해물을 첨가한 조골세포에서는 상대적으로 apoptosis에 의한 DNA의 절편화가 적게 진행되어 자색으로 염색되었다. 따라서 효소분해물 및 발효분해물이 조골세포의 사멸을 억제하는 기능을 보유하고 있다고 판단된다.

4) 이차원 전기영동을 이용한 조골세포 (MC3T3-E1 cell line)의 증식 효과 검증

L. casei ATCC 393의 유단백질 발효분해물에 의한 조골세포 내 단백질의 발현 변화를 탐색하기 위해 이차원 전기영동을 실시하였다(Fig. 61). 흥미롭게도 *L. casei* 393 발효분해물을 조골세포에 첨가하여 배양한 후 특이적으로 발현이 변화되는 단백질을 MALDI-TOF를 이용하여 동정한 결과 조골세포의 세포내 단백질 중

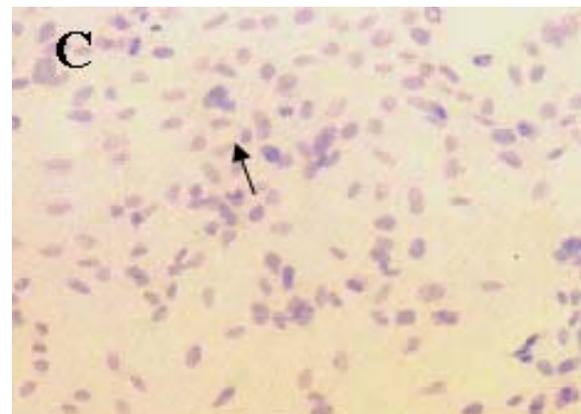
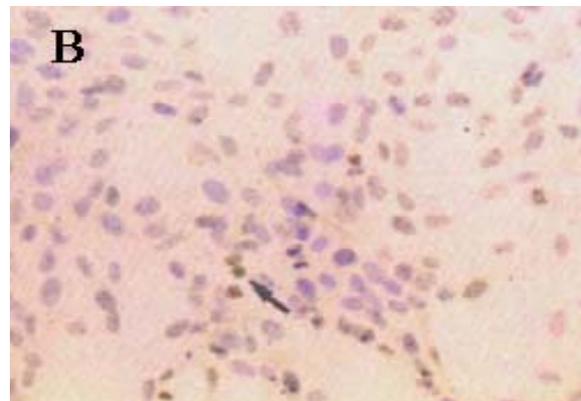
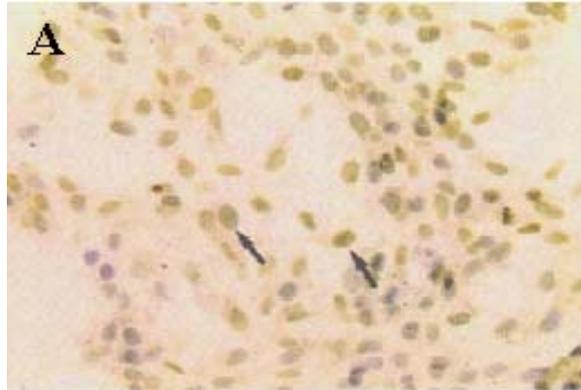


Fig. 60. TUNEL staining of unhydrolyzed whey protein (control, A), hydrolyzed whey protein (B) and culture broth (C). Arrows indicate apoptic body (dark brown).

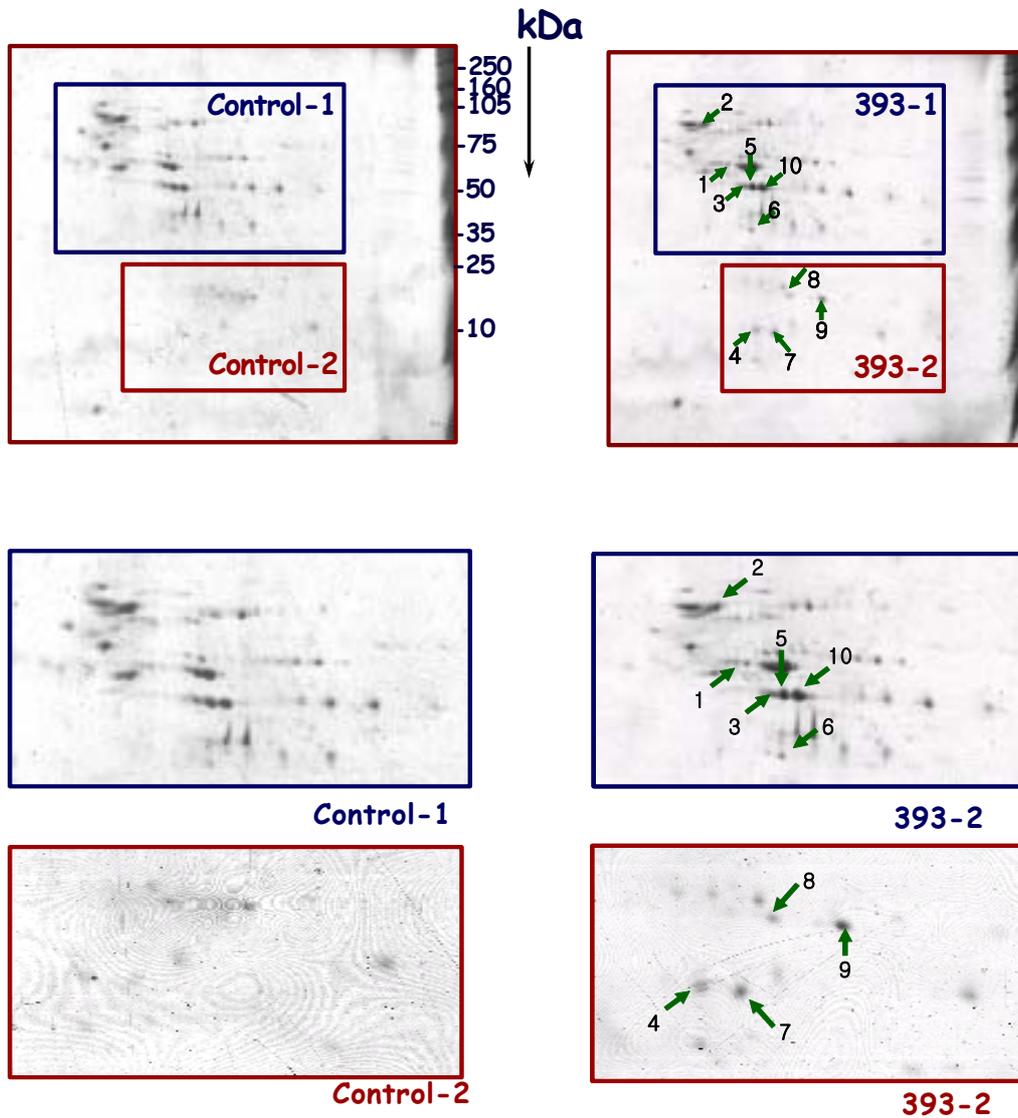


Fig. 61. Two-dimensional electrophoresis images of proteins produced by *L. casei* ATCC 393 treated in MC3T3-E1 cell (A: control and B: *L. casei* ATCC 393 (1 mg/mL) treated in osteoblast cells.

