

국제 경쟁력 있는 비숙성 치즈 및 치즈 부산물을 이용한
기능성 유청음료의 산업화

Industrialization of Internationally Competitive Fresh Cheese and
Functional Whey Beverage Using Cheese By-product

건국대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “국제 경쟁력 있는 비숙성 치즈 및 치즈 부산물을 이용한 기능성 유청음료의 산업화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 4 월 9 일

주관연구기관명 : 건국대학교

주관연구책임자 : 윤 여 창

세부연구책임자 : 윤 여 창

연 구 원 : 목 보 람

연 구 원 : 차투리카

연 구 원 : 김 수 연

협동연구기관명 : 경남대학교

협동연구책임자 : 박 은 주

요 약 문

I. 제 목

국제 경쟁력 있는 비숙성 치즈 및 치즈 부산물을 이용한 기능성 유청음료의 산업화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 국제 경쟁력 있는 기능성 비숙성 치즈의 산업화 및 부산물 유청의 이용방안에 있음. 이를 위해 우선 비숙성 치즈 제조 방법을 확립하고 이어서 수율 및 품질을 향상시킨 비숙성 치즈를 생산한 후 대량생산 하고자 함. 개발되는 제품에는 프로바이오틱 유산균과 필요한 생리활성 물질이 함유됨. 이들 성분의 생산 공정이 적정화되고 배합비를 조사하며 산업시설에서의 적용 가능성을 조사함. 아울러 유청에서 ACE 저해효과 있는 음료를 개발하여 우유와 경쟁이 되는 음료의 우유시장 잠식에 대처하고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

가. 국제 경쟁력 있는 비숙성 치즈 생산

- 저온냉각에 따른 원유품질변화과악 및 비숙성치즈의 제조
- 치즈베이스 의한 비숙성 치즈의 제조가능성 및 품질 조사
- WPC 강화 비숙성 치즈 제조
- 두유를 첨가한 비숙성 치즈의 제조
- 비숙성 치즈 및 프로바이오틱 유산균 스타터 시료 준비
- 비숙성 치즈의 부가가치를 높일 수 있는 플라보노이드의 탐색
- 기존의 확보된 유산균 및 상업적인 유산균 생리적 특성 연구 및 건강기능성 검증
- 생산된 비숙성 치즈의 미생물학적 검사를 통한 안전성 확인

나. 비숙성 치즈 및 프로바이오틱 유산균 스타터의 *in vivo* 실험을 통한 콜레스테롤 저하 활성 평가

- 식이 제조 및 동물 사육
- 혈장 지질 측정
- 간, 변 지질대사물 측정
- 혈장 및 조직의 지질과산화 측정
- 백혈구 내 DNA 손상의 측정
- 혈장 내 지용성 항산화비타민 분석
- 적혈구 내 항산화효소 활성 분석

다. 고부가가치 식품소재인 WPC 가수분해물의 생산 및 기능성 조사

- 한외여과기법을 이용하여 유청단백질(WPC)을 농축된 형태로 분리
- WPC에서 ACE 저해효과 있는 생리활성 펩타이드의 선별적 제조 및 적정조건 파악
- WPC 및 WPC 가수분해물 추출물 제조
- WPC 가수분해물의 물리화학적 및 기능성 조사
- 추출물의 ACE 저해활성 평가
- 비숙성 치즈의 부가가치를 높이기 위해 선정된 플라보노이드의 특성 및 기능성 조사
- 건강기능성이 검증된 유산균의 생산최적화
- 유산균을 이용한 WPC의 생물전환에 의한 펩타이드 생성

라. *In vitro* 및 SHR 모델을 이용한 WPC 가수분해물의 혈압 강하효과 검증

- WPC 가수분해물의 ACE 저해활성 평가
- WPC 가수분해물의 혈압 강하효과 검증
- WPC 가수분해물의 보충섭취가 혈중 지질농도에 미치는 영향 평가
- WPC 가수분해물의 보충섭취가 항산화체계에 미치는 영향 평가
- WPC 가수분해물의 보충섭취가 백혈구 및 신장조직 세포의 DNA 손상에 미치는 영향

마. ACE 저해효과 있는 펩타이드를 이용한 기능성 유청음료의 제조

- ACE 저해 효과있는 펩타이드의 음료 배합비 결정
- 프로바이오틱 함유기능성 건강음료의 배합비 결정
- 플라보노이드의 생산최적화
- 기능성 건강음료의 실험실적 제조 및 파일럿 플랜트에서 생산
- 인스턴트 건강음료믹스의 제조
- 기능성 유청음료의 미생물학적 검사와 유통기한 설정

바. 기능성 유청음료의 ACE 저해활성 및 동물실험을 통한 고혈압 억제 활성 평가

- 유청음료의 ACE 저해활성 평가
- 식이 제조 및 본태성 고혈압 쥐 (SHR) 사육
- 혈압 측정
- 생화학적 검사
- 혈장, 대동맥, 신장의 ACE 활성 측정
- 데이터 분석 및 보고서 작성

IV. 연구개발결과

1. 연구 개발 결과

- 본 연구에서 저온냉각한 원유에서 제조한 비숙성 치즈의 품질은 24시간 까지는 양호한 것

으로 나타났음. 비숙성치즈의 제조를 위해 한외여과를 사용할 수 있는 것으로 나타났음. WPC는 5%까지 첨가할 수 있는 것으로 파악되어 한외여과방법을 도입할 때 활용 할 수 있음. 두유의 첨가는 5%까지 첨가하여 치즈제조원가를 낮출수 있음.

- 치즈 부산물인 유청에서 ACE저해효과 있는 생리활성 펩타이드를 선택적으로 생산하는 적정조건을 파악되었으므로 치즈 부산물 유청에서 탄산음료와 같은 우유 경쟁식품에 대처 가능한 고부가가치제품을 생산할 수 있음.

2. 활용에 대한 건의

- 수입에 의존하고 있는 비숙성 치즈의 가격 경쟁력과 품질 경쟁력의 확보에 기여할 수 있음. 본 과제에 의해 개발되는 비숙성 치즈가 향후 좋은 모델이 될 수 있음.
- 유가공업계에서는 치즈제조를 위한 원거리 집유의 경우 24시간 까지 저온냉각실시를 하고 공간의 절약과 부산물 유청의 활용을 위해 한외여과공정을 도입할 필요가 있음
- 유청단백질을 소재로 한 탄산음료와 같은 우유경쟁식품에 대처 가능한 음료를 개발할 필요가 있음

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 중요성

- 치즈의 국제경쟁력확보를 위해 우선 생산원가의 절감에 대한 노력이 필요함. 현재 국내 유가공 업계에서는 유가공장의 규모 확대를 통한 구조 조정이 진행 됨에 따라 집유지역이 광역화되어 집유비가 부담요인으로 작용하고 있으므로 원가절감 노력의 일환으로 현재의 하루 1회 집유에서 2일 1회 집유의 가능성을 검토할 수 있음. 농가에서 생산된 원유는 우유처리 가공장까지 저온 냉각 상태를 유지하게 됨. 우유의 저온 냉각은 우유의 품질을 보존하기 위해 실시하나 우유의 조성 성분에 불리한 영향을 끼칠 수도 있음. 이 같은 현상은 결국 치즈 제조 시 수율 저하와 제품의 불량한 조직을 초래할 수 있으므로 우유의 저온 냉각이 치즈의 제조 공정에 어느 정도의 영향을 끼치는지 파악하고 치즈 제조에 적합한 저온냉각 시간을 파악함으로써 양질의 치즈 제조를 위한 선별적 집유가능성에 대한 조사가 필요함.
- 국내치즈산업에서는 수율저하문제가 고질적으로 발생하고 있음. 이에 대한 해결방안을 모색함은 위에서 언급한 원유의 선별적집유와 아울러 치즈베이스를 이용하는 가능성이 조사됨. 치즈베이스는 유가공산업분야의 첨단기술인 한외여과를 이용하여 제조했음. 이어서 상기치즈시에 생산되는 부산물 유청을 한외여과를 이용하여 유청단백질(WPC)을 분리하여 치즈수율을 향상시키는 방법에 대한 연구가 필요함. 이와 병행하여 탈지유 및 두유를 활용한 치즈제조가능성을 탐구함
- 소비자 요구에 부응하는 치즈를 제조하기위한 첨가되는 프로바이오틱 유산균 스타터 확보 및 비숙성 치즈의 미생물학적 안전성 확보에 대한 연구 필요함. 아울러 비숙성 치즈 및 프로바이오틱 유산균 스타터 의 *in vivo* 콜레스테롤 저하 활성 평가에 대한 조사가 필요함.
- 치즈제조에 관한 연구후 부산물 유청에서 제조한 유청단백질(WPC)에서 ACE 저해효과 있는 생리활성 펩타이드의 선별적 제조에 대한 연구는 관련분야의 주요 관심사임. WPC 가수분해물의 건조공정 적정화, 이화학적 기능성 조사 및 유산균을 이용한 WPC의 생물전환에 의한 펩타이드 생성에 대한 연구가 필요함. 유청단백질(WPC)에서 분리한 생리활성 펩타이드의 ACE 저해활성 및 동물실험을 통한 고혈압 억제 활성 평가가 필요함.
- 이어서 ACE 저해효과 있는 펩타이드를 이용한 기능성 유청음료의 제조를 수행하여 생리활성 펩타이드 대량유통할 수 있는 방안을 강구함. 이를 위해 생산된 기능성 유청음료의 미생물학적 안전성 확보 및 유통기한 설정하고 기능성 유청음료의 ACE 저해활성 및 동물실험을 통한 고혈압 억제 활성 평가에 대한 연구가 필요함.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발 목표와 내용

본 연구의 목적은 국제 경쟁력 있는 비숙성 치즈와 치즈부산물을 이용한 기능성 유청음료를 개발하여 산업화하는데 있음. 이를 위해 1차년도에 치즈의 원가절감과 품질경쟁력확보방안에 대한 연구를 수행하고 2차년도에 치즈부산물인 유청에서 생리활성 펩타이드 선별적으로 생산하는 방안 3년도에는 생리활성펩타이드를 소재로 한 음료를 개발함.

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차 연도 (200)	(1차 세부과제) 국제 경쟁력 있는 비숙성 치즈 생산	저온냉각에 따른 원유품질변화 파악 및 비숙성치즈의 제조	원유의 저온 저장기간 동안 일어나는 성분변화와 저온 저장기간에 따라 제조된 비숙성 치즈의 이화학적, 물성학적, 전자현미경적, 관능적 특성을 조사하여 원유의 저온냉각기간이 품질에 끼치는 영향을 연구함.
		치즈베이스 의한 비숙성 치즈의 제조가능성 및 품질 조사	한외여과 기술로 제조한 치즈베이스를 이용하여 치즈를 제조하고 Control 치즈와의 이화학적, 물성학적, 관능적 특성을 조사하여 비교함.
		WPC 강화 비숙성 치즈 제조	비숙성 치즈의 부산물인 whey를 이용하여 WPC를 제조하고 그것을 치즈 원료유에 첨가하여 치즈를 제조함. Control 치즈와의 이화학적, 물성학적, 관능적 특성을 조사하여 비교함.
		두유를 첨가한 비숙성 치즈의 제조	Soy milk를 첨가한 원료유로 치즈를 제조하여 Control 치즈와의 이화학적, 물성학적, 관능적 특성을 조사하여 비교함.
		비숙성 치즈 및 프로바이오틱 유산균 스타터 시료 준비	적절한 스타터를 선별하여 준비했음.
		비숙성 치즈의 부가가치를 높일 수 있는 플라보노이드의 탐색	양과, 흑미, 밀감의 부산물을 이용하여 플라보노이드를 추출하여 폴리페놀함량과 항산화효과를 검증함.

	기존의 확보된 유산균 및 상업적인 유산균 생리적 특성 연구 및 건강기능성 검증	상업용 균주 중 4종류와 본 실험실에서 분리된 <i>Lactococcus lactis</i> NK34를 사용하여 실험된 모든 균주에 대해서 내산성 및 내담즙성을 하였음. 이들 결과를 토대로 혼합 균주 SM과 La-5, <i>Lactococcus lactis</i> NK34를 스타터 균주로 결정하였음.
	생산된 비숙성 치즈의 미생물학적 검사를 통한 안전성 확인	총균수, 저온성균 및 유산균의 변화는 모든 cottage cheese sample에서 0, 7, 14일째 확인할 수 없었음. 미생물학적 검사를 통해서 안전성을 확인함.
(협동과제) 비숙성 치즈 및 프로바이오틱 유산균 스타터의 <i>in vivo</i> 실험을 통한 콜레스테롤 저하 활성 평가	식이 제조 및 동물 사육	고지혈증을 유발한 SD 용성 쥐에서 콜레스테롤 저하 효과 및 항산화 활성 효과를 검증하기 위해 기능성 스타터를 첨가한 비숙성 치즈를 6주간 투여한 후 12시간 절식 후 희생함.
	혈장 지질 측정	효소비색법에 의한 정량용 kit 시약 (Bioclinical system, 한국)을 사용하여 TG, TC, HDL-cholesterol, GOT, GPT를 분석하였으며 LDL-콜레스테롤은 Friedewald 계산법을 사용함.
	간, 변 지질대사물 측정	간과 변의 지질대사물을 측정하기 위해 Folch법을 이용하여 지질을 추출하였으며, total lipid, TG, TC 분석을 수행함.
	혈장 및 조직의 지질과산화 측정	혈장에서 LDL을 추출한 후 CD 분석을 시행하였으며 간의 과산화 지질을 분석하기 위하여 TARS 분석을 수행함.
	백혈구 내 DNA 손상의 측정	Collins등에 의해 고안된 comet assay 방법을 이용하여 DNA 손상을 측정함.
	혈장 내 지용성 항산화비타민 분석	혈장 내 단백질을 제거하고 n-hexane으로 지방을 추출한 후 high performance liquid chromatography(HPLC, Dionex, Korea)로 측정함.
	적혈구 내 항산화효소 활성 분석	catalase 활성은 용혈 된 적혈구에 phosphate buffer와 hydrogen peroxide를 첨가한 후 hydrogen peroxide의 감소량을 spectrophotometer를 이용하여 240nm에서 30초간 측정함.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	[제1세부과제] 고부가가치 식품 소재인 WPC 가수 분해물의 생산 및 기능성 조사	한외여과기법을 이용하여 유 청단백질(WPC)을 농축된 형태로 분리	유가공분야의 신기술인 한외여과 기법을 이용하여 비숙성 치즈 제 조의 부산물인 유청에서 탁월한 식품소재인 유청단백질을 농축된 형태로 분리함.
		WPC에서 ACE 저해효과 있는 생리활성 펩타이드의 선별적 제조 및 적정조건 파 악	alcalase (Novozymes, Denmark), protease M(Amano Enzyme, Japan), protease S(Amano Enzyme, Japan), Trypsin (Novozymes, Denmark), Pepsin(Yakuri Pure Chemicals, Japan) 를 사용하여 적합한 효소의 선정과 적정한 가 수분해 조건을 탐색함.
		WPC 및 WPC 가수분해물 추출물 제조	WPC를 선정한 효소와 가수분해 조건에 따라 처리하여 WPC 가 수분해물 추출물을 제조함.
		WPC 가수분해물의 물리화 학적 및 기능성 조사	추출한 WPC 가수분해물의 일반 성분, 이화학적 특성(pH, 밀도, 기포형성력, 용해도, HMF 함량, -SH기 함량, NPN 함량, 단백질 가수분해도)를 측정하고, 전기영 동을 통해 단백질 밴드를 관찰 함.
		추출물의 ACE 저해활성 평 가	WPC 가수분해물의 Angiotensin Converting Enzyme 저해 효과 를 측정하여 혈압조절 효과를 관 찰함.
		비숙성 치즈의 부가가치를 높이기 위해 선정된 플라보 노이드의 특성 및 기능성 조 사	양파, 흑미, 밀감 중 가장 폴리 페놀함량이 높은 양파를 이용하 여 다양한 방법으로 항산화능을 측정함.
		건강기능성이 검증된 유산균 의 생산최적화	<i>Lactococcus lactis</i> NK34의 생 산최적화: 탄소원, 질소원, 무기 염을 선정하여 반응표면분석을 하고, 최대 생산점에 이르는 배 지를 조사함
		유산균을 이용한 WPC의 생 물전환에 의한 펩타이드 생 성	TCC-3, ABTF, <i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> NK34에 대해 WPC의 생물 전환을 검토, ACE 저해효과 확인

<p style="text-align: center;">[협동과제]</p> <p><i>In vitro</i> 및 SHR 모델을 이용한 WPC 가수분해물의 혈압 강하효과 검증</p>	<p>WPC 가수분해물의 ACE 저해활성 평가</p>	<p>ACE (Angiotensin converting enzyme) 저해활성을 표준물질 대비 WPC 가수분해물의 억제력을 분석함으로써 동물모델에 적용할 시료를 선별함.</p>
	<p>WPC 가수분해물의 혈압 강하 효과 검증</p>	<p>선별된 가수분해물을 쥐에게 보충투여 함으로서 혈압강하에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 분석함.</p>
	<p>WPC 가수분해물의 보충섭취가 혈중 지질농도에 미치는 영향 평가</p>	<p>TG, TC, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, GOT, GPT 농도를 분석함으로써 WPC 가수분해물이 혈중 지질농도에 미치는 영향을 분석함.</p>
	<p>WPC 가수분해물의 보충섭취가 항산화체계에 미치는 영향 평가</p>	<p>혈장의 TRAP, CD 농도를 분석함으로써 WPC 가수분해물이 혈중 항산화 상태에 미치는 영향을 분석함.</p>
	<p>WPC 가수분해물의 보충섭취가 백혈구 및 신장조직 세포의 DNA 손상에 미치는 영향</p>	<p>백혈구 및 신장조직을 이용한 DNA 손상을 분석함으로써 WPC 가수분해물이 항유전독성에 미치는 영향을 분석함.</p>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	연구범위
3차 년도 (2011)	<p style="text-align: center;">[제1세부과제]</p> <p>ACE 저해효과 있는 펩타이드를 이용한 기능성 유청음료의 제조</p>	<p>○ACE 저해 효과가 있는 펩타이드의 음료 배합비 결정</p>	<p>복합시스템에서 ACE 저해 효과가 있는 펩타이드의 음료 배합비를 결정함.</p>
		<p>○프로바이오틱 함유기능성 건강음료의 배합비 결정</p>	<p>프로바이오틱 유산균을 함유하는 WPC 가수분해물을 이용하여 기능성 건강음료의 생산에 필요한 소재의 배합비를 결정함.</p>
		<p>○플라보노이드의 생산최적화</p>	<p>비숙성치즈의 부가가치를 높이기 위한 플라보노이드의 생산을 최적화함.</p>
		<p>○기능성 건강음료의 실험실적 제조 및 파일럿 플랜트에서 생산</p>	<p>음료의 제조가능성을 실험실과 생산현장에서 실시함.</p>
		<p>○인스턴트 건강음료믹스의 제조</p>	<p>결정한 배합비를 이용하여 음료를 제조함</p>
		<p>○기능성 유청음료의 미생물학적 검사와 유통기한 설정</p>	<p>대량생산된 기능성 유청음료를 미생물학적 검사를 통해 안전성을 확인하고 유통기한을 설정함.</p>

<p>[협동과제] 기능성 유청음료의 ACE 저해활성 및 동물실험을 통한 고혈압 억제 활성 평가</p>	○유청음료의 ACE 저해활성 평가	유청음료의 ACE 저해활성을 분석함으로써 유효농도를 결정함.
	○식이 제조 및 본태성 고혈압 쥐 (SHR) 사육	본태성 고혈압쥐를 이용한 기능성 음료의 혈압 강하효과를 분석함.
	○혈압 측정	주 1회 측정을 통해 주변 혈압 변화를 관찰함.
	○생화학적 검사	혈액 및 조직 내의 지질양상 및 항산화 상태를 분석함으로써 기능성 음료의 효과를 검증함.
	○혈장, 대동맥, 신장의 ACE 활성 측정	혈장, 대동맥 및 신장의 ACE 활성을 분석함으로써 기능성 유청음료의 혈압강하에 미치는 영향을 분석함.
	○데이터 분석 및 보고서 작성	SPSS program을 이용한 통계분석을 통하여 각 군 간의 유의수준을 검증함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 관련기술의 현황과 문제점

- 현재 국내 유가공 업계는 주종제품인 시유가 소비정체현상을 보이고 있음. 2000년들어 소비가 급증하고 있으나 수입치즈가 소비의 주종을 이루고 있어 국산치즈의 국제경쟁력강화가 시급한 과제임.
- 국내치즈산업에서는 수율저하문제가 고질적으로 발생하고 있음. 이에 대한 해결방이 필요함. 또한 국산치즈는 수입치즈에 대해 가격이 높으므로 가격경쟁력확보 역시 필요함.
- 신제품 개발을 위해 낙농선진국에서 이미 실용화되고있는 한외여과공정의 도입이 필요함.

제 2 절 앞으로의 전망

- 우유의 높은 영양가는 대부분 유단백질에 함량에 기인하는 바가 큼. 유단백질을 인간의 영양에 이용하고 새로운 사용처를 발견하려는 노력은 앞으로 계속 될 전망이다.
- 유청 단백질은 영양가 있는 소프트드링크와 고단백질의 우유를 기초로 한 음료의 제조에 적합하므로 우유 조성 성분을 이용하는데 있어 새로운 가능성을 제공함. 우유를 기초로 하는 음료는 현재 우유의 공급 과잉상태에 있는 국내 낙농 산업계에 새로운 활로를 제공할 수 있음. 유단백질은 필수아미노산이 부족한 식물성 단백질과 이상적으로 결합할 수 있어 전통 식품의 가치를 보강하기 위해 조화될 수 있음. 이러한 목적에 도달하기 위한 조작은 복잡한 시스템에 대한 지식을 필요로 하므로 이 분야의 지속적인 연구가 활발할 것으로 예상된다.

제 3 절 기술도입의 타당성

해당사항 없음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 국제 경쟁력 있는 비숙성 치즈 생산

1. 서론

유청에는 기능성소재인 유청단백질이 많이 함유되어 있음. 이를 치즈원유에 병합시킴으로써 치즈의 기능성을 제고시키고 아울러 수출의 증가가능성을 조사했음. 치즈의 국제경쟁력을 제고시키기 위해서는 수출을 제고하여 원가를 절감시키는 방안에 추가하여 원료유의 일부를 가격이 저렴한 대두유로서 대체하는 방안을 조사했음.

2. 연구내용 및 방법

가. 연구내용

1) 저온 냉각에 따른 원유품질변화파악 및 비숙성치즈의 제조

원유의 저온 저장기간 동안 일어나는 성분변화와 저온 저장기간에 따라 제조된 비숙성 치즈의 이화학적, 물성학적, 전자현미경적, 관능적 특성을 조사하여 원유의 저온 냉각기간이 품질에 끼치는 영향을 연구함.

2) 치즈베이스 의한 비숙성 치즈의 제조가능성 및 품질 조사

한외여과 기술로 제조한 치즈베이스를 이용하여 치즈를 제조하고 Control 치즈와의 이화학적, 물성학적, 관능적 특성을 조사하여 비교함.

3) WPC 강화 비숙성 치즈 제조

비숙성 치즈의 부산물인 whey를 이용하여 WPC를 제조하고 그것을 치즈 원료유에 첨가하여 치즈를 제조함. Control 치즈와의 이화학적, 물성학적, 관능적 특성을 조사하여 비교함.

4) 두유를 첨가한 비숙성 치즈의 제조

Soy milk를 첨가한 원료유로 치즈를 제조하여 Control 치즈와의 이화학적, 물성학적, 관능적 특성을 조사하여 비교함.

5) 비숙성 치즈 및 프로바이오틱 유산균 스타터 시료 준비

6) 비숙성 치즈의 부가가치를 높일 수 있는 플라보노이드의 탐색

양파, 흑미, 밀감의 부산물을 이용하여 플라보노이드를 추출하여 폴리페놀함량과 항산화효과를 검증함.

7) 기존의 확보된 유산균 및 상업적인 유산균 생리적 특성 연구 및 건강기능성 검증

상업용 균주 중 4종류와 본 실험실에서 분리된 *Lactococcus lactis* NK34를 사용하여 실험된 모든 균주에 대해서 내산성 및 내담즙성을 하였음. 이들 결과를 토대로 혼합균주 SM과 La-5, *Lactococcus lactis* NK34를 스타터 균주로 결정함.

8) 생산된 비숙성 치즈의 미생물학적 검사를 통한 안전성 확인

총균수, 저온성균 및 유산균의 변화를 모든 비숙성치즈 시료에서 0, 7, 14일째에서 확인함. 미생물학적 검사를 통해서 안전성을 확인함.

나. 연구방법

1) 저온냉각에 따른 원유품질변화과악 및 비숙성치즈의 제조

가) 시료: 건국유업에서 제공받은 원유를 사용하였음. 공시균주는 TCC-3(Chr. Hansen, Denmark), 응유효소는 standard plus 900(Chr. Hansen, Denmark)를 사용하였음.

나) 원유의 저온 냉각 중의 변화 분석: 공시 원유와 치즈 제조 후 생성된 유청의 일반성분은 Milkoscan(Milkoscan Minor 78110, Foss Co., Denmark)을 이용하여 일반성분을 측정하였음.

다) pH 측정: 유리전극 pH meter(Mettler-Toledo GmbH 8603, Seven Easy, Schwerzenbach Switzeland)를 이용하여 원유의 pH를 측정하였음.

라) Ultracentrifugation을 적용하는 Lonergan(1983)의 방법에 따라 Serum casein 중 무기질 (Ca, P, Mg)을 분석하였음.

마) 단백질분획은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 SDS polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였음.

바) Crude β -casein 측정: Salam(1974)의 방법을 응용하여 측정하였음.

사) 비숙성 치즈 제조: 전통적 방법에 의해 원유를 이용하여 치즈를 제조하였고 30min에 한번 씩 pH를 측정하여 응고시간을 관찰하였음.

아) 비숙성 치즈의 분석: 저온 저장기간을 달리한 원유로 제조된 4가지 치즈들을 15일동안 저온 저장하여 5일 간격으로 실험하였음. 일반성분인 지방, 단백질, 유당, 무기 고형분은 Dairy Lab 2(Bentley II, Bentley Co., U.S.A.)를 이용하여 분석하였음.

자) 비단백태질소 화합물의 측정은 Christensen(1991)의 방법에 따라 kjeldahl법으로 정량하였음.

차) 비숙성 치즈의 물리화학적 성질과 기능성 검증: 주사전자현미경(SEM)에 의한 치즈 조직의 관찰은 치즈 sample을 동결건조한 후 gold coating하여 6.0kv에서 관찰하였음. 산도는 산도측정법에 따라 0.1 N NaOH로 적정하여 적정산도를 계산하고 pH는 pH meter(Orion 420 A)로 측정하였음. Texture는 Rheometer를 사용하여 hardness, cohesiveness, springiness,

gumminess 및 chewiness를 구하였음.

카) 치즈의 관능검사: Wolf와 Donatoni(1979)의 IFT sensory evaluation method 및 Law등 (1994)의 방법을 응용하여 5점 직선척도법으로 실시하였음.

2) 치즈베이스를 이용한 비숙성 치즈의 제조가능성 및 품질 조사

가) 시료: 건국유업에서 제공받은 원유를 사용하였음. 공시균주는 TCC-3(Chr. Hansen, Denmark), 응유효소는 standard plus 900(Chr. Hansen, Denmark)를 사용하였음.

나) 치즈베이스 제조 : 한외여과기는 collodion으로 된, 분자량 cut-off 20,000Da인 막을 장착한 spiral wound type인 DSS Lab Unit M 20(Denmark)을 이용하여 작동하였고 농축계수는 2.5로 하였음.

다) 원료유, retentate, permeate 분석 : 공시 원유와 casein 제조 후 생성된 유청의 일반성분은 Milkoscan(Milkoscan Minor 78110, Foss Co., Denmark)을 이용하여 일반성분을 측정하였음.

라)유리전극 pH meter(Mettler-Toledo GmbH 8603, Seven Easy, Schwerzenbach Switzeland)를 이용하여 원유의 pH를 측정하였음. 원유로 제조한 치즈를 대조구로 하고 retentate(치즈베이스)로 제조한 치즈와 비교 분석하였음.

마) 비숙성 치즈 제조 : 한외여과를 제외한 나머지 공정은 전통적 방법에 의해 치즈를 제조하였고 30min에 한번씩 pH를 측정하여 응고시간을 관찰하였음.

바) 비숙성 치즈의 일반성분분석 : 원료유를 달리하여 제조된 치즈는 2주 동안 저온 저장하여 1주 간격으로 실험하였음. 일반성분인 지방, 단백질, 유당, 무지 고형분은 Dairy Lab 2(Bentley II, Bentley Co., U.S.A.)를 이용하여 분석하였음.

사) 비단백태질소 화합물의 측정: Christensen(1991)의 방법에 따라 kjeldahl법으로 정량하였음.

아) 치즈의 단백질 분획검사: Laemmli(1970)의 방법에 따라 치즈 sample을 가지고 SDS polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였음.

자)pH 측정: pH는 pH meter(Orion 420 A)로 측정하였음.

차) 비숙성 치즈의 물리화학적 성질과 기능성 검증: Texture는 Rheometer를 사용하여 hardness, cohesiveness, springiness, gumminess 및 chewiness를 구하였음.

카) 치즈의 관능검사 : Wolf와 Donatoni(1979)의 IFT sensory evaluation method 및 Davis Law(1994)의 방법을 응용하여 5점 직선척도법으로 실시하였음.

3) WPC 강화 비숙성 치즈 제조

가) 시료: 건국유업에서 제공받은 원유를 사용하였음. 공시균주는 TCC-3(Chr. Hansen,

Denmark), 응유효소는 standard plus 900(Chr. Hansen, Denmark)를 사용하였음.

나) WPC 제조: 비숙성 치즈 제조 후 얻은 유청을 한외여과 방법을 단백질 함량 35%를 소지하는 WPC를 제조하여 사용하였음.

다) 원료유의 제조: 원유에 WPC를 각각 5%, 10%를 첨가하여 치즈를 제조하였고 30min에 한번씩 pH를 측정하여 응고시간을 관찰하였음.

라) 비숙성 치즈의 분석: 원료유를 달리하여 제조된 치즈는 2주 동안 저온 저장하여 1주 간격으로 실험하였음. 일반성분인 지방, 단백질, 유당, 무지 고형분은 Dairy Lab 2(Bentley II, Bentley Co., U.S.A.)를 이용하여 분석하였음. 비단백태질소 화합물의 측정은 Christensen(1991)의 방법에 따라 kjeldahl법으로 정량하였음. Laemmli(1970)의 방법에 따라 치즈 sample을 가지고 SDS polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였음.

마) pH: pH meter(Orion 420 A)로 측정하였음.

바) 비숙성 치즈의 물리화학적 성질과 기능성 검증: Texture는 Rheometer를 사용하여 hardness, cohesiveness, springiness, gumminess 및 chewiness를 구하였음.

사) 치즈의 관능검사: Wolf와 Donatoni(1979)의 IFT sensory evaluation method 및 Law등(1994)의 방법을 응용하여 5점 직선척도법으로 실시하였음.

4) 두유를 첨가한 비숙성 치즈의 제조

가) 시료: 건국유업에서 제공받은 원유를 사용하였음. 공시균주는 TCC-3(Chr. Hansen, Denmark), 응유효소는 standard plus 900(Chr. Hansen, Denmark)를 사용하였음.

나) 원료유의 제조: 원유에 Soy milk를 각각 5%, 10%를 첨가하여 치즈를 제조하였고 30min에 한번씩 pH를 측정하여 응고시간을 관찰하였음.

다) 비숙성 치즈의 일반성분 분석: 일반성분인 지방, 단백질, 유당, 무지 고형분은 Dairy Lab 2(Bentley II, Bentley Co., U.S.A.)를 이용하여 분석하였음.

라)비단백태질소 화합물의 측정: Christensen(1991)의 방법에 따라 kjeldahl법으로 정량하였음.

마) 치즈의 단백질분회 검사: Laemmli(1970)의 방법에 따라 치즈 sample을 가지고 SDS polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였음.

바) pH측정: pH meter(Orion 420 A)로 측정하였음.

사) 숙성 치즈의 물리화학적 성질과 기능성 검증 : Texture는 Rheometer를 사용하여 hardness, cohesiveness, springiness, gumminess 및 chewiness를 구하였음.

아) 치즈의 관능검사: Wolf와 Donatoni(1979)의 IFT sensory evaluation method 및 Law등(1994)의 방법을 응용하여 5점 직선척도법으로 실시하였음.

5) 비숙성 치즈의 부가가치를 높일 수 있는 플라보노이드의 탐색

가) 시료: 플라보노이드 추출을 위하여 양파, 흑미, 밀감의 부산물을 이용하여 에탄올, 열수추출을 하여 사용하였음.

나) 총 polyphenol 함량 측정: phenol 함량은 Folin-Denis법에 따라 비색 정량 하였음.

다) 총 flavonoid 함량 측정: 각 flavonoids 추출물의 총 flavonoid 함량은 aluminum chloride 법에 따라 비색 정량하였음.

라) 항산화 활성 측정: DPPH 라디칼 소거능에 의한 항산화 활성 측정하였음.

6) 기존의 확보된 유산균 및 상업적인 유산균 생리적 특성 연구 및 건강기능성 검증

가) 사용균주:

Lactobacillus casei, *Lactobacillus acidophilus*, 혼합균주 SM (*Bifidobacterium longum* + *Lactobacillus acidophilus* + *Streptococcus thermophilus*), 혼합균주 La-5 (*thermophilic lactic acid culture*)와 본 실험실에서 분리된 *Lactococcus lactis* NK34를 사용하였음.

나) 내산성 및 내담즙성:

- 내산성: pH 2.5, 1% pepsin 첨가하여 2시간동안 반응시킴.

- 내담즙성: 인공위액을 통과한 균중 0.1% oxgall을 24시간동안 처리하여, 대조균인 oxgall 무첨가균과 비교하여 나타냄.

다) 항균효과: *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella enteritidis* KCCM 12021, *Staphylococcus aureus* KCCM 32395, *Escherchia coli* O157에 대해 항균효과를 확인하였음.

라) 항산화효과: DPPH 라디칼 소거능으로 확인하였음.

7) 생산된 비숙성 치즈의 미생물학적 검사를 통한 안전성 확인

가) 시험용액의 조제: 치즈는 25 g을 대상으로 225 ml의 희석액을 가하여 stomacher로 균질화하여 시험용액으로 사용하였음.

나) 세균수 측정: 표준평판배양법에 의해 일반균은 Plate count agar (Difco, USA)를 사용하였고, 유산균은 Plate count agar with bromo cresol purple을 사용하였다. 대장균 및 대장균군은 violet red bile agar를 사용하였음. 본 실험은 “축산물의 가공기준 및 성분규격”에 따라, 10배씩 희석, 도말한 후, 총균수는 35±1℃에서 약 48시간, 저온성균은 25±1℃에서 약 72±3시간 배양하였음. 유산균은 35±1℃에서 약 72±3시간 배양한 후 집락을

확인하였음. 대장균군은 pour plate method를 이용하고, 35±1℃에서 약 24±2시간 배양한 후 집락을 확인하였음.

8) 식이 제조 및 동물 사육

가) 실험동물

평균 체중이 350g인 12주령의 Sprague-Dawley 중 수컷 흰쥐를 코아텍 (Koatech)으로부터 받아 1주간 pellet으로 적응시키고 난 후에 쥐의 무게를 달아 난괴법으로 7군으로 나누어 cage에 한 마리씩 분리 사육하였고, 대조군을 제외한 6그룹은 4주간 고지혈증을 유발한 뒤 6 종류의 실험 식이를 6주간 투여하였음. 물은 자유공급 하였으며 실험 식이는 pair feeding 하였음. 사육실의 실내온도는 22±2℃, 습도는 50±5%를 유지하고, 전등을 조절하여 낮12시간, 밤 12시간으로 조절하였음.

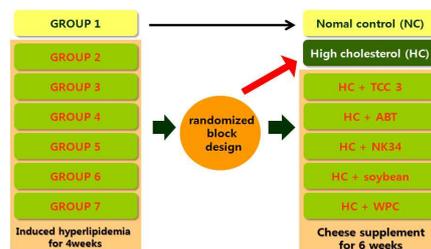


Fig. 1. Experimental design

나) 실험식이

실험 식이는 정상식이군 (Normal control group, NC)과 고지혈증을 유발군 (High cholesterol, HC), 고지혈증 유발식이 + TCC 투여군 (TCC), 고지혈증 유발식이 + ABT 투여군 (ABT), 고지혈증 유발식이 + NK-34 투여군 (NK-34), 고지혈증 유발식이 + Soybean 투여군 (soybean), 고지혈증 유발식이 + WPC 35 투여군 (WPC) 등 총 7군으로 나누어 각 군당 8마리씩 배정하였으며 실험 식이는 6주간 급여하였음 (Table 1, Fig. 1). 식이섭취량은 하루에 한 번씩, 체중은 일주일에 한 번 일정한 시간에 측정하였음. 실험 기간 동안의 체중증가량을 같은 기간 동안의 총 식이섭취량으로 나누어 식이효율을 구하였음.

* 식이효율(FER)

$$=6\text{주간 체중증가량(g)}/6\text{주간 식이섭취량(g)} * 100$$

Table 1. Composition of the experimental diet

(g/100g diet)

Ingredients	NC	PC	TCC -3	ABT	NK -34	Soy bean	WPC -35
Casein	18	18	17.4	17.4	17.4	17.6	17.5
Corn starch	50.5	49.8	49.6	49.6	49.6	49.4	49.4
Sucrose	10	10	10	10	10	10	10
Corn oil	10	5	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9
Lard	0	5	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9
Cholesterol	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Cellulose	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Vitamin mixture	1	1	1	1	1	1	1
Mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.4
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
BTH	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Cheese	0	0	5	5	5	5	5
Sodium cholate	0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

¹⁾NC: Normal control group, HC: High cholesterol supplemented group, TCC-3: High Cholesterol + TCC-3 fortified cheese, ABT: High Cholesterol + ABT fortified cheese, NK-34: High Cholesterol + NK-34 fortified cheese, Soybean: High Cholesterol + soybean fortified cheese, WPC-35: High Cholesterol + WPC-35 fortified cheese

²⁾AIN 93 vitamin mixture contained (in g/kg of mixture): thiamine HCl 0.6; riboflavin 0.6; pyridoxine HCl 0.7; niacin 3; d-calcium pantothenate 1.6; folic acid 0.2; d-biotin 0.02; cyanocobalamin (vitamin B₁₂) 2.5; dry vitamin A palmitate (500,000 U/d) 0.8; dry vitamin E acetate (500U/d) 15; vitamin D₃ trituration (400,000U/g) 0.25; vitamin K1 0.075 menadione sodium bisulfite complex 0.15; sucrose finely powdered 981.08

³⁾AIN 93 mineral mixture contained (in g/kg of mixture): calcium phosphate, dibasic 500; sodium chloride 74; potassium citrate, monohydrate 220; potassium sulfate 52; magnesium oxide 24; manganous carbonate (43-48% Mn) 3.5; ferric citrate (16-17% Fe) 6; zinc carbonate (70% ZnO) 1.6; cupric carbonate (53-55% Cu) 0.3; potassium iodate 0.01; sodium selenite 0.01; chromium potassium sulfate 0.55; sucrose, finely powdered 118.03

9) 혈액 및 각종 장기의 채취

실험동물을 희생시키기 전 12시간 동안 금식을 시킨 후, 에틸에테르 마취하여 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하고 헤파린으로 응고를 방지 하였음. 혈액을 3000rpm에서 30분간 원심 분리 하여 혈장과 적혈구를 분리 하여 분석 시 까지 -70℃에 냉동 보관하였음. 실험동물의 장기는 적출하여 생리식염수에 세척한 후, 흡수지로 물기를 제거하고 무게를 측정 한 후 액체질소로 급속 냉동시킨 후 분석 시 까지 -70℃에 냉동 보관하였음.

10) 혈장 내 지질 분석

혈장 중의 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤의 함량은 효소비색법에 의한 정량용 kit 시약(Bioclinal system, 한국)을 사용하여 측정하였고, LDL-콜레스테롤은 Friedewald 계산법 ($TC - (HDL\text{-콜레스테롤} + TG/5)$)을 이용하여 분석하였음.

11) 간의 지질 생성물 측정

1.5 ml의 생리식염수에 침지시켜 균질화한 0.5g의 간을 2:1 비율의 chloroform과 methanol을 첨가하여 섞은 후 30분간 실온에 방치 하였음. 격렬히 섞은 후 2.5 ml의 chloroform을 첨가하여 2분 동안 방치하고 증류수를 첨가하여 섞은 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 과정을 거쳤음. 하층에서 지질을 추출하여 여과시킨 후 추출물에서 유기물을 증발 시켜 무게를 측정하여 total lipid 양을 측정하였음. 일정량의 methanol을 첨가하여 총콜레스테롤과 중성지방을 효소비색법에 의한 정량용 kit 시약(Bioclinal system, 한국)을 사용하여 측정하였음.

12) 분변의 지질 대사물 분석

유발에 분쇄한 시료 0.5 g을 2:1 비율의 chloroform과 methanol을 첨가하여 섞은 후 30분간 실온에 방치 하였음. 격렬히 섞은 후 2.5 ml의 chloroform을 첨가하여 2분 동안 방치하고 증류수를 첨가하여 섞은 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 과정을 거쳤음. 하층에서 지질을 추출하여 여과시킨 후 추출물에서 유기물을 증발 시켜 무게를 측정하여 total lipid 양을 측정하였음. 일정량의 methanol을 첨가하여 총콜레스테롤과 중성지방을 효소비색법에 의한 정량용 kit 시약 (Bioclinal system, 한국)을 사용하여 측정하였음.

13) 혈장의 과산화지질(CD)측정

혈장 100 μ l에 1.1 mg EDTA와 1,100 μ l trisodium citrate Buffer (0.064 M)를 혼합 후 600 μ l trisodium citrate Buffer (0.064 M)를 다시 혼합 하여 2,500 rpm에서 10 분간 원심 분리하여 LDL를 획득하였음. 분리한 LDL에 0.1 M Na-phosphate Buffer 100 μ l, Chloroform과 methanol(2:1, v/v) 3 ml와 3차 증류수 1 ml을 혼합, 2,500 rpm에서 10 분간 원심 분리하였고 하층액을 질소(N₂)가스로 치환한 후 Cyclohexane 1 ml를 첨가하고 Spectrophotometer (234nm)에서 측정하였음.

14) 간의 과산화지질 (TBARS) 측정

간 조직 0.5g을 0.1 M Na₂HPO₄와 함께 균질화하고 33 mM의 FeSO₄, 0.33 mM의 BHT와 33 mM의 L-ascorbic acid 혼합액(1:1:1)을 첨가하고 37°C에서 30분간 방치하였음. 10% TCA 0.75 ml을 첨가하여 12,000 g, 10분 간 원심분리하고 상층액 200 μ l를 0.67% TBA 200 μ l와 섞은 후 95°C 이상의 온도에서 10분간 처리하였음. 실온으로 식힌 후 1,300 g에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 540 nm에서 측정 하였음.

15) 백혈구 내 DNA 손상의 측정을 위한 comet assay

전혈 20 μ l을 채취하여 precoating된 fully frosted slide 위로 전혈과 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 보관하고 한번 더 LMA를 처리함. Cell lysis 과정을 거친 후 20분간 전기영동을 실시하였음. 전기영동이 끝난 후 0.4M Tris 완충용액 (pH 7.4)으로 충분히 세척하고 20 μ l/ml 농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여 형광현미경상에서 관찰하고 CCD camera를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 comet image analyzing system이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였음.

16) 혈장 내 지용성 항산화 비타민 분석

retinol 및 α -, γ -tocopherol은 ethanol로 단백질을 제거하고 n-hexane으로 지방을 추출한 후 질소 가스로 n-hexane을 증발시킴. 그 후mobile phase (methanol : dichloro -methane = 85 : 15)에 녹여 high performance liquid chromatography(HPLC, Dionex, Korea)로 측정하였음.

17) 적혈구 내 catalase 분석

Catalase의 활성은 용혈 된 적혈구에 50 mM phosphate buffer (pH 7)와 hydrogen peroxide를 첨가한 후 hydrogen peroxide의 감소량을 spectrophotometer를 이용하여 240 nm에서 30초간 측정하였음.

18) 자료의 처리

SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였음. 각 항목에 따라 백분율과 평균치±표준오차 (SE)를 구하고, 군별 유의성 검증을 위해서는 one-way 분산분석 (ANOVA)을 시행하여 F 값을 구한 뒤, Durcan's multiple range test를 이용하여 각 군 간의 유의성 차이를 검증하였음.

3. 연구결과

가. 원유품질변화 파악 및 비숙성치즈의 제조

1) 저온냉각기간에 따른 원유 조성 변화

저온냉각에 따른 원유의 일반조성 변화는 Table 1와 같음. 공급받은 직 후의 원유의 일반 성분함량은 지방 3.97%, 단백질 3.07%, 유당 4.68%, 총고형분 12.58%이었음. 이 결과를 저온 저장된 모든 원유와 비교하면, 단백질은 저온 저장 2일 후 까지 유의적 차이가 없었으며, 3일 후에 유의적 차이를 나타내었음(P<0.05). 또한 지방, 유당 함량은 저온 저장기간이 2일까지는 소폭 감소 하다가 저온 저장 3일 후에는 크게(지방 3.63%, 단백질 2.91%, 유당 4.46%, 총고형분 11.89%) 감소하는 것으로 나타났음. 이는 치즈 제조 시 품질 및 수율을 저하시키는 요인으로 작용함(Bigalke 1985).

