

발간등록번호

11-1541000-001342-01

## 치즈유청을 이용한 프레바이오틱스 및 고부가가치 성 특수 식품소재의 개발

(Development of Prebiotics and Highly Value-Added Food Ingredients with Specified Health Claims Using Cheese Whey)

연세대학교 원주산학협력단

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “치즈유청을 이용한 프레바이오틱스 및 고부가가치성 특수 식품소재의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012 년 4 월 9 일

주관연구기관명 : 연세대학교

총괄연구책임자 : 윤 성 식

세부연구책임자 : 남 명 수

세부연구책임자 : 주 영 철

연 구 원 : 김 기 환

연 구 원 : 전 상 록

연 구 원 : 김 지 연

연 구 원 : 송 태 석

연 구 원 : 최 지 아

연 구 원 : 강 승 범

연 구 원 : 이 경 상

연 구 원 : 배 형 철

연 구 원 : 렌친핸드

연 구 원 : 정 승 희

연 구 원 : 변 정 렬

연 구 원 : 홍 중 구

# 요 약 문

## I. 제 목

치즈유청을 이용한 프레바이오틱스 및 고부가가치성 특수 식품소재의 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

유청은 카제인(casein) 또는 치즈 제조 시 부산물로 얻어지는 황갈색의 물질로서 다양한 물리화학적, 기능적 특징을 가진 단백질과 유당이 주성분임. 단백질은 영양면에서 중요한 역할을 담당할 뿐만 아니라 대부분의 경우 생체 내에서 특수한 생리적 기능을 담당함. 유청 단백질 중에는 신생아에게 중요한 면역성분이 다수 알려져 있고 소화된 가수분해물, 즉 펩타이드들은 생리활성물질로 각광을 받고 있음. 유청에 가장 많이 함유되어 있는 유당은 감미가 낮으나 칼슘의 흡수, 신경세포의 형성에 중요한 이당류로서 Lactase(또는  $\beta$ -galactosidase)에 의해 가수분해되어 포도당(glucose)과 갈락토오스(galactose)로 분해됨. lactase 중에는 가수분해 활성 외에도 transgalactosylation에 의해서 갈락토올리고당(galtooligosaccharide, GOS)을 합성하는 활성이 있음. 효소공학적 기술을 이용하여 생성되는 올리고당은 probiotic 미생물인 *Bifidobacterium* 속의 증식을 촉진하는 것으로 확인됨. 본 연구는 농축 치즈유청을 직접 이용하여 probiotics용 기능성 올리고당을 합성하는 동시에 단백질 가수분해를 통하여 우유, 발효유 및 각종 식품의 건강기능성 소재뿐만 아니라 프로바이오틱 유산균의 성장 촉진효과를 발휘하는 펩타이드 소재를 개발하여 인체 및 동물용 프로바이오틱스 제재, 조미제, 전통발효 식품(젓갈, 김치 등)의 첨가물을 개발하기 위한 필요한 과제임.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 가. 농축 치즈유청을 이용한 프레바이오틱스 및 활용기술 개발(연세대)

- 농축 치즈유청을 이용한 유당분해 효소 및 미생물(효모, 곰팡이, 유산균) 생산기술 개발
- 농축 치즈유청을 이용한 고농도 유산균이 함유된 발효액의 생산기술 개발
- 유당분해 효소 및 미생물 균체의 고정화기술 확립과 갈락토올리고당(GOS)의 생

산

- 갈락토올리고당(GOS)이 고농도 함유된 prebiotic 물질 생산 기술개발
- 농축 치즈유청 발효액으로부터 갈락토올리고당(GOS)의 분리 및 정제 기술 개발
- 농축 치즈유청 발효액의 다양한 활용화 기술 검토

#### 나. 치즈 유청단백질의 생리적 기능성 탐색 및 특수 식품소재 개발(충남대)

- 농축유청의 가수분해효소 및 분해조건 확립
- 유청단백질 가수분해물의 제조 및 기능성 peptide화 기술 개발
- 유청단백질 가수분해물을 이용한 아토피 저감 및 항비만 소재의 개발
- 유청단백질 가수분해물의 항염증 활성 물질의 개발
- 실험동물 모델을 이용한 유청단백질 가수분해물의 기능 연구
- 유청단백질 가수분해물의 다양한 활용화 기술 검토

#### 다. 치즈유청으로부터 Growth Promotion 물질 및 생산 공정의 개발 (바이셀)

- 증식촉진물질을 이용한 발효유의 발효기간 단축 연구: 호상요구르트와 드링크요구르트 제조 시 소요되는 시간이 짧게는 5~6시간, 통산 8시간 정도 소요되는 바, 유청을 이용하여 개발된 증식촉진물질을 1~2% 첨가 시 10~15% 정도 배양시간이 단축되어 생산성이 향상되도록 함.
- 증식촉진물질의 연구 분야를 다음과 같이 3가지로 나누어서 실시하는 함.
  - 1) 생육촉진물질의 개발
  - 2) *Bifidobacterium* 생육촉진물질의 개발
  - 3) *Streptococcus / Lactococcus* 생육촉진물질의 개발
    - 유산균의 그룹별로 증식촉진효과가 나오는 물질의 선발과 조합을 통하여 최적화된 growth promoter를 개발 하도록 함.
    - 유청효소분해 및 발효액, 유청단백질효소분해액을 효모 엑기스 및 기존 생육촉진물질과 비교 평가하고, 이를 효율적으로 조합하여 시너지 효과가 있는 배합률을 완성함.
- 호상요구르트와 드링크요구르트 및 장기배양을 하는 액상요구르트(65ml 타입) 제조 시 제품 중 유산균수의 증감을 시간별로 모니터링함.
- 유청을 원료로 한 growth promotion 물질과 타 물질과 함께 사용할 경우 상승효과의 유무를 측정하여 최적의 증식효과를 나타내는 원료의 조성과 첨가량을 확립함.
- 치즈유청으로부터 저렴하고 공정이 단순한 특수용도 식품소재의 생산공정을 확립함.

- 효모와 유산균 중에서 가장 우수한 유당분해 및 갈락토올리고당(GOS) 전이율이 우수한 선발 미생물의 최적 배양 조건을 검토하여 효율적인 생산방법을 구축함. 참여기업(삼익유가공)에서 스타터 제조방법, 유청농축액의 농도, 통기 조건, 기존 탱크의 활용을 통한 최소 투자 방안을 검토함.
- 미생물 배양공정, 유청 단백질 분해공정, 살균 및 분무공정 시 제품의 생산비용의 절감 및 최적 생산공정 확립함.
- Pilot plant를 이용하여 생산공정을 시뮬레이션(simulation)하고, 그 결과를 바탕으로 제품 생산 및 품질검사 등의 관리 매뉴얼(표준작업 manual)을 제작함.
- 개발된 소재 및 제품의 상품화는 다음 두 가지의 방향으로 생산하여 추진할 예정임.
  - 1) 삼익유가공의 현 설비를 최대한 활용하고, 추가투자를 최소화하여 자체 생산함.
  - 2) 삼익유가공에서 생산하기 어려운 소재 및 제품은 임가공 회사에서 생산함.
- 판매는 삼익유가공 자체 판매조직과 다른 유통조직을 활용하여 추진함.
  - 1) 삼익유가공 판매: 발효유를 제조하는 유가공업체에 유산균 생육촉진제, prebiotics 유청발효분말 등을 납품함.
  - 2) 유통조직통한 판매: 대형할인점이나 백화점, 슈퍼마켓 등에 소비자용 제품을 납품함(유청발효 농축액, 항비만제품, 항염증/아토피 저감제품).
- 항비만 제품이나 항염증/아토피 저감제품은 임가공 하여 판매하거나 건강기능식품 제조회사에 원료로 납품하는 방안을 동시에 고려함.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 연구 개발 결과

- 유산균배양용 분말유청배지는 유청분말 10%, 유기질소원 1% 이상 첨가하는 것이 유산균 배양 시 가장 우수하였음.
- 실험실에서 분리한 총 12주의 공시 유산균의 lactase 활성을 ONPG disc법을 이용하여 측정한 결과 김치 유산균을 제외한 대부분의 유산균에서 lactase 활성이 존재하였음.
- 12주의 공시 유산균주 중 probiotics 미생물로 이용하고 있는 *L. paracasei* FBT314, *L. helveticus* FBT1, *L. acidophilus* KCCM32820, *Lc. lactis* ATCC11454를 선별하였고

각각의 lactase의 활성을 측정한 결과 *L. paracasei* 유래의 lactase의 활성이 1,053 Unit 으로 가장 우수하였으며, 그 비활성(specific activity)은 206 U/protein, mg임.

○ *L. paracasei* FBT314 유래 lactase 조효소액의 최적 pH는 6.5-7.0 으로 나타났고, 온도는 30℃에서 가장 우수한 효소활성이 나타났음.

○ *L. paracasei* FBT314 유래의 lactase의 갈락토올리고당(GOS) 생성 최적 조건은 분말유청 내의 유당의 농도가 30%, 온도는 30℃에서 4시간 이상 배양하는 것임.

○ *L. paracasei* FBT314 유래의 lactase를 처리하여 생산한 갈락토올리고당(GOS)을 HPLC를 이용하여 분석한 결과 수율은 최대 19.1%정도임.

○ *L. paracasei* FBT314 유래의 lactase를 고정화하기 위하여 고정화 물질로는 1.5% sodium alginate가 가장 우수하였으며 고정화효소를 처리하여 생산한 갈락토올리고당(GOS)을 HPLC를 이용하여 분석한 결과 수율은 최대 15.4%로 나타났음.

○ Alcalase, Neutrase, Pancreatin 3 종류의 효소로 유청단백질을 가수분해 한 결과 pH 8.0에서 Alcalase는 50 ℃에서 180분간 반응시켰을 때 가수분해도는 12.5, Neutrase는 50 ℃에서 180분간 반응시켰을 때 가수분해도는 15.15, Pancreatin은 50 ℃에서 180분간 반응시켰을 때 21.73으로 다른 반응시간보다 가수분해도가 가장 높았음.

○ Alcalase, Neutrase, Pancreatin 3 종류의 효소로 50 ℃에서 180분간 유청단백질을 가수분해한 분자량 3,000 이하의 펩타이드 profile이 각 효소별로 펩타이드 양상이 다른 특징을 나타내므로 이러한 다양한 펩타이드가 생리활성 기능 연구에 크게 기여 할 것으로 생각됨.

○ 산생성속도와 유산균 생균수를 종합하여 볼 때 효소분해 유청농축액은 탈지분유와 효모액기스의 중간 정도의 발효 촉진 효과가 있었고, 탈지분유보다 1.6배 높은 생균수를 나타내어 발효촉진물질로서 기대됨. 효모액기스를 실제 사용가능한 농도까지 낮출 경우에는 유청효소분해액과 비슷한 효과를 보일 것으로 추정됨

○ 12종 유산균 및 3주의 *Saccharomyces cerevisiae* 에 대한 lactase 활성을 screening 한 결과 유산균 중에서는 *L. rhamnosus*, *Lc. lactis*, *Leuconostoc mesenteriodes*, *Weissella kimchii* 가 검출되지 않을 정도로 매우 낮았고, 효모 중에서는 실험실 분리균주인 *Saccharomyces cerevisiae* SD1, *Saccharomyces cerevisiae* MG3 균주가 낮은 활성을 보였음.

○ 활성이 비교적 강한 요구르트용 유산균 4종류(*L. acidophilus*, *Lc. lactis*, *L. helveticus*, *L. paracasei*)의 lactase 활성을 상업용 효소 Lactozyme 3000(Novo)과 비교한 바 *L. paracasei*가 시판 효소와 비슷한 정도의 강력한 균체 내 lactase 활성을 나타냄. 따라서 이 조효소에 대한 추가적인 연구를 수행하였다. 그 결과 pH는 7.0에서 최대의 활성을 나타냈고, 온도는 30°C가 최적임. 이 조효소액은 10% 유당을 10시간 만에 약 70%정도 분해하였음.

○ 최적온도인 30°C에서 갈락토올리고당(GOS)의 생산을 검토한 바 갈락토올리고당(GOS) 혼합물이 생성되는 것을 TLC를 통하여 확인 할 수 있었음.

○ *L. paracasei* 조효소액을 encapsulation 방법으로 고정화하였음. 산업적 이용성을 검토하였음. 코팅제는 예비실험을 통하여 5종의 hydrocolloid 물질 중에서 alginate와 modified starch를 선정하였고, alginate를 단독으로 사용한 것이 혼합사용하는 것 보다 우수하였음. Sodium alginate의 최적 농도는 1.5% 였고, 30°C에서 측정된 점도는 38.4 cP (mPa · s)임.

○ 유청분말의 염도(NaCl)는 유청배지를 제조하거나 유청을 효소의 기질로 사용할 때 고려되어야 할 사항으로 본 연구에서 사용한 유청분말(삼익유가공)의 염도를 Volhard법으로 측정한 결과 평균 3.55%로 나타났음.

○ Alcalase, Neutrase, Pancreatin 3 종류의 효소로 유청단백질을 가수분해 한 분해물을 이용하여 엘러지 저해 인자 기능 여부를 RBL-2H3 세포를 이용하여 측정한 바 유청단백질 가수분해물 전체, 3kD 이상, 3kD 이하로 구분한 결과 모두 엘러지 저해 기능은 아주 미약하거나 없는 것으로 확인되었음.

○ 락토페린은 여러 가지 생리활성기능이 보고된 바 있음. 본 연구에서 sms U937, NK92, 수지상세포의 분화된 상태인 mutz-3와 muDC를 이용하여 과민반응과 천식, 면역 관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 측정 한 결과 의미 있는 결과를 도출하였음. 락토페린을 단독 또는 면역증강물질인과 혼합하여 처리 한 경우 상승효과 작용으로 과민반응과 천식, 면역 관련 유전자의 발현을 강하게 유도하였음.

○ 조효소액 제조과정 중 high pressure homogenizer를 이용한 homogenization 과정을 추가한 결과 갈락토올리고당(GOS) 생산 수율이 증가함.

○ 농축유청 발효액(유당 30%)을 한외여과 후 감압농축, 동결건조 등을 통해 시제품을 성공적으로 제조하였음.

○ 농축유청 발효액(1/4X)에 LGG, *Bifidobacterium longum*을 접종하였을 때 0.1% garlic powder, 0.1% yeast extract를 각각 첨가한 경우 유산균의 증식이 더 우수하였음.

- 유청단백질의 가수분해물과 락토페린이 HMC-1 cell과 RAT 기원 Raw 264.7 cell을 이용한 *in vitro* 실험에서 알러지와 염증에 관련된 싸이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6의 발현에 영향을 미치는 것으로 확인되었음.
- 마우스의 항혈청을 이용한 항원성 저감은 유청단백질 가수분해물이 유청단백질에 비해서 현저히 낮은 항원성을 가지는 것으로 확인되었음.
- 알러지와 관련 있는 IgE의 분비는 정상마우스에 비해 유청단백질 투여 혈청과  $\beta$ -1 actoglobulin 투여 혈청에서 높게 나타나므로 유청단백질이 알러지원으로 작용하는 것으로 판단됨.
- 효소분해 유청분말을 제조하여 여기에 효모추출물을 혼합한 것과 혼합하지 않은 조성물을 액상요구르트와 호상요구르트, 치즈 제조 시에 1% 수준으로 첨가한 결과 대체로 유산균의 생육에 효과가 있었으며, 효모추출물을 혼합한 것이 더 효과적이었음.
- 유청농축액을 효소분해하여 분무건조 또는 진공건조로 효소분해 유청분말을 제조한 바, 흡습력이 강하여 caking을 방지할 필요가 있었음. 효소분해를 위한 반응탱크는 살균 및 냉각과 반응을 회분식으로 하기에 용이하도록 3중 자켓 타입으로 설계하여 제작하였으며, Pilot scale 로 시험한 결과 살균과 효소반응공정에 소요되는 총시간이 8시간 20분이었고 만일 불활성화를 생략하면 6시간 40분이었음. 실제 현장에서 HTST 살균기를 사용하지 않고 회분식으로 살균 냉각할 경우 이 정도의 시간이 소요될 것으로 예상됨. 또한 현재의 삼익유가공회사의 유청처리 공장에서 효소처리공정을 추가하는 설계도면을 제시하였음.

## 2. 활용에 대한 건의

- 본 유청발효 농축액 제품은 고형분 75% 내외의 액상 제품으로 올리고당뿐만 아니라 유청미네랄도 그대로 함유하고 있어서 섭취하면 미네랄 보충 등의 효과를 보일 수 있으며 장내미생물 균총을 개선하고 장기능을 활성화하는 symbiotics로서의 기능을 가짐.
- 치즈부산물을 이용한 고기능성 prebiotic 소재 개발로 친환경적 고부가가치 물질의 생산 및 제조기술을 보급함으로써 기능성 올리고당의 생물공학적인 생산 기반을 제공함.
- 고부가가치성 소재의 원천기술 확보, 소규모 치즈산업 활성화에 기여하며 경제적인 신규 기능성 소재 제조 기술의 개발을 통한 국내 관련 산업의 활성화를 도모함.



- 갈락토올리고당(GOS) 생산을 위해 농축유청과 재이용이 가능한 경제적인 균체고정화 방법 확립하여 삼익유가공에 기술 이전함.
- 세계적으로 각광을 받고 있는 prebiotics 물질 생산 기술 확립 및 각종 식품에 응용함.
- 농축유청을 이용하여 제조하는 기술을 목장형 유가공장에 보급함으로써 고부가가치화 실현, 잉여원유해소 및 낙농가의 소득 안정에 기여할 뿐 아니라 유청분말의 수입대체 효과가 클 것으로 기대됨.
- 치즈유청을 이용한 prebiotics와 고부가가치성 특수 식품소재의 개발에 의한 건강기능성 식품의 수출 증대로 인한 외화 획득과 prebiotics 시장 선점할 것으로 기대됨.
- 유청단백질 성분의 가수분해물과 유당이 전이된 갈락토올리고당(GOS)은 장내 유용미생물인 *Bifidobacterium*의 증식을 촉진시키고 유해균은 촉진시키지 않는 prebiotics 효과로 인하여 건강지향성 제품에 응용이 기대되고 있음. 특히 요구르트 제조에 사용하면 관능적인 측면에서 매우 적합한 growth promoter로 활용될 수 있음.
- 유청단백질 가수분해물의 항염증과 아토피 저감 및 다이어트 효과 등 새로운 생리적 기능성과 관련된 결과는 해외 SCI 및 국내 등재학술지 등에 논문을 게재할 계획임. 본 연구의 주요 결과들은 관련 학회 학술논문 발표는 물론 각종 시제품의 특허 출원으로 국내외 지적 재산권 취득함.

# Summary

## I. Title

Development of Prebiotics and Highly Value-Added Food Ingredients with Specified Health Claims Using Cheese Whey

## II. Objectives and Research Significance

Cheese whey is yellowish liquid, which is mostly produced as a by-product from cheese-making process. It consists of lactose and proteins as solid components and is responsible for various physicochemical properties and desirable functional effects in human-beings and animals. Other than key nutrients, peptides and proteins play important roles mostly in the physiological functions in animal bodies. Some whey proteins can act as immuno-stimulatory components when delivered as a major protein source to animals as well as human beings and also their hydrolysates are widely known as the functional peptides. As it is widely known, disaccharide lactose is abundant in the cheese whey. While lactose is relatively low in sweetness, it contributes to absorb Ca, neurogenesis process, and so forth. Lactose is hydrolyzed by a lactase (or  $\beta$ -galactosidase) into monosaccharides; glucose and galactose. Of the lactase activity, transgalactosylation reaction is involved with galactooligosaccharide (GOS) production. Currently, several oligosaccharide such as fructooligosaccharides (FOS) and GOS manufactured by the enzymatic technology has been reported to stimulate the growth of probiotic Bifidobacteria.

In this study, concentrated cheese whey or cheese whey powder was used to produce GOS of the functional prebiotic oligosaccharides and also studied to develop various functional food ingredients applied to dairy products: bovine milk, fermented milk and infant formula. In addition, growth-stimulating peptides were screened for high cell density cultivation of the probiotic lactic acid bacteria (LAB), which can be applied to a number of processed foods including the probiotics preparations for human and animal use, seasonings, and traditional foods such as kimchi, salted fermented fish.

### **III. Contents and Scope of Research**

#### **가. Studies on applications of prebiotics using cheese whey (Yonsei Univ)**

- Productions of lactase microorganisms(yeast, mold, LAB) using cheese whey.
- Development of high cell density of LAB culture using cheese whey-based medium.
- GOS productions using crude lactase preparation and immobilized enzyme technology.
- Development of the prebiotic preparations containing high level of galactooligosaccharides.
- Development of GOS purification technology from lactase-treated cheese whey cultured medium.
- Reviews on application technology using cheese whey-based LAB culture.

#### **나. Physiological functionality screening and specified food ingredients using cheese whey hydrolysates (Chungnam Natl. Univ)**

- Optimal conditions on protease hydrolysis of concentrated whey.
- Optimal conditions on the production of whey protein hydrolysates and functional peptides.
- Development of low atopic and anti-obesity materials using whey protein hydrolysates.
- Development of anti-inflammatory substances derived from whey protein hydrolysates.
- Functionality studies of whey protein hydrolysates using lab animal models.
- Reviews on various industrial uses of whey protein hydrolysates.

#### **다. Development of Growth Promotion substances and establishment of its production process using cheese whey(Vicel)**

- Reduction of fermentation time with growth-stimulants for yogurt and drink yogurts manufacture.

- Growth-promotion studies consists of 3 research items as follows;
  - 1) Growth-promotion for the *Lactobacillus* strains.
  - 2) Growth promotion for the *Bifidobacterium* strains.
  - 3) Growth promotions for the *Streptococcus /Lactococcus* strains.
  
- Monitoring the number of viable LAB cells during the whole fermentation period of stirred- and drink-type yogurts.
  
- Studies on the synergistic effect of growth-promoting substance with other ingredients.
  
- Establishment of simple and cost-effective process producing specified food ingredients derived from cheese whey.
  
- Selection of strains of yeast and LAB which has highest activity of transgalactosylation and optimal culture conditions such as pH, types of starters, concentrations of cheese whey, and aeration controls.
  
- Studies on microbial growth, conditions of whey protein hydrolysis, and spray-drying operations for obtaining maximum productivity.
  
- Process simulations in the pilot plant, trial manufacture of functional or growth-promoting products, and writing a standard management manual.
  
- Reviews on common commercial production strategies: Size of investment, production via tall-processing.

#### **IV. Results and Suggestions for Industrial Applications**

##### **1. Results**

Cheese whey is a by-product from natural cheese-making process, containing disaccharide lactose and whey proteins as the main ingredients. This study was conducted for development of growth-stimulant of LAB, functional whey-based peptides, and GOS production from the natural cheese whey. Major results obtained are described as follows: Sodium chloride in the whey powder(Samik Dairies) was determined to be 3.55% by Volhard method. Compositions of the whey-based medium for LAB was best at the concentrations of 10% whey powder, 1% organic nitrogen source. Of the twelve LAB isolates, lactase

activity was determined using ONPG disc assay to the typical colonies grown on the MRS agar surface. As a result, all the strains were positive in lactase activity. Of the 12 strains, probiotics LAB (*L. paracasei* FBT314, *L. helveticus* FBT1, *L. acidophilus* KCCM 32820, *Lc. lactis* ATCC 11454) were chosen and screened further, selected a single strain of *L. paracasei* based on the highest lactase activity of 1,053 Unit (206 U/protein, mg of specific activity). Lactase activity from *L. paracasei* FBT314 was optimal at pH 6.5–7.0 and 30°C. It has been shown that maximum GOS production was obtained when incubated at 30% lactose, 30°C for 4 hr and was determined at 19.1% of highest yield by a HPLC analysis. A lactase from *L. paracasei* FBT314 was successfully immobilized with 1.5% sodium alginate solution and obtained 15.4% of maximum GOS yield using the immobilized lactase with the same concentration of sodium alginate. Crude lactase enzyme was immobilized using microencapsulation method. Among the hydrocolloids as a coating materials, alginate and starch was primary selected and tested in single and mixed way of treatment, resulted that best activity was obtained with 1.5% sodium alginate (38.4 cP) at 30°C.

On the other hand, whey proteins were used to digest with three kinds of proteases; Alcalase, Neutrase, and Pancreatin, resulted that degree of hydrolysis for 180 min at 50°C, pH 8.0 was 12.5 for Alcalase (Novo), 15.15 for Neutrase (Novo), and 21.73 for Pancreatin (Novo), which was the highest percentage of protease hydrolysis. Moreover, the peptide profiles was shown less than Mr 3,000 and significantly different each other with the three proteases used, suggested that further studies need in order to find distinct functional properties of the whey-based peptides. In terms of titratable acidity (TA) development and viable cell counts of LAB, whey protein hydrolysate was better nitrogen source than skim milk powder but less than yeast extract. In addition, viable cell counts were 1.6 times higher than that of skim milk powder, indicated that the whey protein hydrolysate was a promising nitrogen sources, which can substitute the yeast extract, in growth stimulation of LAB. It was highly expected that practical level of yeast extract was comparable to the whey protein hydrolysate in the growth promoting effect on LAB. When used the whey protein hydrolysate, growth stimulating effect was confirmed on LAB and developed the economical production process in this study.

As for lactase activity, 12 lactic acid bacterial strains, three strains of *Saccharomyces cerevisiae* were screened, obtained that the activity were very slight in *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteriodes*, *Weissella kimchii*, *Saccharomyces cerevisiae* SD1 (our lab stock), *Saccharomyces cerevisiae* MG3. Lactase activity of four yogurt starters (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*) were compared with that of Lactozyme 3000. As a result, lactase activity of *L. paracasei* was almost similar to the commercial e

nzyme. Further characterization was performed, resulting that optimal pH and temperature were pH는 7.0, 30°C, respectively. This crude enzyme preparation was able to digest 10% lactose into 70% in 10 hr incubation and confirmed GOS production at 30°C on TLC. In the preparation of crude lactase, GOS yield was slightly improved in addition to sonication step when high pressure homogenizer was used to extract the enzyme out of the cell. It is noted that LGG strain and *Bifidobacterium longum* were better grown in the presence of 0.1% garlic powder, 0.1% yeast extract supplemented in the quarter-strength fermented whey-based media(1/4x). Finally, GOS test product was manufactured after ultra-filtration of the fermented whey-based medium(30% lactose), followed by concentration under reduced pressure and freeze-drying process.

For the test of anti-allergic effect, proteases(Alcalase, Neutrase, Pancreatin)-digested whey proteins was subjected to cell-line test using RBL-2H3. Three samples(whole hydrolysate, fraction with 3kD or above, 3kD or below) was tested and shown to be none to slight in its efficacy. As reported earlier, lactoferrin was effective in immunomodulation on U937, NK92, dendritic cell line(mutz-3 and muDC), and also in asthma, anaphylactic shock, and allergy. *In vitro* assay using HMC-1 cell and Raw 264.7 cell from rat, expression levels of allergy and inflammation-related cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 was affected by whey protein hydrolysate and lactoferrin. It was confirmed that whey protein hydrolysate was significantly lower in antigenicity than intact whey protein using mouse-antiserum assay. Compare to normal mouse, allergy-related IgE secretion was elevated in the mouse serum when administrated with whey protein or  $\beta$ -lactoglobulin, strongly indicated that these two substances were source of allergen. As for main results from the cooperative project No.2, protease-digested whey proteins were effective in growth promotion of LAB along with yeast extract as a nitrogen source. Protease-digested whey proteins could be manufactured by vacuum- or spray-drying method but special care needs not to form cake. Reaction tank for the protease-digestion was added in the layout and manufactured the triple jacket-type reactor, turned out to be an efficient batch-type equipment, using that it takes 8 hr 20 min for whole treatment time in the preliminary pilot plant experiments.

## 2. Suggestions for Industrial Applications

This whey-based culture preparations contains 75% solid containing minerals, GOS, and functional peptides, which can provide mineral supplement after exercise as well as maintenance of beneficial intestinal flora due to prebiotic galactooligosaccharides. Development of functional prebiotic materials and high value-added products using cheese whey is promising green technology in terms of fermented waste, cheese whey. This

work provides a solid platform in commercial oligosaccharide production via modern biotechnology. Highly value-added original technology has been established through this study and linked to activate the natural cheese and the related industries in Korea. Immobilized lactase technology was established for high yield production of GOS, which can be applied to a number of functional foods with health-claims. Whey-based hydrolysates may be utilized as an organic nitrogen source for grow-promoting LAB, which can replace the expensive commercial yeast extract products in the LAB growth media. This technology can contribute to solve overproduction amount of farm-milk, led to more or less stabilize dairy farmer's household income and also import substitution of prebiotic GOS. Prebiotic GOS is currently gaining popularity in food industry and thus expected to be exported overseas for gaining foreign currency. The results obtained will be published in the international journals as well as taking out patents as intellectual property. Whey-based peptides can be applied to anti-atopic and weight control agents in various kinds of foods.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction of this R&D Project .....	1
Section 1. Necessity and significance of the research project .....	1
Section 2. Objectives and contents of the project .....	3
1. Objectives and contents of the project .....	3
2. Annual objectives and content of the project .....	4
Chapter 2. Current R&D status in domestic and overseas countries .....	6
Section 1. Current status and issues of the related-technologies .....	6
Section 2. Future perspective .....	9
Chapter 3. R&D contents and experimental results .....	10
Section 1. R&D contents and experimental results in the first year .....	10
1. Research range and experimental methods used .....	10
2. Experimental results in details .....	13
A. Detailed results of the sub-project No.1 .....	13
(1) Literature search of whey and its processed products and investigation of biotechnological processes .....	13
(2) Establishment of whey ingredients, compositions standardization, and alcohol fermenting conditions .....	13
(3) Screening of lactase enzyme and lactose-hydrolyzing organisms .....	15
B. Cooperative research project No. 1 .....	21
(1) Selection of optimal hydrolytic enzymes .....	21
(2) Hydrolysis of whey protein .....	22
(3) Conclusions .....	44
C. Cooperative research project No. 2 .....	44
(1) Development of whey-based medium with growth promotion for LAB ..	44
Section 2. R&D contents and experimental results in the second year .....	59
1. Research range and experimental methods used .....	59
2. Experimental results in details .....	60
A. Detailed results of the sub-project No.1 .....	60
(1) GOS production by lactases and lactic acid bacteria fermentation .....	60
(2) GOS production by immobilized crude lactase, yield improvement, and fermentation controlling the fermentation process .....	73
(3) Determination on whey salinity, GOS, glucose, galactose, sucrose, and lactose content .....	77
B. Cooperative research project No. 1 .....	78



(1) Anti-allergic effect of whey protein and its hydrolysate	78
(2) Inflammatory response of whey protein lactoferrin	82
C. Cooperative research project No. 2	86
(1) Development of additives for fermentation	86
Section 3. R&D contents and experimental results in the first year	103
1. Research range and experimental methods used	103
2. Experimental results in details	104
A. Detailed results of the sub-project No.1	104
(1) Development of prebiotic substance containing high GOS level	104
(2) Separation and purification of GOS from fermented concentrated whey	106
(3) Manufacturing the test products	107
(4) Examination on growth promoting activity of the developed prebiotic materials	108
B. Cooperative research project No. 1	118
(1) Whey protein and its hydrolysates affect on the inflammatory response and allergy	118
(2) Antioxidant activity of whey protein hydrolysates	119
(3) Lowering effect of the antigenic whey protein hydrolysates	121
(4) Effect of mouse IgE secretion by the protein hydrolysates	126
(5) Development of functional materials from the whey-based proteins	128
C. Cooperative research project No. 2	129
(1) Growth promotion from cheese whey and development of the production processes	129
Chapter 4. Contributions in achievement of objectives and the related fields	139
Section 1. Annual achievements of this R&D objectives	139
Section 2. Achievements and contributions in R&D and technological advances	142
1. Results of research and development	142
A. Publications from the R&D research project	142
B. Patent applications from the R&D research project	142
C. The scientific presentations from the R&D research project	142
D. Education and directed applications	143
2. Contribution in the related fields for technological advances	143
Chapter 5. Application plans of the R&D results	145
Section 1. Expectations	145
1. Applications and future perspectives of the R&D results	145

2. Further expectations .....	145
Section 2. Applications and industrial applications in other research area .....	146
Chapter 6. The overseas scientific and technological informations collected from the R&D process .....	148
1. Overseas peer-review papers .....	148
Chapter 7. Selected references .....	150

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	1
제 1 절 연구개발의 필요성 .....	1
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용 .....	3
1. 연구개발 목표와 내용 .....	3
2. 연차별 연구개발 목표와 내용 .....	4
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	6
제 1 절. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점 .....	6
제 2 절. 앞으로의 전망 .....	9
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	10
제 1 절 제 1년차 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	10
1. 연구범위 및 연구수행 방법 .....	10
2. 세부연구수행 결과 .....	13
가. 제 1세부과제 .....	13
(1) 유청 및 그 가공처리물의 검색과 생물공학적 제조기술의 탐색, 문헌조사 .....	13
(2) 유청의 성분, 조성 표준화 및 알코올 발효조건 수립 .....	13
(3) 유당분해 효소 및 유당분해 미생물의 선별 .....	15
나. 제 1협동 과제 .....	21
(1) 가수분해효소 선정 .....	21
(2) 유청단백질의 가수분해 .....	22
(3) 결론 .....	44
다. 제 2협동 과제 .....	44
(1) 유산균의 생육촉진효능 유청 소재 개발 .....	44
제 2 절 제 2년차 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	59
1. 연구범위 및 연구수행 방법 .....	59
2. 세부연구수행 결과 .....	60
가. 제 1세부과제 .....	60
(1) 효소처리 및 유산균 발효에 의한 갈락토올리고당(GOS) 생산 검토 .....	60
(2) 효소 고정화법에 의한 갈락토올리고당(GOS)의 생산, 수율 향상 및 발효 제어 연구 .....	73
(3) 유청분말의 염도 및 유당, 갈락토올리고당(GOS), 포도당, 자당, 갈락토오스 함량 측정 .....	77
나. 제 1협동과제 .....	78
(1) 유청단백질 및 가수분해물의 엘러지 저해 기능 .....	78
(2) 유청단백질인 락토페린의 염증반응 효과 .....	82
다. 제 2협동과제 .....	86

(1) 발효제품 첨가제 완성 .....	86
제 3 절 제 3년차 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	103
1. 연구범위 및 연구수행 방법 .....	103
2. 세부연구수행 결과 .....	104
가. 제 1세부과제 .....	104
(1) 갈락토올리고당(GOS)이 다량 함유된 prebiotic 물질생산 기술 개발 .....	104
(2) 농축유청 발효액으로부터 갈락토올리고당(GOS)의 분리/정제 기술 개발 .....	106
(3) 시제품 제조 .....	107
(4) Prebiotics 소재의 유용 미생물 증식 촉진효과 검토 .....	108
나. 제 1협동과제 .....	118
(1) 유청단백질 및 가수분해물이 염증 및 알러지 반응에 미치는 영향 .....	118
(2) 가수분해물의 항산화 기능 .....	119
(3) 유청단백질 가수분해물의 항원성 저하 효과 .....	121
(4) 가수분해물의 mouse IgE 분비에 미치는 영향 .....	126
(5) 유청단백질의 기능성 소재 기반 구축 .....	128
다. 제 2협동과제 .....	129
(1) 치즈유청으로부터 growth promotion 물질 및 생산공정의 개발 .....	129
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	139
제 1 절 연도별 연구개발 목표 및 달성도 .....	139
제 2 절 연구개발 실적 및 기술발전예의 기여도 .....	142
1. 연구개발 실적 .....	142
가. 연구 결과에 대한 학술논문 발표 .....	142
나. 연구 결과에 대한 특허 출원 .....	142
다. 연구 결과에 대한 학술대회 발표 .....	142
라. 교육 및 지도 활용 .....	143
2. 관련분야 기술발전예의 기여도 .....	143
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	145
제 1 절. 기대성과 .....	145
1. 연구개발결과의 활용방안 .....	145
2. 기대성과 .....	145
제 2 절. 타 연구에의 응용 및 산업체 활용 방안 .....	146
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	148
1. 국외 논문 .....	148

제 7 장 참고문헌 .....150

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

○ 유청에는 단백질과 유당, 비타민, 무기질, 필수아미노산, 젖산 및 효소들이 포함되어 있고 우수한 유화작용, 거품생성, 기포형성, 젤라틴화, 용해성 등 여러 기능적인 특성으로 인하여 과거에는 폐기처분되었던 물질이 최근에는 새로운 식품재료와 식품첨가물로써 이용가치가 큼(박, 1988).

○ 치즈 유청농축물에 포함된 단백질 중에 immunoglobulin, lactoferrin과 같은 물질은 면역부활작용이 보고된 바 있으며(Yoon 등, 1991), 유청의 당을 다량 포함한 부분에 존재하는 glycoposphopeptide의 경우는 면역부활당세포에 대하여 강한 증식활성을 나타낸다고 보고되었음(Yun 등 1997).

○ 우유의 단백질은 영양적, 기능적 이용성을 증진할 수 있는 단백질 가수분해물의 개발에 이용되는 중요한 단백질원으로 casein과 cheese whey로부터 제조되며(Arai 등, 1986; Chobert 등, 1991; Lopez-Bajonero 등, 1991; Mahmoud 등, 1992; Siemensma 등, 1993; Clemente, 2000; Clemente와 Chambers, 2000) 치즈 생산의 부산물인 whey에서 분리되어 이용할 수 있는 단백질이 whey protein임.

○ 유청단백질의 가수분해에 대한 연구는 가수분해 산물의 잠재적인 기능성과 식품 성분으로의 활용 가능성을 증진시킬 수 있기 때문에 다양하게 시도되고 있으며(Dalgalarro 등, 1990; Chobert 등, 1991; Turgeon 등, 1992; Bounous 등, 1993; Chen 등, 1993; Huang 등, 1994; Madsen 등, 1998; FitzGerald와 Meisel, 1999; van der Ven 등, 2001) 가수분해에 의해 유청단백질은 항원성 감소 및 다양한 기능적 특성인 기포성, 용해성, 유화력 및 점성 등을 개선시킬 뿐만 아니라(Kilara, 1985) 유청단백질 가수분해물은 유아식과 다양한 임상영양식에 널리 이용되고 있음(Gonzalez-Tello 등, 1994).

○ 올리고당류(oligosaccharides)는 기존의 감미료인 설탕(sucrose)이나 과당과는 달리 감

미도가 낮아 저감미도를 선호하는 식품으로 이용될 수 있으며, 충치발생균 중 유용균만이 선택적으로 이용할 수 있고, 장내 pH를 저하시켜 유해균의 증식을 억제하며, 저 칼로리 성으로 당뇨병 등의 문제점을 극복하거나(Kang 등 1997), 또한 식품소재로서도 응용범위가 다양하기 때문에 소비 또한 증가하고 있는 추세임(Kang 등 1996; Kim 등 1997).

○ 올리고당은 소장에서 분해되지 않고 대장까지 가서 유용세균인 *Bifidobacterium*의 증식인자로 작용하여 장내의 대장균, 장구균 및 부패성세균의 증식을 억제한다. 뿐만 아니라 영양소의 합성, 신진대사의 촉진, 면역기능의 증진과 장의 운동 촉진에 따른 변비의 개선효과를 나타냄. 특히 당뇨 등으로 당 섭취가 제한되는 사람에게 유용하고, 조제분유, 음료수, 아이스크림, 빵 등의 식품소재, 의약품 및 가축사료로 이용되고 있음(고 등 1988). 우유에서  $\beta$ -galactosidase(또는 lactase)의 작용으로 생성되는 올리고당은 3~11개로 보고되어 있고(Robert 등 1957; Toba, 1981), Wierzbicki와 Kosikowski는 유청에서 생성되는 올리고당은 총 유당함량의 1~2%로 보고함. 치즈제조 부산물인 유청에는 유당 70%이상 들어 있기 때문에  $\beta$ -galactosidase(또는 lactase)를 이용하여 올리고당을 생산하면 부산물의 이용성을 높여 경제성이 큼(김 1999).

○ 사람이나 동물물의 장내에는 많은 수의 균들이 존재하는데 이 균들 중에 숙주에게 건강기능성을 부여하는 균들을 'probiotic균주' 또는 'probiotics'로 칭함. 사람의 경우, 모유 수유할 때 균수가 증가하는 *Bifidobacteria*나 *Lactobacillus*속 젖산균이 대표적인 probiotics 세균이라 할 수 있음(Sears 등, 2005; Fuller 등, 2004; Collins 등, 1999). 대부분의 prebiotics는 탄수화물 소재가 많으며 그 중 식물에 기반을 둔 다양한 올리고당들이 대표적임(Boehm 등, 2008).

○  $\beta$ -Galactosidase( $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase, EC. 3. 2. 1. 23)는 유당의  $\beta$ -1, 4 결합을 가수분해하여 글루코스와 갈락토오스를 생산하며 유당의 가수분해로 생성된 갈락토오스는 대부분 단당류나 다당류 및 알콜분자와 새로운 글리코시드 결합을 형성하여 올리고당을 생성한다. 이러한 반응을 갈락토오스 전달반응(transgalactosylation)이라고 한다. 생성되는 올리고당의 수와 형태는 효소, 기질농도, 반응시간, pH, 반응온도, 무기이온의 영향을 받는다(Kwak 등, 1986).

○ 유청 단백질은 우유의 단백질의 약 20%를 차지하며 유청 단백질 중 락토페린은 확실한 항염증 특성을 가진다(Marshall 등, 2004). 락토페린은 TNF(tumor necrosis factor)와 IL-6(interleukin 6)의 농도를 조절하는 활성을 가지고, 염증을 감소시킨다(Machnicki 등, 1993). 더욱이 WPH(Whey Protein Hydrolysates)는 항산화, 항염증 효과를 가진다고 보고됨(Kume 등, 2005).

## 제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 연구개발 목표와 내용

본 연구는 자연 치즈 제조과정에서 생산되는 유청 또는 유장(고형분 30-35%)을 이용하여 prebiotic 갈락토올리고당(GOS)이 고농도로 함유된 조성물, 고농도 유산균 배양하기 위한 유청배지 및 제조공정 확립, 단백질 가수분해를 통하여 probiotics의 성장을 촉진하는 물질을 생산하는 원천기술을 개발하여 사업화하고, 유청단백질 유래의 특수기능(항염증, 항비만, 아토피 저감) 펩타이드 소재를 개발함으로써 궁극적으로 환경친화적인 고부가가치성 식품소재의 개발하는데 있다.

### 2. 연차별 연구개발 목표와 내용



구분	연도	연구개발의 목표(제1 세부)	연구개발의 내용(제1 세부)
1차년도	2009	○ 농축 치즈유청을 직접 이용하여 유용 미생물의 증식과 대사활성을 향진시키는 prebiotics 물질의 개발	○ 농축유청의 성분 조성 분석 표준화, 유당분해 효소 및 효소생산 미생물(효모, 유산균) 배양 ○ 농축유청을 이용한 유당분해 효소 및 미생물(효모, 유산균) 생산기술 개발 ○ 치즈 유청의 보존성 검토
2차년도	2010	○ 농축유청을 효소의 출처, 미생물별 (유산균, 효모 곰팡이), 효소고정화에 의한 기능성 prebiotic 소재 개발	○ 치즈 유청 단백질의 생리적 기능성 탐색 및 특수 식품소재 개발 ○ 농축유청을 이용한 갈락토올리고당 (GOS) 생산기술 개발 ○ 유당분해 효소 및 미생물 균체의 고정화 기술 개발
3차년도	2011	○ Prebiotics가 다량 함유된 농축치즈유청 배양물의 활용기술을 검토하여 다양한 용도의 기능성 소재로 상품화	○ 갈락토올리고당(GOS)이 다량 함유된 prebiotic 물질 생산 기술 개발 ○ 농축유청 발효액으로부터 갈락토올리고당(GOS)의 분리/정제 기술 개발 ○ 시제품제조 ○ Prebiotics 소재의 유용 미생물 증식 촉진 효과 검토

구분	연도	연구개발의 목표(제1 협동)	연구개발의 내용(제1 협동)
1차년도	2009	○ 유청단백질 및 가수분해물 제조를 위한 효소의 선정과 최적조건 확립 및 가수분해물 제조	○ 유청단백질 및 가수분해효소 선정 - 유청단백질 준비 - 효소 선정 및 가수분해 최적조건 확립 ○ 유청단백질 가수분해물의 제조 및 기능성 peptide화 기술 개발 - 가수분해물의 제조 - 가수분해도 측정 - 가수분해물의 peptide 양상 조사 - 기능성 식품소재 및 화장품 소재용으로 타당성 검토
2차년도	2010	○ 유청단백질 가수분해물의 기능 연구 - <i>in vitro</i>	○ 아토피 저감 및 항비만 기능 - 아토피 저감 효능 평가 - 염증매개체 cytokine의 발현 검색 - 지방세포를 이용한 다이어트 효능 평가 ○ 항염증 효과 - 항산화 효과 - 대식세포를 이용한 항염증 효과
3차년도	2011	○ 유청단백질 가수분해물의 기능 연구 - 실험동물 모델 적용	○ 아토피 저감 및 항비만 기능 - 염증매개체 cytokine 발현 검색 - 비만마우스를 이용한 항비만 효능 평가 - 유청단백질 가수분해물 시제품 제조 ○ 항염증 효과 - 실험동물을 이용한 상처치유 효과 - 유청단백질 가수분해물 시제품 제조
구분	연도	연구개발의 목표(제2 협동)	연구개발의 내용(제2 협동)
1차년도	2009	○ Growth Promotion 물질의 개발	○ <i>Lactobacillus</i> 와 <i>Bifidobacterium</i> 의 생육 촉진효과가 큰 유청을 이용한 물질의 제조 방법 개발(발효 및 효소분해 등의 공정) ○ 기존 생육촉진물질과의 비교 평가하여 효능과 경제성이 우수한 물질 개발
2차년도	2010	○ 발효제품 첨가제 완성	○ 요구르트 배양 및 기타 발효제품에 응용 시험 ○ 타 원료와 조합 시 시너지 효과를 측정하여 최적 증식촉진물질의 함량 및 조성 확정
3차년도	2011	○ 제품생산 공정 확립 ○ Pilot plant 제작 및 Simulation	○ 치즈유청을 원료로 한 특수 용도식품 제조의 전 생산공정 확립 ○ 발효 및 효소처리, 혼합, 건조 등을 시험할 수 있는 시험용 기기 제작 및 시운전을 통한 경제적 공정 확립

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

○ 유청(whey)은 치즈 제조 시 커드로부터 방출되는 불투명하고 황록색을 띤 액체로서 치즈 1kg을 생산하면 부산물로 생산되는 평균 유청의 양은 치즈 생산량의 10배인 10k에 이른다. 최근 우리나라는 치즈의 소비가 증가하면서 유청의 생산량도 증가하는 추세이지만 대부분의 유청은 탈지분유 대용품 등으로 사용되고 있으며 일부는 가축사료로 사용되거나 폐수로 버려지는 실정이다.

○ 오래전부터 원료유청에 다양한 기술을 적용하여 여러 가지 제품이 만들어지고 있다. 식품에 주로 이용되는 유청제품에는 유청분말(whey powder), 저유당 유청(reduced lactose whey), 저염유청(reduced mineralized whey), 유청단백질(whey protein concentrate), 유당(lactose)이 있으며 유청에서 유래한 상업적 제품들은 당 또는 산유청, 변형농축물 종류의 유청제품에 불과함. 그러나 현재에는 식품, 사료, 제약, 화장품 산업에서 매우 다양한 형태의 제품으로 생산되고 있으며 최근에는 이러한 제품을 원료로 이용한 기능성제품들이 판매되고 있다.

○ 유청단백질은 다양한 기능적, 영양적 및 생리활성적 기능을 가지는 단백질이 풍부한 혼합물로써(Yamauchi, 1992) 주로 측쇄아미노산(branched chain amino acid)과 tryptophan이 풍부하여 스포츠 영양 제품(Smithers 등, 1996), 대장암의 예방효과(Gallaher와 Schmidt, 1998), 콜레스테롤 조절(Anon, 1994) 및 면역 증강(Bounous 등, 1993)등의 다양한 기능을 가지고 있는 것으로 보고된 바 있다.

○ 예전부터 우수한 영양적 가치와 물리적 기능 특성 때문에 널리 이용되어 온 유청단백질이 최근에는 생리활성 펩타이드 생산 소재로 주목을 받게 되었고 이에 대한 연구가 전세계적으로 활발하게 진행되고 있다.

○ 현재까지 우유 단백질 유래 생리활성 펩타이드는 opioid peptide (Zioudrou 등, 1979), 칼슘흡수 촉진 펩타이드(kitts 와 Yuan, 1992), 혈압강하 펩타이드(Pihlanto-Leppälä, 1998), 면역증강 펩타이드 (Magliore Samour 등1989), growth factor(Azuma 등, 1989), 혈소판응집저해 펩타이드(Meisel 과 Schlimme. 1990) 등이 있다.

○ 유청단백질의 가수분해에 대한 연구는 가수분해 산물의 잠재적인 기능성과 식품 성분으로의 활용 가능성을 증진시킬 수 있기 때문에 다양하게 시도되고 있으며(Dalgalarro 등, 1990; Chobert 등, 1991; Turgeon 등, 1992; Bounous 등, 1993; Chen 등, 1993; Hua

ng 등, 1994; Madsen 등, 1998; FitzGerald와 Meisel, 1999; van der Ven 등, 2001) 가수분해에 의해 유청단백질은 항원성 감소, 기포성, 용해성, 유화력 및 점성 등을 개선시킬 뿐만 아니라(Kilara, 1985) 유청단백질 가수분해물은 유아식과 다양한 임상영양식에 널리 이용되고 있다(Gonzalez-Tello 등, 1994).

○ 우유단백질은 가수분해효소에 의해 기질의 특이성이 모든 식품단백질 중 가장 잘 밝혀진 것 중의 하나로서 pepsin, papain, trypsin, chymotrypsin 등의 많은 가수분해효소를 이용하여 casein과 whey를 가수분해한 많은 실험들이 이루어졌다. 그 중 whey는 cheese와 casein 제조 시 생산되는 부산물로서 우수한 영양적 가치와 기능적 특성을 가지고 있어 다른 단백질 보충 단백질로 이용되거나 대체단백질로 사용할 수 있다. 그러나 whey protein은 단백질 분해효소에 의해서 분해되기 어려운 3차 구조의 구상단백질로서 열처리에 의해서 쉽게 변성되어 불용화되고(de Wit와 Klarenbeek, 1984; Ribadeau-Dumas, 1988) 구조적 특성에 의해서 섭취 후에 소화되기 어렵다는 문제 때문에 in vitro에서 여러 가지 생체내의 소화 효소와 이들 효소 조합에 의한 가수분해에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다(양, 2003).

○ 기존 국내의 선행 연구과제 중에서 “치즈유청의 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱스를 이용한 인스턴트 건강음료의 개발(과제명)”에서는 치즈제조 후 폐기되는 치즈유청을 한외여과 공정을 거쳐 고품질의 단백질로 분리하는데 성공하였고, 이를 효소분해 하여 생리활성 펩타이드를 제조하는 기술을 개발하였다. 특히 알칼라제를 가수분해효소로 사용함으로써 유방암 또는 폐암에 특이적이고 현저한 항암효과를 가지는 유청단백질 가수분해물을 제공할 수 있음을 확인하였다. 하지만 국내에서 유청을 이용하여 생리적 효과를 입증하는 연구는 크게 미흡한 실정이다.

○ 올리고당은 소장에서 분해되지 않고 대장까지 가서 유용세균인 *Bifidobacterium*의 증식인자로 작용하여 장내의 대장균, 장구균 및 부패성세균의 증식을 억제한다. 뿐만 아니라 영양소의 합성, 신진대사의 촉진, 면역기능의 증진과 장의 운동 촉진에 따른 변비 개선효과를 나타냈으며 그래서 당뇨 등으로 당 섭취가 제한되는 사람에게 유용하고, 조제분유, 음료수, 아이스크림, 빵 등의 식품소재, 의약품 및 가축사료로 이용되고 있다(고 등 1988). 우유에서  $\beta$ -galactosidase(또는 lactase)의 작용으로 생성되는 올리고당은 3~11개의 단당류 잔기가 보고되어 있고(Robert 등 1957; Toba, 1981), Wierzbicki와 Kosikowski는 유청에서 생성되는 올리고당은 총 유당함량의 1~2%라 하였다. 치즈제조 부산물인 유청에는 유당 70%이상 들어 있기 때문에  $\beta$ -galactosidase(또는 lactase)를 이용하여 올리고당을 생산하면 부산물의 이용성을 높여 경제성이 높다(김 1999).

○ 올리고당은 중합도가 2~20 정도를 가지는 탄수화물을 말하며 prebiotic 올리고당은 이러한 크기에 해당하는 *Bifidobacteria*나 *Lactobacillus*속 젖산균과 같은 장내 유익균들에 의해 선택적으로 사용하여 동물 숙주의 건강증진에 이득이 된다(Collins 등, 1999). 이에

따라 현재 장내에서 이러한 종류의 세균수의 증가나 prebiotic물질의 사용이 인간이나 동물의 건강에 어떤 좋은 영향을 끼치는가에 대해 연구가 활발히 진행되고 있다(Coppa 등, 2004; Harmsen 등, 2000; Hong 등, 2008).

○ HIV의 산모가 아이에게 수유하여도 HIV를 발생하지 않은 이유를 설명하기 위해 모유 올리고당이 바이러스 감염을 방해하는 현상을 확인한 연구보고도 있다(Hong 등, 2008).

○ Prebiotic올리고당의 연구는 대체적으로 prebiotic올리고당의 유아 장기의 균총 변화와 이에 따른 2차 대사산물 즉 acetic, propionic, butyric acid와 같은 짧은 탄소 수의 유기산(SCFA)들의 변화들을 모유 올리고당 첨가군들과 비교한 연구가 주를 이루고 있다. 이제까지 연구에서 모유 올리고당과 비교하여 실험을 진행한 주요 올리고당으로는 설탕을 과당 전이효소로 처리하여 생산하거나 치커리, 양파 등과 같은 식품에 존재하는 다당으로부터 가수분해, 추출하는 프럭토올리고당(fructooligosaccharides; FOS)과 유당과  $\beta$ -galactosidase(또는 lactase)를 이용하여 생산되는 갈락토올리고당(galactooligosaccharides: GOS)이 대부분이다(Sears 등, 2005).

○ 아토피 피부염은 만성 염증 피부 질병으로 소양성, 홍반, 부종, 표피박리, 건조등의 특성을 가진다. 수용성 흡착분자나 chemokine과 같은 다양한 혈청 단백질들은 아토피 피부염의 염증과 연관이 있다고 보고되고 있다(Morita 등, 2004). 최근 아토피 유발 마우스는 보통의 아토피피부염의 메커니즘을 연구하는 모델로서 많이 사용이 되고, 아토피피부염과 같은 피부 손상의 몇몇 연구들은 진드기 항체에 의한 것이라고 밝혀졌다(Unno 등, 2001). 아토피 유발 마우스를 이용해 아토피피부염과 같은 피부 손상의 발달에 억제효과를 가지고 있는지 조사한 결과, WHP(whey protein hydrolysates)같은 경우 아토피와 같은 피부 손상의 피로움을 줄여주는데 효과적 이라할 수 있고, 추가로 항염증 기능에 저자극성 이라고 확인되었다(Nobuko 등, 2006).

## 제 2 절 앞으로의 전망

○ 생물공학적인 방법으로 생산되는 올리고당은 고부가가치 천연감미료이며 다양한 기능성 때문에 새로운 식품소재로 각광 받고 있다. 더욱이 갈락토올리고당(GOS)은 대장에서 *Bifidobacterium*의 증식인자로 작용하여 대장균, 장구균 및 부패성세균의 증식을 억제하여 영양소의 합성, 신진대사의 촉진, 면역기능이 증진과 같은 효과를 나타내기 때문에 조제분유, 음료수, 아이스크림, 빵 등의 식품소재, 의약품 및 가축사료로 이용될 것으로 기대가 된다.

○ 국내의 갈락토올리고당(GOS)은 생산도 거의 없었을 뿐만 아니라 단가도 타 올리고당

보다 훨씬 높아서 수요가 별로 형성되어 있지 않았으며, 이 점이 유청을 원료로 한 갈락토올리고당(GOS)은 틈새시장으로 성장할 수 있는 잠재성이 있다.

○ 현재 국내에서 치즈를 생산하고 있는데, 영세적인 규모로 치즈를 생산하고 있는 업체에서는 그대로 방류하여 폐수로 버리거나 양돈 농가 등에서 제한적으로 가축용으로 급여하는 용도로 일부 활용되고 있다. 하지만 본 연구진의 새로운 용도의 식품 원료의 개발로 인해 고부가가치를 창출할 수 있을 것으로 기대가 된다.

○ 유청에서 분리한 단백질의 효소분해와 발효 등으로 한 새로운 용도의 식품 원료를 개발하였기 때문에. 유청분말이나 유청 단백질이 갖고 있는 약점으로는 유당불내증(lactose intolerance)에 의한 복부 팽만과 가스발생, 유청단백질의 알러지 반응으로 인한 섭취 제한을 들 수 있으나, 이러한 현상을 모두 해소한 제품은 폭넓은 시장성을 갖추게 될 것이다. 또한 항염증과 항아토피기능이 우수한 것으로 평가되면 피부개선제에도 적용될 수 있으며 기능성식품으로도 각광받을 수 있다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 제 1년차 연구개발수행 내용 및 결과

#### 1. 연구범위 및 연구수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1. 유청 및 그 가공처리물의 검색과 생물공학적 제조 기술의 탐색, 문헌조사	1. 이론적 접근방법 : 국내외 유청 및 가공처리물 현황 파악 2. 실험적 접근방법 : 국내외 유청 및 가공처리물 현황 파악	1. 국내외 연구개발방향 조사 완료
2. 유청의 성분, 조성 표준화 및 알코올 발효조건 수립	1. 이론적 접근방법 : 유청 분말 내 성분 조성 확인, 알코올 발효조건 확립 2. 실험적 접근방법 : 항목별 성분별 객관성 확보 분석방법 (기준 : 식품공전, 분석방법) 정립	1. 유청 분말 내 성분 조성 분석법 정립 - TLC를 이용한 당 정량 - DNS법을 이용한 환원당 정량 2. 알코올 발효조건 확립 - 주정계를 이용한 알코올 함량 측정
3. 유당분해 효소 및 유당분해 미생물의 선별	1. 이론적 접근방법 : 미생물이 생장할 수 있는 유청 배지 제조, 유청배지 내에서 최적 생육조건을 가진 미생물 선별 2. 실험적 접근방법 : 유청분말 함량과 질소원 변화에 따른 미생물의 생장 확인, 온도별로 유청배지에서 최적생육 조건을 가진 미생물 선별	1. MRS와 유청분말을 10%, 15% 첨가한 유청배지에 미생물 배양 후 growth curve로 측정 2. 질소원으로 사용할 yeast extract, soytone, beef extract, malt extract를 넣어 배지 제조 후 미생물 배양하여 growth curve로 측정 3. yeast extract를 0%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2% 함유한 배지 제조 후 미생물 배양하여 growth curve로 측정 4. 유청배지를 사용하여 유산균을 20℃, 30℃, 37℃에서 배양 후 growth curve로 측정 비교
4-1. 유청단백질 및 가수분해물 제조를 위한 효소의 선정	1. 이론적 접근방법 : 2. 실험적 접근방법 1) 가수분해효소 선정 - 유청단백질 준비 - 효소 선정	1. 유청단백질 준비 (주)삼익유가공에서 제공한 치즈 유청단백질을 이용 2. 효소 선정 - Pancreatin-100trypsin - Neutrase-Protex 7L - Alcalase-protex 6L

<p>4-2. 유청 단백질 가수분해물의 제조 최적 조건 확립 기술 개발</p>	<p>1. 이론적 접근방법 :</p> <p>2. 실험적 접근방법 :</p> <p>1) 유청단백질 - 가수분해 최적조건 확립</p> <p>2) 유청단백질 가수분해물의 제조 및 기능성 peptide화 기술 개발 - 가수분해물의 제조 - 가수분해도 측정에 의한 희석배수 결정 - 가수분해물의 peptide 양상 조사 - 저분자 peptide 분리</p>	<p>1. 가수분해 최적조건 확립 유청단백질을 탈염처리를 위하여 투석막 (cut off 10,000)을 사용하여 투석 후 동결건조 후 사용</p> <p>2. Alcalase - Protex 6L 와 Neutrase - Protex 7L 는 1:2,500으로 30℃, 40℃, 50℃ 에서 각각 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min. 동안 효소 반응 또한 Pancreatin - trypsin 1:5,000으로 30℃, 40℃, 50℃ 에서 각각 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min. 동안 효소 반응</p> <p>3. 반응이 끝난 유청단백질은 각각 전기영동과 HPLC를 이용하여 가수분해 결과를 확인</p> <p>4. 가수분해도 측정은 TNBS법을 변형하여 측정 DH(Degree of hydrolysis, %)는 다음식에 의해 계산 <math>DH(\%) = h/htot</math></p> <p>5. 전기영동은 Tricine gel를 사용하여 가수분해물을 사용</p> <p>6. 가수분해물의 분리는 HPLC (Waters)를 이용하였고 시료는 0.5mg/mL로 조정하여 C18 칼럼을 사용 유동상은 0.1% TFA가 함유된 50% acetonitrile과 0.1% TFA가 함유된 증류수를 사용</p> <p>7. 가수분해물의 저분자 peptide 분리는 cut off 3,000 Da centric on을 사용하여 3,000 이상과 3,000 이하를 분리</p>
---	--	--



<p>5. 유산균의 생육촉진효능 유청 소재 개발</p>		<p>1. Protease &amp; Lactase 의 최적 작용 온도와 pH 조사</p> <p>2. 유청농축액에 사용 적합한 효소 1차 선발</p>
<p>6. 기존 생육촉진물질과 효능 및 경제성 비교 평가</p>	<p>1. 이론적 접근방법 :</p> <p>2. 실험적 접근방법 : 유청의 단백질과 유당을 분해하는 효소를 스크리닝 → 요구르트 배양액 제조 → pH &amp; 생균수 측정</p>	<p>3. 효소로 유청농축액 가수분해한 시료를 요구르트 배양액에 첨가</p> <p>4. 살균 후 조직 평가</p> <p>5. 유산균 종류별로 접종하여 각각의 유산균 생육 촉진 효과 평가</p> <p>6. 탈지분유, 유청농축액, 효소분해 유청농축액, 효모엑기스, 펩톤을 각각 첨가한 요구르트 배양액의 pH와 생균수를 비교 평가</p> <p>7. 유청으로 생육촉진물질 제조 방법 확립</p>

## 2. 세부연구수행 결과

### 가. 제 1세부 과제

#### (1) 유청 및 그 가공처리물의 검색과 생물공학적 제조 기술의 탐색, 문헌조사

(가) 목적 : 유청은 자연치즈 제조 시 생기는 부산물로서, 종래에는 대부분 폐기되었으나 최근에는 유청의 영양학적 효능과 기능성이 부각되면서 그 용도가 다양해지고 있음. 현재 유청을 가공 처리하는 기술을 검색하고 비교 검토함으로써 유청을 이용한 저렴하고 간편한 프레바이오틱스 개발의 타당성을 확보하기 위함.