3개의 단백질(Eva6 protein, A630038 E17Rik protein, Ankyrin repeat domain protein 10)이 특이적으로 3배 이상 발현이 증가되었으며 glutamate receptor-interacting protein 1의 경우 3배 이상 발현이 특이적으로 감소하였다(Table 22). 이중 특히 Eva6 protein은 fibroblast growth factor receptor 3와 높은 homology를 가지는 것으로 보고 되었으며 FGF의 경우 MC3T3-E1의 성장을 촉진시키는 것으로 보고 있어 이들의 상관관계가 조골세포의 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다.

Table 22. Identification of specific proteins by MALDI-TOF/MS peptide mass mapping.

Spot No.	Identified protein	Theor. Mr (Da)	Theor. pI	Regulation
1	Etv6 protein	51,462	6.5	Up
2	Glutamate receptor-interacting protein 1	68,765	6.0	Down
4	A630038E17Rik protein	15,627	6.8	Up
5	Ankyrin repeat domain protein 10	48,004	6.8	Up

나. 유단백질 분해물의 생체내에서의 골강도 증진효과 검증

1) 1차 동물실험 : 난소 절제된 rat을 모델로 이용한 유청단백질 효소분해물과 발효분해물의 골강도 증진효과 검증

실험기간동안 rat의 체중 변화를 측정한 결과는 Table 23과 같다. 실험 개시 시 처리구간의 체중 차이는 없었으나, 실험 2주후부터 난소적출구의 체중이 난소비적출구보다 유의적으로 증가하였다. 난소에서 생성되는 estrogen은 식욕 억제와 관련되어 있는 것으로 알려져 있으며 난소가 제거되면 estrogen의 생성이 감소하여, 사료 섭취량이 증가하게 되고 그에 따라 체중이 증가하는 것으로 생각된다. Fig. 62는 난소의 적출에 따른 난관의 크기를 비교한 것으로, 실험 종료 후 모든 rat에서 난관을 적출하여 난소 적출의 부적합 여부를 확인하였다.

골대사와 관련된 혈액 내 성분의 함량을 측정한 결과는 Table 24와 같다. 뼈로부터 유래한 ALP는 골 형성의 주된 인자로, 인을 뼈에 결합시킨 후, 칼슘이 뼈에 축적되도록 하는역할을 수행한다. 혈액 내 ALP의 농도는 난소 적출 시 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, WPC-H와 LC-393 처리구는 난소를 적출하였음에도 높은 혈액 내 ALP 농도를 보였다. 혈액 내 ALP는 간, 장 그리고 뼈에서 유래하기 때문에 혈액 내 ALP가 특이적으로 골 형성과 관련되어 있다고 단정할 수는 없지만, 그중 일부는 뼈로부터 유래한 것이기 때문에 Sham 처리구와 비슷한 수준의 ALP농도는 골 대사 과정 중 높은 골 형성 과정에 있는 것으로 생각된다. 혈액 내 칼슘과 인의 함량은 난소 적출에 의하여 증가하는 경향을 나타냈지만 통계적 유의성은 관찰되지 않았다.

Fig. 63은 골 재흡수 시 혈액내로 유입되는 collagen C-telopeptide Type I의 농도를 측정한 결과이다. 뼈에 특이적으로 존재하는 collagen은 osteoclast cell에 의해 분해되는데, 이때 분해 된 collagen중 C-terminal 부분의 peptide들이 혈액내로 유입된다. 따라서 C-telopeptide는 골 재흡수를 나타내는 좋은 지표로 사용될 수 있다. 난소 적출구는 난소비적출구에 비하여 유의적으로 높은 collagen C-telopeptide Type I의 농도를 나타냈다. 또한, LC-393 급여구와 WPC-H 급여구는 Sham 처리구와, OVX 처리구의 중간 농도를 보였다.

Table 23. Body weight of ovariectomized rats fed on diets containing WPC-H and LC-393.

	Intial BW (g)	2 wks BW(g)	4 wks BW(g)	6 wks BW(g)
OVX-control	241.7±11.2	302.7±14.3 ^a	328.0±21.1 ^a	342.8±31.4 ^a
Sham	248.2±12.4	274.4±14.1 ^b	290.4±24.2 ^b	294.5±14.2 ^b
WPC-H	246.3±15.1	297.1±19.7 ^a	327.3±23.1 ^a	341.5±21.4 ^a
LC-393	250.3±14.1	293.3±14.1 ^a	318.7±20.4 ^a	332.1±18.1 ^a

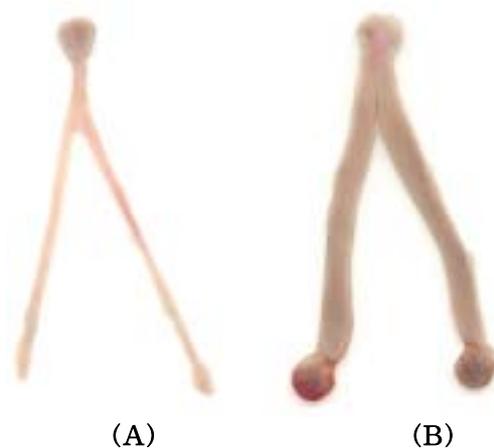


Fig. 62. Pictures of ovary and uterus (A; ovraiectomized, B; non-ovariectomized).

Table 24. The concentrations of serum alkaline phosphatase (ALP), creatinine, blood urea nitrogen (BUN), calcium (Ca), and inorganic phosphorus (IP) in ovariectomized rats fed on diets containing WPC-H and LC-393

	ALP (U/L)	Creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Ca (mg/dL)	IP (mg/dL)
OVX	145.5±20.8	0.68±0.12	19.40±2.48	10.22±0.39	7.63±1.90
Sham	191.8±55.5	0.62±0.09	18.70±2.65	10.17±0.36	6.62±0.82
WPC-H	193.1±45.0	0.64±0.21	18.26±3.12	9.84±0.23	6.75±0.99
LC-393	193.7±38.0	0.66±0.18	20.01±4.18	9.86±0.33	7.26±1.12