Table 1. General components of raw milk during storage period

Components	Days of 5°C storage			
	0	1	2	3
Fat	3.97 ^a	3.91 ^b	3.91 ^b	3.63 ^c
Protein	3.07 ^a	3.06 ^a	3.07 ^a	2.91 ^b
Lactose	4.68 ^a	4.68 ^b	4.67 ^b	4.46 ^c
TS ¹⁾	12.58 ^c	12.51 ^b	12.51 ^b	11.89 ^a

¹⁾TS : Total solid

^{a-c} Mean values with different letters on the same bars are significantly different(P<0.05).

2) 원유의 저온저장 중 pH 의 변화

Table 2는 원유의 저온저장 기간에 따른 pH의 변화를 나타낸 것임.

원유의 저온저장 기간이 지남에 따라 모두 유의적 차이를 나타내었음(P<0.05). 공급받은 직후의 원유의 pH는 6.5였으며, 2일, 3일 저온저장 된 원유의 pH는 각각 6.43, 6.4로 저장기간 2일까지는 소폭 감소하였고 저온 저장 3일 후에는 6.18로 급격히 감소하였음.

Table 2. Effect of storage of raw milk on pH

	Days of 5°C storage			
	0	1	2	3
pH	6.5 ^a	6.43 ^b	6.4 ^c	6.18 ^d

^{a-d} Mean values with different letters on the same bars are significantly different(P<0.05).

3) Serum casein 중 무기질(Ca, P, Mg) 함량의 변화

Table 3는 원유의 저온 저장기간에 따른 무기질(Ca, P, Mg)의 함량의 변화를 나타낸 것임. 공급받은 직후의 원유의 Ca 함량은 0.08%였으며, 저온 저장기간이 지남에 따라 1일 후에는 0.09%로 증가하여 2일, 3일 동안에는 일정한 값을 유지하였음.

공급받은 직후의 원유의 P 함량은 2.13%였으며, Ca과 마찬가지로 저온 저장기간이 지남에 따라 1일, 2일, 3일 후에는 각각 2.14%, 2.18%, 2.26%로 증가하는 경향을 나타냈음. Mg의 함량은 모든 처리구에서 0.09%로 일정한 값을 나타내었음.

Table 3. Effect of storage of serum casein on mineral content

Unit : %

	Days of 5°C storage			
	0	1	2	3
Ca	0.08	0.09	0.09	0.09
P	2.13	2.14	2.18	2.26
Mg	0.09	0.09	0.09	0.09

4) Casein micelle의 전기영동

Fig. 1과 같이 원유의 casein은 22KD과 36KD 사이에 존재하는 α_s -, β -, κ -casein band를 나타내었음. 원유의 저온 저장기간이 지남에 따라 전기영동상 β -casein의 변화가 나타났음. 원유의 공급 직후 제조된 sodium caseinate에는 전기영동상에 그 band가 명료히 나타났으나 저온 저장기간기간이 지남에 따라서 감소현상을 나타냈음. 이와 같은 전기영동상의 결과는 casein의 함량은 원유의 저온 저장기간이 지남에 따라 상대적으로 더 적게 함유되어 있는 것으로 해석할 수 있을 것임.

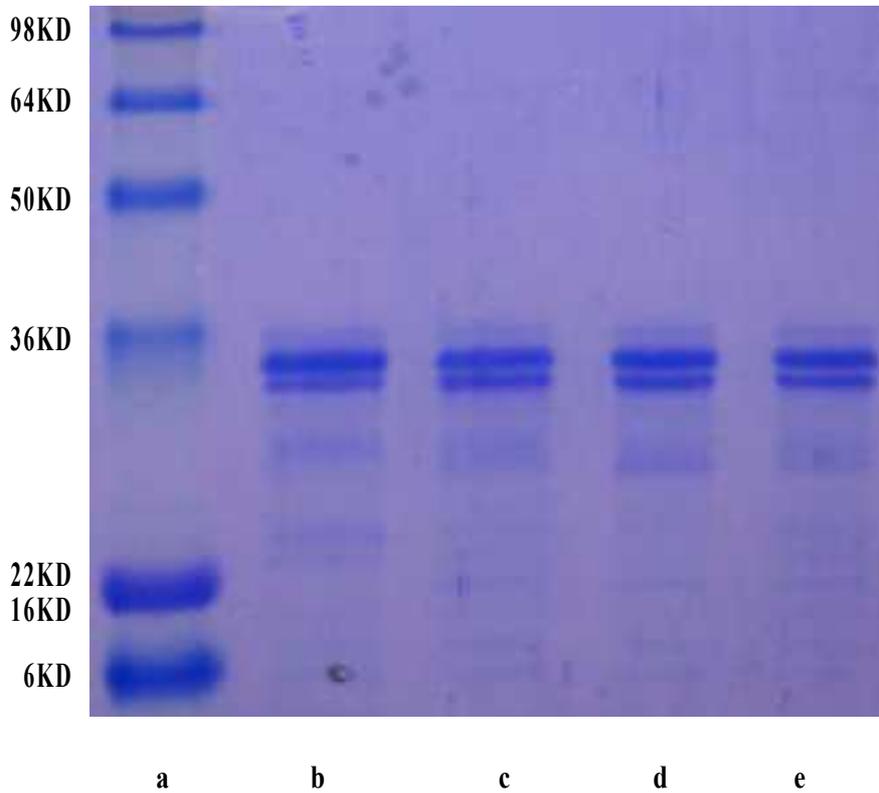


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of sodium caseinate. Gel was electrophoresed on 14% SDS polyacrylamide under an identical condition. Molecular weight standard(a); 0 days of 5°C storage(b); 1 day of 5°C storage(c); 2 day of 5°C storage(d); 3 day of 5°C storage(e).

5) Crude β -casein 함량의 변화

Fig. 2는 원유의 저온 저장 기간에 따른 crude β -casein 함량의 변화를 나타낸 것임. 공급받은 직후 원유 10ml에서 추출한 crude β -casein의 함량은 0.38g이었으며, 1일 저온 저장된 원유는 0.32g로 감소하여 2일, 3일 저온 저장기간이 지남에 따라 0.31g, 0.30g로 유의적 차이를 나타내었음($P < 0.05$).

원유 중의 casein micelle은 주로 Ca의 영향을 받으며(Brunner, 1981) Ca의 존재 하에 α -, β , κ -casein의 상호작용에 의해서 직경 50~300nm(500~3000Å)의 입자가 형성되는데 casein micelle의 형성과정 중 온도의 영향을 받음(Slattery, 1976; Webb 등, 1974 Lenoir 등(1974)과 Ichilczyk-Leone 등(1981)). 또한 내냉성 미생물이 생산하는 protease에 의해 casein이 분해되면서 α -casein 및 β -casein 양이 현저히 감소될 수 있음. 본 실험에서 원유의 저온 저장 시 crude β -casein은 serum casein으로 해리되어 저장기간이 지남에 따라 감소되는 것을 확인할 수 있었음.

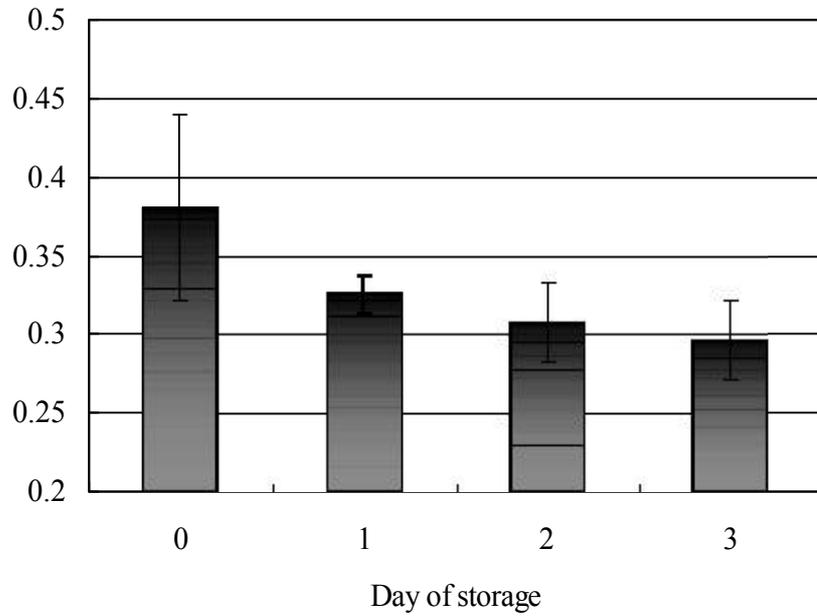
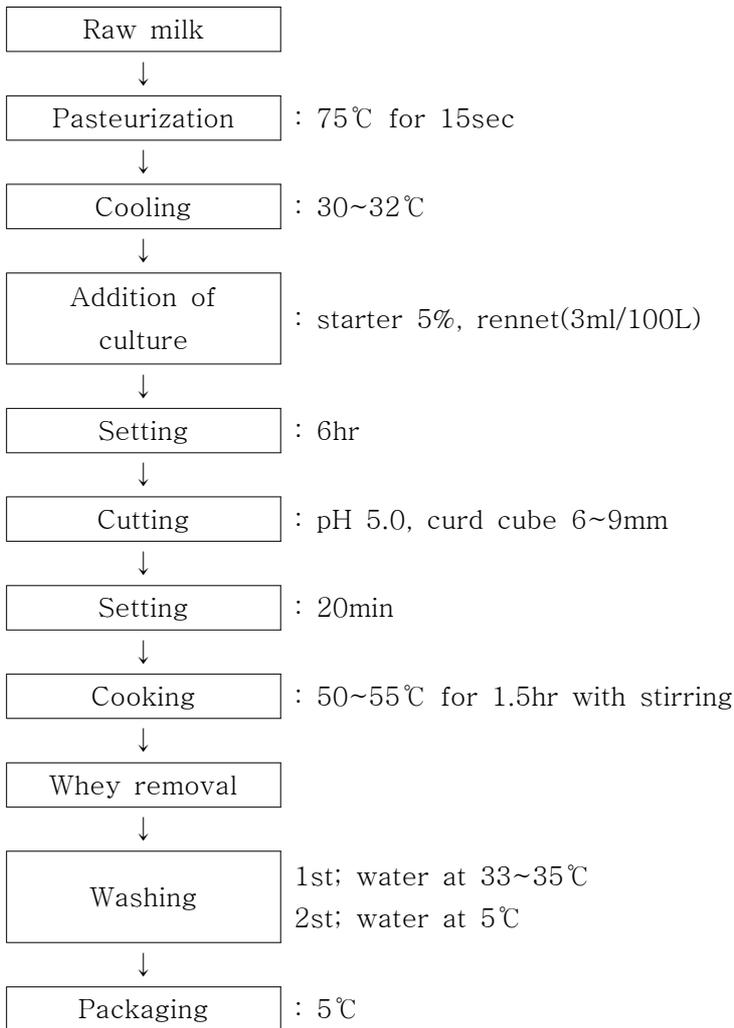


Fig. 2. Effect of storage of raw milk on crude β -casein content.

6) 프로바이오틱스 유산균 스타터 선발 및 생리적 특성파악

공시균주는 *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* : *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*을 1:1로 혼합 동결한 균주인 TCC-3(Chr. Hansen, Denmark)을 응유효소인 rennet는 standard plus 900 제품(Chr. Hansen, Denmark)을 사용하였음.

7) 비숙성 치즈의 제조



8) 커드의 응고시간(coagulation time) 변화

Table 4은 원유의 저온 저장기간에 따라 제조된 비숙성 치즈 커드의 cutting pH(pH4.75~4.8) 도달 시까지의 응고시간을 나타내었음. 또한 Fig. 3는 원유의 저온 저장기간에 의한 비숙성 치즈의 응고시간에 따른 pH 변화를 30분 간격으로 그래프로 나타내었음. Table 4과 같이 응고시간은 대조구와 처리구에서 유의적 차이를 보였음($P < 0.05$). 5°C에서 3일 저장한 원유의 응고시간이 420분으로 가장 길게 나타났으며, 대조구의 경우 270분으로 유의적으로 가장 짧게 나타났음($P < 0.05$).

따라서 원유의 공급 직후 제조된 비숙성 치즈는 저온 저장된 원유로 제조된 비숙성 치즈보다 응고시간을 단축시킬 수 있었음. 양질의 비숙성 치즈를 제조하면서 응고시간을 단축시키는 것은 노동과 비용 면에서 의의가 큼.

Table 4. Comparison of coagulation time among storage period of milk

Sample	Control ¹⁾	Day of 5°C storage		
		1	2	3
C. T. ²⁾	270 ^c	300 ^c	390 ^b	420 ^a
Cutting pH	4.76	4.75	4.77	4.79

¹⁾0 day of 5°C storage

²⁾Coagulation Time(min)

^{a-c} Mean values with different letters on the same bars are significantly different(P<0.05).

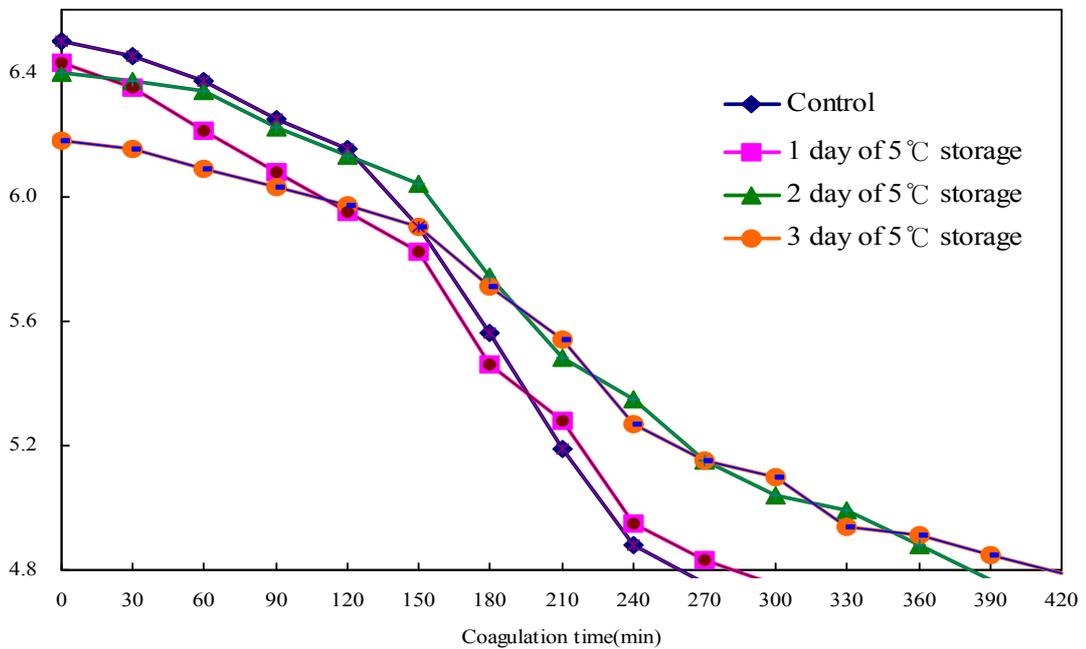


Fig. 3. Coagulation time of unripened cheese.

9) 비숙성 치즈 제조 시 curd 특성

Table 5은 원유의 저온 저장기간에 따라 비숙성 치즈를 제조할 때 형성되는 curd의 특성을 비교한 것임.

원유를 공급받은 직후 제조한 비숙성 치즈의 curd가 조직, 외관, 견고성이 가장 우수하였으며, 1일 저온 저장된 원유로 제조된 비숙성 치즈는 대조구와 유사하였음.

Table 5. Sensory properties of curds at different storage period of milk

Sample		Sensory properties of curd
Control ¹⁾		The particle size of curd was almost equalized. The elasticity was the best. When the curd was been heating, there was few floating curd. After excluding of the whey, there was not remained any whey in the curd.
Day of 5°C storage	1	The particle size of curd and elasticity was nearly similar to control, the floating curd was hardly discovered during the heating.
	2	The particle size of curd was unequal, the elasticity was bad. There were many floating curds during the heating, but when the whey was excluded, a few of remained whey were found in the curd.
	3	The particle size of curd was very unequal, the elasticity was very bad. There were a lots of floating curds. Also, there were many remained whey in the curd after the excluding.

¹⁾0 day of 5°C storage

10) 비숙성치즈제조중 sludge 생성

커드 절단시에 미세한 응고물(cheese fine)인 sludge가 생성되어 수율저하를 초래했음. sludge fragment는 커드가 절단될때 수율저하를 일으키어(Angevine, 1973) 2일 저온냉각한 원유로부터 제조한 치즈에서 6% 손실이 관측되었음.

11) 비숙성 치즈의 pH 변화

원유의 저온 저장기간에 따라 제조된 비숙성 치즈의 저장기간 중 pH의 변화는 Fig. 4과 같음. 각 sample의 pH의 변화 폭은 0.1 이내였음. 따라서 5°C 저장 기간 중에는 starter culture 미생물이나 저온세균의 현저한 활동은 없는 것으로 사료됨.

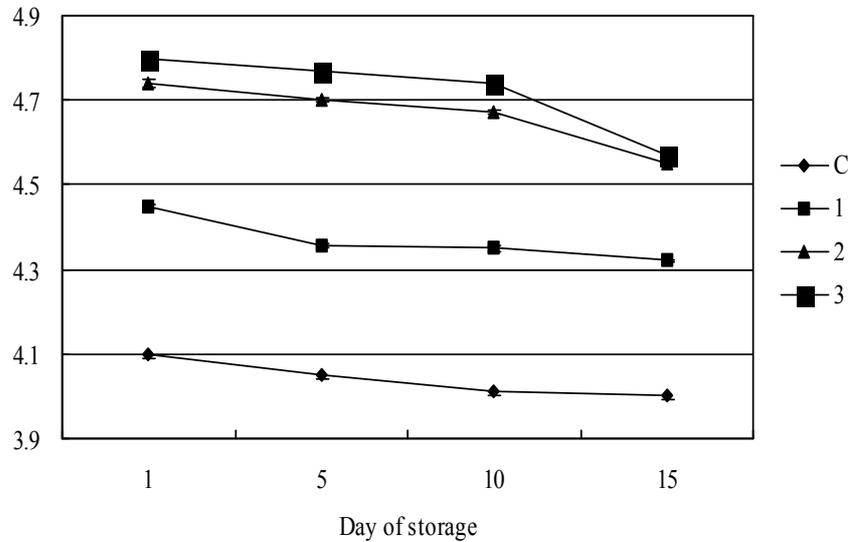


Fig. 4. Effect of storage of raw milk on pH of unripened cheese.

C, 0 day of 5°C storage; 1, 1 day of 5°C storage; 2, 2 day of 5°C storage; 3, 3 day of 5°C storage.

나. 비숙성 치즈의 이화학적 분석

1) 비숙성 치즈의 수분(moisture) 변화

원유의 저온냉각 기간에 따라 제조된 비숙성 치즈의 저장기간 중에 수분 Fig. 5과 같음. 원유를 공급받은 직후 제조된 비숙성 치즈가 77.6%로 수분 함량이 가장 큰 값을 나타냈고, 저온 저장기간이 길어짐에 따라 수분함량이 감소하여 3일 저온 저장된 원유로 제조된 비숙성 치즈는 69.64%를 나타내었음.

비숙성 치즈의 저장기간 동안의 수분함량은 모든 sample에서 유의적으로 감소하는 경향을 보였음($P < 0.05$). 비숙성치즈의 수분함량은 수율에 영향을 미치며 79~80%사이를 유지하는 것이 좋음. 이에 가장 근접한 대조구에서 수분함량이 77.6%로 나타내어 수율이 가장 높은 결과를 나타냈다고 사료됨.

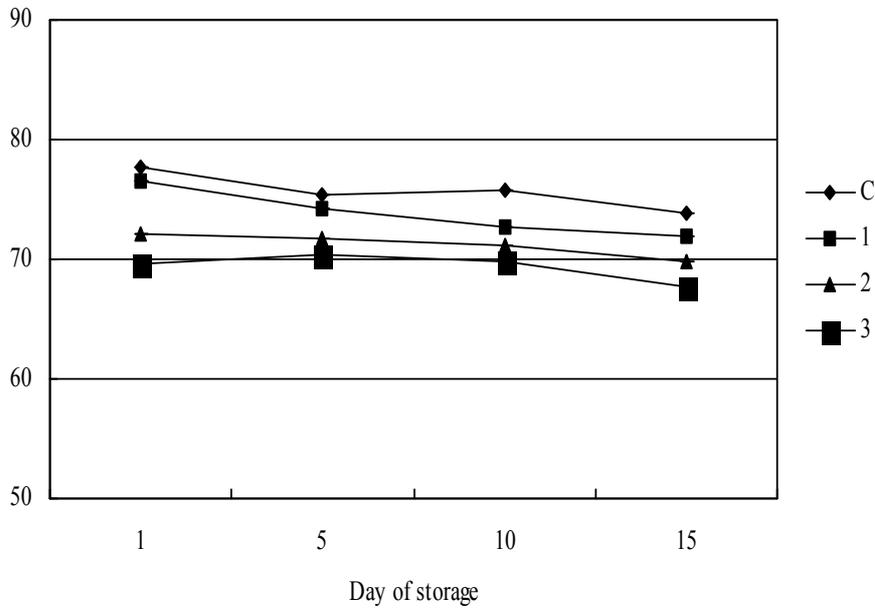


Fig. 5. Effect of storage of milk on moisture of unripened cheese.

C, 0 day of 5°C storage; 1, 1 day of 5°C storage; 2, 2 day of 5°C storage; 3, 3 day of 5°C storage.

2) 비숙성 치즈의 회분(ash) 정량

원유의 저온 저장기간에 따라 제조된 비숙성 치즈의 회분함량은 Fig. 6과 같음. 원유를 공급받은 직후 제조된 비숙성 치즈의 회분함량은 0.62%이며, 1일, 2일, 3일 저온 저장된 원유로 제조된 비숙성 치즈의 회분함량은 각각 0.62%, 0.61%, 0.62%로 모든 sample에서 유의적 차이를 나타내지 않았음($P < 0.05$).

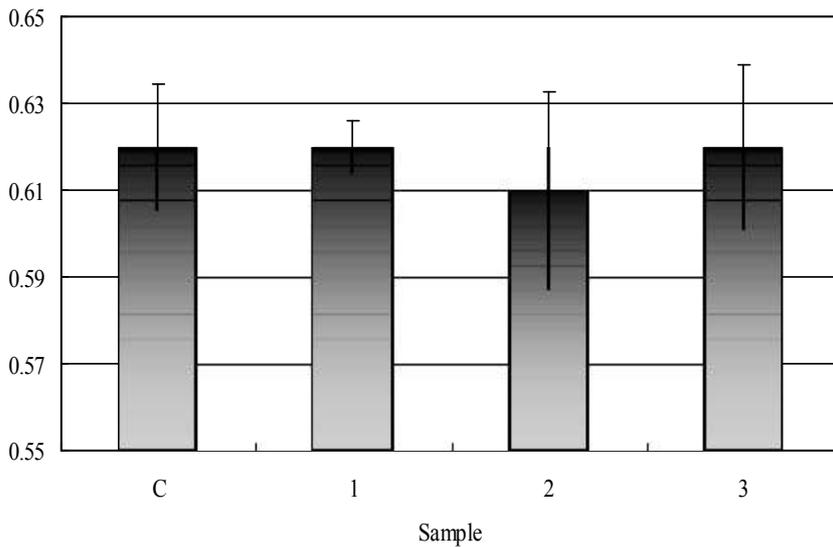


Fig. 6. Effect of storage of milk on ash of unripened cheese.

C, 0 day of 5°C storage; 1, 1 day of 5°C storage; 2, 2 day of 5°C storage; 3, 3 day of 5°C storage.

3) 비숙성 치즈의 단백질 변화

Fig. 7에서는 원유의 저온 저장기간에 따라 제조된 비숙성 치즈의 저장기간 동안의 단백질 함량의 변화를 나타내었음. 공급받은 직후의 원유로 제조된 단백질 함량은 10.4%를 나타냈으며, 1일, 2일, 3일 저온 저장된 원유로 제조된 비숙성 치즈의 단백질 함량은 각각 9.7%, 10.5%, 10.0%로 모든 시료들 간에 차이가 없는 것으로 나타났음.

모든 비숙성 치즈에서 저장기간이 지남에 따라 유의적으로 약간의 증감을 나타내었는데 ($P < 0.05$) 이는 수분의 감소로 인하여 고형분의 상대적 증감에 따른 것으로 사료됨.

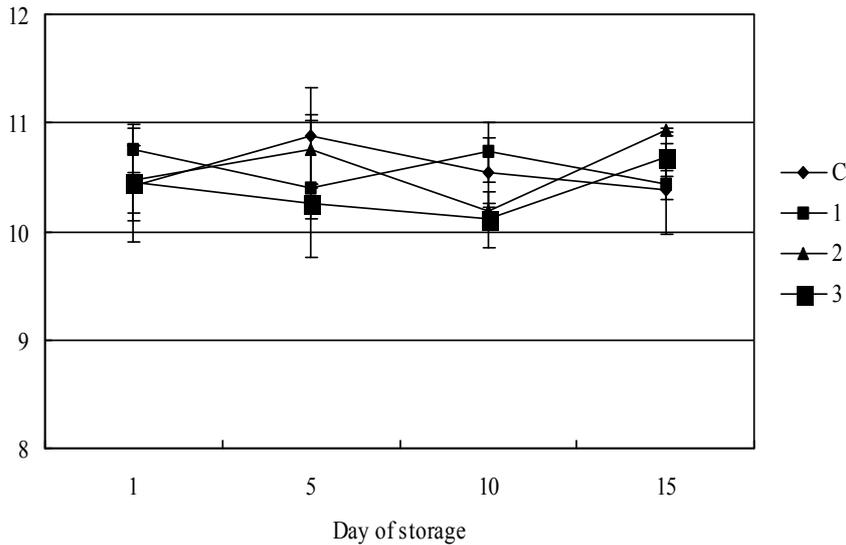


Fig. 7. Change of protein content in unripened cheese during storage period. C, 0 day of 5°C storage; 1, 1 day of 5°C storage; 2, 2 day of 5°C storage; 3, 3 day of 5°C storage.

4) 비숙성 치즈의 수용성 질소 화합물(water soluble nitrogen compounds)의 변화

Fig. 8에서는 원유의 저온 저장기간에 따라 제조된 비숙성 치즈의 저장기간 동안의 수용성 질소 화합물의 변화를 나타내었음. 공급받은 직후의 원유로 제조된 비숙성 치즈의 수용성 질소 화합물의 함량은 0.075%를 나타내었으며, 1일, 2일, 3일 저온 저장된 원유로 제조된 비숙성 치즈의 단백질 함량은 각각 0.018%, 0.82%, 0.094%로 수용성 질소 화합물은 원유의 저온 저장기간이 길어질수록 유의적으로 증가한 것으로 나타났음($P < 0.05$). 또한 모든 비숙성 치즈는 저장기간이 지남에 따라 수용성 질소의 함량은 유의적으로 증가하였음($P < 0.05$). 이런 단백질 함량의 변화는 수분의 감소로 인하여 고형분의 상대적 증감으로 볼 수 있으며, 저장기간중에 고분자 단백질이 저분자로 분해되어 유리아미노산의 생성되거나 아미노산으로 전환됨으로 해석할 수 있음

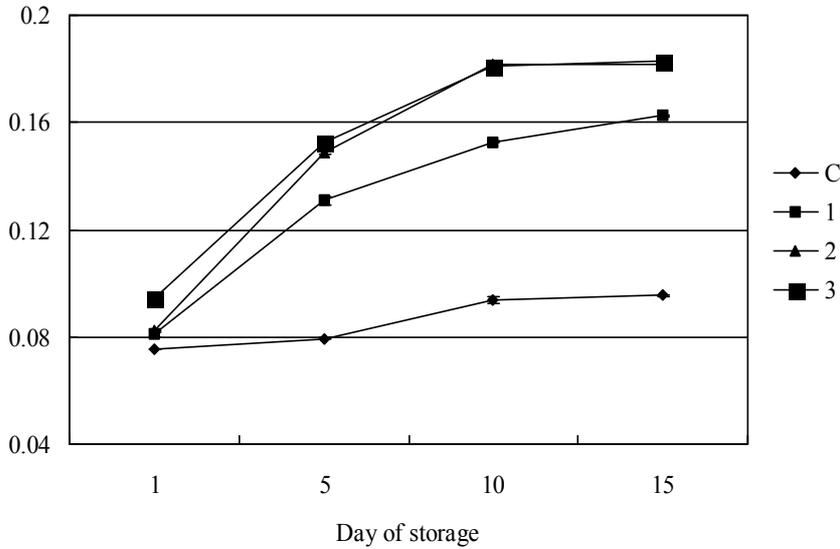


Fig. 8. Change of water soluble nitrogen in unripened cheese during storage period. C, 0 day of 5°C storage; 1, 1 day of 5°C storage; 2, 2 day of 5°C storage; 3, 3 day of 5°C storage.

5) 비숙성 치즈의 지방(fat)의 변화

Fig. 9에서는 원유의 저온 저장기간에 따라 제조된 비숙성 치즈의 저장기간 동안의 지방함량의 변화를 나타내었음. 공급받은 직후의 원유로 제조된 지방함량은 16.7%로 나타났으며, 1일 저온 저장된 원유로 제조된 비숙성 치즈의 지방 함량 16.8%를 나타냈었음. 2일, 3일 저온 저장된 원유로 제조된 비숙성 치즈의 지방함량은 각각 18.1%, 18.8%로 저온 저장기간이 길어질 수록 지방은 증가하는 경향을 보였지만 큰 변화는 보이지 않았음.

또한 모든 비숙성 치즈는 저장 기간 동안 지방은 다소 유의적으로 증가하는 경향을 보였는데 ($P < 0.05$), 이는 수분의 감소로 인하여 고형분의 상대적 증감에 따른 것으로 사료됨. 비숙성 치즈의 저장 기간 동안에는 지방분해가 거의 없어 총 유리지방산 함량은 큰 변화를 보이지 않음.

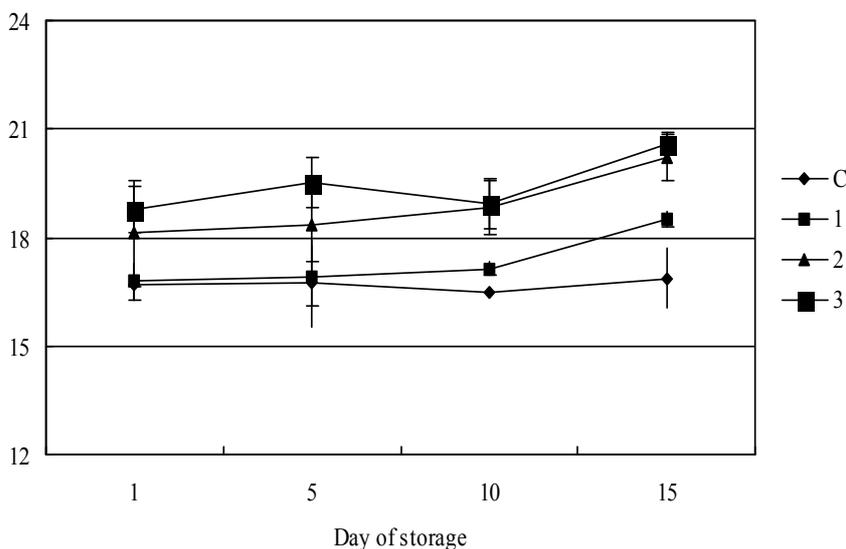


Fig. 9. Effect of storage of milk on fat contents of unripened cheese during storage period. C, 0 day of 5°C storage; 1, 1 day of 5°C storage; 2, 2 day of 5°C storage; 3, 3 day of 5°C storage.

6) 비숙성치즈의 물성(texture) 측정

식품의 물성은 입자의 크기, 모양을 포함한 구성성분의 물리적 배열과 화학성분에 좌우되며, 소비자 기호성과 유통기간에 영향을 미침. 식품의 물성중 응집성(cohesiveness)은 식품의 형태를 구성하는 내부적 결합에 필요한 힘, 탄력성(springiness)은 외부에 의하여 변형을 받고 있는 물체가 본래의 상태로 되돌아가려는 성질을 말하며, 부서짐성(brittleness)은 시료가 부서지고, 깨지며, 조각이 나는 데드는 힘을 말함(Civille, 1973).

Table 6~Table 9은 원유의 저온 저장기간에 따라 제조된 비숙성 치즈의 저장기간 동안의 물성의 변화를 나타낸 것임.

탄력성은 C>1>2>3 순으로 대조구가 가장 높은 값을 나타냈으며 저온 저장 기간이 길어질수록 감소하는 경향을 보였다. 비숙성 치즈의 저장 기간 동안에는 모든 처리구에서 다소 감소하는 경향을 보였음.

응집성은 식품조직을 이루는 성분들의 결합력을 나타내는 수치로서 이 수치가 높을수록 시료의 복원력 또는 결합력이 큰 것으로 간주할 수 있는데, 대조구와 1일 저온 저장된 원유로 제조된 비숙성 치즈는 비슷한 값을 보였으며, 2일, 3일 저온 저장된 원유로 제조된 비숙성 치즈에서는 감소하는 경향을 보였다. 비숙성 치즈의 저장 기간 동안에는 모든 처리구에서 유의적 차이가 나타나지 않았음(p<0.05).

씹음성은 고체의 식품을 저작하여 삼키기 용이한 상태로 만들기 까지 필요한 물리량을 수치로 나타낸 것으로 대조구와 1일, 2일 저온 저장된 원유로 제조된 cheese는 비슷한 값을 보였으며, 3일 저온 저장된 원유로 제조된 cheese에서 가장 높은 값을 나타냈음. 비숙성 치즈의 저장 기간 동안에는 대조구와 1일 저온 저장된 원유로 제조된 비숙성 치즈는 저장 15일 후에 유의적으로 감소하는 경향을 나타냈으며, 2일 저온 저장된 원유로 제조된 비숙성 치즈는 유의적으로 증가하는 경향을 보였으며(p<0.05), 3일 저온 냉각 된 원유로 제조된 비숙성 치즈 또한 유의적 차이는 없었지만 다소 증가하는 경향을 보였음.

부서짐성은 C<1<2<3 순으로 3일 저온 저장된 원유로 제조된 비숙성 치즈가 가장 높은 값을 나타냈음. 비숙성 치즈의 저장 기간 동안에는 모든 처리구에서 유의적으로 증가했음(p<0.05).

Table 6. Comparison of elasticity of unripened cheese during storage period

	Days			
	1	5	10	15
C	65.79±4.91 ^a	63.79±5.55 ^a	64.14±6.72 ^a	61.22±2.76 ^a
1	65.55±2.18 ^a	64.01±7.23 ^a	59.22±3.09 ^a	40.45±4.60 ^b
2	63.54±4.28 ^a	60.82±11.53 ^a _b	62.51±2.16 ^a	44.08±4.11 ^b
3	55.50±4.28 ^a	55.24±1.82 ^a	48.96±0.71 ^a	47.79±5.63 ^a

^{a-b} Mean values with different letters on the same bars are significantly different(P<0.05).

C, 0 day of 5°C storage; 1, 1 day of 5°C storage; 2, 2 day of 5°C storage; 3, 3 day of 5°C storage.

Table 7. Comparison of cohesiveness of unripened cheese during storage period

	Days			
	1	5	10	15
C	56.27±4.48 ^a	57.95±4.18 ^a	58.15±9.12 ^a	51.01±2.44 ^a
1	57.51±1.91 ^a	58.71±4.35 ^a	53.90±3.44 ^a	54.50±3.07 ^a
2	52.57±9.42 ^a	51.49±1.31 ^a	57.09±1.17 ^a	59.62±1.01 ^a
3	53.03±6.22 ^a	53.06±6.23 ^a	48.92±0.39 ^a	52.98±2.33 ^a

^{a-b} Mean values with different letters on the same bars are significantly different (P<0.05).
 C, 0 day of 5°C storage; 1, 1 day of 5°C storage; 2, 2 day of 5°C storage; 3, 3 day of 5°C storage.

Table 8. Comparison of chewiness of unripened cheese during storage period

	Days			
	1	5	10	15
C	63.15±5.64 ^a	64.11±5.04 ^a	53.82±4.03 ^a	27.29±2.12 ^b
1	58.89±1.25 ^a	51.14±7.36 ^{ab}	54.67±12.93 ^a	31.56±3.70 ^b
2	61.71±1.87 ^b	62.16±12.64 ^{ab}	63.78±4.61 ^{ab}	79.09±2.40 ^a
3	86.07±6.77 ^a	88.87±34.47 ^a	110.22±17.31 ^a	108.06±13.44 ^a

^{a-b} Mean values with different letters on the same bars are significantly different (P<0.05).
 C, 0 day of 5°C storage; 1, 1 day of 5°C storage; 2, 2 day of 5°C storage; 3, 3 day of 5°C storage.

Table 9. Comparison of brittleness of unripened cheese during storage period

	Days			
	1	5	10	15
C	2150.53±93.5 ^c	2747.07±102.2 ^b	3064.33±116.5 ^{ab}	3496.99±318.5 ^a
1	2455.38±380.4 ^b	2627.92±205.6 ^{ab}	3155.63±300.5 ^{ab}	3392.55±349.8 ^a
2	2850.38±456.6 ^c	4447.79±215.0 ^{ab}	3893.78±142.3 ^b	5115.13±337.4 ^a
3	4797.22±770.9 ^a	4948.75±203.1 ^a	5653.29±887.6 ^a	5309.10±68.6 ^a

^{a-c} Mean values with different letters on the same bars are significantly different (P<0.05).
 C, 0 day of 5°C storage; 1, 1 day of 5°C storage; 2, 2 day of 5°C storage; 3, 3 day of 5°C storage.

7) 주사전자현미경에 의한 비숙성 치즈 조직의 관찰

시료의 전자현미경적 관찰은 치즈의 성분 상호간의 형성된 구조 상태를 파악하는데 도움을 줌. Cheese의 rheology는 미세구조(i.e. 상호 성분간의 배열상태), 구성 성분 간의 물리화학적 상태 (i.e. Solid fat과 Liquid fat 사이의 비율), 육안적 구조(i.e. curd의 틈)를 말함(Aylward등, 1980).

다음 Fig. 10~13는 원유의 저온 저장기간에 따라 제조된 비숙성 치즈의 저장 기간 중의 조직을 주사전사현미경(Scanning electron micrographs, SEM)으로 관찰한 것으로 700~3,500배 확대한 사진을 나타낸 것임. 모든 비숙성 치즈 조직이 다공성의 커다란 덩어리를 형성하고 있음을 볼 수 있으며 casein micelle이 사슬형태로 연결되어 그물모양을 이루거나 작은 덩어리 형태로 뭉쳐져 있었음.

원유의 저온 저장기간이 지남에 따라 제조된 비숙성 치즈의 미세조직의 표면은 거칠어지고, micelle 직경은 감소하는 결과를 나타냈음.

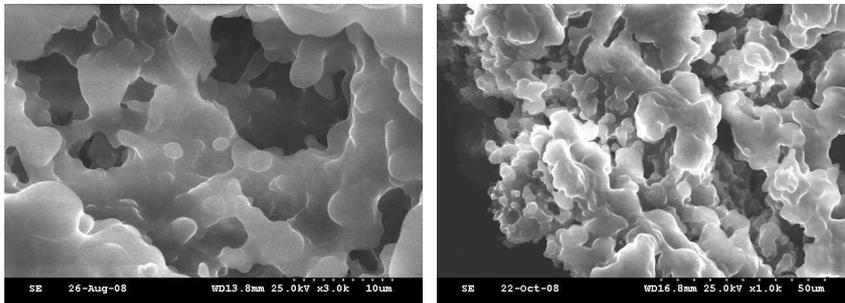


Fig. 10. SEM of unripened cheese manufactured by 0 day of 5°C storage of raw milk.

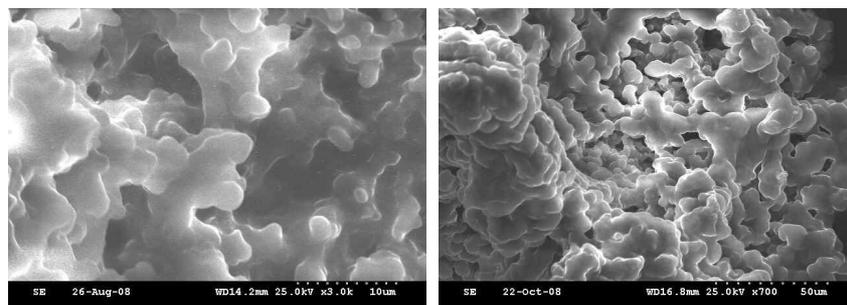


Fig. 11. SEM of unripened cheese manufactured by 1 day of 5°C storage of raw milk.

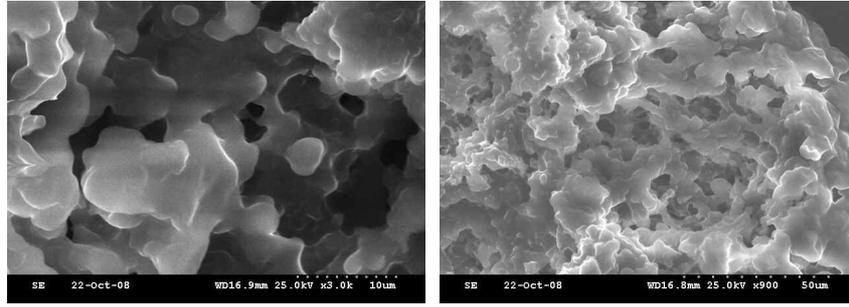


Fig. 12. SEM of unripened cheese manufactured by 2 day of 5°C storage of raw milk.

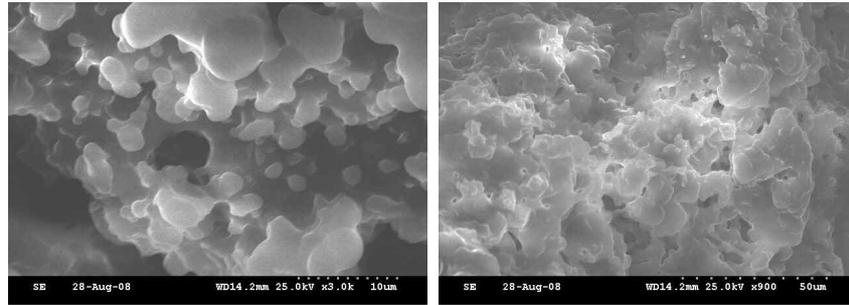


Fig. 13. SEM of unripened cheese manufactured by 3 day of 5°C storage of raw milk.

8) 관능검사(Sensory evaluation)

비숙성 치즈의 관능검사 평가로는 flavor, body/texture 그리고 appearance/color로 나누어 평가했음. 원유의 저온 저장기간에 따라 제조된 비숙성 치즈의 저장기간 동안의 관능적 변화는 Table 10에 나타내었음.

원유의 저온 저장기간에 따라 비숙성 치즈 간의 선호도 차이는 Table 10에서 나타나듯이 뚜렷하였음.

Body & texture는 대조구의 선호도가 4.2점으로 가장 높았으며, 원유의 저온 저장기간이 1일, 2일, 3일 지날수록 4.0점, 3.6점, 3.4점으로 선호도가 떨어지는 결과를 나타내었음. 대조구와 1일 저온 저장된 원유로 제조된 비숙성 치즈 경우 저장기간 10일까지 유의적으로 비교적 큰 변화가 나타나지 않았지만 2일, 3일 저온 저장된 원유로 제조된 비숙성 치즈는 저장기간 5일 만에 유의차를 나타내었음($p < 0.05$).

Appearance는 대조구의 선호도가 4.4점으로 가장 높았으며 원유의 저온 저장기간이 1일, 2일, 3일로 지날 수 록 4.0점, 3.4점, 3.4점으로 선호도가 떨어지는 결과를 나타내었음. 대조구에서는 비숙성 치즈의 저장기간 15일이 되어 유의적 차이를 보였지만, 나머지 처리구에서는 10일 만에 유의적 차이를 나타내었음($p < 0.05$).

Flavor에서는 대조구와 1일 저온 저장된 원유로 제조된 비숙성 치즈는 각각 4.4점, 4.6점으로 선호도가 높았으며, 2일, 3일 저온 저장된 원유는 각각 4.0점, 4.0점으로 선호도가 떨어졌음. 역시 모든 처리구에서 비숙성 치즈 제조 후 처음에는 비교적 높은 선호도를 보였으나 대조구와 1일 저온 저장 된 원유로 제조된 비숙성 치즈의 경우 저장기간 10일까지 유의적으로 비교적 큰 변화

가 없었지만 2일, 3일 냉장저장 된 원유로 제조된 비숙성 치즈의 경우 저장기간 5일 만에 유의차를 나타내었음($p < 0.05$).

관능검사의 모든 항목에서 저장기간이 진행됨에 따라 관능 점수가 감소했음. 따라서 비숙성 치즈에서 원유의 저온 저장 기간이 길어질수록 body & texture, appearance, flavor의 선호도가 현저히 줄어들었으며 또한 선호도에 원유의 저온 저장기간이 중요한 역할을 하고 있음을 보여주고 있음.