#### (나) 결과

##### ① 국내외 유청 및 그 가공제품 현황

- 유청 및 그 가공처리물을 검색한 바 유청은 커피프림을 포함한 크림류, 아이스크림 제품군을 비롯하여 다양한 유제품관련 식품에 이용되고 있음. 현재 그 가공처리 제품은 유청단백질(성분으로는  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, 혈중단백질, 혈청 알부민, 면역글로블린)을 이용한 건강보조제 등이 성공적으로 개발되어 시판되고 있으며, 영양상의 특징으로는 양질의 활성단백질, 탄수화물 및 미네랄의 보고인 동시에 믿을만한 공급원임. 특히 생리활성 유청단백질 및 펩티드가 신체 여러 기관의 성장인자로 작용하는 것으로 보고됨. 또한, 유청의 효능으로는 배변활동 기능의 정상화, 세포 면역반응의 촉진, 항산화 및 노화방지 기능, 항암효과, 고혈압 환자용 식이요법 기능, 콜레스테롤 증상의 완화 효과, 프로바이오틱스와 헬리코박터(Helicobacter)의 증상에 대한 완화를 들 수 있음. 현재 연구 중인 제조기술로는 면역력증강 측면에서 HIV치료제로 개발이 기대되며, 항산화 및 노화방지 기능을 이용한 화장품 개발이 활발하게 수행되고 있음. 그 외에도 유청을 이용한 다양한 형태의 의약품 개발 연구가 진행 중에 있음.

#### (2) 유청의 성분, 조성 표준화 및 알코올 발효조건 수립

(가) 목적 : 치즈유청은 액상유청, 분말유청, 농축유청 등으로 구분하며 농축유청은 농축정도에 따라서 여러 단계(예 30%, 50%, 70% 등)로 구분됨. 본 연구에 사용된 유청(삼익유가공 제품)의 조성을 확인하고, 당의 농도를 표준화하여 미생물 발효 및 효소반응에 사용하고자 함. 유청의 당성분을 간편하고 신속하게 확인하기 위하여 TLC 및 DNS 방법을 확립하고자 함.

#### (나) 결과

##### ① 유청 분말 내 성분 조성 분석법 정량

㉞ Thin layer chromatography(TLC)를 이용한 glucose, galactose, lactose, galactooligosaccharide, fructooligosaccharide를 분석한 결과 다음 그림과 같은 결과를 얻었다. g

lucose의  $R_f$ 치는 0.75, galactose는 0.71, lactose는 0.66, galactooligosaccharide와 fructooligosaccharide는  $R_f$ 치를 정할 수 없었다.

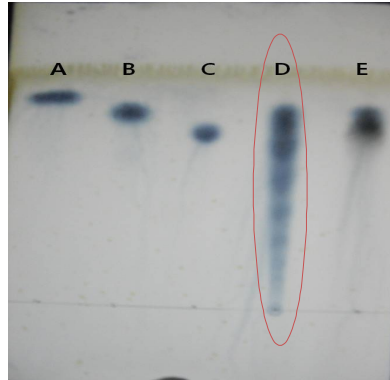


Fig. 1.1.1 TLC를 통한 glucose, galactose, lactose, galacotooligosaccharide, fructooligosaccharide 분석

A : Glucose,  $R_f = 0.75$ , B : galactose,  $R_f = 0.71$ , C : lactose,  $R_f = 0.66$ ,  
D : galactooligosaccharide, E : fructooligosaccharide

$$R_f = \frac{\text{시료의 이동거리}}{\text{용매의 이동거리}}$$

㉞ DNS법을 통한 환원당 정량

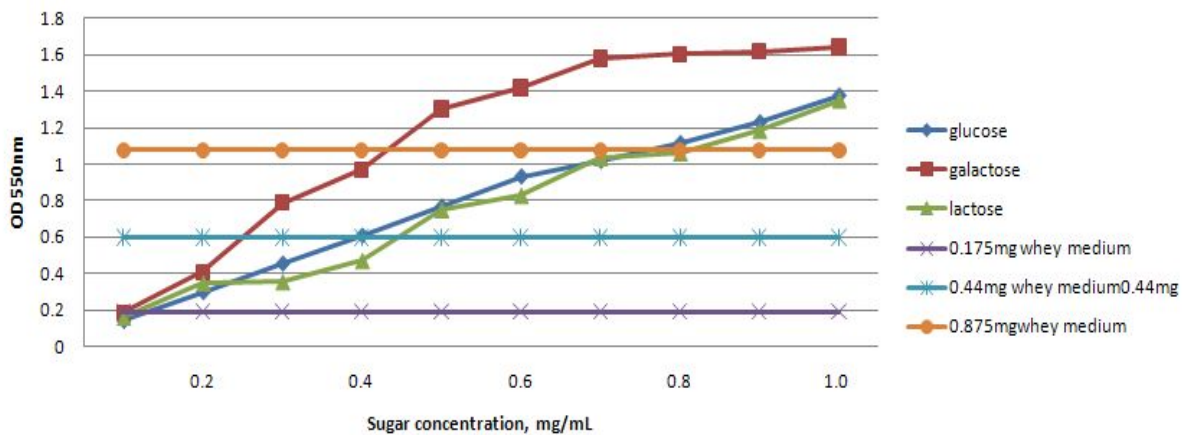


Fig. 1.1.2 Determination of sugar concentrations in the whey-based broth using DNS method.

유당은 환원당으로 유청에 함유된 농도는 DNS법을 사용하여 분석하였다. 유당농도 측정을 위한 표준곡선은 위 그림과 같다. 유청 중에 함유된 당농도는 DNS 방법에 의해서 용이하게 분석이 가능하였다. 유당의 농도를 0.1mg/mL에서부터 1.0mg/mL까지 변화시키면서 발색 정도를 550nm에서 측정한 결과 Fig. 1.1.2에 나타난 바와 같이 거의 직선적으로

증가하였다. 0.1mg/mL는 0.15, 0.2mg/mL은 0.34, 0.3mg/mL은 0.35, 0.4mg/mL은 0.49, 0.5mg/mL은 0.78, 0.6mg/mL은 0.81, 0.7mg/mL은 1.03등의 값을 나타냈다.

② 알코올 발효조건 수립

- 예비실험으로 효모에 의한 알코올 발효생성량을 측정하였다. 삼익유가공에서 제공받은 유청분말을 증류수에 환원시켜 10%분말유청배지를 제조한 다음 *Kluyveromyces marxianus*와 *Saccharomyces cerevisiae*를 각각 2%씩 접종하여 30℃에서 4일간 배양하면서 생성된 알코올 함량을 측정한 결과는 아래 그림(Fig. 1.1.3)과 같다. 알코올 함량 측정하기 위하여 발효시킨 유청 시료 100 mL를 증류하여 채취된 증류액 30 mL에 증류수를 가하여 100 mL로 정용한 다음 15℃로 냉각시켜서, 주정계(대광 계량기 제작소, Korea)를 측정하였다..

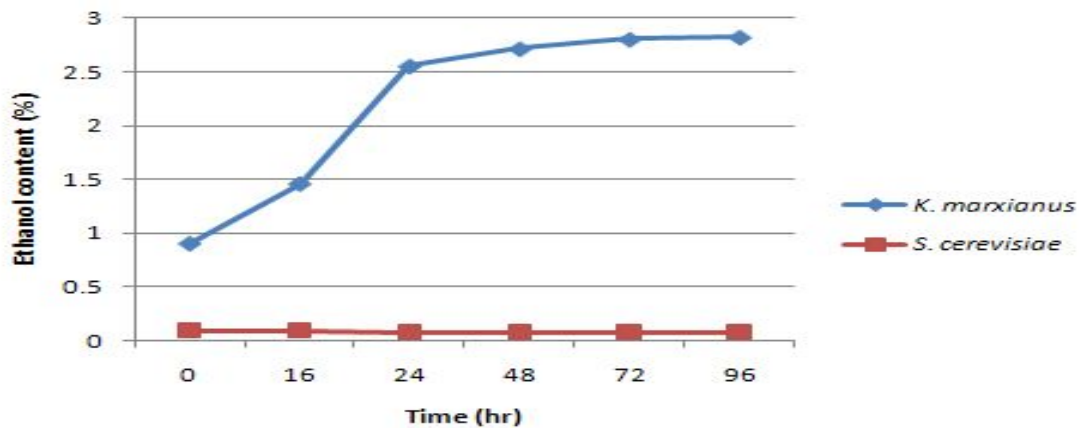


Fig. 1.1.3 Production of ethanol in 10% whey powder medium fermented by *K. marxianus* and *S. cerevisiae*

*K. marxianus*는 발효 96시간 후 알코올의 최고 함량이 2.8%인 것에 비하여 *S. cerevisiae*는 발효 96시간 후 알코올 함량이 0.2%에 불과하였다.

(3) 유당분해 효소 및 유당분해 미생물의 선별

- Lactase 활성을 가진 미생물은 lactose를 이용할 수 있고, galactooligosaccharides를 합성할 수 있는 기능도 함께 가지고 있다고 판단 됨. 따라서 유당을 자화하여 증식할 수 있는 유당이용 효모, bacteria를 일차로 선별하고자 하였다.

(가) 결과

① 유당 이용 효모 및 유산균의 분리

㉔ 유당분해효소(lactase)를 얻기 위하여 유일한 탄소원으로 유당을 자화하여 증식할 수 있는 효모를 일차로 탐색하였음.

㉕ 세균유래의 유당분해효소(lactase)를 얻기 위하여 유일한 탄소원으로 유당을 자화

하여 증식할 수 있는 유산균을 일차로 탐색하였음.

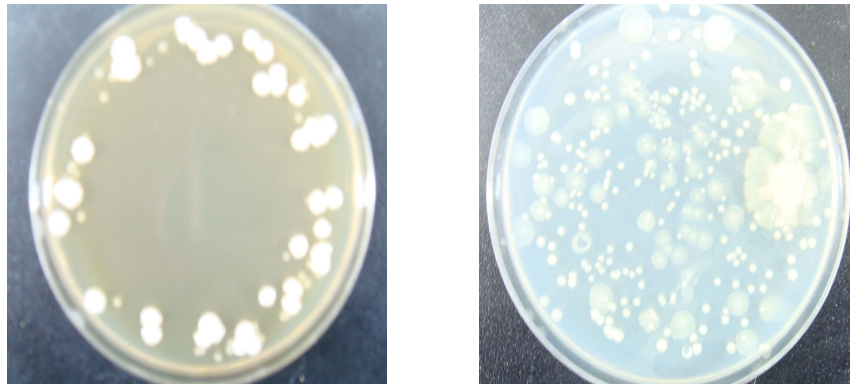


Fig. 1.1.4 Screening of yeast strains(left) and bacterial strain(right) utilizing lactose as a single carborn source on Potato Dextrose Agar(pH 5.0) and Plate Count Agar(pH 6.5)

위 그림은 자연치즈, 곡류, 김치, 포도 등으로부터 효모 및 유산균을 분리하였으며 분리된 효모는 *Saccharomyces Kluyveromyces*, *Kloeckera* 속 등이 분리되었고, 유산균으로는 *L. plantarum*, *Lc. lactis*, *L. paracasei*, *L. helveticus*, *Weissella cibaria* *Lueconostoc param esenteroides* 등을 분리하였다. 효모의 경우 분리주를 PDA 배지 상에 streaking 한 다음 single colony를 취하여 검경한 결과 아래 그림과 같이 전형적인 효모 형태를 나타냈다. 분리주를 동정하기 위하여 API kit 20 C AUX 로 동정을 하였고, 18S rRNA로 PCR 증폭을 하기 위해 NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'), ITS2(5'-GCTGCGTTCTTC ATCGATGC-3') primer(Oda. Y. 등, 1997)를 사용하여 molecular typing을 수행하였다. 그 결과 분리효모주는 *S. cerevisiae*로 동정되었다.

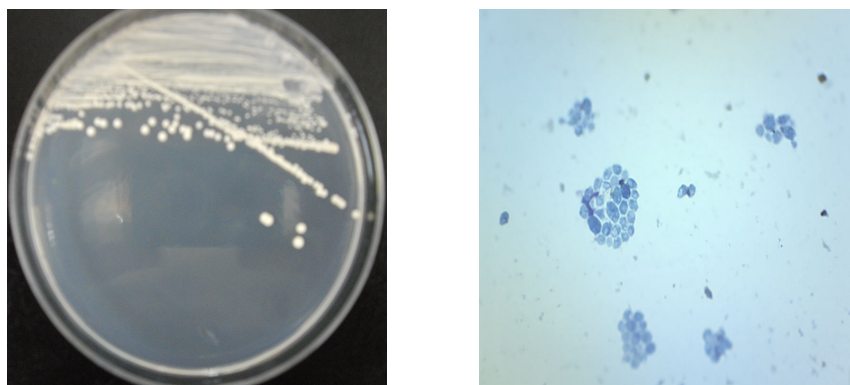


Fig. 1.1.5 Isolation of lactose utilizing yeast strain and microscopic examination (1,500 x)

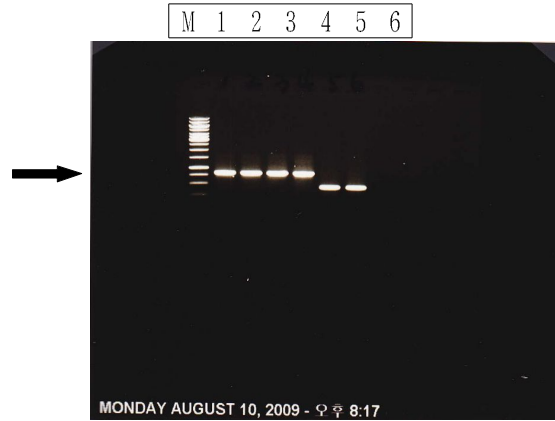


Fig. 1.1.6 Banding patterns of PCR products of the isolated yeast strain using 18s rRNA primers, NS1 and ITS2 after amplification. lane : 1~2, *S. cerevisiae* KCCM12028(type strain) ; 3~4, isolated strain YG1; 5~6, *Geotricum klebahnii*

아래 그림(Fig. 1.1.7)은 분리된 유산균주 일부를 API kit 50CHL을 이용하여 동정한 결과로서 A는 *L. helveticus*, B는 *L. paracasei* 로 동정 되었다.

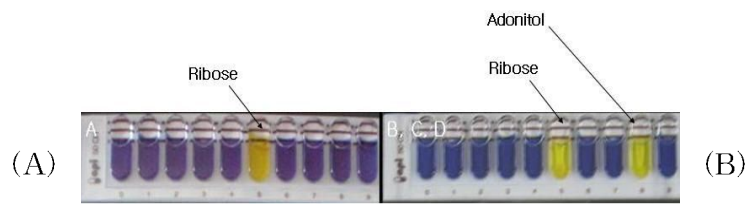


Fig. 1.1.7 Comparison of carbohydrate utilization patterns between LAB isolate A(left) and B(right) using API 50 CHL kit(API. BioMeriux, Marcy l'Etoile, France).

- ① 유청배지 조건 확립 및 미생물 선별
- ② lactose 함량 조절
- ③ 유청분말이 10%, 15%첨가된 액체배지 중 유산균의 배양시간에 따른 증식 측정

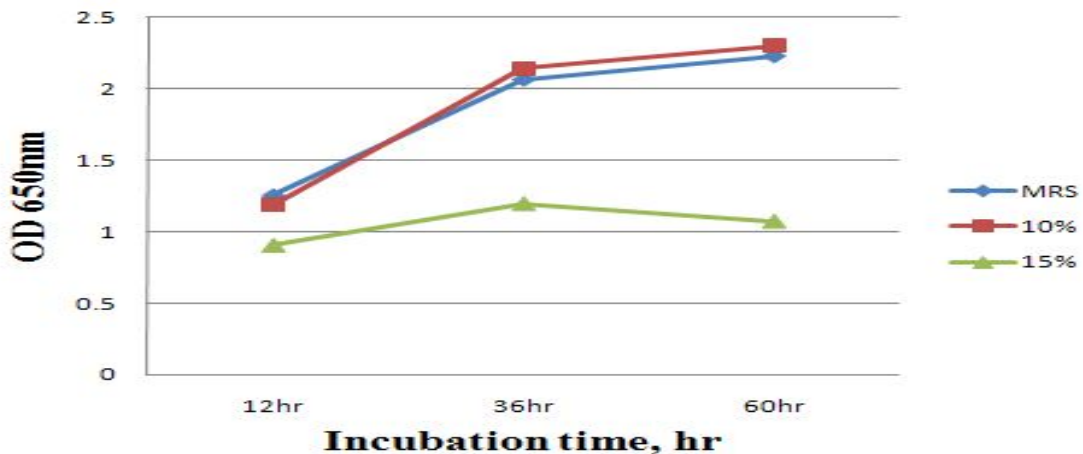


Fig. 1.1.8 Growth *Lc. lactis* YM7 in 10% whey powder medium at 37°C.

- 유청배지 조건을 확립하고자 유청분말 함량에 따른 미생물의 생육변화를 대조구인 MRS배지와 비교한 결과 MRS배지와 유청분말 10%를 첨가한 유청배지의 미생물 증식정도가 60시간까지 비슷한 것으로 나타났음. 따라서 MRS의 가격보다 저렴한 유청을 사용하는 것이 산업적 대량 생산에 유리하다고 판단되었음.

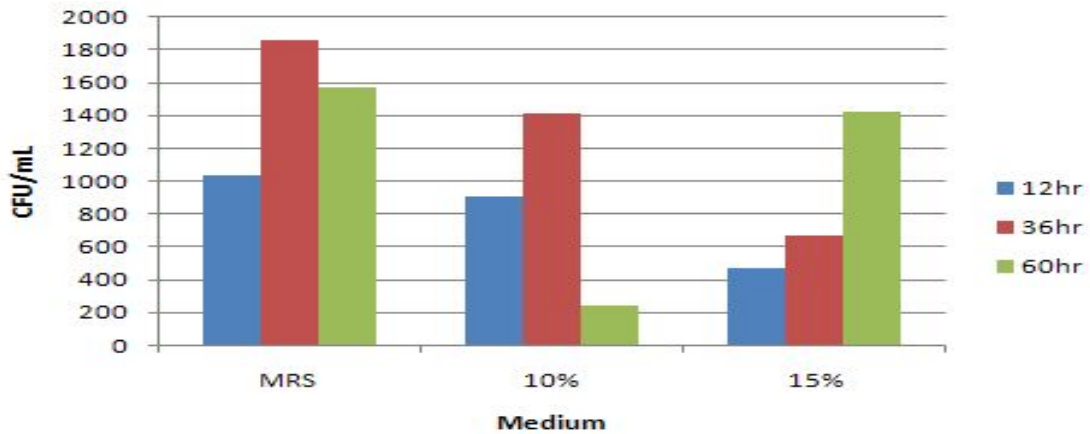


Fig. 1.1.9 Viable cell count of *Lc. lactis* YM7 in MRS broth and whey powder medium.

- MRS배지가 유청분말을 10%, 15%를 첨가한 배지보다 생균수는 많았고, 유청농도 15%배지가 60시간 이후부터 생균수의 증가가 뚜렷하게 관찰되었음. 이는 유청배지에 유산균이 이용할 수 있는 glucose가 고갈되어 배지 내에 다량 존재하는 유당을 분해하기 시작한 것으로 생각됨.

② 질소원 조건 확립

㉞ 질소원 조성에 따른 미생물의 생육변화

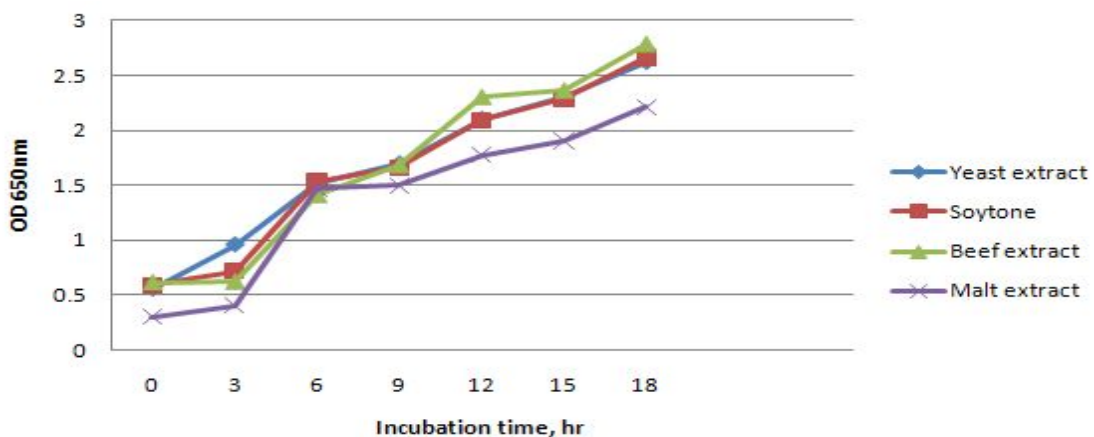


Fig. 1.1.10 Effect of organic nitrogen sources on the growth *Lc. lactis* YM7 in whey powder medium.

- 분말유청배지를 기본 배지로 하여 다양한 질소원에 따른 미생물의 증식을 검토하기

위하여 yeast extract, soytone, beef extract, malt extract를 1% 첨가하여 배지를 제조한 다음 유산균의 증식을 배양 후 18시간까지 측정된 결과 유기질소원의 종류에 따라 균체 증식이 큰 차이가 없는 것으로 나타남.

㉔ 질소원 함량에 따른 미생물의 생육변화

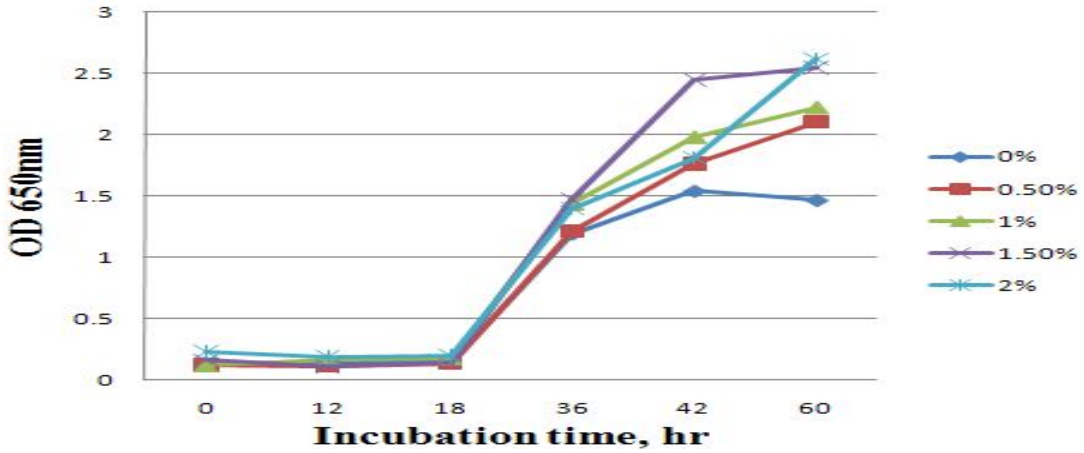
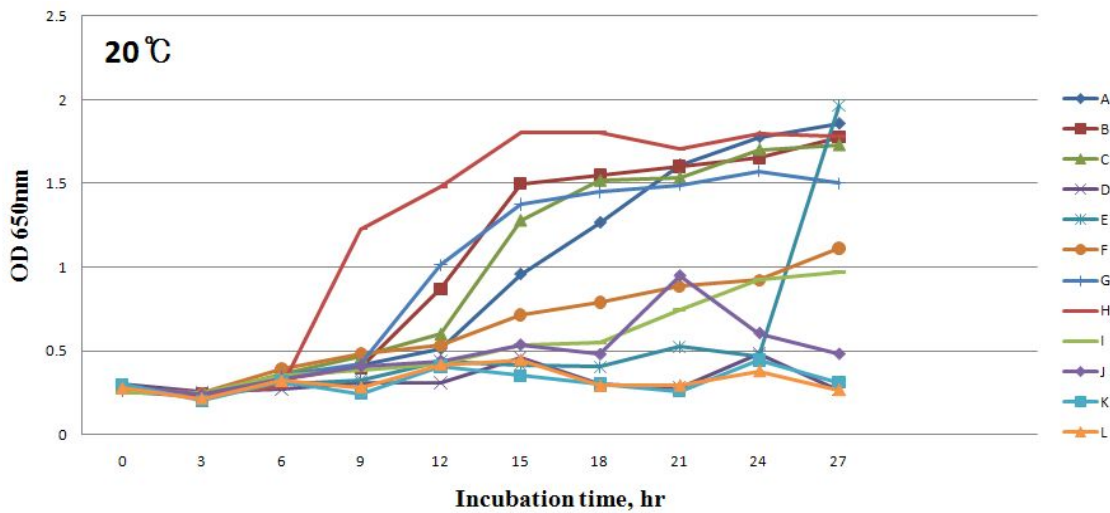


Fig. 1.1.11 Effect of yeast extract concentration on the growth of *Lc. lactis* YM7 in 10% whey powder medium.

- 분말유청배지에 결핍된 유기질소원으로 가장 대표적인 yeast extract의 첨가량에 따른 균체 증식정도를 650nm에서 흡광도를 측정함으로써 수행함. 위 그림에 나타난바와 같이 질소원으로 1%이상을 첨가하는 것이 유리한 것으로 사료됨.

③ 온도별 분말유청배지 중 유산균의 증식

㉕ 유당을 자화할 수 있는 12종류의 분리 유산균주(A~L)를 yeast extract가 1% 첨가된 10% 분말유청배지에 접종한 다음 650nm에서 흡광도를 측정하여 균체 증식을 검토함.





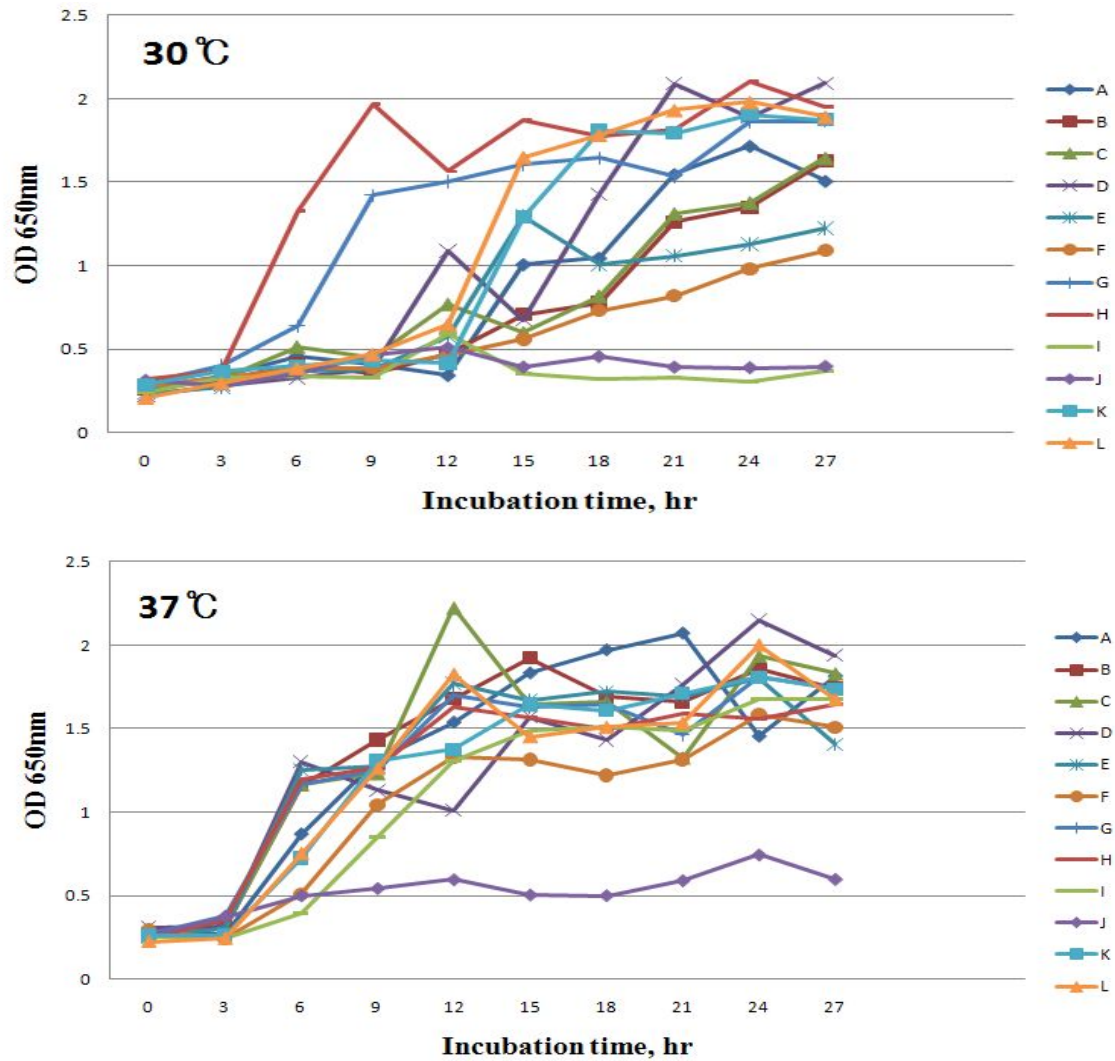


Fig. 1.1.12 Effect of incubation temperature on th growth of lactic acid bacteria strains isolated in 10% whey powder medium.

- 위 그림에 표시한 바와 같이 20°C, 30°C, 37°C에서 미생물의 생육은 H균주의 생육이 가장 두드러지고, E의 경우 20°C에서 배양할 경우 유도기간이 24시간 정도로 매우 길게 나타났으며, J주는 3가지 온도에서 잘 증식하지 못하는 것으로 나타나 분말유청배지에서 증식이 가장 저조하였음. 20°C, 30°C에서는 유산균 분지주의 종류에 따라 생육이 큰 차이가 관찰되었으나, 37°C에서는 J주를 제외한 공시균주 대부분이 잘 자라는 것으로 나타남.

나. 제 1협동 과제

(1) 가수분해효소 선정

(가) 유청단백질 준비

- 본 연구는 (주)삼익유가공에서 제공한 치즈 유청단백질을 이용하여 실험을 실시하였음.

(나) 효소

- 본 연구에 사용된 효소는 Pancreatin-100trypsin, Neutrase-Protex 7L, Alcalase-protex 6L(Genneco international) 를 사용하였음. 사용한 효소의 특징은 Table 1.3.1과 같음.

Table 1.2.1. Properties of the three enzymes used

	Enzymes	Optimum pH	Origin
1	Pancreatin - trypsin	8.0	Porcine
2	Neutrase - Protex 7L	7.0-8.0	<i>B. subtilis</i>
3	Alcalase - Protex 6L	7.0-10.0	<i>B. licheniformis</i>

(2) 유청단백질의 가수분해

(가) 50℃에서 유청단백질의 가수분해

① 각 효소의 가수분해도

Table 1.2.2. Degree of hydrolysis of whey protein treated by proteases at 50℃

Time (min)	Degree of hydrolysis (%)		
	Alcalase 1:2,500	Neutrase 1:2500	Pancreatin 1:5000
15	6.1	7.37	10.12
30	7.26	7.49	10.99
60	8.57	9.23	15.15
90	9	11.53	15.26
120	9.78	12.25	16.23
180	12.5	15.15	21.73

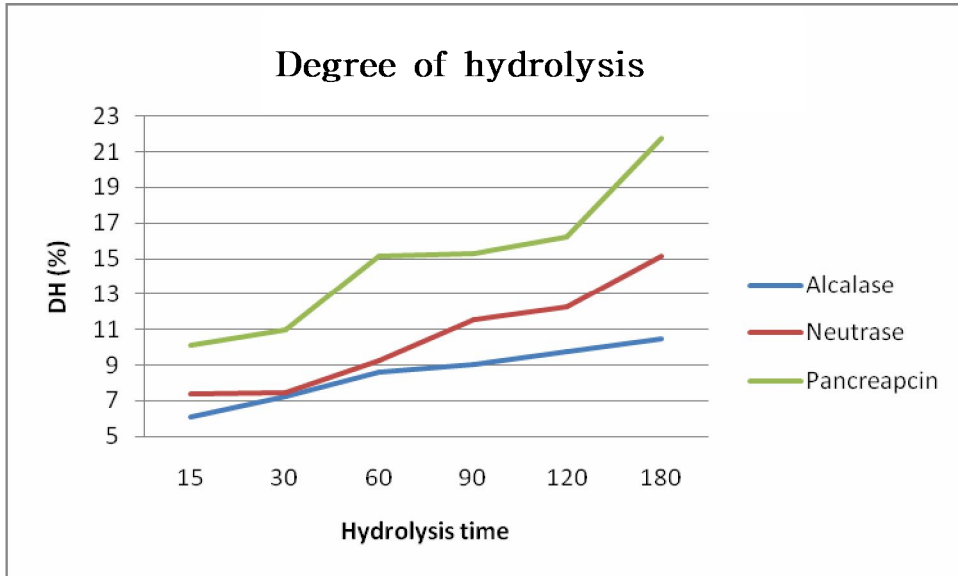


Fig. 1.2.1 Degree of hydrolysis of whey protein treated by proteases at 50°C.

Table 1.3.2와 Fig. 1.2.1은 Alcalase, Neutrase, Pancreatin 효소에 대한 가수분해도를 나타낸 것임. 3 종류의 효소 모두 시간이 경과함에 따라 가수분해도가 증가하고 있음을 나타냄. 이 중 Pancreatin이 180분 경과 때 21.73으로 가장 높았고 Neutrase는 15.15, Alcalase는 12.5로 나타남.

② 각 효소에 의한 가수분해물의 전기영동 양상

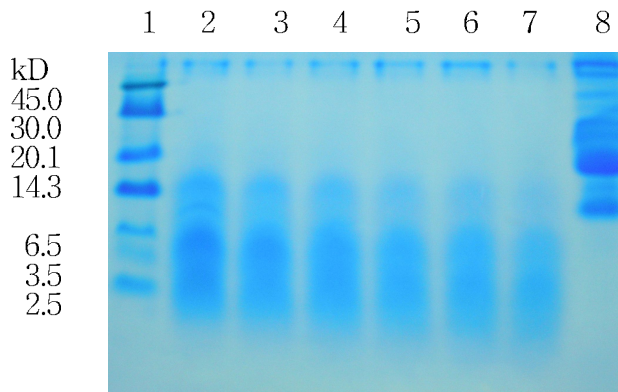


Fig. 1.2.2 Tricine gel electrophoresis of the whey protein hydrolyzed by Alcalase at 50°C (1:2500).

- |                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| 1. Standard marker         | 2. Incubation for 15 min.  |
| 3. Incubation for 30 min.  | 4. Incubation for 60 min.  |
| 5. Incubation for 90 min.  | 6. Incubation for 120 min. |
| 7. Incubation for 180 min. | 8. Control(whey protein)   |

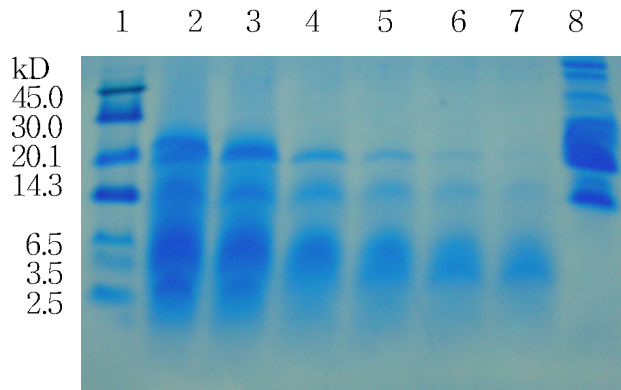


Fig. 1.2.3 Tricine gel electrophoresis of the whey protein hydrolyzed by Neutrased at 50°C (1:2500).

- |                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| 1. Standard marker         | 2. Incubation for 15 min.  |
| 3. Incubation for 30 min.  | 4. Incubation for 60 min.  |
| 5. Incubation for 90 min.  | 6. Incubation for 120 min. |
| 7. Incubation for 180 min. | 8. Control(whey protein)   |

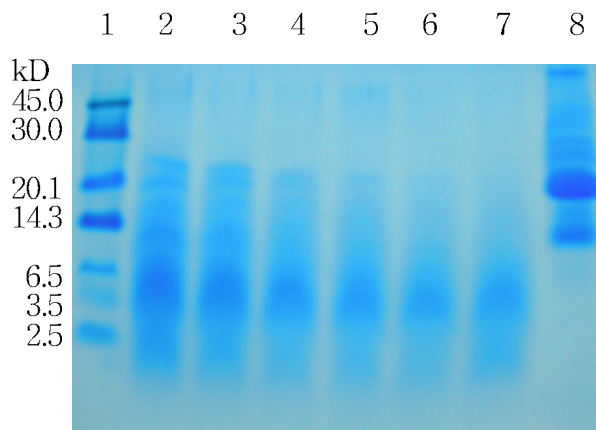


Fig. 1.2.4 Tricine gel electrophoresis of the whey protein hydrolyzed by Pancreatin at 50°C (1:5000).

- |                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| 1. Standard marker         | 2. Incubation for 15 min.  |
| 3. Incubation for 30 min.  | 4. Incubation for 60 min.  |
| 5. Incubation for 90 min.  | 6. Incubation for 120 min. |
| 7. Incubation for 180 min. | 8. Control(whey protein)   |

Fig. 1.2.2. 1.2.3. 1.2.4는 50°C에서 Alcalase, Neutrased, Pancreatin 으로 15분, 30분, 60분, 90분, 120분, 180분 동안 가수분해시킨 분해물을 Tricine gel을 이용하여 전기영동한 결과, 대조구인 유청단백질과 비교해 보면 3종류의 효소에 따라 반응시간이 경과하면서 유청단백질이 잘 분해됨을 알 수 있음. Alcalase로 처리한 유청단백질은 분자량 14.3kD이하에서 1kD까지 폭 넓게 분해가 되고 시간이 경과하면서 저분자 단백질의 양이 증가함을 알 수 있음. 또한 Neutrased, Pancreatin도 비슷한 양상을 나타내는데 Alcalase 처리와 비교하면 분자량이 23 kD 정도부터 1 kD 정도까지 넓은 범위로 분해가 됨을 알 수

있음.

③ Alcalase와 반응한 가수분해물의 peptide 양상

HPLC 작동조건은 다음과 같다.

Column was protein C18 (4.6X250mm)

Flow rate was 1mL/min.

Elution solution: A is 0.1% of TFA in distilled water

B is 0.1% of TFA in acetonitrile.

Eluted with linear gradient.

Elution time was 40min.

Injection volume was 20ul of whey protein hydrolysate. (Was concentrated 5 times in freezing drying machine)

Absorbance of the elute column was monitored at 214nm.

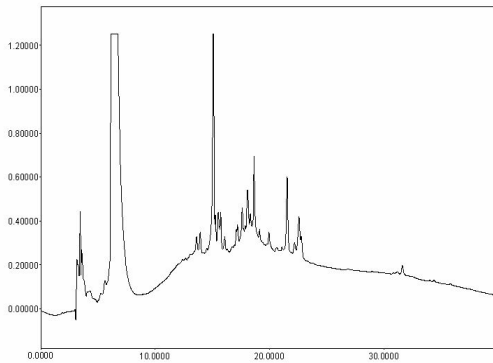


Fig. 1.2.5 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 15 min at 50°C.

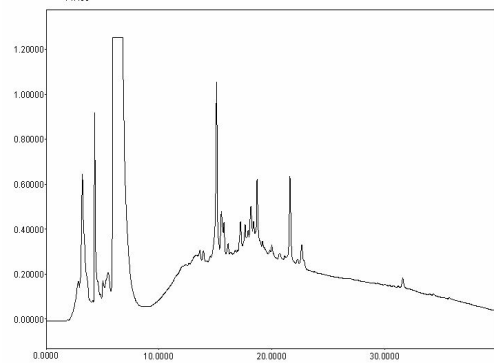


Fig. 1.2.6 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 30 min at 50°C.

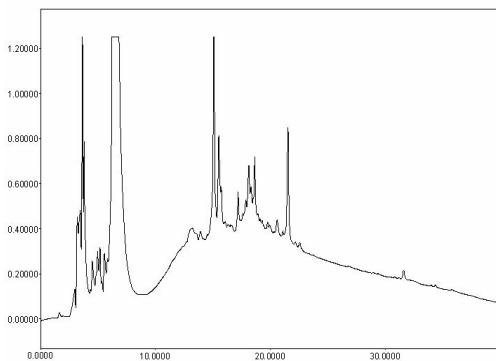


Fig. 1.2.7 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 60 min at 50°C.

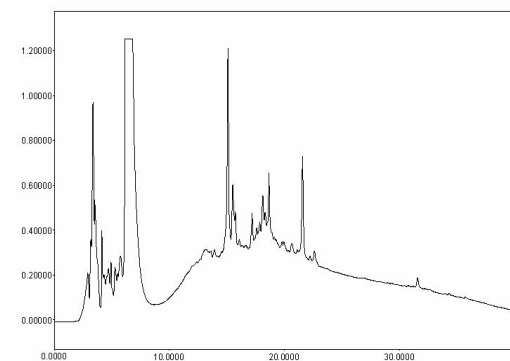


Fig. 1.2.8 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 90 min at 50°C.

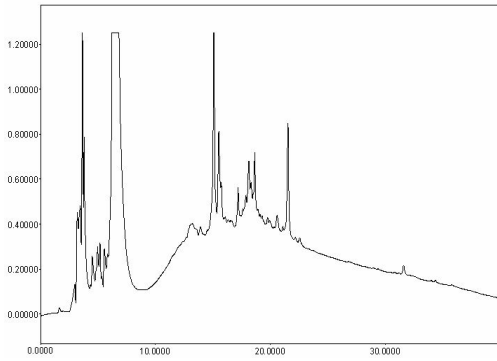


Fig.2.9 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 120 min at 50°C.

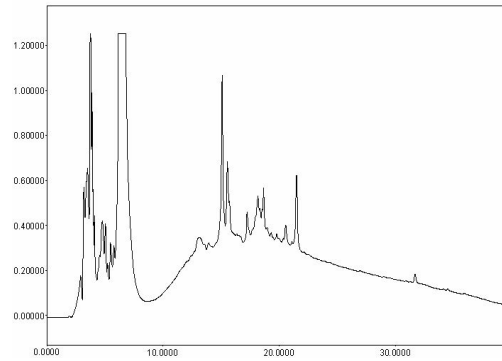


Fig.2.10 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 180 min at 50°C.

유청단백질을 50°C에서 15분, 30분, 60분, 90분, 120분, 180분 동안 Alcalase 로 가수분해하여 HPLC로 분리한 결과는 Fig. 1.2.5, 1.2.6, 1.2.7, 1.2.8, 1.2.9, 1.2.10 에 나타나 있음. 효소 반응시간이 경과함에 따라 분리 양상이 조금씩 차이가 있음을 알 수 있었음.

④ Neutrase과 반응한 가수분해물의 peptide 양상

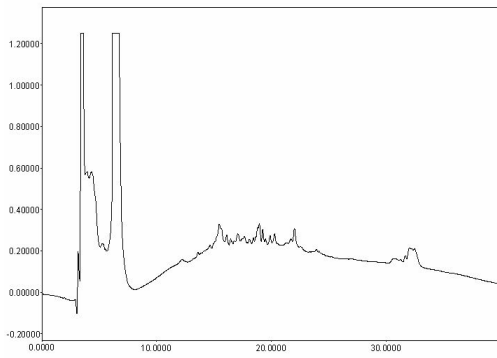


Fig. 1.2.11 Whey protein hydrolysate by Neutrase for 15 min at 50°C.

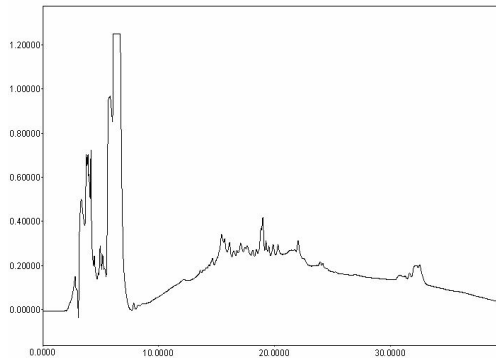


Fig. 1.2.12 Whey protein hydrolysate by Neutrase for 30 min at 50°C.

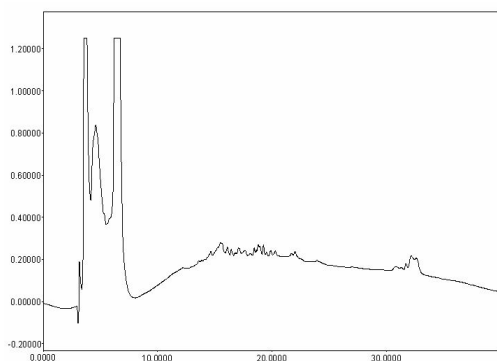


Fig. 1.2.13 Whey protein hydrolysis by Neutrase for 60 min at 50°C.

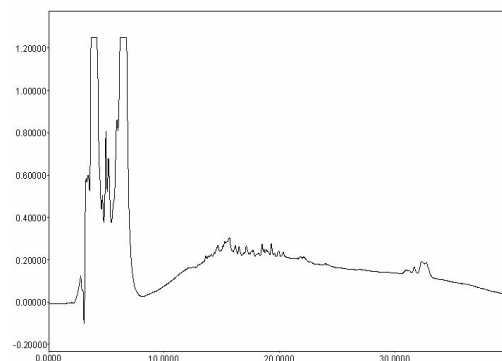


Fig. 1.2.14 Whey protein hydrolysis by Neutrase for 90 min at 50°C.

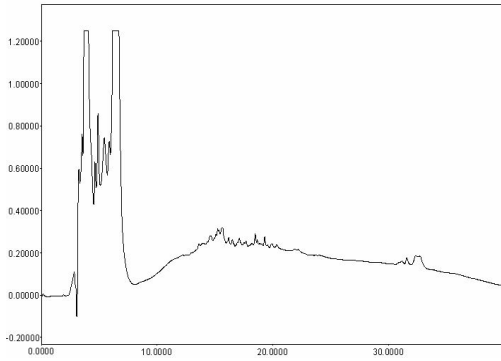


Fig. 1.2.15 Whey protein hydrolysis by Neutrase for 120 min at 50°C.

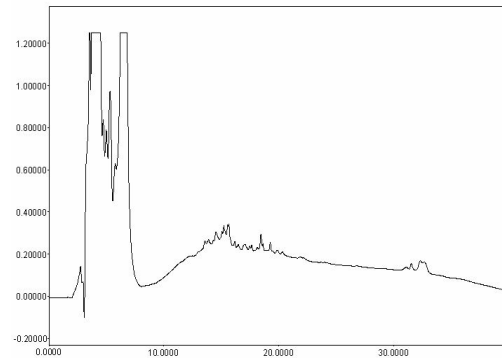


Fig. 1.2.16 Whey protein hydrolysis by Neutrase for 180 min at 50°C.

유청단백질을 50°C에서 15분, 30분, 60분, 90분, 120분, 180분 동안 Neutrase 로 가수분해하여 HPLC로 분리한 결과는 Fig. 1.2.11, .12, 1.2.13, 1.2.14, 1.2.15, 1.2.16 에 나타나 있음. 그림에 나타난 바와 같이 효소 반응시간이 경과함에 따라 분리 양상이 조금씩 차이가 있음을 알 수 있었음.

⑤ Pancreatin과 반응한 가수분해물의 peptide 양상

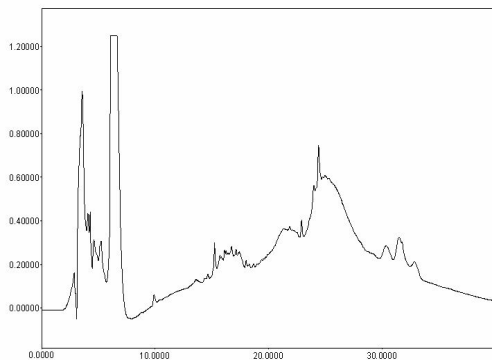


Fig. 1.2.17 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 15 min at 50°C.

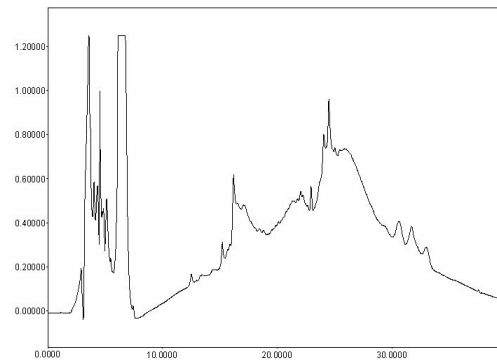


Fig. 1.2.18 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 30 min at 50°C.

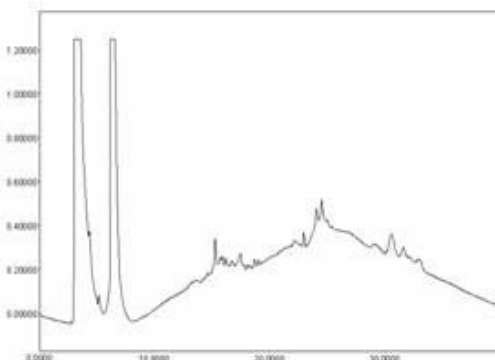


Fig. 1.2.19 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 60min at 50°C.

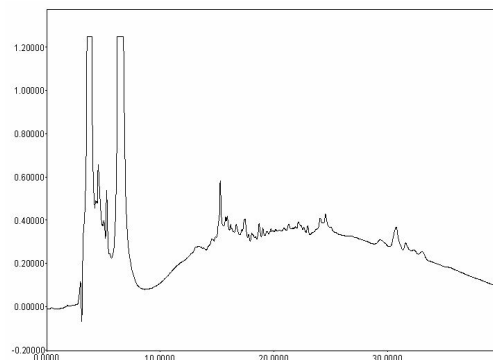


Fig. 1.2.20 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 90min at 50°C.

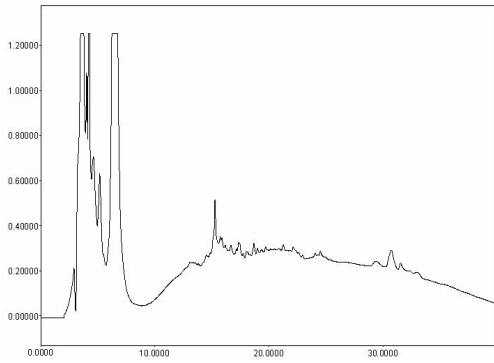


Fig. 1.2.21 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 120 min at 50°C.

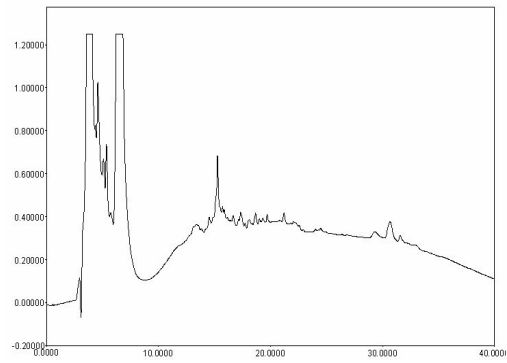


Fig. 1.2.22 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 180 min at 50°C.

유청단백질을 50°C에서 15분, 30분, 60분, 90분, 120분, 180분 동안 Pancreatin으로 가수분해하여 HPLC로 분리한 결과는 Fig. 1.2.11, 1.2.12, 1.2.13, 1.2.14, 1.2.15, 1.2.16 에 나타나 있음. 그림에 나타난 바와 같이 효소 반응시간이 경과함에 따라 분리 양상이 조금씩 차이가 있음을 알 수 있었음.

(나) 40°C에서 유청단백질의 가수분해

① 각 효소의 가수분해도

Table 1.3.3. Degree of hydrolysis of whey protein treated by proteases at 40°C (%)

Time (min)	Alcalase (1:2500)	Neutrase (1:2500)	Trypsin (1:5000)
5	4.68	3.88	5.14
10	5.45	4.37	6.74
15	5.34	4.67	7.47
30	8.39	5.74	8.79
60	8.34	7.55	11.83
90	7.38	7.96	13.56
120	8.22	9.21	12.41
180	11.33	11.71	19.45



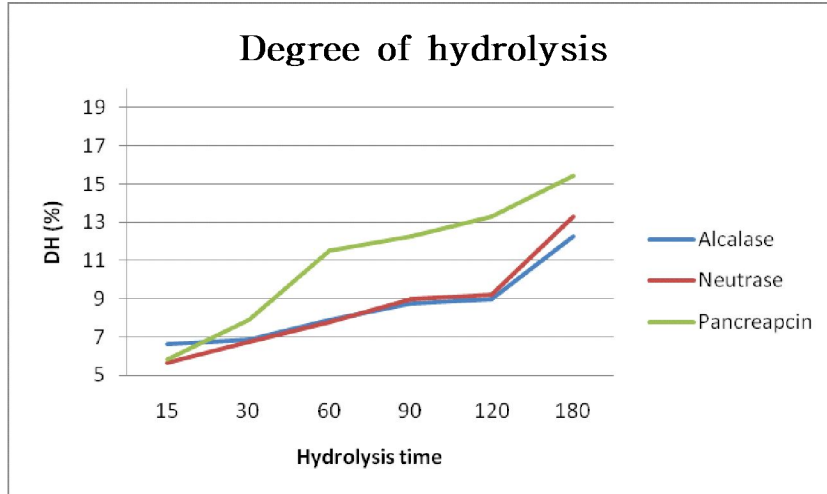


Fig. 1.2.23 Degree of hydrolysis of whey protein treated by proteases at 40°C.

Table 1.3.3와 Fig. 1.2.23은 40°C에서 Alcalase, Neutrase, Pancreatin 효소에 대한 가수분해도를 나타낸 것임. 3 종류의 효소 모두 시간이 경과함에 따라 가수분해도가 증가하고 있음을 나타냄. 이 중 Pancreatin이 180분경과 때 19.45으로 가장 높았고 Neutrase는 11.71, Alcalase는 11.33으로 나타남.

## ② 각 효소에 의한 가수분해물의 전기영동 양상

Fig. 1.2.24. 1.2.25. 1.2.26은 40°C에서 Alcalase, Neutrase, Pancreatin 으로 5분, 10분, 15분, 30분, 60분, 90분, 120분, 180분 동안 가수분해시킨 분해물을 Tricine gel을 이용하여 전기영동한 것임. 대조구인 유청단백질과 비교해 보면 3종류의 효소에 따라 반응시간이 경과하면서 유청단백질이 분해는 되지만 고분자 단백질이 많이 남아 있음을 알 수 있음. Alcalase로 처리한 유청단백질은 분자량 14.3kD이하에서 1kD까지 폭 넓게 분해가 되지만 시간이 경과함에도 고분자 단백질이 여전히 많이 남아 있음을 알 수 있음. 또한 Neutrase, Pancreatin도 비슷한 양상을 나타내는데 Alcalase 처리와 비교하면 분자량이 2 3 kD 정도부터 1 kD 정도까지 넓은 범위로 분해가 되지만 분해가 되지 않고 남아있는 단백질의 양이 많음을 알 수 있음.