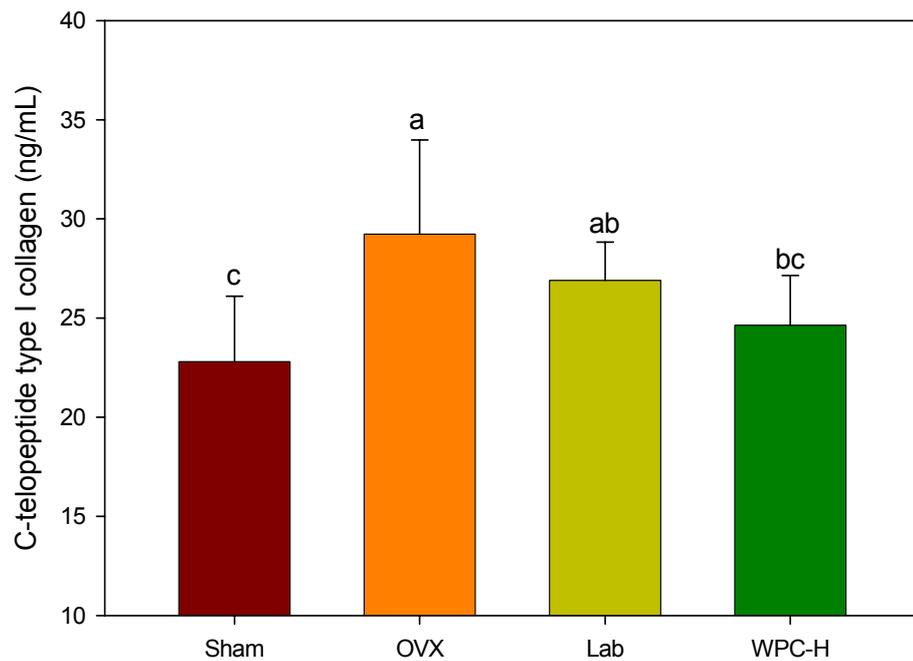


Fig. 63. The concentrations of serum C-telopeptide type I collagen fragment in ovariectomized rats fed on diets containing WPC-H and LC-393 ($p<0.05$).

이 결과는 OVX 처리구에서 파골세포에 의해서 발생하는 골의 재흡수가 Sham에 비하여 높게 나타남을 의미한다. 그러므로, WPC-H나 LC-393의 급여가 파골세포의 활성을 감소시키는데 기여할 수 있는 것으로 판단된다.

대퇴골의 물리적 성질을 나타낸 결과는 Table 24와 같다. 골격의 형성은 체중과 밀접한 관계를 가지고 있으므로 난소의 제거로 난소 적출구들은 난소 비적출구에 비하여 높은 체중을 나타내었고, 그에 따라 femur의 길이도 증가될 것으로 예상되었으나 난소 적출에 의한 대퇴골의 길이의 유의적 차이는 관찰되지 않았다.

OVX 처리구는 다른 처리구에 비하여 대퇴골의 길이가 짧은 경향을 보였으며 유의적으로 낮은 대퇴골의 무게를 나타냈다. 특히, 대퇴골의 무게를 체중으로 나눈 체중 당 대퇴골의 무게에서는 난소 비적출구가 다른 처리구에 비하여 높은 값을 나타내었다. 이는 난소 적출에 의해 골격 형성이 감소되어 체중의 증가를 맞추어 주지 못했기 때문인 것으로 생각된다. 체중은 난소를 적출한 세 처리구(WPC-H, LC393, OVX)간에 유의적 차이가 나타나지 않은 반면 대퇴골의 무게에서는 WPC-H와 LC-393의 급여 처리구가 유의적으로 높았다.

대퇴골 내 무기질의 양을 의미하는 BMC는 난소적출 처리구가 난소 미적출 처리구보다 낮았으며 LC-393을 급여한 처리구에서는 난소 미적출 처리구와 유사한 무기질 함량을 나타냈다(Fig. 64). WPC-H 처리구에서도 난소 적출 처리구에 비하여 높은 무기질 함량을 보였으며 이는 LC-393과 WPC-H의 급여에 의하여 골내 무기질의 함량이 증가된 것으로 생각된다. 그러므로 LC-393과 WPC-H의 급여는 조골세포의 성장을 촉진하는 생체 외 실험결과와 일치하는 경향을 나타내었으며 궁극적으로 골형성의 증가에 기여하는 것으로 사료된다.

대퇴골이 파괴될 때까지 소요되는 힘을 Texture analyser(Stable micro system, USA)로 측정한 결과는 Fig. 65와 같다. 난소 적출구의 경우 약 10 kg의 힘을 가하게 되었을 때 대퇴골이 파괴된 반면, 난소 미적출구에서는 그보다 큰 힘(약 12kg)이 필요한 것으로 나타났다. 또한, WPC-H와 LC-393을 급여한 처리구의 경우 난소 미적출구 보다는 적은 힘이 필요 했지만, 난소 적출구에 비하여 약 1.5 kg의 힘이 더 필요하였다.

Table 25. Physical properties of femur in ovariectomized rats fed on diets containing WPC-H and LC-393

	Length (cm)	Weight (mg)	wt/bw (mg/g)	BMC (mg)
OVX	3.38±0.08	4701±269 ^b	13.96±1.24 ^c	263±13 ^c
Sham	3.43±0.05	4986±287 ^a	17.36±2.48 ^a	289±25 ^{ab}
WPC-H	3.44±0.11	4881±379 ^{ab}	14.30±0.98 ^b	271±25 ^{bc}
LC-393	3.41±0.06	5075±302 ^a	15.37±1.47 ^b	290±23 ^a

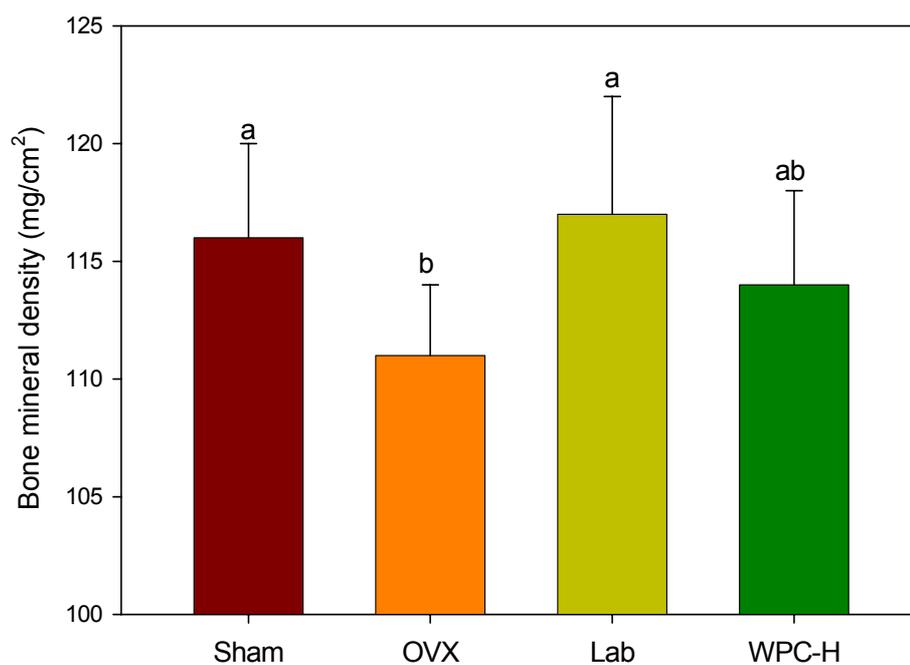


Fig. 64. Bone mineral density (BMD) of femur in ovariectomized rats fed on diets containing WPC-H and LC-393.