Table 10. Sensory scores of unripened cheese during the storage period

Sample	Section	Days			
		1	5	10	15
C	Baby & Texture	4.2±0.49 ^a	3.8±0.75 ^a	3.4±0.49 ^{ab}	2.6±0.49 ^b
	Appearance	4.4 ^a	4.2±0.75 ^a	3.4±0.49 ^a	2.2±0.40 ^b
	Flavor	4.4±0.49 ^a	4.0 ^{ab}	3.2±0.40 ^{bc}	2.4±0.49 ^c
1	Baby & Texture	4.0±0.89 ^a	3.4±0.49 ^a	2.8±0.40 ^{ab}	2.0±0.63 ^b
	Appearance	4.0±0.63 ^a	3.4±0.80 ^{ab}	2.6±0.49 ^b	2.2±0.75 ^b
	Flavor	4.6±0.49 ^a	3.6 ^{ab}	2.8±0.40 ^{bc}	2.0±0.49 ^c
2	Baby & Texture	3.6±0.49 ^a	2.4±0.49 ^b	2.2±0.40 ^b	1.8±0.40 ^b
	Appearance	3.4±0.80 ^a	3.4±0.49 ^a	2.4±0.49 ^{ab}	1.6±0.49 ^b
	Flavor	4.0±0.63 ^a	2.6±0.49 ^b	1.6±0.49 ^b	1.6±0.49 ^b
3	Baby & Texture	3.4±0.80 ^a	2.0 ^b	2.2±0.40 ^b	1.4±0.49 ^b
	Appearance	3.4±0.80 ^a	2.8±0.40 ^a	2.2±0.75 ^{ab}	1.4±0.79 ^b
	Flavor	4.0 ^a	1.4±0.49 ^b	1.4±0.49 ^c	1.4±0.49 ^c

^{a-c} Mean values with different letters on the same bars are significantly different ($P < 0.05$). C, 0 day of 5°C storage; 1, 1 day of 5°C storage; 2, 2 day of 5°C storage; 3, 3 day of 5°C storage.

저온성 미생물은 냉장저장 중 증가 하며 이것은 관능검사 결과의 저장기간이 증가함에 따라 생성된 약한 산미의 원인으로 사료됨.

9) 비숙성 치즈의 수율(yield) 변화

원유의 저온 저장기간에 따라 비숙성 치즈를 제조하여 제조된 비숙성 치즈의 수율은 Table 11과 같이 대조구와 처리구에서 유의적 차이를 보였음($P < 0.05$). 공급받은 직후의 원유로 제조된 비숙성 치즈에서 22.29%로 가장 높은 수율을 나타냈으며, 5°C에서 1일 저온 저장한 원유로 만

든 비숙성 치즈가 22.81%, 그리고 2일, 3일 저장한 원유로 만든 비숙성 치즈가 17.63%, 16.42%의 수율로 대조구에 비해 유의적으로 감소하는 경향을 보였음(P<0.05).

Table 11. Effect of storage of raw milk on unripened cheese yield

Sample	Control ¹⁾	Day of 5°C storage		
		1	2	3
Yield(%)	22.29 ^a	21.88 ^a	17.63 ^b	16.42 ^c

¹⁾ 0 day of 5°C storage

^{a-c} Mean values with different letters on the same bars are significantly different(P<0.05).

장기간의 저장 시 저온성 미생물로 하여금 응고성이 감소되어 수율이 저하. 치즈 베트바닥에 슬러지 형성하여 커드와 네트워크형성하지 않음. 카제인 마이셀은 젤의 네트워크를 형성하지 않고 침전된 sludge형성.

다. 치즈베이스에 의한 비숙성 치즈의 제조가능성 및 품질 조사

국산 치즈는 낮은 수율과 저장성 그리고 불리한 가격 경쟁력이라는 문제에 처해있음. 전통적 방법의 제조에서는 많은 양의 유청이 방출됨. 유청에는 0.5-0.6%의 유청단백질이 함유되어있음. 개선된 방법이 개발된다면 품질과 수율향상이 가능하고 원유에 포함된 단백질을 완전히 이용할 수 있음. 이 문제는 낙농선진국에서 널리 보급되고 있는 신기술인 한외여과(ultrafiltration)기법을 이용하여(Cheryan 1986) 해결할 수 있는 가능성을 조사했음. 본 연구에서는 한외여과를 이용하여 천연의 상태로 얻어진 치즈베이스에서 치즈를 제조하여 전통적방법으로 제조한 치즈와 품질평가를 실시했음.

1) 원료유의 열처리 조건

원료유는 치즈를 제조하기 전에 HTST방법으로 75°C에서 15초동안 살균하였음.

2) 치즈제조에 사용된 유산균은 다음과 같다.

TCC-3(Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus)

ABT-C1(Lactobacillus acidophilus, Bifidus longum, Streptococcus thermophilus)

NK34(Lactococcus lactis)

3) 치즈베이스제조

가) 한외여과 작동조건

한외여과기는 collodion으로 된, 분자량 cut-off 20,000Da인 막을 장착한 spiral wound type인 DSS Lab Unit M 20(Denmark)을 이용하여 다음 조건에서 작동하였음. 농축계수 (concentration factor)는 예비실험을 통해 2.5로 했음.

Table 12. Operation conditions of ultrafiltration for cheese base production

Module	DSS Lab Unit M 20
Membrane	Gr90pp(Denmark)
Temperature	50℃
Inlet pressure	6bar
Outlet pressure	2bar
Quality of the material	collodion

Concentration = Volume of Frist feed/Volume of Final feed

나) 원료유, retentate, permeate 분석

다음 Table 13은 사용한 원료유 및 농축액과 투과액의 조성을 나타냄.

Table 13. General components of raw milk, cheese base and permeate

	raw milk	retentate	permeate
TS ¹⁾	12.92 ^b	20.61 ^a	5.62 ^c
Ash	0.59 ^b	1.06 ^a	0.48 ^c
Lactose	4.88 ^b	4.90 ^a	5.38 ^c
Protein	3.65 ^b	6.52 ^a	0.43 ^c
Fat	3.81 ^b	6.59 ^a	0.21 ^c

^{a-c} means values with different letters on the same bars are significantly different(P<0.05).

¹⁾TS : Total solid

4) 치즈 제조공정 확립

가) 원유를 이용한 cheese의 제조

원유를 이용한 전통적 방법의 비숙성 치즈 제조는 Fig 14.과 같음.

원유를 HTST 방법(75°C/15초)으로 살균하여 31°C로 냉각시켰음. 냉각된 원료유를 starter와 rennet을 첨가하여 pH 4.6이 될 때까지 4~6시간 정치시켰음. pH 4.6에서 8mm cheese knives로 cutting한 후 약 15분간 정치한 후 처음 30분 동안은 30~38°C, 그 다음 30분 동안 38~45°C, 나머지 30분 동안 55°C까지 일정 비율로 상승 시키면서 적당한 속도와 강도로 교반하면서 열처리하였음. 그 후 유청을 배제시키고 정제수로 수세하여 cheese를 33~35°C로 냉각시키고, 다시 한번 5°C로 냉각시켰음. sack에서 10시간 동안 세척수를 완전히 제거하여 curd를 밀봉하고 5°C 냉장고에 보관하였음.

원유로 제조한 치즈를 대조구로 하여 저장 중 일정기간마다 시료를 채취하여 분석에 이용하였음.

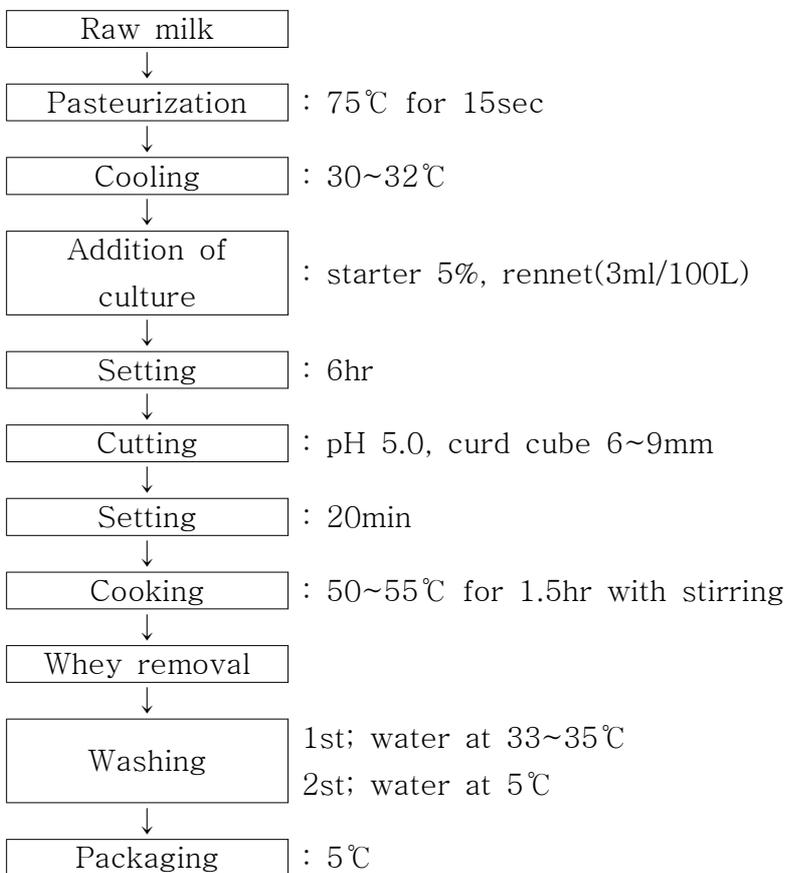


Fig 14. Traditional manufacturing procedure of unripened cheese.

나) cheese base를 이용한 cheese의 제조

치즈베이스를 이용한 비숙성 치즈 제조는 Fig 15.와 같음. 원유를 LTLT 방법(62°C /30분)으로 살균하여 농축계수 2.5로 한외여과하였음. 한외여과로 얻어진 치즈베이스(농축액)를 치즈 제조에 이용하였음. 치즈베이스로 제조한 치즈를 저장 중 일정기간마다 시료를 채취하여 대조구와 비교 분석하였음.

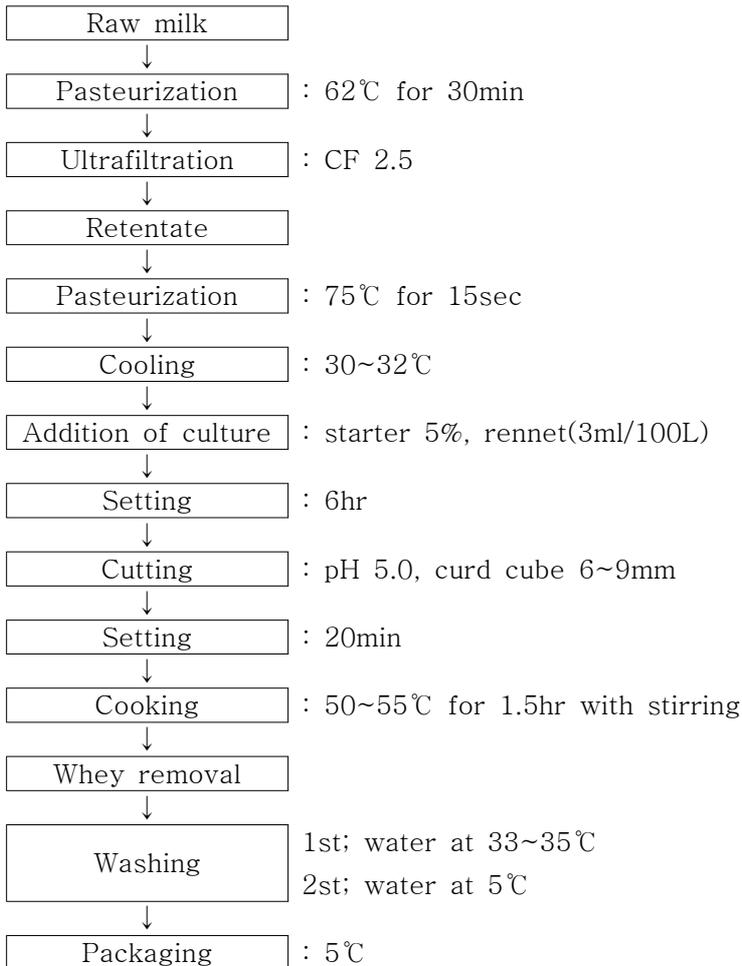


Fig 15. Manufacturing procedure of unripened cheese made with cheese base.

5) 결과 및 고찰

가) 비숙성 치즈의 수율(yield) 변화

Table 14은 전통적 방법에 의해 제조한 Control과 치즈베이스를 이용하여 제조한 치즈의 수율을 비교한 것임.

본 연구에서는 치즈베이스로 제조한 치즈가 Control에 비해 23%의 수율 향상을 나타냄. 치즈베이스를 이용한 치즈 제조 시 전체 유단백질의 20%를 차지하는 유청 단백질은 커드에 남게 됨. 기본적으로 이들은 넓은 산도범위에서 용해성이므로 이 점에서 이

들은 낮은 pH에서 침전되는 casein과 현저하게 차이가 있다. 치즈에 유청단백질이 합병되면 치즈의 영양가가 크게 향상되며 수율 증가로 인해 치즈생산 효율이 크게 개선됨. 치즈베이스는 원유를 한외여과하여 미리 수분을 제거한 상태임. 이것을 가지고 통상의 치즈 제조공정을 거치는데 이 때 유청 방출은 거의 없었음.

또한 분석결과를 볼 때 경질치즈와 달리 비숙성 치즈의 경우 단백질의 제품으로의 전이뿐만 아니라 유당의 함량 역시 제품의 최저 고형분 함량에 큰 영향을 미치는 것으로 보임. 유당은 단백질에 비해 저렴하므로 법적으로 비숙성 치즈의 최저 단백질함량을 정하는 것이 필요할 것으로 사료됨.

Table 14. Comparison of yield of unripened cheese made with raw milk, cheese base

Sample	Control	CB cheese
Yield (%)	23.03	28.32

Control : cheese made with raw milk
 CB cheese : cheese made with cheese base

나) 비숙성 치즈의 응고시간(coagulation time)의 변화

Table 15는 원유와 치즈베이스로 제조된 비숙성 치즈의 cutting pH(pH 4.6~4.8) 도달까지의 응고시간을 나타낸 것임. 또한 Table 16은 응고시간에 따른 pH 변화를 30분 간격으로 나타낸 것임.

치즈베이스를 이용한 치즈 제조 시 원유를 이용할 때보다 pH가 떨어지는 속도가 느렸고, 응고시간이 더 오래 걸림.

Table 15. Comparison of coagulation time of unripened cheese

Sample	Control	CB cheese
Coagulation Time (min)	330	450
Cutting pH	4.62	4.76

Control : cheese made with raw milk
 CB cheese : cheese made with cheese base

Table 16. Comparison of coagulation time by pH

Time (min)	Control	CB cheese
0	6.62	6.6
30	6.49	6.58
60	6.48	6.55
90	6.34	6.42
120	6.18	6.28
150	6.02	6.19
180	5.83	6.03
210	5.58	5.84
240	5.26	5.57
270	4.92	5.41
300	4.73	5.31
330	4.62	5.14
360	-	4.94
390	-	4.93
420	-	4.87
450	-	4.76

Control : cheese made with raw milk

CB cheese : cheese made with cheese base

다) 비숙성 치즈의 pH 변화

원유와 치즈베이스로 제조된 비숙성 치즈의 저장기간 중 pH의 변화는 Table 17와 같음. 두 가지 치즈 모두 저장기간 동안 유의적으로 pH가 감소하였음($p < 0.05$).

Table 17. Comparison of pH of unripened cheese

Sample	0	1week	2week
pH Control	4.62 ^a	4.55 ^b	4.41 ^c
pH CB cheese	4.76 ^a	4.61 ^b	4.46 ^c

^{a-c} means values with different letters on the same bars are significantly different ($p < 0.05$).

Control : cheese made with raw milk

CB cheese : cheese made with cheese base

라) 원유 및 치즈베이스로 제조한 치즈의 이화학적 분석

(1) 치즈의 일반성분 분석

Table 18는 두 가지 제조방법에 의해 제조한 치즈의 조성을 나타냄.

치즈베이스로 제조한 치즈의 성분 함량을 대조구와 비교하여 보면 비단백태 질소를 제외한 모든 성분의 함량이 증가하였는데 특히 총고형분과 총질소 함량이 크게 증가한 것으로 나타났음($p < 0.05$).

두 가지 방법에 의해 제조한 치즈 모두 총고형분 함량에서 총질소가 큰 비율을 차지하고 있는데 치즈베이스로 제조한 치즈의 총질소 비율이 대조구보다 높게 나타났음.

Table 18. General components of unripened cheese made with raw milk, cheese base during the storage period

Sample		0	1week	2week
TS ¹⁾	Control	27.29 ^b	28.54 ^{ab}	29.06 ^a
	CB cheese	41.04 ^a	42.39 ^a	43.08 ^a
Ash	Control	0.83 ^b	0.88 ^{ab}	0.92 ^a
	CB cheese	0.86 ^b	0.90 ^{ab}	0.93 ^a
Lactose	Control	3.95 ^a	3.86 ^a	3.74 ^b
	CB cheese	4.32 ^a	4.24 ^a	4.19 ^b
TN ²⁾	Control	11.31 ^a	11.49 ^a	10.89 ^b
	CB cheese	22.54 ^a	23.20 ^a	22.13 ^a
NPN ³⁾	Control	0.723 ^b	0.0728 ^b	0.0813 ^a
	CB cheese	0.0573 ^a	0.0567 ^a	0.0610 ^a
Fat	Control	12.20 ^a	12.36 ^a	12.33 ^a
	CB cheese	12.29 ^a	12.41 ^a	12.49 ^a

^{a-c} means values with different letters on the same bars are significantly different ($p < 0.05$).

¹⁾TS : Total solid.

²⁾TN : Total nitrogen.

³⁾NPN : Non protein nitrogen.

Control : cheese made with raw milk

CB cheese : cheese made with cheese base

(2) 단백질의 전기영동 분석

치즈베이스로 제조한 치즈의 casein과 유청단백질의 함량 분석을 위해 단백질의 전기영동분석을 실시했음.

전체 단백질 중 유청단백질 함량의 최고치는 원료유와 비슷한 수치를 나타내는 것이 바람직함. 이를 파악하기 위해 전기영동 분석을 실시한 결과 치즈의 유청단백질 함량 비율은 원료유와 상응하는 것으로 나타났음. 이것은 유청단백질이 원료유에서 제품으로 이전된 것을 의미함.

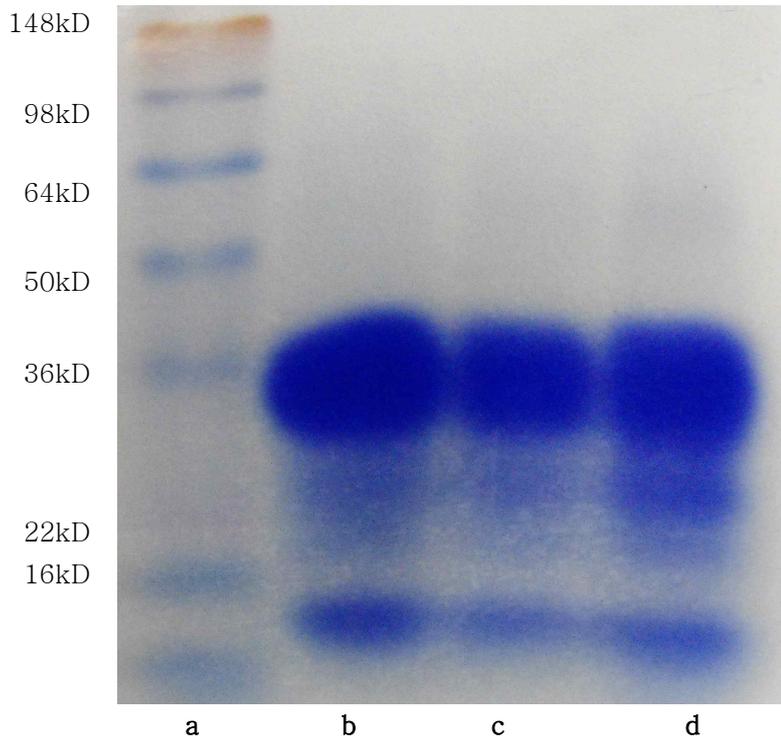


Fig. 16. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of sodium caseinate.

Gel was electrophoresed on 14% SDS polyacrylamide under an identical condition.

Molecular weight standard (a); 0 days of CB cheese (b); 1week of CB cheese (c); 2week of CB cheese (d).

(3) 비숙성 치즈의 물성(texture) 측정

Table 19.는 전통적 방법으로 제조한 Control과 치즈베이스로 제조한 치즈의 물성을 비교한 것임.

탄력성은 제조 직후에는 치즈베이스로 제조한 치즈가 control보다 더 높은 값을 나타내었음. 저장기간이 길어짐에 따라 두 가지 치즈의 탄력성은 약간 감소하는 것으로 보였으나 유의적으로 큰 차이가 나타나지는 않았음($p < 0.05$).

응집성 또한 탄력성과 마찬가지로 치즈베이스로 제조한 치즈의 값이 control보다 높게 나타났다. 두 가지 치즈 모두 저장기간이 지난 후에도 값의 변화가 거의 나타나지 않았으나 control은 저장 2주 후 약간 감소하였음($p < 0.05$).

씹음성은 control이 치즈베이스로 제조한 치즈보다 값이 높게 나왔음. 저장 기간동안 control은 값이 감소하였으나 치즈베이스로 제조한 치즈는 값에 유의적 차이가 나타나지 않았음($p < 0.05$).

부서짐성은 치즈베이스로 제조한 치즈가 control에 비해 훨씬 높게 나타났음. 저장 1주 후에는 두 치즈 모두 값이 약간 감소하였으나 2주 후에는 큰 변화가 나타나지 않았음($p < 0.05$).

이러한 결과로 보았을 때 치즈베이스로 제조한 치즈가 Control에 비해 커드가 더 탄력있고 저작운동 시 부드러운 식감을 느낄 수 있다는 것을 알 수 있음.

Table 19. Texture of unripened cheese made with raw milk, cheese base during the storage period

	Sample	0	1week	2week
Elasticity (%)	Control	76.62 ^a	81.43 ^a	73.25 ^a
	CB cheese	90.98 ^a	83.34 ^a	78.48 ^a
Cohesiveness (%)	Control	70.74 ^a	65.08 ^a	55.47 ^b
	CB cheese	86.19 ^a	86.27 ^a	80.43 ^a
Chewiness (g)	Control	192.66 ^a	146.52 ^b	133.15 ^b
	CB cheese	162.54 ^a	162.22 ^a	155.23 ^a
Brittleness (g)	Control	12974.7 ^a	9683.5 ^b	8727.8 ^b
	CB cheese	16122.6 ^a	15337.2 ^{ab}	14412.8 ^b

^{a-c} means values with different letters on the same bars are significantly different ($p < 0.05$).

Control : cheese made with raw milk

CB cheese : cheese made with cheese base

(4) 관능검사(sensory evaluation)

두 가지 제조방법으로 제조된 치즈의 관능검사 실시 결과는 Table 20.과 같음.

비숙성 치즈의 외관은 유백색, 조직은 균일하게 유연하며 탄력이 있어야 함. 또한 치즈를 보관 시 유청의 분리가 일어나지 않아야 하고 건조한 입자가 보이지 않아야 함. 미각은 자극적이지 않은 순수한 신맛을 나타내야 함. 새로운 제법인 치즈베이스로 비숙성 치즈를 제조하는 방법은 조직과 구조에 영향을 끼치고 향미에도 영향을 줄 수 있음. 본 실험의 결과 Table 20.에 나타나듯이 치즈베이스로 제조된 치즈는 body & texture, appearance, flavor에서 긍정적인 선호도를 나타냈음. 치즈베이스로 제조한 치즈는 Control에 비해 빛나고 미끄러운 외관이 특징이고 조직도 양호한 것으로 나타났음. 이는 전통적 방법으로 제조한 Control은 마지막에 세척수와 유청 제거 과정에서 사용한 sack방법이 유청 방출이 불균형적인 것에 기인하는 것으로 사료됨($p < 0.05$).

한외여과 시에 우유 중의 casein 의 농축이 일어나 자연적 풍미와 조직을 가지게 되고 점도가 향상되며 냉장보관 기간 동안 유청이 분리되는 문제를 감소시킬 수 있을 것임.

Table 20. Sensory scores of unripened cheese made with raw milk, cheese base during the storage period

Sample		0	1week	2week
Body&texture	Control	4.44±0.50 ^a	3.14±0.59 ^b	1.75±0.46 ^c
	CB cheese	4.81±0.37 ^a	4.34±0.39 ^b	3.05±0.31 ^c
Appearance	Control	4.43±0.42 ^a	3.34±0.46 ^b	2.46±0.49 ^c
	CB cheese	4.63±0.52 ^a	4.07±0.41 ^b	3.63±0.35 ^b
Flavor	Control	4.3±0.44 ^a	3.45±0.48 ^b	2.54±0.50 ^c
	CB cheese	4.75±0.46 ^a	3.69±0.46 ^b	3.06±0.56 ^c

^{a-c} means values with different letters on the same bars are significantly different (p<0.05).

Control : cheese made with raw milk

CB cheese : cheese made with cheese base

라. WPC 강화치즈

비숙성 치즈에서 수율향상과 구조형성을 위한 유청 단백질의 첨가가 끼치는 영향에 대한 조사임. 웰빙 추세에 따라 낮은 지방함량을 갖는 제품이 시장에서 선호됨. 이때 제품의 구조문제가 발생할 수 있다. 소비자는 저지방이면서 고지방 함량이 갖는 안정된 구조를 원함. 안정제와 같은 유조성분 이외의 물질을 사용하지 않고 우유 내에 존재하는 성분인 유청단백질 농축물(WPC)을 이용하여 시장의 요구에 부응한 가능성에 관한 연구임. 이 소재는 보수성이 양호하므로 안정된 구조형성에 도움을 줄 수 있음.

1) 원료유의 제조

가) 공시재료

원료유는 탈지유를 사용하였음.

공시균주는 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*을 1:1로 혼합 동결한 TCC-3(Chr. Hansen, Denmark)를 사용하였음.

응유효소인 rennet는 standard plus 900제품(Chr. Hansen, Denmark)을 사용하였음.

나) WPC 제조

비숙성 치즈 제조 후 얻은 유청을 pH 7.0으로 조정한 후 70℃에서 5분 열처리하고 50℃로 냉각하였음. 열처리된 유청을 한외여과 방법을 통하여 permeate를 제거하고 분무건조하여 단백질 함량 35%를 소지하는 WPC를 제조하여 사용했음.

한외여과는 collodion으로 된, 분자량 cut-off 20 kDa인 막을 장착한 spiral wound type인 DSS Lab Unit M 20(Denmark)을 이용하였음(Table 1-20). 분무건조는 Mini Spray Dryer B-191(BüCHI, Switzerland)를 이용하여 inlet 온도 175℃, outlet 온도 70℃의 조건에서 진행되었음.

이러한 치즈부산물인 유청의 이용은 유조성성분의 활용이라는 면에서도 의의가 있음.

Table 21. Operation conditions of ultrafiltration for cheese base production

Module	DSS Lab Unit M 20
Membrane	Gr90pp(Denmark)
Temperature	50℃
Inlet pressure	6bar
Outlet pressure	2bar
Quality of the material	collodion

Concentration = volume of first feed/folume of final feed.

다) WPC 첨가 원료유의 제조

위에서 제조한 WPC를 탈지유에 5%, 10% 첨가하여 원료유를 제조하였음.

라) 원료유의 일반성분 분석

탈지유와 WPC를 첨가한 탈지유의 일반성분 분석은 Table 22.과 같음.

탈지유의 일반성분 함량은 총고형분 9.87%, 회분 0.82%, 유당 4.92%, 단백질 3.48%이고 지방은 미량으로 나타났음. WPC를 첨가한 탈지유의 일반성분은 탈지유와 비교하였을 때 모두 유의적으로 값이 증가하였음. WPC 5%, 10% 첨가 탈지유의 일반성분을 비교하였을 때, WPC 10% 첨가 탈지유가 회분을 제외한 모든 성분에서 유의적으로 높은 값을 나타냈음($p < 0.05$).

Table 22. General components of skim milk, skim milk added with WPC

Components(%)	Skim milk	Skim milk added with WPC 5%	Skim milk added with WPC 10%
TS ¹⁾	9.87 ^c	12.51 ^b	13.6 ^a
Ash	0.82 ^b	1.16 ^a	1.19 ^a
Lactose	4.92 ^c	5.74 ^b	6.31 ^a
Protein	3.48 ^c	4.16 ^b	4.52 ^a
Fat	trace	trace	trace

^{a-c} means values with different letters on the same bars are significantly different ($p < 0.05$).

¹⁾TS : Total solid.

2) 제조공정 확립

가) 탈지유를 이용한 비숙성 치즈의 제조

탈지유를 이용한 비숙성 치즈 제조 방법은 Fig 17.과 같음.

탈지유를 HTST 방법(75℃/15초)으로 살균하여 31℃로 냉각시켰음. 냉각된 원료유를 starter와 rennet을 첨가하여 pH 4.6이 될 때까지 4~6시간 정치시켰음. pH 4.6에서 8mm cheese knives로 cutting한 후 약 15분간 정치한 후 처음 30분 동안은 30~38℃, 그 다음 30분 동안 38~45℃, 나머지 30분 동안 55℃까지 일정 비율로 상승 시키면서 적당한 속도와 강도로 교반하면서 열처리하였음. 그 후 유청을 배제시키고 정제수로 수세하여 cheese를 33~35℃로 냉각시키고, 다시 한 번 5℃로 냉각시켰음. Sack에서 10시간 동안 세척수를 완전히 제거하여 curd를 밀봉하고 5℃ 냉장고에 보관하였음.

탈지유로 제조한 치즈를 대조구로 하여 저장 중 일정기간마다 시료를 채취하여 분석에 이용하였음.

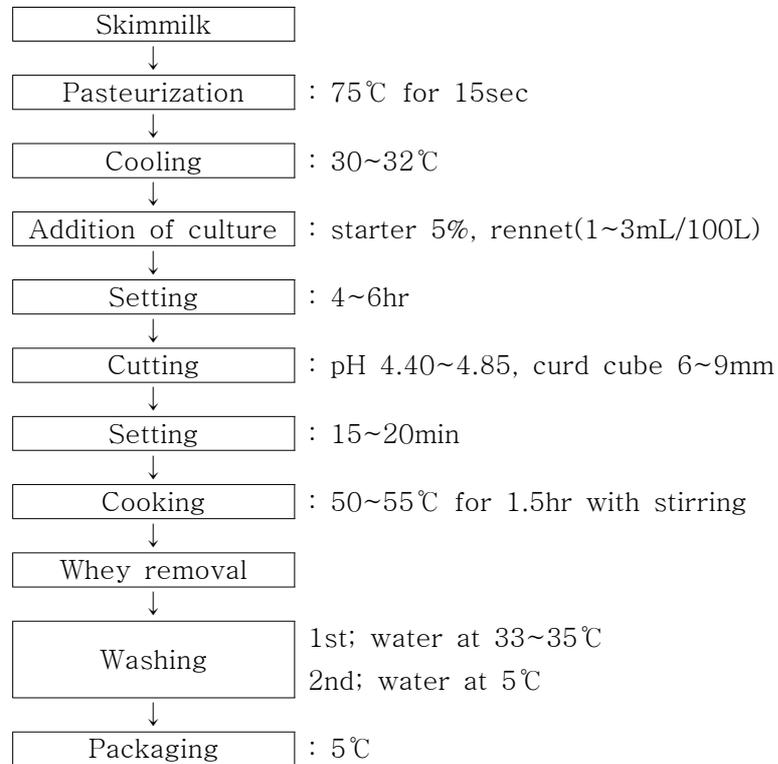


Fig 17. Manufacturing procedure of unripened cheese made with skim milk.

나) WPC를 첨가한 원료유를 이용한 비숙성 치즈의 제조

WPC를 첨가한 원료유를 이용한 비숙성 치즈의 제조 방법은 Fig 18.와 같음.

대조구와 동일한 탈지유에 WPC를 5%, 10%의 비율로 첨가하여 비숙성 치즈를 제조 하였음.

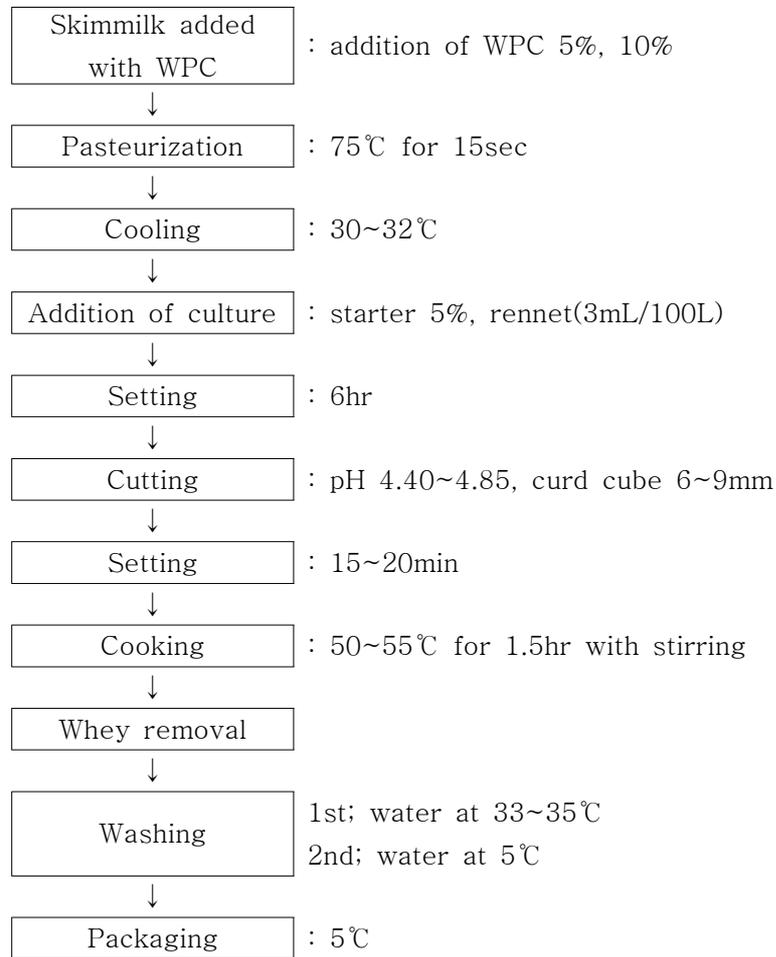


Fig 18. Manufacturing procedure of unripened cheese made with skim milk added with WPC.

3) 결과 및 고찰

가) 비숙성 치즈의 수율(yield)의 변화

Table 23.은 탈지유로 제조한 치즈와 WPC를 첨가한 치즈의 수율을 비교한 것임.

본 연구에서는 WPC를 첨가한 치즈의 수율이 Control보다 높게 나타났고, WPC 첨가 비율이 증가할수록 수율이 증가하였음.

Table 23. Comparison of yield of unripened cheese made with skim milk, cheese made with skim milk added with WPC

Sample	Control	Cheese 1	Cheese 2
Yield (%)	26.38	27.55	33.25

Cheese 1 : cheese made by skim milk added with WPC 5%
 Cheese 2 : cheese made by skim milk added with WPC 10%

나) 비숙성 치즈의 응고시간(coagulation time)의 변화

Table 24.는 탈지유와 WPC 첨가 탈지유로 제조한 비숙성 치즈의 cutting pH(pH 4.6~4.8) 도달까지의 응고시간을 나타낸 것임. 또한 Table 25는 응고시간에 따른 pH 변화를 30분 간격으로 나타낸 것임.

탈지유와 WPC 첨가 탈지유를 이용한 치즈 제조를 비교하였을 때 Control과 WPC 5% 첨가 치즈 제조 시에는 pH 감소 속도와 응고시간이 큰 차이가 나지 않았음. 그러나 WPC 10% 첨가 치즈는 pH 감소 속도가 Control보다 느리게 나타났고 응고시간 역시 오래 걸렸음.

Table 24. Comparison of coagulation time of unripened cheese made with skim milk, cheese made by skim milk added with WPC

Sample	Control	Cheese 1	Cheese 2
Coagulation Time(min)	330	330	420
Cutting pH	4.67	4.65	4.78

Cheese 1 : cheese made by skim milk added with WPC 5%
 Cheese 2 : cheese made by skim milk added with WPC 10%

Table 25. Comparison of coagulation time by pH

Time (min)	Control	Cheese 1	Cheese 2
0	6.52	6.5	6.47
30	6.44	6.42	6.36
60	6.27	6.25	6.27
90	6.04	6.02	6.19
120	5.94	5.84	6.08
150	5.6	5.55	5.94
180	5.31	5.41	5.83
210	5.14	5.32	5.5
240	5.0	5.18	5.36
270	4.91	5.04	5.13
300	4.82	4.86	4.95
330	4.67	4.65	4.89
360	-	-	4.86
390	-	-	4.8
420	-	-	4.78

Cheese 1 : cheese made by skimmilk added with WPC 5%

Cheese 2 : cheese made by skimmilk added with WPC 10%

다) 비숙성 치즈의 pH 변화

탈지유와 WPC 첨가 탈지유로 제조된 비숙성 치즈의 저장기간 중 pH의 변화는 Table 26.과 같음.

Control을 비롯한 모든 치즈가 2주간의 저장기간 동안 유의적으로 pH가 감소하였음. 저장 2주 후의 pH는 Control에 비하여 WPC 첨가 치즈가 약간 더 높게 나타났음 ($p < 0.05$).

Table 26. Comparison of pH of unripened cheese

Sample	0	1week	2week
Control	4.67 ^a	4.51 ^b	4.36 ^c
pH Cheese 1	4.61 ^a	4.53 ^b	4.44 ^c
Cheese 2	4.57 ^a	4.49 ^b	4.41 ^c

^{a-c} means values with different letters on the same bars are significantly different ($p < 0.05$).

Cheese 1 : cheese made by skimmilk added with WPC 5%

Cheese 2 : cheese made by skimmilk added with WPC 10%

라) 비숙성 치즈의 이화학적 분석

(1) 치즈의 일반성분 분석

Table 27.는 탈지유와 WPC 첨가 탈지유로 제조된 치즈의 일반성분 함량을 나타냄.

Control과 WPC 첨가 치즈의 일반성분 함량을 비교하여 보면 비단백태 질소를 제외한 모든 성분에서 WPC 첨가 치즈의 값이 더 높게 나타났음. 특히 치즈의 총고형분은 WPC의 첨가와 함께 확실히 증가하였음. WPC 10% 첨가한 치즈가 5% 첨가한 치즈보다 더 높게 나타났음(p<0.05).

WPC 10% 첨가 치즈와 WPC 5% 첨가 치즈를 비교하여 보면 WPC 10% 첨가 치즈가 모든 성분에서 더 높은 값을 나타내었음. 이중 특히 WPC 10% 첨가 치즈가 5% 첨가 치즈에 비해 훨씬 높은 유당 함량을 나타냈는데 이 결과는 WPC 자체의 높은 유당 함량에 기인함(p<0.05).

Table 27. General components of unripened cheese made with skimmilk, cheese made with skimmilk added with WPC during the storage period

Sample		0	1week	2week
TS ¹⁾	Control	22.19 ^c	23.15 ^b	24.23 ^a
	Cheese 1	28.21 ^b	29.10 ^{ab}	30.21 ^a
	Cheese 2	30.2 ^c	31.38 ^b	32.40 ^a
Ash	Control	0.76 ^a	0.71 ^a	0.74 ^a
	Cheese 1	1.10 ^a	0.98 ^b	0.94 ^b
	Cheese 2	1.18 ^a	1.14 ^{ab}	1.05 ^b
Lactose	Control	5.05 ^a	4.94 ^a	4.52 ^b
	Cheese 1	5.17 ^a	4.59 ^b	4.66 ^{ab}
	Cheese 2	7.46 ^a	6.27 ^b	5.43 ^c
TN ²⁾	Control	11.90 ^a	9.53 ^b	9.28 ^b
	Cheese 1	12.24 ^a	11.57 ^a	10.24 ^b
	Cheese 2	12.55 ^a	11.47 ^a	9.99 ^b
NPN ³⁾	Control	0.0565 ^a	0.0553 ^a	0.0675 ^a
	Cheese 1	0.0291 ^b	0.0447 ^b	0.0704 ^a
	Cheese 2	0.0369 ^c	0.0547 ^b	0.0738 ^a
Fat	Control	trace	trace	trace
	Cheese 1	trace	trace	trace
	Cheese 2	trace	trace	trace

^{a-c} means values with different letters on the same bars are significantly different (p<0.05).

¹⁾TS : Total solid.

²⁾TN : Total nitrogen.

³⁾NPN : Non protein nitrogen.

Cheese 1 : cheese made by skimmilk added with WPC 5%

Cheese 2 : cheese made by skimmilk added with WPC 10%

(2) 단백질의 전기영동분석

유청단백질을 첨가하여 제조한 치즈의 casein과 유청단백질 함량을 분석하기 위해 전기영동을 실시한 결과는 Fig 19.으로 나타났음.

비숙성 치즈의 전체단백질 중 유청단백질 함량의 최고치는 원료유와 비슷한 18.5% 정도를 초과하지 않는 것이 바람직함. 분석된 유청단백질 함량의 비율은 원료유와 상응한 것으로 나타났음.

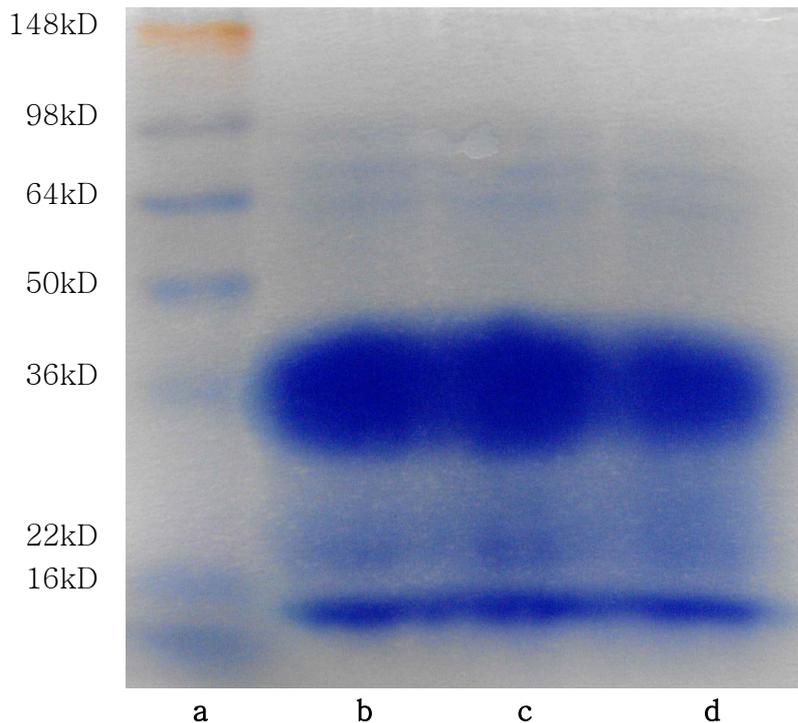


Fig 19. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of sodium caseinate. Gel was electrophoresed on 14% SDS polyacrylamide under an identical condition.

Molecular weight standard (a); 0 days of cheese made by skimmilk added with WPC 5% (b); 1week of cheese made by skimmilk added with WPC 5% (c); 2week of cheese made by skimmilk added with WPC 5% (d).

(3) 비숙성 치즈의 물성(texture) 측정

치즈의 원료유에 따른 cheese의 저장기간 동안의 물성의 변화는 Table 28.와 같음.

탄력성은 WPC 5% 첨가 치즈와 Control의 값이 가장 높았고 WPC 10% 첨가 치즈의 값이 가장 낮게 나타났음. 저장기간 동안의 변화는 모든 치즈가 1주 저장 후에는 값의 변화가 크지 않았으나 Control과 WPC 5% 첨가 치즈는 2주 저장 후에 값이 유의적으로 감소하였음($p < 0.05$).

응집성은 WPC 5% 첨가 치즈 > Control > WPC 10% 첨가 치즈 순으로 값이 나타났음. 저장기간 동안의 변화는 모든 치즈의 값이 유의적 차이가 나타나지 않았음($p < 0.05$).

씹음성은 고체의 식품을 저작하여 삼키기 용이한 상태로 만들기까지 필요한 물리량을 수치로 나타낸 것으로 탈지유로 제조한 치즈의 값이 가장 높게 나타났음. 저장기간에 따른 변화는 WPC 5% 첨가 치즈의 값은 저장기간 동안 유의적으로 값이 감소하였고,

탈지유로 제조한 치즈와 WPC 10% 첨가 치즈의 값은 저장 1주까지는 큰 변화가 없었으나 2주 저장 후 유의적으로 값이 감소하였음.($p<0.05$).

부서짐성은 WPC 10% 첨가 치즈>탈지유로 제조한 치즈>WPC 5% 첨가 치즈 순으로 값이 나타났음. 저장기간 동안의 변화는 탈지유로 제조한 치즈와 WPC 10% 첨가 치즈는 저장 2주 후에 값이 감소하였고 WPC 5% 첨가 치즈는 저장 1주 후에 값이 감소하여 그 후에는 큰 변화가 없는 것으로 나타났음($p<0.05$).

이 결과를 종합적으로 볼 때 WPC를 5% 첨가했을 때 가장 바람직한 물성을 나타냄.

Table 28. Texture of unripened cheese made with skimmilk, cheese made with skimmilk added with WPC during the storage period

	Sample	0	1week	2week
Elasticity(%)	Control	80.86 ^a	79.12 ^a	67.55 ^b
	Cheese 1	89.99 ^a	85.01 ^a	72.85 ^b
	Cheese 2	65.86 ^a	63.33 ^a	59.40 ^a
Cohesiveness (%)	Control	68.89 ^a	79.02 ^a	73.24 ^a
	Cheese 1	82.62 ^a	86.53 ^a	75.36 ^a
	Cheese 2	53.80 ^a	56.79 ^a	50.54 ^a
Chewiness (g)	Control	84.50 ^a	76.99 ^a	54.23 ^b
	Cheese 1	75.62 ^a	57.10 ^b	48.26 ^c
	Cheese 2	70.12 ^a	63.03 ^{ab}	38.62 ^b
Brittleness (g)	Control	5941.7 ^a	5066.7 ^a	3403.2 ^b
	Cheese 1	3653.0 ^a	2663.7 ^b	2214.2 ^b
	Cheese 2	7496 ^a	6958 ^a	4579 ^b

^{a-c} means values with different letters on the same bars are significantly different ($p<0.05$).