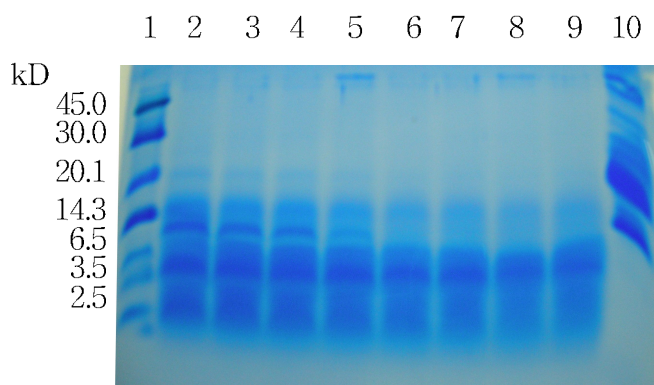


Fig. 1.2.24 Tricine gel electrophoresis of the whey protein hydrolyzed by Alcalase at 40°C (1:2500)

- |                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| 1. Standard marker         | 2. Incubation for 5 min.   |
| 3. Incubation for 10 min.  | 4. Incubation for 15 min.  |
| 5. Incubation for 30 min.  | 6. Incubation for 60 min.  |
| 7. Incubation for 90 min.  | 8. Incubation for 120 min. |
| 9. Incubation for 180 min. | 10. Control(whey protein)  |

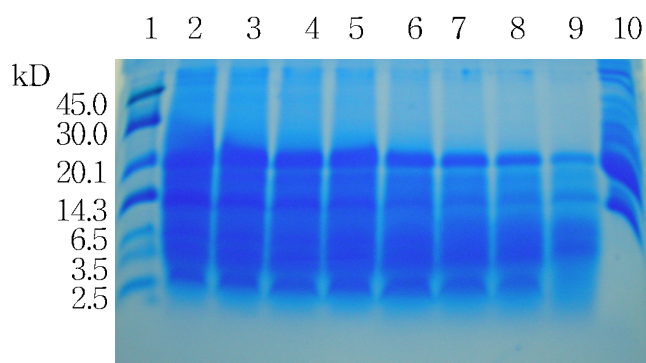


Fig. 1.2.25 Tricine gel electrophoresis of the whey protein hydrolyzed by Neutrase at 40°C (1:2500)

- |                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| 1. Standard marker         | 2. Incubation for 5 min.   |
| 3. Incubation for 10 min.  | 4. Incubation for 15 min.  |
| 5. Incubation for 30 min.  | 6. Incubation for 60 min.  |
| 7. Incubation for 90 min.  | 8. Incubation for 120 min. |
| 9. Incubation for 180 min. | 10. Control(whey protein)  |

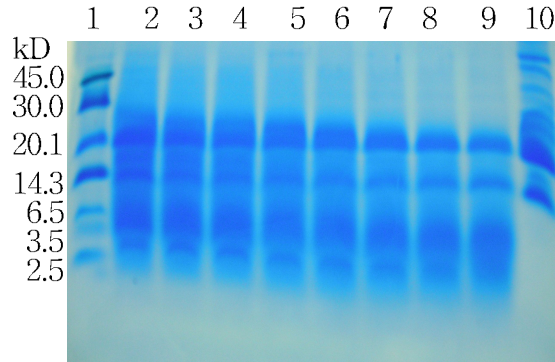


Fig. 1.2.26 Tricine gel electrophoresis of the whey protein hydrolyzed by Pancreatin at 40°C (1:2500)

- |                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| 1. Standard marker         | 2. Incubation for 5 min.   |
| 3. Incubation for 10 min.  | 4. Incubation for 15 min.  |
| 5. Incubation for 30 min.  | 6. Incubation for 60 min.  |
| 7. Incubation for 90 min.  | 8. Incubation for 120 min. |
| 9. Incubation for 180 min. | 10. Control(whey protein)  |

③ Alcalase와 반응한 가수분해물의 peptide 양상

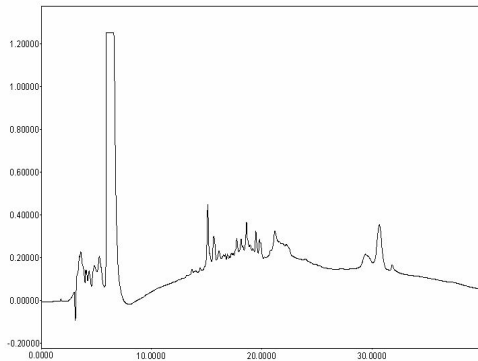


Fig. 1.2.27 Whey protein hydrolyzate by Alcalase for 5 min at 40°C.

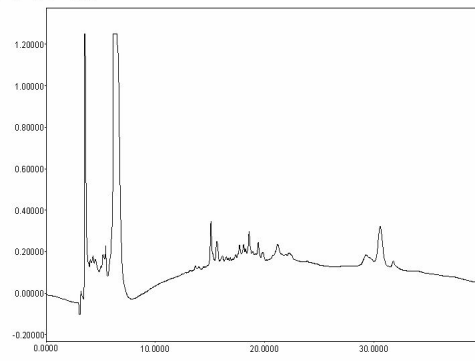


Fig. 1.2.28 Whey protein hydrolyzate by Alcalase for 10 min at 40°C.

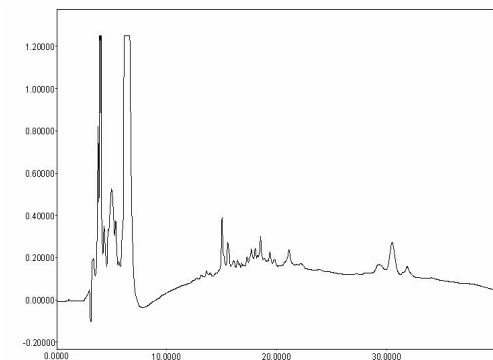


Fig. 1.2.29 Whey protein hydrolyzate by Alcalase for 15 min at 40°C.

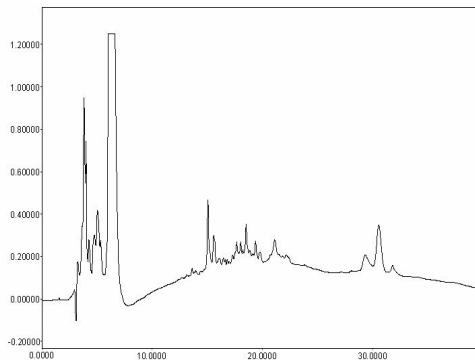


Fig. 1.2.30 Whey protein hydrolyzate by Alcalase for 30 min at 40°C.

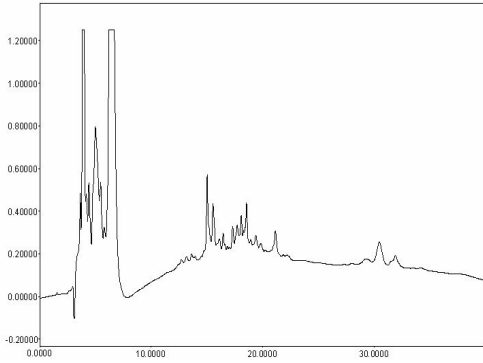


Fig. 1.2.31 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 60 min at 40°C.

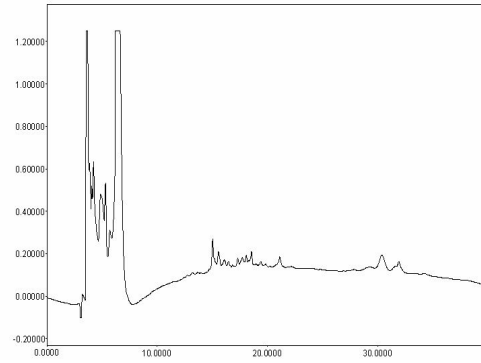


Fig. 1.2.32 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 90 min at 40°C.

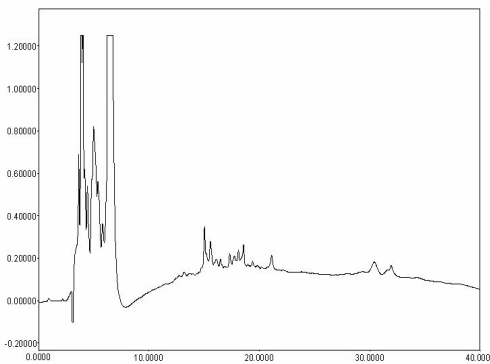


Fig. 1.2.33 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 120 min at 40°C.

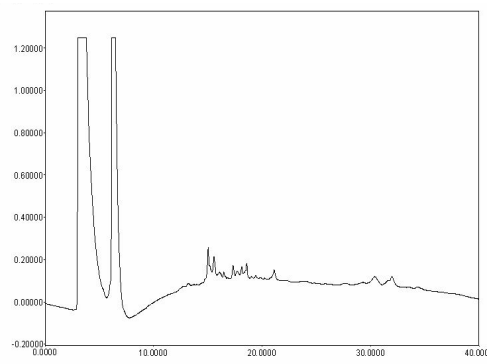


Fig. 1.2.34. Whey protein hydrolysate by Alcalase for 180 min at 40°C.

유청단백질을 40°C에서 5분, 10분, 15분, 30분, 60분, 90분, 120분, 180분 동안 Alcalase로 가수분해하여 HPLC로 분리한 결과는 Fig. 1.2.27, 1.2.28, 1.2.29, 1.2.30, 1.2.31, 1.2.32, 1.2.33, 1.2.34 에 나타나 있음. 그림에 나타난 바와 같이 효소 반응시간이 경과함에 따라 분리 양상이 조금씩 차이가 있음을 알 수 있었음.

#### ④ Neutrase과 반응한 가수분해물의 peptide 양상

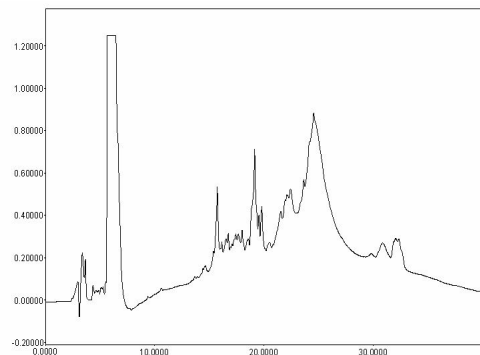


Fig. 1.2.35 Whey protein hydrolysate by Neutrase for 5 min at 40°C.

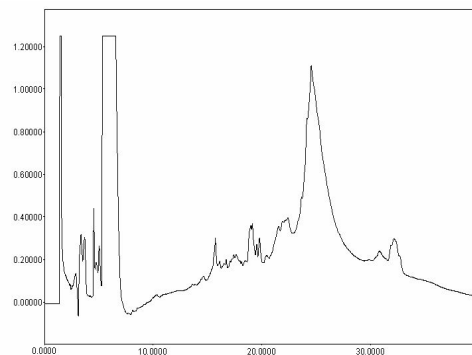


Fig. 1.2.36 Whey protein hydrolysate by Neutrase for 10 min at 40°C.

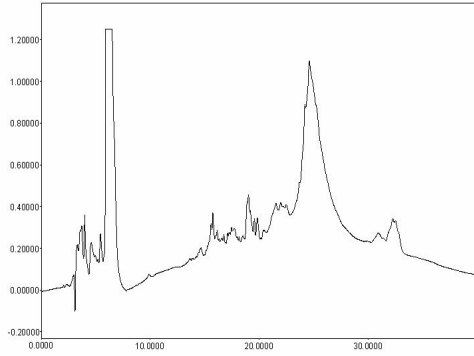


Fig. 1.2.37 Whey protein hydrolysate by Neutrased for 15 min at 40°C.

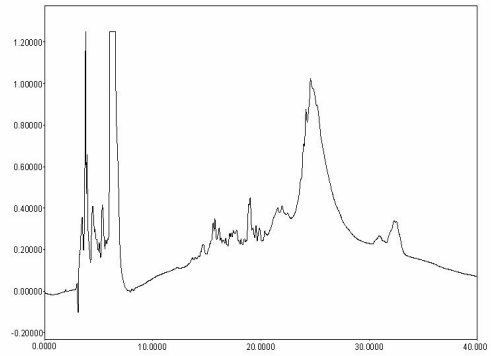


Fig. 1.2.38 Whey protein hydrolysate by Neutrased for 30 min at 40°C.

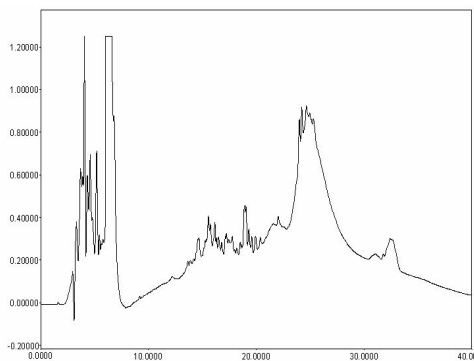


Fig. 1.2.39 Whey protein hydrolysate by Neutrased for 60 min at 40°C.

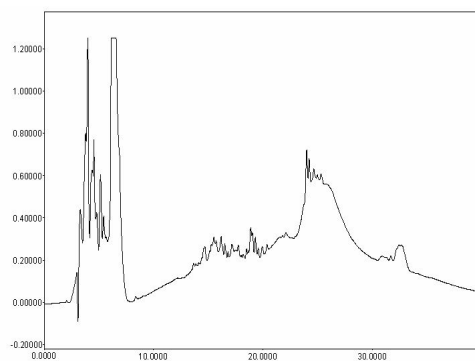


Fig. 1.2.40 Whey protein hydrolysate by Neutrased for 90 min at 40°C.

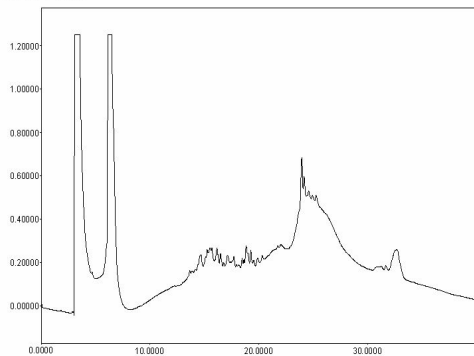


Fig. 1.2.41 Whey protein hydrolysate by Neutrased for 120 min at 40°C.

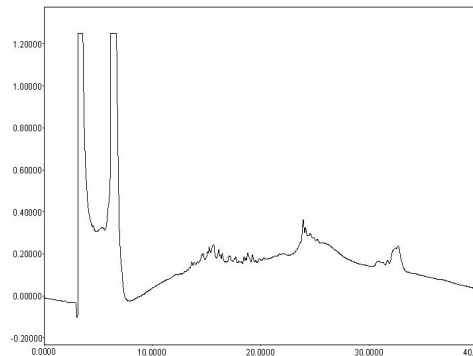


Fig. 1.2.42 Whey protein hydrolysate by Neutrased for 180 min at 40°C.

유청단백질을 40°C에서 5분, 10분, 15분, 30분, 60분, 90분, 120분, 180분 동안 Neutrased 로 가수분해하여 HPLC로 분리한 결과는 Fig. 1.2.35, 1.2.36, 1.2.37, 1.2.38, 1.2.39, 1.2.40, 1.2.41, 1.2.42 에 나타나 있음. 그림에 나타난 바와 같이 효소 반응시간이 경과함에 따라 분리 양상이 조금씩 차이가 있음을 알 수 있음.

⑤ Pancreatin과 반응한 가수분해물의 peptide 양상

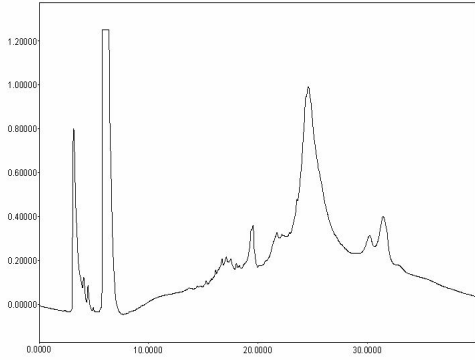


Fig. 1.2.43 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 5 min at 40°C.

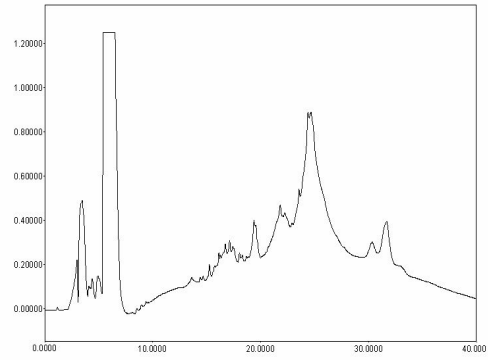


Fig. 1.2.44 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 10 min at 40°C.

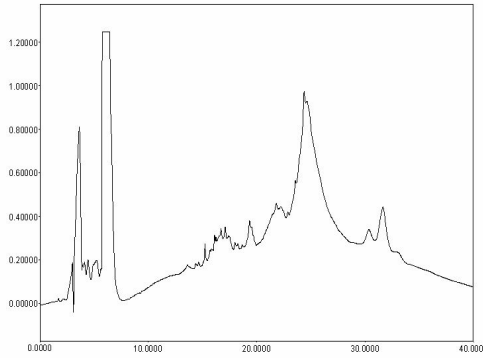


Fig. 1.2.45 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 15 min at 40°C.

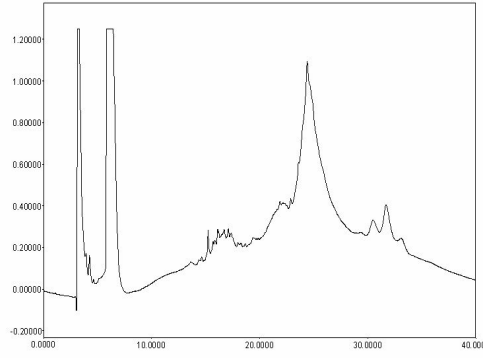


Fig. 1.2.46 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 30 min at 40°C.

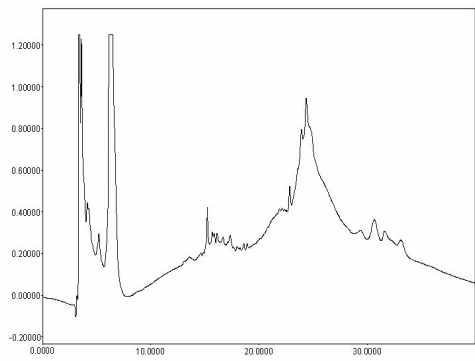


Fig. 1.2.47 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 60 min at 40°C.

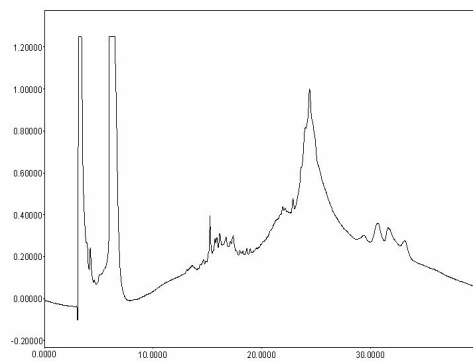


Fig. 1.2.48 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 90 min at 40°C.

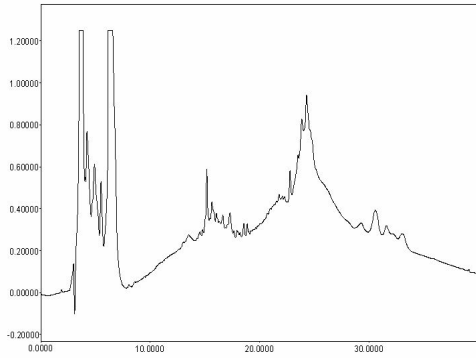


Fig. 1.2.49 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 120 min at 40°C.

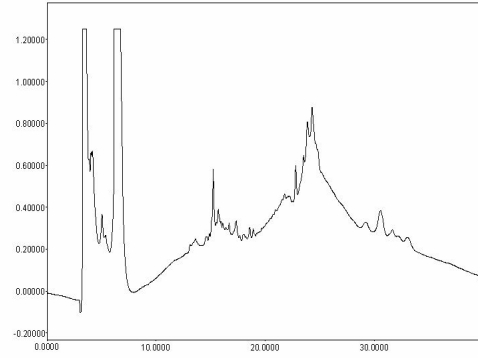


Fig. 1.2.50 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 180 min at 40°C.

유청단백질을 40°C에서 5분, 10분, 15분, 30분, 60분, 90분, 120분, 180분 동안 Pancreatin 으로 가수분해하여 HPLC로 분리한 결과는 Fig. 1.2.43, 1.2.44, 1.2.45, 1.2.46, 1.2.47, 1.2.48, 1.2.49, 1.2.50 에 나타나 있음. 그림에 나타난 바와 같이 효소 반응시간이 경과함에 따라 분리 양상이 조금씩 차이가 있음을 알 수 있음.

(다) 30°C에서 유청단백질의 가수분해

① 각 효소의 가수분해도

Table 1.2.4. Degree of hydrolysis of whey protein treated by protases at 30°C (%)

Time (min)	Alcalase (1:2500)	Neutrase (1:2500)	Trypsin (1:5000)
5	4.78	3.64	4.09
10	5.0	6.94	4.69
15	5.83	4.19	5.02
30	5.91	4.81	5.68
60	6.42	5.19	6.81
90	6.70	6.85	8.41
120	8.44	6.6	13.89
180	9.70	10.46	14.88

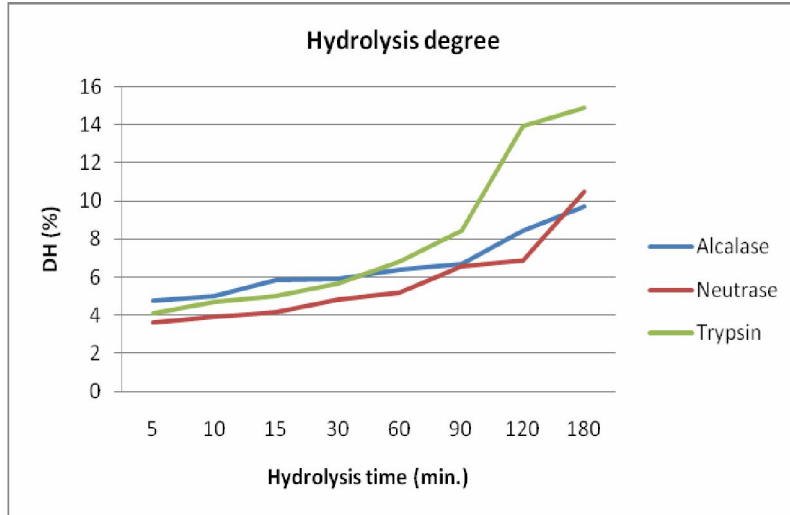


Fig. 1.2.51 Degree of hydrolysis of whey protein treated by proteases at 30°C

Table 1.2.4와 Fig. 1.2.51은 40°C에서 Alcalase, Neutrase, Pancreatin 효소에 대한 가수분해도를 나타낸 것임. 3 종류의 효소 모두 시간이 경과함에 따라 가수분해도가 증가하고 있음을 나타냄. 이 중 Pancreatin이 180분경과 때 14.88으로 가장 높았고 Neutrase는 10.46, Alcalase는 9.70으로 나타남.

② 각 효소에 의한 가수분해물의 전기영동 양상

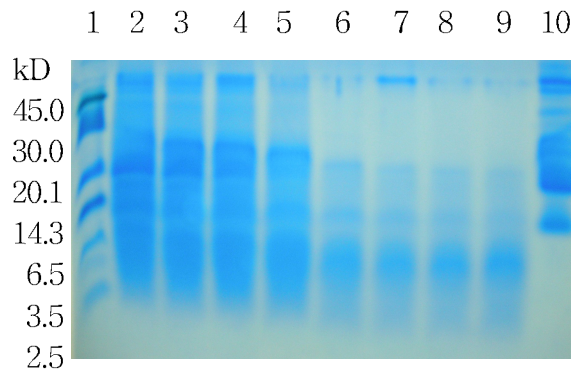


Fig. 1.2.52 Tricine gel electrophoresis of the whey protein hydrolyzed by Alcalase at 30°C (1:2500)

- |                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| 1. Standard marker         | 2. Incubation for 5 min.   |
| 3. Incubation for 10 min.  | 4. Incubation for 15 min.  |
| 5. Incubation for 30 min.  | 6. Incubation for 60 min.  |
| 7. Incubation for 90 min.  | 8. Incubation for 120 min. |
| 9. Incubation for 180 min. | 10. Control(whey protein)  |



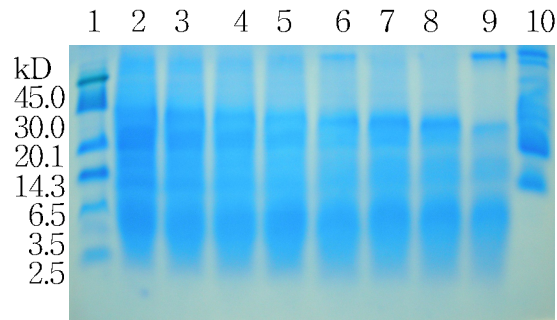


Fig. 1.2.53 Tricine gel electrophoresis of the whey protein hydrolyzed by Neutrase at 30°C (1:2500)

- |                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| 1. Standard marker         | 2. Incubation for 5 min.   |
| 3. Incubation for 10 min.  | 4. Incubation for 15 min.  |
| 5. Incubation for 30 min.  | 6. Incubation for 60 min.  |
| 7. Incubation for 90 min.  | 8. Incubation for 120 min. |
| 9. Incubation for 180 min. | 10. Control(whey protein)  |

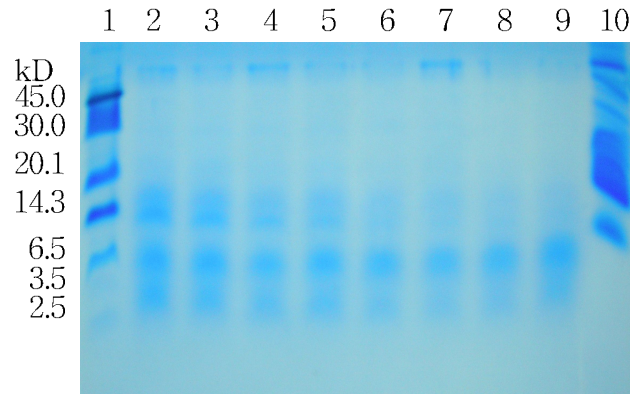


Fig. 1.2.54 Tricine gel electrophoresis of the whey protein hydrolyzed by Pancreatin at 30°C (1:2500)

- |                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| 1. Standard marker         | 2. Incubation for 5 min.   |
| 3. Incubation for 10 min.  | 4. Incubation for 15 min.  |
| 5. Incubation for 30 min.  | 6. Incubation for 60 min.  |
| 7. Incubation for 90 min.  | 8. Incubation for 120 min. |
| 9. Incubation for 180 min. | 10. Control(whey protein)  |

Fig. 1.2.52. 1.2.53. 1.2.54는 30°C에서 Alcalase, Neutrase, Pancreatin 으로 5분, 10분, 15분, 30분, 60분, 90분, 120분, 180분 동안 가수분해시킨 분해물을 Tricine gel을 이용하여 전기영동한 것임. 대조구인 유청단백질과 비교해 보면 3종류의 효소에 따라 반응시간이 경과하면서 유청단백질이 분해됨을 알 수 있다. Alcalase로 처리한 유청단백질은 반응 초기에는 큰 분자량이 많이 보였으나 1시간이상 경과함에 따라 30kD 이하의 저분자 단백질의 양이 증가함을 알 수 있음. 또한 Neutrase는 시간이 경과함에도 불구하고 고분자 단백질이 많이 존재하고, Pancreatin 처리는 대조구와 비교하면 저분자 단백질이 증가함을 알 수 있음.

③ Alcalase와 반응한 가수분해물의 peptide 양상

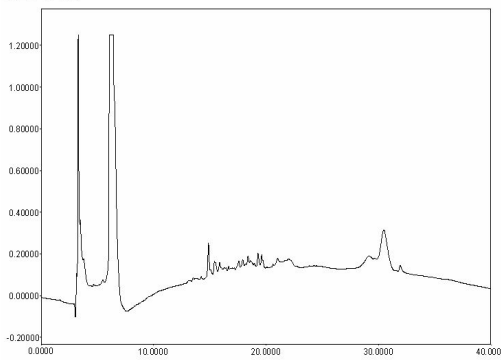


Fig. 1.2.55 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 5 min at 30°C.

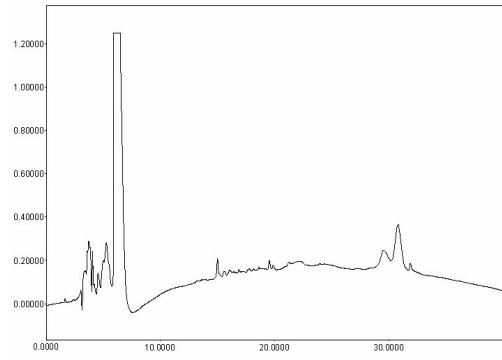


Fig. 1.2.56 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 10 min at 30°C.

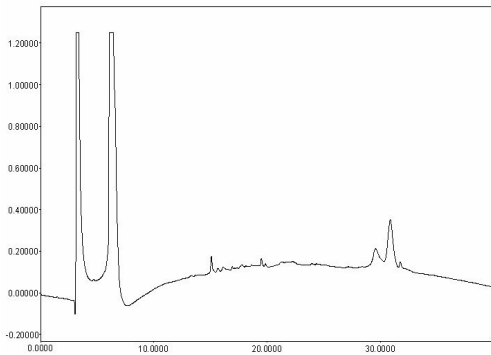


Fig. 1.2.57 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 15 min at 30°C.

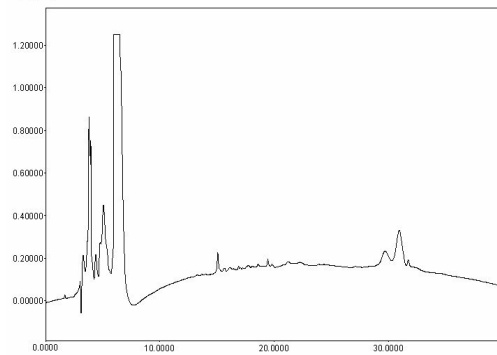


Fig. 1.2.58 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 30 min at 30°C.

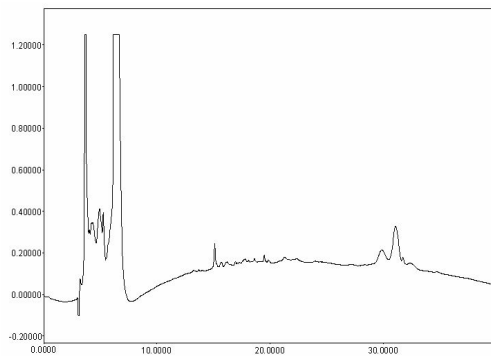


Fig. 1.2.59 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 60 min at 30°C.

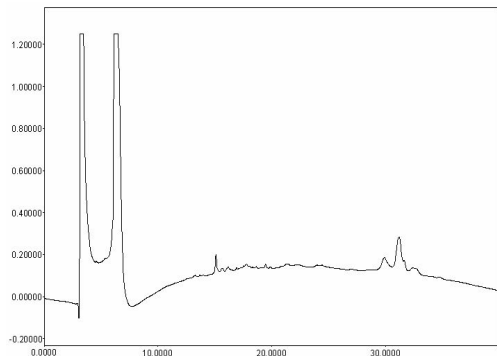


Fig. 1.2.60 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 90 min at 30°C.

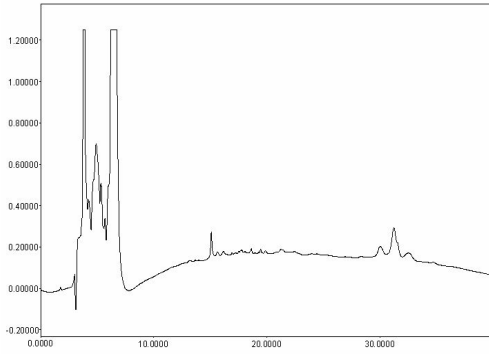


Fig. 1.2.61 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 120 min at 30°C.

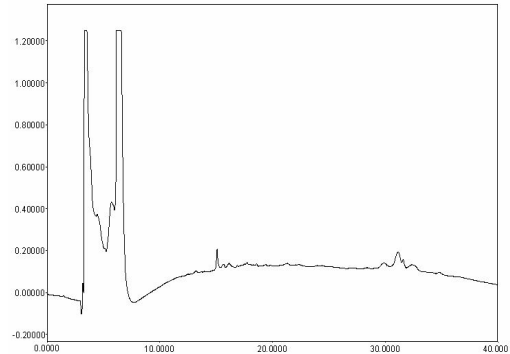


Fig. 1.2.62 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 180 min at 30°C.

유청단백질을 40°C에서 5분, 10분, 15분, 30분, 60분, 90분, 120분, 180분 동안 Alcalase로 가수분해하여 HPLC로 분리한 결과는 Fig. 1.2.55, 1.2.56, 1.2.57, 1.2.58, 1.2.59, 1.2.60, 1.2.61, 1.2.62에 나타나 있음. 그림에 나타난 바와 같이 효소 반응시간이 경과함에 따라 분리 양상이 조금씩 차이가 있음을 알 수 있음.

④ Neutrase과 반응한 가수분해물의 peptide 양상

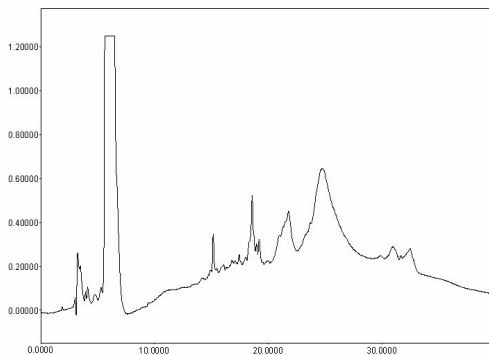


Fig. 1.2.63 Whey protein hydrolysate by Neutrase for 5 min at 30°C.

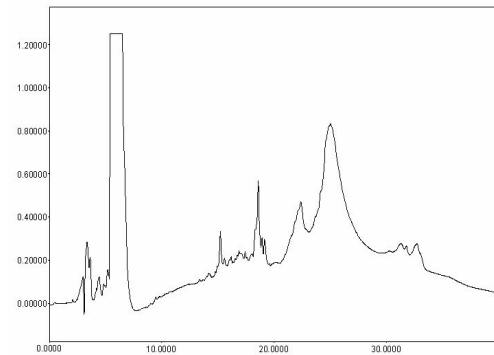


Fig. 1.2.64 Whey protein hydrolysate by Neutrase for 10 min at 30°C.

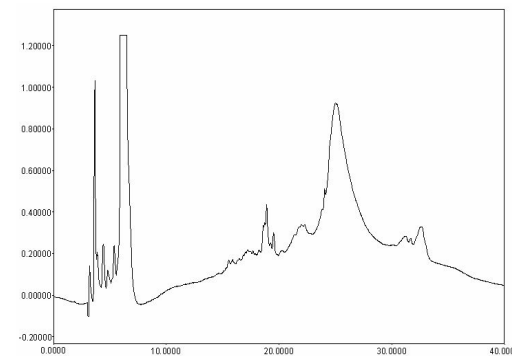


Fig. 1.2.65 Whey protein hydrolysate by Neutrase for 15 min at 30°C.

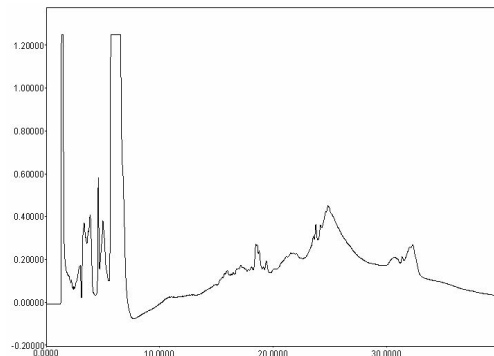


Fig. 1.2.66 Whey protein hydrolysate by Neutrase for 30 min at 30°C.

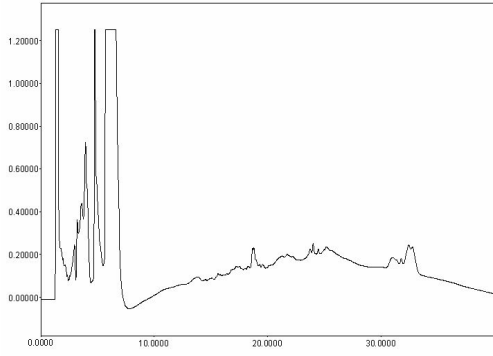


Fig. 1.2.67 Whey protein hydrolysate by Neutrase for 60 min at 30°C.

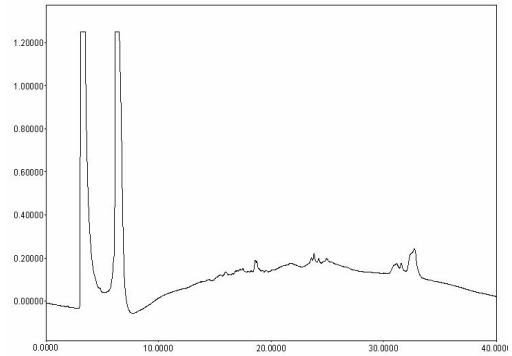


Fig. 1.2.68 Whey protein hydrolysate by Neutrase for 90 min at 30°C.

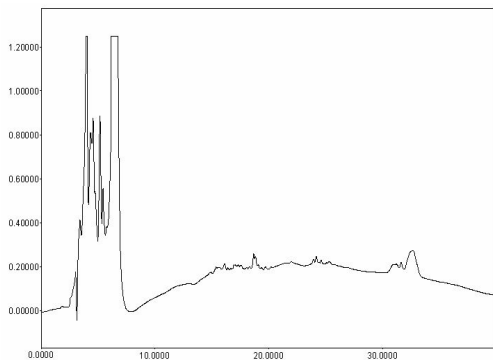


Fig. 1.2.69 Whey protein hydrolysate by Neutrase for 120 min at 30°C.

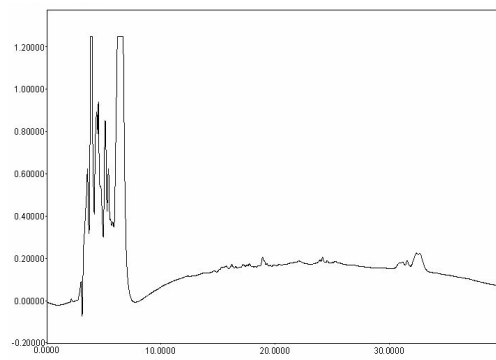


Fig. 1.2.70 Whey protein hydrolysate by Neutrase for 180 min at 30°C.

유청단백질을 40°C에서 5분, 10분, 15분, 30분, 60분, 90분, 120분, 180분 동안 Neutrase로 분해하여 HPLC로 분리한 결과는 Fig. 1.2.63, 1.2.64, 1.2.65, 1.2.66, 1.2.67, 1.2.68, 1.2.69, 1.2.70에 나타나 있음. 그림에 나타난 바와 같이 효소 반응시간이 경과함에 따라 분리 양상이 조금씩 차이가 있음을 나타내었음.

⑤ Pancreatin과 반응한 가수분해물의 peptide 양상

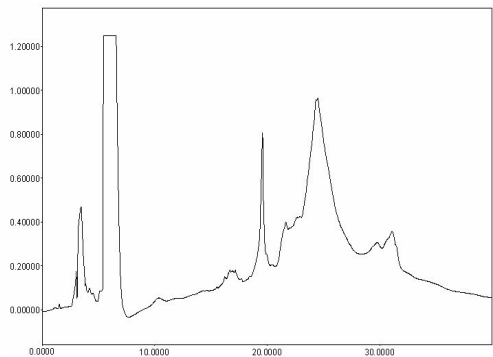


Fig. 1.2.71 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 5 min at 30°C.

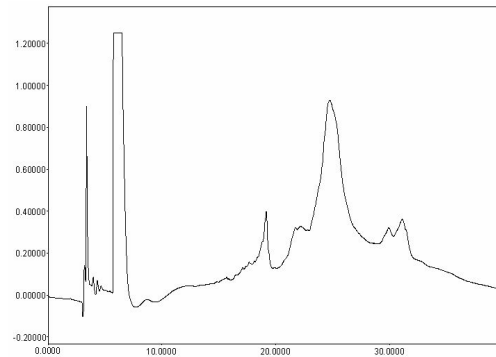


Fig. 1.2.72 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 10 min at 30°C.

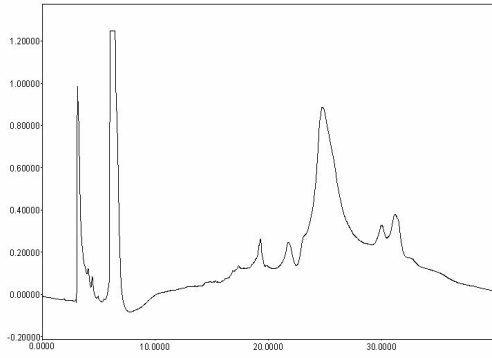


Fig. 1.2.73 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 15 min at 30°C.

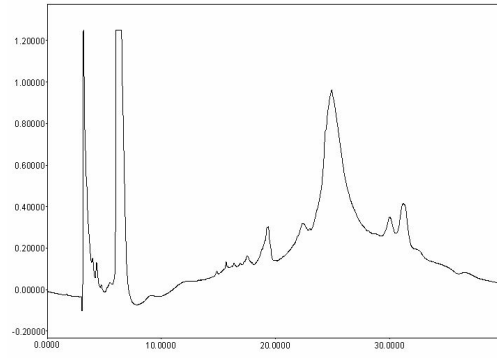


Fig. 1.2.74 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 30 min at 30°C.

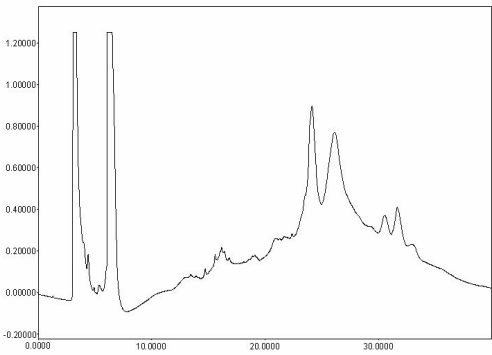


Fig. 1.2.75 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 60 min at 30°C.

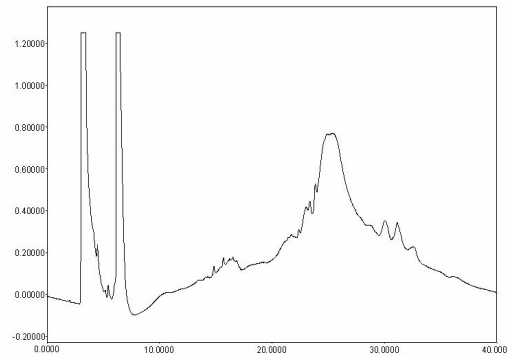


Fig. 1.2.76 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 90 min at 30°C.

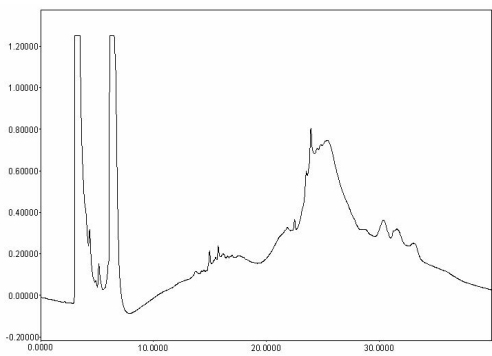


Fig. 1.2.77 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 120 min at 30°C.

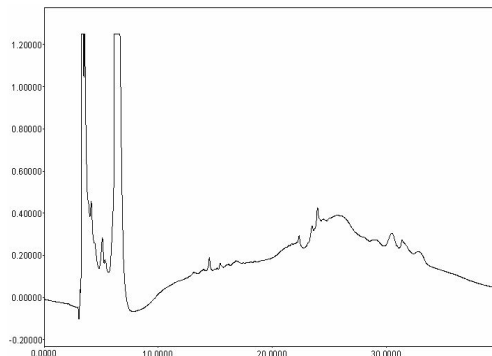


Fig. 1.2.78 Whey protein hydrolysate by Pancreatin for 180 min at 30°C.

유청단백질을 40°C에서 5분, 10분, 15분, 30분, 60분, 90분, 120분, 180분 동안 Neutrase 로 가수분해하여 HPLC로 분리한 결과는 Fig. 1.2.63, 1.2.64, 1.2.65, 1.2.66, 1.2.67, 1.2.68, 1.2.69, 1.2.70에 나타나 있음. 그림에 나타난 바와 같이 효소 반응시간이 경과함에 따라 분리 양상이 조금씩 차이가 있음을 나타내었음.

(라) 유청단백질 가수분해물의 저분자 peptide 분리

① 분자량 3,000 기준으로 분리한 가수분해물의 전기영동 양상

Alcalse, Neutrase, Pancreatin 로 처리한 유청단백질 가수분해물은 centricon(cut off 3,000)을 이용하여 3,000 이상과 3,000이하의 저분자를 분리함. 생리활성을 나타내는 펩타이드는 주로 저분자 물질로, 효소 처리에 의해 저분자 펩타이드가 생산되었음을 아래 전기영동을 통해서 알 수 있었음. 그림 2.79는 효소 종류별로 처리한 유청단백질을 분자량 3,000을 기준으로 3,000 이상과 3,000 이하로 구분하여 전기영동을 수행하였음. 그림에 나타난 바와 같이 분자량 3,000 이상의 물질은 3, 5, 7 번으로 20 kD 전후와 6 kD 전후의 단백질이 존재함을 알 수 있음. 분자량 3,000 이하의 물질은 2, 4, 6 번으로 전기영동상에는 단백질이 보이지 않음을 알 수 있는데, 이것은 저분자이기 때문임. 따라서 효소에 의해 저분자 펩타이드가 생성되었음을 확인 할 수 있었음. Fig. 1.2.80은 3 kD 이상의 단백질을 효소별로 전기영동한 것으로 3 kD 이상의 단백질이 존재함을 알 수 있음.

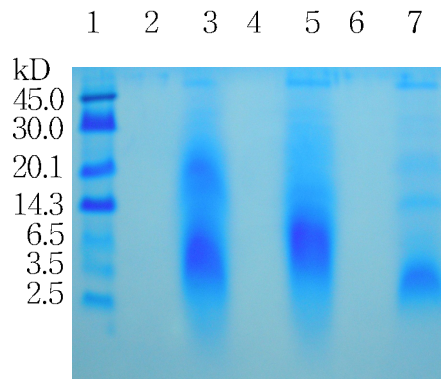


Fig. 1.2.79 Tricine gel electrophoresis of the hydrolyzed whey protein by enzymes and separated using cut off 3kD centricon.

1. Standard marker
2. Below 3kD hydrolysate by Alcalse
3. Above 3kD hydrolysate by Alcalse
4. Below 3kD hydrolysate by Neutrase
5. Above 3kD hydrolysate by Neutrase
6. Below 3kD hydrolysate by Pancreatin
7. Above 3kD hydrolysate by Pancreatin

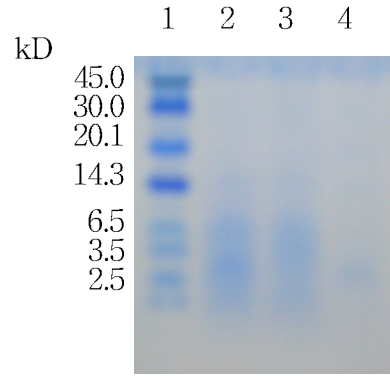


Fig. 1.2.80 Tricine gel electrophoresis of the hydrolyzed whey protein by enzymes and separated using cut off 3kD centricon.

1. Standard marker
2. Above 3kD hydrolysate by Alcalase
3. Above 3kD hydrolysate by Neutrase
4. Above 3kD hydrolysate by Pancreatin

② 분자량 3,000 기준으로 분리한 가수분해물의 peptide 양상

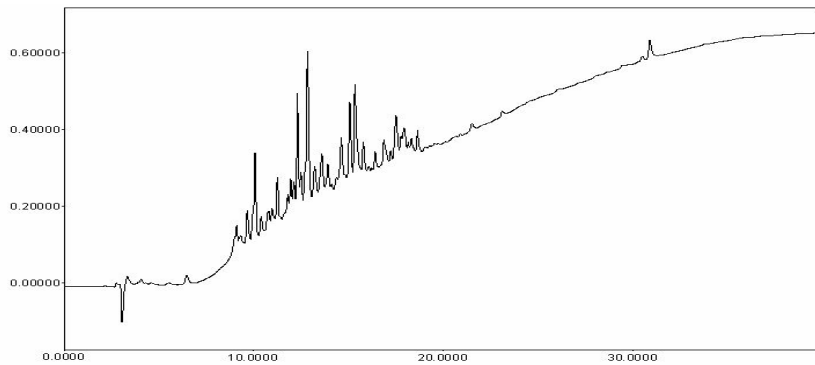


Fig. 1.2.81 Whey protein hydrolysate by Alcalase for 180min at 50 °C.

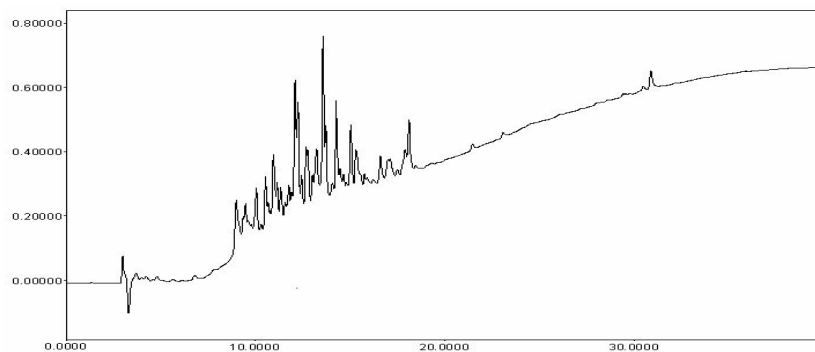


Fig. 1.2.82 Whey protein hydrolysate by Neutrase for 180min at 50 °C

Alcalase, Neutrase, Pancreatin 3 종류의 효소로 50 °C에서 180분간 유청단백질을 가수분해한 분자량 3,000 이하의 펩타이드 양상은 그림 81, 82, 83에 나타난 바와 같음. 각 효소별로 펩타이드 양상을 보면 Alcalase 처리는 다양한 펩타이드 양상을 보이며 retention time 20분까지 분리가 됨. Neutrase 역시 다양한 펩타이드 양상을 보이며 retention time은 Alcalase 처리보다는 조금 짧은 시간까지 분리가 됨. 그러나 Pancreatin 처리는 다양한 펩타이드 양상을 보이지만 retention time은 Alcalase, Neutrase 처리보다는 짧은 15분까지 분리가 됨. 이와 같이 각 효소의 종류에 따라 펩타이드가 생성되는 양상이 다른 특징을 나타냄을 알 수 있음.

### (3) 결 론

Alcalase, Neutrase, Pancreatin 3 종류의 효소로 유청단백질을 가수분해 한 결과 p H 8.0에서 Alcalase는 50 °C에서 180분간 반응시켰을 때 가수분해도는 12.5, Neutrase는 50 °C에서 180분간 반응시켰을 때 가수분해도는 15.15, Pancreatin은 50 °C에서 180분간 반응시켰을 때 21.73으로 다른 반응시간보다 가수분해도가 가장 높음.

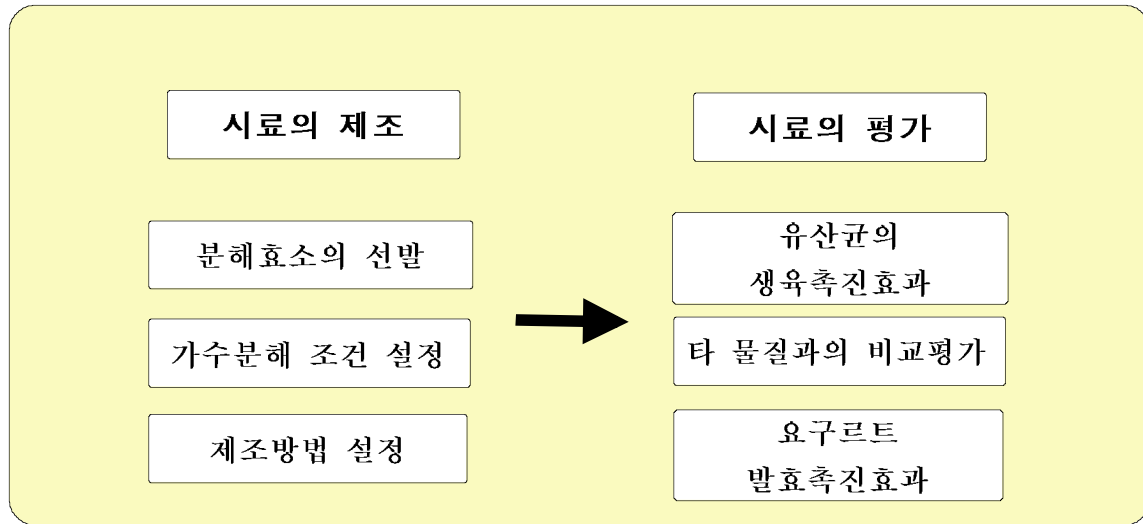
또한 Alcalase, Neutrase, Pancreatin 3 종류의 효소로 50 °C에서 180분간 유청단백질을 가수분해한 분자량 3,000 이하의 펩타이드 양상을 보면 각 효소별로 펩타이드 양상이 다른 특징을 나타내므로 이러한 다양한 펩타이드가 생리활성 기능 연구에 크게 기여 할 것으로 사료됨.



다. 제 2협동 과제

(1) 유산균의 생육촉진효능 유청 소재 개발

유제품 중 건강에 유익한 발효제품인 요구르트에 널리 활용되는 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*, *Streptococcus*의 각 유산균에 대하여 생육촉진 효과가 큰 물질을 치즈유청으로부터 개발하기 위하여 다음과 같은 과정으로 실험을 실시함.



(가) 치즈유청 원료의 선별

체다치즈를 만들 때 나오는 치즈유청, 유청분말을 회석한 것, 그리고 유청농축액을 검토하여 이 실험에 적합한 원료를 다음과 같이 선별하였음.

Table 1.3.1. 유청원료의 비교 평가

항목 / 원료	유청	유청분말	유청농축액
제조원	범산목장	삼익유가공	서울우유
°Bx	6	30 (분말을 회석)	30
물성	묽음	점도가 높음	적당
Protease처리 후 성상	상태 양호	불균일	상태 양호
효소 처리 생산 효율	매우 큰 용량의 탱크 필요	용해 장치 별도 필요	현장에 바로 처리 가능

유청농축액을 대신하여 유청분말을 회석하여 사용하여 보았으나, 농축액과 성상이 달라 실험실적 연구와 실제 상황이 다른 결과가 나올 수 있을 것으로 예상되어, 현장조건과 동일한 유청농축액을 냉동보관하면서 시료로서 사용하여 실험을 진행하였음.

(나) 유청농축액의 분해 효소 선별

① Protease

Table 1.3.2 각 제조사별 Protease의 특성

효소명	제조원	Source	효소특성	작용 온도	작용 pH	비고
Alcalase 2.4L FG	DSM	<i>Bacillus licheniformis</i>	Endo- peptidase	60℃ (55~70℃)	7.0~8.0 (6.5~8.5)	
Neutrase 0.8L	DSM	<i>Bacillus amyloliquefacien s</i>	Endo- protease	45℃ (45~55℃)	6.5 (5.5~7.5)	Ca <sup>++</sup> 에 의해 안정
Protamex	DSM	<i>Bacillus</i>	Complex	40~45℃ (35~60℃)	6.5 (5.5~7.5)	
Flavourzym e 500MG	DSM	<i>Aspergillus oryzae</i>	Complex	50℃ (45~55℃)	6.5 (5.0~7.0)	
Validase FP500	Valley Researc h	<i>Aspergillus oryzae</i>	Complex	50~55℃ (45~60℃)	3.0~6.0	acid type
Umamizyme	Amano	<i>Aspergillus oryzae</i>	Complex	45℃ (40~50℃)	6.5~8.0	
Protease M	Amano	<i>Aspergillus oryzae</i>	Complex	50℃ (45~55℃)	4.5 (3.0~6.0)	acid type

(출처 : 제조사 Technical sheet)

유청과 유청농축액의 pH가 6.2~6.5인 점을 고려하여 시험용 Protease로서 Neutrase 0.8L 과 Flavourzyme 500MG, 그리고 Validase를 1차 선발하였고, 이를 단독 또는 혼합접종 하여 그 효과를 평가하였다. 예비실험에서 Exoprotease로서 Umamizyme과 Flavourzyme 모두 쓴맛을 내지 않고 분해력이 좋았으나, Umamizyme의 경우 효소분해 후 갈변되는 현상이 관찰되어 최종 제품의 성상을 고려하여 Flavourzyme을 선택하여 시험하였음.

㉔ Protease의 효소분해 방법

효소관련 기술자료와 예비시험을 통하여 1차 Screen한 효소로 유청농축액을 다음과 같이 분해 시험하였음.

- 기질 : 유청농축액(30°Bx) 서울우유 제조
- 전처리 : 75℃로 20분 살균
- 반응 온도 : 45℃
- 교반 조건 : 140rpm, Shaking Incubator(JEIO TECH, Model:SI-300R)
- 반응 시간 : 3hr.

Table 1.3.3 Protease 종류별 첨가량

Protease	A	B	C
Flavourzyme	0.09%	0.09%	0.09%
Neutrase		0.03%	

Validase FP500			0.03%
----------------	--	--	-------

㉔ 효소분해액의 비교 평가

효소처리한 시료 3가지 A, B, C에 대하여 pH와 유산균 증식 촉진능력 등을 비교 평가하였음.

Table 1.3.4 Protease처리 후의 물리적 변화

Protease	A	B	C
효소처리 후 pH	6.04	6.05	6.05
실활* 후 조직	영김	영김	영김
쓴맛 여부	없음	없음	없음

\* 실활 조건 : 효소처리 후 중탕 95℃, 10분 처리

효소처리액 각각의 유산균 증식촉진 효과를 알아보기 위하여 요구르트 배양액을 37℃에서 배양하면서 시간별 조직의 응고 여부로 간접 관찰하였음.

- 요구르트 배양액의 조성 : 우유 95%, 효소처리시료 4%, 설탕 1%
- 비교를 위하여 효소처리하지 않은 유청농축액, 탈지분유 15%액을 효소처리시료 대신 첨가한 배양액을 동시에 배양하였음.

Table 1.3.5 요구르트 배양액의 유산균주별 응고 여부

균주	배지(첨가액) 배양	SK	Con	A	B	C
		탈지분유액 (15%)	유청농축액 (30%)	효소처리A	효소처리B	효소처리C
L.a	4 hr	-	-	-	-	-
	8 hr	-	-	-	-	-
	16 hr	-	±	+	+	+
S.t	4 hr	-	-	-	-	-
	8 hr	-	-	+	+	+
	16 hr	-	+	+	+	+
B.i	4 hr	-	-	-	-	-
	8 hr	-	-	-	-	-
	16 hr	-	±	+	±	+

유산균 스타터 종류 : L.a = *L. acidophilus* LAFTI LI0 (DSM)

S.t = *S. thermophilus* ST-BODY-1 (CHR. HANSEN)

B.i = *B. infantis* BI 710 (MARSHAL)

배양시간별 배양액의 응고를 비교한 바 효소를 한가지를 사용한 것에 비하여 혼합 사용



하였을 때 응고 촉진 효과가 뚜렷이 관찰되지 않았음. 또한 Protease를 복합사용한 B시료는 요구르트 배양액을 조제하여 살균하였을 때 접종전에 이미 조직이 엉겨있어서 발효하는 것이 의미가 없었음(Fig. 1.3.1). 따라서 이후 실험에서는 Flavouzyme 단독 처리한 A를 사용하였음.

Fig. 1.3.1 효소처리유청농축액 B를 4% 첨가한 요구르트배양액의 살균 후 조직

㉔ 배양시험 결과

요구르트 배양액 조성을 다음과 같이하여 유산균의 증식 촉진 능력을 pH와 유산간균과 유산구균, 그리고 비피도박테리아 각각의 생균수로서 비교하였음.

- 배양액 조성(Flav) : 우유 92%, 설탕 3%, 유청효소분해액(A) 5%
- 비교를 위하여 효소처리하지 않은 유청농축액(Con), 탈지분유 30%액(SK)을 효소처리시료 대신 첨가한 배양액을 제조하여 각각 Con, SKMP로 표기하였음.