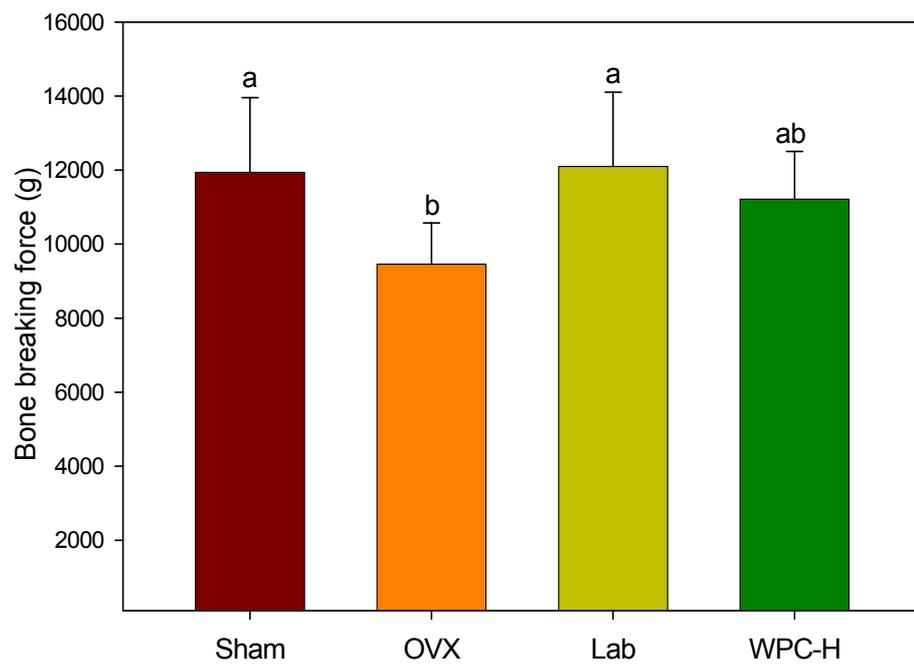


Fig. 65. Breaking force of femur in ovariectomized rats containing WPC-H and LC-393 ($p < 0.1$).

이상의 결과를 종합적으로 분석하면 유청단백질 효소분해물이나 발효분해물의 급여가 난소적출 된 rat에서 대퇴골의 무게, 골내 무기질 함량, 대퇴골의 강도를 모두 유의적으로 증가시키고 골의 재흡수를 감소시키는 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

2) 2차 동물실험 : 난소 절제된 rat을 모델로 이용한 유단백 분해물과 발효분해물의 사료 내 첨가 수준 탐색

1차 실험과 마찬가지로 난소 절제를 실시하지 않은 처리구가 난소 절제를 실시한 처리구에 비하여 낮은 체중을 나타냈다 (Table 26).

Table 26. Change of body weight during experiment

	Initial BW (g)	2 wks BW (g)	4 wks BW (g)	6 wks BW (g)
OVX	246.8±12.2	303.4±25.5 ^a	324.52±36.9 ^a	325.1±38.1 ^a
Sham	242.5±12.2	262.3±19.6 ^b	269.5±19.2 ^b	272.8±16.6 ^b
LC-393 1%	241.6±8.1	300.5±12.3 ^a	319.8±12.7 ^a	318.1±13.5 ^a
LC-393 2%	244.0±9.6	301.8±12.6 ^a	309.8±22.0 ^a	318.3±29.8 ^a
LC-393 4%	241.5±9.2	305.0±19.4 ^a	324.2±29.2 ^a	334.734.9 ^a
WPC-H 1%	239.1±10.5	297.6±14.4 ^a	316.7±16.8 ^a	322.4±10.4 ^a
WPC-H 2%	241.8±8.4	303.6±15.4 ^a	323.0±20.4 ^a	324.4±28.6 ^a
WPC-H 4%	235.2±11.5	288.5±17.9 ^a	314.5±25.4 ^a	313.2±32.4 ^a

골대사와 관련된 혈액 내 성분의 함량을 측정한 결과는 Table 27과 같다. 골의 생성과 관련되어지는 ALP는 난소 적출한 대조구에 비하여 다른 처리구에서 모두 높은 함량을 나타냈다. LC-393를 급여하였을 경우 급여 수준이 증가할수록 ALP의 농도는 증가하는 경향을 보였으나, WPC-H를 급여하였을 경우는 반대의 경향을 나타냈으며 creatinine, BUN, 칼슘, 인의 함량은 모두 처리구간의 차이가 없었다.

Table 27. The concentrations of serum alkaline phosphatase (ALP), creatinine, blood urea nitrogen (BUN), calcium (Ca), and inorganic phosphorus (IP) in ovariectomized rats fed on diets containing WPC-H and LC-393

	ALP (U/L)	Creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)
OVX	145±61	0.62±0.04	20.52±3.95	10.21±0.57	7.75±1.61
Sham	155±35	0.60±0.05	19.30±3.40	10.40±0.47	7.40±1.59
LC-393 1%	170±43	0.62±0.04	19.74±3.19	10.10±0.54	6.87±1.41
LC-393 2%	155±38	0.62±0.08	20.22±5.15	9.84±0.89	7.04±0.91
LC-393 4%	182±47	0.65±0.07	22.15±3.19	9.92±0.50	7.92±1.00
WPC-H 1%	177±56	0.62±0.04	19.27±3.63	10.07±0.46	7.75±1.28
WPC-H 2%	172±61	0.60±0.05	17.95±3.54	9.91±0.64	7.72±1.61
WPC-H 4%	167±40	0.66±0.07	22.42±6.32	10.00±0.62	7.22±1.78

대퇴골의 길이는 처리구간의 유의적 차이는 없었으나 무게는 OVX 처리구가 모든 처리구에 비하여 유의적으로 낮았다(Table 28). 처리구 중 LC-393 1%와 WPC-H 2%의 처리구에서 대퇴골의 무게의 증가가 뚜렷하였다. BMD의 경우 난소 적출에 의해서 감소하였으며 처리구는 난소적출 대조구에 비하여 높은 골밀도를 나타냈다.