Cheese 1 : cheese made by skimmilk added with WPC 5%

Cheese 2 : cheese made by skimmilk added with WPC 10%

(4) 관능검사(sensory evaluation)

관능검사에서는 표면, 냄새, 조직, 미각을 평가하였음. 원료유와 저장기간에 따른 비숙성 치즈의 관능검사 결과는 Table 29.와 같음.

Body&texture는 WPC 5% 첨가 치즈에서 매끄럽고 안정성을 보여 선호도가 5점으로 가장 높았으며, 저장기간 동안 유의적으로 비교적 큰 변화가 나타나지 않았음. WPC 10% 첨가 치즈의 경우 제조 직후의 점수는 나머지 cheese와 비슷하였으나 저장기간이

길어질수록 유의적 차이가 가장 크게 나타났다($p < 0.05$). WPC 첨가한 치즈는 크림상을 나타냈음.

Appearance는 WPC 5% 첨가 치즈의 선호도가 가장 높았으며, Control과 WPC 10% 첨가 치즈의 점수는 비슷하게 나타났음. 탈지유로 제조한 치즈는 저장기간 동안 유의적으로 큰 변화가 나타나지 않았지만 WPC 10% 첨가 치즈의 경우 저장기간이 길어질수록 값이 유의적으로 크게 감소하였음($p < 0.05$). WPC를 함유하는 치즈에서 유청 혼합이 제대로 일어나지 않아 발생하는 유청 라인은 볼 수 없었음.

Flavor는 Control이 온화하고 편안한 신맛을 나타내어 값이 가장 높았으나 WPC 5% 첨가 치즈의 값 또한 불리하지 않은 것으로 나타났음. 저장기간 동안 Control과 WPC 첨가 치즈 모두 유의적으로 선호도의 감소가 나타났음($p < 0.05$). 이 결과를 종합적으로 볼 때 WPC를 5% 첨가했을 때 가장 바람직한 선호도를 나타냈음.

Table 29. Sensory scores of unripened cheese made with skim milk, cheese made with skim milk added with WPC during the storage period

	Sample	0	1week	2week
Body&texture	Control	4.38±0.74 ^a	3.63±0.52 ^b	2.63±0.52 ^c
	Cheese 1	5.0 ^a	4.63±0.52 ^a	3.25±0.71 ^b
	Cheese 2	4.75±0.46 ^a	3.38±0.74 ^b	1.75±0.46 ^c
Appearance	Control	4.63±0.52 ^a	3.38±0.52 ^b	1.88±0.64 ^c
	Cheese 1	4.88±0.35 ^a	4.38±0.52 ^b	2.63±0.52 ^c
	Cheese 2	4.63±0.52 ^a	3.50±0.53 ^b	1.75±0.46 ^c
Flavor	Control	4.75±0.16 ^a	3.5±0.19 ^b	2.75±0.16 ^c
	Cheese 1	68±0.52 ^a	3.88±0.83 ^a	2.67±0.53 ^b
	Cheese 2	4.4.25±0.46 ^a	3.75±0.71 ^a	1.50±0.53 ^b

^{a-c} means values with different letters on the same bars are significantly different ($p < 0.05$).

Cheese 1 : cheese made by skim milk added with WPC 5%

Cheese 2 : cheese made by skim milk added with WPC 10%

마. 두유를 첨가한 치즈의 제조

본 연구에서는 수입에 의존하고 있는 비숙성 치즈의 가격 경쟁력을 확보하기 위해 우유 성분 일부를 콩 성분으로 대체하였음. 두유를 탈지유에 5%와 10%를 첨가하여 제품을 제조한 후 전통적인 방법으로 제조한 치즈와 비교 분석하였음.

1) 원료유의 제조

가) 공시재료

원료유는 탈지유를 사용하였고, 두유의 원료가 되는 대두는 시중에서 구할 수 있는 일반 대두를 사용하였음.

공시균주는 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*을 1:1로 혼합 동결한 TCC-3(Chr. Hansen, Denmark)를 사용하였음.

응유효소인 rennet는 standard plus 900제품(Chr. Hansen, Denmark)을 사용하였음.

나) 두유의 제조

두유의 제조는 원료 대두 100g을 깨끗하게 수세한 후, 10배의 수돗물(14~20℃)로 12시간 동안 침지한 후 건져내 수분을 제거한 후, 원료 무게 2배의 물을 가하여 mixer로 5분간 마쇄한 후, 소형탈수기로 탈수하여 생두유를 얻었음.

다) 두유 첨가 원료유의 제조

위에서 제조한 두유를 탈지유에 5%, 10%의 비율로 혼합하여 원료유를 제조하였음.

라) 원료유의 일반성분 분석

탈지유와 두유를 첨가한 탈지유의 일반성분 분석은 Table 30.과 같음.

탈지유의 일반성분 함량은 총고형분 9.87%, 회분 0.82%, 유당 4.92%, 단백질 3.48%이고 지방은 미량으로 나타났음. 두유를 첨가한 탈지유의 일반성분은 탈지유와 비교하여 보면 총고형분과 회분 함량이 증가하였고 유당은 감소하였으며 단백질 함량은 큰 변화가 없었음. 특히 두유 첨가 시 회분 함량의 증가는 2배 이상이였음($p < 0.05$).

두유 5%, 10% 첨가 탈지유의 일반성분을 비교하여 보면 첨가량이 증가할수록 총고형분과 회분 함량이 증가하였고 유당 함량은 감소하였음($p < 0.05$).

Table 30. General components of skimmilk, skimmilk added with soy milk

Components (%)	Skimmilk	Skimmilk added with soy milk 5%	Skimmilk added with soy milk 10%
TS ¹⁾	9.87 ^c	9.98 ^b	10.08 ^a
Ash	0.82 ^c	1.68 ^b	1.79 ^a
Lactose	4.92 ^a	4.75 ^b	4.64 ^c
Protein	3.48 ^a	3.47 ^a	3.45 ^b
Fat	trace	0.07 ^b	0.16 ^a

^{a-c} means values with different letters on the same bars are significantly different($p < 0.05$).

¹⁾TS : total solid.

2) 제조공정 확립

가) 탈지유를 이용한 비숙성 치즈의 제조

탈지유를 이용한 비숙성 치즈 제조 방법은 Fig. 20.과 같음.

탈지유를 HTST 방법(75°C/15초)으로 살균하여 31°C로 냉각시켰음. 냉각된 원료유를 starter와 rennet을 첨가하여 pH 4.6이 될 때까지 4~6시간 정치시켰음. pH 4.6에서 8mm cheese knives로 cutting한 후 약 15분간 정치한 후 처음 30분 동안은 30~38°C, 그 다음 30분 동안 38~45°C, 나머지 30분 동안 55°C까지 일정 비율로 상승 시키면서 적당한 속도와 강도로 교반하면서 열처리하였음. 그 후 유청을 배제시키고 정제수로 수세하여 cheese를 33~35°C로 냉각시키고, 다시 한 번 5°C로 냉각시켰음. sack에서 10시간동안 세척수를 완전히 제거하여 curd를 밀봉하고 5°C 냉장고에 보관하였음.

탈지유로 제조한 치즈를 대조구로 하여 저장 중 일정기간마다 시료를 채취하여 분석에 이용하였음.

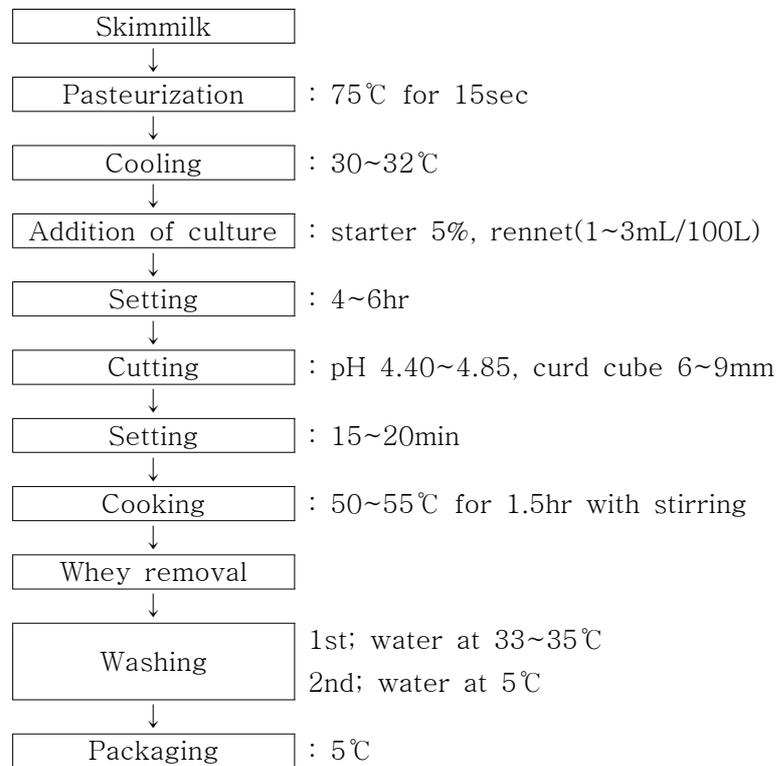


Fig 20. Manufacturing procedure of unripened cheese made with skim milk.

나) 두유를 첨가한 원료유를 이용한 비숙성 치즈의 제조

두유를 첨가한 원료유를 이용한 비숙성 치즈의 제조 방법은 Fig 21.와 같음.

대조구와 동일한 탈지유에 두유를 5%, 10%의 비율로 혼합한 원료유를 HTST 방법 (75°C/15초)으로 열처리한 후 31°C로 냉각하였음. 원료유의 0.15%로 정확하게 계산한 Glucono- δ -lactone(GDL)을 150mL의 증류수에 용해하여 원료유에 첨가하고 교반하면서 15분정도 방치하여 균일한 혼합물을 얻었음. 이것을 가지고 비숙성 치즈를 제조하였음.

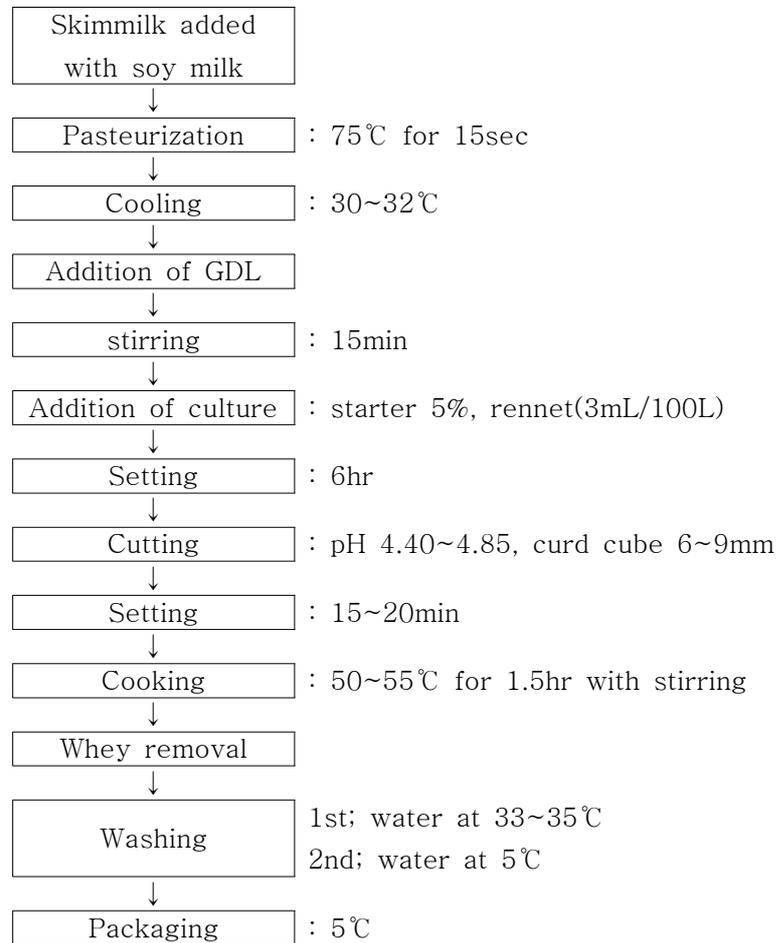


Fig 21. Manufacturing procedure of unripened cheese made with skim milk added with WPC.

3) 결과 및 고찰

가) 비숙성 치즈의 수율(yield)의 변화

Table 31.은 탈지유로 제조한 치즈와 두유를 첨가하여 제조한 치즈의 수율을 비교한 것임.

본 연구에서는 탈지유에 두유를 첨가하여 제조한 치즈의 수율이 Control보다 높게 나타났다, 두유를 10% 첨가한 것보다 5% 첨가하여 치즈를 제조하였을 때 수율이 더 높게 나타났다.

Table 31. Comparison of yield of unripened cheese made with skimmilk, cheese made with skimmilk added with soy milk

Sample	Control	Cheese 1	Cheese 2
Yield (%)	26.38	27.3	29.01

Cheese 1 : cheese made by skimmilk added with soy milk 10%

Cheese 2 : cheese made by skimmilk added with soy milk 5%

나) 비숙성 치즈의 응고시간(coagulation time)의 변화

Table 32.은 탈지유와 두유 첨가 탈지유로 제조한 비숙성 치즈의 cutting pH(pH 4.6~4.8) 도달까지의 응고시간을 나타낸 것임. 또한 Table 33.는 응고시간에 따른 pH 변화를 30분 간격으로 나타낸 것임.

탈지유와 두유 첨가 탈지유를 이용한 치즈 제조를 비교하였을 때 Control과 두유 5% 첨가 치즈 제조 시에는 pH 감소 속도와 응고시간이 큰 차이가 나지 않았음. 그러나 두유 10% 첨가 치즈는 pH 감소 속도가 Control보다 느리게 나타났고 응고시간 역시 오래 걸렸음.

두유를 첨가함으로써 casein 매트릭스에서 대두 단백질이 결합을 방해하므로 응고시간의 증가와 커드강도의 감소를 나타냈음.

Table 32. Comparison of coagulation time of unripened cheese made with skimmilk, cheese made with skimmilk added with soy milk

Sample	Control	Cheese 1	Cheese 2
Coagulation Time(min)	330	330	390
Cutting pH	4.67	4.67	4.71

Cheese 1 : cheese made by skimmilk added with soy milk 5%

Cheese 2 : cheese made by skimmilk added with soy milk 10%

Table 33. Comparison of coagulation time by pH

Time (min)	Control	Cheese 1	Cheese 2
0	6.52	6.51	6.52
30	6.44	6.43	6.47
60	6.27	6.36	6.46
90	6.04	6.29	6.42
120	5.94	6.14	6.3
150	5.6	6.0	6.0
180	5.31	5.84	5.7
210	5.14	5.48	5.53
240	5.0	5.2	5.31
270	4.91	4.98	5.2
300	4.82	4.81	5.1
330	4.67	4.67	5.03
360	-	-	4.84
390	-	-	4.71

Cheese 1 : cheese made by skimmilk added with soy milk 5%

Cheese 2 : cheese made by skimmilk added with soy milk 10%

다) 비숙성 치즈의 pH 변화

탈지유와 두유 첨가 탈지유로 제조된 비숙성 치즈의 저장기간 중 pH의 변화는 Table 34.과 같음.

Control을 비롯한 모든 치즈가 2주간의 저장기간 동안 유의적으로 pH가 감소하였음. 두유를 첨가하여 제조한 치즈에서 Control과 같이 무난한 산 생성을 나타냈음($p < 0.05$).

Table 34. Comparison of pH of unripened cheese

	Sample	0	1week	2week
pH	Control	4.67 ^a	4.51 ^b	4.36 ^c
	Cheese 1	4.61 ^a	4.53 ^b	4.44 ^c
	Cheese 2	4.57 ^a	4.49 ^b	4.41 ^c

^{a-c} means values with different letters on the same bars are significantly different ($p < 0.05$).

Cheese 1 : cheese made by skimmilk added with soy milk 5%

Cheese 2 : cheese made by skimmilk added with soy milk 10%

라) 비숙성 치즈의 이화학적 분석

(1) 치즈의 일반성분 분석

탈지유와 두유 첨가 탈지유로 제조된 비숙성 치즈의 일반성분 함량은 Table 35와 같음. Control과 두유 첨가 치즈를 비교하여 보면 총고형분과 회분은 두유 첨가 치즈가 Control보다 높게 나타났음. 모든 치즈의 총고형분 함량은 저장기간 동안 유의적으로 증가하였다. 저장기간 동안 Control과 두유 5% 첨가 치즈의 회분 함량은 거의 변화가 없었으나 두유 10% 첨가 치즈는 저장 2주 후 감소하였음($p<0.05$).

유당과 총단백질은 Control이 두유 첨가 치즈보다 더 높게 나타났고 저장기간 동안 유의적으로 값이 감소하였음($p<0.05$).

비단백태 질소는 Control이 두유 첨가 치즈보다 더 높게 나타났고 저장기간 동안 Control은 변화가 없었으나 두유 첨가 치즈는 유의적으로 값이 증가하였음($p<0.05$).

두유 10% 첨가 치즈와 5% 첨가 치즈의 성분을 비교하여 보면 5% 첨가 치즈가 비단백태 질소를 제외한 모든 성분에서 더 높은 값을 나타냈음.

Table 35. General components of unripened cheese made with skimmilk, cheese made with skimmilk added with soy milk during the storage period

Sample		0	1week	2week
TS ¹⁾	Control	22.19 ^c	23.15 ^b	24.23 ^a
	Cheese 1	23.72 ^c	24.92 ^b	26.03 ^a
	Cheese 2	24.02 ^c	25.38 ^b	26.20 ^a
Ash	Control	0.76 ^a	0.71 ^a	0.74 ^a
	Cheese 1	1.20 ^a	1.18 ^a	1.14 ^a
	Cheese 2	1.38 ^a	1.34 ^a	1.25 ^b
Lactose	Control	5.05 ^a	4.94 ^a	4.52 ^b
	Cheese 1	4.17 ^a	3.99 ^b	3.76 ^c
	Cheese 2	4.46 ^a	4.27 ^b	3.91 ^c
TN ²⁾	Control	11.90 ^a	9.53 ^b	9.28 ^b
	Cheese 1	9.9 ^a	9.57 ^b	8.24 ^c
	Cheese 2	10.56 ^a	10.47 ^a	9.99 ^b
NPN ³⁾	Control	0.0565 ^a	0.0553 ^a	0.0675 ^a
	Cheese 1	0.0291 ^b	0.0447 ^b	0.0704 ^a
	Cheese 2	0.0369 ^c	0.0547 ^b	0.737 ^a
Fat	Control	trace	trace	trace
	Cheese 1	trace	trace	trace
	Cheese 2	trace	trace	trace

^{a-c} means values with different letters on the same bars are significantly different ($p<0.05$).

¹⁾TS : Total solid.

²⁾TN : Total nitrogen.

³⁾NPN : Non protein nitrogen.

Cheese 1 : cheese made by skimmilk added with soy milk 5%

Cheese 2 : cheese made by skimmilk added with soy milk 10%

(2) 비숙성치즈의 물성(texture) 측정

치즈의 원료유에 따른 cheese의 저장기간 동안의 물성의 변화는 Table 36.과 같음.

탄력성은 Control과 두유 5% 첨가 치즈는 거의 차이가 없었고 두유 10% 첨가 치즈의 값이 가장 낮은 것으로 나타났음. 저장기간 동안의 변화는 모든 치즈가 2주 저장 후에 값이 유의적으로 감소한 것으로 나타났음(p<0.05).

응집성은 Control>두유 5% 첨가 치즈>두유 10% 첨가 치즈 순으로 나타났음. 저장기간 동안 모든 치즈의 응집성 값은 유의적으로 변화가 나타나지 않았음(p<0.05).

씹음성도 응집성과 마찬가지로 제조 직후 Control>두유 10% 첨가 치즈>두유 5% 첨가 치즈 순으로 나타났음. 두유 10% 첨가 치즈는 저장기간 동안 계속 값이 유의적으로 감소하였고, Control과 두유 5% 첨가 치즈는 저장 2주 후에 값이 유의적으로 감소한 것으로 나타났음(p<0.05).

부서짐성은 두유 10% 첨가 치즈>Control>두유 5% 첨가 치즈 순으로 나타났음. Control과 두유 5% 첨가 치즈는 저장 2주 후에 값이 유의적으로 감소하였고, 두유 10% 첨가 치즈는 저장 1주 후에 값이 유의적으로 감소하고 2주 후에는 변화가 없었음(p<0.05).

Table 36. Texture of unripened cheese made with skimmilk, cheese made with skimmilk added with soy milk during the storage period

	Sample	0	1week	2week
Elasticity (%)	Control	80.86 ^a	79.12 ^a	67.55 ^b
	Cheese 1	79.55 ^a	70.63 ^b	67.43 ^b
	Cheese 2	70.92 ^a	65.22 ^{ab}	58.96 ^b
Cohesiveness (%)	Control	68.89 ^a	79.02 ^a	73.24 ^a
	Cheese 1	64.60 ^a	66.76 ^a	70.46 ^a
	Cheese 2	57.19 ^a	62.30 ^a	65.51 ^a
Chewiness (g)	Control	84.50 ^a	76.99 ^a	54.23 ^b
	Cheese 1	78.78 ^a	75.87 ^a	55.58 ^b
	Cheese 2	67.85 ^a	57.38 ^b	37.09 ^c
Brittleness (g)	Control	5941.7 ^a	5066.7 ^a	3403.2 ^b
	Cheese 1	4113.1 ^a	3638.6 ^a	2636.2 ^b
	Cheese 2	7716.4 ^a	5193.7 ^b	4901.0 ^b

^{a-c} means values with different letters on the same bars are significantly different (p<0.05).

Cheese 1 : cheese made by skimmilk added with soy milk 5%

Cheese 2 : cheese made by skimmilk added with soy milk 10%

(3) 관능검사(sensory evaluation)

원료유와 저장기간에 따른 비숙성 치즈의 관능검사 결과는 Table 37.과 같음.

Body&texture는 Control의 점수가 가장 높았으나 두유 첨가 치즈의 선호도도 이와 유사하였음. 저장기간 동안 모든 치즈의 선호도가 유의적으로 감소하였음(p<0.05). 단백질 집합체인 치즈를 제조하는 공정에서 대두 단백질과 우유단백질의 결합에 문제가 있는 것으로 보임. 이는 대두 단백질이 친수성 체계에서 그들의 소수성을 노출하여 높은 수분 보유력과 커드의 유리, 높은 지방손실을 야기시키기 때문인 것으로 사료됨.

Appearance 역시 모든 치즈의 선호도가 4점 이상으로 높았고 그 중 Control의 선호도가 가장 높은 것으로 나타났음. 저장기간 동안 모든 치즈의 선호도가 유의적으로 감소하였음(p<0.05).

Flavor는 Control과 두유 5% 첨가 치즈의 선호도는 4점 이상으로 높았으나 두유 10% 첨가 치즈의 선호도는 낮게 나타났음. 저장기간 동안 모든 치즈의 선호도가 유의적으로 감소하였음(p<0.05).

Table 37. Sensory scores of unripened cheese made with recombined milk, cheese made with skimmilk added with soy milk during the storage period

Sample		0	1week	2week
Body&texture	Control	4.38±0.74 ^a	3.63±0.52 ^b	2.63±0.52 ^c
	Cheese 1	4.23±0.74 ^a	3.38±0.92 ^b	2.63±0.74 ^b
	Cheese 2	4.08±0.52 ^a	3.13±0.64 ^b	2.03±0.64 ^c
Appearance	Control	4.63±0.52 ^a	3.38±0.52 ^b	1.88±0.64 ^c
	Cheese 1	4.48±0.35 ^a	3.36±0.76 ^b	1.75±0.46 ^c
	Cheese 2	4.12±0.52 ^a	3±0.53 ^b	1.76±0.53 ^c
Flavor	Control	4.75±0.16 ^a	3.5±0.19 ^b	2.75±0.16 ^c
	Cheese 1	4.63±0.52 ^a	3.25±0.71 ^b	1.88±0.64 ^c
	Cheese 2	3.69±0.70 ^a	1.88±0.64 ^b	1.63±0.58 ^c

^{a-c} means values with different letters on the same bars are significantly different (p<0.05).

Cheese 1 : cheese made by skimmilk added with soy milk 5%

Cheese 2 : cheese made by skimmilk added with soy milk 10%

(4) 결론

조직과 풍미에 불리한 영향을 끼치지 않는 범위에서 두유와 우유를 혼합하여 사용하여

야 하고 원가절감을 위한 시도가 필요함.

사용가능한 soy milk첨가량은 본 실험에서 5%로 나타났음. 더 이상의 두유첨가는 콩 비린내에 의해 미각에 문제가 발생할 수 있음. 관능검사결과 우유로부터 제조한 치즈보다 못했지만 치즈대용으로 사용 가능(첨가물-과일 사용으로)할 것으로 사료됨.

바. 비숙성 치즈의 부가가치를 높일 수 있는 flavonoid 탐색

양파, 흑미, 밀감의 플라보노이드 추출을 위해 에탄올 및 열수 추출을 수행한 결과 추출율이 모두 10% 내외로 나타났음. 각 추출물의 총 polyphenol 함량 측정 결과 모든 추출물에서 열수 추출에 비해 에탄올 추출을 실시할 경우 많은 함량의 polyphenol 및 flavonoid가 측정되었음. 세 가지 시료 중 추출물 1 g당 327.5 mg로 양파껍질의 에탄올 추출물에서 가장 많이 측정되었음. 총 flavonoid 함량 또한 양파껍질 에탄올 추출물에서 1g 당 183.95 mg로 흑미, 밀감에 비해 다량의 flavonoid가 추출되었음. 이러한 유효성분의 항산화능 측정을 위하여 DPPH 라디칼 소거능을 수행하였음. 그 결과 양파껍질 에탄올 추출물의 경우 0.2 mg/mL의 농도에서 약 72.25%의 항산화능을 관찰하였으나, 흑미 및 밀감의 에탄올 추출물은 1 mg/mL 농도에서 각각 87.14%, 21.16% 로 양파에 비해 낮은 항산화능을 관찰하였음. 이는 양파 껍질 추출물의 유효성분이 다른 시료에 비해 다량 함유되어있어 흑미, 밀감 보다 낮은 농도에서도 높은 항산화능을 보인 것으로 사료됨. 따라서 식품가공과정 중에 발생한 부산물인 양파껍질에 다량 함유되어있는 유용한 flavonoid를 추출하는 것이 비숙성 치즈의 첨가물로 적합한 것을 확인하였음.

Table 38. 에탄올, 열수 추출물의 고형분, 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량

Materials	Extraction	Solids contents (%)	Total polyphenols content (mg quercetin /g extract)	Total flavonoid content (mg quercetin /g extract)
Onion peels	Ethanol	4.46±0.2	372.5±±6.85	183.95±±11.3
	Hot water	8.31±1.20	120.6±±6.05	54.5±±5.21
Black rice meal	Ethanol	1.85±0.20	133.82±4.9	44.59±1.79
	Hot water	11.85±0.35	24.42±2.52	4.12±0.56
Tangerine peels	Ethanol	4.75±0.12	82.30±1.95	19.19±2.13
	Hot water	2.95±0.22	56.40±2.13	11.18±1.82

Table 39. 에탄올, 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 측정

Materials	Extraction	DPPH radical scavenging activity (%)
BHT	Positive control	89.72±2.03
Onion peels (0.2 mg/mL)	Ethanol	72.25±2.74
	Hot water	49.68±1.55
Black rice meal (1mg/mL)	Ethanol	87.14±1.14
	Hot water	20.08±1.05
Tangerine peels (1mg/mL)	Ethanol	21.16±1.53
	Hot water	21.14±1.38

사. 기존의 확보된 유산균 및 상업적인 유산균 생리적 특성 연구 및 건강기능성 검증

1) 사용균주

상업용 균주 중 4가지 (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, 혼합균주 SM (*Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*), 혼합균주 La-5 (Thermophilic lactic acid culture)와 젓갈에서 분리된 박테리오신 생산 균주 *Lactococcus lactis* NK34를 lactobacilli MRS배지를 사용하여 배양한 후 검토하였음.

2) 내산성 및 내담즙성

*Lactobacillus casei*는 내산성 55.8%, 내담즙성 68%, *Lactobacillus acidophilus*는 내산성 3.6%, 내담즙성 76.6%를 나타내었으며, 혼합균주는 파우더 상태에서 내산성, 내담즙성은 확인할 수 없었으나, 이들은 균주를 따로 분리하여 사용하였을 때, SM의 분리균주 (*Lactobacillus crispatus*)의 내산성 70.5%, 내담즙성 280%를 나타내었고, La-5 분리균주 (*Lactobacillus acidophilus*)의 내산성 55.2%, 내담즙성 132%을 확인할 수 있었음. *Lactococcus lactis* NK34는 내산성 1.6%로 낮았으나, 내담즙성 100%은 비교적 높게 나타났음.

3) 항균효과

대상균주는 *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella enteritidis* KCCM 12021, *Staphylococcus aureus* KCCM 32395, *Escherichia coli* O157에 대해 항균효과를 검토한 결과, *Lactococcus lactis* NK34의 경우만, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313에 뚜렷한 항균효과를 나타내었으며, 이를 제외한 상업용 균주들은 항균효과를 나타내지 않았음.

4) 항산화효과

DPPH에 의한 항산화능을 확인하였으며, *Lactococcus lactis* NK34 (5.6%) > *Lactobacillus casei* (4.8%) > SM (4.3%) > *Lactobacillus acidophilus* (-) > La-5 (-) 순으로 나타났음. 결과적으로, 항산화효과는 모든 균주에 있어 다 미비하였음.

5) 비숙성치즈의 스타터 선정

내산, 내담즙성 및 항균효과를 토대로 혼합균주인 SM, La-5, *Lactococcus lactis* NK34를 비숙성치즈의 스타터로 선정하였음.

아. 생산된 비숙성 치즈의 미생물학적 안전성

1) 총균수 (total plate count)의 변화

Fig. 22은 cottage cheese sample들의 총균수의 변화를 나타내었음. 대조군의 총균수는 7일째 증가하였다가 14일째 감소하는 추세를 나타내었으나, 그 차이는 0.7 Log cfu/g으로 미비하였음. 5% soybean flour를 첨가한 경우와 WPC35, 5% soybean flour를 첨가한 경우는 14일까지 큰 변화를 나타내지 않았으나, 한외여과를 처리한 원유를 이용해서 만든 cottage cheese에서도 7일째에 0.4 Log cfu/g이 증가하였으나, 14일째에는 유지되었음.

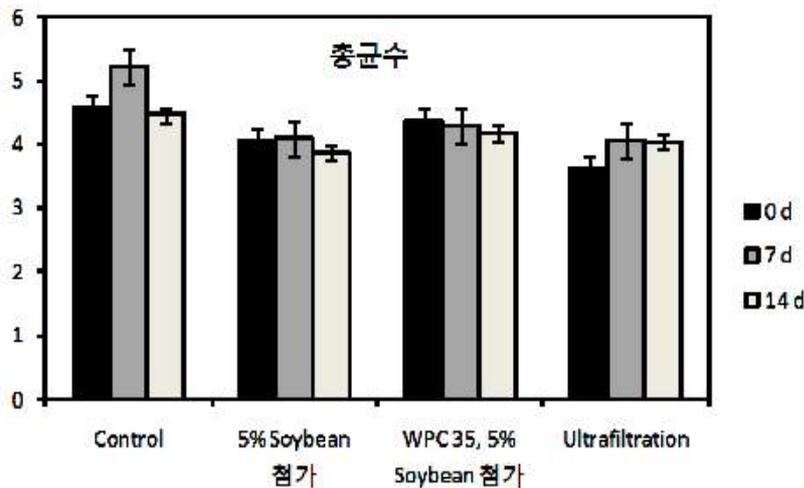


Fig 22. Total plate count per gram of cottage cheese during storage (0, 7, 14 days) at 5°C. The value is represented as Mean±S.E.

2) 저온성 세균수 (psychrotrophic bacterial count)의 변화

저온성 세균의 경우, 산미를 일으키고 응고성을 감소시키는 원인이 되는 것으로 알려져 있음. Fig. 23는 cottage cheese sample들의 저온성 세균수의 변화를 나타내었음. 저온성 세균수는 대조군, 5% soybean flour를 첨가한 경우, WPC35, 5% soybean flour를 첨가한 경우의 경우는 총균수의 변화와 유사하게 나타냈음. 한외여과를 처리한 원유를 이용해서 만든 cottage cheese에서는 0일째에 3.5 Log cfu/g으로 낮은 값을 나타내었지만, 7일째에 0.4 Log cfu/g, 14일째에 0.6 Log cfu/g으로 증가하였음. 14일째는 모든 cottage cheese에서 저온성 세균수가 4.2-4.5 Log cfu/g을 나타낸 것을 확인할 수 있었으며, 한외여과한 원유를 이용한 경우를 제외하고는, 초기균수와 14일째 균수는 큰 변화가 나타나지 않았음.

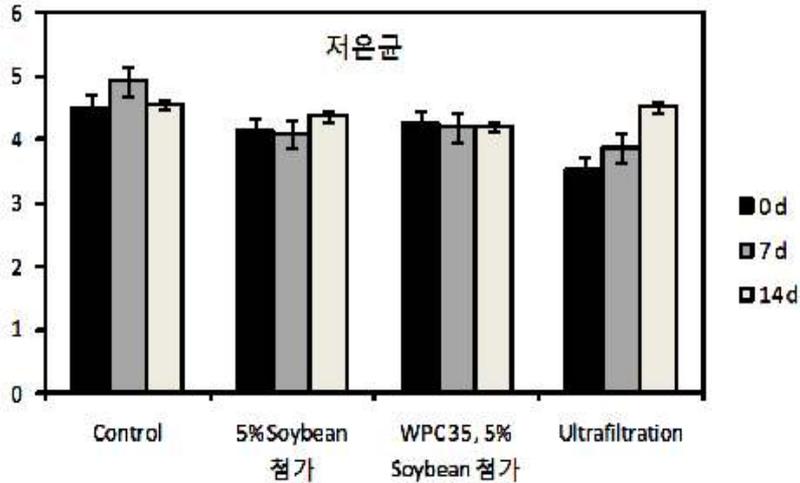


Fig. 23. Psychrotrophic bacterial count per gram of cottage cheese during storage (0, 7, 14 days) at 5°C. The value is represented as Mean±S.E.

3) 대장균 및 대장균군의 변화

가공치즈의 미생물에서 성분규격은 대장균군이 음성이어야 함. 본 연구에서 만든 cottage cheese의 경우, 대장균 및 대장균군이 나타나지 않았음.

4) 유산균의 변화

유산균은 cottage cheese를 유산을 생산하여 우유 중 카제인의 rennet의 응고, 커드로부터 whey의 배출촉진, 풍미 증진, 오염균의 생육 억제 등 다양한 역할을 함. Fig. 24는 cottage cheese sample들의 유산균수의 변화를 나타내었음. 한외여과한 원유를 이용한 cottage cheese의 경우, 유산균수가 3.2 Log cfu/g에서 3.7 Log cfu/g으로 증가한 반면, 나머지 다른 cottage cheese는 14일 동안의 유산균수의 변화는 비교적 유지되었음.

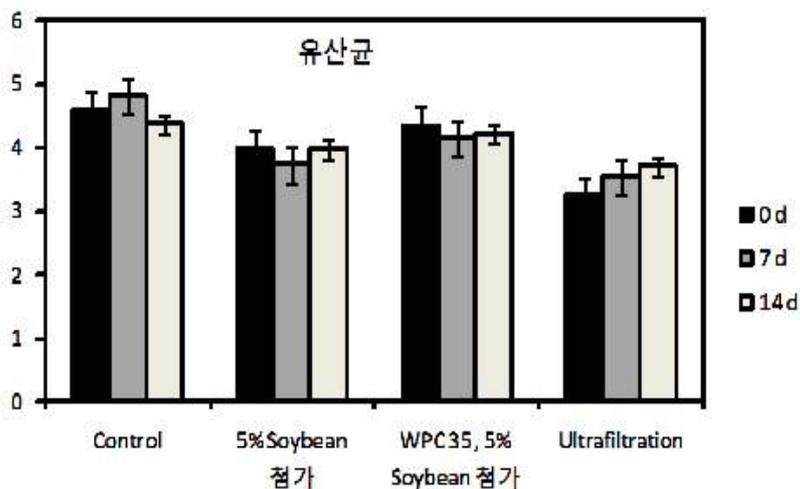


Fig. 24. Lactic acid bacterial count per gram of cottage cheese during storage (0, 7, 14 days) at 5°C. The value is represented as Mean±S.E.

자. 비숙성 치즈 및 프로바이오틱 유산균 스타터의 *in vivo* 실험을 통한 콜레스테롤 저하 활성 평가

1) 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율에 미치는 영향

실험기간 중 체중증가량은 NC와 HC군에 비해 TCC-3군에서 유의적으로 낮게 나타났으며, 평균 식이섭취량은 NC에 비해 TCC-3군에서 유의적으로 높게 나타났으며 식이효율에서도 유의적인 차이를 나타내었음. 따라서 TCC-3 첨가 식이의 섭취가 체중감소의 효과가 있는 것으로 사료 됨(Table 38).

Table 38. Effects of various starters fortified cheese on Body weight gains, Food intake and FER in rats fed high cholesterol diet

	Body weight gains (g)	Food intake (g/day)	FER ²⁾ (%)
NC ¹⁾	35.63±5.46 ^{3) b4)}	18.83±0.31 ^a	4.79±0.69 ^b
HC	41.88±4.42 ^b	19.54±0.19 ^{ab}	5.47±0.55 ^b
TCC-3	19.88±3.28 ^a	21.22±1.64 ^b	2.40±0.37 ^a
ABT	29.13±4.80 ^{ab}	19.10±0.31 ^a	3.87±0.62 ^b
NK-34	33.38±4.12 ^b	19.47±0.25 ^{ab}	4.38±0.53 ^b
Soybean	35.38±2.58 ^b	19.18±0.23 ^{ab}	4.71±0.31 ^b
WPC-35	35.38±2.76 ^b	19.61±0.13 ^{ab}	4.62±0.36 ^b

¹⁾NC: Normal control group, HC: High cholesterol supplemented group, TCC-3: High Cholesterol + TCC-3 fortified cheese, ABT: High Cholesterol + ABT fortified cheese, NK-34: High Cholesterol + NK-34 fortified cheese, Soybean: High Cholesterol + soybean fortified cheese, WPC-35: High Cholesterol + WPC-35 fortified cheese

²⁾FER : Food efficiency rate.

³⁾Mean±SE.

⁴⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

2) 장기무게에 미치는 영향

실험식이가 쥐의 100g당 장기무게에 미치는 영향은 Table 39에 나타내었음. 간의 무게는 NC군에 비해 모든 군에서 유의적으로 높았고 특히 NK-34군에서 가장 높은 유의성을 보였음. 심장의 무게는 HC군에 비해 NC군과 NK-34군에서 유의적으로 높은 것으로 나타났음. 비장의 경우 NK-34군이 다른 군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며, 신장의 무게는 NC에 비해 ABT와 WPC-35 군에서 유의적으로 낮게 나타났음.

Table 39. Effects of various starters fortified cheese on liver, heart, spleen and kidney in rats fed high cholesterol diet

(g/100g B.W)

	Liver	Heart	Spleen	Kidney
NC ¹⁾	2.19±0.05 ^{2)a}	0.33±0.02 ^c	0.16±0.01 ^a	0.60±0.01 ^b
HC	2.83±0.07 ^{bc3)}	0.29±0.01 ^a	0.16±0.01 ^a	0.60±0.01 ^{ab}
TCC-3	2.64±0.05 ^b	0.30±0.01 ^{abc}	0.17±0.01 ^a	0.57±0.01 ^{ab}
ABT	2.74±0.08 ^{bc}	0.32±0.01 ^{abc}	0.16±0.01 ^a	0.56±0.01 ^a
NK-34	3.11±0.15 ^d	0.33±0.02 ^{bc}	0.21±0.02 ^b	0.57±0.01 ^{ab}
Soybean	2.92±0.07 ^{cd}	0.29±0.01 ^{ab}	0.18±0.01 ^a	0.57±0.01 ^{ab}
WPC-35	2.82±0.08 ^{bc}	0.30±0.01 ^{abc}	0.16±0.01 ^a	0.56±0.01 ^a

¹⁾NC: Normal control group, HC: High cholesterol supplemented group, TCC-3: High Cholesterol + TCC-3 fortified cheese, ABT: High Cholesterol +ABT fortified cheese, NK-34: High Cholesterol + NK-34 fortified cheese, Soybean: High Cholesterol +soybean fortified cheese, WPC-35: High Cholesterol + WPC-35 fortified cheese

²⁾Mean±SE.

³⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

3) 혈중 지질 농도에 미치는 영향

다양한 스타터를 이용한 비숙성 치즈를 보충 섭취한 쥐의 혈중 지질을 측정본 연구의 결과는 Table 3에 나타내었음. HC군에 비해 TCC-3, ABT, NK-34군에서 TC를 저하시키는 효과가 나타났음. TG의 경우, TCC-3, ABT, NK-34, soybean 군에서 HC에 비해 TG의 수준을 낮추는 효과를 보였으며, 특히 TCC-3와 soybean 군에서는 NC보다 유의적으로 낮은 수준의 농도를 나타내었음. HDL-Chol 농도는 NC군에 비해 모든 군에서 유의적으로 낮게 나타났으며 비숙성 치즈를 보충섭취한 군과 HC군의 유의적 차이는 발견할 수 없었음. 그러나 LDL-Chol 농도는 NC에 비해 HC에서 높게 나타났고, ABT, NK-34군에서 유의적 차이를 보여 ABT 및 NK-34가 LDL-chol을 저하시키는 효과를 나타내었음. GOT 농도는 NC 보다 HC에서 높게 나타났으며 비숙성 치즈보충섭취군 모두에서 GOT 수준을 낮추는 효과를 보였으며 특히 ABT 군에서 탁월한 효과를 보였음.

Table 40. Effects of various starters fortified cheese on lipid profiles in rats fed high cholesterol diet

	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-Chol (mg/dl)	LDL-Chol (mg/dl)	GOT (U/I)	GPT (U/I)
NC ¹⁾	85.00±2.51 ^{2)a3)}	66.88±5.38 ^b	40.25±4.00 ^b	31.38±2.88 ^a	80.75±5.34 ^{ab}	38.88±1.88 ^{ns4)}
HC	122.88±9.55 ^{cd}	78.25±4.53 ^c	18.38±0.96 ^a	88.85±10.01 ^{cd}	115.75±13.17 ^c	47.88±3.38
TCC-3	103.38±3.14 ^b	54.00±2.71 ^a	21.29±2.47 ^a	73.95±5.63 ^{bc}	77.25±3.55 ^{ab}	48.38±6.70
ABT	100.38±3.72 ^b	58.50±2.44 ^a _b	20.88±2.01 ^a	67.80±4.79 ^b	62.63±1.40 ^a	39.13±4.03
NK-34	103.88±4.41 ^b	58.63±2.86 ^a _b	24.88±2.64 ^a	67.28±4.40 ^b	91.38±10.76 ^b	52.63±7.31
Soybean	135.88±6.94 ^{cd}	55.25±2.40 ^a	26.00±1.78 ^a	98.83±5.93 ^d	75.25±5.39 ^{ab}	42.63±3.02
WPC	113.88±3.26 ^{bc}	59.25±2.90 ^a _b	22.75±2.30 ^a	79.28±3.14 ^{bc}	79.25±3.90 ^{ab}	44.63±2.02

¹⁾NC: Normal control group, HC: High cholesterol supplemented group, TCC-3: High Cholesterol + TCC-3 fortified cheese, ABT: High Cholesterol + ABT fortified cheese, NK-34: High Cholesterol + NK-34 fortified cheese, Soybean: High Cholesterol + soybean fortified cheese, WPC-35: High Cholesterol + WPC-35 fortified cheese

²⁾Mean±SE.

³⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

⁴⁾NS means not significant.

4) 간의 지질 생성물에 미치는 영향

체내 지질대사는 주로 간에서 이루어지지만 고콜레스테롤 식이섭취로 인하여 간에서 합성된 중성지질이 정상적으로 체외로 배출되지 않으면 지방간을 초래하게 됨. 따라서 간의 콜레스테롤 농도는 지질대사에 미치는 영향을 측정하기 위한 주요한 지표로 작용할 수 있음. 본 연구에서의 간장 중의 총지질, 중성지질 및 총콜레스테롤 함량 측정 결과는 Table 41과 같음. total lipid, TG, TC 모두 NC군에 비해 HC군에서 유의적으로 높게 나타났음. 그러나 비숙성 치즈를 섭취한 모든 군에서 total lipid는 HC와 유의적 차이를 보이지 않았으나 TG와 TC 수준은 비숙성치즈를 보충섭취한 모든 군에서 유의적으로 감소시키는 효과를 나타내었으며, 특히 TCC-3와 soybean군에서 TG 저하에 탁월한 효과를 나타내었음. TC의 경우에는 TCC-3, soybean, ABT, WPC-35 순으로 효과를 나타냈으며, TCC-3와 ABT군은 NC 수준으로 월등한 효과를 보였음.