- 배양 온도 : 37°C
- 배양 시간 : 6, 12, 19hr.
- 유산균 스타터 종류 : *L. acidophilus* LAFTI L10 (DSM)  
*S. thermophilus* ST-BODY-1 (CHR. HANSEN)  
*B. infantis* BI 710 (MARSHAL)
- 미생물 분석용 배지 : *Lactobacillus* (MRS Agar)  
*Streptococcus* (M17 Agar)  
*Bifidobacterium* (BL Agar)

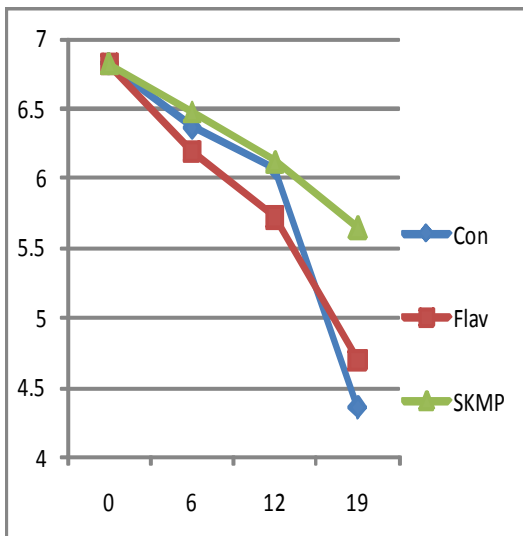


Fig. 1.3.2 *L. acidophilus* 배양액의 pH 변화

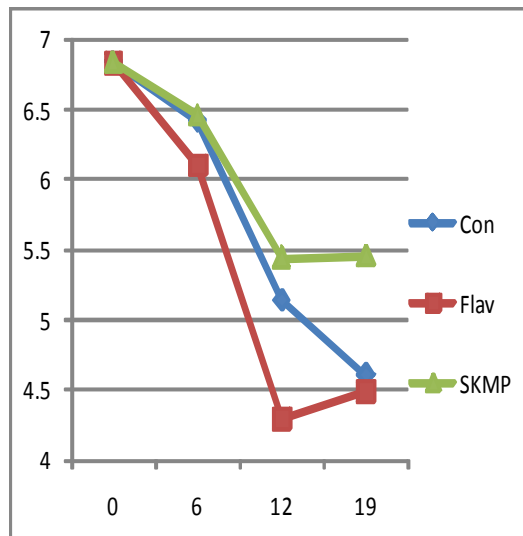


Fig. 1.3.3 *S. thermophilus* 배양액의 pH 변화

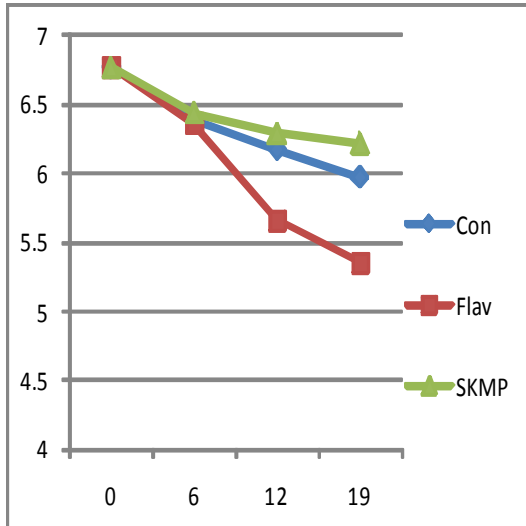


Fig. 1.3.4 *B. infantis* 배양액의 pH 변화

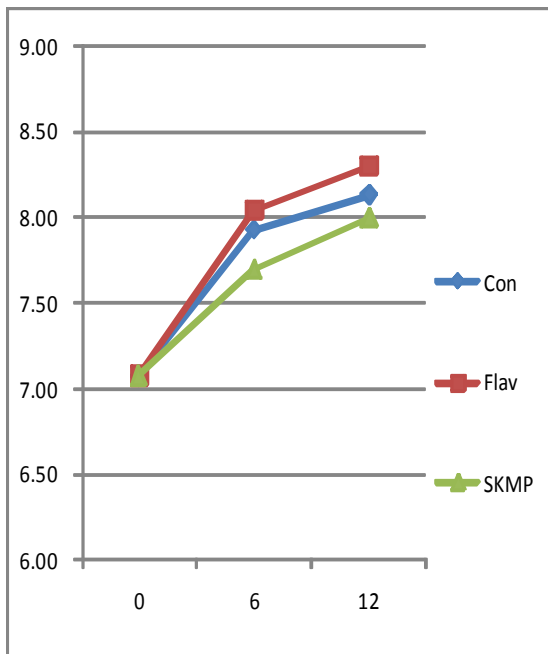


Fig. 1.3.5 *L. acidophilus* 배양액의 생균수 변화

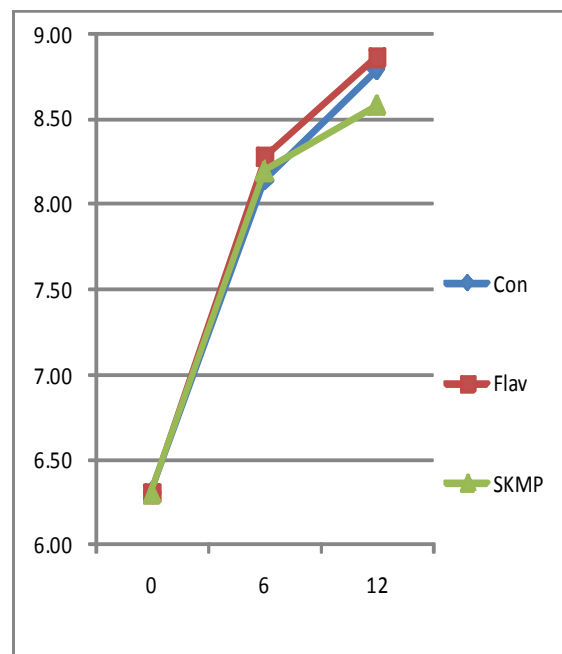


Fig. 1.3.6 *S. thermophilus* 배양액의 생균수 변화

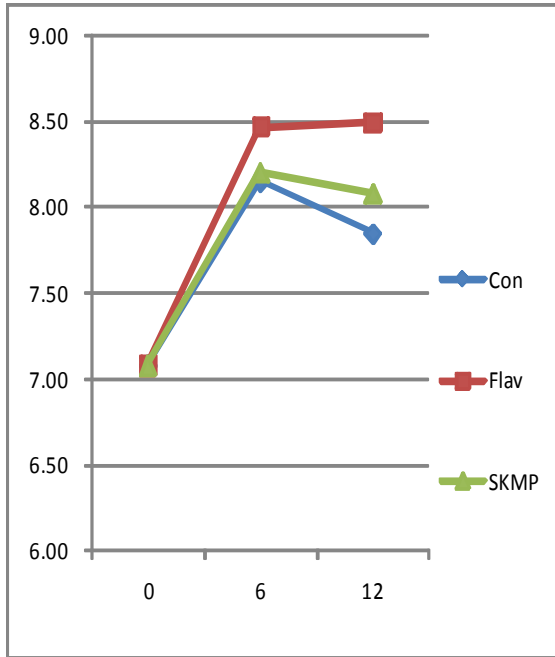


Fig. 1.3.7 *B.infantis* 배양액의 생균수 변화

위의 그래프 Fig. 1.3.2 ~ Fig. 1.3.7에서 보는 바와 같이 탈지분유 30% 용액을 첨가한 배양액(SKMP)보다 유청농축액을 첨가한 것(Con)이 더 pH가 빨리 낮아졌고, 또 유청농축액(Con)보다는 효소분해 유청농축액(Flav)이 더 빨랐음. 생균수 역시 SKMP보다 Con이, Con보다 Flav가 더 높은 생균수를 나타냄. 특히 *B. infantis*는 12시간 발효 후 생균수가 SKMP에 비해 Flav가 6배나 높아 가장 현저한 차이를 나타내었고, 이로 미루어 유청 효소농축액은 비피더스 생육촉진효과가 높다고 판단됨. 그 외 *L. acidophilus*와 *S. thermophilus*의 경우에도 SKMP 시료보다 Flav 시료가 2배 정도 높은 생균수를 나타내어 요구르트 발효촉진물질로서의 가능성을 시사하고 있음.

## ② Lactase

Table 1.3.6 제조사별 Lactase의 특성

효소명	제조원	Source	효소특성	작용 온도	작용 pH	비고
Validase 60 Yeast Lactase	Valley Research	<i>Kluyveromyces lactis</i>	60,000 ONPGU /g	40~45℃ (37~50℃)	6.0~6.5 (6.0~8.0)	
GODO-Y NL 2	GODO SHUS EI	<i>Kluyveromyces lactis</i>	50,000 ONPGU /g	40~45℃ (37~50℃)	6.0 (6.0~6.5)	

(출처 : 제조사의 Technical sheet)

Lactase는 Valley Research사 원료와 GODO SHUSEI사 원료가 동일 종의 미생물로부터

터 정제된 것이어서 최적 작용 온도와 pH 역시 동일하였음.

㉑ Lactase의 효소분해 방법

효소관련 기술자료와 예비시험을 통하여 시료를 다음과 같이 제조하여 평가하였음.

- 기질 : 유청농축액(30°Bx) 서울우유 제조
- 반응 온도 : 45℃
- 교반 조건 : 140rpm, Shaking incubator(JEIO TECH, Model:SI-300R)
- 반응 시간 : 3hr.

Table 1.3.7 Lactase 효소 첨가량

Lactase	Vali	Godo
Validase 60	0.09%	
GODO-YNL 2		0.09%

㉒ 효소분해액의 비교 평가

Lactase 효소처리한 시료 2가지에 대하여 pH와 관능검사, 그리고 유산균 축진 능력 등을 비교 평가하였다. Validase사의 Lactase를 사용하여 제조한 효소분해액의 pH는 6.1로서 Godo사 제품의 pH인 6.02보다 약간 높았으며, 감미는 Validase가 약간 낮은 경향을 보였음.

㉓ 배양시험 결과

유산균의 증식 축진 능력은 Protease 효소분해액의 평가와 동일한 방법으로 측정하였음.

- 배양액 조성 : 우유 92%, 설탕 3%, 유청효소분해액 5%
- 배양 온도 : 37℃
- 배양 시간 : 6, 12, 19hr.
- 유산균 스타터 종류 : *L. acidophilus* LAFTI L10 (DSM)  
*S. thermophilus* ST-BODY-1 (CHR. HANSEN)  
*B. infantis* BI 710 (MARSHAL)
- 미생물 분석용 배지 : *Lactobacillus* (MRS Agar)  
*Streptococcus* (M17 Agar)  
*Bifidobacterium* (BL Agar)

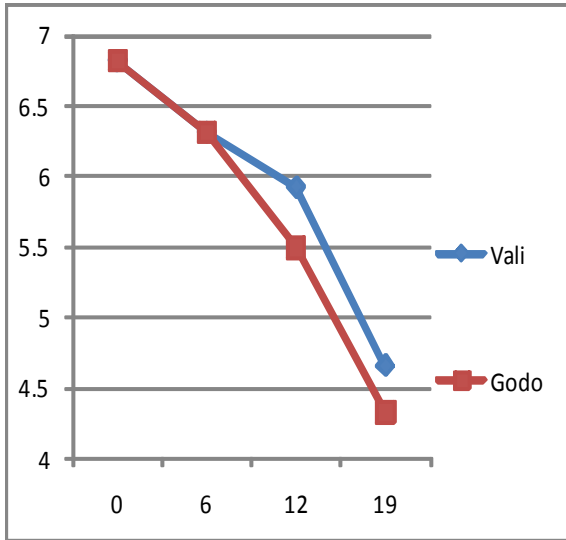


Fig. 1.3.8 *L. acidophilus* 배양액의 pH 변화

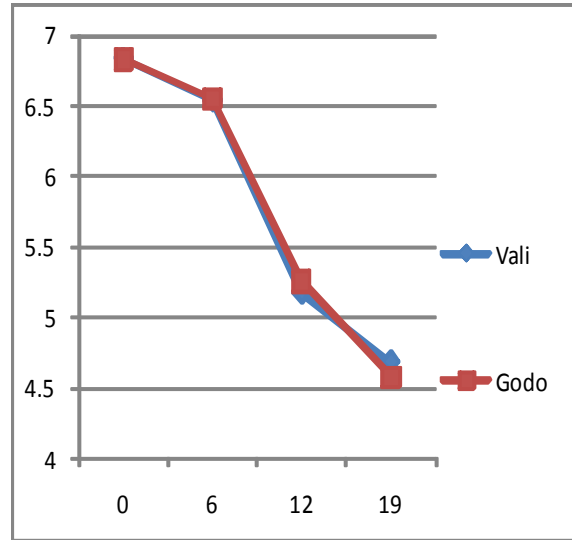


Fig. 1.3.9 *S. thermophilus* 배양액의 pH 변화

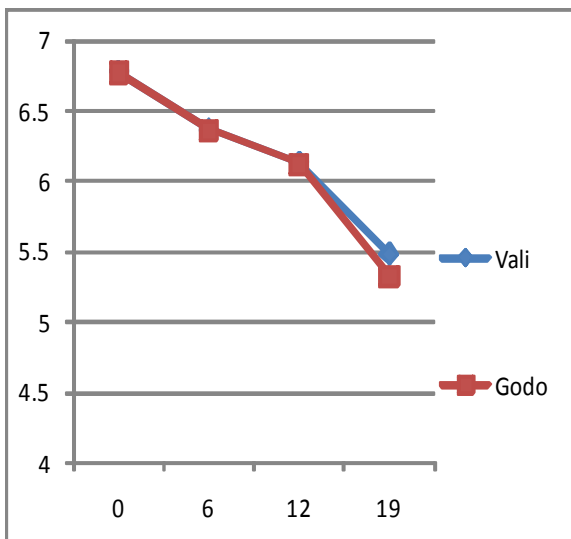


Fig. 1.3.10 *B. infantis* 배양액의 pH 변화



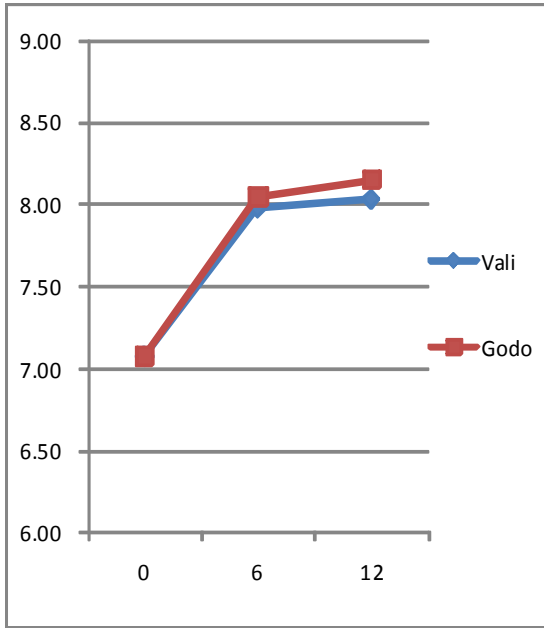


Fig. 1.3.11 *L. acidophilus* 배양액의 생균수 변화

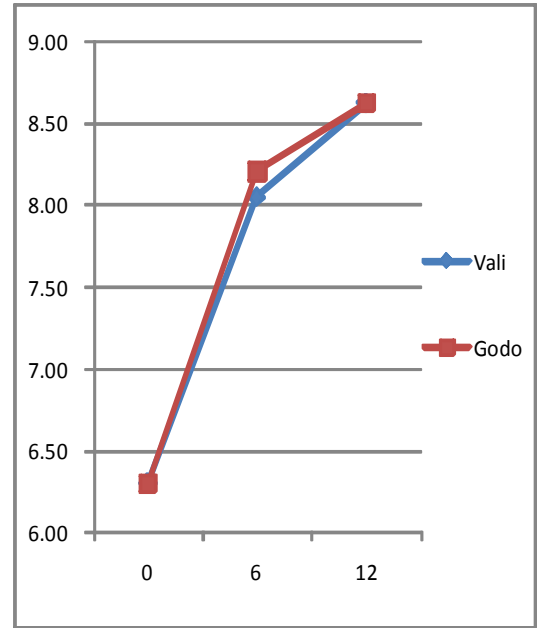


Fig. 1.3.12 *S. thermophilus* 배양액의 생균수 변화

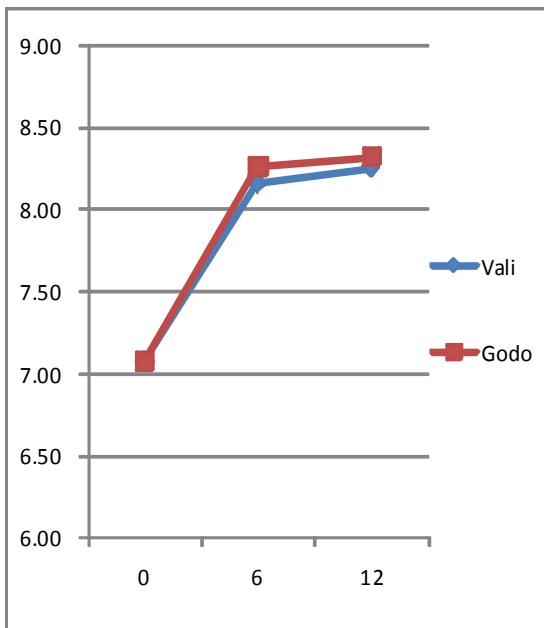


Fig. 1.3.13 *B. infantis* 배양액의 생균수 변화

Fig. 1.3.8 ~ Fig. 1.3.13에서 보는 바와 같이 두 종류의 Lactase는 특성이 유사하고, pH의 경시변화와 생균수에 있어서 큰 차이를 보이지 않아서 Validase사의 Lactase로 추후 시험을 진행하였음.

(다) 타 Growth promotion 물질과의 비교 평가

미생물 생육촉진물질로 널리 사용되고 있는 효모엑기스와 펩톤을 효소분해 유청농축액과 비교하기 위하여 단백분해효소 및 Lactase효소 시험과 동일한 방법으로 시험하였음.

㉞ 시료의 조제

- 배양액 조성 : 우유 92%, 설탕 3%, 유청효소분해액(E)/효모엑기스액(Y)/펩톤용액(P) 5%

- 배양 온도 : 37°C

- 배양 시간 : 6, 12, 19hr.

- 유산균 스타터 종류 : *L. acidophilus* LAFTI L10 (DSM)

*S. thermophilus* ST-BODY-1 (CHR. HANSEN)

*B. infantis* BI 710 (MARSHAL)

Table 1.3.8 유청효소분해액 및 비교 시료의 조성

원료 / 시료	유청효소분해액(E)	효모엑기스액(Y)	펩톤용액(P)
Flavouzyme	0.09%		
Validase 60	0.09%		0.09%
효모엑기스 분말		4%	
펩톤 분말			4%

㉞ 배양 시험 결과

유청분해효소액을 첨가한 배양액을 다른 물질 첨가한 배양액과 pH와 생균수를 비교평가한 결과는 다음과 같았음.

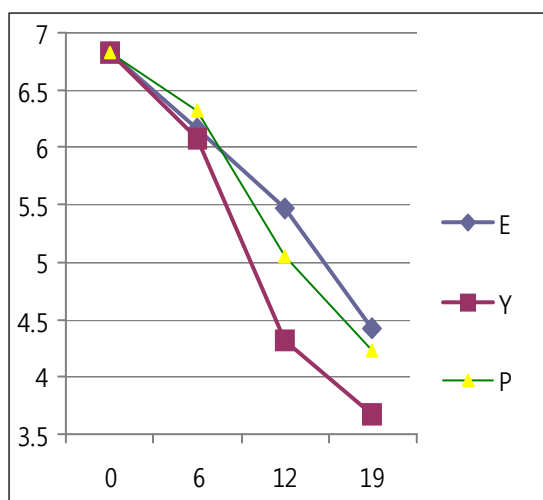


Fig.14 *L. acidophilus* 배양액의 pH 변화

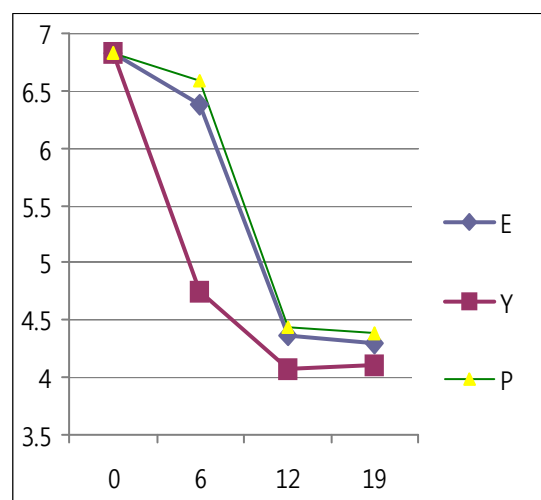


Fig.15 *S. thermophilus* 배양액의 pH 변화

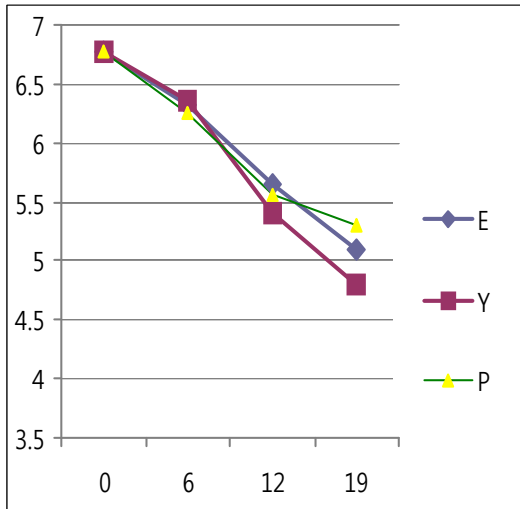


Fig. 1.3.16 *B. infantis* 배양액의 pH 변화

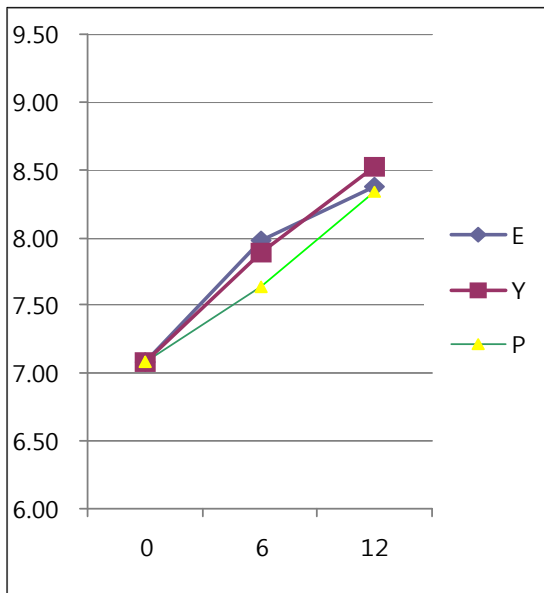


Fig. 1.3.17 *L. acidophilus* 배양액의 생균수 변화

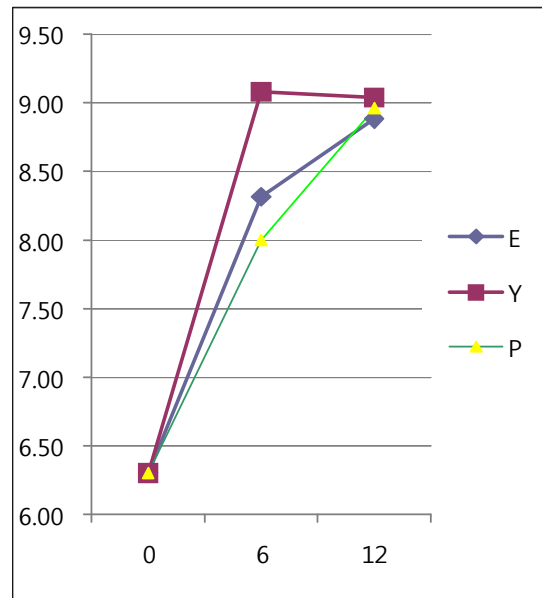


Fig. 1.3.18 *S. thermophilus* 배양액의 생균수 변화

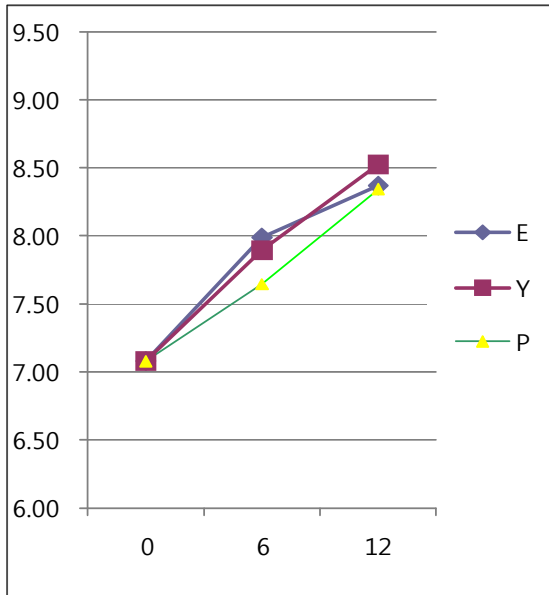


Fig. 1.3.19 *B.infantis* 배양액의 생균수 변화

Fig. 1.3.14 ~ Fig. 1.3.18에서 보는 바와 같이 효모엑기스액을 첨가한 배양액(Y)가 다른 두 시료에 비하여 압도적으로 생육촉진효과가 높았으며, 유청효분해액(E) 시료와 펩톤용액(P) 시료는 거의 유사한 경향을 보였음. 그런데 실제적으로 효모엑기스는 맛에 영향을 주기 때문에 요구르트 제조 시 고형물 기준으로 0.2% 첨가하는 것은 어려움이 있어서 추후 이 보다 대폭 낮추어 비교하는 것이 필요할 것으로 보임.

#### (라) 요구르트 발효 촉진 효과

타 Growth Promotion 물질과 동일한 배양액 조성으로 요구르트용 균주인 ABT-G(미국 Culture Systems)를 사용하여 요구르트 배양액을 제조하여 평가한 결과는 Fig. 1.3.20 ~ Fig. 1.3.21과 같음.

탈지분유 30% 용액을 우유에 5% 첨가한 배양액(SKMP)의 pH가 가장 천천히 떨어졌으며, 효모엑기스 4% 용액을 5% 첨가한 배양액(Y)의 pH가 가장 빨리 떨어졌고, 뒤를 이어서 효소분해 유청농축액(Enz)이 그 다음 빨리 떨어졌음. 그리고 Y와 Enz는 6시간 후 pH 4.5~4.8를 나타내서 SKMP의 5.46에 비하여 큰 폭의 발효 촉진 효과를 보임.

요구르트 발효액의 유산균 생균수는 SKMP의 경우 12시간 발효 후 9억5천만균이었는데 비해 Enz는 16억2천만균, Y는 21억3천만을 각각 나타냄. 산진전속도와 유산균 생균수를 종합하여 볼 때 효소분해 유청농축액은 탈지분유와 효모엑기스의 중간 정도의 발효 촉진 효과가 있었고, 탈지분유보다 1.6배 높은 생균수를 나타내어 발효촉진물질로서 가치가 있다고 판단되었음. 효모엑기스를 실제 사용가능한 수준으로 낮출 경우에는 유청효소

분해액과 비슷한 경향을 보일 것으로 예상됨.

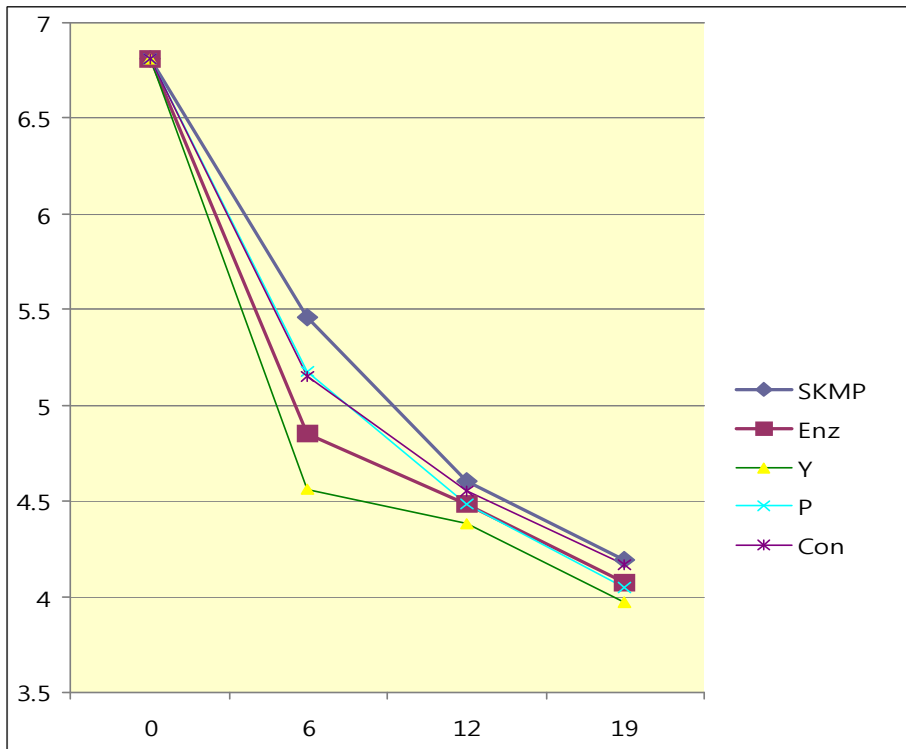


Fig. 1.3.20 ABT-G배양액의 pH 변화

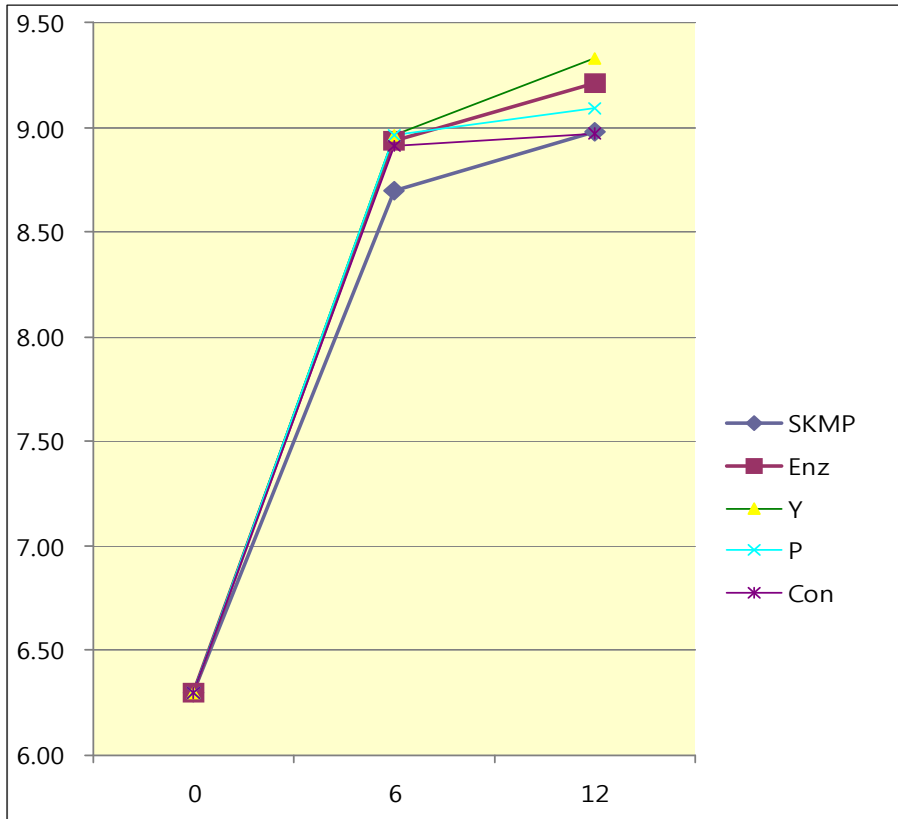


Fig. 1.3.21 ABT-G배양액의 생균수 변화

마. 유청으로부터 유산균 생육촉진물질의 제조공정

유청 원료로부터 효소분해를 통하여 시료를 준비하여 몇 종류의 유산균에 대한 생육촉진효과를 pH저하력과 생균수를 분석 평가하여 효과를 확인하였고, 이를 바탕으로 다음과 같이 생육촉진물질의 제조공정을 확립하였음.

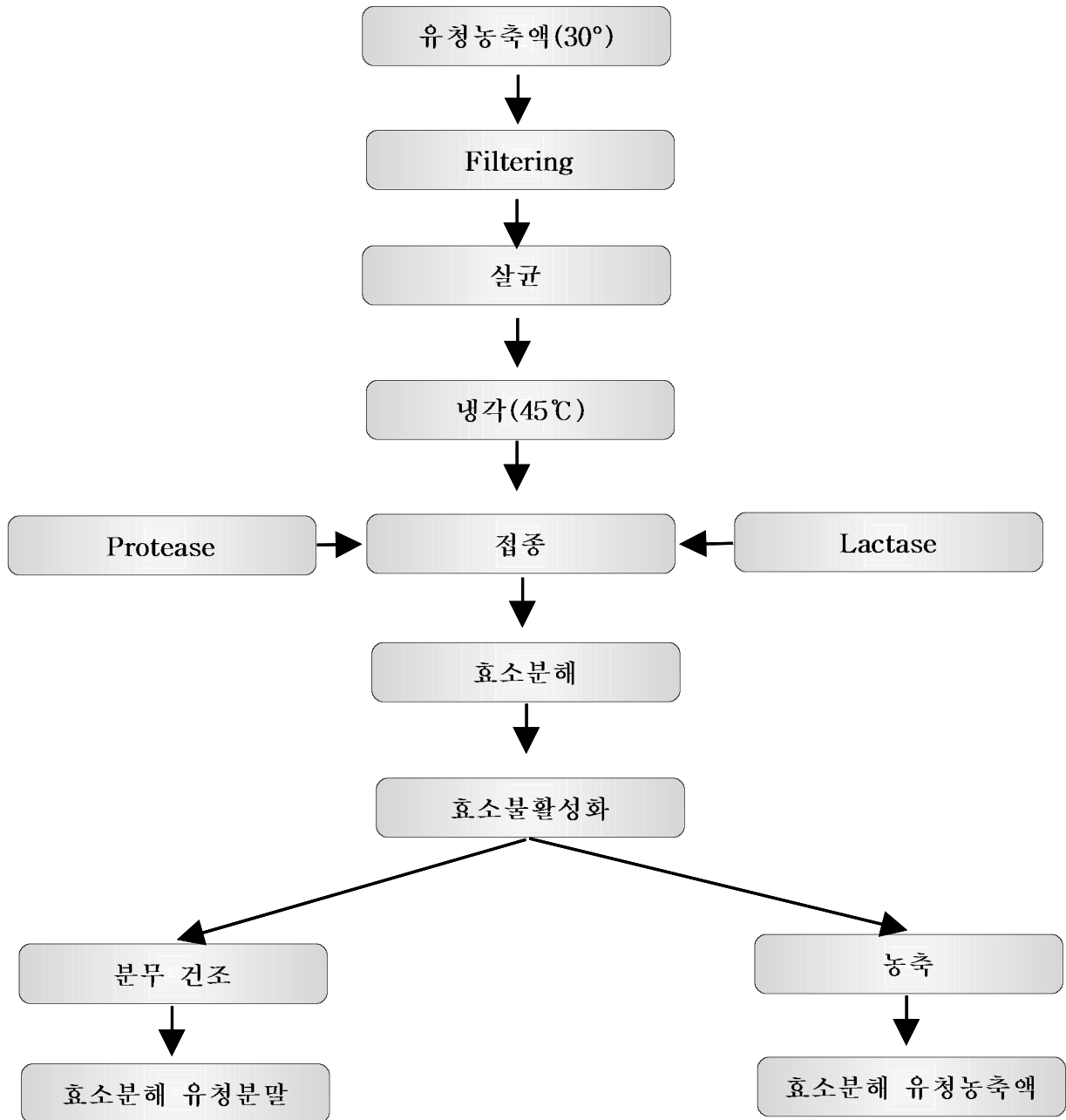


Fig. 1.3.22 유청의 생육촉진물질 제조공정도

## 제 2 절 제 2년차 연구개발수행 내용 및 결과

### 1. 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1. 효소처리 및 유산균 발효에 의한 갈락토올리고당(GOS) 생산	1. 이론적 접근방법 : 효소 및 유산균에 의한 갈락토올리고당(GOS) 생산 조건 확립 2. 실험적 접근방법 : 효소 및 유산균의 lactase에 의한 활성 측정 및 생산 조건 확립	1. 유청배지에 효소를 처리한 후 40℃, 45℃, 50℃에서 갈락토올리고당(GOS) 생산 확인 2. 유청배지에 효소를 100 μl, 200 μl, 300 μl, 400 μl, 500 μl 처리하여 갈락토올리고당 (GOS) 생산 확인 3. 유산균 유래의 lactase 를 ONPG 실험법을 이용하여 활성 측정 후 최적 유산균 선발 4. 유산균 유래 lactase를 유청배지에 첨가한 후 30℃, 35℃, 40℃, 45℃에서 갈락토올리고당(GOS) 생산 수율 확인
2. 효소 고정화법에 의한 갈락토올리고당(GOS)의 생산 수율 향상 및 발효 제어 연구	1. 이론적 접근방법 : 효소를 고정화하여 갈락토올리고당(GOS) 생산 조건 확립 2. 실험적 접근방법 : alginate와 CaCl <sub>2</sub> 를 이용하여 lactase를 고정화하여 갈락토올리고당(GOS) 생산	1. External gelation법을 사용하여 1%, 1.5%, 2% alginate와 다른 식용코팅물질을 사용하여 캡슐 제조하고 최적 조건 검토 2. 효소를 고정화를 통한 갈락토올리고당(GOS)을 생산 수율 향상 조건 검토
3. 유청 단백질 및 가수분해물의 엘러지 저해 인자 효과	1. RBL-2H3 세포를 이용한 유청단백질 가수분해물의 엘러지 저해인자 효과 - RBL-2H3 세포 준비 - 각 농도별 저해기능	1. 유청단백질의 가수분해물 준비 - W.A.(Alcalase - Protex) - W.N.(Neutrase - Protex) - W.P.(Pancreatin-trypsin) 2. RBL-2H3 세포를 이용한 각 시료의 농도 별 저해 기능 - 10μg/mL, 1μg/mL



4. 유청 단백질인 락토페린의 염증 억제 기능	유청단백질인 락토페린의 염증 관련 기능 효과 - U937 세포를 이용 - Mutz-3 세포를 이용 - NK-92 세포를 이용	1. 락토페린의 생리적 기능 연구 - U937 세포를 이용한 면역 유전자 발현 조사 - Mutz-3 세포를 이용한 면역 유전자 발현 조사 - NK-92 세포를 이용한 면역 유전자 발현 조사
5. 발효 제품 첨가제 완성	1. 효소분해 유청농축액을 진공건 조하여 분말 제조  2. 기존 Growth Promoter로 알려진 소재와 혼합사용하여 관능적 평가와 미생물검사에 의한 증식 효과 평가  3. 액상요구르트 및 호상요구르트, 치즈 배양시 개발된 원료를 첨가하여 배양시간단축과 유산균 증식 정도를 평가	1. 1차년도 기 선발한 Protease와 Lactase로 유청농축액을 가수분해하고 이를 진공건조하여 분말제조  2. 증식촉진제로서 peptone 과 yeast extract를 효소분해유청분말과 혼합 시 관능적으로 문제되지 않는 배합을 결정, 이 배합 전후로 하여 유산균 종류별로 배양 시의 시너지 효과 검증  3. 제품에의 응용 실험을 위하여 액상요구르트와 호상요구르트, 치즈의 제조에 단계별로 첨가한 그룹간에 배양시간과 유산균수를 비교 평가

## 2. 세부연구수행 결과

### 가. 제 1세부 과제

#### (1) 효소처리 및 유산균 발효에 의한 갈락토올리고당(GOS) 생산

(가) 유청배지에 lactase효소를 처리한 후 온도별(40℃, 45℃, 50℃)에서 갈락토올리고당(GOS) 생산을 위한 최적조건 및 첨가량별 갈락토올리고당(GOS) 생산 조건

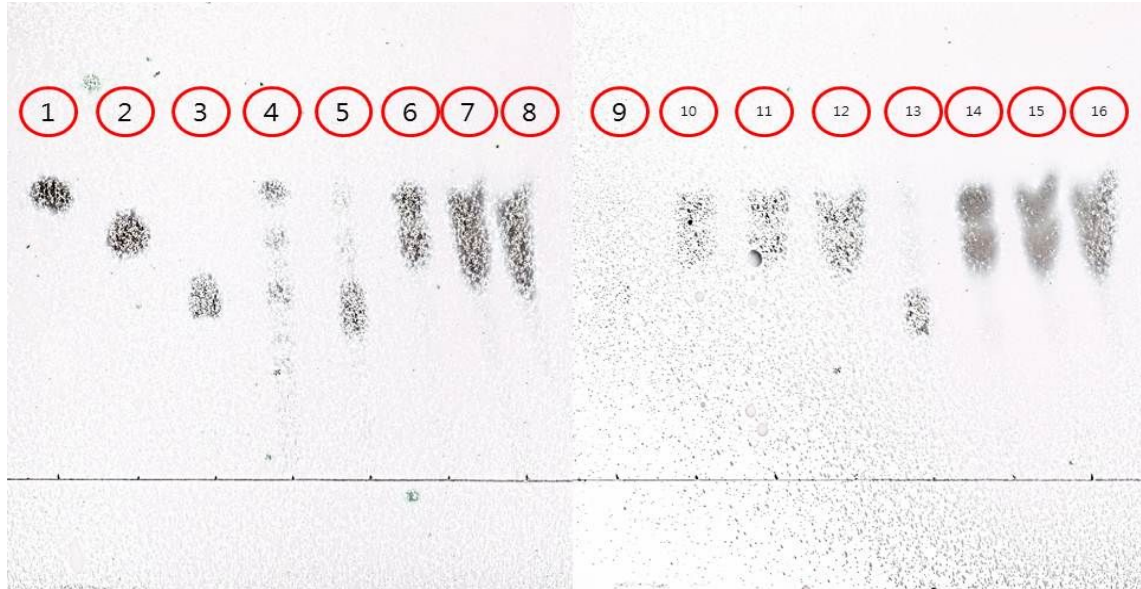


Fig. 2.1.1. TLC를 이용한 시판 lactase의 온도 및 농도별 갈락토올리고당(GOS) 생산

1. glucose, 2. galactose, 3. lactose, 4. (GOS)galactooligosaccharide,
5. 유청배지+D.W.(40°C), 6. 유청배지+lactase 100  $\mu$ l(40°C),
7. 유청배지+lactase 200  $\mu$ l(40°C), 8. 유청배지+lactase 300  $\mu$ l(40°C),
9. 유청배지+D.W.(45°C), 10. 유청배지+lactase 100  $\mu$ l(45°C),
11. 유청배지+lactase 200  $\mu$ l(45°C), 12. 유청배지+lactase 300  $\mu$ l(45°C),
13. 유청배지+D.W.(50°C), 14. 유청배지+lactase 100  $\mu$ l(50°C),
15. 유청배지+lactase 200  $\mu$ l(50°C), 16. 유청배지+lactase 300  $\mu$ l(50°C),

위의 Fig. 2.1.1은 유청배지에 시판 상업용 효소 Lactozyme 3000을 100  $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 300  $\mu$ l 넣고 온도별(40°C, 45°C, 50°C)로 갈락토 올리고당의 최적조건을 찾기 위한 실험이다. 그 결과 온도와 농도에 상관없이 갈락토올리고당(GOS)이 생겼다. 또한 50°C의 조건에서 조금 더 뚜렷하게 갈락토올리고당(GOS)을 확인이 가능하였다.

(나) 유산균 유래의 lactase에 대한 ONPG test를 이용한 최적 유산균 선발

Table 2.1.1. 공시 유산균 및 효모 균체에 대한 lactase 활성 screening 실험<sup>1)</sup>

LAB strains		+/-	LAB strains		+/-
A	<i>L. rhamnosus</i>	-	I	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-
B	<i>L. brevis</i>	+	J	<i>Weissella kimchii</i>	-
C	<i>L. confusus</i>	+	K	<i>L. helveticus</i>	+
D	<i>L. reuteri</i>	+	L	<i>L. paracasei</i>	+
E	<i>L. delbrueckii</i>	+	M	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 12028	+
F	<i>L. acidophilus</i>	+	N	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SD1	-
G	<i>L. plantarum</i>	+	O	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MG3	-
H	<i>Lc. lactis</i>	-	P	Control(D.W.)	-

<sup>1)</sup> ONPG disc method was used. + : positive, - : negative.

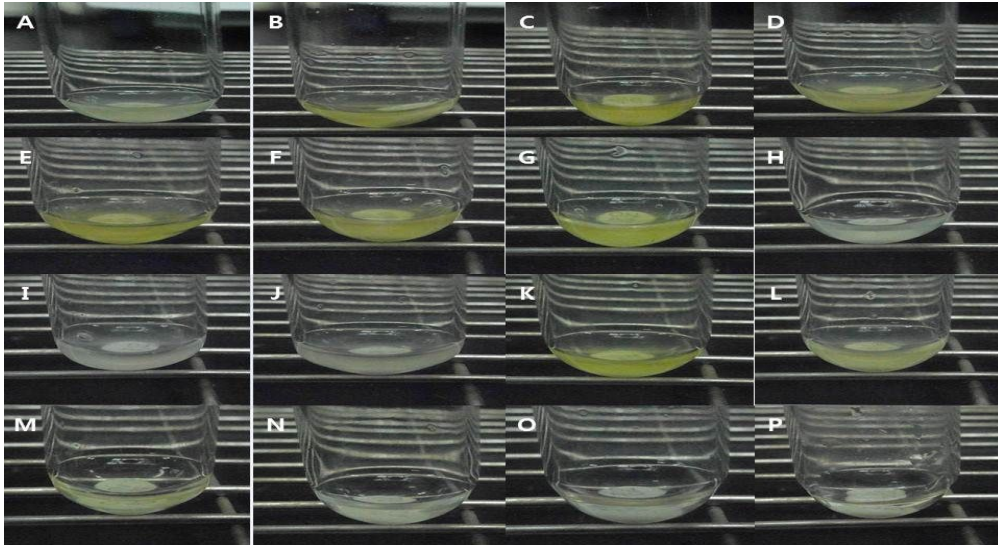


Fig. 2.1.2. 유산균 및 효모 균종별 lactase 활성 유무 측정(ONPG disc법)

Table 2.1.2. 유청배지 배양여액의 lactase활성 screening 실험<sup>1)</sup>

LAB strains	+/-	LAB strains	+/-
<i>L. rhamnosus</i>	-	<i>Leuconostoc mesenteriodes</i>	-
<i>L. brevis</i>	-	<i>Weissella kimchii</i>	-
<i>L. confusus</i>	-	<i>L. helveticus</i>	-
<i>L. reuteri</i>	-	<i>L. paracasei</i>	-
<i>L. delbrueckii</i>	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 12028	-
<i>L. acidophilus</i>	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SD1	-
<i>L. plantarum</i>	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MG3	-
<i>Lc. lactis</i>	-	Control (D.W.)	-

<sup>1)</sup> ONPG disc method was used. + : positive, - : negative.

위의 Table 2.1.1와 Fig. 2.1.2는 유산균과 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 표준균주, 실험실에서 분리한 효모를 이용하여 ONPG disc를 통한 lactase활성을 4시간동안 측정된 실험이다. 12종 유산균 및 3주의 *Saccharomyces cerevisiae* 에 대한 lactase 활성을 screening 한 결과, 유산균 중에서는 *L. rhamnosus*, *Lc. lactis*, *Leuconostoc mesenteriodes*, *Weissella kimchii* 가 검출되지 않을 정도로 매우 낮았고, 효모 중에서는 실험실 분리균주인 *Saccharomyces cerevisiae* SD1, *Saccharomyces cerevisiae* MG3 균주가 낮은 활성을 보였다. 이 실험 결과에서 유산균 중 일부 균주와 효모 중 표준균주에서 lactase 활성이 양성(positive)으로 나타나는 것을 볼 수 있는데, 모두 pellet을 통한 실험에서 나타난 것으로 유산균과 효모의 lactase는 세포 외부로 배출하는 것이 아니라 세포내 효소인 것으로 생각되었다. 따라서 세포외 효소를 거의 생산하지 않으므로 균체 고정화 실험은 생략하였다. 위 결과를 토대로 현재 시판 요구르트 스타터로 사용되는 4종의 probiotics 유산균주(*L. acidophilus*, *Lc. lactis*, *L. helveticus*, *L. paracasei*)를 임의로 선택하여 효소 활성을 상호비교 하였다.

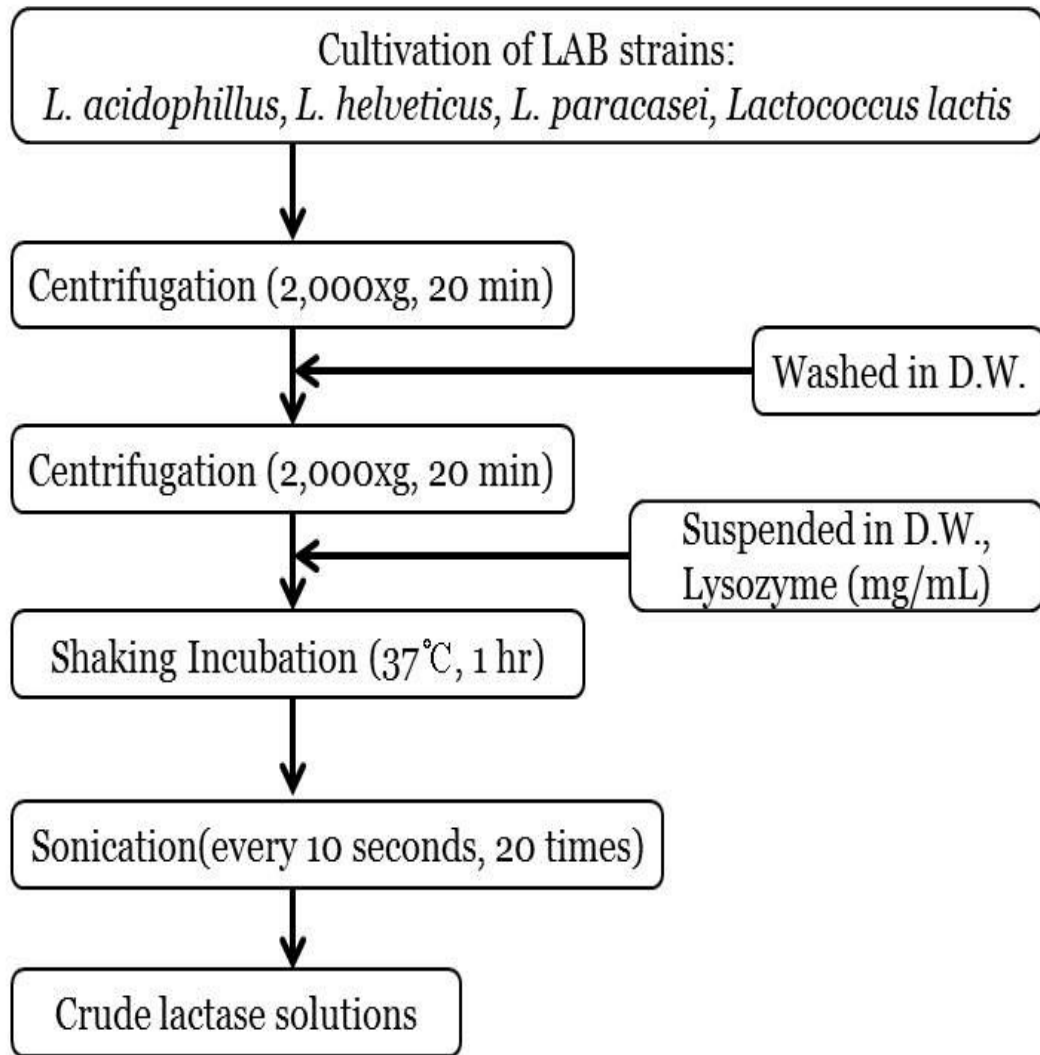


Fig. 2.1.3. Preparation of crude lactase solutions

위의 Fig. 2.1.3은 유산균을 25 mL 대량 배양하고 2회 원심분리하여 얻은 pellet을 lysozyme 처리 후 sonication 하여 세포를 파쇄하여 유산균 유래 lactase 조효소액을 생산하는 그림이다.

Table 2.1.3. 시판 요구르트용 스타터 균주의 lactase활성 비교

공시균주	<i>L. acidophilus</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. paracasei</i>	Lactozyme 3000 <sup>1)</sup>
OD value <sup>*)</sup>	0.357	0.167	0.794	1.594	1.800

\*<sup>1)</sup> OD was determined at 405nm by using ONPG test.

<sup>1)</sup> Lactozyme 3000 is a commercial lactase of Novozyme.

위의 Table 2.1.3은 선별한 유산균주와 시판 lactase의 활성을 비교한 실험이다. 유산균 유래의 조효소액 500  $\mu$ l에 phospahte buffer(pH 6.5)를 1.4 mL, 20 mM ONPG를 100  $\mu$ l 첨가하여 40 $^{\circ}$ C, 30min 간 처리한 후 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200  $\mu$ l, boiling 하여 효소반응을 정지 시킨 후 spectrophotometer를 통해 405nm의 OD값을 측정된 결과 *L. paracasei*의 값이 가장 높은 것으로 나타났다. 또한 대조구로 시판 Lactozyme 3000을 100  $\mu$ l의 첨가하여 측정된 결과 *L. paracasei*의 OD값보다 약간 높게 측정되었다.

Table 2.1.4. *L. paracasei*가 생산하는 lactase 활성에 대한 pH의 영향

OD value	pH			
	6.0	6.5	7.0	7.5
<i>L. paracasei</i> 조효소액	0.170	1.800	1.924	0.559
Lactozyme 3000 <sup>1)</sup>	2.164	1.796	1.788	1.796

\* OD was determined at 405 nm by using ONPG test.

<sup>1)</sup> Lactozyme 3000 is a commercial lactase of Novozyme.

위의 Table 2.1.4는 선별한 유산균주와 시판 lactase의 buffer를 pH 변화에 따른 효소활성을 ONPG 법으로 측정된 결과이다. 유산균 조효소액의 최적 pH는 6.5~7.0 정도로 나타났다. 유산균이 생성하는 lactase는 낮은 pH보다 중성 pH에서 높은 효소활성을 가지고 있었다. 또한 시판 효모 유래 lactase는 pH 6.0부터 7.5까지 넓은 범위에서도 최대 활성을 유지하였다.

Table 2.1.5. *L. paracasei*가 생산하는 lactase 활성에 대한 온도의 영향

온도( $^{\circ}$ C)	20	25	30	35	40
OD value <sup>*)</sup>	0.338	0.711	1.872	1.854	1.722

\* OD was determined at 405 nm by using ONPG test.

위의 Table 2.1.5는 *L. paracasei* 유래의 lactase의 온도에 대한 활성을 ONPG법으로 측정된 결과이다. *L. paracasei* 유래의 lactase는 최적 온도는 30 $^{\circ}$ C 정도로 나타났다. *L. paracasei*는 중온성균이기 때문에 이 유산균 유래의 lactase 또한 30 $^{\circ}$ C 정도에서 높은 효소활성을 가지고 있었다.

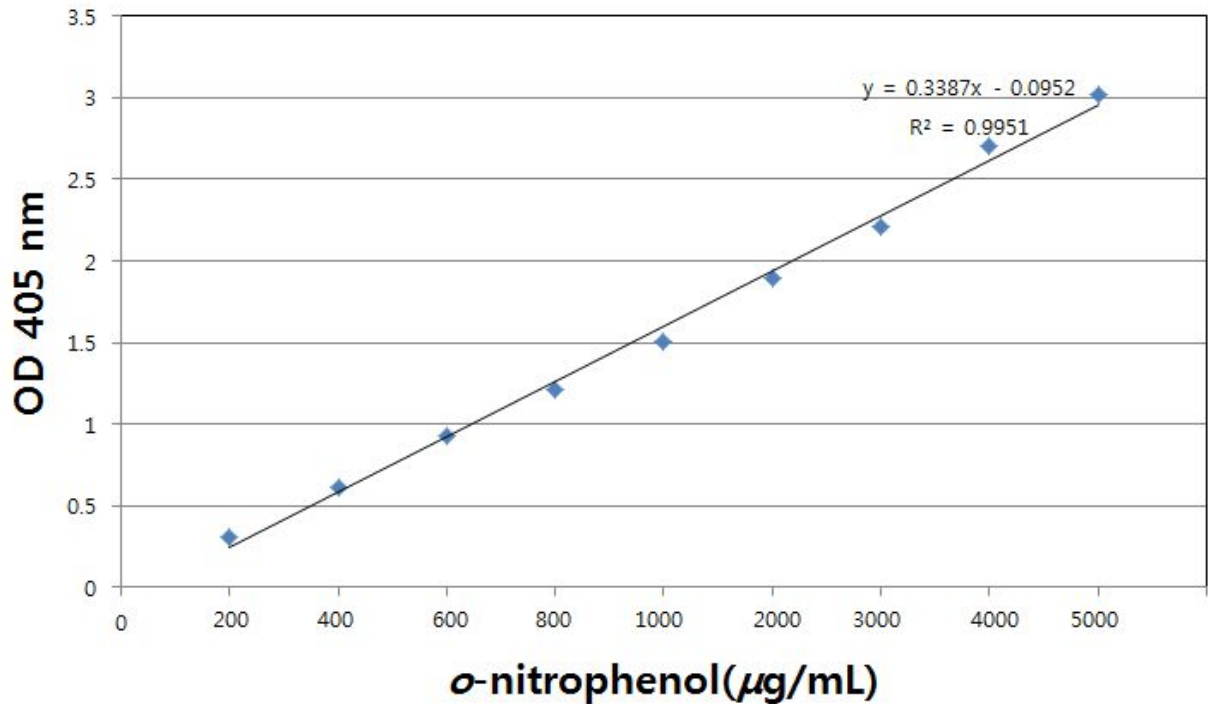


Fig. 2.1.4. o-Nitrophenol의 standard curve 작성

o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(ONPG, Sigma)로부터 유리되는 o-Nitrophenol의 양을 측정하였다. 효소액 0.5 mL 와 100 mM 인산염 완충액(pH 7.0)을 1.4 mL 빈 시험관에 넣고 혼합한 다음 20 mM ONPG 용액 0.1 mL를 재빨리 가하여 혼합한 후 30°C water bath 중에서 10분간 반응시켰다. 10분 후 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.2 mL을 가하여 반응을 중지시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 1 U는 반응시간 분당 ONPG로부터 생성되는 o-nitrophenol의 µmole 수로 정의하였다. 이를 통하여 *L. paracasei* 유래의 lactase의 효소 활성은 4000 U으로 계산하였다.

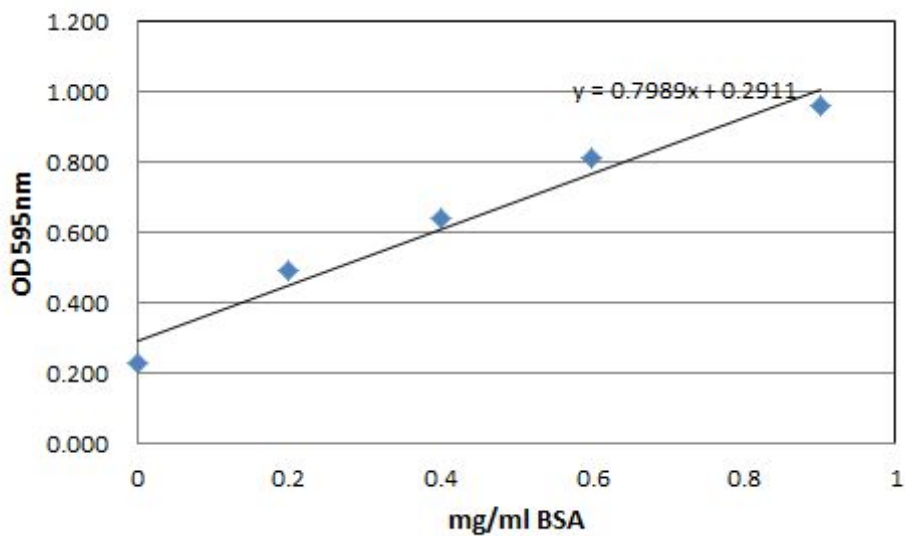


Fig. 2.1.5. Bradford법을 통해 측정한 단백질 표준곡선

위의 Fig. 2.1.5는 Bovine serum albumin을 이용하여 1 mL당 1 mg의 BSA가 함유되도록 stock solution을 제조하였다. Dye용액은 증류수와 1:4의 비율로 희석하고, 여과지로 여과하여 사용하였다. BSA 표준용액은 농도별로 준비하여 dye용액을 혼합하고 상온에서 10분간 방치 후, 595 nm로 OD값을 측정한 결과이다. 시료는 희석하지 않은 상태로 dye와 혼합하고 동일하게 상온에서 10분간 방치 후, 595 nm에서 OD값을 측정하여 시료내의 단백질 함량을 작성한 BSA 표준곡선의 의하여 계산한 값은 5.1 mg/mL 였다. 앞의 ONP 표준곡선을 통하여 효소활성을 구한 값과 BSA 표준곡선을 통하여 구한 단백질의 함량을 토대로 *L. paracasei* 유래의 lactase 조효소액의 비활성은 800 U/protein, mg으로 측정되었다.