Table 28. Physical properties of femur in ovariectomized rats fed on diets containing WPC-H and LC-393 (P<0.05)

	Length (cm)	Weight (mg)	BMD (mg/cm ²)	BMC (mg)
OVX	3.35±0.93	422±27 ^b	162±3 ^c	296±24 ^b
Sham	3.31±0.95	463±14 ^a	178±10 ^a	329±18 ^a
LC-393 1%	3.35±1.35	468±21 ^a	171±5 ^{ab}	315±21 ^{ab}
LC-393 2%	3.35±1.11	451±13 ^a	167±6 ^{bc}	315±22 ^{ab}
LC-393 4%	3.40±0.60	464±14 ^a	168±3 ^{bc}	326±10 ^a
WPC-H 1%	3.42±0.93	465±18 ^a	169±4 ^{abc}	319±18 ^{ab}
WPC-H 2%	3.41±1.28	477±28 ^a	171±9 ^{ab}	331±23 ^a
WPC-H 4%	3.37±1.69	451±25 ^a	168±6 ^{bc}	312±15 ^{ab}

골의 직접적인 강도를 측정할 때 파괴강도에서도 난소 절제에 의해 골의 강도가 낮아지는 것이 확인되었다(Fig. 66). LC-393과 WPC-H 처리에 의하여 골의 강도가 증가하였으나 첨가수준에 따른 골 강도의 변화는 관찰되지 않았다. 그러므로 사료 내 유청 단백질 가수분해물이나 발효분해물은 1% 이하의 첨가수준에 골밀도를 증진시키는 효과를 가지는 것으로 판단된다.

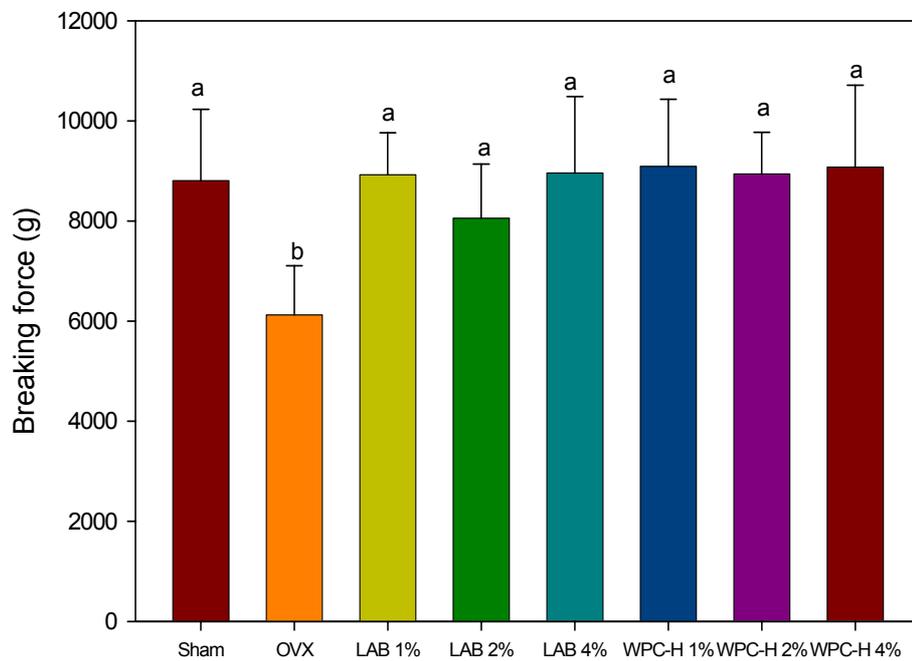


Fig. 66. Breaking force of femur in ovariectomized rats containing various concentration of WPC-H and LC-393.

골 재흡수에 의해 혈액으로 유입되는 C-telopeptide type I collagen fragment의 혈액 내 농도를 측정한 결과는 Fig. 67과 같다. OVX 처리구가 다른 처리구에 비하여 유의적으로 높은 농도를 나타냈으며 LC-393과 WPC-H 급여에 의해서 C-telopeptide type I collagen fragment의 수준이 감소하는 것이 확인되었다. 앞의 결과와 유사하게 첨가 수준에 따른 영향은 관찰되지 않았다.

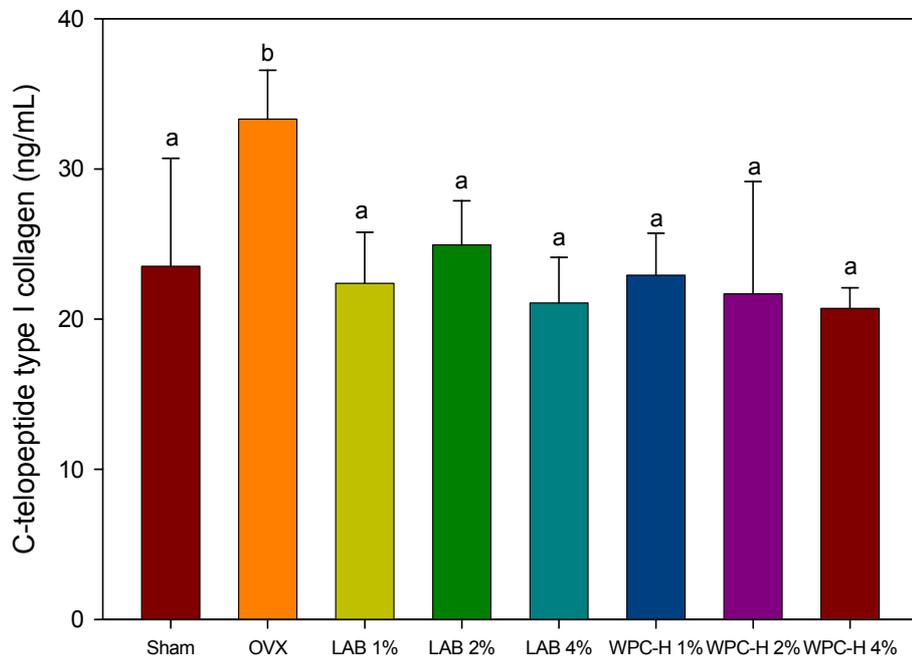


Fig. 67. The concentrations of serum C-telopeptide type I collagen fragment in ovariectomized rats fed on diets containing WPC-H and LC-393 ($p < 0.05$).

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

제 1 절 주관과제

우유단백질의 효소 분해에 의한 가수 분해물의 제조, 물리화학적 특성 구명 및 활성 펩타이드 제조를 위한 대량생산 공정의 개발

본 연구과제는 우유단백질에 단백질 분해효소를 첨가하여 가수분해물을 제조하고 가수분해물로부터 골밀도 강화 기능을 가지는 활성 분획을 분리 정제 하는 공정을 확립하는 것을 일차적 목표로 두고 있으며 활성 분획의 물리화학적, 관능적 특성을 분석하여 궁극적으로 식품소재화를 위한 자료를 제공하는 것을 이차적 목표로 하고 있다.