Table 41. Effects of various starters fortified cheese on liver total lipid, triglyceride and total cholesterol concentration in rats fed high cholesterol diet

	Total lipid (mg/g)	TG (mg/g)	TC (mg/g)
NC ¹⁾	23.60±5.49 ^a	3.61±0.06 ^a	1.96±0.07 ^a
HC	105.20 ±26.54 ^{bc}	5.96±0.32 ^d	2.77±0.10 ^d
TCC-3	67.40 ±13.30 ^b	4.13±0.23 ^{ab}	1.95±0.10 ^a
ABT	75.26 ±12.04 ^b	5.04±0.24 ^c	2.24±0.11 ^{ab}
NK-34	71.23 ±16.44 ^b	4.72±0.30 ^{bc}	2.40±0.12 ^{bc}
Soybean	70.83 ±12.48 ^b	4.06±0.18 ^{ab}	2.23±0.09 ^{ab}
WPC	131.12 ±19.02 ^c	4.77±0.19 ^{bc}	2.56±0.12 ^{cd}

¹⁾NC: Normal control group, HC: High cholesterol supplemented group, TCC-3: High Cholesterol + TCC-3 fortified cheese, ABT: High Cholesterol + ABT fortified cheese, NK-34: High Cholesterol + NK-34 fortified cheese, Soybean: High Cholesterol + soybean fortified cheese, WPC-35: High Cholesterol + WPC-35 fortified cheese

²⁾Mean±SE.

³⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

5) 분변의 지질 대사물에 미치는 영향

분변으로의 지질배설량을 알아보기 위한 분변의 지질을 분석한 결과는 Table 42와 같음. 총지질배설량은 NC와 HC 사이에는 유의적인 차이가 없었으며, soybean군에서 월등히 높은 수치를 나타내었음. TC는 NC군에 비해 HC군에서 유의적으로 높은 결과를 나타내었으며 ABT, NK-34, WPC-35군에서 HC군에 비해 TC 배설량이 유의적으로 높은 것으로 나타났음. 특히 WPC-35군에서 그 효과가 월등히 높았다. 본 연구 결과는 비숙성치즈 보충섭취가 지질 배출을 촉진하는 것으로 사료됨.

Table 42. Effects of various starters fortified cheese on fecal total lipid, triglyceride and total cholesterol concentration in rats fed high cholesterol diet

	Total lipid (mg/g)	TG (mg/g)	TC(mg/g)
NC ¹⁾	19.80±1.57 ^{2)a3)}	1.28±0.04 ^a	1.56±0.13 ^a
HC	22.82±1.56 ^a	1.38±0.03 ^{ab}	3.03±0.15 ^b
TCC-3	21.75±3.15 ^a	1.36±0.04 ^{ab}	3.41±0.11 ^{bc}
ABT	29.00±1.96 ^a	1.25±0.04 ^a	3.88±0.13 ^{cd}
NK-34	64.97±33.81 ^a	1.36±0.03 ^{ab}	3.93±0.30 ^d
Soybean	182.50±44.78 ^b	1.48±0.10 ^b	3.24±0.14 ^b
WPC	93.63±63.18 ^{ab}	1.51±0.07 ^b	4.53±0.16 ^e

¹⁾NC: Normal control group, HC: High cholesterol supplemented group, TCC-3: High Cholesterol + TCC-3 fortified cheese, ABT: High Cholesterol + ABT fortified cheese, NK-34: High Cholesterol + NK-34 fortified cheese, Soybean: High Cholesterol + soybean fortified cheese, WPC-35: High Cholesterol + WPC-35 fortified cheese

²⁾Mean±SE.

³⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

6) 혈장 및 간의 지질과산화에 미치는 영향

혈액 내 생성된 지질과산화물인 conjugated dienes (CD) 및 간에서의 TBARS 분석 결과를 Table 6에 제시하였음. CD의 경우 HC에서 NC에 비해 지질과산화물 생성이 유의적으로 높게 나타났으며, 반면 다양한 스타터를 이용한 비숙성 치즈를 보충섭취한 군에서는 감소하는 경향을 보였음. 특히 ABT군에서는 NC 수준의 농도를 보였으며 이는 비숙성 치즈의 보충섭취가 지질과산화물 생성을 억제하는데 긍정적인 작용을 하는 것으로 사료됨. 그러나 간의 지질과산화물인 TBARS의 분석에서는 그룹간의 유의적 차이를 확인할 수 없었음.

Table 43. Effects of various starters fortified cheese on oxidative lipid of plasma and liver in rats fed high cholesterol diet

	CD (μM)	TBARS (nmol TBARS/g liver)
NC ¹⁾	3.85 \pm 0.13 ^{2)ab3)}	0.057 \pm 0.003 ^{ns4)}
HC	4.34 \pm 0.16 ^c	0.060 \pm 0.003
TCC-3	4.17 \pm 0.13 ^{bc}	0.055 \pm 0.003
ABT	3.57 \pm 0.16 ^a	0.059 \pm 0.003
NK-34	4.30 \pm 0.14 ^{bc}	0.058 \pm 0.003
Soybean	4.31 \pm 0.19 ^{bc}	0.055 \pm 0.002
WPC	3.95 \pm 0.11 ^{abc}	0.062 \pm 0.003

¹⁾NC: Normal control group, HC: High cholesterol supplemented group, TCC-3: High Cholesterol + TCC-3 fortified cheese, ABT: High Cholesterol + ABT fortified cheese, NK-34: High Cholesterol + NK-34 fortified cheese, Soybean: High Cholesterol + soybean fortified cheese, WPC-35: High Cholesterol + WPC-35 fortified cheese

²⁾Mean \pm SE.

³⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

⁴⁾NS means not significant.

7) 백혈구의 DNA 손상도에 미치는 영향

4주간 고지방 식이를 섭취하여 고지혈증이 유발된 쥐에게 4주간 다양한 스타터를 이용한 치즈를 보충섭취 시킨 후 백혈구의 DNA 손상정도를 comet assay를 이용하여 분석하였음.(Table 44) 그 결과, Tail DNA와 Tail moment에서는 유의적인 차이를 보이지 않은 반면, Tail length에서는 NC와 HC 사이에서는 차이를 나타내지 않았으나, NC와 TCC-3, NK-34, soybean 및 WPC-35 군 사이에서 DNA 손상이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났음.

Table 44. Effects of various starters fortified cheese on leukocytes DNA damage in rats fed high cholesterol diet

	Tail DNA (%)	Tail Moment	Tail Length (μm)
NC ¹⁾	6.41±0.41 ^{2)ns3)}	1.43±0.13 ^{ns}	14.30±0.80 ^{b4)}
HC	7.23±0.50	1.57±0.19	12.89±0.71 ^{ab}
TCC-3	6.51±0.47	1.31±0.17	11.17±0.60 ^a
ABT	7.31±0.43	1.61±0.19	13.09±0.81 ^{ab}
NK-34	6.28±0.40	1.25±0.13	11.24±0.47 ^a
Soybean	6.73±0.23	1.38±0.09	12.19±0.31 ^a
WPC-35	6.26±0.34	1.21±0.09	11.42±0.65 ^a

¹⁾NC: Normal control group, HC: High cholesterol supplemented group, TCC-3: High Cholesterol + TCC-3 fortified cheese, ABT: High Cholesterol + ABT fortified cheese, NK-34: High Cholesterol + NK-34 fortified cheese, Soybean: High Cholesterol + soybean fortified cheese, WPC-35: High Cholesterol + WPC-35 fortified cheese

²⁾Mean±SE.

³⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

8) 혈중 지용성 항산화비타민 농도에 미치는 영향

본 연구에서 분석한 Retinol, γ-tocopherol 농도에서 NC군에 비하여 HC군에서 낮은 경향을 보였으며, α-tocopherol 농도는 NC군과 HC군 사이에서 유의적인 차이를 나타내었음 (Table 45). Retinol의 경우 비숙성치즈를 섭취한 모든 군에서 NC와 같은 농도 수준을 보였으며, WPC-35군에서 HC군 보다 유의적으로 높은 농도 수준을 나타내었음. α-tocopherol은 치즈의 보충섭취에 대한 효과는 없었으며, γ-tocopherol에서는 NK-34군과 WPC-35군에서 HC군에 비해 높은 농도 수준을 나타냄으로써 비숙성 치즈의 보충 섭취가 혈중 지용성 항산화 비타민 농도에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료됨.

Table 45. Effects of various starters fortified cheese on lipid corrected plasma retinol and tocopherols in rats fed high cholesterol diet

	Retinol ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	γ -tocopherol ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	α -tocopherol ($\mu\text{g}/\text{dl}$)
NC ¹⁾	42.27 \pm 5.57 ^{2)ab3)}	9.32 \pm 2.57 ^b	743.84 \pm 142.92 ^{ab}
HC	32.53 \pm 4.22 ^a	4.14 \pm 1.01 ^a	559.09 \pm 94.03 ^a
TCC-3	40.01 \pm 2.79 ^{ab}	3.70 \pm 1.44 ^a	684.33 \pm 86.70 ^{ab}
ABT	44.13 \pm 4.15 ^{ab}	3.48 \pm 1.30 ^a	812.33 \pm 147.19 ^{ab}
NK-34	40.62 \pm 6.52 ^{ab}	3.95 \pm 0.89 ^a	943.63 \pm 118.47 ^b
Soybean	39.30 \pm 4.52 ^{ab}	3.74 \pm 1.11 ^a	733.15 \pm 101.32 ^{ab}
WPC-35	51.32 \pm 4.48 ^b	3.02 \pm 0.86 ^a	940.65 \pm 113.80 ^b

¹⁾NC: Normal control group, HC: High cholesterol supplemented group, TCC-3: High Cholesterol + TCC-3 fortified cheese, ABT: High Cholesterol + ABT fortified cheese, NK-34: High Cholesterol + NK-34 fortified cheese, Soybean: High Cholesterol + soybean fortified cheese, WPC-35: High Cholesterol + WPC-35 fortified cheese

²⁾Mean \pm SE.

³⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

9) 적혈구 catalase 효소 활성에 미치는 영향

적혈구의 catalase 항산화 효소활성에 미치는 연구결과를 Fig 25에 나타내었음. NC군에 비해 HC군에서 유의적으로 낮은 수준을 보여 고콜레스테롤식이섭취가 항산화 효소활성에 영향을 미치는 것으로 나타났음. 다양한 스타터를 이용한 비숙성 치즈를 보충섭취 한 쥐에서 NC, HC와의 유의적인 차이는 확인할 수 없었지만 ABT, NK-34, soybean, WPC-35군에서는 HC군에 비해 높은 활성을 보이는 경향을 나타내었음.

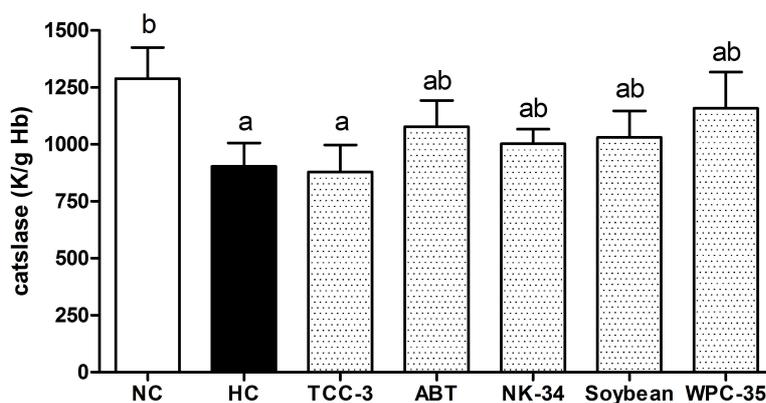


Fig. 25. Effects of various starters fortified cheese on erythrocyte catalase enzyme concentration in rats fed high cholesterol diet

제 2 절 고부가가치 식품소재인 WPC 가수분해물의 생산 및 기능성 조사

1. 서론

유청에 함유된 단백질은 영양생리학적으로 중요한 의미를 지닌다(koskowski 1982, Yamauchi, K.1992). 유청단백질에 내재 되어있는 생리활성펩타이드들은 아동, 성인과 노인들에 이르기까지 다양한 용도로 이용될 수 있는 신제품을 개발하기위한 중요한 소재로 활용될 수 있음(Mullally 1996, Pihlanto-Leppälä 등 1996, Fiat등 1993, Marshall 1994, Gallaher등 1998). 유청에서 유청단백질을 획득하기 위한 한외여과의 기술이 필요하고(Abd.Elsalam등 1991, Maubois 등 1997) 유청단백질이 함유한 생리활성펩타이드를 활용하기 위해서는 가수분해가 효율적으로 이루어져야 함(Kananen등 2000, Pahud등 1985, Adler-Nissen등 1983). 본 연구에서는 생리활성 펩타이드를 선별적으로 생산할 수 있는 방안에 대한 연구를 실시하였음.

2. 연구내용 및 방법

가. 연구내용

- 1) 한외여과기법을 이용하여 유청단백질(WPC)을 농축된 형태로 분리
- 2) WPC에서 ACE 저해효과 있는 생리활성 펩타이드의 선별적 제조 및 적정조건 파악
- 3) WPC 및 WPC 가수분해물 추출물 제조
- 4) WPC 가수분해물의 물리화학적 및 기능성 조사
- 5) 추출물의 ACE 저해활성 평가
- 6) 비숙성 치즈의 부가가치를 높이기 위해 선정된 플라보노이드의 특성 및 기능성 조사
- 7) 건강기능성이 검증된 유산균의 생산최적화
- 8) 유산균을 이용한 WPC의 생물전환에 의한 펩타이드 생성
- 9) WPC 가수분해물의 ACE 저해활성 평가
- 10) WPC 가수분해물의 혈압 강하효과 검증
- 11) WPC 가수분해물의 보충섭취가 혈중 지질농도에 미치는 영향 평가
- 12) WPC 가수분해물의 보충섭취가 항산화체계에 미치는 영향 평가
- 13) WPC 가수분해물의 보충섭취가 백혈구 및 신장조직 세포의 DNA 손상에 미치는 영향

나. 연구방법

- 1) 한외여과기법을 이용하여 유청단백질(WPC)을 농축된 형태로 분리
유가공분야의 신기술인 한외여과기법을 이용하여 비숙성 치즈 제조의 부산물인 유청에서

탁월한 식품소재인 유청단백질을 농축된 형태로 분리하였음.

2) WPC에서 ACE 저해효과 있는 생리활성 펩타이드의 선별적 제조 및 적정조건 파악
적합한 효소의 선정과 적정한 가수분해 조건을 탐색하였음.

3) WPC 및 WPC 가수분해물 추출물 제조

가) WPC 제조 : 비숙성 치즈 제조 후 얻은 유청을 한외여과(DDS LabUnit M20, Denmark)
후 분무건조(Buechi, Mini Spray Dryer B-191, Swiss)하는 방법을 통해 단백질 함량 35%
를 소지하는 WPC를 제조하였음.

나) 사용효소 : Alcalase(Novozymes, Denmark), Protease M(Amano Enzyme, Japan),
Protease S(Amano Enzyme, Japan), Trypsin(Novozymes, Denmark), Pepsin(Yakuri Pure
Chemicals, Japan)

다) 가수분해 조건 : WPC를 10% 용액으로 만들고 WPC의 단백질 양과 효소의 비율을
25:1(wt/wt)로 첨가, 37°C shaking incubator(VS-8480S, Vision)에서 180RPM으로 0, 2, 3,
4시간동안 반응시킴. 95°C water bath/10min 가열처리 하여 반응을 정지시킨 후
3,000rpm/30min 원심분리 한 후 상등액만 취하여 동결건조하였음(FDU-1200, EYELA).

4) WPC 가수분해물의 물리화학적 및 기능성 조사

추출한 WPC 가수분해물의 일반성분을 측정하였음.

추출한 WPC 가수분해물의 이화학적 특성(pH, 밀도, 기포형성력, 용해도, HMF 함량, -SH
기 함량, NPN 함량, 단백질 가수분해도)을 측정하였고, 전기영동을 통해 단백질 밴드를 관
찰하였음.

가) 총고형분 및 수분은 A.O.A.C(1995) 방법에 따라 함량을 구한 수분수기에 cottage cheese
5g을 넣고 표면적을 넓게 하여 105°C 건조기에서 건조시킨 후 손실된 수분의 양을 측정하여 계
산하였음.

나) 회분은 A.O.A.C(1990) 방법에 따라 함량을 구한 회분수기에 cottage cheese 5g을 넣고
550°C 전기로에서 회화시킨 후 회분의 양을 측정하였음.

다) 유당은 A.O.A.C(1995) 방법에 의해 시료 10g의 유당 함량을 측정하였음.

라) 단백질은 A.O.A.C(1995) 방법에 따라 micro-Kjeldahl 방법으로 단백질함량을 산출하였음.
시료 10g의 질소함량을 구한 후 여기에 질소계수 6.38을 곱하여 단백질의 양으로 정량하였음.

마) pH는 WPC 가수분해물 10% 용액을 제조하여 pH meter(SevenEasy, Mettler-Toledo)를
이용하여 측정.

바) 밀도(Bulk density)는 5g의 시료를 메스실린더에 넣고 부피를 확인하였음.

사) 기포형성력(Foam expansion)은 Beuchat(1977)의 방법에 의해 시료 4g에 40ml의 증류수
를 가하여 pH 7.0이 되도록 조정하였음. 20ml를 취하여 2,000rpm/5min 교반하여 발생한 거
품의 부피를 확인하였음.

아) 용해도(Solubility)는 Butler(1971)의 방법에 의해 시료 0.5g에 50ml의 증류수를 가하여
pH를 2, 4, 6, 8, 10으로 조정하였음. 3,000rpm/5min 원심분리후 상등액을 280nm에서 흡광
도를 측정하였음(OPTIZEN 2120UV, Mecasys). 최대값을 100으로 환산한 후 비교치를 용해
도로 나타내었음.

자) HMF 함량은 Keeney 와 Bassette(1959)방법에 의해 실시했음.

40°C water bath/30~40min 반응시킨 후 실온으로 냉각하여 443nm에서 흡광도를 측정하
였음(OPTIZEN 2120UV, Mecasys).

차) Free sulfhydryl group(-SH기)는 Ellman(1959)의 방법에 의해 증류수에 10%로 용해시킨 시료 100 μ l와 Ellman's reagent[5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) 4 mg+ 0.1N sodium phosphate buffer(pH 8.0) 1ml] 100 μ l를 혼합한 후 0.1N sodium phosphate buffer(pH 8.0) 5ml를 첨가하여 실온에서 15분간 반응시킴. 412nm에서 흡광도를 측정하였음(OPTIZEN 2120UV, Mecasys).

카) NPN(Non protein nitrogen)은 Lowry 등(1951)의 방법에 의해 실시하여 540nm에서 흡광도를 측정하였음(OPTIZEN 2120UV, Mecasys).

타) 단백질 가수분해도(Degree of protein hydrolysis)는 Alder-Nissen(1979)의 방법을 이용하여 Trinitrobenzensulfonic acid(TNBS)의 측정에 의해 실시함. 여러 단계의 농도로 희석한 표준시료를 동일한 방법에 따라서 분석한 다음 표준시료의 농도별 흡광도를 표준곡선으로 나타내었음. 표준곡선으로부터 나온 상관방정식에 시료의 흡광도를 대입하여 α -amino group 농도를 산출하였음. 각 시료의 α -amino group 농도를 다음의 식에 대입하여 가수분해도를 나타내었음.

파) 전기영동(SDS-PAGE)는 Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System(BIO-RAD)을 사용하여 Laemmli(1970)의 방법에 따라 수행하였음. 시료 10mg을 1ml의 sample buffer(SIGMA)에 용해하고 100 $^{\circ}$ C/5min 가열하였음. Tri-glycine running buffer(ELPIS BIOTECH)를 채운 polyacrylamide gel(acrylamide 14%)에 시료용액 7 μ l를 넣고 30mA에서 영동하였음. SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard(INVITROGEN)를 표준물질로 사용하였음.

5) WPC 가수분해물의 관능검사

Meilgaard 등(1987)의 방법에 따라 7점 척도법에 의해 관능검사를 실시하였음. 건국대학교 축산식품생물공학과의 panelist 10명에 의하여 10% 용액으로 제조한 Sample의 쓴맛 정도를 평가하였음.

6) 비숙성 치즈의 부가가치를 높이기 위해 선정된 플라보노이드의 특성 및 기능성 조사.

7) 건강기능성이 검증된 유산균의 생산최적화

8) 유산균을 이용한 WPC의 생물전환에 의한 펩타이드 생성

9) WPC 가수분해물의 ACE 저해활성 평가

10) WPC 가수분해물의 혈압 강하효과 검증

11) WPC 가수분해물의 보충섭취가 혈중 지질농도에 미치는 영향 평가

12) WPC 가수분해물의 보충섭취가 항산화체계에 미치는 영향 평가

13) WPC 가수분해물의 보충섭취가 백혈구 및 신장조직 세포의 DNA 손상에 미치는 영향

3. 연구결과

가. WPC 35의 제조와 일반성분 분석

1) WPC 35의 제조

비숙성 치즈 제조 후 얻은 유청을 pH 7.0으로 조정한 후 고온살균(70°C/15초) 후 50°C로 냉각하였다. 살균된 유청을 한외여과를 통하여 요구되는 양의 투과액을 제거하여 농축시킨 후 분무건조하여 약 35% 단백질 함량을 소지하는 WPC를 제조하였음(Fig. 1). 한외여과기는 collodion으로 된, 분자량 cut-off 10,000Da인 막을 장착한 spiral wound type인 DSS Lab Unit M 20(Denmark)을 이용하였음(Table 1). 사용된 압력은 유입압력 2bar 와 유출압력 6 bar 이었음. 분무건조는 Mini Spray Dryer B-191(BüCHI, Swiss)를 이용하여 inlet 온도 175°C, outlet 온도 70°C의 조건에서 진행되었음.

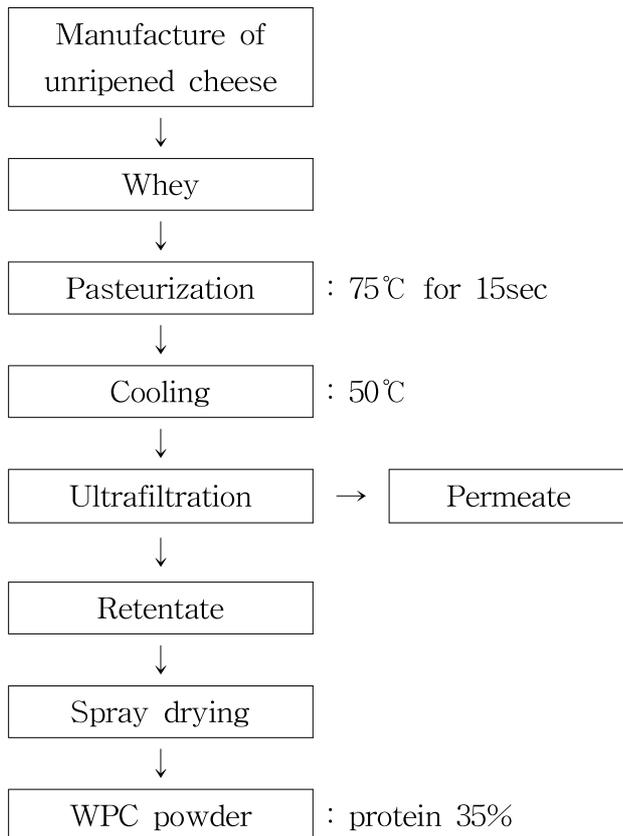


Fig. 1. Manufacturing procedure of WPC

Table 1. Operation conditions of ultrafiltration for cheese base production

Module	DSS Lab Unit M 20
Membrane	Gr90pp(Denmark)
Temperature	50°C
Inlet pressure	2bar
Outlet pressure	6bar
Quality of the material	collodion

2) WPC 35의 일반성분

WPC 35의 일반성분은 단백질 35.26%, 유당 53.32%, 지방 0.24%을 함유하는 것으로 나타났다. WPC의 제조과정에서 적절한 한외여과기 작동에 필요한 압력, 유속, 온도 등이 파악되었으며 이를 토대로 막을 제외한 기기의 95%를 국산화시킬 수 있는 가능성을 확인했고 아울러 한외여과기의 국산화를 위한 자료를 확보했음. WPC 80의 국산화를 위해서는 점도가 높아짐에 따라 기기에 가중되는 부담을 해결하는 과제가 향후 해결되어야 함. 제조한 유청 단백질 농축물의 일반성분을 분석한 결과 단백질 34.94%, 유당 53.32%, 지방 3.50%, 회분 3.24%, 수분 5.0 % 로 나타났다.

나. WPC 가수분해물의 제조

1) 단백질 분해 효소

WPC의 단백질의 가수분해를 위해 상업적으로 판매되는 효소인 *Bacillus licheniformis* 로부터 유래한 alcalase(Novozymes, Denmark), *Aspergillus oryzae* 로부터 유래한 protease M(Amano Enzyme, Japan), *Bacillus stearothermophilus* 로부터 유래한 protease S(Amano Enzyme, Japan), Bovine Pancrease로부터 유래한 Trypsin(Novozymes, Denmark), 돼지의 위에서 추출된 Pepsin(Yakuri Pure Chemicals, Japan)을 사용하였음.

2) 가수분해물의 생산

WPC의 가수분해는 Abubakar 등(1998)의 방법을 응용하여 실행하였음. WPC를 증류수에 용해시켜 10% 용액으로 만들고 WPC에 함유된 단백질의 양과 효소의 비율을 25:1(wt/wt)로 첨가하여 37°C shaking incubator(VS-8480S, Vision)에서 180RPM으로 shaking하면서 반응시간을 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간으로 나누어 가수분해하였음. 반응을 종결시키기 위해 95°C water bath에서 10분간 가열처리 하여 효소를 불활성화 시킨 다음 실온으로 냉각시킴. 3,000RPM 원심분리기(Combi-514R, Hani1)에서 30분간 원심분리 한 후 상등액만 취하여 완전히 냉동시켰음. 동결건조기(FDU-1200, EYELA)를 사용하여 건조 시킨 후 분말상태로 만들어 냉장 보관 하였음.

다. WPC 35 가수분해물의 이화학적 특성

1) pH

WPC 35 가수분해물의 pH는 table 2에서 볼 수 있듯이 다섯 가지 효소 모두 가수분해 시간이 증가할수록 pH가 감소했음. 특히 Protease M과 Trypsin은 3시간 및 4시간에서 동일한 평균값을 나타내고 있어 다른 효소들에 비해 상대적으로 pH의 변화가 적었음. Pepsin은 가수분해 처리 전에 효소의 활성을 위하여 pH 2로 미리 조정해 놓은 상태이므로 상대적으로

낮은 pH를 나타내고 있음. 가수분해가 진행되면서 pH가 낮아지는 이유는 Márquez와 Vázquez(1999)의 보고와 같이 펩티드 결합이 끊어지면서 생성된 아미노산 잔기에 의해 음전하(negative charge)를 나타내기 때문으로 사료됨.

Table 2. The change of pH in WPC 35 during hydrolysis by enzyme

Hydrolysis time (hours)	Enzyme				
	Alcalase	Protease M	Protease S	Trypsin	Pepsin
0	6.27±0.04 ^a	6.27±0.04 ^a	6.27±0.04 ^a	6.27±0.04 ^a	6.27±0.04 ^a
0.5	6.22±0.05 ^a	6.27±0.06 ^a	6.22±0.03 ^a	6.20±0.04 ^a	2.94±0.20 ^b
1	6.19±0.06 ^{bac}	6.24±0.04 ^a	6.21±0.04 ^a	6.18±0.04 ^a	2.88±0.04 ^b
2	6.18±0.05 ^{bac}	6.23±0.05 ^a	6.20±0.04 ^{ba}	6.17±0.02 ^a	2.87±0.03 ^b
3	6.09±0.04 ^{dc}	6.23±0.04 ^a	6.07±0.04 ^{ed}	6.15±0.05 ^a	2.78±0.01 ^c b
4	6.03±0.04 ^{ed}	6.23±0.04 ^a	6.06±0.06 ^{ed}	6.15±0.04 ^a	2.76±0.12 ^c b
5	5.98±0.04 ^e	6.10±0.04 ^{bdc}	6.03±0.04 ^{ed}	6.09±0.02 ^a	2.63±0.05 ^c

Treatment condition;

Hydrolysis temperature : 37°C with 180rpm in shaking incubator

Enzyme : Substrate ratio = 1:25(wt/wt)

^{a~e} Means with the different letter in same column are significantly different by Duncan's multiple range test(p<0.05).

2) Bulk density

WPC 가수분해물의 bulk density는 다섯 가지 효소 모두 가수분해 시간의 증가에 따라 통계적으로 유의하게 증가했음(table 3). Alcalase, Protease M, Protease S, Trypsin, Pepsin은 각각 5시간에서 0.43, 0.47, 0.48, 0.44, 0.38g/ml 로 최대의 밀도를 나타내었음. Harper 등(1963)과 Bell 등(1963)은 각각 밀도가 0.4 이하와 0.33 정도일 때 분산성에 좋은 효과를 보인다고 하였음. 가수분해는 입자크기가 축소된 유리아미노산과 작은 분자의 펩타이드를 초래함으로써 bulk density가 높게 나타나는 것으로 판단됨(Adler-Niessen 1981, Mahmoud 1984). 작아진 입자는 큰 입자사이의 공간에 채워짐으로써 효율적으로 가수분해된 분무건조 WPC의 높은 bulk density가 초래된다는 사실을 설명할 수 있음. 이 결과는 가수분해되지 않은 시료에 비해 건조제품의 포장시 의의가 있음.

Table 3. The change of bulk density in WPC-35 during hydrolysis by enzyme

Hydrolysis time (hours)	Enzyme				
	Alcalase	Protease M	Protease S	Trypsin	Pepsin
0	0.30±0.04 ^f	0.30±0.04 ^f	0.30±0.04 ^f	0.30±0.04 ^f	0.30±0.04 ^f
0.5	0.36±0.04 ^{de}	0.42±0.05 ^{bdac}	0.37±0.08 ^{dec}	0.39±0.01 ^{dc}	0.32±0.01 ^e
1	0.37±0.04 ^{dec}	0.43±0.01 ^{bdac}	0.43±0.01 ^{bdac}	0.41±0.01 ^{bdc}	0.33±0.05 ^e
2	0.40±0.03 ^{bdc}	0.44±0.01 ^{bac}	0.43±0.04 ^{bdac}	0.41±0.01 ^{bdc}	0.33±0.05 ^e
3	0.42±0.00 ^{bdac}	0.44±0.01 ^{bac}	0.43±0.07 ^{bdac}	0.41±0.01 ^{bdc}	0.35±0.01 ^{de}
4	0.43±0.01 ^{bdac}	0.45±0.00 ^{ba}	0.44±0.01 ^{bac}	0.44±0.01 ^{bac}	0.36±0.03 ^{de}
5	0.43±0.01 ^{bdac}	0.47±0.02 ^{ba}	0.48±0.00 ^a	0.44±0.01 ^{bac}	0.38±0.00 ^{dec}

Treatment condition:

Hydrolysis temperature : 37°C with 180rpm in shaking incubator

Enzyme : Substrate ratio = 1:25 (wt/wt)

^{a-f} Means with the different letter in same column are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

3) 거품형성력(Foam expansion)

WPC 효소적 가수분해가 거품생성능에 끼치는 영향은 table 4에서 볼 수 있음. 오버런으로 표현되는 거품생성능은 WPC 가수분해물에서 가수분해가 진행됨에 따라 현저히 증가한데서 볼 수 있듯이 가수분해가 거품생성능에 긍정적으로 작용하는 것을 시사함. WPC에 대한 효소적 가수분해의 거품생성능의 개선은 다른 연구에서도 관측된다 있음(Vkjayakumar 등 2000). 거품생성능이 개선된 현상은 가수분해로 인해 작은 분자인 펩타이드와 아미노산이 방출되는데서 설명할 수 있음. 이들 작은 펩타이드와 아미노산은 물에 잘 용해되고 기포가 잘 생성되는 경향이 있어 수분의 경계면에 단백질의 신속히 확산되어 표면의 장력을 감소시킴(Poole and Fry, 1987). 이로 인해 기포의 캡슐화 초래가 용이하게 된다. 이러한 거품생성능은 특정음료에서 중요한 의의가 있음.

Table 4. The change of foam expansion in WPC-35 during hydrolysis by enzyme

Hydrolysis time (hours)	Enzyme				
	Alcalase	Protease M	Protease S	Trypsin	Pepsin
0	137.5±17.68 ^b	137.5±17.68 ^b	137.5±17.68 ^b	137.5±17.68 ^b	137.5±17.68 ^b
0.5	150.0±0.00 ^b	150.0±0.00 ^b	137.5±17.68 ^b	162.5±17.68 ^a	162.5±17.68 ^a
1	162.5±17.68 ^a	150.0±0.00 ^b	162.5±17.68 ^a	162.5±17.68 ^a	187.5±17.68 ^a
2	175.0±0.00 ^b	150.0±0.00 ^b	162.5±17.68 ^{ba}	175.0±0.00 ^b	225.0±70.71 ^a
3	187.5±17.68 ^a	162.5±17.68 ^b	162.5±17.68 ^{ba}	187.5±17.68 ^a	237.5±17.68 ^a
4	250.0±70.71 ^a	175.0±0.00 ^{ba}	187.5±17.68 ^a	212.5±53.03 ^a	250.0±70.71 ^a
5	287.5±17.68 ^b	175.0±0.00 ^{ba}	212.5±53.03 ^a	225.0±70.71 ^a	250.0±70.71 ^a

Treatment condition;

Hydrolysis temperature : 37°C with 180rpm in shaking incubator

Enzyme : Substrate ratio = 1:25 (wt/wt)

^{a~b} Means with the different letter in same column are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

4) 용해도(Solubility)

분무건조된 WPC 가수분해물의 용해도의 변화는 fig. 2와 3에서 볼수있음. 효소가수분해는 모든 pH에서 용해도를 개선한 것으로 나타났음. WPC 가수분해물의 용해도 개선정도는 등전점 부근에서 현저함으로써 단백질용해도개선에 있어 효소적분해의 의의가 입증되었음. 이 결과는 여러 종류의 단백질에서 다양한 효소를 이용한 가수분해에서 용해도의 증가를 보인 많은 문헌의 결과와 일치함(Adler-Niessen 1976).

WPC 가수분해의 증가된 용해도는 펩타이드, 아미노산등 작은 분자화합물의 방출에 기인하는 것으로 사료됨. 가수분해는 이온화될 수 있는 아미노기와 카르복시기의 수를 증가시킴으로써 친수성이 증가되어 용해도의 증가를 초래한다고 볼 수 있음. 이와같은 결과는 WPC를 산성의 과일주스에 기초한 음료, 수프와 같은 식품에 이용할 때 단백질의 용해도가 중요하므로 의의가 있음.

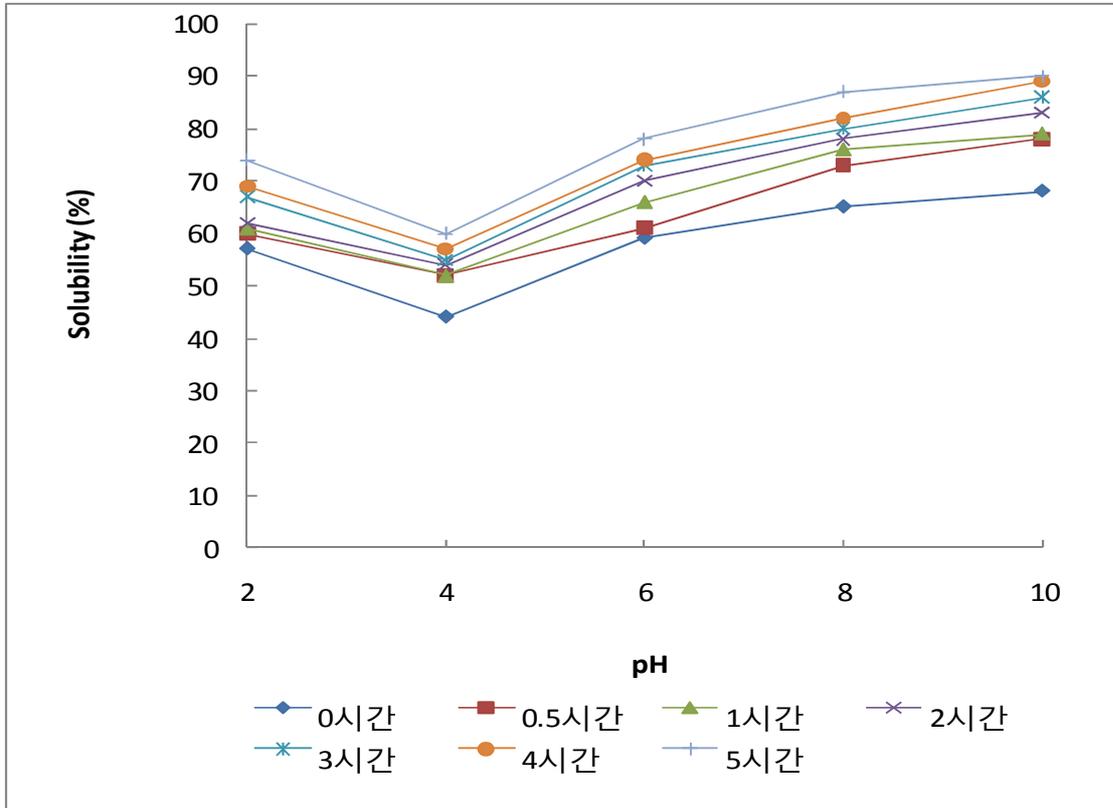


Fig. 2. The change of solubility in WPC-35 during hydrolysis by Protease S

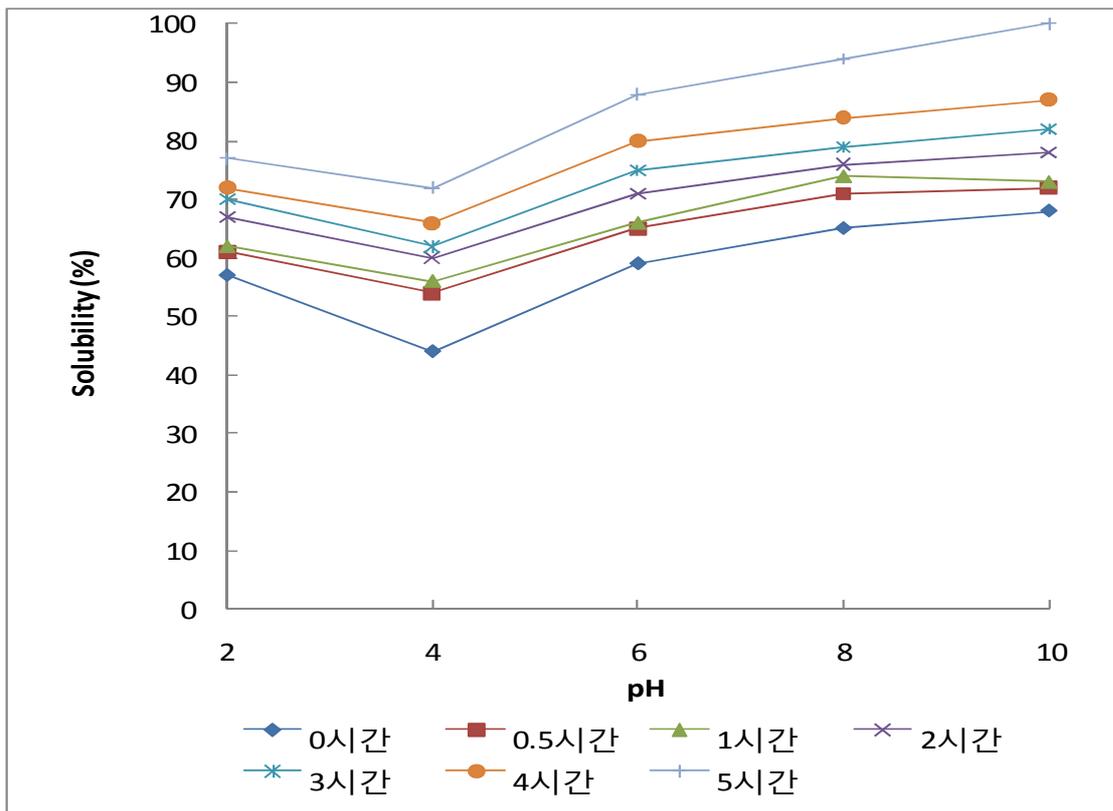


Fig. 3. The change of solubility in WPC-35 during hydrolysis by Trypsin

5) HMF(5-hydroxymethyl-2-furfural)

HMF는 갈변화 반응의 중간산물로서 우유, 과일주스, 꿀을 포함한 다양한 열처리 식품에 나타남. 이 반응은 아미노산과 환원당이 함께 존재할 때 일어나며, 분유를 장기간 저장하면 갈색을 띠게되는 현상이 나타남. HMF 함량은 열처리 온도와 아울러 저장시간, 온도 및 습도에 따라 영향을 받음(Fink and Kessler, 1986; Renner, 1988, 1989). 가수분해 후에는 가수분해 전보다 유리 상태의 lysine 함량이 증가하여 이들이 유당과 반응하면서 HMF 함량이 증가하는 것으로 사료됨.

Table 5에 나타낸 것과 같이 가수분해로 인해 pepsin 처리구를 제외한 모든 시료의 HMF 함량이 증가했는데, 특히 protease M 처리구가 가장 급격한 증가를 보였음. 또한 각각의 효소 처리구들 간에 유의적인 차이가 있었음. Trypsin과 Pepsin은 다른 세 가지 효소들에 비해 전반적으로 낮은 수치를 나타냈음.

Table 5. The change of HMF content in WPC-35 during hydrolysis by enzyme

Unit: $\mu\text{mol}/\ell$

Hydrolysis time (hours)	Enzyme				
	Alcalase	Protease M	Protease S	Trypsin	Pepsin
0	117.69 $\pm 10.89^e$	117.69 $\pm 10.89^d$	117.69 $\pm 10.89^b$	117.69 $\pm 10.89^{bc}$	117.69 $\pm 10.89^a$
0.5	127.58 $\pm 0.99^{de}$	179.00 $\pm 11.96^c$	177.27 $\pm 3.98^{ba}$	93.15 $\pm 7.32^d$	91.20 $\pm 6.77^c$
1	136.94 $\pm 3.59^{dc}$	245.14 $\pm 0.93^a$	183.54 $\pm 15.87^{ba}$	112.02 $\pm 10.51^{dc}$	98.48 $\pm 5.14^{bac}$
2	198.41 $\pm 0.18^a$	177.89 $\pm 2.35^c$	211.40 $\pm 43.69^a$	122.66 $\pm 11.04^{bc}$	114.92 $\pm 9.270^a$
3	212.58 $\pm 0.68^a$	194.52 $\pm 11.14^{cb}$	200.79 $\pm 12.64^a$	158.54 $\pm 5.90^a$	112.20 $\pm 9.92^{ba}$
4	178.14 $\pm 10.38^b$	210.79 $\pm 2.72^b$	250.92 $\pm 9.58^a$	139.82 $\pm 13.63^{ba}$	104.67 $\pm 3.59^{bac}$
5	152.20 $\pm 10.83^c$	182.32 $\pm 10.51^c$	228.29 $\pm 5.40^a$	125.10 $\pm 4.61^{bc}$	94.21 $\pm 5.25^{bc}$

Treatment condition;

Hydrolysis temperature : 37°C with 180rpm in shaking incubator

Enzyme : Substrate ratio = 1:25(wt/wt)

^{a~g} Means with the different letter in same column are significantly different by Duncan's multiple range test(p<0.05).

6) Free sulfhydryl group(-SH기)

유단백질의 가수분해에 의해 혹은 가열에 의해 sulfhydryl group이 유리되며, 유제품에서 유리 SH기의 존재는 cooked flavor의 형성, 항산화 활성, 저장성과 관련이 있음(Apenten, 1998). SH기의 주요한 출처인 β -lactoglobulin은 자연상태의 우유단백질에서 dimer로 존재하는데 열처리와 같은 에너지를 받을 경우 변성과 함께 구조변화를 초래하여 monomer로 분리되고 이로 인해 내부에 있던 SH기가 외부로 노출됨. SH기의 농도는 열처리 온도와 시간, 산도, 산소의 함량, 저장조건등에 영향을 받음. Blankenagel과 Humbert(1963)는 β -lactoglobulin 이 130°C에서 완전히 변성되며, 이 때 함황아미노산인 methionine, cysteine, cystine 등이 가열취를 야기시키는 SH기를 생성한다고 보고하였음.

가수분해 시간에 따라 유리되는 SH기의 농도 변화는 table 6에서 보듯이, 효소들 간에 유의적인 차이가 있었음. 모든 효소에서 가수분해 30분 후 SH기 농도가 급격히 감소하였고, 그 이후에는 완만하게 감소하였음. 유리된 SH기는 가수분해 후 그들 중의 일부가 disulfide bond로 결합되면서 그 농도가 줄어드는 것으로 사료됨.

Table 6. The change of SH group in WPC-35 during hydrolysis by enzyme

Hydrolysis time (hours)	Enzyme				
	Alcalase	Protease M	Protease S	Trypsin	Pepsin
0	0.359±0.011 ^a	0.359±0.011 ^a	0.359±0.011 ^a	0.359±0.011 ^a	0.359±0.011 ^a
0.5	0.172±0.012 ^b	0.192±0.007 ^b	0.215±0.018 ^b	0.194±0.008 ^b	0.254±0.004 ^b
1	0.166±0.008 ^b	0.131±0.004 ^c	0.212±0.018 ^b	0.196±0.004 ^b	0.226±0.008 ^{cb}
2	0.159±0.002 ^b	0.125±0.003 ^{dc}	0.201±0.009 ^{cb}	0.160±0.003 ^{dc}	0.226±0.014 ^{cb}
3	0.155±0.001 ^b	0.123±0.001 ^{dc}	0.179±0.000 ^{cd}	0.145±0.003 ^{de}	0.205±0.043 ^c
4	0.154±0.001 ^b	0.114±0.001 ^{de}	0.154±0.000 ^{ed}	0.139±0.011 ^e	0.232±0.013 ^{cb}
5	0.125±0.013 ^c	0.105±0.001 ^e	0.148±0.000 ^e	0.171±0.001 ^c	0.192±0.001 ^c

Treatment condition;

Hydrolysis temperature : 37°C with 180rpm in shaking incubator

Enzyme : Substrate ratio = 1:25 (wt/wt)

^{a~e} Means with the different letter in same column are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

7) NPN(Non protein nitrogen)

비단백태질소의 농도는 table 7에 나타낸 바와 같이 모든 효소에서 가수분해 시간이 증가할 수록 꾸준한 증가를 나타냈으며, pepsin 처리구가 최대값을, protease M 처리구가 최소값을 나타냈음.