(다) *L. paracasei* 유래 lactase의 갈락토올리고당(GOS) 생산

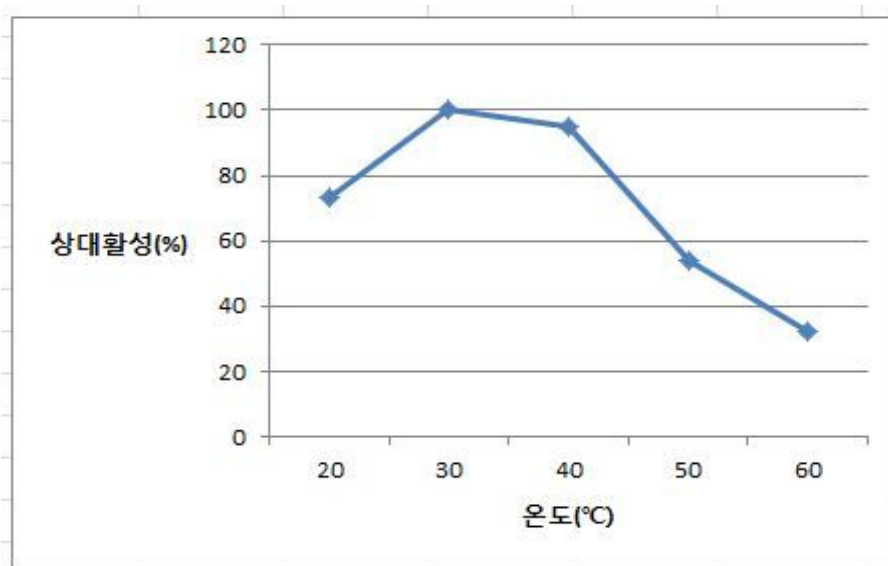


Fig. 2.1.6. *L.paracasei* 유래 lactase의 온도별 활성 변화

위의 Fig. 2.1.6은 *L. paracasei* 유래의 lactase의 최적 온도를 알아보기 위한 실험으로 효소는 30°C에서 최대 효소활성을 나타냈으며, 40°C에서도 상당히 높은 활성을 유지하고 있었다. 그러나 50°C 이상의 온도에서는 급격하게 활성을 잃어 60°C에서 효소의 잔존 활성이 32% 이었다.

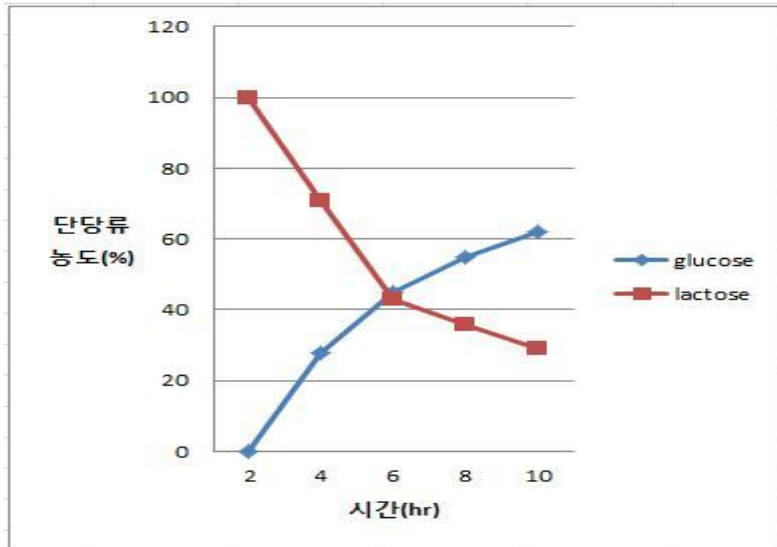


Fig. 2.1.7. *L.paracasei* 유래 lactase의 시간에 따른 당농도의 변화

위의 Fig. 2.1.7은 *L. paracasei* 유래의 lactase를 유당 용액(10%)에 넣고 시간변화에 따른 단당류의 농도의 변화를 glucose oxidase(GE)를 통하여 측정된 결과이다. 시간이 증가함에 따라 glucose의 농도가 증가하고, lactose의 농도는 감소하였다. 참고로 유당 농도가 높을수록 갈락토올리고당(GOS)의 생성량이 증가하는 것으로 알려져 있다.

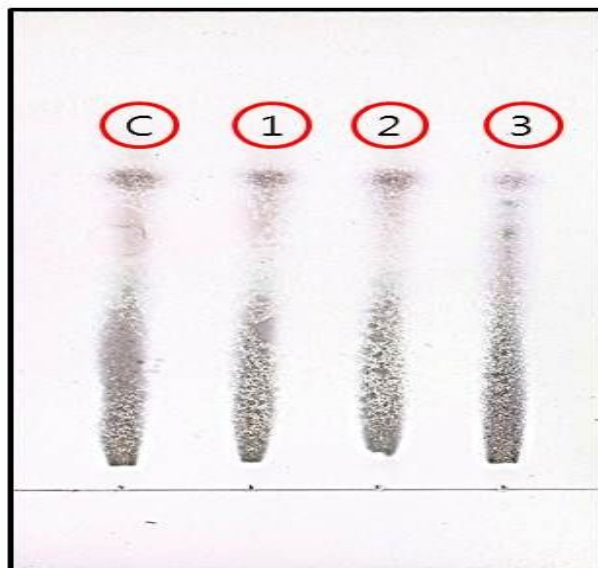


Fig. 2.1.8. TLC를 이용한 *L. paracasei* 조효소액의 갈락토올리고당(GOS) 생산 (30℃)

①~③; sample, C; D.W.

[전개용매 ; isopropanol : water = 4 : 1]



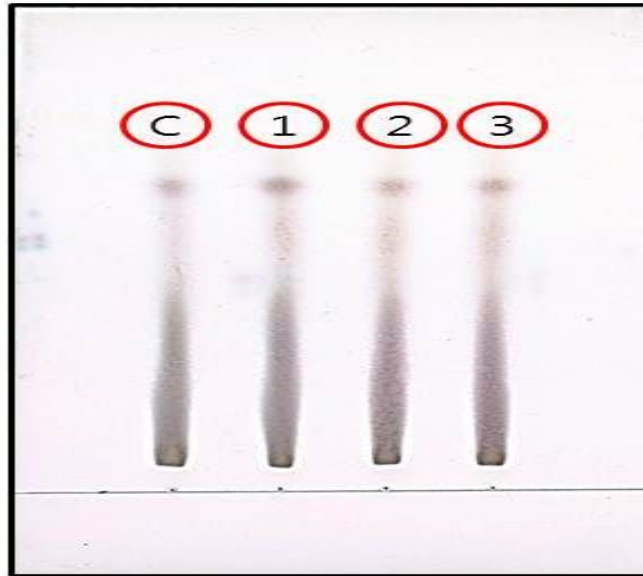


Fig. 2.1.9. TLC를 이용한 *L. paracasei* 조효소액의 갈락토올리고당(GOS) 생산 (35°C)  
 ①~③; sample, C; D.W.  
 [전개용매 ; isopropanol : water = 4 : 1]

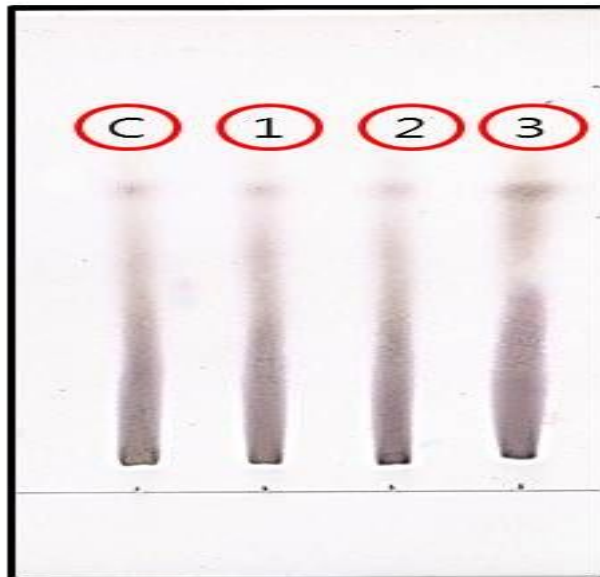


Fig. 2.1.10. TLC를 이용한 *L. paracasei* 조효소액의 갈락토올리고당(GOS) 생산 (40°C)  
 ①~③; sample, C; D.W.  
 [전개용매 ; isopropanol : water = 4 : 1]

위의 Fig. 2.1.8~2.1.10은 10% 유당 배지를 이용하여 *L. paracasei*균이 생산하는 lactase가 온도변화에 따라 갈락토올리고당(GOS)을 얼마나 생성하는가를 실험한 결과이다. 대조구는 유당배지에 증류수를 동량 첨가하여 실험을 한 결과, 조효소액과 갈락토올리고당(GOS)의 생성을 확인하기 어려웠다. TLC plate에 tailing이 심한 것은 당농도가 높기 때문에 생긴 것으로 판단하여 시료를 희석하여 추가 실험을 실시하였다.

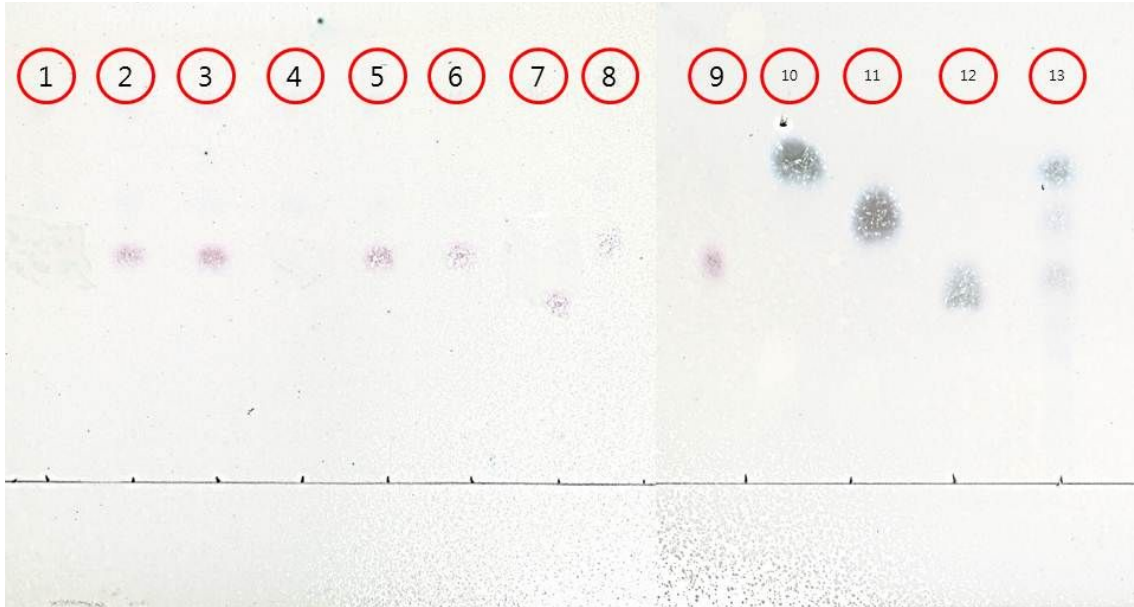


Fig. 2.1.11. TLC를 통한 *L. paracasei* 조효소액의 갈락토올리고당(GOS) 생성 확인  
 1. D.W.(30℃), 2. sample A(30℃), 3. sample B(30℃), 4. D.W.(35℃),  
 5. sample A(35℃), 6. sample B(35℃), 7. D.W.(40℃), 8. sample A(40℃),  
 9. sample B(40℃), 10. glucose, 11. galactose, 12. lactose, 13. GOS  
 [전개용매 ; isopropanol : water = 4 : 1]

위의 Fig. 2.1.11은 앞의 Fig. 2.1.8~2.1.10의 tailing을 해소하기 위해 유당배지에 조효소액을 첨가하여 만든 생산물을 16배 희석하여 TLC를 한 결과이다. 위의 그림과 같이 희석을 하면 tailing이 spot으로 나타나게 된다. 위의 실험에서 glucose의 Rf 값은 0.67, galactose의 Rf 값은 0.56, lactose의 Rf 값은 0.41로 나타난 반면 생산물의 spot의 Rf 값은 0.47로 galactose와 lactose의 Rf 값 사이 값으로 나타났다. 또한 여전히 Rf 값이 0.79인 spot이 희미하게 보이는 것을 확인하였다. 이것은 유당배지를 제조할 때 pH를 7.0으로 조절하기 위하여 사용한 phosphate buffer(pH 7.0)의 영향으로 추측되었다.

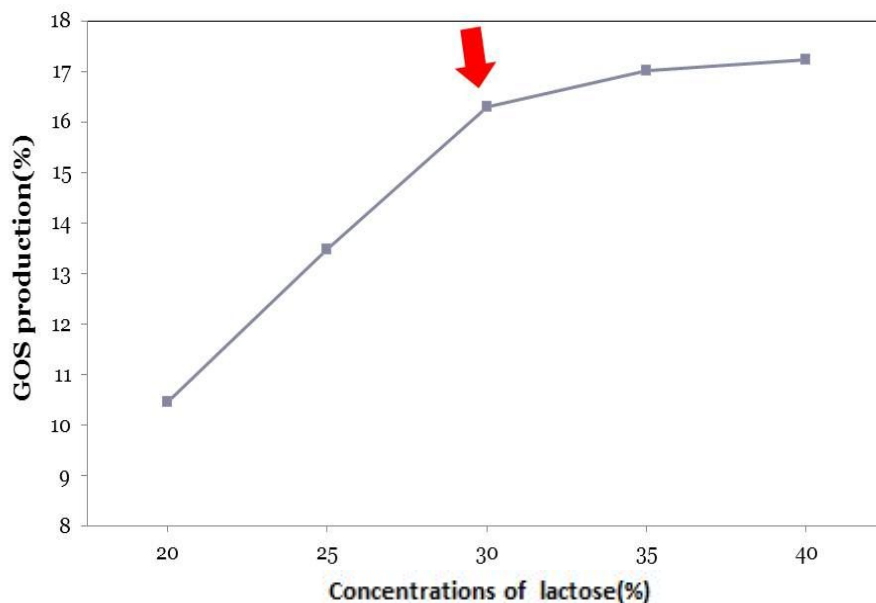


Fig. 2.1.12. 유당농도에 따른 갈락토올리고당(GOS)의 생산 효과

위의 Fig. 2.1.12는 분말유청의 유당 농도를 20~40%까지 5%단위로 하여 갈락토올리고당(GOS)의 생산을 확인한 결과이다. 30%까지 급격히 갈락토올리고당(GOS)의 생산이 증가하다 30%이후에는 완만하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 이를 통하여 유당의 농도는 30%가 가장 적당한 것으로 판단하였다.

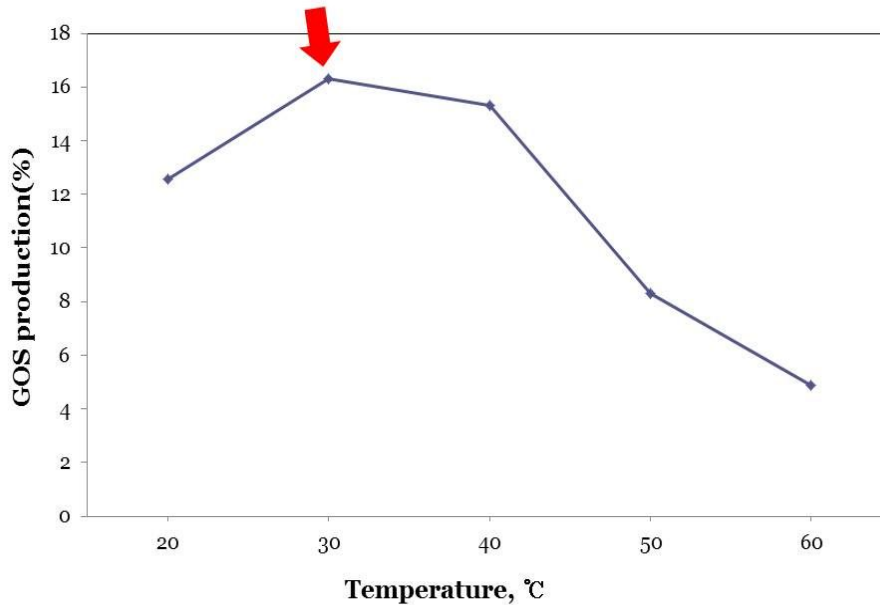


Fig. 2.1.13. 온도에 따른 갈락토올리고당(GOS)의 생산 효과

Fig. 2.1.13은 온도에 따른 갈락토올리고당(GOS)의 생산을 측정 한 결과이다. 앞의 *L. p aracasei* 유래의 lactase 조효소액의 ONPG실험의 결과와 같이 30°C에서 최적생산을 확인 할 수 있었다. 특히 50°C 이상의 온도에서는 갈락토올리고당(GOS)의 생산이 현저하게 감소하는 것을 알 수 있었는데 이는 *L. paracasei* 유래 조효소액의 변성되어 수율이 감소한 것으로 판단하였다.

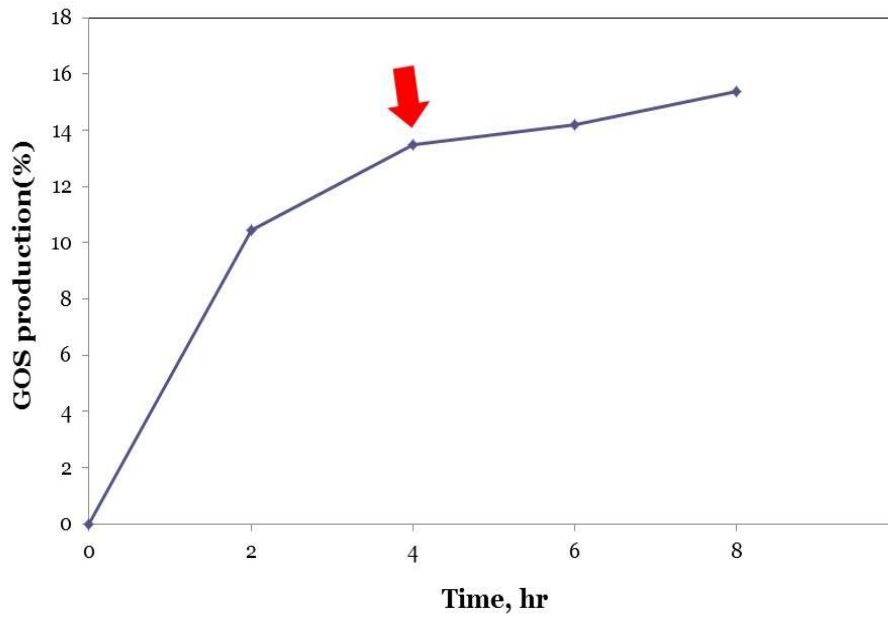


Fig. 2.1.14. 시간에 따른 갈락토올리고당(GOS)의 생산 효과

Fig. 2.1.14는 시간에 따른 갈락토올리고당(GOS)의 생산을 측정한 결과이다. 시간이 증가함에 따라 갈락토올리고당(GOS)의 생산 또한 증가하는 것을 알 수 있었으나 비용대비 수율이 가장 적절한 4시간을 최적생산 시간으로 택하였다.

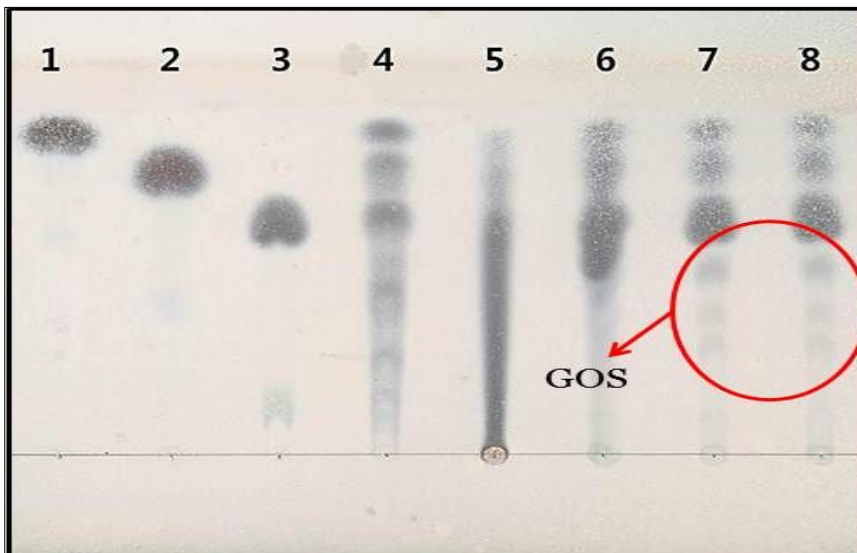


Fig. 2.1.15. TLC를 통한 *L. paracasei* 조효소액의 갈락토올리고당(GOS) 생성 확인

1. Glucose, 2. galactose, 3. lactose, 4 galactooligosaccharide(reference)
  5. sample(1/2), 6. sample(1/4), 7. sample(1/8), 8. sample(1/16)
- [전개용매 ; isopropanol : water = 4 : 1]

Fig. 2.1.15은 앞서 실험한 분말유청의 농도, 온도, 시간의 조건을 최적으로 하여 갈락토올리고당(GOS)의 생산을 TLC를 통하여 확인한 결과이다. 시료의 농도가 높아 1/8로 희

석한 시료부터 갈락토올리고당(GOS)의 생산을 확인 할 수 있었다.

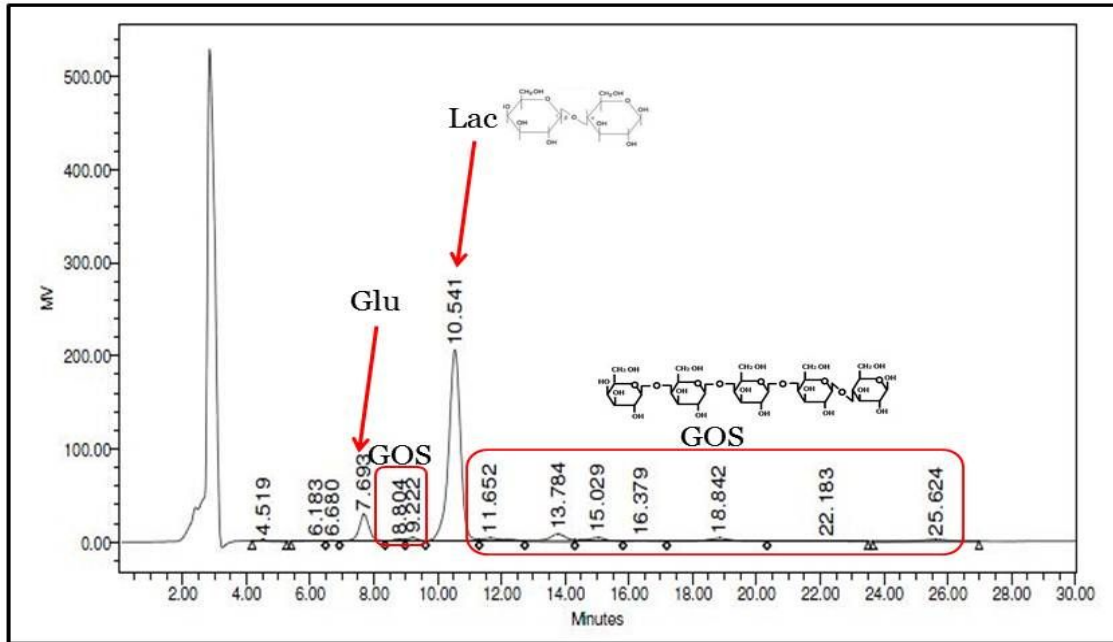


Fig. 2.1.16. HPLC를 통한 갈락토올리고당(GOS)의 정량

Fig. 2.1.16은 TLC를 통하여 확인한 시료를 HPLC를 사용하여 정량한 결과이다. 갈락토올리고당(GOS)은 한 가지의 물질이 아니고 여러 가지의 polymer를 묶어서 이르기 때문에 위의 그림과 같이 여러 개의 peak가 존재하는 것을 알 수 있었다.

Table 2.1.6. *L. paracasei* 유래 lactase에 의해 생산한 갈락토올리고당(GOS)의 정량

	Fru	Glu	GOS-DP2	Lac	GOS-DP3	4'-gala ctosyla ctose	6'-gala ctosyla ctose	GOS-DP4<	Total GOS
1	0.76	5.13	1.66	80.73	1.70	3.59	1.24	4.65	12.84
2	0.47	2.41	1.42	86.7	0	4.13	0.47	4.01	10.03
3	0.51	6.21	1.74	81.58	0.23	4.10	1.37	3.94	11.38
4	0.56	6.60	2.07	80.07	0	3.95	1.84	4.61	12.47
5	0	5.38	1.56	82.33	1.80	3.65	1.10	4.18	12.29
6	0	4.06	5.04	79.81	2.20	4.05	1.14	3.70	16.13
7	0	5.25	6.44	75.34	0	5.02	1.91	6.04	19.41
8	0	2.34	5.50	83.69	0	4.39	0.58	3.50	16.31
9	0.53	9.06	2.09	73.80	2.65	4.26	2.48	4.82	16.3
10	0.5	7.60	1.03	78.69	2.5	4.12	0.76	4.62	13.03
11	0.32	7.81	1.19	79.61	1.78	3.51	0.75	4.83	12.06
12	2.12	8.95	0.73	76.95	1.8	3.39	0.74	5.14	11.8

$$\text{Total GOS} = \text{GOS-DP2} + \text{GOS-DP3} + 4'\text{-galactosylactose} + 6'\text{-galactosylactose} + \text{GOS-DP4<}$$

Table 2.1.6은 *L. paracasei* 유래 lactase를 처리하여 생산한 갈락토올리고당(GOS)을 H

PLC를 통해 정량한 결과이다. 갈락토올리고당(GOS) 수율은 최대 19.41%정도 생산이 되었고, 평균적으로 14%의 갈락토올리고당(GOS)의 생산을 확인할 수 있었다.

(2) 효소 고정화법에 의한 갈락토올리고당(GOS)의 생산, 수율 향상 및 발효 제어 연구

(가) 코팅 물질 선별

Table 2.1.7. 코팅물질 배합비

샘플	코팅물질
1	1% Sodium alginate
2	1.5% Sodium alginate
3	2% Sodium alginate
4	1% Sodium alginate + 1% modified starch
5	1% Sodium alginate + 3% modified starch
6	1% Sodium alginate + 5% modified starch

Sodium alginate 용액을 만들기 위하여 60℃의 온도로 물중탕 하였고, Sodium alginate를 조금씩 넣어주며 magnetic bar로 교반하며 제조하였다.

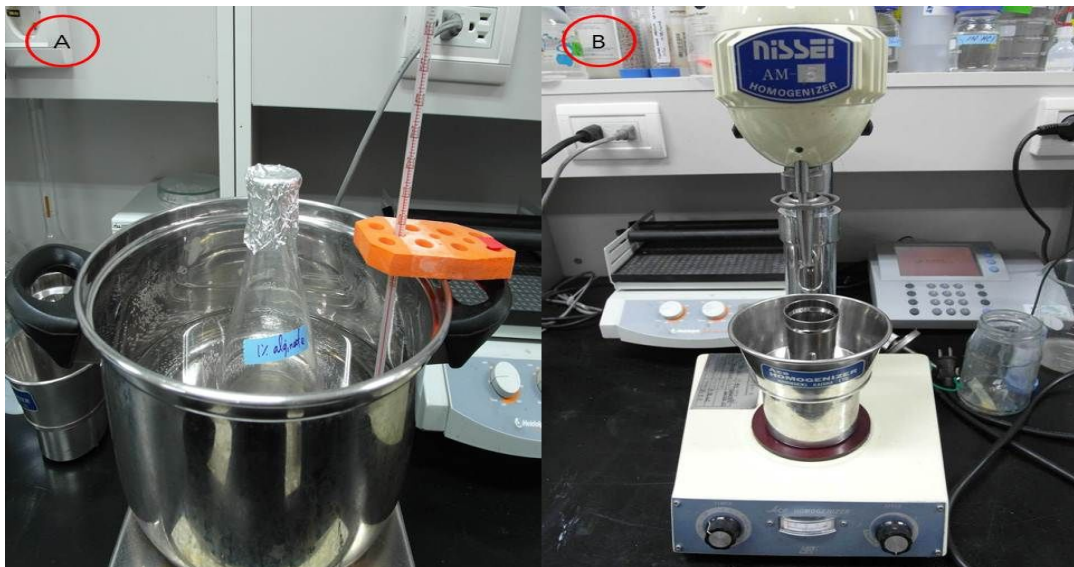


Fig. 2.1.17. Na-alginate 및 modified starch 코팅용액의 조제, 60℃(A);  
조효소액과 코팅 물질의 Homomixing, 40℃(B)

(나) 캡슐제조 실험

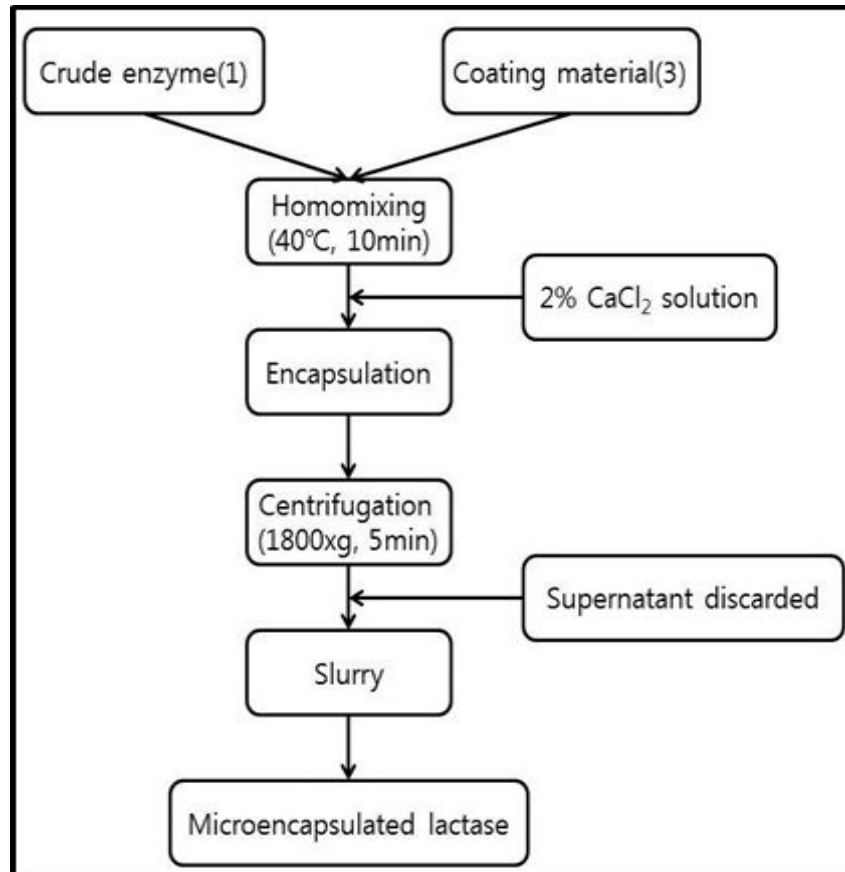


Fig. 2.1.18. External gelation법을 이용한 미세캡슐 제조 과정

(다) 코팅물질의 최적 배합비 선정



Fig. 2.1.19. 점도 측정, viscometer(Brookfield DV- II+) spindle No. 63, 100 rpm/10 sec.

코팅제는 예비실험을 통하여 5종의 hydrocolloid 물질 중에서 alginate와 modified starch를 선정하였고, 적절한 코팅물질의 배합비를 선정하기 위해 alginate 단독 또는 다른 코

팅물질과 배합하여 위의 Fig. 2.1.19과 같은 점도계(Brookfield DV-II+)를 사용하여 점도를 측정된 결과는 아래의 Table 2.1.7과 같다.

Table 2.1.8. 코팅물질의 농도에 따른 점도의 변화

배합 코팅물질	점도 (cP)
1% alginate	25.0
1.5% alginate	38.4
2% alginate	61.2
1% alginate + 1% modified starch	24.0
1% alginate + 3% modified starch	28.8
1% alginate + 5% modified starch	33.6

위의 Table 2.1.8을 보면 순수하게 alginate만 첨가하여 코팅물질을 제조한 것이 alginate에 modified starch를 첨가하여 제조한 코팅물질 보다 점도가 높게 나왔으며, Sodium alginate의 최적 농도는 1.5% 였고, 30°C에서 측정된 이것의 점도는 38.4 cP(mPa · s)이었다. 2% alginate의 경우에는 점도가 너무 높아 코팅물질로 사용하는데 어려움이 있을 것이라고 생각된다. 코팅물질과 조효소액의 혼합비율을 검토한 결과 코팅제의 양이 많을수록 효소 활성이 크게 감소하였으며, 그 비율은 1:3이 가장 적합한 것으로 나타났다.

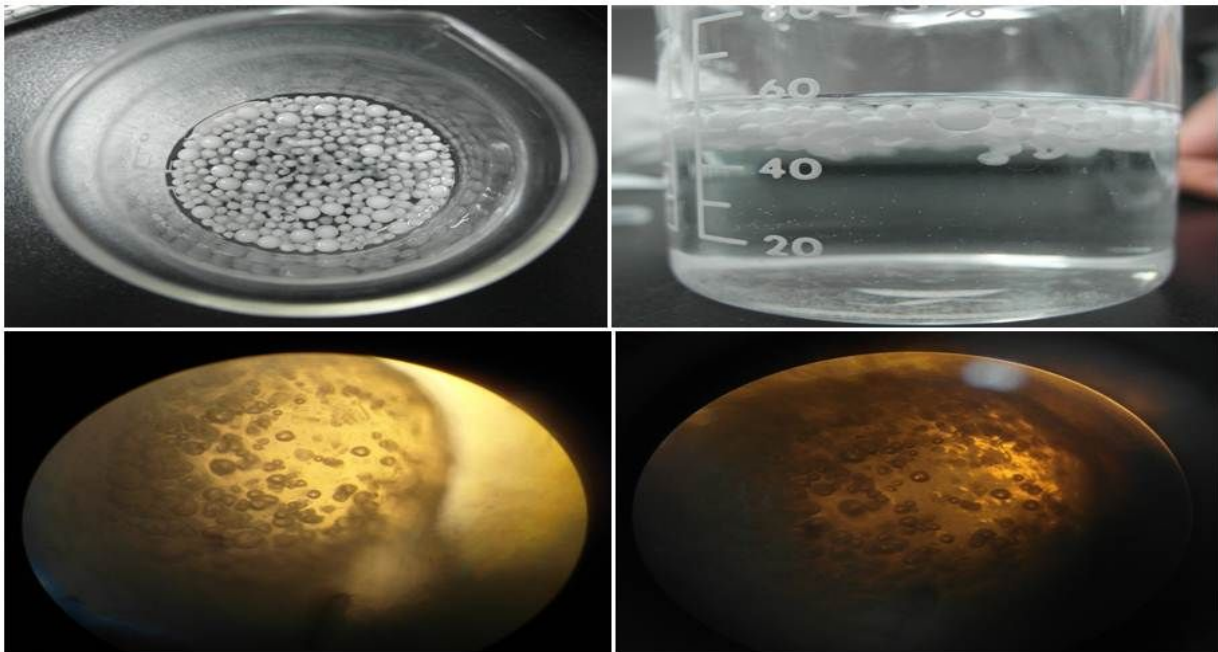


Fig. 2.1.20. *L. paracasei* 유래의 lactase 조효소액의 코팅

Fig. 2.1.20은 *L. paracasei* 유래의 lactase 조효소액을 1.5% sodium alginate로 코팅한



사진과 캡슐을 현미경을 통하여 확인한 사진이다.

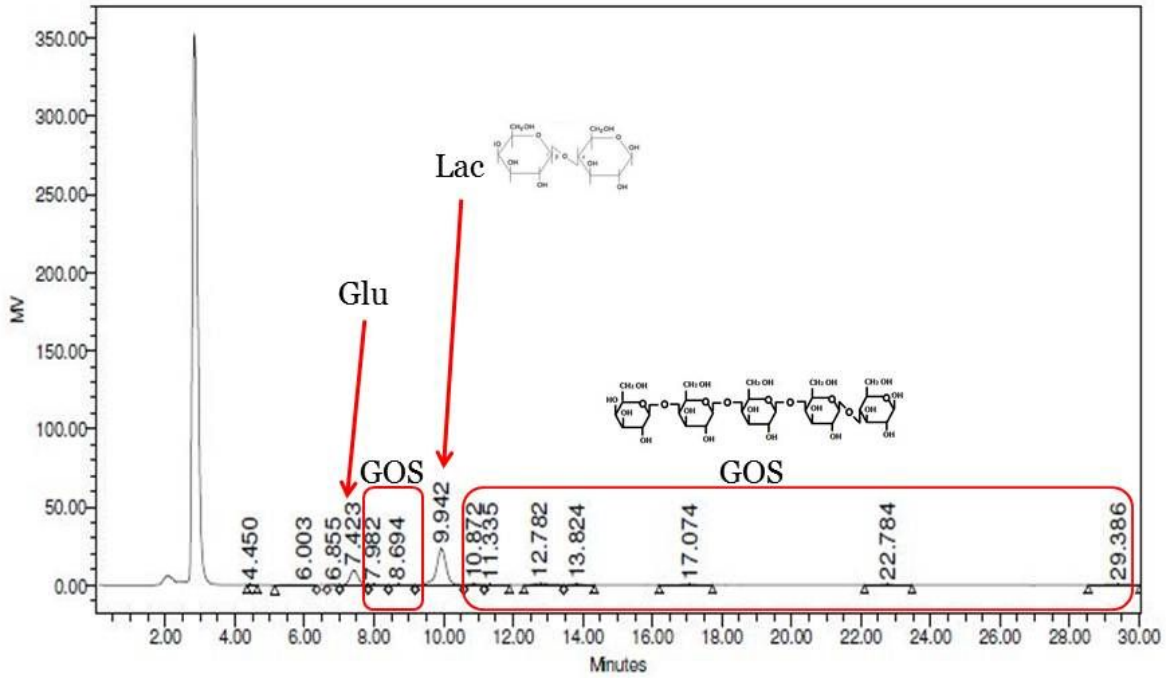


Fig. 2.1.21. 고정화한 *L. paracasei* 유래의 lactase를 통하여 생산한 갈락토올리고당의 HPLC 정량

Fig. 2.1.21은 *L. paracasei* 유래의 lactase 조효소액을 1.5% sodium alginate로 코팅하여 고정화하고 30% 분말유청배지에서 30℃로 4시간 배양하여 생산한 갈락토올리고당(GOS)을 HPLC를 통하여 정량한 결과이다. 앞의 HPLC 정량 결과와 마찬가지로 갈락토올리고당(GOS)의 생산을 확인 할 수 있었다.

(라) 미세캡슐의 수율 측정

미세캡슐 조건의 적정성을 확인하기 위하여 lactase를 미세캡슐화한 후에 캡슐을 lipase 처리하고 캡슐용액내의 캡슐화되지 않은 lactase의 활성을 colorimetric assay를 이용하여 측정한다. 캡슐의 수율(%)은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{캡슐수율(\%)} = \frac{\text{총 lactase 활성} - \text{캡슐화되지 않은 lactase 활성}}{\text{총 lactase 활성}} \times 100$$

(3) 유청분말의 염도(Volhard법) 및 유당, 갈락토올리고당(GOS), 포도당, 자당, 갈락토오스 함량 측정

유청제품의 조성분은 우유의 종류, 제조공정 등에 따라 대단히 다양하다. 일반적으로 유청에는 단백질, 유당, 무기질 및 비타민류가 풍부히 들어 있다. 우유와 유청 속의 단백질은 완벽하고 특별한 품질을 가지고 있다. 그 속에는 사람에게 필요한 모든 종류의 아미노산이 다양한 양과 알맞은 비율로 들어있다. 또한 소화되기 쉽고 완벽하게 생체 이용 가능한 형태로 되어 있다. 유청내의 가장 중요한 성분은 유청 단백질이다. 많은 경우 유청 제품은 매우 경제적인 단백질, 탄수화물 및 칼슘과 같은 무기물원으로서의 영양적인 이유로 사용된다(Table 2.1.9 참조). 유청분말의 염도는 유청배지를 제조하거나 유청을 효소의 기질로 사용할 때 고려해야 할 사항이다.

Table 2.1.9. 우유, 치즈커드 유청 고형분 조성(단위 : %)

구분	단백질	지방	유당	회분
우유	26.6	29.7	37.8	5.9
체다치즈	39.4	52.4	2.0	6.2
유청분말	13.4	1.1	76.9	8.6

(1) 유청분말의 염도 측정(Volhard법)

Table 2.1.10. Volhard법을 통한 유청분말의 염도 측정

회 차	1차	2차	3차
염도(%)	3.53	3.53	3.58

위의 Table 2.1.10은 Volhard법을 이용하여 유청분말에 포함된 염도를 측정한 실험이다. 유청분말을 1 g 취하여 0.1 N AgNO<sub>3</sub> 20 mL을 가하고 진한 질산 20 mL을 첨가한 후 가열한다. 그 후에 증류수 100 mL과 철명반 지시약 5 mL을 첨가한 다음 0.1 N KSCN으로 적정하여 얻은 실험 결과 인데 3차까지 측정한 결과 유청분말의 염도는 평균 3.55% 이다.

## 나. 제 1협동 과제

### (1). 유청 단백질 및 가수분해물의 엘러지 저해 인자 기능

#### (가) 유청단백질 준비

본 연구는 (주)삼익유가공에서 제공한 치즈 유청단백질을 이용하여 실험을 실시하였다.

#### (나) RBL-2H3 세포를 이용한 유청단백질 가수분해물의 엘러지 저해인자 효과

##### - 가수분해물 종류

가수분해물은 W.A.(Alcalase - Protex), W.N.(Neutrase - Protex), W.P.(Pancreatin-trypsin)으로 가수분해물 전체와 3kD 이상과 3kD 이하로 구분하였고, 대조구로 유청단백질과 bovine serum albumin 을 사용하였다.

##### - RBL-2H3 세포 준비

Rat 기원의 엘러지 관련 마스트 세포인 RBL-2H3 세포는 충남대 의대 생화학교실에서 분양받아 실험에 이용하였다. MEM 배지에 10% FBS가 첨가된 세포배양 배지를 이용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 배양기에서 배양하였다. RBL-2H3 세포를 24-well 에 1.6×10<sup>5</sup>/400ul/well로 조정하여 monoclonal IgE-DNP 항체를 100ng/mL로 처리하고 18시간 배양 후 시료를 처리하여 30분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 DNP-HSA 항원을 100ng/mL로 처리하여 20분 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 상등액을 회수하고 남은 세포에 0.1% Triton X-100을 처리하여 세포를 파괴 후 원심분리하여 상등액을 회수하여 β-Hexosaminidase assay를 하여 마스트 세포의 탈과립 정도를 조사하였다. 즉, 기질인 1 mM p-NAG 20 ul와 처리구 상등액 20 ul를 96-well plate에 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 반응을 중지시키고 405nm에서 OD 값을 측정하여 탈과립 정도를 측정하였다.

Sup. OD 값

$$\text{탈과립 \%} = \frac{\text{Sup. OD 값}}{\text{Sup. OD 값} + \text{Cell lysis OD 값}} \times 100$$

\* sample 0을 100%로 했을 때 각 처리구 별 %를 계산한다.

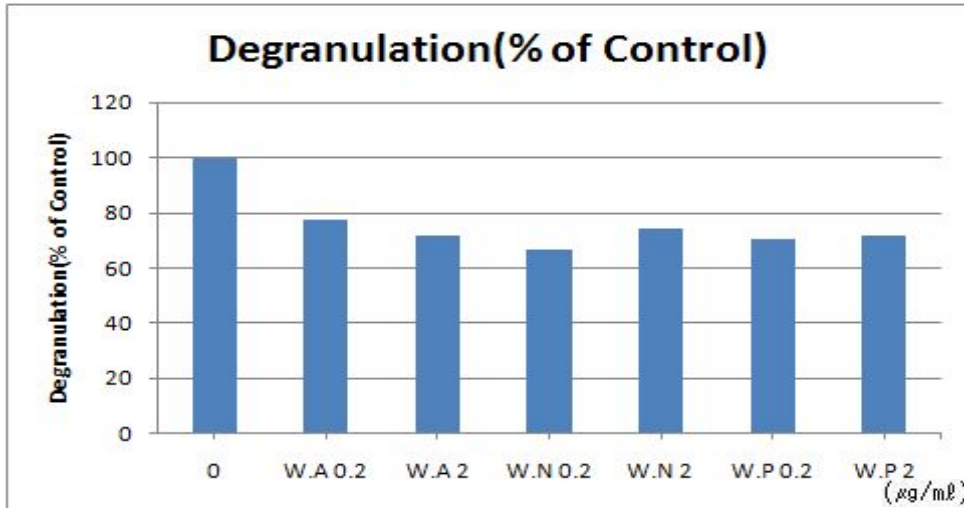


Fig. 2.2.1. 각 시료 별 처리에 의한 탈과립 효과

- Sample 0 : 100%, W.A 1  $\mu\text{g/ml}$  : 77.32%, W.A 10  $\mu\text{g/ml}$  : 71.79%,  
W.N 1  $\mu\text{g/ml}$  : 66.85%, W.N 10  $\mu\text{g/ml}$  : 74.05%, W.P 1  $\mu\text{g/ml}$  : 70.21%,  
W.P 10  $\mu\text{g/ml}$  : 71.73%

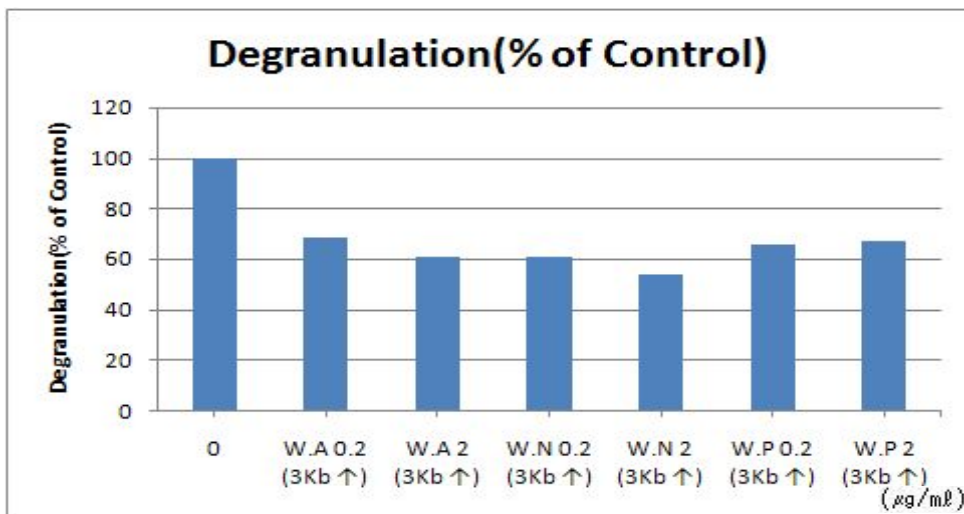


Fig. 2.2.2. 각 시료 별 처리에 의한 탈과립 효과

- Sample 0 : 100%, W.A 1  $\mu\text{g/ml}$  (3Kb ↑) : 68.14%,  
W.A 10  $\mu\text{g/ml}$  (3Kb ↑) : 60.55%, W.N 1  $\mu\text{g/ml}$  (3Kb ↑) : 60.49%,  
W.N 10  $\mu\text{g/ml}$  (3Kb ↑) : 53.93%, W.P 1  $\mu\text{g/ml}$  (3Kb ↑) : 65.50%,  
W.P 10  $\mu\text{g/ml}$  (3Kb ↑) : 67.16%

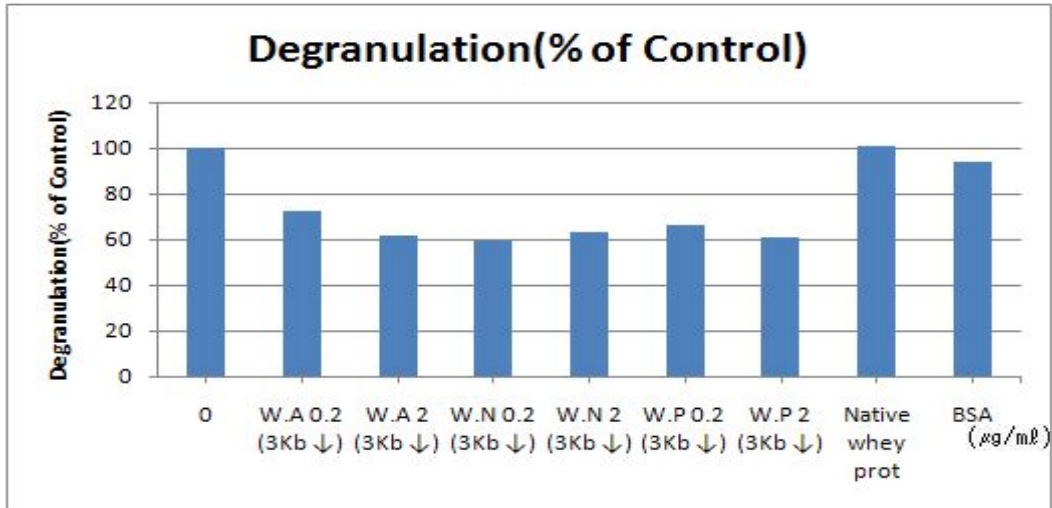
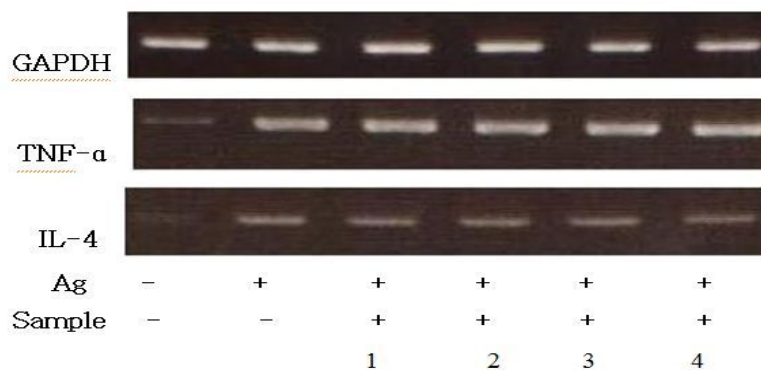


Fig. 2.2.3. 각 시료 별 처리에 의한 탈과립 효과

- Sample 0 : 100%, W.A 1  $\mu\text{g/ml}$  (3Kb ↓) : 72.16%,  
W.A 10  $\mu\text{g/ml}$  (3Kb ↓) : 61.66%, W.N 1  $\mu\text{g/ml}$  (3Kb ↓) : 59.22%,  
W.N 10  $\mu\text{g/ml}$  (3Kb ↓) : 63.11%, W.P 1  $\mu\text{g/ml}$  (3Kb ↓) : 65.77%,  
W.P 10  $\mu\text{g/ml}$  (3Kb ↓) : 60.79%, Whey Protein 10  $\mu\text{g/ml}$  : 100.80%  
Bovine Serum Albumin 10  $\mu\text{g/ml}$  : 93.60%

위 Fig. 2.2.1, 2, 3에서 보는 바와 같이 각 처리구별 탈과립 정도는 시료를 처리하지 않은 처리구에 비해서 1  $\mu\text{g/ml}$ 와 10  $\mu\text{g/ml}$  처리 시 대부분의 처리구에서 60 ~ 70% 정도에 이른다. 탈과립 %가 높다는 것은 유청단백질 가수분해물 펩타이드가 엘러지 저해인자로써 기능이 있는 것이 아님을 RBL-2H3 세포 실험으로 간접적으로 나타내는 것이다.

또한 탈과립 저해인자로써의 기능을 확인하기 위해서 엘러지 관련 사이토카인인 IL-4 와 TNF- $\alpha$ 의 발현을 RT-PCR로 분석하였다. 시료 중 W.A.와 유청단백질을 처리 후 세포로부터 RNA를 추출하여 RT를 수행하고 Rat 마스트세포가 발현하는 IL-4 와 TNF- $\alpha$ 의 primer를 제작하여 PCR를 수행하였다. 그 결과는 Fig. 2.2.4에 나타난 바와 같다. IL-4 와 TNF- $\alpha$ 의 발현은 W.A. 와 유청단백질에서 모두 발현이 되었음을 알 수 있었다. 이는 Fig. 2.2.1, 2, 3에서 탈과립 저해 정도를 나타낸 결과와 같이 저해 기능이 없는 것으로 나타남으로써 유청단백질 가수분해물이 엘러지 저해 인자로써의 기능은 없는 것으로 사료된다.





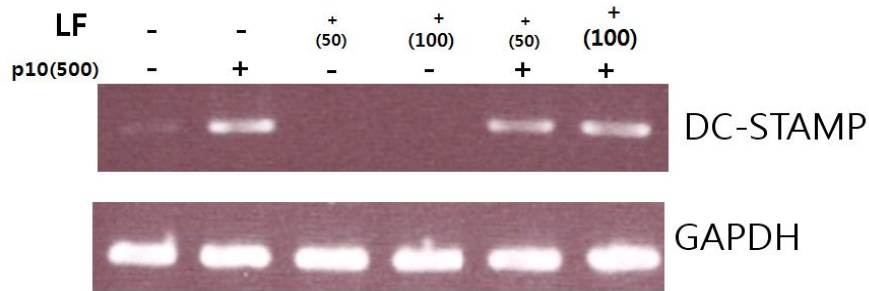


Fig. 2.2.7. U937 세포에서 DC marker 관련 유전자들의 발현

사람유래 U937 세포를 이용하여 항원제시세포로 작용하는 dendritic cell(DC, 수지상 세포) marker 유전자인 DC-STAMP가 락토페린에 의한 발현여부를 RT-PCR로 조사한 결과는 Fig. 2.2.7에 나타난바와 같다. 락토페린 단독으로는 DC-STAMP의 발현이 되지 않지만, p10 단독으로는 DC-STAMP의 발현이 아주 강하게 나타남으로써 DC-STAMP 발현에는 락토페린이 영향을 주지 못하는 것으로 생각된다.

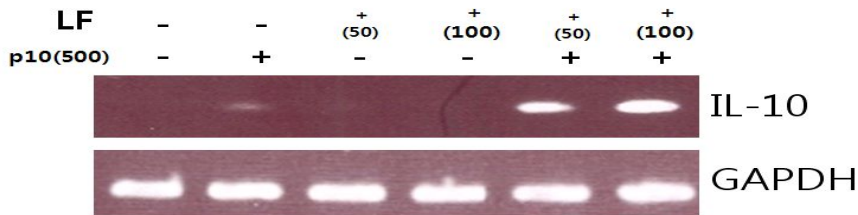


Fig. 2.2.8. U937 세포에서 IL-10 유전자의 발현

사람유래 U937 세포를 이용하여 엘러지와 관련된 IL-10 유전자의 락토페린에 의한 발현여부를 RT-PCR로 조사한 결과는 Fig. 2.2.8에 나타난바와 같다. 락토페린 단독 또는 p10 단독으로는 DC-STAMP의 발현이 되지 않지만, 락토페린과 p10 혼합처리시는 IL-10의 발현이 아주 강하게 나타남으로써 이 두 물질이 IL-10 발현에 강하게 상승작용을 하는 것으로 생각된다.

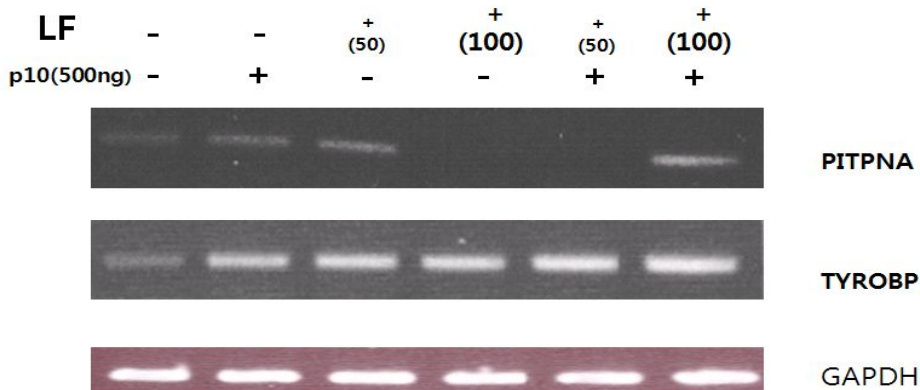


Fig. 2.2.9. U937 세포에서 DC marker 관련 유전자들의 발현

사람유래 U937 세포를 이용하여 phospholipase C 신호전달에 관련된 PITPNA 유전자와 면역관련 수용체와 관련된 신호전달과 관련된 TYROBP 유전자의 락토페린에 의한 발현여부를 RT-PCR로 조사한 결과는 Fig. 2.2.9에 나타난바와 같다. 락토페린 단독 또는 p10 단독으로 TYROBP의 발현이 강하게 나타났고, 락토페린과 p10 혼합처리시에도 TYROBP의 발현이 아주 강하게 나타남으로써 이 두 물질이 TYROBP 발현에 강하게 상승작용을 하는 것으로 생각된다.

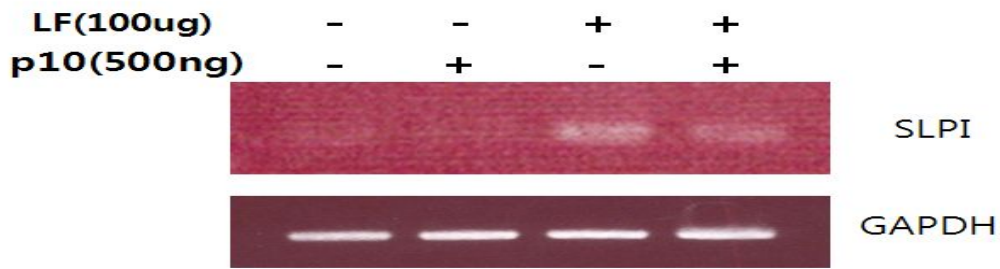


Fig. 2.2.10. U937 세포에서 SLPI 유전자의 발현

사람유래 U937 세포를 이용하여 상피세포 보호로 면역반응에 기여하는데 관련된 SLP I 유전자의 락토페린에 의한 발현여부를 RT-PCR로 조사한 결과는 Fig. 2.2.10에 나타난 바와 같다. p10 단독처리 경우는 발현이 되지 않았지만, 락토페린 단독 처리 경우에는 p10과 혼합처리보다 SLPI의 발현이 더 강하게 나타남으로써 락토페린이 SLPI 발현에 강하게 작용 하는 것으로 생각된다.

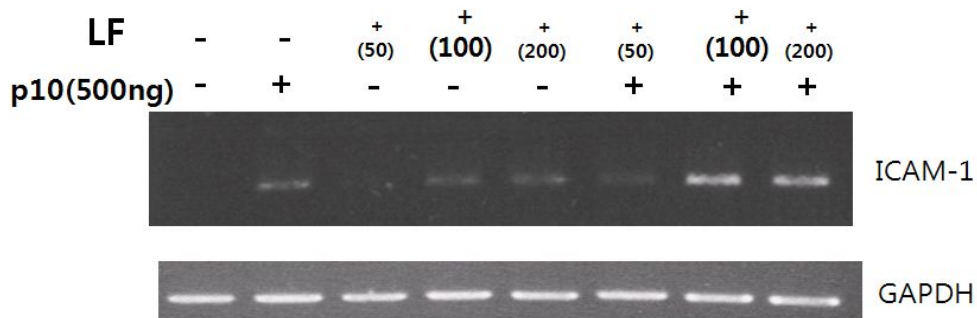


Fig. 2.2.11. U937 세포에서 ICAM-1 유전자의 발현

사람유래 U937 세포를 이용하여 세포표면 당단백질 결합과 관련된 ICAM-1 유전자의 락토페린에 의한 발현여부를 RT-PCR로 조사한 결과는 Fig. 2.2.11에 나타난바와 같다. p10과 락토페린 각각 단독 처리 경우에는 미약하게 발현이 되었지만 p10과 락토페린의 혼합처리 경우에는 ICAM-1의 발현이 매우 강하게 나타남으로써 락토페린이 ICAM-1의 발현에 상승작용 하는 것으로 생각된다.