골밀도 강화 기능을 가지는 활성분획의 존재여부를 확인하기 위한 방법으로써 조골세포의 배양 실험을 이용하여 다양한 효소 및 가수분해 조건으로 제조된 우유단백질 분해물의 조골세포 성장 촉진 효과를 분석한 결과 Flavourzyme(5%, 단백질 함량 기준)을 이용하여 제조된 유청단백질 분해물이 가장 높은 활성을 나타내었다. 최적가수분해 조건은 반응표면분석을 이용하여 예측하고 확인실험을 통하여 검증함으로써 최적가수분해 조건을 설정(54℃, 140분)하였다.

효율적 분리 정제의 방법으로 효소의 실활 조건(pH 4.0, 85℃, 5min)과 에탄올 처리(30%, w/w) 과정을 조합하여 제조된 가수분해물은 cation column chromatography로 정제하여 얻어진 염기성 분획의 활성과 유사함을 확인하였으며 대량 생산 공정으로써 일련 공정을 설계하여 제시하였다.

최종적으로 얻어진 활성 유청단백질 분해물의 물리화학적 특성은 다양한 pH와 가열 조건에서 조사되었으며 관능검사를 통하여 시제품의 관능적 특성을 분석하였다. 시제품은 단백질 가수분해물의 제조 시 발생할 수 있는 쓴맛이 감지되지 않았으므로 관능적 특성 개선을 위한 별도의 가공 공정은 불필요한 것으로 나타났다. 또한 시제품은 4℃이하의 저온에서 저장 시 조골세포의 성장 촉진 활성이 유지되는 것으로 나타났다. 이상의 연구 결과로써 연구목표는 무난히 달성된 것으로 판단된다.

본 연구과제에서 제시한 골밀도 기능 강화 펩타이드 소재를 생산하는 기술은 향후 단백질소재를 이용한 기능성 펩타이드의 생산에 적극적으로 활용될 수 있으며 신제품의 개발을 촉진시킴으로써 식품산업의 활성화에 기여할 수 있을 것으로 판단된다. 특히, 국내 낙농산업의 안정적 발전 및 자원의 효율적 활용 측면에서 유청의 생산 및 그 이용방안이 확립되지 않은 국내 실정을 고려할 때 유청을 활용하여 고부가 가치의 소재를 발굴하는 일은 매우 의미 있는 일로 사료 된다.

제 2 절 협동과제

미생물 발효에 의한 우유단백질 분해물의 분별 및 생체 내 · 외에서의 골밀도 증진효과 검증

본 협동과제는 다양한 근원에서 분리, 동정한 미생물 균주를 대상으로 우유 단백질 분해능이 우수한 균주를 선발하고, 생체 외에서 조골세포를 대상으로 유단백질 분해물의 성장 효능을 평가하였으며 생체 내 골밀도 증진효과를 쥐를 이용한 동물 실험을 통하여 검증하였다. 또한, 조골세포에서 유단백질 분해물의 첨가 시 특이적인 단백질의 발현 양상의 변화를 이차원 전기영동을 통해 확인하였다.

그 결과로써 단백질 분해 능력이 높은 *Lactobacillus acidophilus* 4356, *Lactobacillus casei* 393, *Lactococcus* 449 등 3 종의 유산균주를 최종 선발하였으며 유청단백질 분해물 및 미생물 발효분해물이 조골세포의 성장 및 분화를 촉진하는 효과를 가진 것을 확인하였다. 또한 *L. casei* 393 발효분해물을 조골세포에 첨가하여 배양한 후 특이적으로 발현이 변화되는 단백질을 동정한 결과 Eva6 protein같은 growth factor의 receptor의 발현을 증가시키는 것을 발견하였다.

최종적으로 유청단백질 효소분해물(WPC-HD)과 발효분해물(LC-393)의 생체 내 효과를 분석한 결과 유청단백질 효소분해물과 발효분해물이 처리된 실험구에서 다양한 골형성과 관련된 생화학 지표들의 농도 증가가 관찰되었다. 유청단백질 효소분해물 및 발효분해물의 사료 내 첨가수준을 탐색하기 위해 1%, 2%, 4% 수준으로 유청단백질 분해물 및 발효분해물을 첨가하여 2차 동물실험을 실시한 경우 첨가 수준에 따른 유의적 차이는 적었지만 전체적으로 효소분해물의 경우는 2%에서, 발효분해물

의 경우는 4%의 첨가에서 가장 높은 골밀도 증진효과를 나타냈다.

최근 식물에서 유래한 다양한 생리활성 성분 중 골형성과 관련된 연구가 보고 되고 있으나 아직까지 그 명확한 기작과 물질 탐색은 기초단계에 머물러 있는 실정이므로 본 연구는 학문적이나 산업적으로 중요한 의미를 가진 것으로 판단된다. 본 연구결과는 산업 현장에서 대량생산 공정에 적용하기 위한 기초 자료의 제공을 가능하게 하며 다양한 형태의 유제품의 생산에 활용이 가능할 것으로 판단되며 기술이전 등을 통하여 유제품 산업의 내수시장을 안정화하고 원료수입에 대한 대체효과 및 수출 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용 계획

1995년 유제품 시장이 개방된 이래 우리나라의 유제품시장과 낙농산업은 커다란 변화를 겪고 있으며 실제적으로 국내 낙농산업은 상당부분 시유에 의존하고 있는 실정이다. 우리나라의 우유소비는 60%이상이 음용유로 구성되어 선진국에 비하여 소비비율이 높고 수입개방의 문제점은 적은편이나 장기간 저장이 불가능하므로 과잉생산 시 원유의 수급불안정이 심화될 위험성이 있다(Han, 2003). 낙농산업의 지속 가능한 발전방안은 상당부분 제도적 측면에서 접근하여야 하나 산업계나 학계에서는 제품의 고급화와 다양화를 통하여 유가공품의 소비확대를 통한 문제점의 해결방안을 찾아야 할 것으로 생각된다.

현재 우리나라에서 골밀도의 저하에 따른 골다공증의 발생은 성별에 관계없이 증가하고 있으며 골다공증은 평소의 식생활 습관과 직결되므로, 골밀도가 최고에 달하는 20대 후반이나 30대 초부터 골다공증의 예방을 위한 노력이 필요하다. 우유의 섭취에 의한 칼슘의 공급만으로는 갱년기 골다공증의 발생을 효과적으로 막을 수 없다는 보고 등을 고려할 때 조골세포와 파골세포의 활성의 균형을 조절할 수 있는 골밀도 강화용 우유펩타이드의 활용은 적절한 접근 방법으로 사료된다.