가수분해물의 NPN이 증가한 것은 단백질 가수분해에 의한 영향인것으로 사료되며, 가수분해가 많이 진행될수록 수용성의 비단백태질소 화합물인 아미노산이, 펩타이드의 양이 증가하기 때문에 NPN 값이 증가하는 것으로 사료됨. 이같은 NPN의 증가는 쓴맛을 초래할 수 있으므로 미각과의 관계를 고려하여 적절한 가수분해를 실시 할 필요가 있음(Clemente 2000).

Table 7. The change of NPN level in WPC-35 during hydrolysis by enzyme

Hydrolysis time (hours)	Enzyme				
	Alcalase	Protease M	Protease S	Trypsin	Pepsin
0	0.119±0.081 ^a				
0.5	1.296±0.389 ^a	1.168±0.326 ^a	1.315±0.354 ^a	1.310±0.389 ^a	1.208±0.389 ^a
1	1.345±0.343 ^a	1.184±0.339 ^a	1.328±0.346 ^a	1.316±0.343 ^a	1.507±0.343 ^a
2	1.369±0.336 ^a	1.202±0.325 ^a	1.350±0.342 ^a	1.382±0.336 ^a	1.648±0.336 ^a
3	1.470±0.287 ^a	1.214±0.312 ^a	1.502±0.174 ^a	1.643±0.287 ^a	1.853±0.287 ^a
4	1.512±0.247 ^a	1.252±0.264 ^a	1.541±0.204 ^a	1.641±0.247 ^a	1.923±0.247 ^a
5	1.549±0.262 ^a	1.434±0.130 ^a	1.567±0.170 ^a	1.641±0.262 ^a	1.796±0.262 ^a

Treatment condition;

Hydrolysis temperature : 37°C with 180rpm in shaking incubator

Enzyme : Substrate ratio = 1:25 (wt/wt)

^a Means with the different letter in same column are significantly different by Duncan's multiple ragne test (p<0.05).

8) 단백질 가수분해도(Degree of protein hydrolysis)

가수분해결과 α-amino group을 가지고 있는 아미노산 함량이 증가함에 따라 TNBS 값도 증가하게 됨. TNBS 값과 가수분해도의 변화는 table 8과 9에 각각 나타내었음. TNBS 값은 30분 동안 급격히 증가했다가 그 이후로는 분해 시간이 길어질수록 완만히 증가하는 양상을 보였음.

가수분해도는 모든 효소 처리구에서 분해 30분 동안 급격히 증가했다가 완만한 증가를 나타내는 것으로 나타남. 모든 효소에서 가수분해 시작 후 30분 이내에 단백질의 7.94~9.96%가 분해되었으며, 최종 분해율은 9.48~11.78%로 나타났음. 5시간동안 가수분해한 처리구를 비교해 보면 Protease M 처리구가 최대값을, Alcalase 처리구가 가장 낮은 값을 나타내고 있음.

Table 8. The change of DH in WPC-35 during hydrolysis by enzyme

Hydrolysis time (hours)	Enzyme				
	Alcalase	Protease M	Protease S	Trypsin	Pepsin
0	4.65±0.31 ^b	4.65±0.31 ^b	4.65±0.31 ^b	4.65±0.31 ^b	4.65±0.31 ^b
0.5	7.94±1.44 ^a	9.22±1.07 ^a	9.96±1.17 ^a	8.78±0.06 ^a	8.26±0.02 ^a
1	8.39±1.73 ^a	9.58±1.20 ^a	10.01±1.23 ^a	8.80±0.08 ^a	8.37±0.10 ^a
2	8.68±1.54 ^a	10.39±1.10 ^a	10.25±1.51 ^a	9.58±0.16 ^a	9.30±0.09 ^a
3	9.07±2.02 ^a	10.81±1.56 ^a	10.61±1.49 ^a	10.25±0.0 ^a	9.79±0.20 ^a
Unit:% 4	9.20±2.11 ^a	11.24±1.75 ^a	10.82±1.68 ^a	10.69±0.15 ^a	9.87±0.08 ^a
5	9.48±2.10 ^a	11.78±2.31 ^a	11.20±1.17 ^a	11.23±0.25 ^a	10.34±0.12 ^a

Treatment condition;

Hydrolysis temperature : 37°C with 180rpm in shaking incubator

Enzyme : Substrate ratio = 1:25 (wt/wt)

^{a~b} Means with the different letter in same column are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

Table 9. The change of TNBS in WPC-35 during hydrolysis by enzyme

Hydrolysis time (hours)	Enzyme				
	Alcalase	Protease M	Protease S	Trypsin	Pepsin
0	0.775 ±0.052 ^b	0.775 ±0.052 ^b	0.775 ±0.052 ^b	0.775 ±0.052 ^f	0.775 ±0.052 ^e
0.5	1.322 ±0.239 ^{ba}	1.537 ±0.180 ^a	1.661 ±0.196 ^a	1.464 ±0.009 ^e	1.378 ±0.004 ^d
1	1.398 ±0.288 ^{ba}	1.597 ±0.200 ^a	1.669 ±0.204 ^a	1.467 ±0.014 ^e	1.396 ±0.016 ^d
2	1.447 ±0.257 ^{ba}	1.731 ±0.183 ^a	1.708 ±0.251 ^a	1.597 ±0.026 ^d	1.549 ±0.016 ^c
3	1.512 ±0.336 ^a	1.802 ±0.260 ^a	1.768 ±0.249 ^a	1.709 ±0.001 ^c	1.632 ±0.033 ^b
4	1.533 ±0.351 ^a	1.873 ±0.292 ^a	1.804 ±0.281 ^a	1.783 ±0.025 ^b	1.646 ±0.013 ^b
5	1.579 ±0.350 ^a	1.964 ±0.384 ^a	1.867 ±0.196 ^a	1.872 ±0.042 ^a	1.723 ±0.019 ^a

Treatment condition;

Hydrolysis temperature : 37°C with 180rpm in shaking incubator

Enzyme : Substrate ratio = 1:25(wt/wt)

^{a~e} Means with the different letter in same column are significantly different by Duncan's multiple ragne test(p<0.05).

9) 전기영동(SDS-PAGE)

Fig. 4와 5는 WPC 가수분해물의 단백질을 분석하기 위해 전기영동을 실시한 결과임.

Lane M은 표준단백질로서 분자량에 따라 myosin(250kD), phosphorylase(148kD), bovine serum albumin(98kD), glutamic dehydrogenase(64kD), alcohol dehydrogenase(50kD), carbonic anhydrase(36kD), myoglobin red(22kD), Lysozyme(16kD)으로 나타남.

대조구에서는 50~98kDa, 16~22kDa, 6~16kDa 범위에서 BSA(66.4kDa), β-Lg(18kDa), α-La(14kDa)의 band가 나타남. 가수분해물은 효소의 종류에 따라 가수분해물의 단백질 band 농도와 위치는 각각 다르게 나타났으나, 모든 효소에서 가수분해 30분 후 분자량 22kDa 이상의 단백질들이 거의 모두 분해되었으며 6kDa이하의 peptide들이 생성되었음. 가수분해 30분 이후로는 band의 위치나 선명도에 큰 변화가 없었는데, 이는 단백질 가수분해도가 30분 동안 급격히 증가했다가 그 이후로 완만한 증가를 보인 결과와 일치함(Fig. 9).

Alcalase 및 Protease S 처리구에서 분해 개시 30분 만에 β-Lg에 해당되는 밴드가 완전히 사라졌음. Alcalase 처리 가수분해물의 경우 6~22kDa에 속하는 band는 매우 희미하게, 6kDa 이하의 band는 다소 눈에 띄는 정도로 남아있었음. Protease S 처리 가수분해물의 경우 가장 높은 단백질 분해력을 보였는데, 16kDa이상은 거의 모두 분해되어 band가 나타나지 않았고 16kDa이하도 매우 희미하게 남아있었음. Protease M 처리 가수분해물의 경우 22kDa 이하는 전

체적으로 band가 희미하게 나타났고 β -Lg과 α -La band만이 선명하게 나타났음. Trypsin 및 pepsin은 protease M과 매우 유사한 결과를 나타냈음. Trypsin 처리 가수분해물의 경우 4시간 가수분해 후에도 β -Lg, α -La의 band가 나타났음.

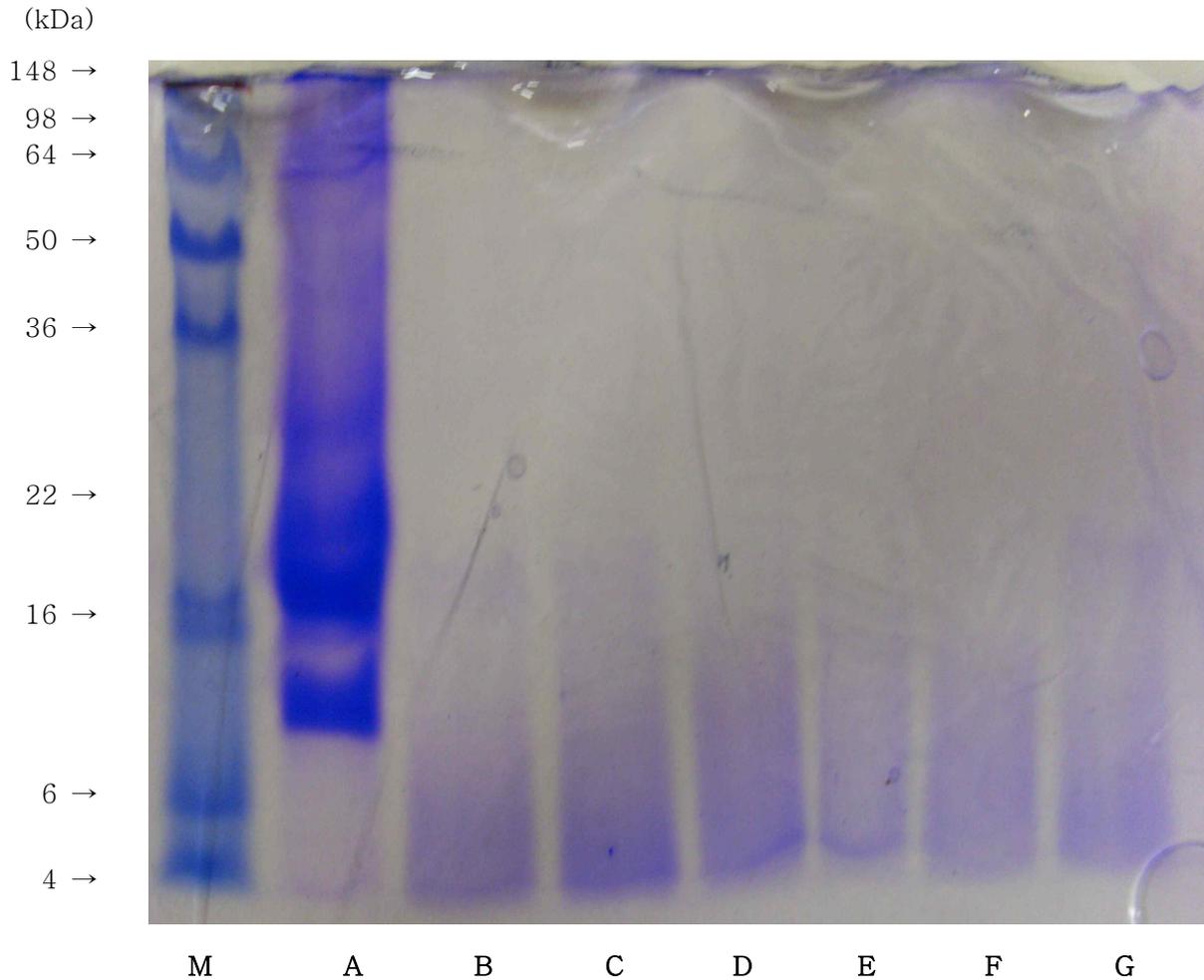


Fig. 4. SDS-PAGE patterns of WPC-35 hydrolysates by protease S at 37°C for 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 hours.

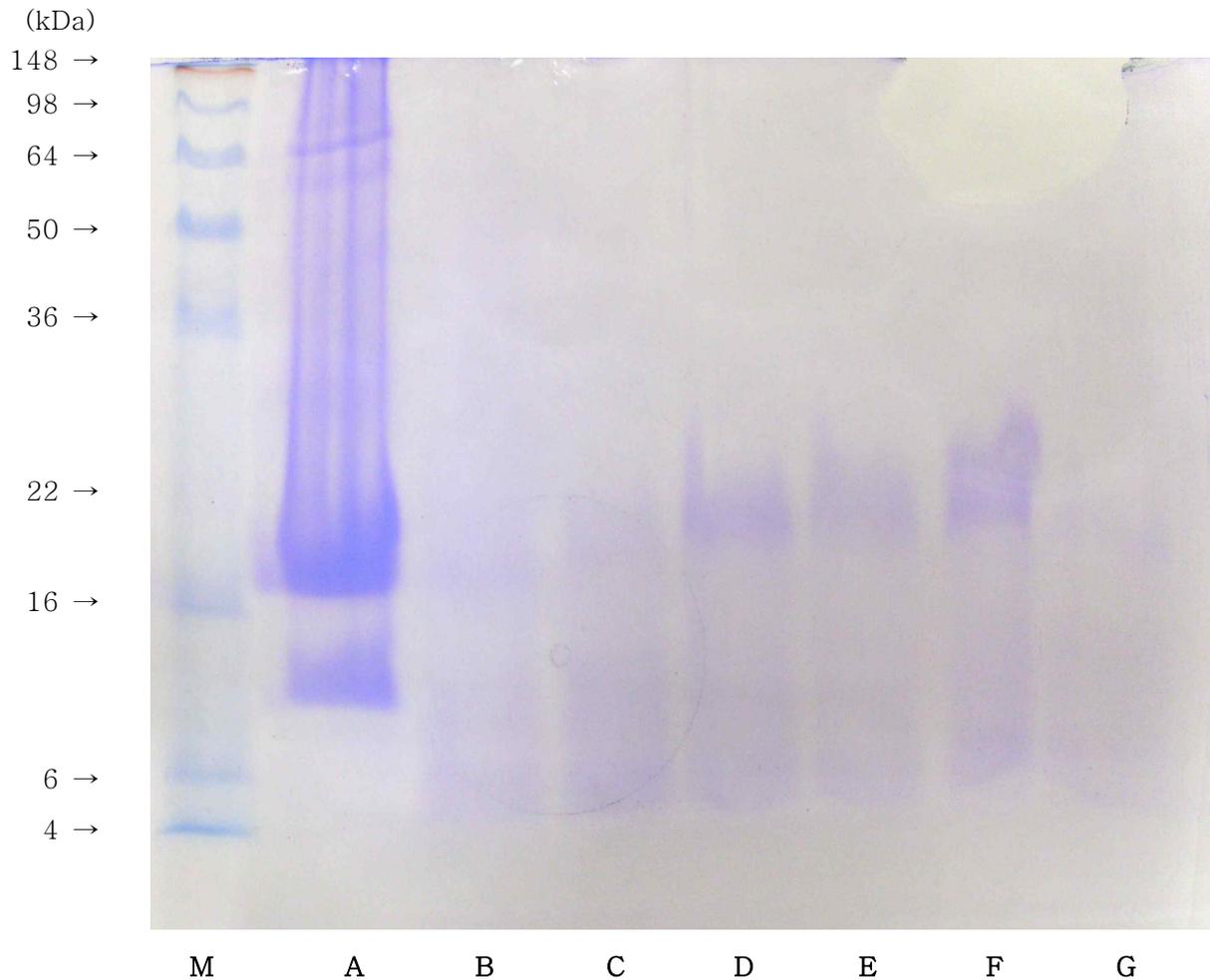


Fig. 5. SDS-PAGE patterns of WPC-35 hydrolysates by trypsin at 37°C for 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 hours.

10) Angiotensin Converting Enzyme 저해 효과(ACE-inhibitory activity)

생체 내에서 angiotensin I은 angiotensin 변환 효소의 작용에 의해 C-말단의 histidine-leucine을 잃고 angiotensin II로 변함. 이 angiotensin II는 혈관 평활근, 부신 등에 작용하여 혈압을 상승시키는 물질로 가장 강력한 혈관 수축작용을 하고 있음. 또한 angiotensin 변환 효소는 혈액 중에서 혈압을 내리는 작용을 하는 kinin을 불활성화 시키므로 두 가지 측면에서 혈압을 올리는 작용을 함(Fitzerald 와 Meisel 1999).

Table 10에 나타낸 바와 같이 WPC 가수분해물들의 ACE 저해율을 계산한 결과, Pepsin 가수분해물이 가장 높은 값을 보였는데 2시간, 3시간, 4시간에서 각각 94.24, 95.57, 95.41%로 나왔음. 모든 효소들의 가수분해물에서 60% 이상의 ACE 저해 효과를 나타내었음.

Table 10. ACE-inhibitory activity in WPC-35 during hydrolysis by enzyme

Enzyme	Hydrolysis time(hours)			
	0	2	3	4
Alcalase	6.06±0.28 ^f	89.97±0.62 ^b	85.71±6.43 ^{bc}	83.61±5.05 ^{dc}
Protease M	6.06±0.28 ^f	81.27±0.88 ^c	82.64±0.34 ^c	81.22±1.63 ^d
Protease S	6.06±0.28 ^f	90.23±0.59 ^b	90.91±1.81 ^{ba}	91.55±1.18 ^{ba}
Chymotrypsin	6.06±0.28 ^f	75.26±0.88 ^d	80.63±0.73 ^c	87.36±0.17 ^{bc}
Trypsin	6.06±0.28 ^f	61.97±2.26 ^e	67.46±1.65 ^d	62.90±1.86 ^e
Pepsin	6.06±0.28 ^f	94.24±2.21 ^a	95.57±1.22 ^a	95.41±1.45 ^a

Treatment condition;

Hydrolysis temperature : 37°C with 180rpm in shaking incubator

Enzyme : Substrate ratio = 1:25 (wt/wt)

^{a~b} Means with the different letter in same column are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

11) 관능검사(Sensory test)

쓴맛의 정도는 table 11에 나타낸 바와 같이 가수분해가 진행되면서 증가했으며, 특히 alcalase와 pepsin 처리 가수분해물의 쓴맛이 강하게 증가한 것으로 나타났음. 나머지 시료들의 쓴맛은 기호에 크게 영향을 미칠 정도는 아니었음.

효소를 이용한 가수분해물의 경우 쓴맛 생성이 이용도를 낮추는 요인이 됨. 이 쓴맛은 통상 2~23개의 아미노산 잔기로 구성된 펩타이드에서 나타나며 일반적으로 소수성을 함유하고 있음 (Rothenbuhler and Kinsella, 1985). 다른 단백질과 마찬가지로 유단백질도 바깥쪽은 친수성 아미노산으로 덮여있고 안쪽은 소수성 아미노산이 자리 잡고 있음. 따라서 가수분해에 의해 구상구조가 파괴되면서 안쪽의 소수성 아미노산이 노출되는 것으로 보임(Matoba and Hata, 1972). endopeptidase의 이용은 품질에 영향을 미칠 정도의 과도한 소수성 유리 아미노산이 생성될 가능성이 있기 때문에 이용목적에 따라 적절한 가수분해조건의 선택이 필요함. 본 조사에서는 Trypsin 처리구가 온화한 미각을 나타냈음.

Table 11. Sensory scores in WPC-35 during hydrolysis by enzyme

Hydrolysis time (hours)	Enzyme				
	Alcalase	Protease M	Protease S	Trypsin	Pepsin
0	2.0±1.4 ^b	2.0±1.4 ^a	2.0±1.4 ^b	2.0±1.4 ^a	2.0±1.4 ^b
0.5	4.0±1.4 ^{ba}	3.8±0.3 ^a	3.4±0.3 ^{ba}	2.8±0.3 ^a	5.6±0.8 ^a
1	4.2±0.3 ^{ba}	3.6±0.1 ^a	3.4±0.1 ^{ba}	3.0±0.7 ^a	5.4±0.6 ^a
2	4.4±0.6 ^a	3.9±0.6 ^a	3.6±0.3 ^{ba}	2.8±0.6 ^a	6.0±1.4 ^a
3	4.8±0.4 ^a	3.9±0.8 ^a	3.6±0.3 ^{ba}	3.8±0.6 ^a	5.6±1.1 ^a
4	5.4±0.1 ^a	4.0±1.4 ^a	3.8±0.3 ^a	3.4±0.6 ^a	5.0±1.4 ^a
5	5.2±1.1 ^a	4.0±0.7 ^a	4.0±0.7 ^a	3.6±0.6 ^a	5.2±0.6 ^a

Treatment condition;

Hydrolysis temperature : 37°C with 180rpm in shaking incubator

Enzyme : Substrate ratio = 1:25 (wt/wt)

^{a-b} Means with the different letter in same column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

12) 가수분해된 유청 단백질의 생리활성 펩타이드 분석

유청단백질 가수분해물의 펩타이드 분석을 위해 Massspectrometer QStar(Applied Biosystem MDS SCIEX, Canada) 를 사용했음. 이온화된 시료의 분자는 기체상태로 전환되어 매분당 유속 2-200 microliter에서 분석되었음. 유청 단백질은 alcalase, pretease S, protease M, pepsin, trypsin을 이용하여 가수분해한 결과 3시간동안의 가수분해에서 protease S 와 pepsin 처리한 가수분해물에서 생리활성 펩타이드가 분석되었음. 가수분해물의 펩타이드 분석 결과는 table 12에 나타내었음. Protease S 에서 β -Lactoglobulin이 생성한 LDAQSAPLR 이, trypsin에서 역시 β -Lactoglobulin이 생성한 22-25 fragment 인 LAMA(Leu-Ala-Met-Ala) 와 32-40fragment인 LDAQSAPLR(Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg)을 확인할 수 있었음. 이들 펩타이드의 ACE 저해효과는 문헌에 보고되었음(Mullally, 1997; Pihlanto-Leppaelae 등 2000).

Table 12. The peptide analysis in WPC-35 during hydrolysis by enzyme

Sequence (fragments)	Protein	[M+H] ⁺	PP	Δm	Sample
WPC 35, Protease S					
AASDISL	β -Lactoglobulin.	676.3514	18.46	0.22	M4.RAW
DALNENKVLVLDTDYKKYL	β -Lactoglobulin.	2254.1969	15.18	0.14	M4.RAW
FNPTQLEEQ	β -Lactoglobulin.	1105.5175	32.39	1.25	M4.RAW
FNPTQLEEQCHI	β -Lactoglobulin.	1458.6672	53.99	-0.74	M4.RAW
IAEKTKIPA	β -Lactoglobulin.	970.5894	52.39	-3.92	M4.RAW
IAEKTKIPAVFK	β -Lactoglobulin.	1344.8262	36.31	0.90	M4.RAW
IDALNENKV	β -Lactoglobulin.	1015.5419	30.40	0.02	M4.RAW
IDALNENKVL	β -Lactoglobulin.	1128.6285	19.07	2.21	M4.RAW
IDALNENKVLVLDTDYKK	β -Lactoglobulin.	2091.1364	96.05	1.48	M4.RAW
IDALNENKVLVLDTDYKKY	β -Lactoglobulin.	2254.1969	120.15	0.14	M4.RAW
IIAEKTKIP	β -Lactoglobulin.	1012.6416	31.74	1.43	M4.RAW
IIAEKTKIPA	β -Lactoglobulin.	1083.6767	55.18	-0.55	M4.RAW

IIAEKTKIPAV	β -Lactoglobulin.	1182.7482	44.34	2.13	M4.RAW
IIAEKTKIPAVFK	β -Lactoglobulin.	1457.9106	50.73	1.01	M4.RAW
IIAEKTKIPAVFKI	β -Lactoglobulin.	1570.9927	21.08	-0.29	M4.RAW
LDAQSAPLR	β -Lactoglobulin.	970.5328	41.53	1.12	M4.RAW
LDAQSAPLRVY	β -Lactoglobulin.	1232.6657	87.27	1.85	M4.RAW
LDAQSAPLRVYVEE	β -Lactoglobulin.	1589.8168	70.24	-0.13	M4.RAW
LDTDYKKY	β -Lactoglobulin.	1045.5209	45.80	0.81	M4.RAW
LIVTQT	β -Lactoglobulin.	674.4086	19.47	0.43	M4.RAW
LIVTQTMKG	β -Lactoglobulin.	990.5645	67.29	-0.79	M4.RAW
LKALPMH	β -Lactoglobulin.	809.4704	22.43	0.18	M4.RAW
LKPTPEGDLE	β -Lactoglobulin.	1098.5689	70.36	1.00	M4.RAW
LKPTPEGDLEIL	β -Lactoglobulin.	1324.7363	25.45	0.24	M4.RAW
LKPTPEGDLEILL	β -Lactoglobulin.	1437.8206	24.76	0.42	M4.RAW
LKPTPEGDLEILLQK	β -Lactoglobulin.	1693.9753	29.16	1.04	M4.RAW

LKPTPEGDLEILLQKW	β -Lactoglobulin.	1880.0541	74.64	0.67	M4.RAW
LLDAQSAPLRVYVEE	β -Lactoglobulin.	1702.9025	81.24	0.83	M4.RAW
LNENKVLVLDTDYKKY	β -Lactoglobulin.	1955.0533	121.29	2.47	M4.RAW
LSFNPTQLEEQCHI	β -Lactoglobulin.	1658.7854	56.87	0.67	M4.RAW
LVLDTDYKKY	β -Lactoglobulin.	1257.6713	70.36	-0.99	M4.RAW
LVLDTDYKKYL	β -Lactoglobulin.	1370.7552	85.25	-1.06	M4.RAW
LVRTPEVDDEA	β -Lactoglobulin.	1243.6163	73.10	-0.23	M4.RAW
LVRTPEVDDEAL	β -Lactoglobulin.	1356.7061	23.86	4.05	M4.RAW
LVRTPEVDDEALEK	β -Lactoglobulin.	1613.8409	130.02	1.66	M4.RAW
SFNPTQLEEQ	β -Lactoglobulin.	1192.5503	49.87	1.84	M4.RAW
SFNPTQLEEQCHI	β -Lactoglobulin.	1545.7021	50.75	1.17	M4.RAW
SLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGD LEILL	β -Lactoglobulin.	4068.1490	107.76	0.67	M4.RAW
VEELKPTPEGDLEIL	β -Lactoglobulin.	1681.8898	56.13	0.16	M4.RAW
VFKIDALNENKV	β -Lactoglobulin.	1389.7747	87.67	0.72	M4.RAW

VLDTDYKKY	β -Lactoglobulin.	1144.5896	61.53	1.01	M4.RAW
VLDTDYKKYL	β -Lactoglobulin.	1257.6727	32.80	0.07	M4.RAW
VLVLDTDYKKY	β -Lactoglobulin.	1356.7391	54.98	-1.42	M4.RAW
VRTPEVDDEA	β -Lactoglobulin.	1130.5320	57.61	-0.39	M4.RAW
VRTPEVDDEALEK	β -Lactoglobulin.	1500.7568	72.48	1.77	M4.RAW
VYVEELKPTPEGDLEIL	β -Lactoglobulin.	1944.0239	36.23	1.32	M4.RAW
YVEELKPTPEGDLEILL	β -Lactoglobulin.	1958.0383	40.45	0.67	M4.RAW

WPC 35, Trypsin

ALKALPMH	β -Lactoglobulin.	880.5073	34.70	-0.07	M5.RAW
ALKALPMHIR	β -Lactoglobulin.	1149.6928	83.33	0.17	M5.RAW
ALPMHIRLSFNPTQLEEQCHI	β -Lactoglobulin.	2477.2428	51.39	-0.03	M5.RAW
AMAASDISLLDAQSAPLR	β -Lactoglobulin.	1829.9439	68.67	0.66	M5.RAW
DIQKVAGTWYSL	β -Lactoglobulin.	1380.7156	34.34	-0.16	M5.RAW
FNPTQLEEQCHI	β -Lactoglobulin.	1458.6687	75.42	0.35	M5.RAW

GLDIQKVAGTWY	β -Lactoglobulin.	1350.7049	41.89	-0.30	M5.RAW
GLDIQKVAGTWYS	β -Lactoglobulin.	1437.7374	78.11	0.03	M5.RAW
GLDIQKVAGTWYSL	β -Lactoglobulin.	1550.8207	50.71	-0.42	M5.RAW
GLDIQKVAGTWYSLA	β -Lactoglobulin.	1621.8599	55.14	0.87	M5.RAW
GLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR	β -Lactoglobulin.	3361.7571	82.49	3.22	M5.RAW
IDALNENKV	β -Lactoglobulin.	1015.5411	57.49	-0.83	M5.RAW
IIAEKTKIPA	β -Lactoglobulin.	1083.6769	88.18	-0.33	M5.RAW
IIAEKTKIPAV	β -Lactoglobulin.	1182.7452	71.87	-0.45	M5.RAW
IIAEKTKIPAVF	β -Lactoglobulin.	1329.8139	61.96	-0.17	M5.RAW
IIAEKTKIPAVFK	β -Lactoglobulin.	1457.9095	96.36	0.26	M5.RAW
LAMA	β -Lactoglobulin.	1943.0259	62.54	-0.42	M5.RAW
LDAQSAPLR	β -Lactoglobulin.	970.5287	18.10	-3.09	M5.RAW
LIVTQT	β -Lactoglobulin.	674.4086	25.95	0.34	M5.RAW
LIVTQTMK	β -Lactoglobulin.	933.5436	64.99	-0.26	M5.RAW

LIVTQTMKG	β -Lactoglobulin.	990.5645	79.06	-0.79	M5.RAW
LIVTQTMKGLDIQK	β -Lactoglobulin.	1587.9151	90.75	0.73	M5.RAW
LIVTQTMKGLDIQKVAGTWY	β -Lactoglobulin.	2265.2309	45.73	-0.17	M5.RAW
LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYS	β -Lactoglobulin.	2352.2635	109.54	0.08	M5.RAW
LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSL	β -Lactoglobulin.	2465.3510	57.28	1.50	M5.RAW
LKALPMH	β -Lactoglobulin.	809.4708	22.02	0.63	M5.RAW
LKPTPEGDLEIL	β -Lactoglobulin.	1324.7364	19.67	0.34	M5.RAW
LKPTPEGDLEILL	β -Lactoglobulin.	1437.8196	20.49	-0.26	M5.RAW
LSFNPTQLE	β -Lactoglobulin.	1048.5311	25.38	0.13	M5.RAW
LSFNPTQLEE	β -Lactoglobulin.	1177.5745	20.69	0.74	M5.RAW
LSFNPTQLEEQCHI	β -Lactoglobulin.	1658.7851	77.51	0.45	M5.RAW
LVLDTDYKKY	β -Lactoglobulin.	1257.6749	51.37	1.82	M5.RAW
LVRTPEVDDEA	β -Lactoglobulin.	1243.6167	67.53	0.17	M5.RAW
LVRTPEVDDEALE	β -Lactoglobulin.	1485.7436	79.73	0.25	M5.RAW

LVRTPEVDDEALEK	β -Lactoglobulin.	1613.8370	143.31	-0.73	M5.RAW
MKGLDIQK	β -Lactoglobulin.	932.5230	35.54	-0.46	M5.RAW
SFNPTQLEEQCHI	β -Lactoglobulin.	1545.7013	32.67	0.69	M5.RAW
SLAMAASDISLLDAQSAPLR	β -Lactoglobulin.	2030.0591	70.12	0.17	M5.RAW
SLAMAASDISLLDAQSAPLRVY	β -Lactoglobulin.	2292.1924	56.04	0.83	M5.RAW
TKIPAVFK	β -Lactoglobulin.	903.5660	31.34	-0.24	M5.RAW
TPEVDDEALEKFDK	β -Lactoglobulin.	1635.7743	84.27	-0.36	M5.RAW
TPEVDDEALEKFDKALK	β -Lactoglobulin.	1947.9910	122.61	-0.03	M5.RAW
VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR	β -Lactoglobulin.	2707.3736	65.97	-0.93	M5.RAW
VEELKPTPEGDLE	β -Lactoglobulin.	1455.7221	41.75	0.47	M5.RAW
VEELKPTPEGDLEIL	β -Lactoglobulin.	1681.8901	39.20	0.30	M5.RAW
VEELKPTPEGDLEILLQ	β -Lactoglobulin.	1923.0331	66.79	0.48	M5.RAW
VEELKPTPEGDLEILLQK	β -Lactoglobulin.	2051.1251	50.18	-1.01	M5.RAW
VLDTDYKKY	β -Lactoglobulin.	1144.5884	67.88	-0.06	M5.RAW

VRTPEVDDEA	β -Lactoglobulin.	1130.5325	60.49	0.04	M5.RAW
VRTPEVDDEALEK	β -Lactoglobulin.	1500.7542	70.41	0.06	M5.RAW
VYVEELKPTPEGDLEILLQK	β -Lactoglobulin.	2313.2576	83.00	-0.57	M5.RAW
YVEELKPTPEGDLEIL	β -Lactoglobulin.	1844.9543	52.27	0.76	M5.RAW
YVEELKPTPEGDLEILL	β -Lactoglobulin.	1958.0398	54.56	1.48	M5.RAW

* No specific enzyme for the database search used : every amino acid can be a possible cleavage side

* Parameter ; Peptide probability (PP) : >10

Peptide confidence : high

Mass deviation : <5ppm

* PP : the probability that this peptide was identified by chance 10 is a suggestive value for the PP, the higher the value the better

* M4 : WPC hydrolysed by protease S

M5 : WPC hydrolysed by trypsin

13) 파이로트 플랜트에서 생리활성 펩타이드의 생산

건국대학교 동물생명과학대학 파이로트 유가공 플랜트에서 실험실에서 생산과 같은 조건에서 트립신을 이용해서 다음과 같이 가수분해물을 생산함. 시간당 처리능력 100리터의 HTST 열처리기에서 74℃, 46초간 열처리된 유청에서 DSS Lab Unit M 20(Denmark) 한외여과기를 이용하여 WPC-35 를 생산했음. 이 WPC-35 로 부터 mixing unit을 통해 용량 1,000리터의 저유탱크에서 10% WPC를 제조하여 용량 1,000리터의 발효조에서 37℃, 3시간 가수분해를 실시했음. 발효조의 교반기에 의해 균일 한 온도가 유지되었음. 가수분해가 끝난 후 원심분리하여 상등액을 취한 다음 이화학적 성질을 조사한 결과 실험실에서 생산한 펩타이드와 동일한 품질을 확인했음.

14) 프로바이오틱 유산균의 생존율을 고려하여 프로바이오틱 유산균을 함유하는 WPC 가수분해물의 건조공정 적정화

동결건조한 스타터 lactobacillus LA-5 와 Bifidobacterium BB-12(Ch. Hansen Ltd. Denmark)를 접종량을 다르게하여 멸균한 배지에서 배양했음. Bidifobacterium BB-12 의 경우 혐기정조건의 생성은 실험실용 모델인 진공펌프를 사용하여 진공처리했음.

이 스타터는 가수분해한 WPC 에 건조공정전에 첨가되어 분무건조후에 생존율을 검사했음. 분무건조법과 비교를 위해 가수분해물은 fluid bed 건조기에서 건조되었음. 분무건조시 와 마찬가지로 Bifidobacterium BB-12 스타터는 4, 5, 6%로 혼합되었고 Lactobacillus LA-5 역시 4, 5, 6% 로 혼합된 후 fulid bed건조기(GMP Model...)에서 건조됨. 이때 outlet 온도는 40℃ 를 유지함. 이렇게 건조한 제품에서 Lactobacillus LA-5 와 Bifidobacterium BB-12의 숫자를 조사했음.

Table 13에 건조방법과 스타터의 접종량에 영향을 받은 Lactobacillus LA-5 와 Bifidobacterium BB-12 의 생존율을 나타냈음. Lactobacillus LA-5 와 Bifidobacterium BB-12 의 생존율은 접종량에 별다른 영향을 받지 않았으나 건조방법은 생존율에 유의한 효과를 나타냈음. 분무건조된 Lactobacillus LA-5 의 생존율은 4.4.9 log cfu/g 인 반면에 fluid bed 건조제품은 거의 두배인 8.64 log cfu/g 을 나타냈음. Bifidobacterium BB-12의 생존율은 분무건조한 제품에서 4.18 log cfu/g 이었고 fluid bed 건조제품은 8.22 log cfu/g 를 나타냈음.

이 결과에서 보듯이 분무건조는 Lactobacillus LA-5 와 Bifidobacterium BB-12 의 생존율에 불리한 결과를 초래했음. 이와 유사한 결과는 Gardinen(2000)이 paracasei NFBC-338 스타터의 분무건조에서도 관측했음. 이 경우 outlet 온도는

80-85℃에서 단지 49%의 생존율은 보임. Bifidobacterium 의 분무건조시 여러 종의 균주를 검사한Simpson(2005)의 조사에서는 fluidbed 건조에 이은 분무건조가 생존율을 크게 향상시킴.

Table 13. Effects of drying techniques on viability of probiotic cultrues

Culture level (%)	LA-5		BB-12	
	Spray dried	Fluid bed dried	Spray dried	Fluid bed dried
	Viability (log ₁₀ cfu/g)			
4	4.49	8.64	4.18	8.22
5	4.67	8.83	4.32	8.49
6	4.72	8.91	4.38	8.65
CD	0.09	0.12	0.14	0.178

LA : *Lactobacillus acidophilus*

BB : *Bifidobacterium bifidum*

라. 기능성 유산균의 생산최적화, 유산균을 이용한 펩타이드생성, 플라보노이드의 기능성

1) 건강기능성이 우수한 *Lactococcus lactis* NK34 균주의 배지 최적화

가) 사용 균주 및 배지

L. lactis NK34는 lactobacilli MRS 배지, 35℃에서 배양하여 사용하였고, 균주의 보관은 20% glycerol을 넣어 -70℃ deep freezer에서 보관하였음.

나) 균수의 측정

균수는 배양액을 0.1%(w/v) 펄톤수로 10배씩 연속적으로 희석을 시킨 다음, 평판 배지에 0.1 mL씩 분주하여 도달한 후 최적온도에서 배양하고 콜로니형성단위 (colony forming unit)를 측정하여 총균수를 계산하였음.

다) *Lactococcus lactis* NK34의 배양

L. lactis NK34는 MRS 배지, 35°C, 1%(v/v) 접종비로 300 mL 플라스크에 200 mL working volume으로 16시간 배양하였음. *L. lactis* NK34의 생육곡선은 MRS배지, 35°C, 정지배양으로 배양하였으며, 이 조건에서는 유도기는 매우 짧아 확인할 수 없었으며, 4시간까지 대수증식기를 나타내었고, 그 후 마지막 sampling 단계인 16시간까지 계속 균수가 유지되었음 (Fig. 6). 따라서, 배지 최적화를 위해 항균효과의 최대치를 나타낸 9시간을 기준으로 One factor-at-a time method로 실험하였음.

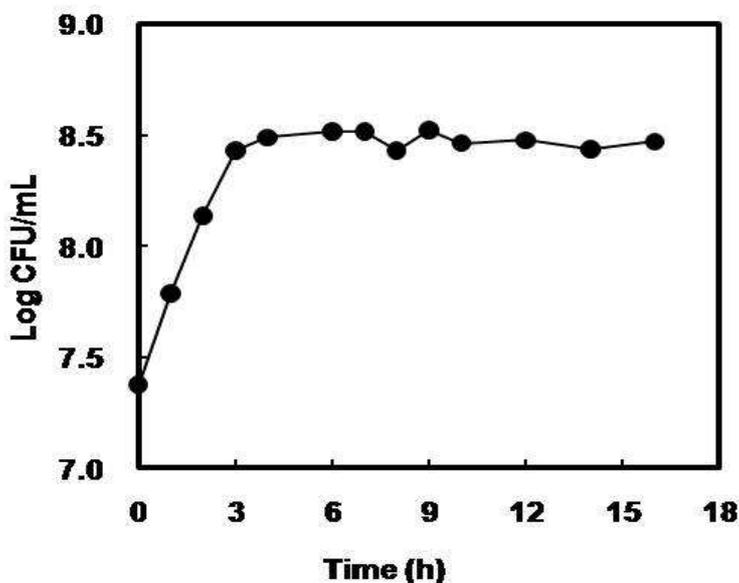


Fig. 6. Growth of *L. lactis* NK34 in lactobacilli MRS medium.

라) One factor-at-a time method에 의한 탄소원, 질소원, 무기염의 최적화

생산배지의 탄소원을 선정하기 위해 glucose, fructose, lactose, sucrose, glycerol, mannitol, maltose를 검토하였고, 1% 탄소원에 1% yeast extract로 배지를 만들어 배양하였음. 정해진 1% 탄소원에 질소원으로 tryptone, yeast extract, peptone, malt extract, beef extract를 검토하였음. 무기염으로는 0.2%의 농도로 NaCl, Tween 80, KH₂PO₄, MgSO₄, K₂HPO₄, sodium acetate를 이용하였음.

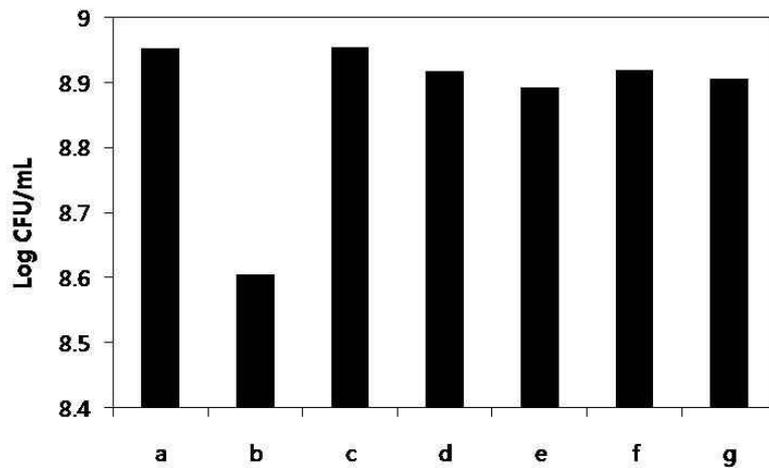


Fig. 7. Effect of carbon sources on cell growth of *L. lactis* NK34. a, glucose; b, fructose; c, lactose; d, sucrose; e, glycerol; f, mannitol; g, maltose.

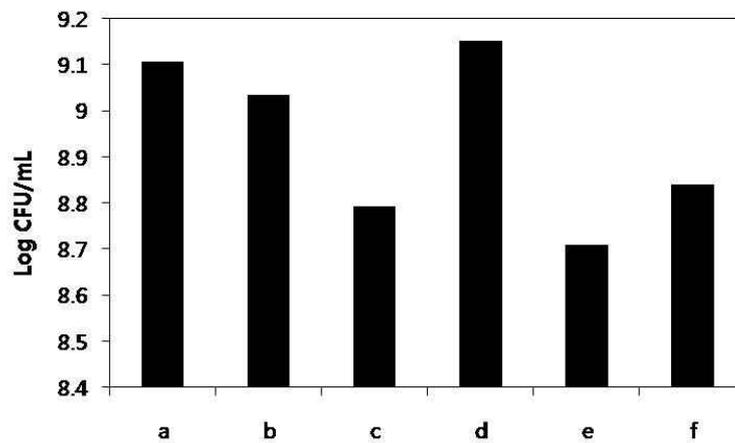


Fig. 8. Effect of nitrogen sources on cell growth of *L. lactis* NK34. a, tryptone; b, yeast extract; c, peptone; d, malt extract; e, beef extract; f, 0.5% tryptone+0.5% yeast extract.

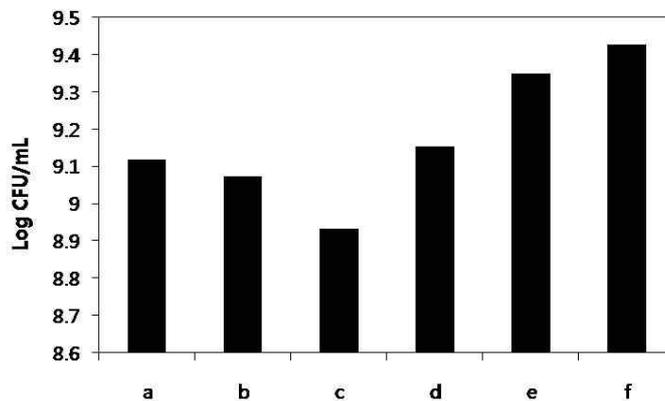


Fig. 9. Effect of salt on cell growth of *L. lactis* NK34. a, NaCl; b, Tween 80; c, KH₂PO₄; d, MgSO₄; e, K₂HPO₄; f, sodium acetate.

L. lactis NK34의 생균수는 탄소원에서 lactose > glucose > mannitol > sucrose > maltose > glycerol > fructose의 순이었으며, 질소원에서는 malt extract > tryptone > yeast extract > peptone > beef extract 순이었다 (Fig. 7, 8). 무기염의 경우는 sodium acetate > K₂HPO₄ > MgSO₄ > NaCl > Tween 80 > KH₂PO₄ 순이었음 (Fig. 9). 따라서, 유산균의 균수와 항균효과를 기준으로 6가지 요인들인, sucrose, yeast extract, tryptone, Tween 80, NaCl, sodium acetate를 선택하여 표면반응분석을 수행하였음.

마) 반응표면분석법 실험계획

선정된 배지인 탄소원, 질소원, 무기염으로 최대 활성을 나타내는 6가지 요인으로 fractional factorial design을 이용하여 실험계획을 수행하였음. 결정된 sucrose (1-2%), tryptone (0.5-1.5%), yeast extract (0.5-1%), Tween 80 (0.05-0.2%), sodium acetate (0.05-0.2%), NaCl (0.05-0.2%)를 -1, 0, 1의 세 단계로 부호화 하였음 (Table 14). 변수는 fractional factorial design에 따라 20 실험구로 구분하였으며, 이들 요인변수 (X_n)에 의해 영향을 받는 반응변수 (Y)를 회귀분석에 사용하였음. 회귀분석에 의한 모델식의 예측에는 SAS program이 사용됨.