(다) DC 세포를 이용한 면역 관련 유전자들의 발현

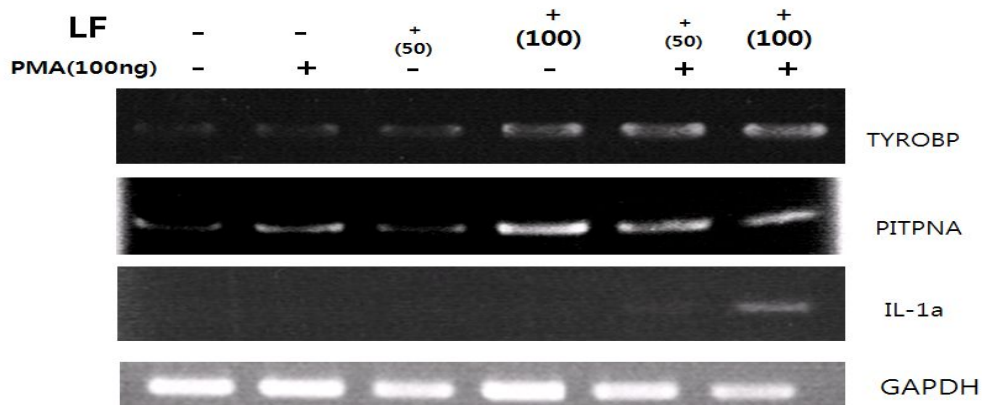


Fig. 2.2.12. Mutz-3 세포에서 면역 관련 유전자들의 발현

Dendritic cell(수지상 세포) 세포를 분화시킨 Mutz-3 세포를 이용하여 TYROBP, PITPNA 그리고 IL-1a 유전자의 락토페린에 의한 발현여부를 RT-PCR로 조사한 결과는 Fig. 2.2.12에 나타난바와 같다. TYROBP 유전자는 락토페린 단독 처리 경우 강하게 발현하였는데 이는 면역반응을 유도하는 PMA와 혼합처리 했을 경우와 비슷하게 발현하였다. 따라서 락토페린이 TYROBP 유전자 발현에 강하게 영향을 미치는 것으로 생각된다. 또한 PITPNA 유전자 역시 락토페린을 처리했을 경우에 강하게 발현하였고, IL-1a 유전자 발현에는 아주 미약하게 작용하였다.

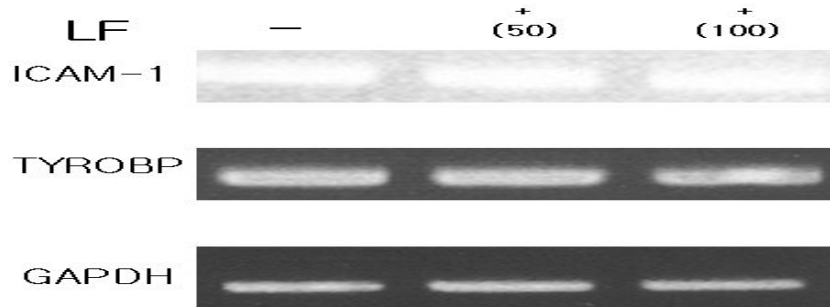


Fig. 2.2.13. muDC 세포에서 ICAM-1과 TYROBP 유전자들의 발현

수지상 세포를 분화시킨 muDC 세포를 이용하여 ICAM-1과 TYROBP 유전자의 락토페린에 의한 발현여부를 RT-PCR로 조사한 결과는 Fig. 2.2.13에 나타난바와 같다. ICAM-1과 TYROBP 유전자는 락토페린 처리 여부에 상관없이 강하게 발현하였는데 이는 ICAM-1과 TYROBP 유전자 발현에 락토페린이 영향을 미치지 못하는 것으로 생각된다.

(라) 락토페린과 PMA 처리시 NK92 와 U937 세포에서 면역 관련 유전자들의 발현

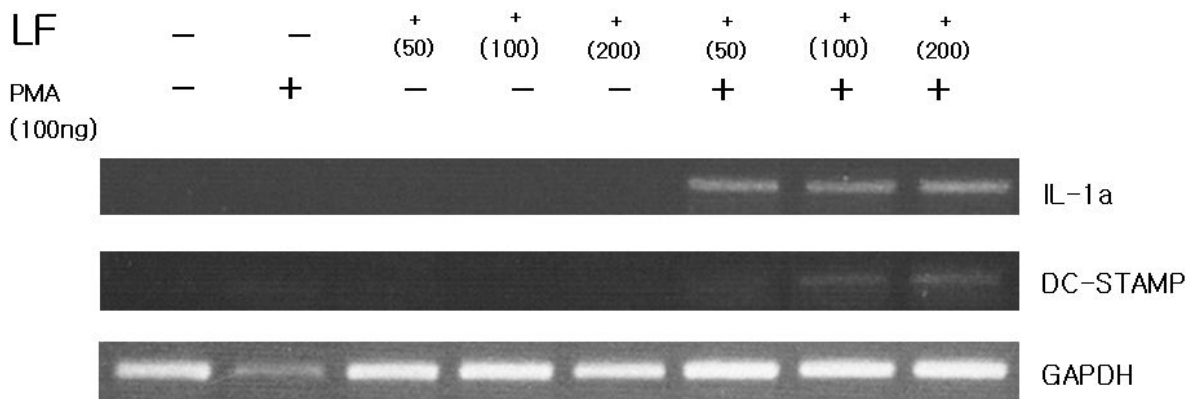


Fig. 2.2.14. NK92 세포에서 IL-1 $\alpha$ 와 Dc-stamp 유전자의 발현

NK92세포에 락토페린과 PMA를 처리하여 IL-1 $\alpha$ 와 DC-stamp 유전자의 발현여부를 RT-PCR로 조사한 결과는 Fig. 2.2.14에 나타난바와 같다. IL-1 $\alpha$ 와 DC-stamp 유전자는 락토페린과 PMA 단독 처리하였을 경우 발현하지 않았는데, 두 물질을 혼합하여 처리 하였을 경우에는 발현하였다. 따라서 락토페린과 PMA 두 물질이 상호작용하여 유전자를 발현하는 것으로 생각되어진다.

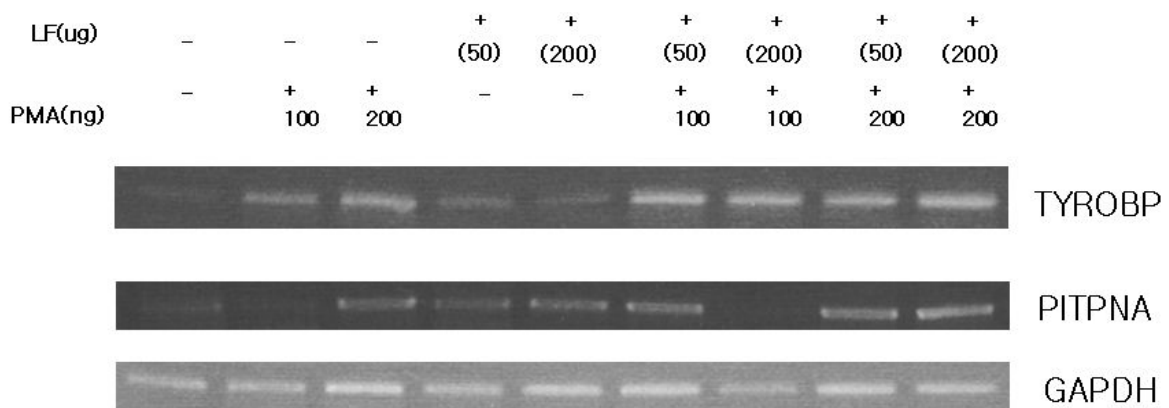


Fig. 2.2.15. U937 세포에서 TYROBP와 PITPNA 유전자의 발현

U937 세포에 락토페린과 PMA를 처리하여 TYROBP와 PITPNA 유전자의 발현여부를 RT-PCR로 조사한 결과는 Fig. 2.2.15에 나타난바와 같다. TYROBP와 PITPNA 유전자는 락토페린과 PMA 단독 처리 경우 약하게 발현하였는데, 두 물질을 혼합처리 했을 경우에는 단독처리보다 강하게 발현하였다. 따라서 락토페린과 PMA가 유전자 발현에 강하게 영향을 미치는 것으로 생각되어진다.

## 다. 제 2협동 과제

### (1) 발효제품 첨가제 완성

1차년도에 유청농축액을 원료로 하여 이를 Protease와 Lactase로 가수분해한 시료가 유산균 종류별로 어느 정도 증식촉진 효과가 있는지를 평가하였다. 이 때 사용한 *L. acidophilus*와 *Bifidobacterium infantis*, 그리고 *Streptococcus thermophilus* 균주들에 대하여 매우 효과가 있었으며, 이를 Yeast extract와 Peptone과 비교한 결과 중간적인 효과를 발휘함을 알 수 있었다. 이어서 2차년도에는 효소분해한 유청농축액이 다른 원료와 혼합 시 시너지를 나타낼 수 있는지를 확인하여 최종첨가제 조성을 완성하고, 실제로 액상요구르트와 호상요구르트, 치즈 작업 중에 어느 정도 효과가 있는지를 평가하였다.

#### (가) 타 원료와 혼합시의 상승효과 측정

실험용 유청농축액 원료를 입실치즈에서 구하여 원료 규격을 검사한 결과는 다음과 같았다.

pH : 6.00, Brix : 30.0°, Total Solids : 31.2%

위와 같이 본 유청농축액 시료는 우리나라에서 일반적으로 유통되는 유청농축액의 일반적인 규격을 나타내었으므로 이를 가지고 타 원료와의 혼합 시의 시너지 효과를 측정하기 위하여 Fig. 2.1.1과 같은 공정으로 효소분해 유청분말을 제조하였다. 효소처리한 유청농축액은 액상이어서 보존성이 길지 않아 이를 1차로 진공건조한 후 2차로 65°C에서 열풍건조하여 만든 분말(수분함량 : 2.8%)을 보관하면서 실험용 원료로 사용하였다.

유산균을 비롯한 미생물의 증식 효과를 갖는 성분 중 1차년도에 yeast extract와 peptone을 선발하여 비교 평가하였는데, 효소처리한 유청분말에 이들 성분들을 혼합하여 배양 촉진 효과와 유산균 증식 효과를 각각 측정하여 비교하였다.

혼합첨가용 원료는 산업용으로 사용되고 있는 Yeast extract(Gistex LS Powder)와 Soy peptone PR(샘표식품)을 비전바이오켄에서 공급받아 사용하였다. 시유는 서울우유의 제품을, 탈지분유는 매일유업의 제품을 사용하였다.

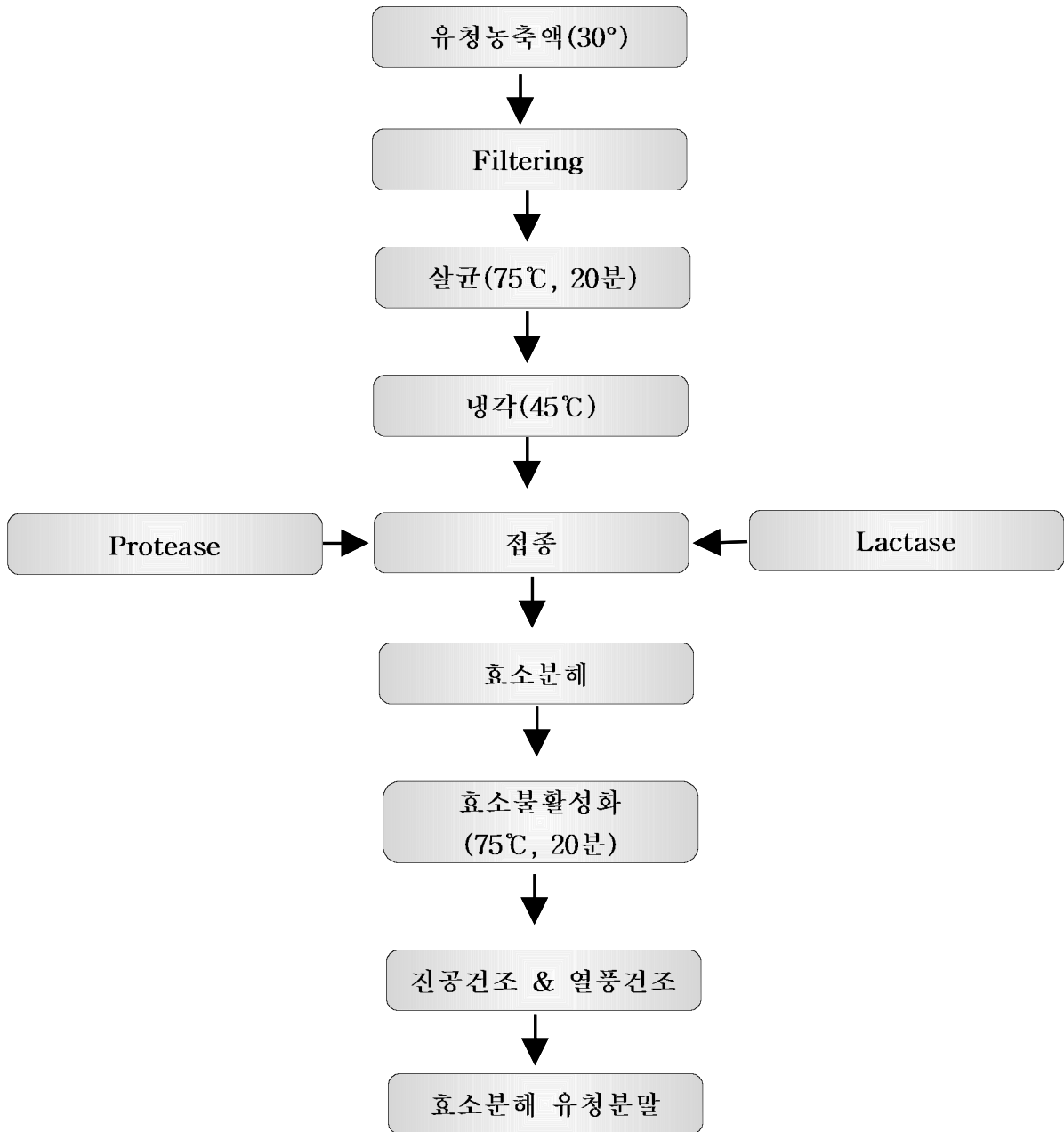


Fig. 2.3.1 효소분해 유청분말의 시료 제조과정

① 효모추출물의 상승효과

효소분해 유청분말에 효모추출물을 혼합 시 배양속진과 유산균수의 증가에 어떤 영향을 주는지 파악하기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다.

Table 2.3.1. 효소분해 유청분말과 효모추출물을 첨가한 배양액 조성물(%)

Sample No	1	2	3	4	5	6
Enzyme-treated Whey Powder	0	2	2	2	0	0
Yeast Extract	0	0	0.05	0.1	0.05	0.1
Market Milk	100	98	97.95	97.9	99.95	99.9

유산균은 Culture systems의 요구르트용 복합균주인 ABT-B를 사용하였고, 배양온도는 38°C에서 배양액의 pH와 유산균 생균수를 배양시간별로 분석하였다.

Table 2.3.2. 배양시간별 pH의 변화

Sample No Incubation time	1	2	3	4	5	6
0 Hr	6.86	6.64	6.64	6.64	6.86	6.86
2 Hr	6.96	6.55	6.48	6.45	6.76	6.75
6 Hr	5.90	4.71	4.54	4.45	4.43	4.31
8 Hr	5.28	4.57	4.46	4.35	4.37	4.27

Table 2.3.3. 배양시간별 유산균 생균수의 변화

Sample No Incubation time	1	2	3	4	5	6
0 Hr	$6.6 \times 10^6$	$6.6 \times 10^6$	$6.6 \times 10^6$	$6.6 \times 10^6$	$6.6 \times 10^6$	$6.6 \times 10^6$
2 Hr	$2.1 \times 10^7$	$1.7 \times 10^7$	$3.1 \times 10^7$	$3.3 \times 10^7$	$6.8 \times 10^7$	$6.8 \times 10^7$
6 Hr	$2.1 \times 10^8$	$1.2 \times 10^9$	$1.4 \times 10^9$	$1.7 \times 10^9$	$1.6 \times 10^9$	$2.4 \times 10^9$
8 Hr	$3.4 \times 10^8$	$8.4 \times 10^8$	$8.4 \times 10^8$	$9.7 \times 10^8$	$2.3 \times 10^9$	$2.4 \times 10^9$

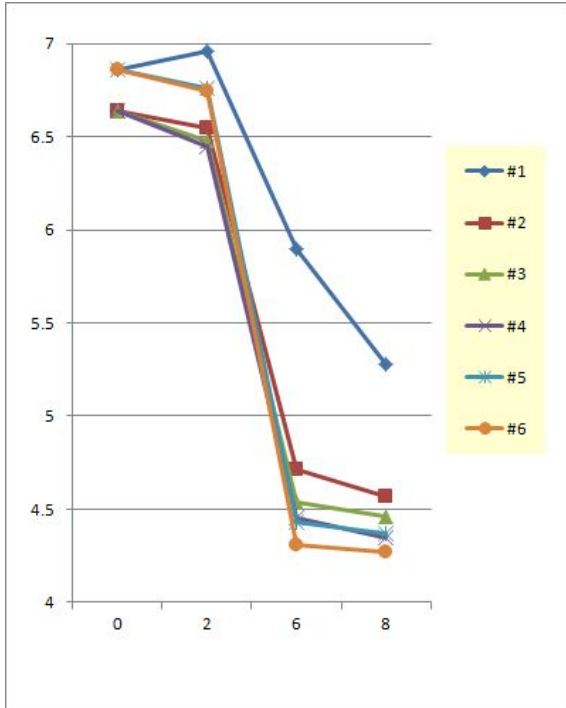


Fig. 2.3.2 효모추출물 농도별 pH

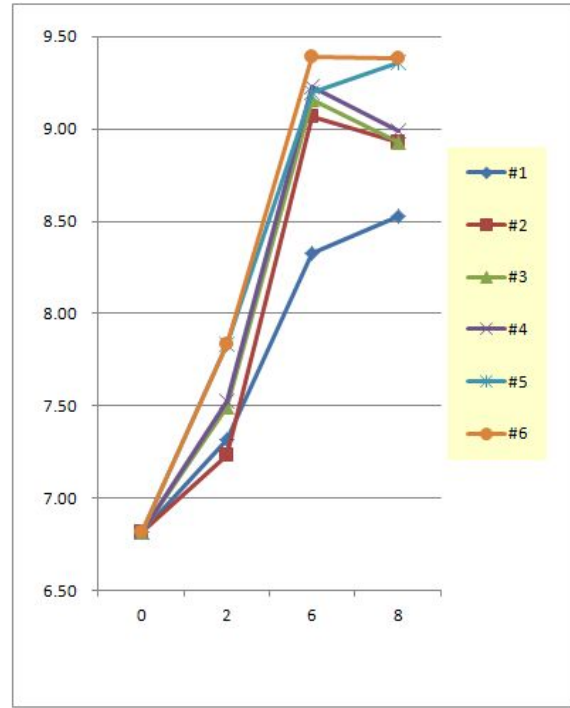


Fig. 2.3.3 효모추출물 농도별 유산균 생균수

유산균 생균수는 BCP 배지(Eiken)를 사용하였으며, 시료를 증류수로 십진 희석하여 36℃에서 2~3일간 배양한 후 Petridish에 나타난 Colony를 계수하였다.

효소분해 유청분말을 첨가하였을 때 배양액의 pH는 첨가 안한 것에 비해 6.86에서 6.64로 약 0.2가 낮아졌다. 이는 유청농축액의 원래 pH가 6.0이었기 때문에 시유의 pH가 이로 인하여 낮아진 것으로 예상된다. 순수한 시유의 경우 요구르트용 유산균주로 배양하였을 때 8시간 후에 5.28을 나타내어 커드가 엉기기 시작하였다. 반면 효소분해 유청분말과 효모추출물을 넣은 시료는 모두 4.6 이하를 나타내어 요구르트 배양이 완료된 것으로 나타났다. 특히 효모추출물을 많이 첨가할수록 pH가 더 낮아지는 경향을 보여서 배양 촉진에 유효한 것으로 평가되었다. 또한 유산균수도 시유에 비하여 효소분해 유청분말을 첨가한 시료가 6시간 및 8시간 배양 후에 2~3억균 대 8~12억균으로 4배 정도 높았다. 그리고 효모추출물만을 첨가한 시료가 16~24억균을 나타내어서 시료 중 가장 좋은 결과를 보여주었다. 그렇지만 효소분해 유청분말에 효모추출물을 첨가한 시료가 효모추출물만 첨가한 시료보다 오히려 배양 증식 정도와 유산균 생균수가 낮아서 시너지 효과는 없는 것으로 보인다.

## ② 효소분해 유청분말의 효과

효소분해한 유청분말의 농도별로 요구르트 배양액의 생육촉진 효과를 분석하기 위하여 다음과 같이 실험하였다.

Table 2.3.4. 효소분해 유청분말 첨가 농도별 배양액 조성물(%)

Sample No	7	8	9	10
Enzyme-treated Whey Powder	0	1	2	4
Market Milk	100	99	98	96

배양용 유산균주는 전 실험과 동일한 ABT-B 복합균주를 사용하였고, 배양온도는 38℃에서 배양액의 pH와 유산균 생균수를 배양시간별로 분석하였다.

Table 2.3.5. 배양시간별 pH의 변화

Sample No Incubation time	7	8	9	10
0 Hr	6.86	6.75	6.64	6.46
2 Hr	6.90	6.67	6.53	6.46
4 Hr	6.46	5.27	5.79	6.39
6 Hr	5.32	4.66	4.85	6.23
8 Hr	4.75	4.44	4.59	5.85

Table 2.3.6. 배양시간별 유산균 생균수의 변화

Sample No Incubation time	7	8	9	10
0 Hr	$1.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$
2 Hr	$4.4 \times 10^7$	$5.2 \times 10^7$	$2.4 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$
4 Hr	$8.3 \times 10^7$	$4.1 \times 10^8$	$3.3 \times 10^8$	$7.0 \times 10^7$
6 Hr	$3.0 \times 10^8$	$6.1 \times 10^8$	$4.6 \times 10^8$	$1.9 \times 10^8$
8 Hr	$5.2 \times 10^8$	$8.9 \times 10^8$	$4.5 \times 10^8$	$2.3 \times 10^8$

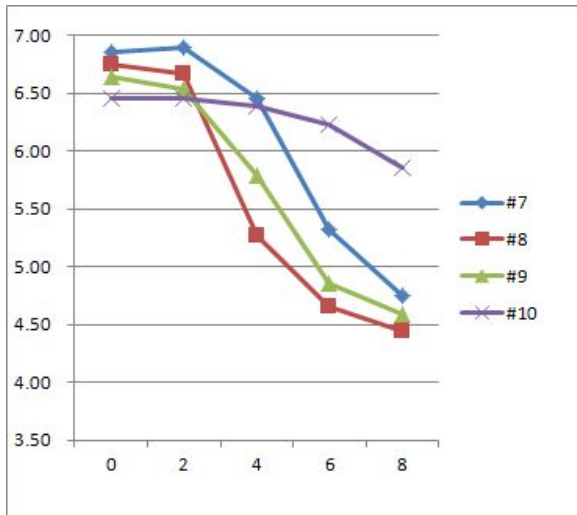


Fig. 2.3. 4 유청 농도별 배양액의 pH

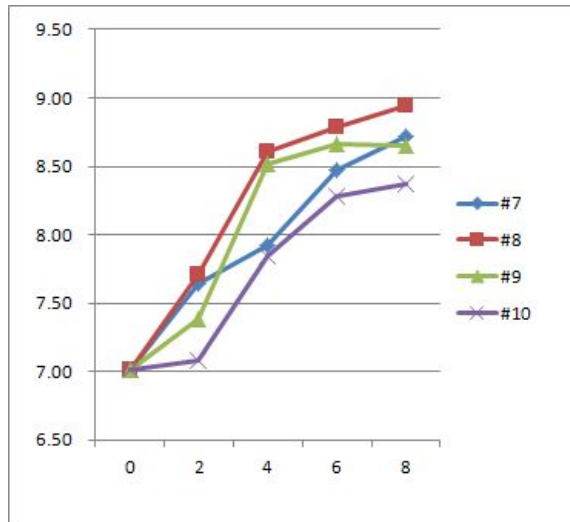


Fig. 2.3. 5 유청 농도별 배양액의 유산균 생균수

효소분해 유청분말을 무첨가한 것과 1%, 2%, 4% 첨가한 시료를 비교한 결과 1% 첨가한 것이 가장 산 진전 속도가 빠르며, 유산균 생균수도 가장 높은 결과가 나왔다. 그리고 2% 첨가한 시료는 무첨가 시료보다 약간 좋았으며, 4% 첨가한 시료는 오히려 산 진전 속도도 느려지고 유산균 생균수도 낮은 현상을 보였다. 이 결과로 미루어 볼 때, 효소분해 유청분말은 농도 의존적인 영향력을 주지 못하고 1% 첨가에서 가장 좋은 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

산 진전속도는 무첨가 시료가 6시간 후에 pH가 5.32, 8시간 후에 4.75를 보였지만, 1% 효소분해 유청분말을 첨가한 시료는 각각 4.66, 4.44를 나타내어서 우수한 효과를 보였다. 유산균 생균수는 무첨가 시료는 4시간 발효 후 8천만 군/mL인데 반하여 1% 첨가 시료는 4억/mL로 나와 5배의 차이를 보였으며 6시간과 8시간 후에도 약 2배가량 생균수가 높아서 확실한 증식 효과가 인정되었다. 2% 첨가 시료의 경우는 4시간 후에는 4배 높은 생균수를 보였으나, 6시간과 8시간 후에는 동일한 생균수를 보여 증식 효과가 별로 있다고 보이지 않았다. 그리고 4% 첨가 시료의 경우처럼 농도가 높아질수록 오히려 억제력을 나타내는 이유는 추후 규명해야 할 것으로 보인다.

### ③ 효모추출물 및 펩톤 첨가 효과

효소분해 유청분말에 효모추출물을 첨가한 것과 펩톤 첨가한 것을 비교 평가하기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다.



Table 2.3.7. 효모추출물과 펩톤을 첨가한 배양액 조성물(%)

Sample No	11	12	13	14	15	16
Enzyme-treated Whey Powder	1	1	1	1	1	1
Yeast Ext.	0	0.05	0.1			0.1
Soy peptone	0	0	0	0.1	0.2	0.1
Market Milk	99	98.95	98.9	98.9	98.8	98.8

효소분해 유청분말은 전 실험에서 최적 첨가량인 1%로 고정하였고, 효모추출물과 Soy peptone을 각각 0.05~0.1%, 0.1~0.2% 범위에서 첨가하여 6가지의 배합물을 만들었다. 유산균은 전 실험과 동일한 Culture systems의 요구르트용 복합균주인 ABT-B를 사용하였고, 배양온도는 38℃에서 배양액의 pH와 유산균 생균수를 배양시간별로 분석하였다.

Table 2.3.8. 배양시간별 pH의 변화

Sample No Incubation time	11	12	13	14	15	16
0 Hr	6.64	6.64	6.65	6.66	6.66	6.64
4 Hr	5.37	5.14	4.90	4.90	4.85	4.81
8 Hr	4.34	4.30	4.24	4.20	4.16	4.15
12 Hr	4.08	4.03	4.02	4.04	3.97	3.90

Table 2.3.9. 배양시간별 유산균 생균수의 변화

Sample No Incubation time	11	12	13	14	15	16
0 Hr	$7.5 \times 10^6$	$7.5 \times 10^6$	$7.5 \times 10^6$	$7.5 \times 10^6$	$7.5 \times 10^6$	$7.5 \times 10^6$
4 Hr	$6.3 \times 10^8$	$1.0 \times 10^9$	$1.0 \times 10^9$	$1.8 \times 10^9$	$1.1 \times 10^9$	$1.3 \times 10^9$
8 Hr	$2.2 \times 10^9$	$1.4 \times 10^9$	$1.7 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$	$1.9 \times 10^9$	$1.4 \times 10^9$
12 Hr	$2.7 \times 10^9$	$1.3 \times 10^9$	$1.8 \times 10^9$	$2.4 \times 10^9$	$1.6 \times 10^9$	$1.3 \times 10^9$

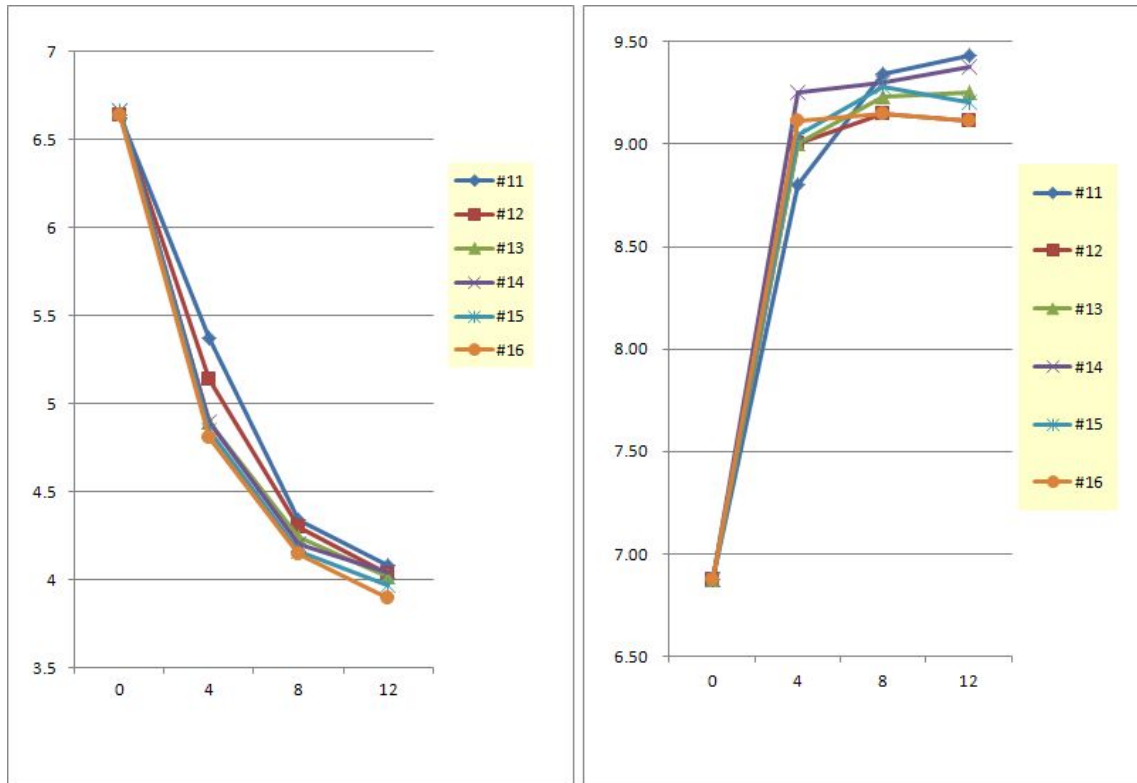


Fig. 2.3.6 증식물질 첨가농도별 배양액의 pH Fig. 2.3.7 증식물질 첨가농도별 배양액의 유산균수

효소분해 유청분말에 효모추출물이나 펩톤을 첨가한 배양액의 산진전은 효모추출물이나 펩톤을 첨가할수록 빨라지는 경향을 보였다. 이는 4시간에서 8시간 사이에 촉진되었다고 8시간 이후에는 비슷하게 되었다. 효모추출물 0.1% 첨가군과 펩톤 0.1% 첨가군의 pH가 거의 같은 점으로 미루어 증식 효과가 비슷하다고 유추할 수 있었다. 산 진전 촉진과는 별개로 유산균의 생균수의 경우에는 비슷하였고 8시간 이후에는 오히려 효소분해 유청분말만을 첨가한 시료의 유산균 생균수가 더 높은 결과를 보여 효모추출물과 펩톤이 중간에 일시적으로 촉진하는 효과를 보였고 생균수를 더 뛰어나게 높이지는 못하였다. 이로 미루어 효소분해 유청분말 1% 첨가만으로도 생육촉진에 의한 산 진전 촉진과 생균수를 높이는 효과를 발휘한 것으로 평가된다. 한편 효모추출물과 펩톤을 동시에 0.1%씩 첨가하였을 때는 단독 첨가에 비하여 산 진전 속도는 빨라졌지만 유산균 생균수를 높이는 데는 별로 효과가 없었다. 종합적으로 볼 때 효소분해 유청분말 단독 첨가하는 방안과 여기에 효모추출물 또는 펩톤을 10% 첨가하는 방안 두 가지를 세부적으로 검토하는 것이 바람직할 것으로 보인다.

(나) 최종 첨가제 조성 완성

요구르트를 비롯한 식품을 제조하는데 관능적인 측면을 무시할 수 없으므로 효소분해 유청분말과 효모추출물 등을 첨가하고자 하면, 이로 인한 이취를 사전 평가하지 않으면 안 된다. 따라서 주요 원료인 시유에 효모추출물을 농도별로 첨가하면서 이미 이취를 감지하는 농도를 구하였다. 그 결과 0.05% 이상에서 감지가 되었고, 0.1% 첨가 농도에서는 심하게 이미 이취를 느낄 수 있었다. 여기에 효소분해 유청분말을 첨가하였을 때 효모추출물의 이미 이취를 상쇄(masking)하여 0.1% 첨가농도까지도 관능적으로 무리가 없었다. 그리고 펩톤의 경우에는 0.2%까지 첨가해도 무난하였다. 또한 효소분해 유청분말을 제조 시 진공건조 및 열풍건조를 통하여 분말화 작업을 한 관계로 약간의 갈변현상이 있었다. 따라서 이를 1%, 2% 농도를 올려갈수록 배양액의 색상이 진해지는 현상을 보였는데, 이는 실제로 현장에서 분무건조를 하게 되면 일반적인 유청분말과 같은 유백색 분말이 될 것이므로 크게 염려할 필요가 없을 것으로 예상된다.

첨가제의 조성을 완성하기 위하여 전 항의 데이터를 분석한 결과 효소분해 유청분말 자체만으로 하는 것과 여기에 효모추출물을 10% 첨가하는 것으로 결정하였다. 펩톤의 경우에는 동량의 첨가량에서 동일한 결과를 보여서 사용할 수는 있으나 원료 단가가 효모추출물보다 50% 더 비싸므로 경제적 측면에서 효모추출물을 최종 선발하였다.

Table 2.3.10. 첨가제의 일반사항

증식촉진제 조성	효소분해 유청분말 100%	효소분해 유청분말 90% + 효모추출물 10%
제품의 유형	유가공품의 유청분말	기타가공품
용도	발효유제품의 생육촉진용	좌동
첨가량	1% 내외	1% 내외
유통기한	건냉암소에서 1년	건냉암소에서 1년

(이하 효소분해 유청분말 100%는 EWP로, 효소분해 유청분말 90% + 효모추출물 10% 는 MEWP로 약칭함.)

축산물가공처리법규상의 유가공품 유청분말의 성분규격기준은 다음 표와 같다.

Table 2.3.11. 유청의 성분규격 기준

항목 \ 유형	유청	농축유청	유청분말	유청단백분말
(가) 정상	고유의 색택과 향미를 가진 액체로서 이미 이취가 없어야 한다.	고유의 색택과 향미를 가진 액체로서 이미 이취가 없어야 한다.	고유의 색택과 향미를 가진 분말로서 이미 이취가 없어야 한다.	고유의 색택과 향미를 가진 분말로서 이미 이취가 없어야 한다.
(나) 수분(%)	-	-	5.0이하	5.0이하
(다) 유고형분(%)	5.0이상	25.0이상	95.0이상	95.0이상 (유단백질은 유고형분의 35.0% 이상이어야 한다)
(라) 세균수	1ml당 20,000이하 (멸균제품의 경우 55℃에서 2주 또는 30℃에서 2주 보관 후 표준 평판배양법에 의할때 음성이어야 한다)	1g당 20,000이하 (멸균제품의 경우 55℃에서 2주 또는 30℃에서 2주 보관 후 표준 평판배양법에 의할때 음성이어야 한다)	1g당 20,000 이하	1g당 20,000이하
(마) 대장균군	1ml당 2이하 (멸균제품의 경우 음성이어야 한다)	1g당 2이하 (멸균제품의 경우 음성이어야 한다)	음성이어야 한다.	음성이어야 한다.

기타가공품의 성분규격은 다음과 같다.

- 1) 성 상 : 적합하여야 한다.
- 2) 이 물 : 적합하여야 한다.
- 3) 산 가 : 3.0 이하 (식용유지가공품에 한하며, 참깨분 및 대두분은 4.0 이하, 식용번데기 가공품 또는 유탕·유처리식품은 5.0 이하)
- 4) 과산화물가 : 60 이하(식용번데기 가공품 또는 유탕·유처리식품에 한한다)
- 5) 중금속(mg/kg) : 10 이하(식용유지가공품 또는 당류가공품에 한한다)
- 6) 대장균군 : 음성이어야 한다(살균제품에 한한다).
- 7) 세 균 수 : 음성이어야 한다(멸균제품에 한한다).
- 8) 타르색소, 합성보존료, 산화방지제는 식품첨가물공전에 사용기준이 정하여진 식품에 한하여 검사하며 중요성에 따라 선별 적용할 수 있다.

(다) 요구르트 및 발효 응용 시험

위에서 연구된 두 가지 조성물 EWP와 MEWP를 가지고 두가지 타입의 요구르트와 치즈제조 과정에서 어떤 효과가 있는지를 검증하기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다.

가) 액상요구르트에의 응용시험

액상요구르트는 일반적으로 탈지분유를 주원료로 사용한 배지를 *L. casei* 로 장기 발효시키는데 보통 3~5일간 실시한다. 따라서 초기에 유산균의 생육이 왕성하지 않으면 2차 오염으로 인하여 배양 중에 변패될 우려가 있다. 그러므로 장기 배양하는 액상요구르트의 경우에는 생육촉진물질의 첨가가 필요할 수 있다. 본 연구에서 개발한 효소분해 유청분말과 타 원료와의 혼합제제를 사용하여 액상요구르트 배양액의 제조에 대한 효과를 파악하기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다.

① 배양액의 조성

Table 2.3.12. 액상요구르트 배양액의 조성

원료 / 배양액 종류	A1	A2	A3
탈지분유	16	16	16
포도당	5	5	5
EWP		1	
MEWP			1
정수	79	78	78
합계	100	100	100

② 실험 방법

탈지분유와 포도당을 비롯한 첨가물을 계량하여 정수에 잘 혼합하고 중탕으로 100℃ 끓는 물에서 90분간 살균하여 실제 액상요구르트처럼 갈변되도록 하였다. 이어서 36℃로 냉각한 다음 *L.casei* 01(Chr. Hansen) 유산균주를 접종하여 배양하였다. 12시간 간격으로 pH와 유산균 생균수를 검사하여 생육촉진 효과를 비교 평가하였다.

③ 실험결과

Table 2.3.13. 배양시간별 pH의 변화

배양시간 / 시료	A1	A2	A3
0	6.61	6.51	6.52
12	6.51	6.49	6.47
24	5.66	6.13	5.80
36	4.51	5.14	4.71
48	4.13	4.42	4.18
60	4.07	4.19	4.10

Table 2.3.14. 배양시간별 유산균수의 변화

배양시간 / 시료	A1	A2	A3
0	1.0 x 10 <sup>6</sup>	1.0 x 10 <sup>6</sup>	1.0 x 10 <sup>6</sup>
12	4.0 x 10 <sup>7</sup>	2.0 x 10 <sup>7</sup>	3.0 x 10 <sup>7</sup>
24	5.8 x 10 <sup>8</sup>	5.1 x 10 <sup>8</sup>	1.5 x 10 <sup>9</sup>
36	2.9 x 10 <sup>9</sup>	3.0 x 10 <sup>9</sup>	4.8 x 10 <sup>9</sup>
48	3.7 x 10 <sup>9</sup>	4.3 x 10 <sup>9</sup>	4.6 x 10 <sup>9</sup>

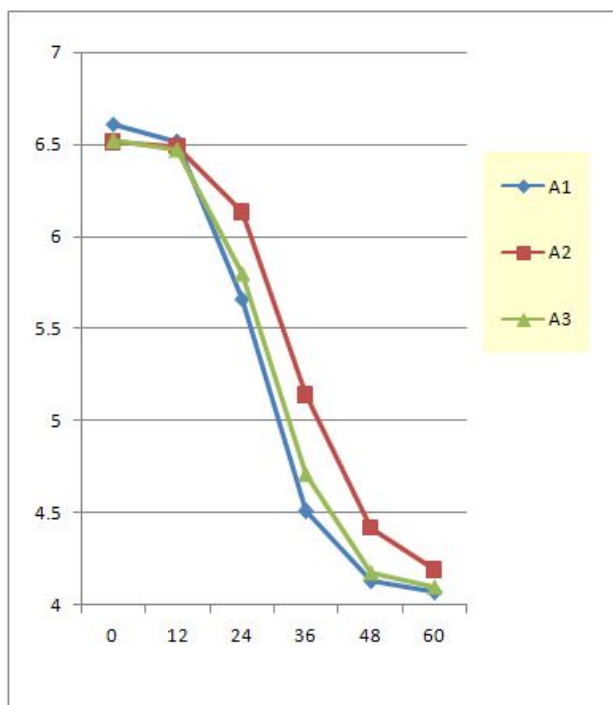


Fig. 2.3.8 액상요구르트의 pH변화

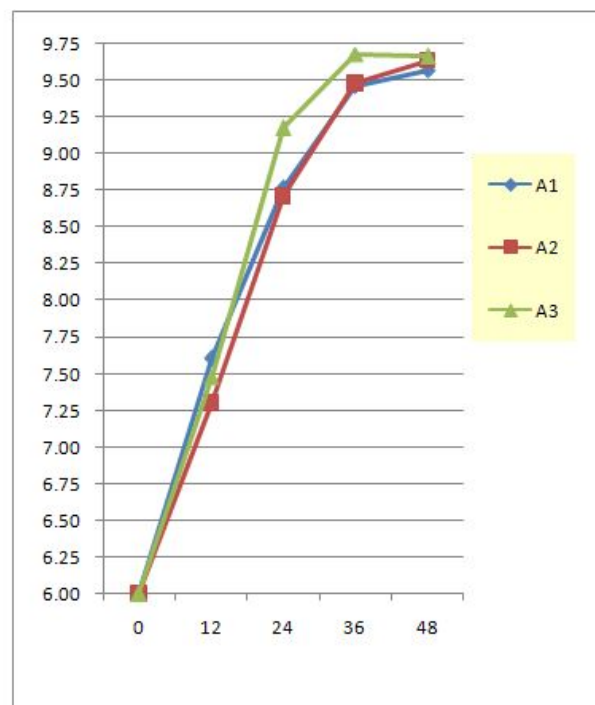


Fig. 2.3.9 액상요구르트의 유산균수 변화

액상요구르트는 탈지분유와 포도당을 주요 성분으로 하여 살균 중 갈변과정을 거친 다음 배양하는 관계로 이미 생육촉진물질을 함유하고 있다. 그리고 L.casei 라는 유산균 간균으로 장기배양을 하는 독특한 공정을 거치고 있는 관계로 서구식 요구르트 제조방법과는 확연히 차별화되고 있다. 본 연구에서 준비한 EWP와 MEWP를 각각 1% 첨가한 시료가 무첨가 시료와 어떤 차이를 보일지를 실험한 결과 산진진 속도에 도움이 되지 않고 오히려 근소하나마 느려진 것으로 나타나 첨가로 인한 아무런 효과를 얻지 못하였다. 이는 기존 배합 조성물 자체만으로 충분히 발효되고 있으며 본 연구조성물의 추가적인 촉진 효과가 없었음을 의미한다. 유산균 생균수의 경우에는 무첨가시료와 EWP 시료는 거의 유사하였으나 MEWP의 경우에는 유산균 생균수의 촉진 효과가 있는 것으로 나타났다. 24시간 후부터 48시간 후까지의 생균수가 최소 24% 이상 최대 2.5배나 높은 것으로 평가되었다. 이로 인하여 효모추출물을 함유한 배지는 그렇지 않은 배지에 비하여 장시간 배양 시 생육촉진효과가 큰 것을 알 수 있었다. 그런데 초기 유산균 투여 농도가 다소 낮았던 관계로 12시간 후에도 증식이 미미하였는데, 추후 실험 시 유산균 초기 투여 농도를 높이도록 하여 배양하는 것이 좋을 것으로 보인다.

(라) 호상요구르트에의 응용

호상요구르트는 원유를 기본으로 하여 약간의 탈지분유와 당을 첨가하여 제조하고 있다. 본 연구에서 개발된 물질이 호상요구르트의 배양시간 단축과 생균수 증진에 어떠한 영향을 주는지 다음과 같은 방법으로 평가하였다.

① 배양액의 조성

Table 2.3.15 호상요구르트의 배양액 조성

원료 / 배양액 종류	B1	B2	B3
시유	95	94	94
탈지분유	2	2	2
설탕	3	3	3
EWP		1	
MEWP			1
합 계	100	100	100

② 실험 방법

시유와 탈지분유를 비롯한 첨가물을 계량하여 잘 혼합하고 증탕으로 100℃ 끓는 물에서 20분간 살균하였다. 이어서 36℃로 냉각한 다음 ABT-B(Culture Systems) 복합 유산균주를 접종하여 배양하였다. 4시간 간격으로 pH와 유산균 생균수를 검사하여 생육촉진 효과를 비교 평가하였다.

③ 실험 결과

Table 2.3.16 배양시간별 pH의 변화

배양시간 / 시료	B1	B2	B3
0	6.72	6.62	6.64
4	6.65	6.32	6.10
8	4.90	4.86	4.61
12	4.42	4.42	4.36

Table 2.3.17 배양시간별 유산균수의 변화

배양시간 / 시료	B1	B2	B3
0	$6.0 \times 10^6$	$6.0 \times 10^6$	$6.0 \times 10^6$
4	$3.1 \times 10^8$	$3.0 \times 10^8$	$5.2 \times 10^8$
8	$2.7 \times 10^9$	$2.3 \times 10^9$	$1.9 \times 10^9$
12	$1.9 \times 10^9$	$1.4 \times 10^9$	$1.6 \times 10^9$

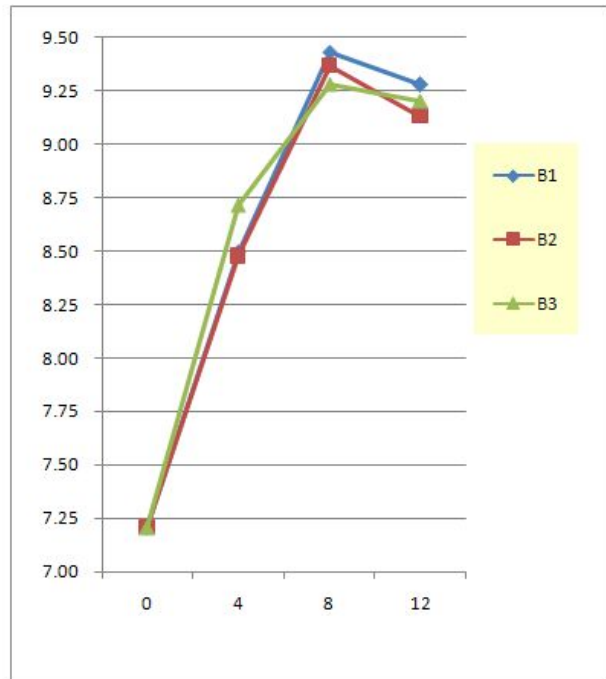
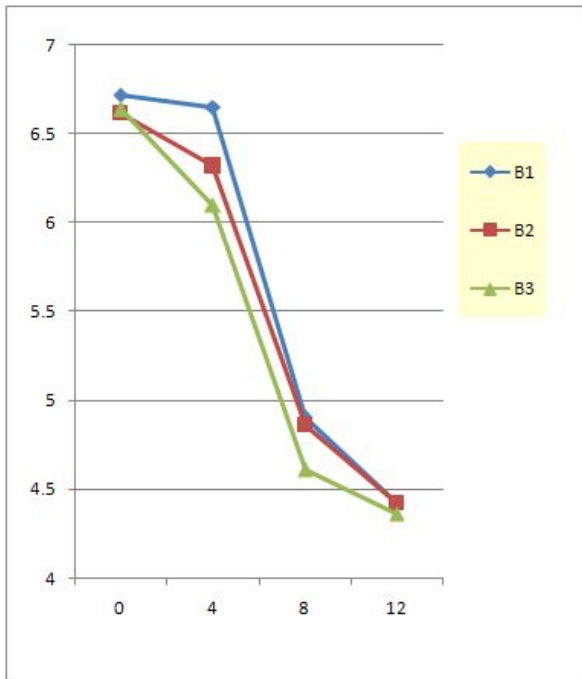


Fig. 2.3.10 호상요구르트 배양액의 pH변화 Fig. 2.3.11 호상요구르트 배양액의 유산균수 변화

호상요구르트 배양액에 EWP와 MEWP를 첨가한 결과 산진전 속도는 개선된 것으로 나타났으며, 이 때 EWP보다 MEWP가 더 효과적이었다. 일반적으로 호상요구르트 또는 드링크요구르트를 제조할 때 38~42℃에서 배양하므로 배양시간은 4시간 30분에서 8시간 정도가 소요되고 있다. 본 실험에서는 36℃에서 실시하였으므로 무첨가 시료의 경우 8시간 안에 완료되지 못하고 8~12시간 사이에 완료된 것으로 나타났다.(배양 종료 시점을 통상적인 pH 4.5로 정할 경우) 시유에 아무것도 첨가하지 않았을 때보다 설탕이나 탈지



분유들을 첨가하였을 때 EWP나 MEWP의 첨가 효과가 낮아지는 경향을 보였는데 이는 다른 첨가물질들도 생육 촉진에 적극적인 효과를 나타내었기 때문으로 보인다. 배양 중 유산균수는 시료 3가지 모두 큰 차이 없이 유사한 결과를 보였다. 이는 EWP와 MEWP의 성분들이 탈지분유와 설탕의 촉진효과와 간섭되어 특별히 더 뛰어난 효과를 나타내지 못한 것으로 추정된다. 따라서 효상요구르트와 같이 단기간 배양하는 경우에는 탈지분유나 설탕을 뛰어넘는 더욱 강력한 생육촉진효과를 갖도록 첨가제를 개선할 필요가 있다고 본다.

(마) 치즈에의 응용

치즈는 중온균에 의해 원유를 발효하기 때문에 산진전이 비교적 느린 편이다. 만일 박테리오파지의 오염이 있으면 치즈 커드가 생성되지 않는 치명적 결함이 되기 때문에 치즈의 발효는 매우 중요하다. 이따므로 치즈제조 시 나오는 유청을 주요성분으로 하는 발효촉진 물질을 스타터 첨가시 스타터액으로 첨가해주는 것을 고려해 볼 수 있다. 치즈 제조 시 유산균이 우점하면 이차적인 오염에도 강하게 견딜 수 있을 뿐만 아니라 발효 지연으로 인한 제조시간 연장도 방지할 수 있는 이점이 있게 된다.

① 치즈 배양액의 조성

Table 2.3.18 배양액의 조성

원료 / 배양액 종류	C1	C2	C3
시유	100	99	99
EWP		1	
MEWP			1
합 계	100	100	100

② 실험 방법

시유와 첨가물을 계량하여 잘 혼합하고 증탕으로 100℃ 끓는 물에서 20분간 살균하였다. 이어서 36℃로 냉각한 다음 R-703(Chr. Hansen) 치즈 종균을 접종하여 배양하였다. 2시간 간격으로 pH와 유산균 생균수를 검사하여 생육촉진 효과를 비교 평가하였다.

③ 실험 결과

Table 2.3.18 배양시간별 pH의 변화

배양시간 / 시료	C1	C2	C3
0	6.73	6.60	6.61
2	5.56	5.42	5.16
4	4.77	4.80	4.68
6	4.50	4.59	4.56

Table 2.3.19 배양시간별 유산균수의 변화

배양시간 / 시료	C1	C2	C3
0	$2.4 \times 10^8$	$2.4 \times 10^8$	$2.4 \times 10^8$
2	$1.1 \times 10^9$	$8.7 \times 10^8$	$1.3 \times 10^9$
4	$1.8 \times 10^9$	$1.5 \times 10^9$	$1.4 \times 10^9$
6	$1.4 \times 10^9$	$1.1 \times 10^9$	$3.6 \times 10^9$

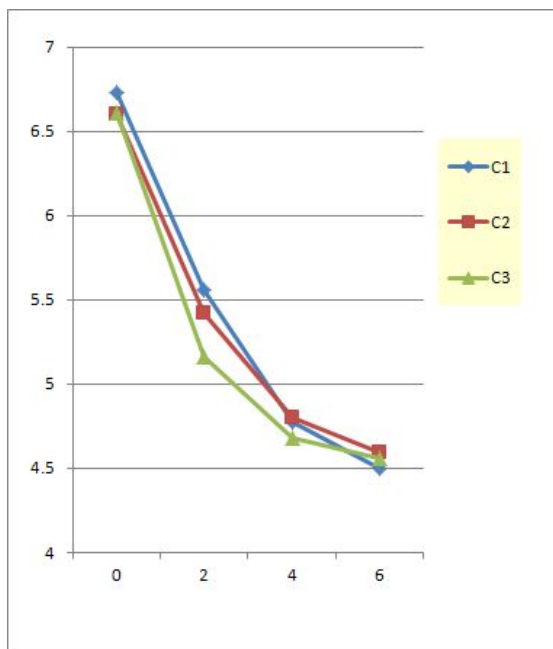


Fig. 2.3.12 치즈 배양액의 pH 변화

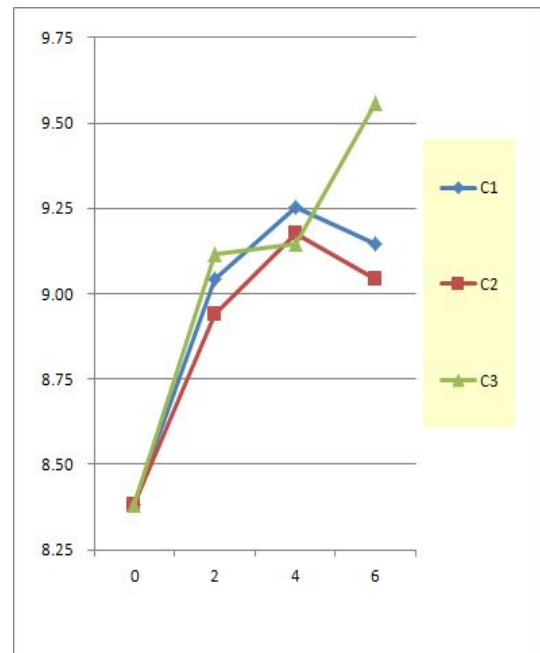


Fig. 2.3.13 치즈 배양액의 유산균수의 변화

치즈 종균은 중온균으로서 일반적으로 32~33℃ 내외에서 배양을 하는데, 요구르트 배양과 동시에 비교하기 위하여 편의상 36℃에서 실시한 결과 무첨가 시료와 EWP첨가 시료간에 산진전 속도는 별로 차이가 나지 않았으며, 유산균수는 오히려 무첨가 시료가 약간 더 높아서 결과적으로 EWP 첨가에 의한 효과는 관찰되지 않았다. 그렇지만 MEWP의 경우는 산진전 속도도 빨라졌고 유산균수 역시 다른 시료보다 높게 나온 것으로 미루어 중온균도 생육촉진하여 치즈의 발효에도 기여할 것으로 보인다. 치즈는 원래 원유에

효소와 유산균, 그리고 소금 외에는 다른 첨가물이 없는 것을 감안할 때 연구된 조성물을 첨가할 경우에는 스타터의 형태로 첨가하는 것이 바람직하며, 박테리오파지의 위험이나 산진전이 현저히 둔화될 때 적용을 고려할 만하다고 평가된다. 대체로 치즈 종균인 R-703을 36℃에서 배양할 때 동일 시간에서 요구르트보다 훨씬 더 빨리 산진전이 이루어졌는데, 이것은 초기 유산균의 농도가 mL당 10<sup>6</sup> 이 아닌 10<sup>8</sup>으로 매우 높았기 때문이 아닌가 추측되며, 추후 실험 시 유산균 접종 농도를 낮추어서 실험을 실시할 계획이다.

### 제 3 절 제 3년차 연구개발수행 내용 및 결과

#### 1. 연구범위 및 연구수행 방법

##### 가. 제 1세부 과제

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1. 농축 치즈유청을 이용한 prebiotics 및 활용기술 개발	1. 갈락토올리고당 (GOS)이 다량 함유된 prebiotic 물질 생산 기술 개발 2. 농축유청 발효액으로부터 갈락토올리고당(GOS)의 분리 정제 기술 개발 3. 시제품제조 4. Prebiotics 소재의 유용 미생물 증식 촉진효과 검토	1. High pressure homogenizer 처리공정을 추가해 만든 조효소액으로 갈락토올리고당(GOS)을 생산 2. 원심분리 및 한외여과를 통한 분리/정제 3. 농축기를 이용한 농축을 통해 갈락토올리고당 (GOS) 시제품 제조 4. <i>L. rhamnosus GG</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> 등 유용미생물을 여러 조건에서 키워 증식 촉진 효과 검토
2. 치즈 유청 단백질의 생리적 기능성 탐색 및 특수 식품소재 개발	1. 유청단백질 가수분해물과 락토펜의 기능 연구 - <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> 모델 적용	1. 유청가수분해물의 염증과 알러지 및 항산화 효과 - HMC-1세포와 Raw264.7세포를 이용한 염증과 알러지 영향 - 항산화 기능 2. 유청가수분해물의 항원성 저감 - 실험동물을 이용한 항원성 저감 조사 3. 유청단백질의 기능성 소재 기반 구축
3. 치즈유청으로 부터 Growth Promotion 물질 및 생산공정 개발	1. 효소분해 유청농축액을 건조하여 분말 제조 2. 효소분해를 위한 탱크 제작 3. 제조과정 시뮬레이션	1. 1차년도 기 선발한 Protease와 Lactase로 유청농축액을 가수분해하고 이를 진공건조 또는 분무건조하여 분말제조하는 공정 평가 2. 유청농축액을 효소분해하기 위한 소규모 반응탱크 제작 3. Growth Promotion 물질을

		제조하는 과정을 시뮬레이션하여 공정에 소요되는 시간 등을 프로세스 화함
--	--	---

2. 세부연구수행 결과

(1) 갈락토올리고당(GOS)이 다량 함유된 prebiotic 물질 생산 기술개발

- 기존 조효소액 제조 방법에서 Sonication 처리 전 High pressure homogenizer(SPX APV-1000)을 이용해 740bar(=10732.83psi)의 압력으로 *L. paracasei*를 세포파쇄를 한 후에 lysozyme을 처리한 후 Sonication 처리하였다

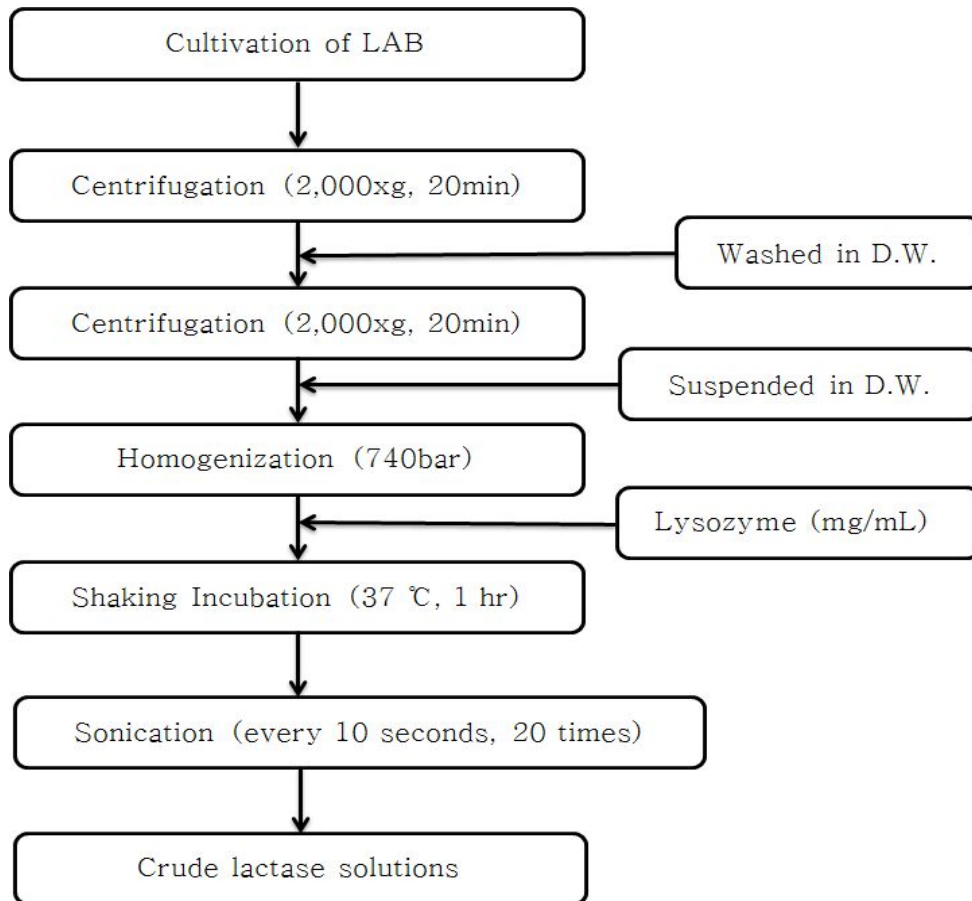


Fig. 3.1.1. Preparation of crude lactase solutions (improved)

위의 Fig. 3.1.1은 2차년도의 조효소액 생산하는 과정에서 균질과정이 추가된 그림임.