본 연구과제의 결과는 골밀도 강화를 위한 기능성 소재로서 우유 유래 펩타이드의 잠재적 능력을 시사해 주었다고 생각한다. 우유에서 유래한 단백질의 가수분해물은 안전성의 평가에서 문제점이 없으며 우유단백질과 비교할 때 pH, 온도 등의 환경조건에서 우수한 물리화학적 특성을 나타내므로 다양한 식품의 형태에 적용이 가능할 것으로 판단된다. 최종적으로 본 연구에서 제조된 골밀도 강화 펩타이드는 우유에서 유래한 고부가가치의 식품소재로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대되며 우유가 가지고 있는 다양한 생리기능성에 관한 유사 연구의 기초 자료로서 활용될 수 있을 것이다. 그러나 최종적 산업적 적용을 위해서는 작용기작에 대한 연구의 보완이 필요할 것으로 판단된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

우유에서 유래한 다양한 생리활성 펩타이드에 관한 연구가 활발하게 진행되어 왔으나 실제로 상업적으로 생산되는 펩타이드는 매우 적은 것이 현실이다. 또한 직접적으로 골밀도 증진과 관련된 활성 펩타이드에 관한 보고는 거의 없는 실정이다. 최근 일본의 유키지루시 유업에서는 우유에서 유래한 골밀도 증진 활성 펩타이드인 MBP를 제조하여 판매하고 있으며 정제와 다양한 동물실험을 통해 그 효능을 다각도로 검증해 왔다. 하지만 아직까지 그 분획의 정제방법과 특성에 관한 명확한 보고는 없는 실정이다. 또 다른 연구보고에 의하면 우유에서 분리한 lactoferrin에서 골밀도 증진에 높은 활성을 나타내었다는 보고가 있으나 (Cornish et al., 2005) 두 가지 종류의 단백질 모두 우유에 미량으로 존재하는 단점을 가지고 있다.

최근 mesenchymal stem cell에서 IGF를 포함한 다양한 관련인자의 영향을 통해 osteoblast cell과 adipocyte cell로 분화하는 pathway를 조절할 수 있다고 보고되었다(Harada and Rodan, 2003). 이는 지방의 축적과 골밀도 관련 세포의 분화는 매우 밀접한 관계가 있는 것을 제시해 주는 보고로 판단된다. 따라서 직접적인 골밀도 증진 효과 이외에 우유에서 분리한 생리활성 물질에 의해 간접적으로 골밀도 증진과 관련된 인자들을 조절하는 물질을 탐색할 수 있을 것으로 판단된다.

제 7 장 참고문헌

Agostino, M., Loredana, B. and Victoria, P. 1995. In vitro hormonal effect of soybean isoflavones. *J. Nutr.* 125: 751S.

Aoe, S., Toba, Y., Yamamura, J., Kawakami, H., Yahiro, M., Kumegawa, M., Itabashi, A. and Takada, Y. 2001. Controlled trial of the effects of milk basic protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy adult women. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 913-918.

Arjmandi, B. H., Alekel, L., Hollis, B. W., Amin, D., Stacewicz-sapuntzakis, M., Guo, P. and Kukreja, S. C. 1996. Dietary soybean protein prevents bone loss in ovariectomized rat model of osteoporosis. *J. Nutr.* 126: 161-167.

Bazinet, L., Trigui, M. and Ippersiel, D. 2004. Rheological behavior of WPI dispersion as a function of pH and protein concentration. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5366-5371.

Bowles, S. A., Kurdy, N., Davis, A. M., France, M. W. and Marsh, D. R. 1996. Serum osteocalcin, total and bone-specific alkaline phosphatase following isolated tibial shaft fracture. *Ann. Clin. Biochem.* 33: 196-200.

Boza, J. J., Moennoz, D., Vuichoud, J., Jarret, A. R., Gaudard-de-Weck, D. and Balleve, O. 2000. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diet on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur. J. Nutr.* 39: 237-243.

Carr, J. C., Cutting, G. V. and Whiting, G. C. 1977. Lactic acid bacteria in beverage and food. Academic Press, New York, N.Y. p.233-266.

Chobert, J. M., Bertrand-Harb, C. and Nicolas, M. G. 1988. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *J. Agric. Food Chem.* 36: 883-892.

Choi, E. M., Suh, K. S., Kim, Y. S., Choue, R. W. and Koo, S. J. 2001. Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry* 56: 733-739.

Christenson, R. H. 1997. Biochemical markers of bone metabolism: An overview. *Clin. Biochem.* 30: 573-593.

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

Cornish, J., Callon, K. E., Naot, D., Palmano, K. P., Banovic, T., Bava, U., Watson, M., Lin, J. M., Tong, P. C., Chen, Q., Chan, V. A., Reid, H. E., Fazzalari, N., Baker, H. M., Baker, E. N., Haggarty, N. W., Grey, A. B. and Reid, A. R. 2005. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in Vivo. *Endocrinology* 145: 4366-4374.

Das, A. S., Das D., Mukherjee, M., Mukherjee, S. and Mitra C. 2005. Phytoestrogenic effect of black tea extract (*Camellia sinensis*) in an oophorectomized rat (*Rattus norvegicus*) model of osteoporosis. *Life Sci.* 77: 3049-3057.

Donovan, M. and Mulvihill, D. M. 1987. Thermal denaturation and aggregation of whey proteins. *Irish J. Food Sci. Tech.* 11: 87-100.

Feskanich, D., Willett, W. C., Stampfer, M. J. and Colditz, G. A. 1997. Milk, dietary calcium, and bone fractures in women: a 12-year prospective study. *Amer. J. Public Health.* 87: 992-997.

Gorozyca, W., Gong, J., Ardelt, B., Traganos, F. and Darzynkiewicz, Z. 1993. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res.* 53: 3186-3192.

Groleau, P. E., Morin, P., Gauthier, S. F. and Pouliot, Y. 2003. Effect of physicochemical conditions on peptide-peptide interactions in a tryptic hydrolysate of β -lactoglobulin and identification of aggregating peptide. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4370-4375.

Hahn, R., Schulz, P. M., Schaupp, C. and Jungbauer, A. 1998. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. *J. Chromatogr.* 795: 277-287.

Han, D. B. 2003. New directions of dairy industry in the era of trade liberalization. *J. Korean Dairy Technol.* 21: 45-53.

Harada, S. I. and Rodan, G. A. 2003. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423: 349-355.

Huang, W., Carlsen, B., Rudkin, G., Berry, M., Ishida, K., Yamguchi, D. T. and Miller, T. A. 2004. Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. *Bone* 34: 799-808.

Ishibashi, N., Ono, I., Kato, K., Shigenaga, T., Shinoda, I., Okai, H. and Fukui, S. 1988. Role of hydrophobic amino acid residue in the bitterness of peptide. *Agric. Biol. Chem.* 52: 91-94.