Table 14. Levels of independent variables for experimental design

X _n	Independent variables	Levels		
		-1	0	1
X ₁	Sucrose (%)	1.00	1.50	2.00
X ₂	Tryptone (%)	0.50	1.00	1.50
X ₃	Yeast extract (%)	0.50	1.00	1.50
X ₄	Tween 80 (%)	0.05	0.10	0.20
X ₅	Sodium acetate (%)	0.05	0.10	0.20
X ₆	NaCl (%)	0.05	0.10	0.20

Sucrose (1.00-2.00%), tryptone (0.50-1.50%), yeast extract (0.50-1.50%), Tween 80 (0.05-0.20%), sodium acetate (0.05-0.20%), NaCl (0.05-0.20%)를 fractional factorial design에 따라, 3가지 수준으로 하여 실험하였음. 실험결과는 Table 15와 같이 얻어졌으며, 이 결과를 이용해 SAS를 통한 회귀분석 결과는 Table 16에 나타내었음.

Table 15. Experimental data for cell concentration under different conditions of carbon, nitrogen, and salt

No	Medium composition (%)						Cell concentration (Log CFU/mL)
	Sucrose	Tryptone	Yeast extract	Tween 80	Sodium acetate	NaCl	
1	1.0	0.5	0.5	0.05	0.05	0.05	9.08
2	2.0	0.5	0.5	0.05	0.2	0.2	9.05
3	1.0	1.5	0.5	0.05	0.2	0.05	9.31
4	2.0	1.5	0.5	0.05	0.05	0.2	9.29
5	1.0	0.5	1.5	0.05	0.2	0.2	9.29
6	2.0	0.5	1.5	0.05	0.05	0.05	9.29
7	1.0	1.5	1.5	0.05	0.05	0.2	9.33
8	2.0	1.5	1.5	0.05	0.2	0.05	9.50
9	1.0	0.5	0.5	0.2	0.05	0.2	9.23
10	2.0	0.5	0.5	0.2	0.2	0.05	9.29
11	1.0	1.5	1	0.2	0.2	0.2	9.39
12	2.0	1.5	0.5	0.2	0.05	0.05	9.38
13	1.0	0.5	1.5	0.2	0.2	0.05	9.35
14	2.0	0.5	1.5	0.2	0.05	0.2	9.37
15	1.0	1.5	1.5	0.2	0.05	0.05	9.39
16	2.0	1.5	1.5	0.2	0.2	0.2	9.50
17	1.5	1	1	0.1	0.1	0.1	9.34
18	1.5	1	1	0.1	0.1	0.1	9.34
19	1.5	1	1	0.1	0.1	0.1	9.30
20	1.5	1	1	0.1	0.1	0.1	9.36

Table 16. Regression coefficients of the second order polynomials for cell concentration of *L. lactis* NK34

Regression	DF	R-Square	F Value	Pr>F
Linear	6	0.7932	19.66	0.0062
Quadratic	2	0.0190	1.41	0.3431
Cross product	6	0.1609	3.99	0.1009
Total model	14	0.9731	10.34	0.0182

여섯 가지 조건으로 통계처리 했을 때, *L. lactis* NK34의 균체 생산에 관한 반응 회귀식은 다음과 같았음. Cell concentration (Log CFU/mL)=9.9990+0.1400X₁X₂

L. lactis NK34의 균체 농도는 회귀식의 전체 R²는 0.9731이었고, 전체모형의 유의확률(Pr>F)은 0.0182로 0.05보다 훨씬 작은 값으로 반응 모형의 유의성을 확인할 수 있었음. 그러나, 선형회귀에서만 유의성을 보였다. 요인 별로 봤을 때, tryptone, yeast extract의 유의성이 있는 것으로 나타남. 최대 생산점은 1.96% sucrose, 1.14% tryptone, 1.07% yeast extract, 0.14% Tween 80, 0.12% sodium acetate, 0.12% NaCl의 성분에서 예측치는 9.5 Log CFU/mL로 나타남.

바) 최적조건에서 생산 검증

SAS program을 통해 최고점을 얻었고, 최적화된 배지의 성분비율로 sucrose, tryptone, yeast extract, Tween 80, sodium acetate, NaCl을 이용하여 시간에 따른 균수를 확인하였으며, 예측치와 마찬가지로 9.5 Log CFU/mL를 얻을 수 있었음.

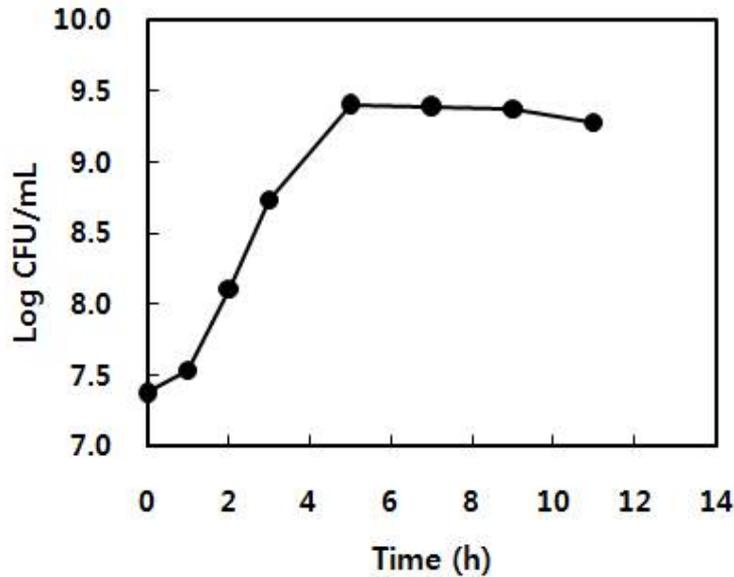


Fig. 10. Production of *L. lactis* NK34 in optimized medium.

2) 유산균을 이용한 WPC의 생물전환에 의한 펩타이드의 생성

가) ACE 저해효과

ACE 억제 활성 측정은 Je et al. (2009)의 실험방법을 변형하여 사용하였음. Rabbit lung powder를 0.3 M NaCl이 함유된 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3)에 0.1 g/mL의 농도로 현탁하고, 4°C에서 24시간 동안 효소를 추출하였음. 이것을 3,000 rpm에서 40분 간 원심분리하여 그 상등액을 ACE 조효소로 사용하였음. 기질은 hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL)을 0.3 M NaCl이 함유된 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3)에 녹여 5 mM로 만들어 사용하였음. 대조구는 시료대신 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3)를 사용함.

0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3) 100 μ L, 시료 50 μ L, ACE 조효소 50 μ L를 혼합하여 37°C에서 5분 간 예비반응 시킨 후, hippuryl-L-histidyl-L-leucine 기질 50 μ L를 가하여 37°C에서 30분간 반응시킴. 반응 후 1 N HCl 250 μ L를 첨가하여 반응을 정지시키고, ethyl acetate 1.5 mL를 가하여 15초 간 교반한 후, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리시켜 상등액 1 mL를 취하였음. 이 상등액을 100°C에서 가열하여 완전 건조시킨 뒤 증류수 3 mL를 가하여 용해시킨 후, 228 nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해효과를 계산하였으며, 계산식은 다음과 같다.

$$\text{ACE 저해율 (\%)} = (\text{대조구 흡광도} - \text{시료의 흡광도}) \times 100 / \text{대조구 흡광도}$$

나) 균주 및 배지

사용된 균주는 1차년도에 우수한 기능성을 나타낸 TCC-3, ABTF, *L. lactis* NK34를 사용하였음. 2%의 접종비로 배양하였으며, 접종 균수는 초기균수 약 10^7 CFU/mL가 되게 사용하였음. 사용된 배지는 10% Skim milk, 5% WPC+ 5% Skim milk를 이용하였다. 10% WPC의 경우 용해도 문제로 배지에서 제외시킴. 이 배지는 autoclave (121°C, 15 min)하여 사용하였음. 균주의 성장을 확인하기 위해 pH를 측정하였음.

다) 시료의 제조

생물전환된 배양액은 0, 24, 48시간에 샘플링하여 동결건조하고, 실험에서는 2.5 mg/mL의 농도로 녹여서 사용하였음.

라) 사용균주에 따른 ACE 저해효과

사용균주에 따라 실험한 결과, 10% skim milk와 5% WPC+ 5% skim milk에서 *L. lactis* NK34가 45%의 ACE 저해효과를 나타내었음. Table 17의 결과, *L. lactis* NK34가 가장 효율적으로 생물전환된 것을 확인할 수 있었음.

Table 17. ACE inhibitory effect of probiotic strains

Medium	Incubation time (h)	ACE inhibitory effect (%) (pH)		
		<i>L. lactis</i> NK34	TCC-3	ABTF
10% Skim milk	Control	15.03 (6.3)	15.03(6.3)	15.03 (6.3)
	0	15.03 (6.2)	11.72 (6.16)	14.81 (4.15)
	24	45.10 (5)	15.86 (3.97)	8.51 (3.94)
	48	45.10 (4.7)	12.41 (3.83)	7.04 (3.89)
5% WPC+5% skim milk	Control	7.58 (6.3)	7.58 (6.3)	7.58 (6.3)
	0	5.49 (6.2)	0 (6.14)	7.54 (6.10)
	24	36.86 (4.9)	0(4.03)	6.74 (4.15)
	48	46.47 (4.6)	0(3.89)	4.37 (3.96)

마) 배지 조성에 따른 *L. lactis* NK34의 ACE 저해효과

Table 18과 같이 배지 조성에 따라 ACE 저해효과를 확인하였음. 5% WPC와 5% WPC+5% Skim milk에서 가장 높은 46% ACE 저해효과를 확인할 수 있었음.

Table 18. ACE inhibitory effect of *L. lactis* NK34 as medium

Medium	Incubation time (h)	pH	Log CFU/mL	ACE inhibitory effect (%)
5% Skim milk	Control	6.5	0.00	22.45
	0	6.4	7.43	16.99
	24	4.8	8.66	38.24
	48	4.4	8.88	31.11
	72	4.4	8.88	-6.01
10% Skim milk	Control	6.3	0.00	15.03
	0	6.2	7.10	15.03
	24	5	9.01	45.10
	48	4.7	9.06	45.10
	72	4.6	8.58	13.33
5% WPC	Control	6.3	0.00	-3.73
	0	6.2	7.39	6.47
	24	4.7	8.53	46.67
	48	4.9	8.61	44.31
	72	4.9	7.92	5.49
5% WPC+5% skim milk	Control	6.3	0.00	7.58
	0	6.2	7.41	5.49
	24	4.9	7.91	36.86
	48	4.6	8.09	46.47
	72	4.6	8.17	8.82

3) 비숙성 치즈의 부가가치를 높이기 위한 플라보노이드의 항산화 활성 측정

양과, 흑미, 밀감의 플라보노이드 추출을 위해 에탄올 및 열수 추출을 수행한 결과, 추출율은 모두 10% 내외로 나타났으며, 각 추출물의 총 polyphenol 함량 측정 결과 (Table 18), 세 가지 시료 중 70% 에탄올 추출한 양과에서 추출물 1 g 당 327.5 mg로 가장 높게 측정되었음. 측정된 polyphenol 함량에 대해 추출된 flavonoid 류의 비율을 퍼센트로 환산한 결과, 에탄올 양과추출물이 약 50%로 flavonoid류 추출에도 가장 적합한 것을 알 수 있었음.

이러한 결과를 바탕으로 양과 에탄올 추출물의 항산화능을 DPPH법, Ferric thiocyanate법, TBA법으로 측정하였음.

DPPH 라디칼 흡착능 측정결과, 양과 에탄올 추출물이 열수 추출물에 비해 약 1.4배 높은 흡착능을 보였으며 (Table 19), 지질의 과산화 정도를 비색법으로 측정하는 FTC test법에 의한 항산화능 측정결과, 시료 무첨가 구인 메탄올은 반응 시간이 지남에 따라 꾸준히 흡광도가 증가한 반면, 에탄올 및 열수 추출 처리군은 반응 4일까지 약 0.1정도의 낮은 흡광도를 보였음(Fig. 11). 하지만 DPPH법에 의한 결과와는 달리 에탄올 및 열수 추출에 유의차는 없었음.

지질산화의 최종산물인 malonaldehyde를 비색정량한 TBA법의 결과 (Fig. 12), positive control인 BHT가 40%의 활성을 나타낸 반면, 에탄올 양과 추출물은 13%로 낮은 활성을 보였으며, 열수 추출물은 이보다 더 낮은 4.5%의 활성을 보였음. 이러한 결과는 양과 추출물이 지질산화의 마지막 단계인 malonaldehyde형성까지의 영향을 미치지 못하는 것으로 사료됨.

본 연구는 비숙성 치즈에 적합한 플라보노이드를 탐색하여 양과 추출물에 대한 항산화 활성을 측정한 결과 에탄올 추출이 가장 적합한 추출법임을 알 수 있었음.

Table 18. 에탄올, 열수 추출물의 고형분, 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량

Materials	Extraction	Solids contents (%)	The ratio of total flavonoid to total polyphenols content (%)
Onion peels	Ethanol	4.46±0.2	49.38±2.13
	Hot water	8.31±1.20	45.19±2.06

Table 19. 에탄올, 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 측정

Materials	Extraction	DPPH radical scavenging activity (%)
BHT	Positive control	89.72±2.03
Onion peels (0.2 mg/mL)	Ethanol	72.25±2.74
	Hot water	49.68±1.55

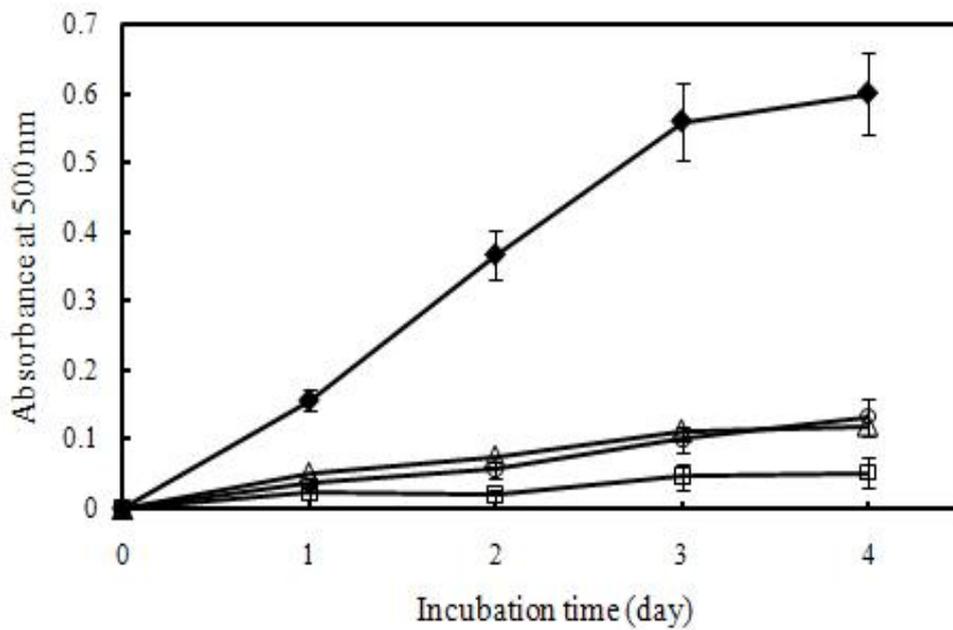


Fig. 11. FTC test법에 의한 양파 추출물의 항산화 측정결과. Methanol (◆), BHT (□), ethanolic extraction (△), hot water extraction (○).

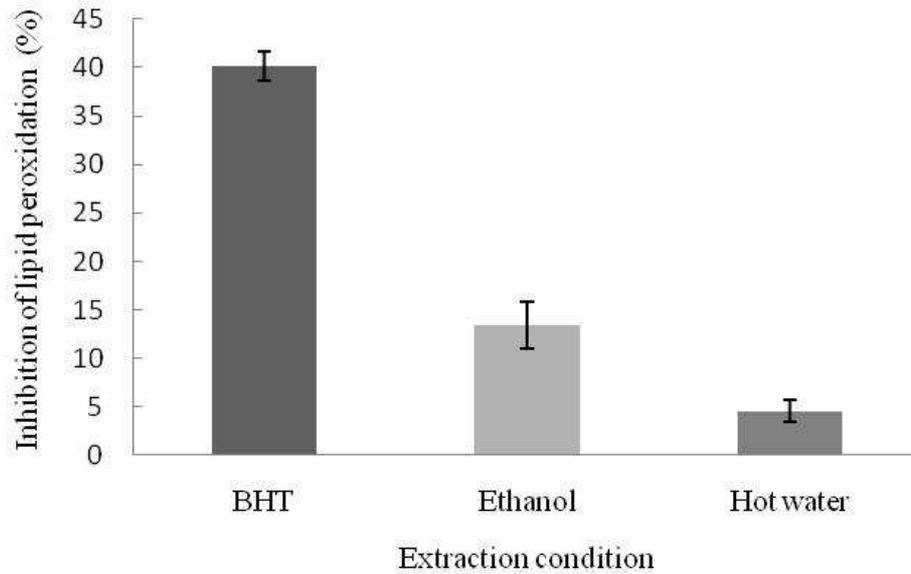


Fig. 12. TBA법에 의한 양과 추출물의 항산화 측정결과.

마. WPC 가수분해물의 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통한 고혈압 저하 활성 평가

1) *In vitro*의 WPC 가수분해물의 ACE 저해활성 분석

여러 가지 효소를 이용하여 WPC를 가수분해한 시료의 ACE (Angiotensin converting enzyme) 저해활성 분석 결과를 Fig 1에 나타내었다. 가장 좋은 활성을 나타낸 것은 Protease S와 Pepsin이 96%의 억제력을 보였으며 M이 89%, Alcalase와 Trypsin이 각각 86%, 68%로 나타났다. 따라서 본 연구의 결과 모든 WPC 가수분해물에서 ACE 저해활성이 50% 이상인 것으로 나타났으며, WPC 가수분해물이 혈압 강하에 효과적일 것으로 사료된다.

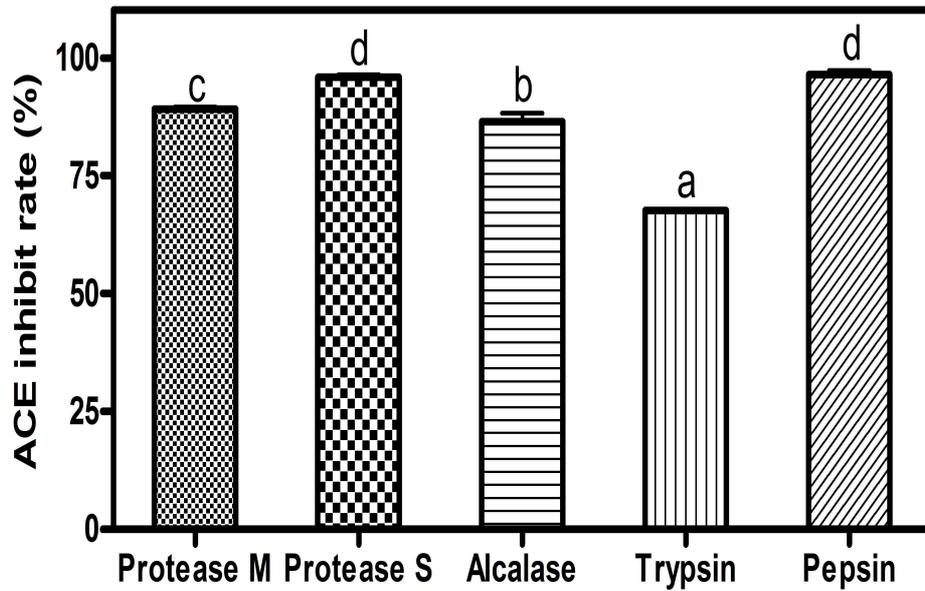


Fig. 1. ACE inhibitory activity of various WPC hydrolysates
 Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

2) SHR 모델을 이용한 WPC 가수분해물의 고혈압 강화효과

가) 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율에 미치는 영향

실험기간 중 체중증가량 및 평균 식이섭취량과 식이효율에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 1).

Table 1. Effects of various WPC hydrolysates on Body weight gains, Food intake and FER in SHR rats

	Body weight gain (g)	Food intake (g/day)	FER (%)
WKY ¹⁾	131.3±9.0 ^{ns3)}	15.5±0.4 ^{ns}	0.11±0.03 ^{ns}
SHR	128.0±5.7	16.3±0.2	0.12±0.01
WPC	123.4±9.7	15.5±0.3	0.13±0.01
Protease M	123.4±6.4	15.4±0.2	0.13±0.01
Protease S	133.0±3.9	16.0±0.3	0.14±0.00
Trypsin	127.0±5.0	15.7±0.1	0.10±0.01

¹⁾WKY: Normal control group (Wistar kyoto rat), SHR: Hypertension group (Spontaneous hypertension rat), WPC: SHR + WPC, Protease M: SHR +WPC hydrolysates used protease M, Protease S: SHR + WPC hydrolysates used protease S, Trypsin: SHR + WPC hydrolysates used trypsin

²⁾Mean±SE.

³⁾ns: not significant

나) 장기무게에 미치는 영향

실험식이 섭취가 SHR의 체중 100g당 조직의 무게에 미치는 영향은 Table 2에 나타내었다. 간, 신장, 심장, 대동맥의 무게에서는 각 군 간의 유의적 차이를 나타내지 않았으며, 비장무게에서는 WKY군에 비해 SHR군의 무게가 유의적으로 증가한 것으로 나타났으며, 실험식이를 보충섭취한 군에서는 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 2. Effects of various WPC hydrolysates liver, heart, spleen and kidney in SHR rats

(g/100g B.W)

	Liver	Kidney	Heart	Aorta	Spleen
WKY ¹⁾	8.00±0.66 ^{2)ns3)}	1.98±0.08 ^{ns}	1.17±0.11 ^{ns}	0.09±0.01 ^{ns}	0.51±0.03 ^{a4)}
SHR	8.48±0.20	1.81±0.23	1.16±0.02	0.13±0.02	0.58±0.01 ^b
WPC	8.14±0.29	1.92±0.09	1.14±0.05	0.11±0.02	0.56±0.03 ^{ab}
Protease M	7.64±0.21	1.82±0.05	1.11±0.04	0.10±0.02	0.56±0.03 ^{ab}
Protease S	8.10±0.16	1.94±0.04	1.17±0.02	0.13±0.01	0.55±0.01 ^{ab}
Trypsin	8.06±0.21	1.90±0.03	1.13±0.02	0.14±0.02	0.54±0.01 ^{ab}

¹⁾WKY: Normal control group (Wistar kyoto rat), SHR: Hypertension group (Spontaneous hypertension rat), WPC: SHR + WPC, Protease M: SHR +WPC hydrolysates used protease M, Protease S: SHR + WPC hydrolysates used protease S, Trypsin: SHR + WPC hydrolysates used trypsin

²⁾Mean ± SE.

³⁾ns: not significant

⁴⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

다) WPC 가수분해물이 혈압강화에 미치는 영향

WPC 가수분해물의 보충섭취 전과 후의 혈압을 비교한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 실험식이를 섭취 전에는 각 그룹간의 유의적 차이를 보이지 않았으나, 9주 동안 실험식이를 보충 섭취한 결과, WKY군이 130 mmHg인 것에 비해 SHR군에서는 223.8 mmHg로 약 58% 혈압이 증가한 반면 WPC군은 SHR군에 비해 24%, Protease군은 34%, Protease S군은 36%, Trypsin군에서는 44% 혈압상승을 억제하는 것으로 나타났다. 본 연구결과 WPC 자체의 보충섭취 보다는 WPC를 가수분해한 물질을 보충섭취 하였을 경우 혈압강화에 효율적인 효과를 보이는 것으로 나타났다.

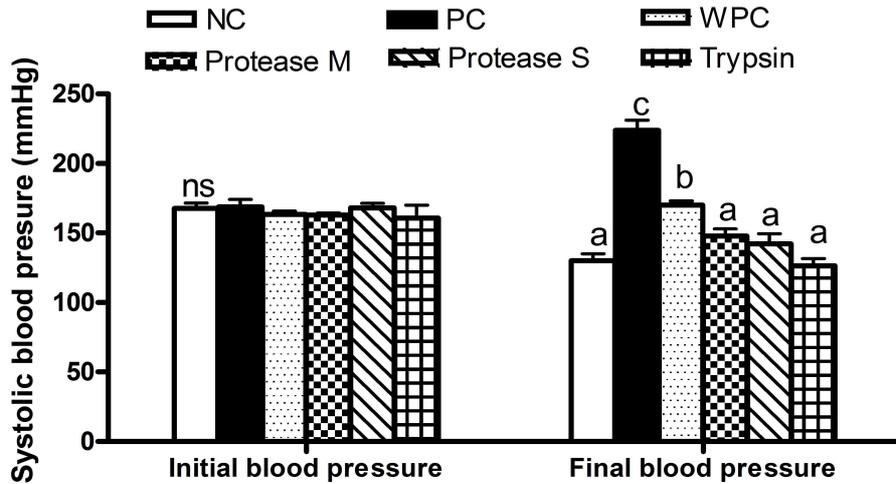


Fig. 2. Effect of various WPC hydrolysates supplementation on systolic blood pressure in SHR

WKY : Normal control group (Wistar kyoto rat, WKY)
 SHR : Hypertension group (Spontaneous hypertension rat, SHR)
 WPC: Hypertension + WPC
 Protease M : Hypertension + WPC hydrolysates used protease M,
 Protease S : Hypertension + WPC hydrolysates used protease S
 Trypsin : Hypertension + WPC hydrolysates used trypsin
 Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

라) WPC 가수분해물 보충섭취가 혈압의 변화에 미치는 영향

각각의 실험식이를 보충 투여하는 동안 1주일에 한 번씩 혈압측정 결과를 Fig 3에 나타내었다. WKY에서는 0주에서 4주까지는 유의적 차이를 나타내지 않았고 8주차에서 2주차에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였으며 9주차에서는 유의적으로 감소하는 결과를 나타내었다. 그에 반해 SHR군에서는 4주 이후 혈압이 상승하는 경향을 보였으며, 8주차에서는 혈압의 상승정도가 유의적으로 증가하였으며 그 수준은 9주차에서 지속되는 것으로 나타났다. WPC군에서는 3주차에 비해 4주차에서 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으나 9주차에서 4주차 혈압에 비해 상승하는 것으로 나타나 지속적인 투여에는 효과가 다소 감소하는 것으로 나타났으며, Protease M군에서는 2주차에서 다소 증가하는 경향을 보였으나 유의적이지는 않았으며 3주차부터 감소하는 경향을 보였으며 이는 9주차까지 지속적으로 유지되는 경향을 보였다. Protease S에서는 0주차에 비해 4주차부터 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며 9주차에서 그 효과는 0주차에 비해 유의적으로 감소함으로써 확실한 효과를 보였다.

Trypsin군에도 4주차까지는 혈압상승 억제효과를 보였으며 5주차부터 감소효과를 보이며 9주차에서는 통계적 유의성을 나타내었다. 이 결과 SHR군에서는 혈압이 점차 증가하는데 반해 WPC 및 WPC 가수분해물을 보충 투여 하였을 때는 혈압상승을 억제 또는 강하하는 효과를 가지는 것으로 나타났다.

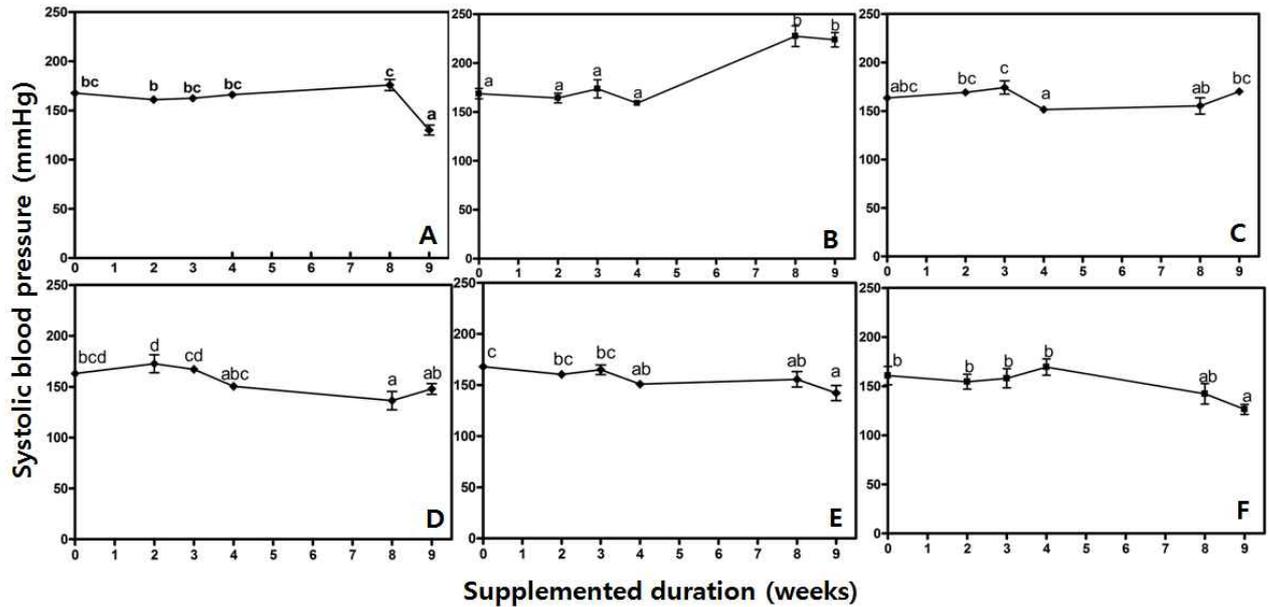


Fig. 3. Change in systolic blood pressure of SHR after supplementation of various WPC hydrolysates diet for 10 weeks.

- A: Normal control group (Wistar kyoto rat, WKY), WKY
 - B: Hypertension group (Spontaneous hypertension rat, SHR), SHR
 - C: Hypertension + WPC, WPC
 - D: Hypertension + WPC hydrolysates used protease M, Protease M
 - E: Hypertension + WPC hydrolysates used protease S, Protease S
 - F: Hypertension + WPC hydrolysates used trypsin, Trypsin
- Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

마) WPC 가수분해물 보충섭취가 혈중 지질 농도에 미치는 영향

다양한 WPC 가수분해물을 보충 섭취한 SHR의 혈중 지질을 측정된 결과는 Table 3에 나타내었다. TG의 농도는 WKY와 SHR 사이의 유의적 차이는 없었으나 SHR군에서 다소 낮은 경향을 보였으며, WPC, Protease M, Protease S군에서 유의적 차이를 보이지 않았다. 그에 반해 Trypsin군은 WKY군과 같은 수준의 농도를 나타내었다. TC와 HDL, LDL 콜레스테롤의 농도는 WKY에 비해 SHR를 비롯한 모든 실험식이군에서 유의적으로 낮게 나타났으며 실험식이 보충섭취군 간의 차이는 없었다. GOT 농도는 WKY군에 비해 SHR군에서 유의적으로 높은 결과를 보였으며 Protease S와 Trypsin군에서 WKY군과 같은 유의적 수준으로 감소시키는 탁월한 효과를 보였다. GPT의 분석

결과에서는 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 3. Effects of various WPC hydrolysates on lipid profiles in SHR rats

	T G (mg/dL)	T C (mg/dL)	H D L (mg/dL)	L D L ⁵⁾ (mg/dL)	G O T (U/I)	G P T (U/I)
WKY ¹⁾	82.8 ± 7.6 ^{2) b3)}	95.8 ± 6.9 ^b	41.0 ± 2.8 ^b	38.2 ± 7.0 ^b	106.25 ± 4.2 ^a	41.00 ± 2.9 ^{ns4)}
SHR	74.7 ± 4.3 ^{ab}	49.0 ± 2.3 ^a	25.0 ± 1.6 ^a	9.1 ± 1.2 ^a	142.50 ± 11.5 ^b	40.17 ± 2.0
WPC	78.9 ± 5.8 ^b	49.6 ± 5.4 ^a	25.4 ± 1.9 ^a	8.4 ± 3.3 ^a	134.60 ± 6.5 ^b	43.80 ± 3.6
Protease M	82.0 ± 5.4 ^b	48.2 ± 2.1 ^a	22.4 ± 0.9 ^a	9.4 ± 1.9 ^a	122.10 ± 9.9 ^{ab}	45.40 ± 1.7
Protease S	78.8 ± 4.4 ^b	55.8 ± 6.7 ^a	22.2 ± 0.8 ^a	17.8 ± 6.8 ^a	110.80 ± 1.9 ^a	40.40 ± 0.7
Trypsin	62.3 ± 1.5 ^a	51.2 ± 2.0 ^a	26.8 ± 1.7 ^a	11.9 ± 1.2 ^a	106.33 ± 3.7 ^a	48.33 ± 3.4

¹⁾WKY: Normal control group (Wistar kyoto rat, WKY), SHR: Hypertension group (Spontaneous hypertension rat, SHR), WPC: Hypertension + WPC, Protease M: Hypertension + WPC hydrolysates used protease M, Protease S: Hypertension + WPC hydrolysates used protease S, Trypsin: Hypertension + WPC hydrolysates used trypsin

²⁾Mean ± SE.

³⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

⁴⁾Ns means not significant

⁵⁾LDL(Friedewald's analysis) = TC - (HDL + TG/5)

바) WPC 가수분해물 보충섭취가 혈중 지질과산화 및 총항산화능에 미치는 영향

혈장의 지질과산화(Conjugated Dienes, CD)와 총항산화력(Total radical trapping antioxidant potential, TRAP) 분석 결과는 table 4에 나타내었다. TRAP 측정법은 혈장 내 a-tocopherol, ascorbate, urate, protein sulfhydryl groups 등의 항산화제들의 복합된 활성을 측정하여 혈장의 총 유리기 포집 항산화능을 측정하는 방법으로 본 연구에서는 각 그룹간의 유의적 차이를 나타내지 않았다. CD는 산화적 스트레스로 인한 혈장 내 초기 과산화 상태에서 생성되는 물질로써 대표적인 지질과산화물이다. 본 연구의 결과에서는 각 군 간의 유의적 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다.

Table 4. Effects of various WPC hydrolysates on total antioxidant capacity (TRAP) and lipid peroxidation (CD) status in SHR rats

	TRAP (mM)	CD (mM)
WKY ¹⁾	1.21 ± 0.00 ^{2)ns3)}	4.02 ± 0.38 ^{ns}
SHR	1.23 ± 0.01	3.82 ± 0.08
WPC	1.06 ± 0.14	4.38 ± 0.26
Protease M	1.02 ± 0.17	4.10 ± 0.23
Protease S	1.20 ± 0.03	3.93 ± 0.14
Trypsin	1.22 ± 0.01	4.16 ± 0.11

¹⁾WKY: Normal control group (Wistar kyoto rat, WKY), SHR: Hypertension group (Spontaneous hypertension rat, SHR), WPC: Hypertension + WPC, Protease M: Hypertension + WPC hydrolysates used protease M, Protease S: Hypertension + WPC hydrolysates used protease S, Trypsin: Hypertension + WPC hydrolysates used trypsin

²⁾Mean ± SE.

³⁾Ns means not significant

사) WPC 가수분해물 보충섭취가 적혈구 항산화효소활성에 미치는 영향

식이로 섭취하는 항산화제와 마찬가지로 체내 존재하는 catalase와 GSH-Px와 같은 항산화 효소체계는 체내 항산화 능력을 좌우하는 중요한 인자라고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 WPC 가수분해물의 보충섭취가 체내 항산화 체계에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 적혈구의 catalase와 GSH-Px 분석을 시행하였다. (Table 5) 분석결과, catalase 농도에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. GSH-Px 농도는 WKY와 SHR, WPC, Protease S군 사이의 유의적 차이가 없는 것으로 나타났으며, Protease M과 Trypsin군에서는 SHR군에 비해 유의적으로 낮은 활성을 가지는 것으로 나타났다. 이는 Protease M과 Trypsin을 이용한 WPC 가수분해물 자체의 항산화물질이 산화적 스트레스를 직접적으로 방어하는 기전으로 혈액 내 항산화체계에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Table 5. Effects of various WPC hydrolysates on erythrocyte antioxidant enzyme status (catalase and GSH-Px) in SHR rats

	Catalase (K/g Hb)	GSH-Px (U/g Hb)
WKY ¹⁾	1652.44 ± 168.70 ^{2)ns3)}	109.01 ± 11.06 ^{ab4)}
SHR	2095.26 ± 181.53	143.34 ± 11.86 ^b
WPC	2064.46 ± 245.04	142.14 ± 17.12 ^b
Protease M	1548.15 ± 179.27	94.20 ± 8.77 ^a
Protease S	2089.39 ± 364.83	150.81 ± 25.09 ^b
Trypsin	1503.12 ± 149.08	96.73 ± 10.59 ^a

¹⁾WKY: Normal control group (Wistar kyoto rat, WKY), SHR: Hypertension group (Spontaneous hypertension rat, SHR), WPC: Hypertension + WPC, Protease M: Hypertension + WPC hydrolysates used protease M, Protease S: Hypertension + WPC hydrolysates used protease S, Trypsin: Hypertension + WPC hydrolysates used trypsin
²⁾Mean ± SE.
³⁾Ns means not significant
⁴⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

아) WPC 가수분해물 보충섭취가 백혈구의 DNA 손상도에 미치는 영향

9주간 5% SHR에 WPC 가수분해물을 보충 투여 시 유전독성에 대한 영향을 알아보기 위하여 comet assay를 이용하여 백혈구의 DNA 손상정도를 분석하였다.(Table 6) Tail DNA는 WKY와 SHR 사이에 유의적 차이가 나타나지 않았으며 WPC군을 비롯한 WPC 가수분해물을 보충 투여 시에도 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Tail length에서는 WKY군과 SHR군 사이의 차이는 보이지 않았으며, SHR군과 실험식이 섭취군들 사이에도 유의적 차이를 나타내지 않았다. 그러나 WKY와 Protease M과 Protease S, Trypsin군 사이에서 유의적 차이를 보였으며 그 수준은 WKY에 비해 Protease M과 Protease S, Trypsin군에서 낮은 결과를 보였다.

Table 6. Effects of various WPC hydrolysates on leukocytes DNA damage in SHR rats

	Tail DNA (%)	Tail Moment	Tail Length (mm)
WKY ¹⁾	7.09±0.68 ^{2)ab3)}	1.48±0.23 ^{ab}	14.88±1.31 ^c
SHR	7.42±0.23 ^{ab}	1.56±0.10 ^{ab}	12.42±0.32 ^{abc}
WPC	8.06±0.73 ^b	2.32±0.32 ^c	13.96±0.97 ^{bc}
Protease M	7.30±0.65 ^{ab}	1.58±0.27 ^b	12.24±1.08 ^{ab}
Protease S	7.02±0.46 ^{ab}	1.42±0.12 ^{ab}	11.66±0.58 ^{ab}
Trypsin	5.92±0.34 ^a	0.92±0.06 ^a	10.83±0.22 ^a

¹⁾WKY: Normal control group (Wistar kyoto rat, WKY), SHR: Hypertension group (Spontaneous hypertension rat, SHR), WPC: Hypertension + WPC, Protease M: Hypertension +WPC hydrolysates used protease M, Protease S: Hypertension + WPC hydrolysates used protease S, Trypsin: Hypertension + WPC hydrolysates used trypsin

²⁾Mean±SE.

³⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

자) WPC 가수분해물 보충섭취가 신장의 DNA 손상도에 미치는 영향

고혈압은 신장의 RAS (Rennin angiotensin system) 기전에 의해 영향을 받으며 이는 신장조직의 세포에도 영향을 미칠 것으로 생각되어진다. 따라서 본 연구에서는 신장조직의 DNA 손상정도를 분석하였으며, 그 결과를 Table 7에 나타내었다. Tail DNA는 WKY에 비해 SHR군에서 유의적으로 손상정도가 증가하였으며 WPC, Protease M, Protease S, Trypsin군에서 SHR보다 손상정도가 유의적으로 감소하였으며 Protease S군과 Trypsin군에서 손상정도가 가장 적은 것으로 나타났다. 이 결과는 tail moment와 tail length에서도 같은 경향을 보였으며 Trypsin군에서 DNA 손상정도가 SHR에 비해 유의적으로 가장 낮은 것으로 나타났다. 본 연구의 결과 Trypsin을 이용한 WPC 가수분해물의 보충섭취가 항유전독성에 탁월한 효과를 나타내는 것으로 나타났다.

Table 7. Effects of various WPC hydrolysates on kidney tissue DNA damage in SHR rats

	Tail DNA (%)	Tail Moment	Tail Length (mm)
WKY ¹⁾	13.57 ± 2.23 ^{2)ab3)}	12.05 ± 2.64 ^{cd}	55.02 ± 9.54 ^c
SHR	18.35 ± 1.08 ^c	14.47 ± 1.04 ^d	47.24 ± 2.93 ^{bc}
WPC	14.33 ± 0.96 ^b	8.93 ± 1.45 ^{bc}	34.46 ± 5.40 ^{ab}
Protease M	12.50 ± 0.68 ^{ab}	8.73 ± 1.41 ^{bc}	38.34 ± 4.59 ^{ab}
Protease S	10.17 ± 1.36 ^a	7.13 ± 0.90 ^{ab}	33.99 ± 3.89 ^{ab}
Trypsin	9.71 ± 0.53 ^a	3.79 ± 0.52 ^a	24.24 ± 2.28 ^a

¹⁾WKY: Normal control group (Wistar kyoto rat, WKY), SHR: Hypertension group (Spontaneous hypertension rat, SHR), WPC: Hypertension + WPC, Protease M: Hypertension + WPC hydrolysates used protease M, Protease S: Hypertension + WPC hydrolysates used protease S, Trypsin: Hypertension + WPC hydrolysates used trypsin

²⁾Mean ± SE.

³⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

차) 결론

WPC 및 여러 가지 효소를 이용한 WPC 가수분해물을 이용하여 혈압강하효과를 분석하기 위하여 시료의 ACE 억제력을 분석한 결과, 표준물질에 비해 Protease M이 억제력이 가장 높은 것으로 나타났으며, 그 다음으로 S와 WPC의 억제력이 높은 것으로 나타났다. In vitro 모델에서 ACE 활성 억제에 효과가 있는 시료를 선택하여 본태성고혈압 모델인 SHR을 이용하여 10주간 보충투여를 실시하였다. 그 결과, 체중 및 식이효율에서는 유의적 차이가 없었으며, 장기무게에서도 유의적 차이를 보이지 않았다. 비장의 무게에서 SHR군에서 유의적으로 높은 수치를 보였으나 실험식을 섭취한 군에서는 통계적 유의성이 없는 것으로 나타났다. 이는 고혈압이 비장의 무게에 영향을 미치는 것으로 사료되어 진다. 처음 혈압과 마지막 혈압을 비교하였을 때, 처음 혈압에서는 군별 유의성이 없는 것으로 나타난 반면, 마지막 혈압에서는 SHR군에서 가장 높은 수치를 나타내었으며, WPC, Protease M, Protease S, Trypsin군에서는 SHR군에 비해 유의적으로 낮은 수치를 보였다. 뿐만 아니라 WPC군이 비해 가수분해물들이 효과가 월등했으며 WKY과 같은 수준을 나타내었다. 주별 혈압의 변화를 분석한 결과, WKY군에서는 유의적 차이를 보이지 않았으나 SHR군에

서는 점차적인 혈압 상승 경향을 보인 반면, 실험식이를 섭취하였을 때는 혈압이 유지(WPC, Protease M)되거나 강하(Protease S, Trypsin)되는 효과가 있는 것으로 나타났다. 혈중 지질양상 분석 결과, GOT 농도는 WKY군에 비해 SHR군에서 유의적으로 높은 결과를 보였으며 Protease S와 Trypsin군에서 WKY군과 같은 유의적 수준으로 감소시키는 탁월한 효과를 보였다. 항유전독성에 대한 결과는 신장의 DNA 손상 정도 분석에서 WKY군에 비해 SHR군에서 손상정도가 증간한데 반해 실험식이를 보충 섭취 하였을 경우, 손상정도가 감소하는 것을 알 수 있었다.

따라서 본 연구의 결과, WPC 가수분해물을 이용한 기능성 음료가 개발된다면 보충섭취 시 혈압강하 효과뿐만 아니라 체내 항유전독성에도 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다.

제 3 절 기능성 유청음료의 ACE 저해활성 및 동물실험을 통한 고혈압 억제 활성 평가

1. 연구내용 및 범위

본 연구에서는 한외여과를 통해서 성공적으로 획득한 유청단백질(WPC-35)을 가수분해하여 생리활성펩타이드를 함유하는 것으로 나타낸(Chaturika, 김 2011) 트립신 가수분해물을 소재로 한 기능성음료를 개발하였음. 또한 치즈소비가 확대됨에 따라 이로부터 얻어지는 유청의 부가가치를 높이는 방안으로써(Zadow 1984) 또 하나의 음료가 개발되었음. 개발한 유청단백질 가수분해물을 이용한 음료와 유청을 원료로 한 유청음료의 품질과약 및 이 제품의 유통기간 설정, 기간중의 품질변화를 과약, 음료의 고혈압억제효과를 비롯한 생리활성을 조사하는데 본 연구의 목적이 있음.