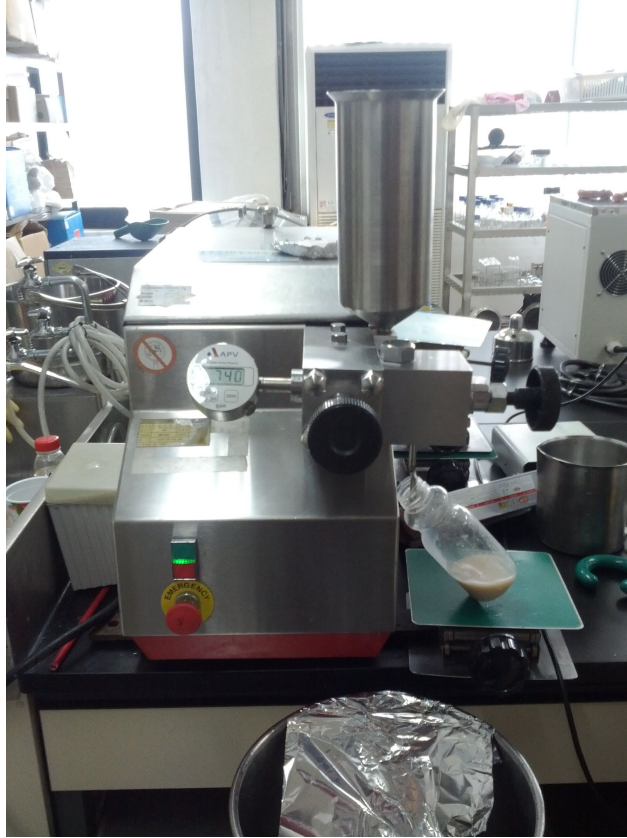


Fig. 3.1.2. High pressure homogenizer를 이용한 세포 파쇄

위의 Fig. 3.1.2는 유산균을 대량 배양하고 2회 원심분리하여 얻은 pellet을 lysozyme 처리 전 homogenizer 처리를 하고 있는 그림이다.

Table 3.1.1. *L. paracasei* 유래 lactase에 의해 생산한 갈락토올리고당(GOS)의 정량

단위 : %DB

Sample 명	농도 (Bx)	Unkown Dpl	Fructose	Galactose	Dextrose	GOS2 (1)	GOS (2)	Lactose	GOS2 (3)	GOS 3	GOS 4+	Total GOS
A-1	29.2	0.10	0.16	2.07	2.61	1.06	2.56	60.67	0.85	3.95	25.97	34.39
A-2	30.2	0.00	0.16	2.36	2.62	0.92	2.02	59.12	0.74	4.20	27.86	35.74
B-1	29.8	0.12	0.16	2.07	2.90	0.73	3.22	60.93	0.74	4.66	24.47	33.82
B-2	30.4	0.13	0.17	2.16	3.01	0.85	3.28	59.83	0.74	4.79	25.04	34.70
C-1	20.6	0.00	0.00	1.42	1.88	0.45	0.00	93.96	0.81	0.98	0.50	2.74
C-2	20.6	0.00	0.00	1.47	1.87	0.59	0.00	93.57	0.99	0.87	0.64	3.09
D-1	23.2	0.40	0.12	2.70	3.21	0.86	2.18	61.29	0.83	4.28	24.13	32.28

\* Total GOS = GOS2(1) + GOS(2) + GOS2(3) + GOS 3 + GOS4+

위의 표는 Fig 3.1.1.의 방법으로 생산해낸 조효소액으로 갈락토올리고당(GOS) 생산 후 HPLC를 이용해 정량한 값으로 Sample A에 존재하는 갈락토올리고당(GOS)은 평균 35.0 64%로써 다른 샘플에 비해 높은 값을 가진다는 것을 볼 수 있다. 여기서 샘플은 A는 유청 30%, B는 유청 30% 가수분해물, C는 유당 30%, D는 유청 25%이다.

## (2) 농축유청 발효액으로부터 갈락토올리고당(GOS)의 분리/정제 기술 개발

- 농축유청 발효액으로부터 갈락토올리고당(GOS)을 분리/정제하기 위해 한외여과법을 사용하였다.

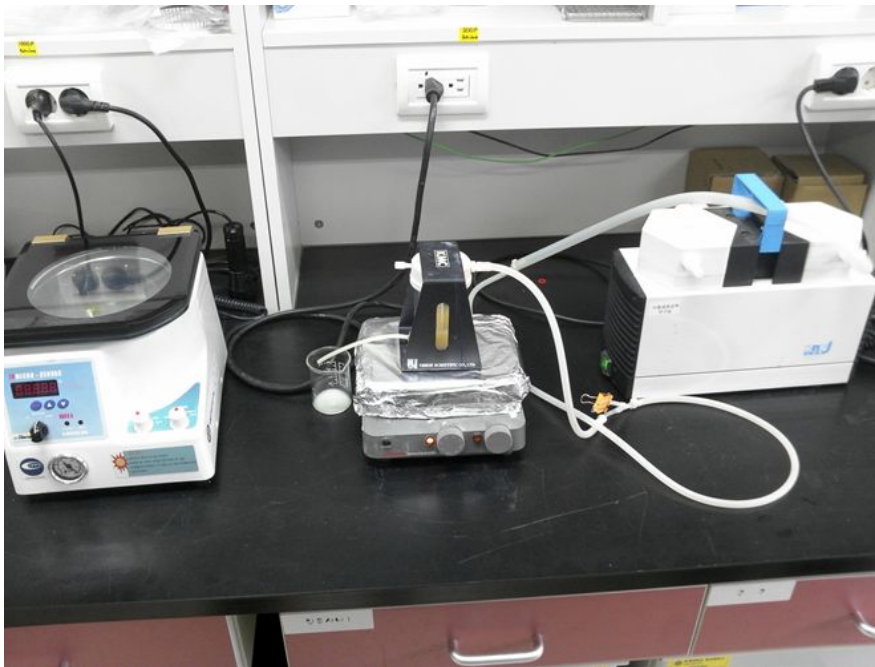


Fig. 3.1.3. 한외여과기, pump, stirrer

- 위의 그림(Fig. 3.1.3.)에 사용된 기기 및 재료는 Ultrafiltration (KMC-86S, KMC), Ultrafiltration Membrane (YM10. MILLIPORE), pump (LABOPORT, KNFLAB), Stirrer/Hotplate (CORNING)이다. 한외여과를 하기 전 원심분리 처리를 하여 고분자 물질들을 분리하였다.

(3) 시제품 제조

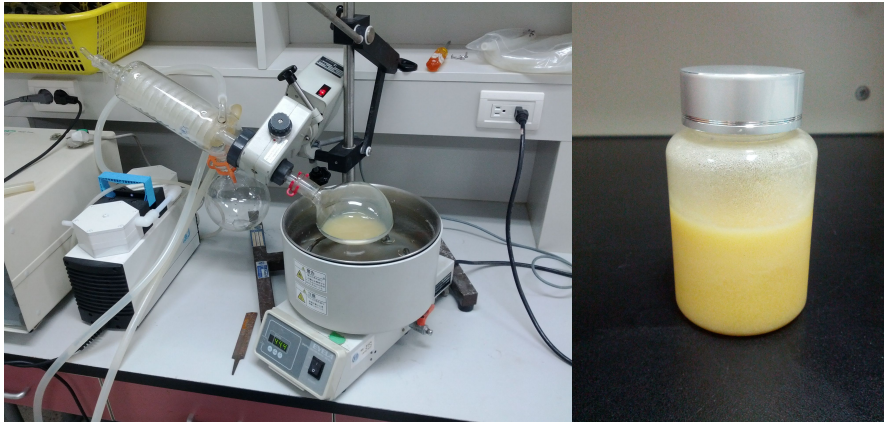


Fig. 3.1.4. 감압농축기를 이용한 농축과정과 시제품

- 감압 농축기(7400 Tübingen, Edmund Bühler)를 이용해 한외여과 처리한 농축GOS 액을 수분함량이 25%될때까지 처리하였다.

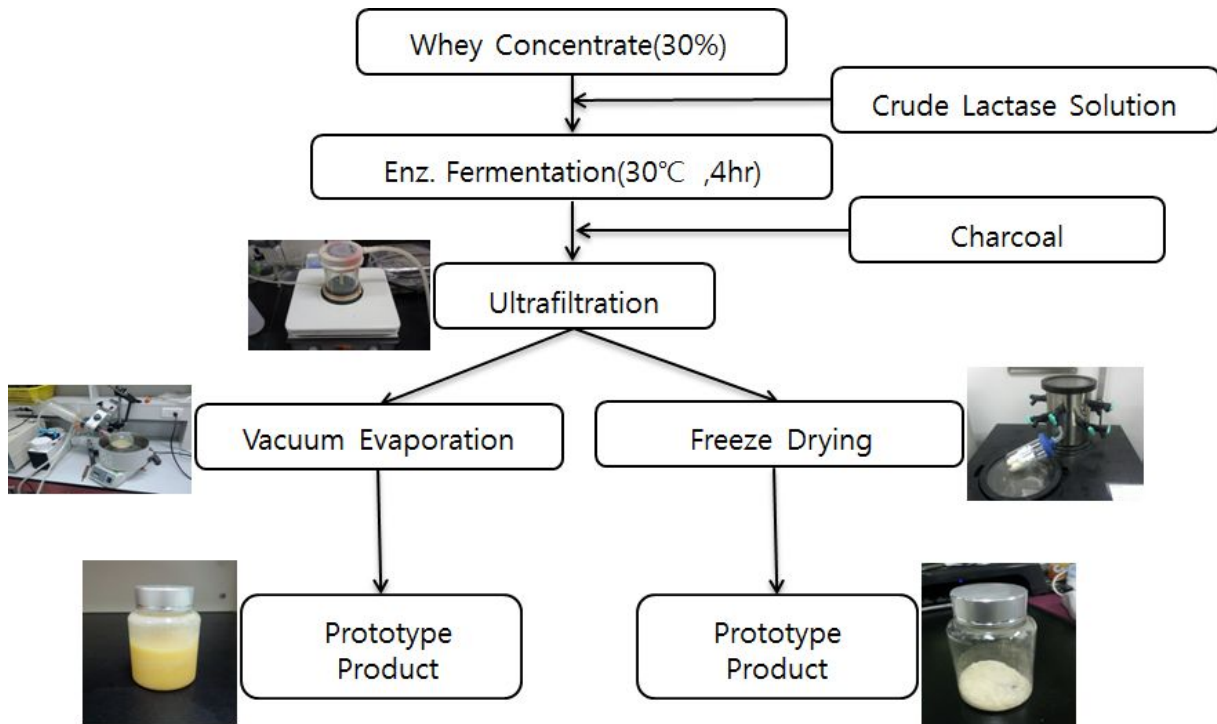


Fig. 3.1.5. 농축유청 발효액으로부터 GOS의 분리/정제 및 시제품 제조 공정

- 위의 그림(Fig. 3.1.5)은 30% 농축유청을 조효소액으로 처리해 효소 발효과정을 거쳐 제조한 발효액을 활성탄으로 탈취를 하고 난 후 한외여과 공정이후 감압농축, 동결건조를 실시하여 각각 농축GOS 시제품 및 건조GOS 시제품을 제조하는 과정을 도식으로 나타낸 것이다.



(4) Prebiotics 소재의 유용 미생물 증식 촉진효과 검토

(가) *L. rhamnosus GG*

- *L. rhamnosus GG*는 최근에 각광받고 있는 probiotic 유산균이다. 특별한 단백질 선모가 발달돼 있어 장내에서 부착성을 높여주기 때문에 장내 정착성이 좋고, 장내에 오래 머물면서 활동하기 때문에 다른 유산균에 비해 생존율이 높아 뛰어난 장 건강 효과를 나타낸다. LGG 섭취군이 비섭취군에 비해 월등히 낮은 아토피 피부염 발생을 보였는데 핀란드 연구진은 159명의 아토피 이력이 있는 산모를 대상으로 출산 전과 후의 아이의 아토피 피부염 발생 빈도를 측정한 결과 LGG를 섭취한 대상이 섭취하지 않은 대상보다 발생빈도가 반으로 준 연구결과를 발표한 바 있다. LGG 유산균을 쥐에게 투여한 결과 쥐의 간에서 지방축적을 저지하는 기능이 있음을 확인하였고, 호흡기 감염, 감기 예방 효과에 대한 임상시험 결과도 발표되었다. LGG 유산균 바이러스성 감염, 항생제 유발 설사, 여행자 설사 등 위장관 감염 질환을 억제해 소화기 건강에 도움을 줄 수 있다. 이렇듯 장내 환경 개선, 면역 증진, 아토피증 완화, 비만 억제등 많은 효능을 가지고 있다.

- 예비실험에 의해 갈락토올리고당(GOS)을 함유하고 있는 농축유청 발효액 자체에서는 자라지 않는 것을 확인하였다. 잘 자라지 않는 것은 고형분 함량이 너무 높기 때문이라 사료되어 그 다음으로 농축유청 발효액을 4배, 5배, 10배로 희석해서 90℃에서 20분간 살균처리를 한 후 6시간 간격으로 24시간동안 균을 배양시켜 MRS(Difco) 배지에 평판도말을 하여 어느 희석배수에서 가장 잘 자라는지 확인하였다.

Table 3.1.2. *L. rhamnosus GG*의 농축유청 발효액의 희석 배수

Sample	A	B	C
농축유청 발효액 희석	1/4	1/5	1/10

Table 3.1.3. *L. rhamnosus GG*의 배양시간별 생균수 변화

배양시간(hr)	생균수(CFU/mL)		
	A	B	C
0	2.0x10 <sup>5</sup>	2.0x10 <sup>5</sup>	2.0x10 <sup>5</sup>
6	4.4x10 <sup>6</sup>	4.1x10 <sup>6</sup>	3.7x10 <sup>6</sup>
12	2.1x10 <sup>7</sup>	1.7x10 <sup>7</sup>	8.0x10 <sup>6</sup>
18	5.4x10 <sup>7</sup>	3.6x10 <sup>7</sup>	2.1x10 <sup>7</sup>
24	7.0x10 <sup>7</sup>	5.0x10 <sup>7</sup>	4.2x10 <sup>7</sup>

Table 3.1.4. *L. rhamnosus GG*의 배양 시간별 pH 변화

배양시간(hr)	pH		
	A	B	C
0	5.97	5.98	6.12
6	5.76	5.69	5.92
12	5.14	5.17	5.35
18	4.51	4.58	4.91
24	4.33	4.45	4.78

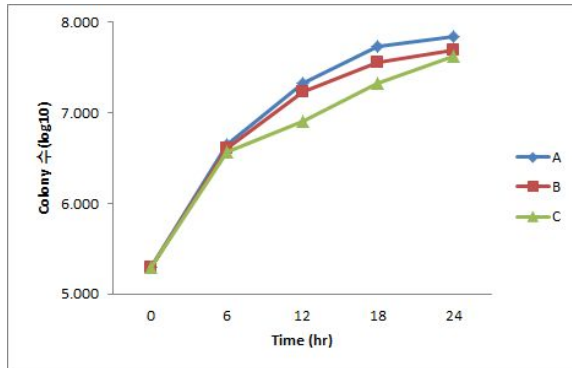


Fig. 3.1.6. 배양시간별 생균수 변화

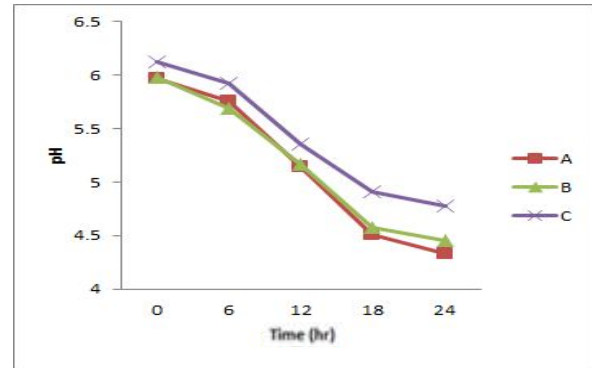


Fig. 3.1.7. 배양시간별 pH 변화

- 위의 표 및 그림을 통해 확인해본 결과 A(농축유청 발효액 4배 희석)가 생균수가 가장 많고, pH도 가장 큰 변화가 있는 것으로 미루어 볼 때 A조건에서 균 배양에 최적화되어있음을 확인하였다.

① 배양액의 조성

㉠ 1/4배 희석 농축유청 발효액 이용

- 농축유청 발효액을 1/4배 희석했을 시 가장 좋은 결과가 나왔고, 이제 1/4배 희석한 농축유청 발효액에 균 생장의 Growth factor 물질을 첨가하여 미생물의 증식을 촉진할 수 있는지 알아보았다. 0.1% Yeast extract(Difco)와 0.1% Garlic powder를 각각 발효액에 첨가해서 90°C에서 20분간 살균처리를 한 후 3시간 간격으로 24시간동안 균을 배양시켜 MRS(Difco) 배지에 평판도말을 하여 첨가물질에 따라 차이가 있는지 확인하였다.

Table 3.1.5. 농축유청 발효액에 첨가한 증식촉진물질

Sample	N	G	Y
증식촉진물질	없음	0.1% Garlic powder	0.1% Yeast extract

Table 3.1.6. *L. rhamnosus GG*의 배양시간별 생균수 변화

배양시간(hr)	생균수(CFU/mL)		
	N	G	Y
0	$1.7 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$
3	$9.5 \times 10^5$	$1.2 \times 10^6$	$1.33 \times 10^6$
6	$4.2 \times 10^6$	$6.1 \times 10^6$	$6.3 \times 10^5$
9	$8.5 \times 10^6$	$1.72 \times 10^7$	$1.82 \times 10^7$
12	$1.8 \times 10^7$	$3.9 \times 10^7$	$4.2 \times 10^7$
15	$3.5 \times 10^7$	$7.5 \times 10^7$	$7.58 \times 10^7$
18	$4.8 \times 10^7$	$8.8 \times 10^7$	$8.9 \times 10^7$
21	$5.8 \times 10^7$	$1.12 \times 10^8$	$1.33 \times 10^8$
24	$6.9 \times 10^7$	$1.52 \times 10^8$	$1.82 \times 10^8$

Table 3.1.7. *L. rhamnosus GG*의 배양시간별 pH 변화

배양시간(hr)	pH		
	N	G	Y
0	5.99	5.97	5.91
3	5.7	5.6	5.7
6	5.4	5.3	5.5
9	5.2	5.1	5.3
12	5.09	4.99	4.88
15	4.79	4.61	4.7
18	4.56	4.48	4.52
21	4.38	4.23	4.31
24	4.26	4.19	4.23

Table 3.1.8. *L. rhamnosus GG*의 배양시간별 TA 변화

배양시간(hr)	TA(%)		
	N	G	Y
0	0.112	0.117	0.118
3	0.132	0.131	0.132
6	0.139	0.148	0.148
9	0.188	0.212	0.198
12	0.233	0.239	0.249
15	0.349	0.359	0.359
18	0.481	0.475	0.493
21	0.579	0.559	0.535
24	0.602	0.599	0.587

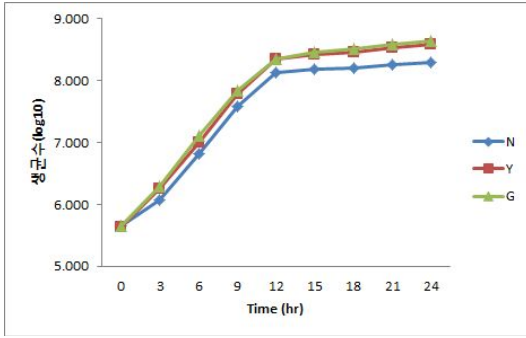


Fig. 3.1.8. 배양시간별 생균수 변화

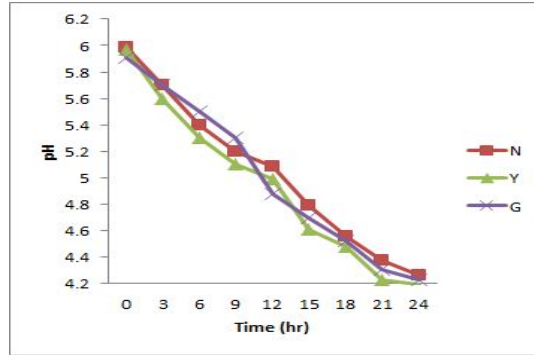


Fig. 3.1.9. 배양시간별 pH 변화

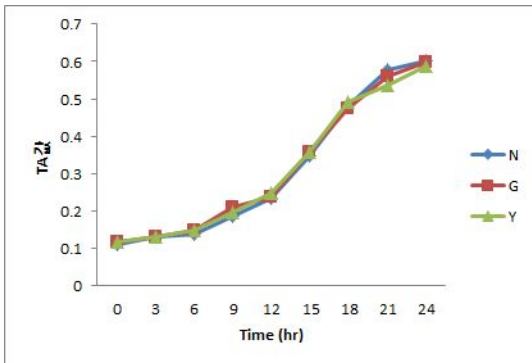


Fig. 3.1.10. 배양시간별 TA 변화

- 실험 결과 대조구에 비해 G(0.1% garlic powder, 움트리, 국산), 또는 Y(0.1% yeast extract, Difco)를 첨가한 농축유청 발효액에서 미생물의 증식이 증가되었으나 시험구간에는 차이가 크지 않았다.

㉔ 가수분해(Alcalase) 처리한 1/4배 희석 농축유청 발효액 이용

- GOS 생산하기 전에 alcalase로 가수분해 처리한 농축유청 발효액을 이용해 미생물을 배양했을 시 유청단백질 가수분해물이 Growth factor로 균 성장을 촉진하기 때문에 기존 농축유청 발효액과 비교해 효과가 있는지 확인하기 위해 가수분해 처리했다는 점을 제외하고 동일한 과정으로 실험을 하였다.

Table 3.1.9. 농축유청 발효액에 첨가한 증식촉진물질

Sample	N	G	Y
증식촉진물질	없음	0.1% Garlic powder	0.1% Yeast extract

Table 3.1.10. *L. rhamnosus* GG의 배양시간별 생균수 변화

배양시간(hr)	생균수(CFU/mL)		
	N	G	Y
0	$2.0 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$
3	$9.8 \times 10^5$	$1.19 \times 10^6$	$1.45 \times 10^6$
6	$2.5 \times 10^6$	$4.11 \times 10^6$	$4.9 \times 10^6$
9	$9.9 \times 10^6$	$1.72 \times 10^7$	$1.99 \times 10^7$
12	$2.0 \times 10^7$	$5.2 \times 10^7$	$6.3 \times 10^7$
15	$5.0 \times 10^7$	$1.02 \times 10^8$	$1.35 \times 10^8$
18	$5.9 \times 10^7$	$1.35 \times 10^8$	$1.69 \times 10^8$
21	$8.5 \times 10^7$	$1.89 \times 10^8$	$2.29 \times 10^8$
24	$1.00 \times 10^8$	$2.20 \times 10^8$	$2.52 \times 10^8$

Table 3.1.11. *L. rhamnosus* GG의 배양시간별 pH 변화

배양시간(hr)	pH		
	N	G	Y
0	5.98	5.97	5.91
3	5.72	5.6	5.7
6	5.36	5.32	5.5
9	5.2	5.1	5.3
12	5.09	4.99	4.88
15	4.79	4.61	4.7
18	4.56	4.58	4.52
21	4.38	4.23	4.31
24	4.24	4.16	4.13

Table 3.1.12. *L. rhamnosus* GG의 배양시간별 TA 변화

배양시간(hr)	TA(%)		
	N	G	Y
0	0.113	0.111	0.119
3	0.133	0.129	0.133
6	0.147	0.149	0.152
9	0.186	0.188	0.199
12	0.231	0.241	0.244
15	0.356	0.362	0.365
18	0.480	0.510	0.530
21	0.585	0.588	0.601
24	0.590	0.65	0.69

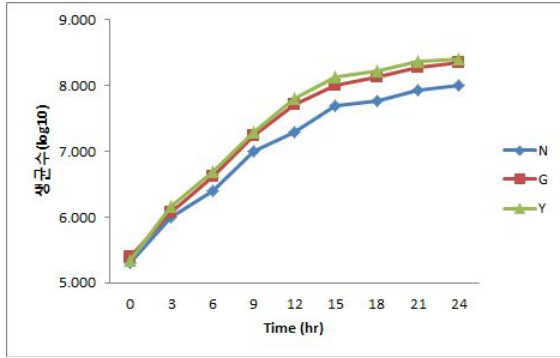


Fig. 3.1.11. 배양시간별 생균수 변화

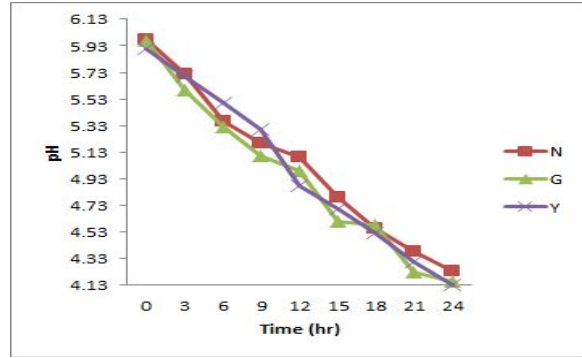


Fig. 3.1.12. 배양시간별 pH 변화

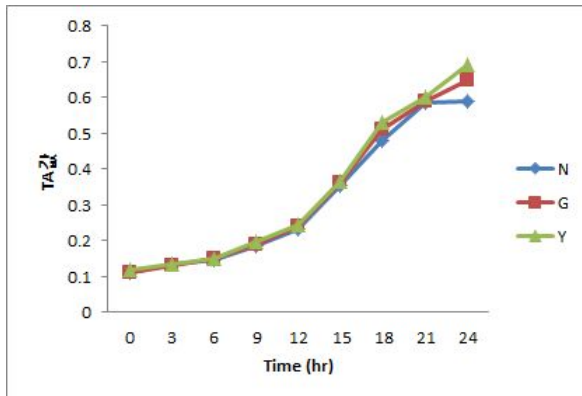


Fig. 3.1.13. 배양시간별 TA 변화

- 실험 결과, 가수분해하지 않은 농축유청 발효액보다 가수분해한 농축유청 발효액에서 LGG 유산균의 증식이 촉진되었다. 가수분해한 농축유청 발효액을 이용해 첨가물질을 서로 달리한 실험을 확인한 결과, 가수분해하지 않은 농축유청 발효액과 유사하였다.

#### (나) *Bifidobacterium longum*

- *Bifidobacterium longum*은 대표적인 장내 유익 미생물로 장내부패 억제, 유해물질의 흡수 저해, 장내 산생성, 장내 건강 유지등 역할을 하는 probiotics이다.

##### ① 배양액의 조성

##### ㉠ 1/4배 희석 농축유청 발효액 이용

- *L. rhamnosus GG* 균배양과 동일하게 1/4배 희석한 농축유청 발효액에 균 생장의 Growth factor 물질을 첨가하여 미생물의 증식을 촉진할 수 있는지 알아보았다. 0.1% Yeast extract(Difco)와 0.1% Garlic powder를 각각 발효액에 첨가해서 90℃에서 20분간 살균처리를 한 후 3시간 간격으로 24시간동안 균을 배양시켜 BL agar 배지에 평판도말을 하여 첨가물질에 따라 차이가 있는지 확인하였다.

Table 3.1.13. 농축유청 발효액에 첨가한 증식촉진물질

Sample	N	G	Y
증식촉진물질	없음	0.1% Garlic powder	0.1% Yeast extract

Table 3.1.14. *Bifidobacterium longum*의 배양시간별 생균수 변화

배양시간(hr)	생균수(CFU/mL)		
	N	G	Y
0	$4.5 \times 10^5$	$4.2 \times 10^5$	$5 \times 10^5$
3	$8.5 \times 10^5$	$10.2 \times 10^5$	$12.8 \times 10^5$
6	$4.0 \times 10^6$	$7.2 \times 10^6$	$6.8 \times 10^6$
9	$2.0 \times 10^7$	$5.2 \times 10^7$	$4.9 \times 10^7$
12	$7.8 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$
15	$1.2 \times 10^8$	$2 \times 10^8$	$1.9 \times 10^8$
18	$1.59 \times 10^8$	$2.5 \times 10^8$	$2.39 \times 10^8$
21	$1.8 \times 10^8$	$3.1 \times 10^8$	$3.7 \times 10^8$
24	$2 \times 10^8$	$4.2 \times 10^8$	$4.9 \times 10^8$

Table 3.1.15. *Bifidobacterium longum*의 배양시간별 pH 변화

배양시간(hr)	pH		
	N	G	Y
0	5.90	5.99	5.95
3	5.78	5.79	5.71
6	5.57	5.55	5.51
9	5.23	5.15	5.16
12	4.97	4.9	4.91
15	4.79	4.71	4.73
18	4.36	4.31	4.32
21	4.28	4.23	4.21
24	3.78	3.69	3.71

Table 3.1.16. *Bifidobacterium longum*의 배양시간별 TA 변화

배양시간(hr)	TA(%)		
	N	G	Y
0	0.113	0.111	0.119
3	0.133	0.129	0.133
6	0.197	0.179	0.182
9	0.286	0.288	0.299
12	0.331	0.341	0.344
15	0.396	0.382	0.365

18	0.520	0.512	0.53
21	0.631	0.598	0.601
24	0.690	0.70	0.73

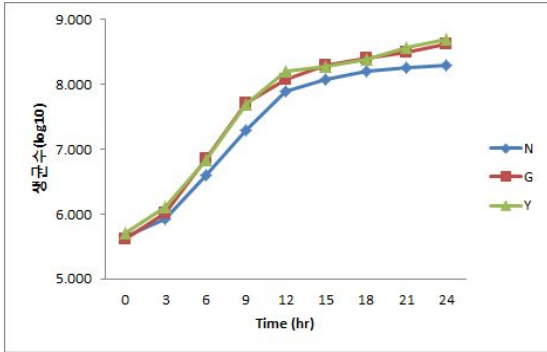


Fig. 3.1.14. 배양시간별 생균수 변화

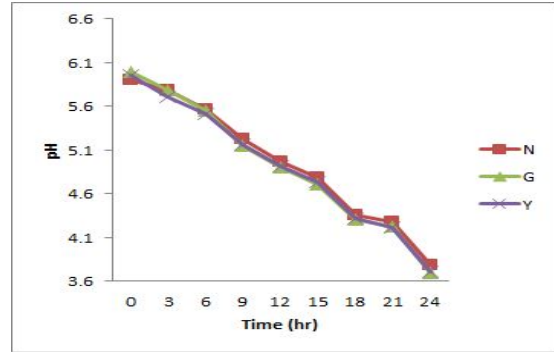


Fig. 3.1.15. 배양시간별 pH 변화

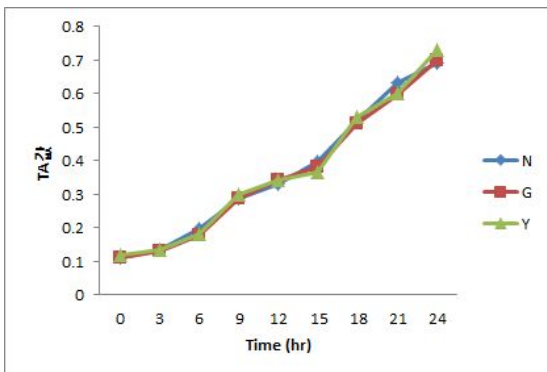


Fig. 3.1.16. 배양시간별 TA 변화

- LGG 배양 결과와 유사한 결과를 보였는데, 대조구에 비해 G(0.1% garlic powder, 움트리, 국산), 또는 Y(0.1% yeast extract, Difco)를 첨가한 농축유청 발효액에서 미생물의 증식이 증가되었으나 시험구간에는 차이가 크지 않았다.

㉠ 가수분해(Alcalase) 처리한 1/4배 희석 농축유청 발효액 이용

- GOS 생산하기 전에 alcalase로 가수분해 처리한 농축유청 발효액을 이용해 미생물을 배양했을 시 유청단백질 가수분해물이 Growth factor로 균 성장을 촉진하기 때문에 기존 농축유청 발효액과 비교해 효과가 있는지 알아보기 위해 가수분해 처리했다는 점을 제외하고 동일한 과정으로 실험을 하였다.

Table 3.1.17. 농축유청 발효액에 첨가한 증식촉진물질



Sample	N	G	Y
증식촉진물질	없음	0.1% Garlic powder	0.1% Yeast extract

Table 3.1.18. *Bifidobacterium longum*의 배양시간별 생균수 변화

배양시간(hr)	생균수(CFU/mL)		
	N	G	Y
0	$3.9 \times 10^5$	$3.6 \times 10^5$	$3.3 \times 10^5$
3	$9.9 \times 10^5$	$1.5 \times 10^6$	$1.6 \times 10^6$
6	$3.7 \times 10^6$	$6.2 \times 10^6$	$6.1 \times 10^6$
9	$1.33 \times 10^7$	$2.69 \times 10^7$	$2.77 \times 10^7$
12	$5.7 \times 10^7$	$1.22 \times 10^8$	$1.33 \times 10^8$
15	$7.0 \times 10^7$	$1.42 \times 10^8$	$1.48 \times 10^8$
18	$8.9 \times 10^7$	$1.89 \times 10^8$	$1.98 \times 10^8$
21	$1.20 \times 10^8$	$2.45 \times 10^8$	$2.55 \times 10^8$
24	$1.47 \times 10^8$	$2.51 \times 10^8$	$2.7 \times 10^8$

Table 3.1.19. *Bifidobacterium longum*의 배양시간별 pH 변화

배양시간(hr)	pH		
	N	G	Y
0	6.03	5.99	5.95
3	5.97	5.86	5.85
6	5.67	5.76	5.73
9	5.62	5.63	5.58
12	5.29	5.11	5.15
15	4.91	4.79	4.75
18	4.58	4.55	4.59
21	4.31	4.27	4.25
24	4.08	3.97	3.98

Table 3.1.20. *Bifidobacterium longum*의 배양시간별 TA 변화

배양시간(hr)	TA(%)		
	N	G	Y
0	0.118	0.115	0.121
3	0.135	0.131	0.135
6	0.158	0.149	0.154
9	0.182	0.191	0.181
12	0.243	0.245	0.245
15	0.357	0.368	0.368

18	0.489	0.513	0.532
21	0.593	0.589	0.609
24	0.692	0.711	0.731

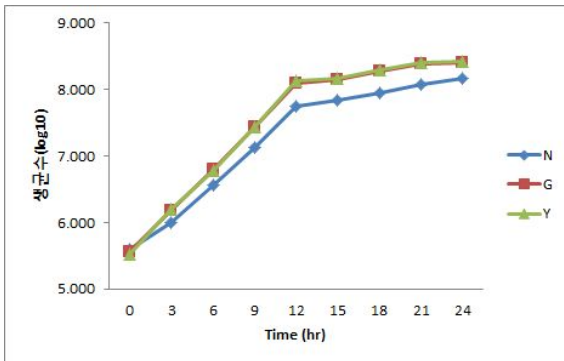


Fig. 3.1.17. 배양시간별 생균수 변화

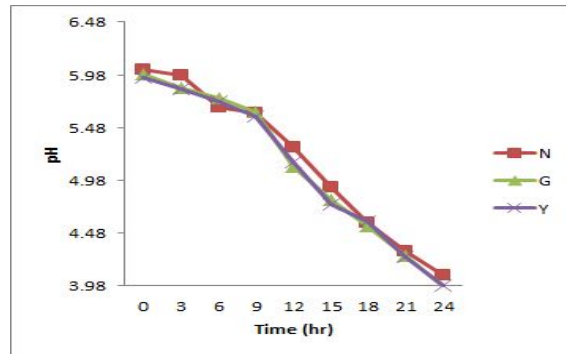


Fig. 3.1.18. 배양시간별 pH 변화

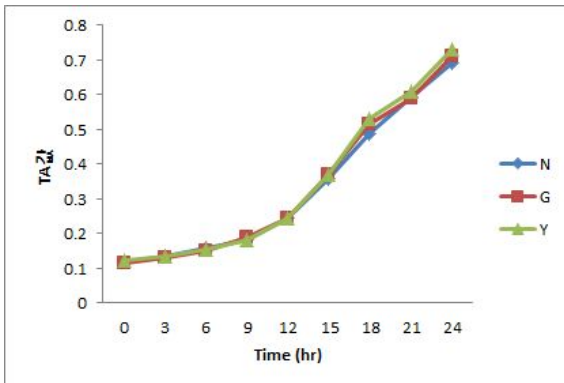


Fig. 3.1.19. 배양시간별 TA 변화

- 실험 결과, 가수분해하지 않은 농축유청 발효액보다 가수분해한 농축유청 발효액에서 LGG 유산균의 증식이 촉진되었다. 가수분해한 농축유청 발효액을 이용해 첨가물질을 서로 달리한 실험을 확인한 결과, 가수분해하지 않은 농축유청 발효액과 유사하였다.

## 나. 제 1협동 과제

### (1) 유청단백질 및 가수분해물이 염증 및 알러지 반응에 미치는 영향

Human mast cell(HMC)-1은  $4 \times 10^5$ /well으로 조정하여 12 well에 10% FBS 함유 IMDM(Gibco, USA)배지로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 세포배양기에서 배양하였다. 배양 8시간 후에 시료를 처리하여 30분간 반응시키고 PMA를 처리하고 6시간 반응시킨 후 세포를 취하고 RNA 분리키트를 이용하여 RNA를 분리하여 염증관련 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-6의 발현을 조사를 위해서 RT-PCR을 수행하였다. Raw264.7 cell은 10% FBS 함유 DMEM(Gibco, USA)배지를 이용하여 10시간 배양 후에 시료를 처리하고 30분 반응 후 LPS를 처리하여 24시간 반응시키고 세포를 회수하여 염증관련 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-6의 발현을 조사를 위해서 그림 1에 나타난 바와 같이 primer를 사용하여 30 사이클로 RT-PCR을 수행하였다.

Fig. 3.2.1.에 나타난 바와 같이 TNF- $\alpha$ 는 대표적인 염증 활성 사이토카인으로 알려진 분자로 사람 기원인 알러지 세포인 HMC-1 cell에 whey protein hydrolysates(WPH) 분자량 3kD 이하의 가수분해물을 처리 했을 경우 TNF- $\alpha$ 의 발현이 억제되는 것으로 나타났다, lactoferrin hydrolysates(LFH)도 분자량 3kD 이상과 3kD 이하의 가수분해물에서 억제되는 양상을 보였다. IL-6는 염증을 억제시키는 대표적인 사이토카인으로 유청단백질 가수분해물 전체를 처리한 구에서 발현이 강하게 나타났고, 전체적으로 유청단백질 및 lactoferrin을 처리안한 구에 비해서 높게 발현이 나타났는데 이는 유청단백질 가수분해물이 염증관련 사이토카인의 발현에 직간접적으로 영향을 미치는 것으로 생각된다.

랫트 대식세포 기원인 Raw 254.7 cell에 유청가수분해물을 처리한 결과 TNF- $\alpha$ 에 미치는 영향은 나타나지 않았으나 IL-6의 발현에는 현저한 영향을 미쳤는데 특히 유청단백질 가수분해물 전체와 분자량 3kD이하 가수분해물, lactoferrin 가수분해물 분자량 3kD 이상, 이하에서 IL-6의 발현이 강하게 나타남을 알 수 있었다. 따라서 유청단백질 가수분해물이 염증 반응의 조절에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다.

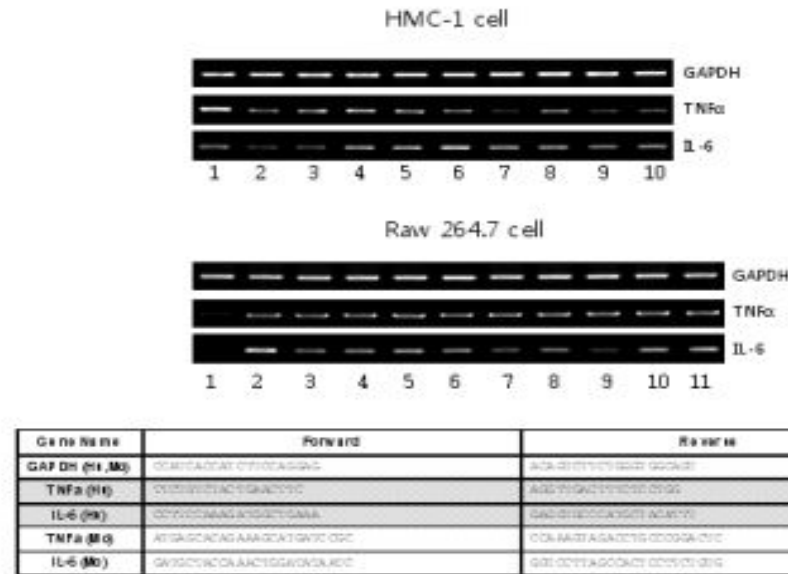


Fig. 3.2.1. 유청단백질 가수분해물이 HMC-1과 Raw 264.7 cell에 대한 TNF- $\alpha$ , IL-6의 발현 양상

**HMC-1 cell** : 1. Neg. 2. PMA 80 nM 3. PMA 160 nM 4. WP 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , PMA 80 nM 5. WPH 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , PMA 80 nM 6. WPH 3kD  $\uparrow$  5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , PMA 80 nM 7. WPH 3kD  $\downarrow$  5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , PMA 80 nM 8. LFH 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , PMA 80 nM 9. LFH 3kD  $\uparrow$  5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , PMA 80 nM, 10. LFH 3kD  $\downarrow$  5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , PMA 80 nM

**Raw 264.7 cell** : 1. Neg. 2. LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3. LPS 50 ng/mL 4.  $\beta$ -LG 100 ng/mL, LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  5. WP 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  6. WPH 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  7. WPH 3kD  $\uparrow$  5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  8. WPH 3kD  $\downarrow$  5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  9. LFH 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  10. LFH 3kD  $\uparrow$  5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  11. LFH 3kD  $\downarrow$  5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$

(2) 가수분해물의 항산화 기능

① DPPH 라디칼 소거능

DPPH radical에 대한 소거활성은 Blois의 방법[2]을 변형하여 측정하였다. 각 시료 20  $\mu\text{l}$ 에 0.1 mM DPPH 180  $\mu\text{l}$ 를 넣고 vortex한 후, 30분 동안 방치한 다음 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 다음 식으로 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능 (\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{반응구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

② 아질산염 소거 작용

아질산염 소거작용은 Kato 등[3]의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 즉, 1mM의  $\text{NaNO}_2$  용액 20  $\mu\text{l}$ 에 시료추출물을 40  $\mu\text{l}$ 를 첨가하고 여기에 0.1 N HCl(pH 1.2) 용액 140  $\mu\text{l}$ 를 가하여 전체를 200  $\mu\text{l}$ 로 하였다. 그리고 37°C에서 1시간동안 반응시켜 얻은 반응액을 40  $\mu\text{l}$ 씩 취하고 여기에 2% 초산 용액 200  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 다음 Griess 시약(30% acetic acid로 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합한 것, 사용직전에 조제) 16  $\mu\text{l}$ 를 가하여 혼합시켜 빛을 차단한 상태로 실온에서 15분간 방치시킨 후 흡

수 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염의 백분율로 나타내었다. 공시험은 Griess시약 대신 증류수를 가하여 같은 방법으로 행하였다

$$N(\%) = [1-(A-B)/(C-D)] \times 100$$

N : 아질산 소거능(%)

A : 시료의 흡광도

B : 시료 대조구의 흡광도

C : Control의 흡광도

D : Control 대조군 mL 흡광도

### ③ Superoxide anion 소거능

Super anion 소거활성은 Okamura등[4]방법을 변형하여 측정하였다. 즉 시료 20 $\mu$ l, 2mM xanthine과 0.1mM NBT 혼합액 160 $\mu$ l를 넣고 0.05mM EDTA가 포함된 50mM potassium phosphate buffer(pH7.4)에 녹인 xanthine oxidase(0.5 unit/ml) 20 $\mu$ l를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응시켰다. 다음, 여기에 2.5N HCl 80 $\mu$ l를 첨가하여 반응을 중지시키고 560nm에서 흡광도를 측정하였다.

DPPH 라디칼 소거능은 유청단백질과 가수분해물 전체에서 거의 없는 것으로 나타났다. superoxide anion 소거능은 lactoferrin 61.3%, lactoferrin 가수분해물 전체 51.67%, lactoferrin 가수분해물 분자량 3kD 이하 58.64%, 유청단백질 가수분해물 분자량 3kD 이하 66.21%로 나타났다. 아질산염 소거 작용은 유청단백질 가수분해물 분자량 3kD 이하에서 22.72%로 미약하게 나타났다. 따라서 전체적으로 유청단백질과 가수분해물의 항산화효과는 superoxide anion 소거능이 어느 정도 있는 것으로 확인되었다.

Table 3.2.1. 유청단백질 가수분해물의 항산화 효과

Sample name	Antioxidant activity					
	DPPH radical scavenging activity		Superoxide anion radical scavenging activity		Nitrite scavenging activity	
	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	%	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	%	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	%
Lactoferrin	1000	133.23	1000	61.30	1000	19.30
	500	-35.31				
	250	-5.19				
Lactoferrin 가수분해물	1,000	30.27	1000	51.67	1000	0.1
Lactoferrin 가수분해물 3kD 이상	1,000	3.86	1000	0	1000	0.08
Lactoferrin 가수분해물 3kD 이하	1,000	4.06	500	58.64	500	0.02
whey protein	500	11.19	500	36.70	500	15.84
	250	1.40				
	125	0.14				
	1,000	25.8	1,000	52.9	1,000	18.33
whey protein 가수분해물	1,000	17.9	1,000	4.0	1,000	16.50
whey protein 가수분해물 3kD 이하	1,000	6.2	1,000	13.2	1,000	14.31
whey protein 가수분해물 3kD 이하	1,000	14.9	1,000	51.7	1,000	22.72
Vit C	-	-	-	-	1,000	98.78

(3) 유청단백질 가수분해물의 항원성 저하 효과

① Competitive Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

㉠ 항체 제작

6주령 Balb/C 마우스 3마리에 유청단백질과  $\beta$ -lactoglobulin을 마리당 10  $\mu$ g을 복강 주사하여 1차 면역시키고 2주일 경과 후 유청단백질과 adjuvant를 혼합하여 2차 면역화 시킨 후 3일 경과한 후에 혈액을 채취하여 혈청을 회수하여 사용하였다. 항체의 역가는 ELISA 방법으로 측정하였고, 1/100,000 농도로 사용하는 높은 역가의 항체를 얻었다(Fig 3.2.2., Fig. 3.2.3.).

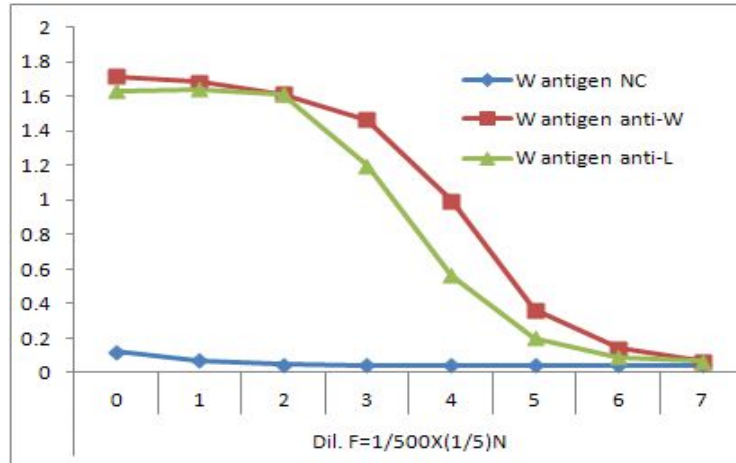


Fig. 3.2.2. Wee protein에 대한 anti-wee protein과 anti- $\beta$ -lactoglobulin의 역가

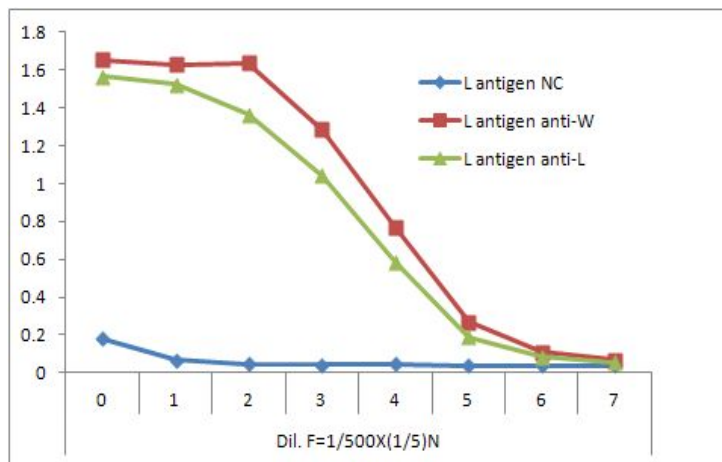


Fig 3.2.3.  $\beta$ -lactoglobulin에 대한 anti-wee protein과 anti- $\beta$ -lactoglobulin의 역가

㉞ 항원성 저감 효과 측정

항원성 저하 효과 측정은 유청단백질 항체와  $\beta$ -lactoglobulin 항체를 이용하여 ELISA 방법으로 측정하였다. 즉, mouse anti-wee protein serum과 mouse anti- $\beta$ -lactoglobulin serum을 유청단백질 가수분해물과의 반응성을 competitive inhibition

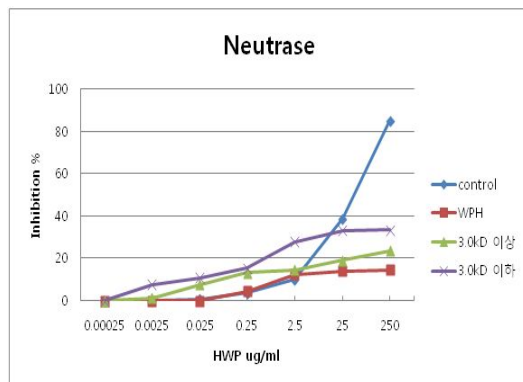
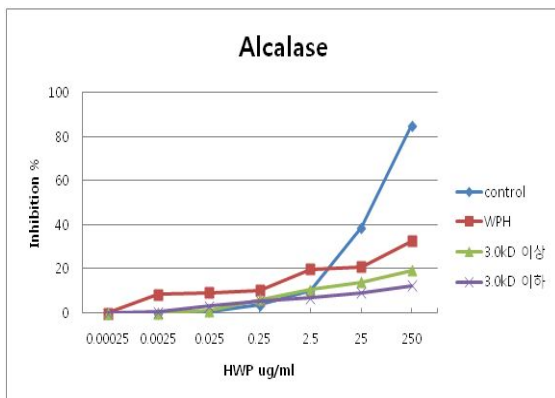
ELISA로 실시하였다. 유청단백질 가수분해물을 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 조정하고 50  $\mu\text{l}$ 를 PVC microtiter plate에 코팅시키고, BSA로 well의 빈 공간을 blocking 하고, 유청단백질 항체와 유청단백질 가수분해물을 0.00025, 0.0025, 0.025, 0.25, 2.5, 25, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 혼합하여 well에 넣고 반응시킨 후 기질반응을 시키고 450 nm에서 흡광률 도측정하여 항원성 저감을 측정하였다.  $\beta$ -lactoglobulin항체를 이용하는 방법도 동일하게 수행하였다.

$$\frac{\text{시료의 OD값} - \text{Blank}}{\text{시료의 최고치 OD값} - \text{Blank}} \times 100 = \text{계산된 값}$$

$$\text{저해율(\%)} = 100 - \text{계산된 값}$$

Alcalase 효소로 처리한 가수분해물 중에서 anti-whey protein serum에 대한 유청단백질 가수분해물, 분자량 3kD이상, 분자량 3kD이하는 control구인 유청단백질에 비해 현저히 낮은 항원성을 보였다. Neutrase 효소로 처리한 가수분해물 중에서도 anti-whey protein serum에 대한 유청단백질 가수분해물, 분자량 3kD이상, 분자량 3kD이하는 control구인 유청단백질에 비해 현저히 낮은 항원성을 보였다. 또한 Pancripsin 효소로 처리한 가수분해물 중에서도 anti-whey protein serum에 대한 유청단백질 가수분해물, 분자량 3kD이상, 분자량 3kD이하는 control구인 유청단백질에 비해 현저히 낮은 항원성을 보였다(Fig. 3.2.4).

Alcalase, neutrase, pancripsin로 처리한 유청단백질 가수분해물 중에서 anti-whey protein serum에 대한 대조구인 유청단백질에 비해서 항원성이 현저히 저감되었는데 neutrase, pancripsin은 비슷한 경향을 나타내었고 alcalase가 약간 높게 나타났다. 가수분해물 분자량 3kD 이상에서는 pancripsin, alcalase, neutrase순으로 항원성 저감이 나타났다. 또한 분자량 3kD이하에서는 alcalase, neutrase는 거의 동일한 양상으로 아주 낮은 항원성 저감을 나타내었고, neutrase는 조금 높게 나타났다(Fig 3.2.5).





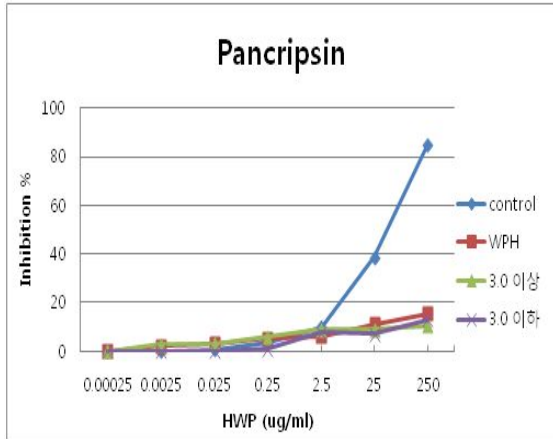


Fig. 3.2.4. Alcalase, Neutrase, Pancipisin으로 가수분해된 유청단백질에 대한 anti-whey protein serum을 이용한 항원성 저감

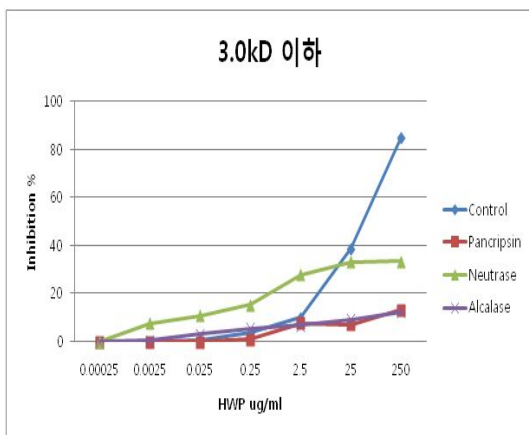
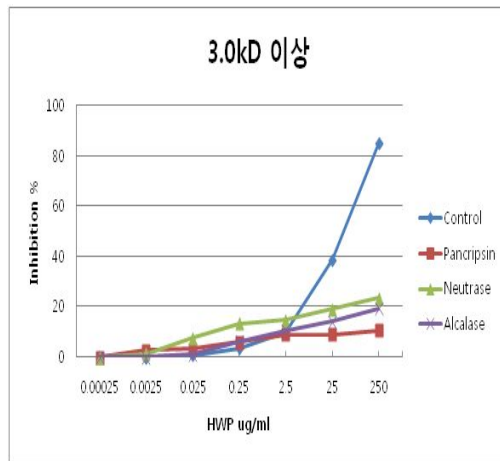
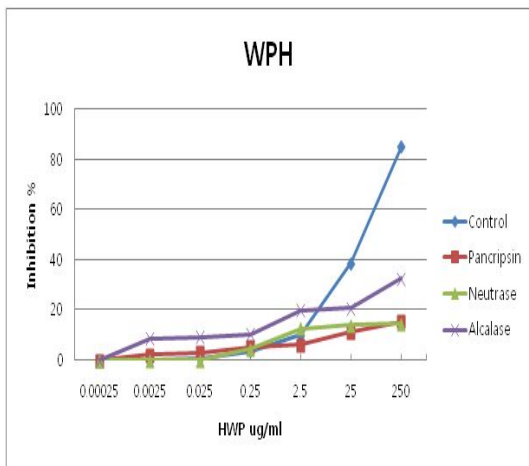


Fig. 3.2.5. Alcalase, Neutrase, Pancipisin 가수분해물인 WPH, 3kD ↑, 3kD ↓에 대한 anti-whey protein serum을 이용한 항원성 저감

Alcalase 효소로 처리한 가수분해물 중에 anti-β-lactoglobulin serum에 대한 가수분해물, 가수분해물 분자량 3kD이상, 가수분해물 분자량 3kD이하는 control구인 유청단백질

에 비해 비슷한 수준으로 현저히 낮은 항원성을 보였다.

Neutrase 효소로 처리한 가수분해물에서도 anti- $\beta$ -lactoglobulin serum에 대한 유청단백질 가수분해물, 분자량 3kD이상, 분자량 3kD이하는 control구인 유청단백질에 비해 현저히 낮은 항원성을 보였다. 또한 Pancripsin 효소로 처리한 가수분해물 중에서도 anti- $\beta$ -lactoglobulin serum에 대한 유청단백질 가수분해물, 분자량 3kD이상, 분자량 3kD이하는 control구인 유청단백질에 비해 현저히 낮은 항원성을 보였다(Fig. 3.2.6).

Alcalase, Neutrase, Pancripsin로 처리한 유청단백질 가수분해물 중에서 anti- $\beta$ -lactoglobulin serum에 대한 대조구인 유청단백질에 비해서 항원성이 현저히 저감되었는데 Neutrase, Pancripsin은 비슷한 경향을 나타내었고 Alcalase가 약간 높게 나타났다. 가수분해물 분자량 3kD 이상에서는 Pancripsin, Alcalase, Neutrase 순으로 항원성 저감이 나타났다. 또한 분자량 3kD이하에서는 Alcalase, Neutrase는 거의 동일한 양상으로 아주 낮은 항원성 저감을 나타내었고, Neutrase는 조금 높게 나타났다(Fig. 3.2.7).