- Ju, Z. Y., Otte, J., Madsen, J. S. and Qvist, K. B. 1995. Effect of limited proteolysis on gelation and gel properties of whey protein isolate. *J. Dairy Sci.* 78: 2119-2128.
- Kee, H. J. and Hong, Y. H. 1998. Functional properties of α -Lactalbumin Separated from Bovine Whey. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour* 18: 9-18.
- Kim, C., Ha, H., Kim, H., Lee, J. H. and Song, K. Y. 2002. Pueraria lobata Ohwi as an osteoporosis therapeutics. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 710-718.
- Kim, K. Y., Kim, S. B. and Lim, J. W. 2004. Effects of safflower seed yoghurt on the osteoporosis in ovariectomized rats. *Korean J. Anim. Sci. Technol.* 46: 69-76.
- Klemaszewski, J. L., Das, K. P. and Kinsella, J. E. 1992. Formation and coalescence stability of emulsions stabilized by milk proteins. *J. Food Sci.* 57: 366-371, 379.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227: 680-685.
- Lee, D. S. and Byun, S. Y. 2001. Effect of the dietary mixture of isoflavone on osteoporosis. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 16: 420-425.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Mahmoud, M. I. 1994. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol.* 48: 89-95.

- Matsudomi, N., Kanda, Y., Yoshika, Y. and Moriwaki, H. 2004. Ability of α s-casein to suppress the heat aggregation of ovotransferrin. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4882-4886.
- Matsuoka, Y., Serizawa, A., Yoshioka, T., Yamamura, J., Morita, M., Kawakami, H., Toba, Y., Takada, Y. and Kumegawa, M. 2002. Cystatin C in milk basic protein (MBP) and its inhibitory effect on bone resorption in vitro. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 2531-2536.
- Mine, Y. 1997. Effect of dry heat and mild alkaline treatment on functional properties of egg white proteins. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2924-2928.
- Moro, A., Gatti, C. and Delorenzi, N. 2001. Hydrophobicity of whey protein concentrates measured by fluorescence quenching and its relation with surface functional properties. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4784-4789.
- Mutilangi, W. A. M., Panyam, D. and Kilara, A. 1995. Hydrolysate from proteolysis of heat denatured whey proteins. *J. Food Sci.* 60: 1084-1087.
- Nielsen, P. M., Petersen, D. and Dambmann, C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis, *J. Food Sci.* 66: 642-646.
- Oates, T. W., Rouse, C. A. and Cochran, D. L. 1993. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J. Periodontol.* 64: 142-148.
- Orcel, P. and Krane S. M. 2000. Secondary osteoporosis and glucocorticoid induced osteoporosis. *Ann. Med. Interne.* 151: 497-502.

- Otte, J., Lomholt, S. B., Ispen, R., Stapelfeldt, H., Bukrinsky, J. T. and Qvist, K. B. 1997. Aggregate formation during hydrolysis of β -Lactoglobulin with a Glu and Asp specific protease from *Bacillus licheniformis*. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4889-4896.
- Panyam, D. and Kilara, A. 1996. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 120-125.
- Park, J. H., Lee, J. W., Kim, H. J. and Lee, I. S. 2005. Effects of *Solidago virga-aurea* var. *gigantea* Miq. root extracts on the activity and differentiation of MT3T3-E1 osteoblastic cell. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 929-936.
- Parfitt, A. M. 1994. Osteonal and hemi-osteonal remodelling : The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J. Cell. Biochem.* 55: 273-286.
- Paulsson, M., Hwgg, P. O. and Castberg, H. B. 1985. Thermal stability of whey proteins studied by differential scanning calorimetry. *Thermochim. Acta.* 95: 435-440.
- Pearce, K. N. and Kinsella, J. E. 1978. Emulsifying properties of proteins; Evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.* 26: 716-720.
- Ragic, J. L. and Kurmann, J. A. 1989. *Yoghurt. Tech. Dairy Publ. House, Denmark.* p.90-97.
- Robey, P. G., Bianco, P. and Termine, J. D. 1992. The cellular biology and molecular biochemistry of bone formation. In *Disorders of Mineral Metabolism.* Eds. Coe, F. L. and Favus, M. J.. New York, Raven Press, pp.241-263.

Schmidt, R. T., Packard, V. S. and Morris, H. A. 1984. Effect of processing on whey protein functionality. *J. Dairy Sci.* 67: 2723-2733.

Seth, R., Yang, S., Choi, S., Sabeen, M. and Roberts, E. A. 2004. In vitro assessment of copper-induced toxicity in the human hepatoma line, Hep G2. *Toxicology in Vitro.* 18: 501-509.

Spellman, D., McEvoy, E., O'Cuinn, G. and FitzGerald, R. J. 2003. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *Int. Dairy J.* 13: 447-453.

Takada, Y., Kobayashi, N., Kato, K., Matsuyama, H., Yahiro, M. and Aoe, S. 1997a. Effect of whey protein on calcium and bone metabolism in ovariectomized rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 43: 199-210.

Takada, Y., Matsuyama, H., Kato, K., Kobayashi, N., Yamamura, J., Yahiro, M. and Aoe, S. 1997b. Milk whey protein enhances the bone breaking force in ovariectomized rats. *Nutr. Res.* 17: 1709-1720.

Takada, Y., Kobayashi, N., Matsuyama, H., Kato, K., Yamamura, J., Yahiro, M. and Aoe, S. 1997c. Whey protein suppresses the osteoclast-mediated bone resorption and osteoclast cell formation. *Int. Dairy J.* 7: 821-825.

Takada, Y., Aoe, S. and Kumegawa, M. 1996. Whey protein stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223: 445-449.

Toba, Y., Takada, Y., Yamamura, J., Tanaka, M., Matsuoka, Y., Kawakami, H., Itabash, A., Aoe, S. and Kumegawa, M. 2000. Milk basic protein: a novel protective function of milk against osteoporosis. *Bone.* 27: 403-408.

Tong, M. A. 1978. Rheology of protein dispersions. *J. Texture Studies* 9: 3-31.

Van der Ven C., Gruppen, H., de Bont, D. B. A. and Voragen, A. G. J. 2001. Reversed phase and size exclusion chromatography of milk protein hydrolysate: relation between elution from reversed phase column and apparent molecular weight distribution. *Int. Dairy J.* 11: 83-92.

Wang, D., Christensen, K., Chawla, K., Xiao, G., Krebbach, P. H. and Franceschi, R. T. 1999. Isolation and Characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *JBMR.* 14: 893-905.

Yamamura, J., Aoe, S., Toba, Y., Motouri, M., Kawakami, H., Kumegawa, M., Itabashi, A. and Takada, Y. 2002. Milk basic protein (MBP) increases radial bone mineral density in healthy adult women. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 702-704.

Yamamura, J., Takada, Y., Goto, M., Kumegawa, M. and Aoe, S. 1999. High mobility group-like protein in bovine milk stimulates the proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261: 113-117.