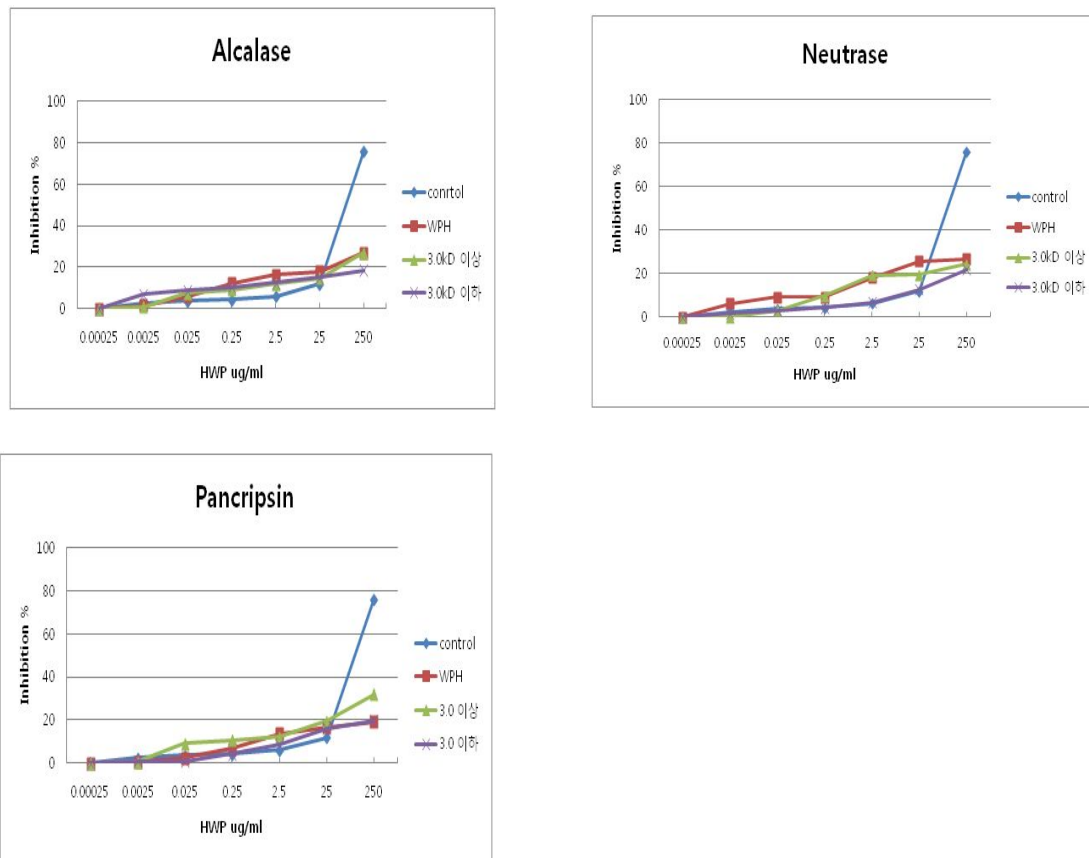


Fig. 3.2.6. Alcalase, Neutrase, Pancripsin에 따른 유청단백질 가수분해물에 대한 anti- $\beta$ -lactoglobulin serum을 이용한 항원성 저감

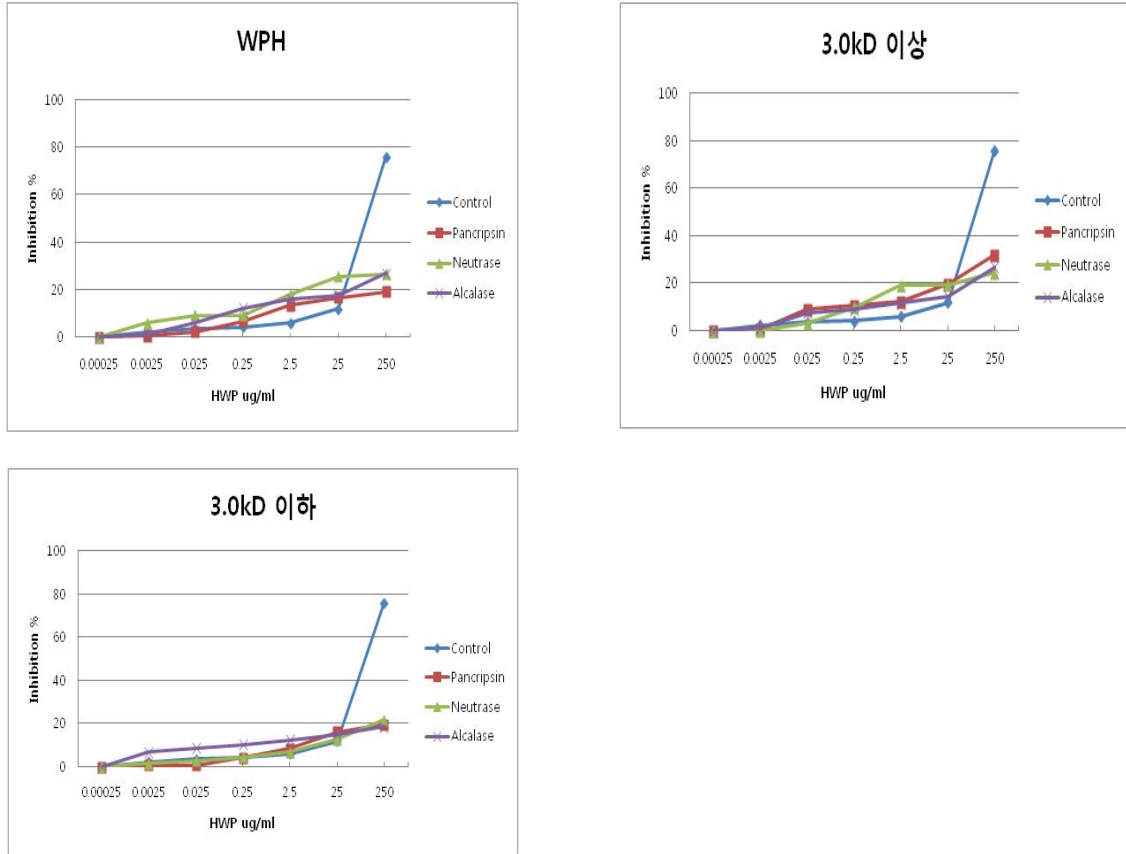


Fig. 3.2.7. Alcalase, Neutrase, Pancipisin 가수분해물인 WPH, 3kD ↑, 3kD ↓에 대한 anti-β-lactoglobulin serum을 이용한 항원성 저감

#### (4) 가수분해물의 mouse IgE 분비에 미치는 영향

##### ① Total IgE

Total IgE는 whey protein과 β-lactoglobulin을 면역화 시킨 마우스 혈액으로부터 혈청을 분리하여 mouse IgE ELISA Kit (Life Science Inc. Usen, USA)를 사용하여 양을 측정하였다. 측정방법은 ELISA assay kit 방법에 따랐다. 마우스의 total IgE의 양은 대조구인 normal mouse는 약 800 ng/mL 인데 비해서 whey protein을 면역화시킨 mouse의 혈액에서는 2,800 ng/mL, β-lactoglobulin을 면역화 시킨 mouse의 혈액에서는 5,100 ng/mL로 높은 함량을 나타내고 있다(Fig. 3.2.8.). 알러지 기전에서 B 세포가 활성화되어 알러지와 관련있는 면역글로블린인 IgE 분비가 촉진되고 분비된 IgE는 비만세포의 수용체와 결합하고 IgE 항원 결합부위에 항원이 교차결합하여 비만세포가 활성화되어 각종 화학적 매개물질들이 분비되어 알러지 증상이 일어나는 것으로 알려져 있다. IgE의 함량이 높게 나타난 것은 유청단백질이 알러지 항원성으로 강하게 작용을 한다는 것을 의미한다. 따라서 유청단백질의 항원성을 저감하는 것이 알러지 반응을 미약하게 하는 방법 중 하나로 알려져 있다.

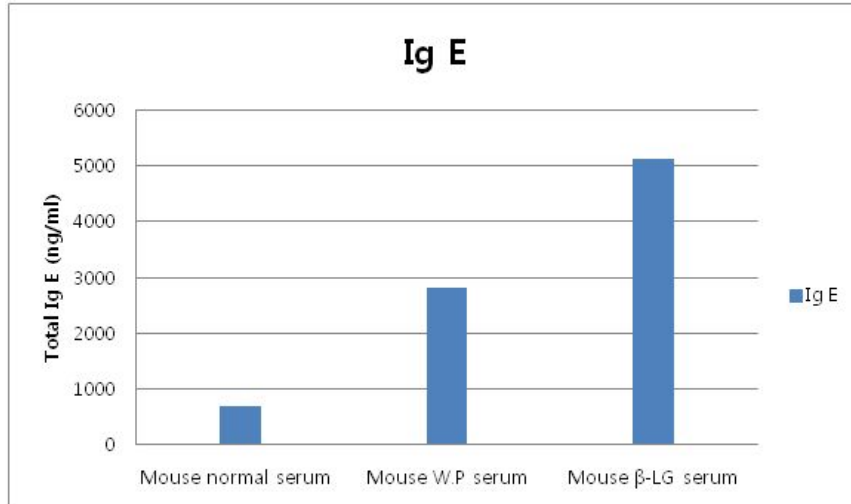
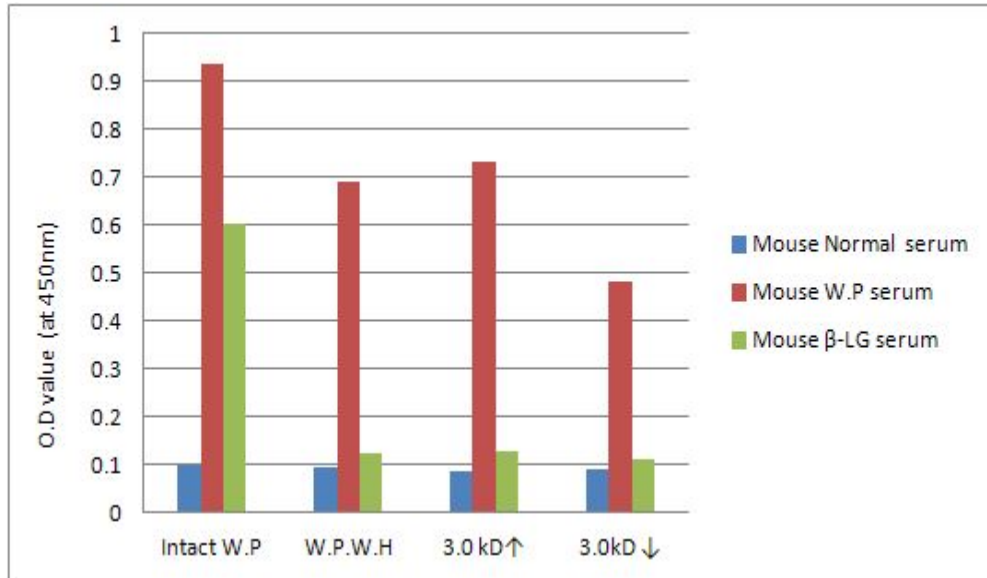


Fig. 3.2.8.. 면역화된 mouse 혈액으로부터 Mouse IgE ELISA Kit에 의한 측정

② Whey protein과 β-lactoglobulin에 대한 특이 immunoglobulin 분비

Whey protein과 β-lactoglobulin에 대한 특이 항체 분비는 유청단백질 가수분해물 (alcalase 처리 가수분해물)을 20 μg/mL로 조정하여 PVC microtiter plate에 coating시키고, BSA로 well의 빈 공간을 blocking 하고, anti-whey protein serum과 anti-β-lactoglobulin serum을 well에 넣고 반응시킨 후 기질반응을 시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하여 특이 면역글로블린을 측정하였다. Mouse normal serum의 흡광도 0.1에 비해서 Intact whey protein 처리구가 mouse whey protein serum과 mouse β-lactoglobulin serum과 반응하는 흡광도 값이 각각 0.94, 0.6으로 현저히 높게 나타났고, whey protein whole hydrolysis(WPWH)는 mouse whey protein serum과 mouse β-lactoglobulin serum과 반응하는 흡광도 값이 각각 0.68, 0.12로 특히 mouse β-lactoglobulin serum과의 반응이 현저히 낮았다. 또한 유청단백질 가수분해물 3.0kD 이상에서는 mouse whey protein serum과 mouse β-lactoglobulin serum과 반응하는 흡광도 값이 각각 0.72, 0.12로 WPWH와 유사하게 나타났고, 3.0kD 이하에서는 mouse whey protein serum과 mouse β-lactoglobulin serum과 반응하는 흡광도 값이 각각 0.48, 0.1로 현저하게 나타났다. 이는 유청단백질의 가수분해물에는 mouse whey protein serum과 mouse β-lactoglobulin serum이 반응하는 항원결정기(epitope)가 intact whey protein에 비해서 많은 부분이 소실되었다는 것을 의미한다. 따라서 항원성이 저감된 유청단백질 가수분해물을 기능성 식품과 의약품 소재로 활용하는 연구가 계속해서 이루어져야 한다고 생각한다.

Fig. 3.2.9. 마우스 혈액에서 whey protein과 β-lactoglobulin에 대한 특이 면역글로블린 분비



(5) 유청단백질의 기능성 소재 기반 구축

다양한 효소를 이용하여 유청단백질 가수분해물을 생산하고, 이에 대한 생리활성 기능을 연구하여 기능성과 기전을 밝히는 것이 대학교에서 수행해야 되는 과제라 생각한다. 웰빙시대와 고령화 시대에 맞게 장년층, 노년층을 위한 새로운 제품 개발이 필수적이다. 따라서 유청단백질의 산업적 이용을 위해서 기업체는 기능성을 접목 할 수 있는 신제품 개발과 기능성 소재의 대량 생산 시스템을 확립하여 고부가가치의 유청단백질 식품 소재 기반을 구축하는 것이 필요하다.

## 다. 제 2협동 과제

### (1) 치즈유청으로부터 Growth Promotion 물질 및 생산공정의 개발

#### (가) 생산 공정 확립

1차년도에 유청농축액을 원료로 하여 이를 Protease와 Lactase로 가수분해한 시료가 유산균 종류별로 어느 정도 증식촉진 효과가 있는지를 평가하였으며, 이어서 2차년도에는 효소분해한 유청농축액이 다른 원료와 혼합 시 시너지를 나타낼 수 있는지를 확인하여 최종첨가제 조성을 완성하고, 실제로 액상요구르트와 호상요구르트, 치즈 작업시 어느 정도 효과가 있는지를 평가하였다. 3차년도에는 유산균의 Growth Promotion 물질을 실제로 현장에서 제조하는 공정을 확립하고자 연구하였다.

#### ① 효소분해 유청농축액 분말의 제조

기 개발된 실험적 제조공정을 확인하기 위하여 삼익유가공에서 받은 유청농축액 원료를 가지고 효소분해 유청농축액을 제조하였으며, 이를 분무건조와 진공건조 두가지 방법을 시도하여 분말화하였다. 제조공정은 2차년도 개발한 공정과 동일한 Fig. 3.3.1.과 같이 시행하였다.

실험에 사용된 유청농축액의 pH는 6.0이었고, Bx는 30.0° 이었다. 이는 국내에서 일반적으로 사용되는 유청농축액의 규격과 동일하다.

제조공정은 먼저 증탕으로 75℃에서 20분간 교반하면서 살균하였고, 45℃로 냉각한 다음 Protease(NOVO사, Flavourzyme) 0.09%와 Lactase(Valley Research사, Validase 60) 0.09%를 접종하여 Shaking Incubator에서 140rpm으로 교반하면서 3시간동안 반응하였다. 반응이 완료된 효소분해액은 다시 75℃에서 20분간 효소불활성화를 한 다음 건조용 시료로 사용하였다. 진공 건조된 시료는 흡습력이 높아서 공기 중의 수분을 흡수하여 caking 현상이 발생하는 것을 관찰하였다. 따라서 수분차단성이 좋은 포장재와 환경조건에서 보존하여야 할 것으로 보인다. 건조된 시료를 적외선 수분측정기(OHAUS, MB45)로 측정 한 결과는 다음과 같다.

제품의 유형	수분의 법적 기준	측정된 수분 함량
유청분말	5.0% 이하	2.33%

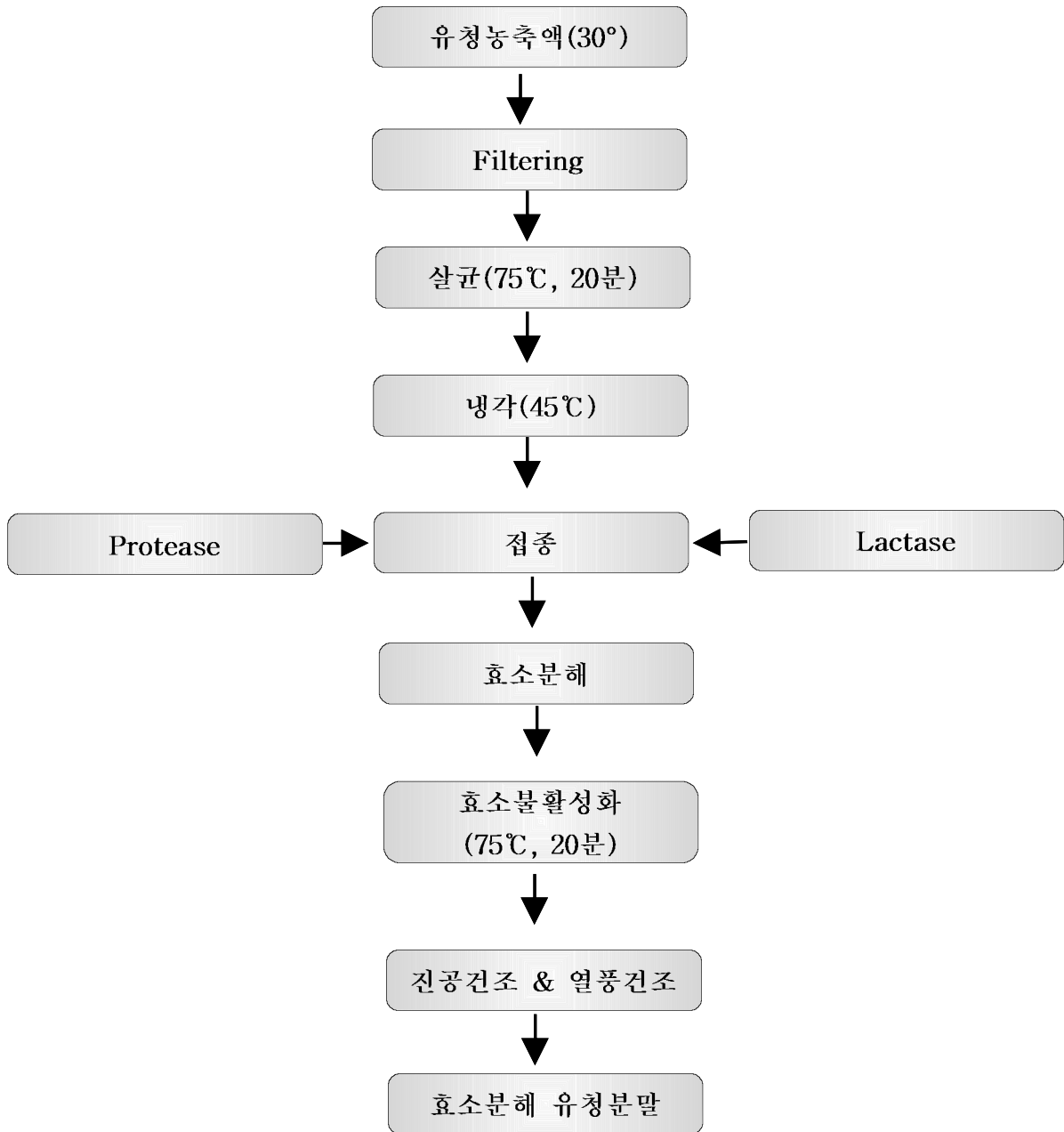


Fig. 3.3.1. 효소분해 유청분말의 시료 제조공정

건조기는 분무건조기로 다음과 같은 조건으로 시도하였으나, 벽에 달라붙는 현상이 심하여 정상적인 시료채취가 어렵다. 따라서 소량시료를 회수하기 위하여 분무건조보다는 진공건조를 사용하는 것이 용이할 것으로 생각되어 다시 진공건조기를 사용하여 효소분해 유청분말을 제조하였다.

\* 분무건조 조건 : 온도 180℃, 배풍온도 90~100℃, Atomizer 회전속도 : 17,000rpm



Fig. 3.3.2. Spray Dryer

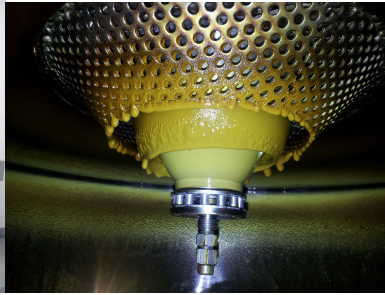


Fig. 3.3.3. Spray Dryer Nozzle

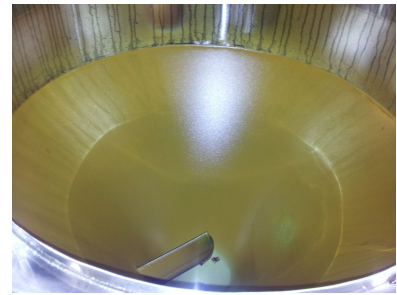


Fig.3.3.4. Spray Dryer Bottom

\* 진공건조 조건 : 자켓온도 70℃, 진공도 670mmHg



Fig. 3.3.5 진공건조기



Fig. 3.36 효소분해 유청분말(샘플)

## ② 효소분해를 위한 탱크 제작

효소분해 및 살균공정을 수행하기 위하여 삼익유가공 공장의 상황에 맞추어 배치 살균되는 탱크 사양으로 제작하였다. 75℃에서 20분간 살균할 수 있고, 45℃로 냉각하여 효소처리를 할 수 있으려면 3중 자켓타입으로 하여 열수와 냉각수가 자켓에 들어갈 수 있도록 하였다. 그리고 효소분해 중에 반응이 원활히 될 수 있도록 교반장치를 부착하였고, 교반의 속도를 가감할 수 있도록 Inverter를 장착하였다. 파이롯트 탱크는 500L 규모로 제작되었는데 실제로 현장에 적용하려면 1,000~1,500L 탱크가 적합할 것으로 예상되었다. 이보다 더 크면 배치로 살균 및 냉각하는데 시간이 많이 소요되는 단점이 있기 때문에 이 용량 규모보다 더 크게 제작하기는 어려울 것으로 추정되었다.

1,000~1,500L 탱크를 제작할 경우, CIP를 원활히 하기 위한 CIP Ball을 장착하고 직접 들어가서



세척하는 것도 가능하도록 할 필요가 있다. 이 장치는 미생물 발효탱크와도 겸용할 수 있는 구조와 조건을 가지고 있어서 향후 다목적용으로 사용할 수 있게 하였다. 다만 열매체로서 스팀을 사용하는지 열수를 사용하는지에 맞추어서 탱크의 사양을 결정해야 하는데, 유청농축액이 열에 약한 특징을 감안하여 스팀보다는 열수가 보다 더 적합한 것으로 판단되었다.

효소분해 처리 시간이 3시간 정도이므로 구태여 온도를 일정하게 유지하기 위한 장치는 없어도 될 것으로 보여, 전기히터를 삽입하지 않았다. 만약 12시간 이상 반응한다면 자켓에 보조 전기히터를 삽입하는 것이 필요할 것이나 겨울철에도 3시간 경과 후 온도가 1~2℃ 정도밖에 편차를 나타내지 않으므로 온도유지에 대한 부분은 무시해도 좋을 것으로 예상되었다. Pilot scale 로 제작된 500L 효소분해 탱크의 사양은 다음 Fig. 3.3.7과 같다.



③ 제조과정 시뮬레이션

Pilot scale로 제작된 500L 탱크를 사용하여 살균 및 냉각 등에 소요되는 시간을 측정한 바 다음과 같은 결과를 얻었다. 이로 판단하여 불 때 효소처리에 소요되는 시간은 총 8시간 20분으로 나타났다으며, 만일 효소불활성화 공정을 생략하게 되면 6시간 40분으로 줄어 들 수 있다.

Table 3.3.1. 효소처리공정(500L 처리 시)

No	공정명	소요시간	세부내용	비고
1	유청 이송	20분	유청 원료 Surge → 효소처리탱크	
2	살균	2시간	8℃ → 75℃ 로 가온	열수로 살균
3	Holding	20분	75℃에서 20분 살균	
4	냉각	30분	75℃ → 45℃로 냉각	지하수로 냉각
5	접종 및 효소분해	3시간	45℃에서 3시간 반응	
6	효소 불활성화	1시간 20분	45℃ → 75℃ 로 가온	열수로 가온
7	Holding	20분	75℃에서 20분 Holding	
8	균질 및 찌지 이송	30분	75℃에서 냉각되는 공정 포함	
합 계		8시간 20분		

- 효소불활성화 공정이 분무건조 시 열처리를 다시 받음으로 인해 생략될 수 있으며, 이 경우 효소불활성화에 소요되는 1시간 40분이 줄어들어 총 6시간 40분이 된다.

- 삼익유가공의 현장에서는 유청 Surge에서 Homomixer 탱크를 경유하여 가온된 것을 균질기를 통과하여 균일하게 된 후 Surge에 넘어가서 대기하다가 분무시스템으로 투입됨. 여기에서 효소처리공정을 삽입하는 것을 검토한 바 Homomixer 탱크로 넘어가기 전에 반응탱크를 2대 설치하는 것으로 하였다. 현장의 공간상 1,500L 탱크 2대 정도를 배치할 여유가 있었으므로 추가하는 것은 별문제가 되지 않을 것으로 보인다. 그리고 신규 제품을 위하여 설비 투자도 최소한 하여야 하므로 탱크 2대를 제작하여 설치하는 비용도 총 3,000만원 내외가 될 것으로 예상되었다.

- 생산량 : 효소처리 유청농축액을 1,500L 두 대의 반응탱크로 작업하면 3톤이 되는데, 고품분이 30%이므로 이를 분무건조하면 총 900kg 의 분말이 얻어진다. 수율 및 생산성을 고려하면 1일 3톤의 효소처리한 것만 분무건조하지 말고 2일간 효소처리하여 6톤을 분무건조하면 1.8톤의 분말을 얻게 된다. 그러므로 2번 작업한 것을 분무건조하는 방향으로 작업을 추진하는 것이 효율적일 것으로 보인다.

Table 3.3.2. 공정별 작업 진도표

(단위 : 분)

공정	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
유청 이송	■											
살균 및 Holding		■	■	■	■	■	■					
냉각							■	■				

공정	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
접종 및 효소분해	■	■	■	■	■	■	■					
효소불활성화								■	■	■		
균질 및 썬지 이송											■	■

삼익유가공의 현장 조건을 감안하여 작업 프로세스 라인을 검토한 것은 다음 Fig. 3.3.8과 같다. 유청작업시는 유청 Surge에서 바로 Homomixer로 들어가는데 이때 효소처리제품은 반응탱크로 바이패스하여 효소처리한 후에 Homomixer로 들어가게 하면, 그 외는 기존 라인의 구조를 그대로 활용할 수 있게 된다.

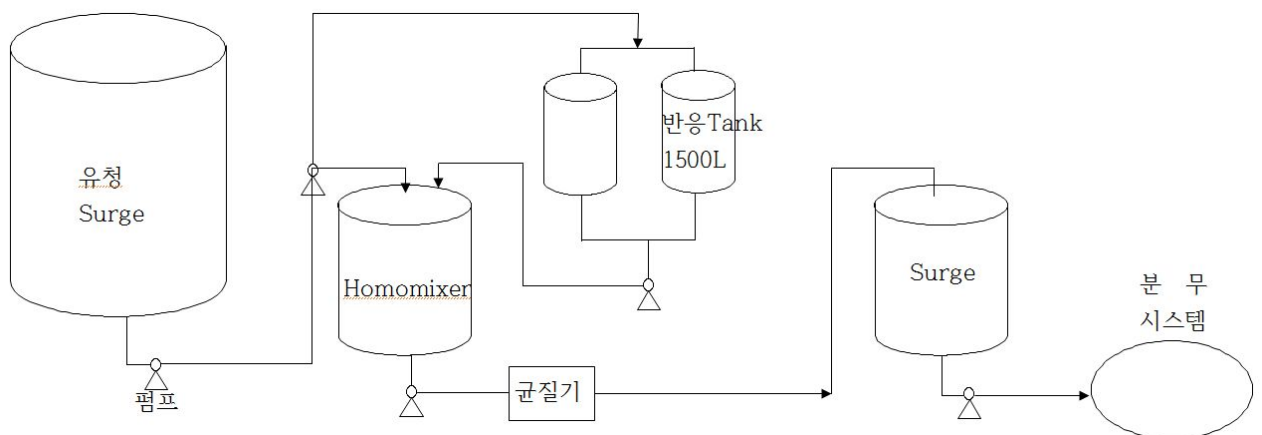


Fig. 3.3.8. 효소처리 프로세스 라인

현재 삼익유가공 공장에서 유청분말 작업하는 설비를 조사한 내용은 다음 그림과 같다.



Fig. 3.3.9. 유청작업실 전경(1)



Fig. 3.3.10. 유청작업실 전경(2)



Fig. 3.3.11. 조합탱크



Fig. 3.3.12. Homomixer 탱크(1)



Fig. 3.3.13. Homomixer 탱크(2)



Fig. 3.3.14. 프림가공라인



Fig. 3.3.15. Surge 탱크



Fig. 3.3.16. Fluid bed



Fig. 3.3.17. 분무실(1)



Fig. 3.3.18. 분무실(2)



Fig. 3.3.19. 중앙제어실

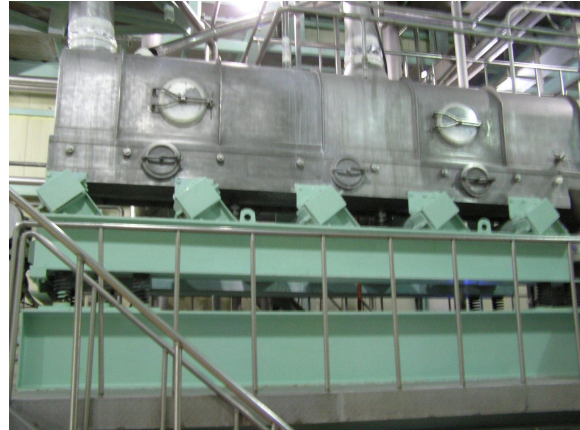


Fig. 3.3.20. Fluid bed (2)

현재 유청분말을 제조하고 있으므로 효소분해유청분말은 유청작업 후 별도의 청소 없이 이어서 작업가능하므로 유청분말 제조 다음에 효소분해유청분말을 제조하는 것이 적합하다. 유청분말에 비하여 효소분해유청분말의 가격은 최소한 2배 상 되는 가치가 있으므로 초기에는 소량부터 작업하여 나중에 주문이 늘면 점점 늘려가도록 하는 것이 바람직할 것으로 예상된다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연도별 연구개발목표 및 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009, 주관)	농축치즈유청을 이용한 prebioti cs 및 활용기술 개발	1. 유청 및 그 가공처리물의 검색과 생물공학적 제조 기 술의 탐색, 문헌조사 등	100	1. 국내외적 유청 및 가공처리 물 검색
		2. 유청의 성분, 조성 표준화 및 알코올 발효조건 수립	100	1. 유청 내 환원당 정량 2. 알코올 발효조건 수립
		3. 유당분해 효소 및 유당분 해 미생물의 선별	100	1. 유청조성에 따른 배지 제조 법 확립 2. 유당분해 미생물 선별
1차 연도 (2009, 1협동)	치즈 유청 단백 질의 생리적 기 능성 탐색 및 특수 식품소재 개발	4. 유청단백질 및 가수분해물 제조를 위한 효소의 선정과 최적 조건 확립 및 가수분해 물 제조	100	1. 유청단백질 및 가수분해효소 선정 - 유청단백질 준비 - 효소 선정 및 가수분해 최적조건 확립 2. 유청단백질 가수분해물의 제조 및 기능성 peptide화 기술 개발 - 가수분해물의 제조 - 가수분해도 측정 - 가수분해물의 peptide양상 조사
1차 연도 (2009, 2협동)	치즈 유청 으 로부터 Growth P romotion 물질 및 생산공정 개 발	5. 유산균의 생육촉진효능 유 청 소재 개발	100	1. 유청농축액을 원료로 단백질분 해효소 및 락타아제 선별하여 요구르트배양액의 산생성 촉진 및 생균수 증가시키는 원료의 개발
		6. 기존 생육촉진물질과 효능 및 경제성 비교 평가	100	1. 기존 생육촉진물질로 사용되 는 효모엑기스와 펩톤과의 비교 평가



구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010, 주관)	농축치즈유청을 이용한 prebiotic s 및 활용기술 개발	효소처리 및 유산균 발효에 의한 갈락토올리고당(GOS) 생산	100	1. 시판 lactase 처리에 의한 갈 락토올리고당(GOS) 생성 확인 2. 유산균 유래 lactase 처리에 의한 갈락토올리고당(GOS) 생 성 확인
		효소 고정화법에 의한 갈락 토올리고당(GOS)의 생산, 수 율 향상 및 발효 제어 연구	100	1. 효소 고정화에 의한 갈락토 올리고당 생산조건 검토
2차 연도 (2010, 1협동)	치즈 유청 단백 질의 생리적 기 능성 탐색 및 특 수 식품소재 개 발	유청단백질 가수분해물의 기 능 및 락토펜의 생리적 기 능 연구	100	1. 엘러지 관련 RBL-2H3 세포 를 이용한 유청단백질 가수분해 물의 엘러지 저해 기능 효과 - 저해 인자 평가  2. 락토펜의 생리적 기능 효과 - U937 세포를 이용한 면역 유전자 발현 효과 - Mutz-3 세포를 이용한 면역 유전자 발현 효과 - NK92 세포를 이용한 면역 유 전자 발현 효과
2차 연도 (2010, 1협동)	치즈유청으로 부 터 Growth Pro motion 물질 및 생산공정 개발	타 원료와 혼합 시의 시너지 효과 측정	100	효모추출물 및 펙톤과 혼합비율별 산진전과 유산균 증식 효과를 분 석함.
		최종 첨가제 조성 완성	100	관능적인 측면과 경제적 측면을 고려하여 두가지의 첨가제 조성을 완성하고 식품 유형을 조사함.
		요구르트 및 발효 응용시험	100	두가지 확정된 첨가제로 액상요 구르트, 호상요구르트, 그리고 치 즈제조시의 산진전과 유산균 증 식효과를 비교 평가함.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2011, 주관)	Prebiotic가 다량 함유된 농축치즈 유청 배양물의 활용기술을 검토 하여 다양한 용 도의 기능성 소 재로 상품화	갈락토올리고당(GOS)이 다 량 함유된 prebiotic 물질 생 산 기술개발	100	갈락토올리고당(GOS)이 다량 함유된 prebiotic 물질을 생산하 는 기술을 개발하였음
		농축유청 발효액으로부터 갈 락토올리고당(GOS)의 분리/ 정제 기술 개발	100	한외여과를 이용하여 농축유청 발효액으로부터 갈락토올리고당 (GOS)의 분리/정제 의 기술을 개발함
		시제품 제조	100	한외여과한 농축유청 발효액을 농축을 통해 제품 제조
		Prebiotics 소재의 유용 미생물 증식 촉진효과 검토	100	<i>L. rhamnosus GG, Bifidobacte rium longum</i> 등의 균을 농축유 청 발효액에 배양시켜 균 증식 촉진효과 검토
3차 연도 (2011, 1협동)	유청단백질 가수 분해물의 기능 연구	유청단백질 가수분해물과 락 토페린의 기능 연구 - <i>in vitro, in vivo</i> 모델 적 용	100	유청가수분해물의 염증과 엘러 지 및 항산화 효과 - HMC-1세포와 Raw264.7 세 포를 이용한 염증과 엘러지 영 향 - 항산화 기능
			100	유청가수분해물의 항원성 저감 - 실험동물을 이용한 항원성 저감 조사
			95	유청단백질의 기능성 소재 기 반 구축
3차 연도 (2011, 1협동)	제품생산 공정 확립	O 치즈유청을 원료로 한 특 수 용도식품 제조의 전 생산 공정 확립	100	O 치즈유청을 원료로 한 특수 용도식품 제조의 전 생산공정 확립
	Pilot plant 제작 및 Simulation	O 발효 및 효소처리, 혼합, 건조 등을 시험할 수 있는 시험용 기기 제작 및 시운 전을 통한 경제적 공정 확립	100	O 발효 및 효소처리, 혼합, 건 조 등을 시험할 수 있는 시험용 기기 제작 및 시운전을 통한 경 제적 공정 확립

## 제 2 절 연구개발 실적 및 기술발전의 기여도

### 1. 연구개발 실적

#### 가. 연구 결과에 대한 학술논문 발표

- (1) 제목 : The biological Effects of Bovine Lactoferrin on Inflammatory Cytokine Expression in the PMA Stimulated cells (개제예정)
  - 저널명 : Korean J. Food Sci. Ani. Resour. Vol 32(3):371-375(2012)[SCIE]
- (2) 제목 : Production of galactooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* lactase in the whey-based medium(투고예정)
  - 저널명 : Korean J. Food Sci. Ani. Resour. (2012)[SCIE]
- (3) 제목 : Population and potential association of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in naturally fermented Korean rice wine
  - 저널명 : Food Sci. Biotechnol. 21(2):419-424(2012)[SCIE]

#### 나. 연구 결과에 대한 특허 출원

- (1) 특허출원 3건
  - (가) 특허 출원 : 10-2011-0022907
    - 제목 : 효소분해 유청농축액 또는 효소분해발효 유청농축액을 포함하는 유산균 생육 촉진용 조성물
  - (나) 특허 출원 : 10-2011-0121109
    - 제목 : 락토페린을 함유하는 면역 조절용 조성물
  - (다) 특허 출원 : 10-2012-003783
    - 제목 : 유산균체 추출물과 유청(분말, 농축)을 이용한 프레바이오틱 갈락토올리고당(GOS)의 생산

#### 다. 연구 결과에 대한 학술대회 발표

- (1) 2009년 한국식품과학회 제76차 학술대회 및 정기총회 포스터 발표
  - In Vitro Evaluation of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Dairy and Non-Dairy Environments
- (2) 2010년 한국축산식품학회 제42차 정기학술발표대회 포스터 발표
  - Studies on Development of Microbial Growth Medium and Conditions for the Production Galactooligosaccharides Using Cheese Whey-based Medium
- (3) 2010년 한국축산식품학회 제42차 정기학술발표대회 포스터 발표

- 효소에 의한 치즈 유청단백질 유래의 가수분해물 생산
- (4) 2011년 한국축산식품학회 제43차 정기학술발표대회 포스터 발표
  - 락토페린이 U937, DC, NK92 세포의 염증반응 유전자에 미치는 영향
- (5) The 10th Symposium on Lactic Acid Bacteria 포스터 발표
  - Development of a Whey-based Medium for the Growth of Lactic Acid

## 라. 교육 및 지도 활용

- (1) 석사학위 논문 - 1 건
  - 유산균용 유청배지의 개발 및 *Lactobacillus paracasei* 유래 lactase를 이용한 galacto oligosaccharide 생산 조건

## 2. 관련분야 기술발전예의 기여도

○ 유산균 배양용 유청배지를 생산하는 제조 기술을 국내에서 산업용 배지를 생산하는 업체에 제공함으로써 시중에서 판매하고 있는 기존의 MRS와 같은 유산균 제조용 배지보다 더 값싸게 대체함으로써 경쟁력을 높여 줄 것으로 기대가 됨. 그 뿐 아니라 배지를 공급받는 업체에 원가부담을 줄이는 역할을 함.

○ prebiotics 물질이 함유된 갈락토올리고당(GOS)은 직접섭취 또는 요리와 제빵에 사용되는 제품으로 판매가 가능하고 자체의 영양소를 함유하고 있어 식품보조제와 사료의 첨가물로 활용할 뿐 아니라 유산균 배양 액체로써 장내미생물 균총을 개선하고 장기능을 활성화하는 기능성식품으로 고부가가치 산업화를 촉진시킴.

○ 치즈부산물을 이용한 고기능성 prebiotic 소재 개발로 친환경적 고부가가치 물질의 생산 및 제조기술을 보급함으로써 기능성 올리고당의 생물공학적인 생산 기반을 제공함.

○ 환경오염의 주된 원인으로 치즈부산물인 농축유청을 이용하는 기술을 자연 치즈를 제조하는 목장형 유가공장에 보급함으로써 고부가가치화 실현 및 잉여원유해소 및 낙농가의 소득 안정에 기여할 것으로 기대됨

○ 치즈유청으로부터 개발된 growth promotion 물질을 산업적으로 이용, 첨가하여 발효유 제조 시 발효시간 단축과 더불어 유산균수를 현저하게 증가시킴으로써 시장 경쟁력 확보함

○ 연구의 결과들은 관련 학회 학술논문 발표는 물론 각종 시제품의 특허 출원으로 국

내외 지적 재산권 확보에 기여함.

## 제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획

### 제 1 절 기대 성과

#### 가. 연구개발결과의 활용방안

- 치즈유청을 이용한 식품(생선, surimi 등)의 단백질 냉동변성 보호제의 개발
- 치즈 유청을 이용한 조미제의 개발에 응용
- 치즈 유청을 이용한 아토피 저감제 개발
- 치즈유청을 이용한 항알러지 및 항비만 물질 개발
- 치즈유청을 이용한 기능성 화장품의 제조에 응용
- 치즈유청을 이용한 기능성 식품의 제조에 응용
- Prebiotics를 전통식품 제조에 활용
- 유청을 이용한 바이오알코올 제조에 활용
- 목장형 치즈제조업자의 환경오염부담을 경감하고 민간 또는 관련 산업체를 대상으로 교육과 컨설팅을 전수함으로써 치즈 부산물 활용의 원천 기술을 확산하고 낙농산업의 활성화에 기여
- 연구의 결과들은 관련 학회 학술논문 발표는 물론 각종 시제품의 특허 출원으로 국내외 지적 재산권 확보에 기여함.

#### 나. 기대성과

##### (1) 기술적 측면

- 치즈부산물을 이용한 고기능성 prebiotic 소재 개발로 친환경적 고부가가치 물질의 생산

- 제조기술을 보급함으로써 기능성 올리고당의 생물공학적 생산 기반을 제공
- 고부가가치성(highly value-added) peptide 소재 및 prebiotic GOS 생산 원천기술 개발 소규모 치즈산업 활성화에 기여
- 경제적인 신규 기능성 소재 제조 기술의 개발을 통한 국내 관련 산업의 활성화 및 소규모 치즈산업 활성화
- 갈락토올리고당(GOS) 생산을 위한 농축유청 제조, 고압균질법을 이용한 효소 수율 향상 및 효소 고정화법 확립
- 신규소재로 각광을 받고 있는 prebiotic GOS 물질 생산 기술 확립 및 각종 식품(젓갈, 유제품 등)에 응용

(2) 경제적·산업적 측면

- 농축유청를 이용하여 제조하는 새로운 자연 치즈 제조기술의 목장형 유가공장에 보급함으로써 산업의 육성과 더불어 고부가가치화 실현 및 잉여원유 해소(연간 20만 톤) 및 낙농가의 소득 안정에 기여함
- 목장형 유가공장 육성을 통한 환경친화적 부산물 활용기술 개발, 환경정화비용 절감효과
- 유청분말의 수입(사료 25,000 톤, 10,000 톤, 평균 1,000 \$/톤)대체 효과가 클 것으로 기대됨
- 건강기능성 식품(기능성 유제품)의 해외 수출 증대로 인한 외화 획득과 prebiotics 시장 선점

## 제 2 절 타 연구에의 응용 및 산업체 활용 방안

1. 치즈유청을 이용한 프레바이오틱스 및 고부가가치성 특수 식품소재의 개발 관한 체계

적인 연구로 학문적 기초자료 제공

가. 국내학술대회(한국식품과학회, 한국축산식품학회 등) 및 해외학술대회(International Congress of Meat Science and Technology)에 발표 예정임

나. Food Science and Biotechnology, Korean J. Food Sci. Ani. Resour.등의 SCI(E) 논문 및 한국유가공학회지, 한국식품과학회지 등 비 SCI 논문에 게재 예정임

다. 관련 산업에 종사할 고급 인력 양성

2. 치즈유청을 이용한 프레바이오틱스 및 고부가가치성 특수 식품소재의 개발 및 관련 사항에 대한 지적재산권(특허, 상표 출원) 취득 및 참여기업 또는 관련 기업들에 대한 산업체 기술 이전 실시 예정(㈜삼익유가공과 협의 중)

3. 참여기업체(㈜삼익유가공) 및 타 식품 업체에게 치즈유청을 활용한 신제품 개발 시 기술지도를 통하여 실용화 할 계획임

4. 치즈유청을 이용한 프레바이오틱스 및 고부가가치성 특수 식품소재의 제조방법 및 공정 개선 등 추가 연구

5. ㈜삼익유가공의 유청처리 공정 중 효소처리공정 추가 검토



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

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

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

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

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

다. Probiotics and prebiotics-perspectives and challenges

- 1)저자: Ivonne Figueroa-Gonzalez
- 2)저널: Society of Chemical Industry
- 3)발행연도: 2011

라. Dietary Whey Protein hydrolysate Suppresses Development of Atopic Dermatitis-like Skin Lesion

- 1)저자: Nobuko Shimizu
- 2)저널: Allergology International.
- 3)발행연도: 2006

마. Structural and functional aspects of prebiotics used in infant nutrition

- 1)저자: BOEHM Günther
- 2)저널: The Journal of nutrition
- 3)발행연도: 2008

바. Cytotoxic effects of whey protein hydrolysates prepared by enzymatic hydrolysis

- 1)저자: CHOI G. H
- 2)저널: Milchwissenschaft

3)발행년도: 2009

## 제 7 장 참고문헌

- Ahn, J. W., K. W. Park, and J. H. Seo: Continuous production of isomaltooligosaccharides by immobilized transglucosidase in a packed-bed reactor. *Kor. J. Food Sci. Technol*, 29:320-327 (1997)
- Alder-Nissen, J.: Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agr. Food Chem.* 27:1256-1262 (1979)
- Anon.: Dairy components increasingly find uses in functional foods. *The cheese reporter*, April. 10:11 (1998)
- Anon.: This lucky piglet got whey protein. *Science News.* 146:137 (1994)
- Arai, S., A. Maeda, M. Matsumara, N. Hirao, and M. Watanabe: Enlarge-scale production of a low-phenylalanine peptide substance as a foodstuff for patients with phenylketonuria. *Agric. Biol. Chem.* 50:2929 (1986)
- Azuma, N., S. I. Nagaune, Y. Ishino, H. Mori, S. Kamigogawa, and K. Yamauchi: DNA synthesis stimulating peptides from human  $\beta$ -casein. *Agric. Biol. Chem.* 53(10):2631-2634 (1989)
- Bae, H. S., M. S. Shin, Y. J. Kim, Y. J. Baek: Effects of the lactic acid bacteria administration on fecal microflora and putrefactive metabolites in health adults. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol* 24:254-260 (1996)
- Baek, J. S., D. Kim, J. H. Lee, P. S. Chang, H. S. Han, and J. F. Robyt: Enzymatic synthesis of new oligosaccharides using glucansucrase. *Kor, J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:179-186 (1998)
- Boehm, G, and G. Moro: Structural and functional aspects of prebiotics used in infant nutrition. *J. Nutr.* 138:1818-1828 (2008)
- Bounous G. and P. Gold: Whey proteins as a food supplement in Hiv-seropositive individuals. *Clin. Invest. Med.* 16:204 (1993)
- Bounous, G., S. Baruchel, J. Falutz, and P. Gold: Whey proteins as a food supplement in HIV-seropositive individuals. *Clin. Invest. Med.* 16:204-209 (1993)
- Chmile, J. F.: Anti-tumor effects of dietary whey protein and its value for head and neck cancer patients. Presentation at International Whey Conference, Chicago, IL., USA (1997)

- Chobert, J. M., E. Dalgalarondo, C. Dufour, Berteand-Harb, and T. Haertle: Influence of pH on the structural change of  $\beta$ -lactoglobulin studied by trypsin hydrolysis. *Biochem. Biophys. Acta.* 1077:31-34 (1991)
- Clemente, A, and S. J. Chambers: Development and production of hypoallergenic protein hydrolysates for use in infant formulas. *Food Allergy Intolerance.* 1:175 (2000)
- Clemente, A.: Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Tech.* 11:254-262. (1993)
- Collins, M. and G. Gibson: Probiotics, prebiotics, and synbiotics; approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am, J clin. Nutr.* 69:1052-1057 (1999)
- Coppa, G, S. Bruni, L. Morelli, S. Soldi, and O. Gabrielli,: The first prebiotics in humans; human milk oligosaccharides. *J. clin. Gastroenterol.* 38:S80-83 (2004)
- de Wit, J. N. and G. Klarenbeek: Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *J. Dairy Sci.* 67:2701-2710 (1984)
- de Wit, J. N.: Functional properties of whey proteins in food systems. *Neth Milk Dairy J.*, 76:109-113 (1984)
- Delaney, R.A.M.: Composition, properties and uses of whey protein concentrates. *J. Soc. Dairy Technol.*, 29(4):91-101 (1976)
- Dickson, R. C., L. R. Dickson, and J. S. Markin: Purification and properties of inducible  $\beta$ -galactosidase isolated from the yeast *Kluweromyces lactis*. *J. Bacteriol.* 137:51-61 (1979)
- Drewnowski, A.: Food preference and the opioid peptide system. *Trends Food Sci. Tech.* 3:97-99 (1992)
- Dyving, S. T. and D. E. Smith: Relation of chemistry and processing procedures to whey proteins functionality-A review. *Cultured Dairy Products J.* 4 (1991)
- Fiat, A. M., D. Migliore-Samour, P. Jolles, L. Drouet, C. B. D. Soller, and J. Cean: Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J. Dairy Sci.* 76:301-310 (1993)
- FitzGerald, R. J. and H. Meisel: Lactokinins: whey protein-derived ACE inhibitory peptides. *Nahrung.* 43:165 (1999)
- Forsum, E. and L. Hambraeus: Nutritional and biochemical studies of whey products. *J. Dairy Sci.* 60:370-377 (1976)

- Fox: Cheese—chemistry, physics and microbiology, Fox ed., Elsevier, London (1987)
- Fu, D. and J. F. Robyl: Acceptor reactions of maltodextrins with *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranase, *Arc. Biochem. Biophys.* 283:379–387 (1990)
- Fuller, G.: Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365–378 (2004)
- Gallaher, D. and M. Schmidl: Bioactive and nutraceutical entities found in whey. Paper presented at Institute of Food Technologists, Annual Meeting, June Atlanta, Georgia, USA. (1998)
- Gao, X. K., N. Nakamura, and K. Fuseda, H. Tanaka, N. Inagaki, and H. Nagai: Establishment of allergic dermatitis in NC/Nga mice as a model for severe atopic dermatitis. *Biol. Pharm. Bull.* 27:1376–1381 (2004)
- Gonzalez-Tello, P., F. Camacho, E. Jurado, M. P. Paez, and E. M. Guadix: Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular weight range. *Biotech. Bioeng.* 44:529–532 (1994)
- Harmsen, H., A. Wildeboer-veloo, G. Raangs, A. Wagendorp, N. Klijin, J. Bindels, and G. Weling: Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30:61–67 (2000)
- Heine, W. E., P. D. Klein, and P. J. Reeds: The importance of  $\alpha$ -lactalbumin in infant nutrition. *J. Nutr.* 121:277–283 (1991)
- Hong, P., M. Ninonuevo, B. Lee, C. Lebrilla, and L. Bode: Human milk oligosaccharides reduce Hiv-1-gp120 binding to dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN). *Br. J. Nutr.* 101:482–486 (2008)
- Hong, Y. H.: Nutritional properties and utilization of bovine whey. *Korean J. Nutr. Soc.* 10:137 (1983)
- Huang, X. L., G. W. Coleman, and D. R. Stanworth: Investigation of the allergenicity of  $\beta$ -lactoglobulin and its cleavage fragments. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 78:337–344 (1985)
- Jayaprakasa, H. M., R. S. Patel, and E. Renner: Application of ultrafiltration technology for production of whey protein concentrate. *Proc X Nat conf IMS on recent Trends in Membrane Science and Technology* Jan 21:123 (1993)
- Jelen, P.: Reprocessing of whey and other dairy wastes for use as food ingredients. *Food Technol.* 37(2):81 (1983)

- Kang, S. C., J. W. Yun, and T. W. Ro: Effect of oligosaccharide on mannitol accumulation during fermentation of Kimchi. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 11:181-185 (1996)
- Kikuchi, E.: Utilization and problem of whey into food. *Food Development.* 19:113 (1984)
- Kim, K. S. and Y. K. Chae: The effects of addition of oligosaccharide on the quality characteristics of tomatojam. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 13:348-354 (1997)
- Kim, S. B., I. S. Seo, M. A. Khan, K. S. Ki, M. S. Nam, and H. S. Kim: Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. *Int. Dairy. J.* 17:625 (2007)
- Kitts, D. D. and Y. V. Yuan: Caseinophosphopeptide and calcium bioavailability. *Trends Food Sci. Tech.* 3:31 (1992)
- Kravchenco, E. F.: whey beverages. In trends in utilization of bovine whey and whey derivatives. *IDF Bulletin.* 233:61 (1988)
- Kume, H.: Applying Nutrigenomics to Food Science -10- Anti-inflammation Effect of Whey Proteins and Their Trypsin-hydrolyzed Peptides on Hepatic Injury Induced by Concanavalin A DNA Microarray Analysis. *ILSI* 83:9-17 (2005)
- Kwak, H. S. and Jeon, I. J.: Effect of various conditions on the formation of oligosaccharides in milk treated with  $\beta$ -galactosidase. *J. Dairy Sci.* 69:2785-2790 (1986)
- Lee, Y. H.: Food processing approaches to altering allergenic potential of milk-based formula. *J. Pediatric.* 121:S47 (1992)
- Lee, Y. K., K. Nomoto, S. Salminen, and S. Gorbach: *Handbook of Probiotics*, Wiley, NY. (1999)
- Lopez-Bajonero, L. J., P. Lara-Calderon, A. Galvez-Mariscal, A. Velazgues-Arellano, and A. Lopez-Munguia: Enzymatic production of a low-phenylalanine product skin milk powder and caseinate. *J. Food Sci.* 56:938-942 (1991)
- Machnicki, M., M. Zimecki, and T. Zagulski: Lactoferrin regulates the release of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo. *Int. J. Exp. pathol.* 74:433-439 (1993)
- Marshall, K.: Therapeutic applications of whey protein. *Altern. Med. Rew.* 9:136-156 (2004)
- Morita, E., T. Hiragum, S. Mihara, S. Kaneko, H. Matsuo, and Y. Zhang: Determination of thymus and activation-regulated chemokine(TARC)-contents in scales of atopic d

dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* 34:237-240 (2004)

Morr, C. V. and E. Y. W. Ha: Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33(6):431-476 (1993)

Nakaoka, M.: Gifu university explains mechanism for lowering of rat blood cholesterol by whey proteins. *Comline : Biotechnology and Medical Industry of Japan*. Ref. CBI91 03280002 (1992)

Nicholas, J. and E. C. Reynolds: Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase Determination of enzyme specificity. *Enzyme Microb. Tech.* 19:202-207 (1996)

Nobuko, S., D. Kazuo, O. Saori, and K. Tetsuo: Dietary Whey Protein hydrolysate Suppresses Development of Atopic Dermatitis-like Skin Lesion Induced by Mite Antigen in NC/Nga Mice *Allergology International*. 55:185-189 (2006)

Onishi, N. and T. Tanaka: Galacto-oligosaccharide production using a recycling cell culture of *Sterigmatomyces elviae* CBS8119, *Lett. Appl. Microbiol.* 26:136-139 (1998)

Patel, M. A. and A. Kilara: Studies on whey protein concentrates. 2. foaming and emulsifying properties and their relationships with physicochemical properties. *J. Dairy Sci.* 73:2731-2740 (1990)

Pihlanto-Leppälä, A., P. Koskinen, I. Paakkari, T. Tupasela, and H. Korhonen: Opioid whey protein peptides obtained by membrane filtration. *Bull, IDF.* 311:36 (1996)

Robert, H. R. and J. D. Petinati: Concentration effects in the enzymatic conversion of lactose to oligosaccharides. *J. Agri. Chem.* 130-134 (1957)

Schmidt, R. H.: Effects of processing on whey protein functionality. *J. Dairy Sci.* 67:2723-2733 (1984)

Sears, C.: A dynamic partnership; celebrating our gut flora. *Anaerobe*, 11:247-251 (2005)

Siemensma, A. D., W. T. Weijer, and H. J. Bak: The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. *Trans Food Sci. Tech.* 4:16-21 (2005)

Smither, G. W., F. J. Ballard, A. D. Copeland, K. J. de Silva, D. A. Dionysius, G. L. Francis, C. Goddard, P. A. Grieve, G. H. McIntosh, I. R. Mitchell, R. J. Pearce, and G. O. Regester: New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *J. Dairy Sci.* 79:1454-1459 (1996)

Toba, T. Y., Y. Tomita, T. Itoh, and S. Adachi:  $\beta$ -Galactosidase of lactic acid bacteria

a:Characterization by oligosaccharides formed during hydrolysis of lactose. J. Dairy Sci. 64:185-192 (1981)

Toba, T. Y., Y. Tomita, T. Itoh, and S. Adachi: beta-Galactosidase of lactic acid bacteria; Characterization by oligosaccharides formed during hydrolysis of lactose. J. Dairy Sci. 64:185-192 (1981)

Unno, T., H. Suto, T. Yoshiike, H. Ogawa, C. Ra: Induction of atopic dermatitis-like skin lesion in NC/Hga mice—the influence of the skin barrier destroying solution to the induction of dermatitis. Arerugi 50:1152-1162 (2001)

Lagrange, V.: Whey proteins and new fractions as ingredients in functional dairy products and innovative nutraceuticals. Kor. J. Dairy Technol. 16(2):118 (1998)

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

Van Hoogstraeten, J. J.: The marketing of whey products. IDF Bulletin. 212:17 (1987)

Wierzbicki, L.E. and F. V. Kosikowski: Formation of oligosaccharides during  $\beta$ -galactosidase action on lactose. J. Dairy Sci. 55:1400-1404 (1972)

Yamauchi, K.: Biologically functional proteins of milk and peptides derived from milk protein. Bull. IDF. 272:51 (1992)

Yan, S. H., Jr. C. G. Hill, and C. H. Amundson: Ultrafiltration of whole milk. J. Dairy Sci. 62:23-40 (1979)

Yoon, S. L.: Home Therapy Using vegetable and Fruit. Geumyoo publishing Co., Seoul, Korea. 9 (1991)

Yoshikawa, A.: Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from food proteins. Trends Food Sci. Tech. 4:139-144 (1993)

Zioudrou, C., R. A. Streaty, and W. A. Klee: Opioid peptide derived from food protein. J. Biochemical Biochemistry. 254(7):2446-2449 (1979)

강국희, 김상희: *Kluveromyces fragilis*의  $\beta$ -galactosidase에 의한 oligosaccharides의 생성. 한국식품위생학회지, 2:67-73 (1987)

고준수: Bifidobacteria의 특성과 발효유 제조. 한국유가공연구회지, 5:75-84 (1988)



김창렬: 고정화  $\beta$ -galactosidase에 의한 갈락토올리고당(GOS)의 생산 및 특성. 전남대학교 박사학위 논문, 70-71 (1990)

박인덕, 홍윤호: 우유성분을 이용한 생치즈와 유청음료의 개발. 한국식품과학회지, 24:209-214 (1992)

서진호: 국내 올리고당의 연구개발 및 동향. 식품과학과 산업, 27(4):8-11 (1994)

신현재, 조수진: 셀룰라제를 이용한 갈락토올리고당(GOS)의 생산 특성, 한국생물공학회지, 11(3):317-322 (1996)

윤여창: 치즈유청의 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱스를 이용한 인스턴트 건강음료의 개발, 농림기술연구개발보고서, 농림부. 2007

이용규, 전순배, 최원기, 정기철, 배석, 김관천:  $\beta$ -Galactosidase의 고정화 및 응용에 관한 연구. *Aspergillus niger* CAD 1의 효소 생산 조건 및 효소학적 성질. 한국영양식량학회지, 24:326-331 (1985).

이형주: 식품산업에서 whey의 이용. 식품과학과산업, 5:106 (1988)

인만진, 채희정: *Penicillium* sp. KFCC10888이 생산하는 galactose전이활성이 우수한  $\beta$ -galactosidase의 특성. 한국미생물생명공학회지, 26:40-44 (1998)

조수진, 홍윤호: 시판 유청분말의 이화학적 및 기능적 특성. 한국식품과학회지, 27:151-155 (1995)

하월규: 유청제품의 잠재적 이용가능성과 활용분야. 매일유업(주)중앙연구소 (1998)

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.