2. 연구내용 및 방법

가. 연구내용

- 1) ACE 저해 효과있는 펩타이드의 음료 배합비 결정
- 2) 플라보노이드의 생산최적화
- 3) 기능성 건강음료의 실험실적 제조 및 파일로트 플랜트에서 생산
- 4) 인스턴트 건강음료믹스의 제조
- 5) 기능성 유청음료의 미생물학적 검사와 유통기한 설정
- 6) 유청음료의 ACE 저해활성 평가
- 7) 식이 제조 및 본태성 고혈압 쥐 (SHR) 사육
- 8) 혈압 측정
- 9) 생화학적 검사
- 10) 혈장, 대동맥, 신장의 ACE 활성 측정
- 11) 데이터 분석 및 보고서 작성

나. 연구방법

1) 공시재료

한외여과를 이용하여 획득하여 분무 건조된 단백질함량 35%의 WPC의 트립신 가수분해물은 재조합된 분무건조된 음료의 기초 물질로써 사용하였음.

2) 음료의 제조위한 WPC 35 음료의 재조합

단백질함량 35%의 WPC의 트립신 가수분해물은 여러 수준의 단백질함량을 갖는 음료로 재조합하여 적절한 단백질함량을 조사하였음. 첨가되는 물질로는 설탕, 구연산, 향료, 색소 와 함께 ABT strains(Bifidobacterium longum, S. thermophilus 와 Lactobacillus acidophilus)이었다. WPC 가수분해물과 Probiotic를 함유한 재조합된 음료믹스를 얻기 위한 가공공정을 최적화 하였음.

3) 유청 단백질 농축물과 유청에서 제조한 기능성 건강음료의 분석

가) 유청 단백질 농축물을 이용한 기능성 건강음료와 유청음료의 분석

나) 수분, 총 고형분 (moisture & total solid), 회분(ash), 유당은 A.O.A.C(1990 1995) 방법에 따라 측정하였음.

다) 단백질(Crude protein) 측정은 A.O.A.C(1990) 방법에 따라 micro-Kjeldahl 방법으로 단백질함량을 산출하였음.

라) NPN(Non Protein Nitrogen) 은 NPN은 Lorry 등(1951)의 방법에 의해 측정하였음.

마) 지방(fat)의 측정은 Rose-Gottlieb 방법에 따라 실시함.

바) 젖산(lactic acid)과 Galactose 함량은 Boehringer Mannheim 사의 효소적방법에 의해 실시함.

사) Glucose 함량은 Glucose가 hexokinase 와 ATP에 의해 Glucose-6-p 를 거쳐서 Glucose-6-9 dehydrogenase 와 NAD 에 의해 gluconat-6-p 로 산화되는 효소반응에 의거하여 산출함.

아) 적정산도(Titration Acidity test)는 중화적정법에 의해 산출하였음.

자) pH 측정은 pH meter(Mettler-Toledo GmbH 8603 Schwerzenbach Switzeland, Seven Easy, China)를 사용하여 측정하였음.

차) Bulk density 측정은 시료의 무게를 측정후 메스실린더에 무게를 측정한 시료를 넣고 측정함.

카) 비중 측정은 비중은 비중계를 사용하여 표준방법에 의해 실시하였음.

타) 점도는 Ioanna 등의 방법에 따라 Brookfield Viscometer (LV DV-II+ Brookfield Eng Labs Inc.USA)로 측정하였음.

파) Angiotensin Converting Enzyme 저해효과 (ACE-inhibitory activity) 측정은 Cushman과 Cheung(1971)의 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였음.

과) 유산균수 측정은 Standard method(APHA, 1995)에 의해 Plate count agar with bromo cresol purple을 사용하였음.

하) 관능검사 (Sensory evaluation)는 풍미, 맛, 색도, 전체적인 기호도의 4항목을 평가하였으며, 10점 척도법(1:매우 나쁨, 10:매우 좋음)을 사용하였음.

4) 통계분석

통계분석은 SAS program (Statistics Analytical System, USA, 1999)의 GLM(General Linear Model) procedure를 통하여 분석하였고, 처리구간의 평균간

비교는 다중범위 검정 (Duncan's multiple range test)을 통하여 유의성 검정 ($p < 0.05$)을 실시하였음.

- 5) WPC 및 WPC 가수분해물에 대한 ACE 활성 억제력을 검증하였음.
- 6) WPC 및 WPC 가수분해물의 혈압강하효과를 검증하기 위해 혈압을 측정 하였음.
- 7) *In vitro* 분석에서 효과가 있었던 시료를 선별하여 6주간 보충투여 후 희생시켰으며, 동물의 혈액과 각종 장기를 채취하여 보관하였음.
- 8) 혈장 내 지질 분석을 위하여 혈장 중의 총콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, GOT, GPT를 분석하였음.
- 9) 혈장에서 과산화지질 및 총항산화력 측정을 측정하였음.
- 10) 백혈구 내 DNA 손상의 측정, 신장세포의 DNA 손상정도를 분석 하였음.
- 11) 적혈구 내 항산화효소 활성 분석을 실시하였음.
- 12) SPSS-PC+ package를 사용하여 통계 처리 하였음.

3. 연구 결과

가. 유청 단백질 농축물을 이용한 기능성 건강음료

- 1) 유청단백질가수분해물을 주 원료로 사용한 기능성 건강음료의 생산에 필요한 소재의 배합비결정

2차년도 실험에서 생리활성 펩타이드를 함유한 것으로 나타낸 트립신 가수분해물을 (HWPC) 주된 원료로 사용했다. 복합시스템에서 ACE 저해효과 있는 펩타이드의 음료배합비를 결정하기 위해 가수분해하지 않은 WPC 첨가한 시료와 구분했고 가수분해물을 첨가한 시료는 프로바이오틱스를 첨가한 시료와 첨가하지 않은 시료로 구분함. WPC 첨가량은 이 배합비에서 음료를 제조했을 때 단백질 함량 1.0 %를 기준으로했음.

WPC 또는 HWPC를 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가하여 혼합한 배합비는 Table 1 에 나타내었다. WPC-35를 첨가한 Placebo의 배합비(%)는 WPC, 설탕, 구연산, 향료, 색소는 각각 28.6, 69.4, 1.6, 0.2, 0.2로, 가수분해 된 WPC를 첨가한 Sample 1의 배합비(%)는 WPC-35를 첨가한 Placebo의 배합비와 동일하게 하였으며, WPC를 가수분해한 WPC로 첨가하였음. 가수분해 된 WPC와 설탕, 구연산, 향료, 색소에 활생균을 첨가한 Sample 2의 배합비(%)는 28.6, 69.3, 1.6, 0.2, 0.2, 0.1로 제조하였음.

Table 1. Compositions of health beverage using whey protein

	Placebo	Sample 1	Sample 2
WPC	28.6	0.0	0.0
HWPC	0.0	28.6	28.6
설탕	69.4	69.4	69.3
구연산	1.6	1.6	1.6
향료	0.2	0.2	0.2
색소	0.2	0.2	0.2
프로바이오틱스	0.0	0.0	0.1
Total	100.0	100.0	100.0

2) 재조합된 음료의 화학적조성

음료의 배합비 결정에는 다음 요소를 고려함.

3) 음료의 당/산도 비율에 따른 기호도 효과

음료에서 당과 산도의 비율은 소비자기호에 큰 영향을 끼치는 요소이다. 본 연구에서 개발된 음료에서 당 과 산도 비율은 43%로서 이보다 감소될수록 기호도는 저하되었음. 설탕의 일부를 액상과당으로 치환했을 때 기호도를 높일 수 있었음. 당도가 높아 질수록 소비자 선호도는 일반적으로 높아지는 경향을 나타내었으나 탄산음료와 비교하여 건강효과를 차별화 시키기위해 당 함량을 일정수준으로 제한함.

4) 가수분해된 WPC로부터 제조한 음료의 침전물형성에 대한 안정제의 효과

단백질 함량을 0.50, 1.0, 1.5 및 2.0%로 변화시킨 가수분해된 WPC 음료에 유화안정제로 사용한 almax, 검류와 카르기난 혼합제제의 양을 달리하여 첨가하였음. 저장기간 동안 육안으로 관찰한 침전결과는 table 2에서 볼 수 있음. 단백질 함량이 0.5-2.0%로 증가했을 때 침전물은 뚜렷이 증가했음. 그러나 0.05-2.0의 안정제를 첨가했을 때 침전물을 형성하는 정도가 감소하였고 음료의 단백질함량이 0.05와 1.0%일 때는 침전물이 생기지 않았음. 단백질함량 1%와 안정제의 함량이 0.15%로 제조된 음료는 다른 배합과 비교하여 조직형성이 가장 양호한 결과를 나타냄.

Table 2. Effect of stabilizer on sedimentation of beverage prepared from HWP

Stabilizer (%)	Protein (%)			
	0.5	1.0	1.5	2.0
Extent of sedimentation				
0.05	+	+	+ +	+ + +
0.10	-	-	+	+ +
0.15	-	-	+	+

+ + +	-	High and Medium sediment
+ +	-	Low sediment
+	-	Insignificant

5) WPC 가수분해물로부터 제조된 음료의 선호도에 대한 단백질함량의 효과

18% 단백질함량인 WPC 가수분해물을 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%의 단백질함량으로 재조합한 후 설탕, 구연산, 색소 그리고 향료의 요구량의 농도로 혼합하였음. 여러 종류의 단백질 함량에서 실험한 결과 1.0%단백질함량으로부터 제조된 음료는 높은 단백질함량(1.5, 2.0%)과 비교하여 선호도 면에서 더 나은 결과를 나타냈음. 단백질 함량이 1.0%이상으로 증가할 때 전체적 선호도와 관련된 스코어는 유의하게 감소하였음.

Table 3에서 보듯이 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% 단백질 함량으로 제조된 음료의 전체적 선호도에 대한 스코어는 7.79, 7.845, 7.805, 7.750으로 나타났음. 풍미와 감도 스코어 에서 감소정도는 유의하게 높았음. 1.0%와 1.5%의 단백질함량에서 풍미에 대한 스코어는 7.805, 7.735이고. 감도 스코어는 7.805와 7.735를 나타냈음.

Table 3. Effect of different protein level on acceptability of beverage prepared from Hydrolysed WPC

Protein(%)	sample			
	color & appearance	Flavor	sweetness	overall acceptability
0.5	7.790 ±0.014 ^b	7.775 ±0.007 ^b	7.775 ±0.007 ^{ab}	7.790 ±0.014 ^b
1.0	7.830 ±0.014 ^{ab}	7.865 ±0.021 ^a	7.805 ±0.021 ^a	7.845 ±0.007 ^a
1.5	7.805 ±0.007 ^a	7.740 ±0.014 ^{bc}	7.735 ±0.021 ^{bc}	7.805 ±0.007 ^b
2.0	7.775 ±0.007 ^b	7.710 ±0.014 ^c	7.710 ±0.014 ^c	7.750 ±0.014 ^c

3) 좋은 풍미를 얻기위해 시럽을 첨가했을 때 열안정성은 감소했음. 원인은 시럽의 첨가로 인한 고형분증가와 첨가한 시럽에 의한 pH 저하 때문일 것으로 사료됨 (Driessen 1990). 이 현상은 저장기간이 증가함에 따라 뚜렷했다. 따라서 본연구에서는 설탕함량 69 %로 실시함.

나. 유청을 주 원료로 사용한 음료 제조

유청단백질 가수분해물을 주 소재로 사용하여 개발한 음료에 이어 유청을 주 원료로 사용한 음료를 개발했음. 산성유청은 감성유청에 비해 저장성이 길고 청량감을 주는데 적합한 산성의 미각소지하므로 음료제조에 산성유청을 사용했음. 감성유청은 유청단백질 같은 각개성분의 분리획득에 적합한 것으로 보고되었음.(Koskowski 1979). 본 연구에서 유청음료의 제조는 커티지치즈제조시 얻은 유청을 사용했음. 유청을 주된 소재로 하는 기능성 건강음료의 제조과정은 Fig. 1 과 같음. 유청은 10분간 70℃에서 열처리하고, 8000 RPM에서 10분간 원심분리 하였음. 여과후 40℃ 배양온도로 조정후 여액을 채취하여 lactase를(Ch Hansen,Denmark)) 여액의 1.5% 첨가하여 3시간 동안 배양한 후에 WPC-35 가수분해물을 1% 첨가하여 교반하고, 프로바이오틱스 유산균 NK-34 0.5%를(5%?) 첨가하여 pH 4.3까지 배양하였다. 배양시간은 3 시간 이었음. 배양 후, 시트르산으로 pH 4.0으로 조정하고, 6000 RPM에서 10분간 원심분리 한 후에 그 여액에 감미료

2%를 첨가하고 충전하였음.

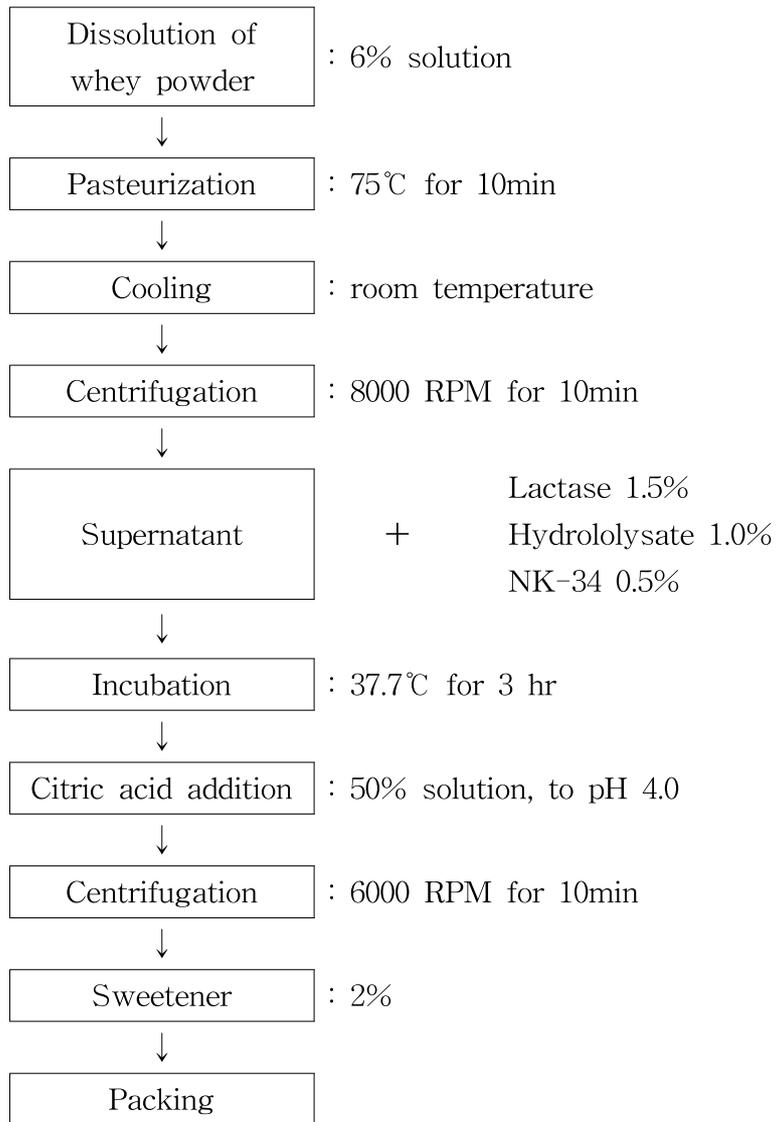


Fig.1 Flowchart for whey beverage manufacture

Table.4 Compostion of health whey beverage(%)

총고형분	9.62
단백질	0.68
NPN	0.065
유당	3.85
회분	0.82
프로바이오틱스	0.5
WPC hydrolysate	1.0

다. 유청 단백질 농축물을 이용한 음료의 이화학적 성질

1) 고형분 (moisture & total solid)의 변화

WPC-35에 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Placebo와 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Sample 1 그리고 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소에 프로바이오틱스를 첨가한 Sample 2로 재조합 하여 4℃ 냉장온도와 실온에서 6주 동안 보관한 후 10% 용액으로 각각 물에 희석하여 총 고형분을 측정된 값을 Table 6 에 나타내었음.

6주간 시간이 지남에 따라 나타난 총 고형분함량은 Placebo는 냉장온도 저장 시 10.34에서 9.945%까지 감소하였고, 실온 저장 시 10.35에서 9.945%까지 감소하였음. Sample 1은 냉장온도 저장 시 10.50에서 9.93%까지 감소하였고, 실온 저장 시 10.505에서 9.945%까지 감소하는 경향을 보임. Sample 2는 냉장온도 저장 시 10.436에서 10.109%까지 감소하였으며, 실온 저장 시 10.436에서 10.109%로 감소함.

Table 5. Total solid of health beverage using whey protein during the storage period.

storage	Placebo		sample1		sample2	
	c o l d room	Room	c o l d room	Room	c o l d room	Room
0	10.340 ±0.014 ^a	10.350 ±0.014 ^a	10.500 ±0.014 ^a	10.505 ±0.007 ^a	10.436 ±0.001 ^a	10.436 ±0.001 ^a
2	10.280 ±0.014 ^b	10.260 ±0.014 ^b	10.365 ±0.021 ^b	10.355 ±0.021 ^b	10.256 ±0.001 ^b	10.256 ±0.001 ^b
4	10.255 ±0.021 ^b	10.255 ±0.007 ^b	10.085 ±0.049 ^c	10.100 ±0.042 ^c	10.115 ±0.001 ^c	10.115 ±0.001 ^c
6	9.945 ±0.021 ^c	9.945 ±0.007 ^c	9.930 ±0.014 ^d	9.945 ±0.021 ^d	10.109 ±0.001 ^b	10.109 ±0.001 ^d

2) 회분(ash)의 변화

WPC-35에 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Placebo와 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Sample 1 그리고 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소에 프로바이오틱스를 첨가한 Sample 2로 재조합 하여 4℃ 냉장온도와 실온에서 6주 동안 보관한 후 10% 용액으로 각각 물에 희석하여 회분을 측정된 값을 Table 5에 나타내었음. 냉장 및 실내온도 저장 시 모두 회분 함량에 유의적 차이가 나타나지 않았음.

Table 6. Ash of health beverage using whey protein during the storage period.

storage	Placebo		sample1		sample2	
	c o l d room	Room	c o l d room	Room	c o l d room	Room
0	0.05 ±0.00 ^a	0.05 ±0.000 ^a	0.06 ±0.01 ^a	0.05 ±0.00 ^a	0.05 ±0.01 ^a	0.06 ±0.01 ^a
2	0.05 ±0.00 ^a	0.05 ±0.00 ^a	0.06 ±0.01 ^a	0.06 ±0.01 ^a	0.05 ±0.00 ^a	0.05 ±0.01 ^a
4	0.06 ±0.01 ^a	0.06 ±0.01 ^a	0.05 ±0.01 ^a	0.05 ±0.00 ^a	0.06 ±0.01 ^a	0.06 ±0.01 ^a
6	0.05 ±0.01 ^a	0.05 ±0.01 ^a	0.05 ±0.01 ^a	0.04 ±0.01 ^a	0.04 ±0.00 ^a	0.04 ±0.01 ^a

3) 유당(lactose)의 변화

WPC-35에 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Placebo와 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Sample 1 그리고 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소에 프로바이오틱스를 첨가한 Sample 2로 재조합 하여 4℃ 냉장온도와 실온에서 6주 동안 보관한 후 유당 함량을 측정된 값을 Table 8에 나타내었음. 유당의 함량은 placebo와 sample 1에서 저장 기간 동안 약간 감소하였고 Sample 2에서는 6주의 저장 기간 동안 큰 폭으로 감소했다. 냉장온도에서는 5.045에서 6주후에 1.855%까지 감소했고 실온에서는 5.05%에서 1.635%까지 감소했음.

Table 7. Lactose of health beverage using whey protein during the storage period.

storage	Placebo		sample1		sample2	
	c o l d room	Room	c o l d room	Room	c o l d room	Room
0	4.855 ±0.007 ^a	4.855 ±0.007 ^a	5.335 ±0.021 ^a	5.34 ±0.014 ^a	5.045 ±0.021 ^a	5.05 ±0.014 ^a
2	4.63 ±0.028 ^b	4.615 ±0.021 ^b	5.31 ±0.014 ^{ab}	5.255 ±0.021 ^b	3.085 ±0.021 ^b	3.07 ±0.028 ^b
4	4.56 ±0.014 ^c	4.47 ±0.014 ^c	5.25 ±0.028 ^b	4.79 ±0.014 ^c	2.235 ±0.021 ^c	2.185 ±0.021 ^c
6	4.49 ±0.014 ^d	4.419 ±0.014 ^d	4.925 ±0.035 ^c	4.92 ±0.014 ^d	1.855 ±0.021 ^d	1.635 ±0.021 ^d

4) 지방(fat)의 변화

WPC-35에 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Placebo와 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Sample 1 그리고 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소에 프로바이오틱스를 첨가한 Sample 2로 재조합 하여 4℃ 냉장온도와 실온에서 6주 동안 보관한 후 10% 용액으로 각각 물에 희석하여 지방 함량을 측정된 값을 Table 9 에 나타내었음. 지방 함량은 모든 시료에서 냉장 및 실온저장 시 대체적으로 큰 차이를 보이지 않았음.

Table 8. Fat content of health beverage using whey protein during the storage period.

storage	Placebo		sample1		sample2	
	c o l d room	Room	c o l d room	Room	c o l d room	Room
0	0.335 ±0.021 ^a	0.335 ±0.021 ^a	0.330 ±0.000 ^a	0.325 ±0.007 ^a	0.355 ±0.007 ^a	0.355 ±0.007 ^a
2	0.330 ±0.014 ^a	0.330 ±0.014 ^a	0.325 ±0.007 ^{ab}	0.320 ±0.014 ^a	0.350 ±0.014 ^b	0.353 ±0.000 ^{ab}
4	0.335 ±0.021 ^a	0.335 ±0.021 ^a	0.315 ±0.007 ^b	0.310 ±0.014 ^a	0.348 ±0.001 ^b	0.349 ±0.002 ^b
6	0.330 ±0.014 ^a	0.330 ±0.014 ^a	0.300 ±0.000 ^c	0.295 ±0.007 ^a	0.345 ±0.001 ^c	0.341 ±0.002 ^c

5) 적정산도(Titration Acidity test)의 변화

WPC-35에 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Placebo와 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Sample 1 그리고 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소에 프로바이오틱스를 첨가한 Sample 2로 재조합 하여 4℃ 냉장온도와 실온에서 6주 동안 보관한 후 10% 용액으로 각각 물에 희석하여 적정 산도를 측정된 값을 Table 10 에 나타내었음.

적정산도는 냉장 저장 시 Placebo는 0.223, 0.225, 0.225, 0.245의 비슷한 값으로 유의적 차이를 보이지 않았으며, 실온 저장 시 0.222, 0.225, 0.225, 0.245로 약간 상승하는 값을 나타냈음. Sample 1은 냉장 저장 시 초기에 0.25에서 6주 저장후 0.255로 변화하며 유의적 차이를 보이지 않았으며, 실온 저장 시 0.24, 0.255, 0.275, 0.285로 저장 시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 보임. Sample 2는 냉장 저장 시 0.275에서 6주 저장후 0.275로 비슷한 값을 나타내었고, 실온 저장 시 0.285에서 0.295로 저장 시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 보였음.

Tabel 9. TA of health beverage using whey protein during the storage period.

storage	Placebo		sample1		sample2	
	c o l d room	Room	c o l d room	Room	c o l d room	Room
0	0.223 ±0.001 ^a	0.222 ±0.001 ^a	0.25 ±0.000 ^a	0.24 ±0.014 ^a	0.27 ±0.000 ^a	0.265 ±0.007 ^a
2	0.225 ±0.007 ^a	0.225 ±0.021 ^a	0.255 ±0.007 ^a	0.255 ±0.007 ^a	0.265 ±0.007 ^a	0.27 ±0.014 ^a
4	0.225 ±0.007 ^a	0.225 ±0.021 ^a	0.255 ±0.007 ^a	0.275 ±0.021 ^a	0.26 ±0.014 ^a	0.28 ±0.014 ^a
6	0.245 ±0.007 ^a	0.245 ±0.007 ^a	0.255 ±0.007 ^a	0.265 ±0.007 ^a	0.275 ±0.007 ^a	0.295 ±0.007 ^a

6) pH의 변화

WPC-35에 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Placebo와 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Sample 1 그리고 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소에 프로바이오틱스를 첨가한 Sample 2로 재조합 하여 4℃ 냉장온도와 실온에서 6주 동안 보관한 후 10% 용액으로 각각 물에 희석하여 pH를 측정된 값을 Table 11 에 나타내었음. 6주 동안 시간이 지남에 따라 Placebo의 결과 값은 냉장 저장 시 4.025에서 3.985까지 감소하였고, 실온 저장 시 4.025에서 3.925까지 감소하였음. Sample 1의 냉장 저장 시 4.135에서 4.055까지 감소하였고, 실온 저장 시 4.040에서 4.090까지 감소하는 값을 나타내었음. Sample 2 또한 냉장 저장 시 4.155에서 4.01까지 감소하였고, 실온 저장 시 4.155에서 4.066까지 감소하는 값을 나타내었음.

Sample 1보다 프로바이오틱스를 첨가한 Sample 2에서 가장 큰 폭으로 감소한 것으로 보아 첨가된 프로바이오틱스가 pH를 감소시키는 영향을 끼친 것으로 사료됨. Renata(1999)의 유청단백질로 배합한 음료를 4℃ 에서 시간이 지남에 따라 측정된 경우 pH는 서서히 감소하는 값과 비슷한 결과는 나타내었음.

Table 10. pH of health beverage using whey protein during the storage period.

storage	Placebo		sample1		sample2	
	cold room	Room	cold room	Room	cold room	Room
0	4.025 ±0.007 ^a	4.025 ±0.007 ^a	4.135 ±0.007 ^a	4.040 ±0.000 ^c	4.155 ±0.007 ^a	4.155 ±0.007 ^a
2	4.010 ±0.014 ^{ab}	4.005 ±0.014 ^{ab}	4.095 ±0.007 ^b	4.115 ±0.007 ^a	4.100 ±0.000 ^b	4.120 ±0.000 ^b
4	3.995 ±0.007 ^{ab}	3.975 ±0.007 ^{ab}	4.075 ±0.007 ^{bc}	4.115 ±0.007 ^a	4.045 ±0.007 ^c	4.090 ±0.000 ^c
6	3.985 ±0.007 ^b	3.925 ±0.007 ^b	4.055 ±0.007 ^c	4.090 ±0.014 ^b	4.010 ±0.000 ^d	4.065 ±0.007 ^d

7) Bulk density의 변화

WPC-35에 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Placebo와 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Sample 1 그리고 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소에 프로바이오틱스를 첨가한 Sample 2로 재조합 하여 4℃ 냉장온도와 실온에서 0~6주 동안 보관한 후 10% 용액으로 각각 물에 희석하여 bulk density를 측정한 값을 Table 12에 나타내었음.

6주 동안 기간이 지남에 따라 Placebo의 bulk density의 값은 냉장 저장 시 1.034, 1.032, 1.033, 1.032를 나타내었고, 실온 저장 시 1.034, 1.033, 1.032, 1.032의 각각 비슷한 값을 나타내었음. Sample 1의 냉장 저장 시 값은 1.018, 1.017, 1.017, 1.017를 나타내었고, 실온 저장 시 값은 1.017, 1.017, 1.016, 1.016의 각각 비슷한 값을 나타내었음. Sample 2의 냉장 저장 시 값은 1.015, 1.011, 1.012, 1.011를 나타내었고, 실온 저장 시 값은 1.010, 1.011, 1.011, 1.012의 각각 비슷한 값을 나타내었음.

대체적으로 bulk density의 값에 유의적 차이를 보이지 않았음. Placebo의 값이 Sample 1과 Sample 2보다 높은 값을 나타낸 것은 WPC 가수 분해 후 동결 건조 시 부피가 증가했기 때문인 것으로 사료됨. 재조합된 WPC 음료는 냉장 저장과 실온 저장에 관계없이 저장기간이 지남에 따라 bulk density의 값은 거의 변화가 없는 결과를 나타내었음. 재조합한 WPC 음료는 온도와 기간이 부피에 영향을 주지 않는 것으로 사료됨.

Table 11. Bulk density of health beverage using whey protein during the storage period.

storage	Placebo		sample1		sample2	
	cold room	Room	cold room	Room	cold room	Room
0	1.034 ±0.001 ^a	1.034 ±0.001 ^a	1.018 ±0.002 ^a	1.017 ±0.001 ^a	1.015 ±0.001 ^a	1.010 ±0.001 ^a
2	1.032 ±0.001 ^a	1.033 ±0.001 ^a	1.017 ±0.002 ^a	1.017 ±0.001 ^a	1.011 ±0.001 ^a	1.011 ±0.001 ^a
4	1.033 ±0.000 ^a	1.032 ±0.001 ^a	1.017 ±0.002 ^a	1.016 ±0.003 ^a	1.012 ±0.001 ^a	1.011 ±0.001 ^a
6	1.032 ±0.001 ^a	1.032 ±0.001 ^a	1.017 ±0.001 ^a	1.016 ±0.001 ^a	1.011 ±0.001 ^a	1.012 ±0.001 ^a

8) 비중의 변화

WPC-35에 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Placebo와 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Sample 1 그리고 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소에 프로바이오틱스를 첨가한 Sample 2로 재조합 하여 4℃ 냉장온도와 실온에서 0~6주 동안 보관한 후 10% 용액으로 각각 물에 희석하여 비중을 측정한 값을 Table 13 에 나타내었음.

6주 동안 기간이 지남에 따라 Placebo의 냉장 저장 시 비중의 값은 각각 1.039, 1.038, 1.038, 1.038을 나타내었고, 실온 저장 시 1.039, 1.039, 1.038, 1.038의 비슷한 값을 나타내었음. Sample 1의 냉장 저장 시 값은 각각 1.039, 1.040, 1.039, 1.038을 나타내었고, 실온 저장 시 1.038, 1.039, 1.038, 1.038의 비슷한 값을 나타내었음. Sample 2의 냉장 저장 시 값은 각각 1.038, 1.039, 1.038, 1.038을 나타내었고, 실온 저장 시 1.038, 1.039, 1.039, 1.038의 비슷한 값을 나타내었음. 대체적으로 비중 값에 큰 차이가 없었음.

재조합 된 WPC 음료는 냉장 저장과 실온 저장에 관계없이 저장 기간이 지남에 따라 비중은 거의 변화가 없는 결과를 나타내었음. 즉 재조합한 WPC 음료는 온도와 기간이 물리적인 특성에는 영향을 주지 않는 것으로 사료됨.

Table 12. Gravity of health beverage using whey protein during the storage period.

Storage (Weeks)	Placebo		Sample 1		Sample 2	
	Cold room	Room	Cold room	Room	Cold room	Room
0	1.039 ±0.000 ^a	1.039 ±0.000 ^a	1.039 ±0.000 ^a	1.038 ±0.000 ^a	1.038 ±0.000 ^a	1.038 ±0.000 ^a
2	1.038 ±0.000 ^a	1.039 ±0.000 ^a	1.040 ±0.000 ^a	1.039 ±0.000 ^a	1.039 ±0.000 ^a	1.039 ±0.000 ^a
4	1.038 ±0.000 ^a	1.038 ±0.000 ^a	1.039 ±0.000 ^a	1.038 ±0.000 ^a	1.038 ±0.000 ^a	1.039 ±0.000 ^a
6	1.038 ±0.000 ^a					

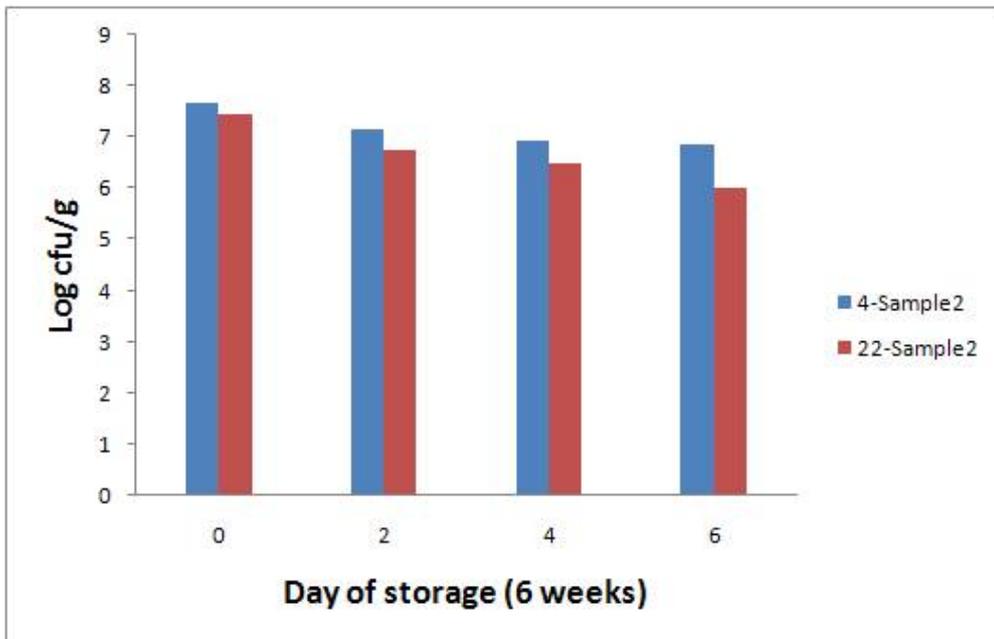
9) 유산균수의 변화

WPC-35에 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Placebo와 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Sample 1 그리고 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소에 프로바이오틱스를 첨가한 Sample 2로 재조합 하여 4℃ 냉장온도와 실온에서 0~6주 동안 보관한 후 10% 용액으로 각각 물에 희석하여 유산균수를 측정된 값을 Fig.2 에 나타내었음.

6주 동안 기간이 지남에 따라 유산균수의 값은 Placebo와 Sample 1에는 프로바이오틱스를 첨가하지 않았기 때문에 냉장 저장과 실온 저장 모두 0의 값을 나타내었음. Sample 2의 냉장 저장은 7.69, 7.17, 6.94, 6.86의 값을 나타내었고, 실온 저장은 7.44, 6.75, 6.49, 6.01의 값을 나타내었음. 실온 저장 시 냉장 저장 시 보다 시간에 따라 유산균수의 값이 급격히 감소하는 결과 값을 나타내었음.

저장 기간이 프로바이오틱스에 약간의 영향을 미치지만 저장온도가 높을수록 프로바이오틱스의 생존에 직접적인 영향을 미치는 것으로 사료됨.

Renata(1999)의 유청단백질로 배합한 음료를 4℃ 에서 시간이 지남에 따라 측정된 경우 유산균수는 약간 감소하는 경향을 보인 것과 비슷한 결과를 나타내었음.



4- : refrigeration keeping

22- : room temperature keeping

Fig 2. Lactic acid bacterial of health beverage using whey protein during the storage period.

10) 점도의 변화

WPC-35에 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Placebo와 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Sample 1 그리고 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소에 프로바이오틱스를 첨가한 Sample 2로 재조합 하여 10% 용액으로 각각 물에 희석하여 점도를 측정 한 값을 Fig.3 에 나타내었음.

6개의 Sample 모두 RPM이 증가할수록 cP 값이 감소하는 경향을 나타내는 비뉴턴 유체의 특성을 나타냈음.

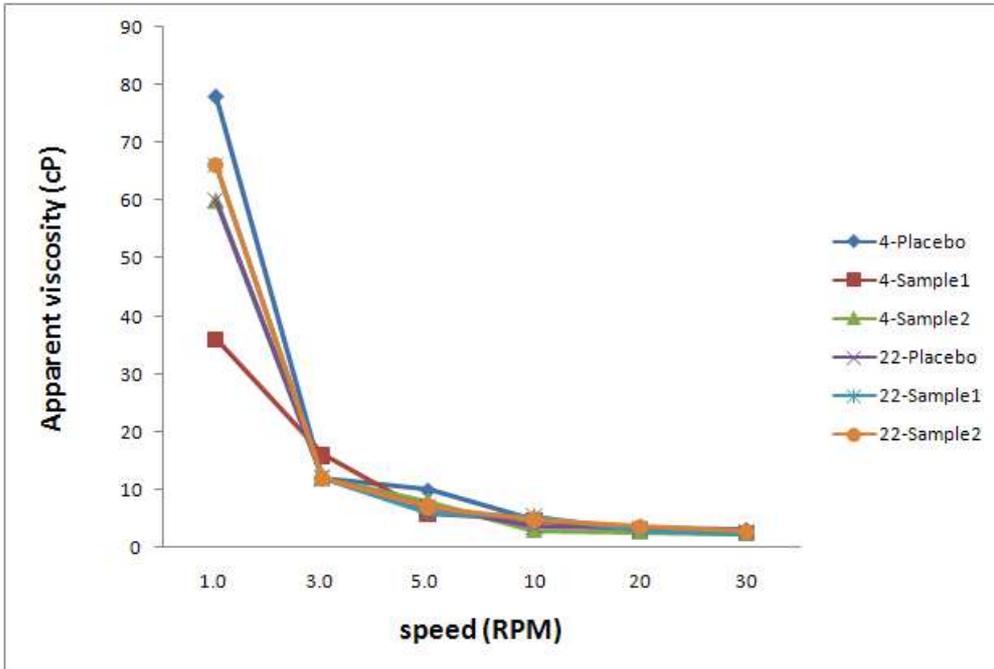


Fig 3. Viscosity of health beverage using whey protein.

4- : refrigeration keeping

22- : room temperature keeping

11) NPN(Non Protein Nitrogen)의 변화

WPC-35에 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Placebo와 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Sample 1 그리고 WPC-35 가수 분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소에 프로바이오틱스를 첨가한 Sample 2로 재조합 하여 4℃ 냉장온도와 실온에서 보관한 후 10% 용액으로 각각 물에 희석하여 NPN을 측정된 값을 table. 14 에 나타내었음.

6주 동안의 기간이 지남에 따라 Placebo의 NPN의 값은 냉장 저장 시 0.543, 0.549, 0.589, 0.591의 값을 나타내었고, 실온 저장 시 0.543, 0.563, 0.595, 0.614의 값을 나타내며 약간 증가하는 경향을 나타내었음. Sample 1은 냉장 저장 시 0.734, 0.740, 0.752, 0.767의 값을 나타내었고, 실온 저장 시 0.733, 0.744, 0.769, 0.775의 값을 나타내며 유의적 차이를 보이지 않았음. Sample 2는 냉장 저장 시 0.745, 0.752, 0.777, 0.789의 값을 나타내었고, 실온 저장 시 0.745, 0.752, 0.770, 0.864의 값을 나타내며 유의적 차이를 보이지 않았음.

Table 13. NPN content of health beverage using whey protein during storage

storage	Placebo		sample1		sample2	
	cold room	Room	cold room	Room	cold room	Room
0	0.543 ±0.001 ^c	0.543 ±0.002 ^d	0.734 ±0.001 ^d	0.733 ±0.001 ^d	0.745 ±0.001 ^d	0.745 ±0.001 ^d
2	0.549 ±0.001 ^b	0.563 ±0.001 ^c	0.740 ±0.001 ^c	0.744 ±0.001 ^c	0.752 ±0.001 ^c	0.752 ±0.001 ^c
4	0.589 ±0.001 ^a	0.595 ±0.001 ^b	0.752 ±0.001 ^b	0.769 ±0.001 ^b	0.777 ±0.002 ^b	0.770 ±0.003 ^b
6	0.591 ±0.001 ^a	0.614 ±0.001 ^a	0.767 ±0.001 ^a	0.775 ±0.001 ^a	0.789 ±0.002 ^a	0.864 ±0.003 ^a

12) 관능검사 (Sensory evaluation)

WPC-35 가수분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Placebo와 WPC-35 가수분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소, Probiotics를 첨가한 Sample 2로 재조합 하여 6주동안 보관한 후 관능검사를 실시한 결과를 Table 15 에 나타내었음.

외관(Appearance), 산미(Sourness), 전체적선호도(Overall acceptability)에서 6주 동안의 선호도는 유의적 차이를 보이지 않았고, 감미(Sweetness)는 Sample 2에서 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었음. 외관, 감미, 산미에서 대체적으로 Placebo 보다 Sample 2가 더 높은 점수를 받았고, 특히 전체적 선호도에서 Probiotics를 함유한 Sample 2의 선호도가 더 높은 점수를 받음. placebo와 sample 1 은 차이가 관측되지 않았음. 유청단백질농축물은 냄새, 미각에 영향을 끼치지 않는 소재로 나타남. 또한 완충능력이 높아 양호한 용해도를 보여 외관에서도 좋은 점수를 나타냈음.

Table 14. Sensory score of health beverage using whey protein during the storage period.

storage (Weeks)	sample	Appearance	sweetness	flaver	Overall acceptability
0	placebo	8.20±0.14 ^a	7.75±0.21 ^a	7.30±0.00 ^c	7.77
	sample2	8.30±0.14 ^a	7.80±0.14 ^a	7.25±0.07 ^a	7.78
2	placebo	8.15±0.07 ^a	7.40±0.14 ^{ab}	7.35±0.07 ^d	7.63
	sample2	8.25±0.07 ^a	7.75±0.07 ^a	7.25±0.07 ^a	7.75
4	placebo	7.90±0.00 ^b	7.15±0.07 ^{cb}	7.65±0.07 ^b	7.63
	sample2	8.30±0.00 ^a	7.30±0.00 ^b	7.30±0.00 ^a	7.63
6	placebo	7.75±0.07 ^b	7.00±0.00 ^c	7.95±0.07 ^a	7.58
	sample2	8.25±0.07 ^a	7.25±0.07 ^b	7.25±0.07 ^a	7.57

13) Angiotensin Converting Enzyme 저해효과

WPC-35 가수분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 Placebo와 WPC-35 가수분해물과 설탕, 구연산, 향료, 색소, Probiotics를 첨가한 Sample 2로 재조합 하여 6주동안 보관한 후 10%용액으로 각각 물에 희석하여 Angiotensin Converting Enzyme 저해효과를 실시하여 ACE 저해율을 계산한 결과를 Table 16 에 나타내었음.

Probiotics를 함유한 Sample 2의 ACE 저해율이 더 높게 나타났다. 이 같은 효과는 6주의 저장기간동안 지속되었음. 이 결과는 유청단백질의 다양한 소화기 단백질 분해소 분해물로부터 ACE 활성을 확인한 보고된 결과와 일치함(Mullally등, 1996).

Table 15. ACE-inhibitory of health beverage using whey protein during the storage period. Unit: %

Storage (Weeks)	Placebo	Sample 1
0	60.15	68.39
2	61.79	70.22
4	61.80	70.55
6	61.78	70.56

라. 유청을 주된 소재로 이용한 기능성 건강음료

1) 수분 및 총 고형분 (moisture & total solid)의 변화

유청분말에 WPC-35 가수분해물, 프로바이오틱스, 설탕, 시트르산을 첨가한 음료를 4℃ 냉장 온도와 실온에서 6주 동안 보관한 후 총 고형분을 측정된 값을 Table. 17에 나타내었음. 실온과 냉장온도에서의 저장기간동안의 변화를 보면 저장기간이 지남에 따라 총 고형분은 냉장 저장 시 9.62에서 8.95까지 감소하는 값을 나타냈으며 실온 저장 시 7.415까지 감소하는 값을 나타내었음. 음료 제조 직후에는 냉장 저장 시 시료와 실온 저장 시 시료가 동일한 값을 나타내었지만 저장 기간이 지남에 따라 실온 저장 한 시료의 감소폭이 더 크게 나타났음.

Table 16. Total solids content of health beverage using whey during the storage period.

storage	sample	
	cold room	Room
0	9.620 ±0.028 ^a	9.625 ±0.021 ^a
2	9.465 ±0.021 ^b	8.735 ±0.021 ^b
4	9.010 ±0.056 ^c	7.620 ±0.028 ^c
6	8.950 ±0.014 ^c	7.415 ±0.021 ^d

2) 회분(ash)의 변화

산성유청의 회분에는 칼슘이 풍부하게 함유되어있으므로 회분함량은 높게 나타났음. 한외여과한 투과액을 사용할 경우 회분함량은 더 높게 나타남(Jayaprakasha 등 1993.). 본 연구에서 회분 함량은 Walstra와 Jenness(1984)가 보고한 순수 감성 유청에서의 0.5~0.6%보다 다소 낮게 보고되었음.

유청분말에 WPC-35 가수분해물, 프로바이오틱스, 설탕, 시트르산을 첨가한 음료를 4℃ 냉장 온도와 실온에서 6주 동안 보관한 후 회분을 측정된 값을 Table. 18에 나타내었음.

6주 동안의 기간이 지남에 따라 회분 함량은 냉장 저장 시 0.817 에서 0.820의 값을 나타내었고, 실온 저장 시 0.820의 값을 나타내며 두 시료 모두 유의적 차이를 나타내지 않았음.

Table 17. Ash content of health beverage using whey during the storage period.

storage	sample	
	cold room	Room
0	0.817 ±0.007 ^a	0.820 ±0.000 ^a
2	0.820 ±0.014 ^a	0.818 ±0.014 ^a
4	0.820 ±0.014 ^a	0.820 ±0.014 ^a
6	0.820 ±0.000 ^a	0.820 ±0.000 ^a

3) 유당(lactose)의 변화

가) 유청음료 원료의 유당함량

유청음료 원료의 유당함량은 WPC-35 첨가에 의해 유당함량이 증가된 양으로 인해 원료유청의 유당함량보다 높음. 본 연구에서는 유당을 일부분해하여 사용함. 산성유청에서 유당함량은 약 4.3% 을 나타냈으나 유당분해효소와 프로바이오틱스 유산균에 의해 산이 생성되었으므로 이보다 3.85%로 낮음(table 19). Table 19에서 보듯이 6주 저장기간중 추가로 약간의 유당분해 발생했으나 이는 큰 의미 있는것은 아님.

유당분해효소와 프로바이오틱스에 의한 원료유청에서 유당의 분해과정은 다음과 같다. 유당분해효소는 1.5%의 농도를 사용하여 50-60℃에서 가수분해후 유당함량을 측정하여 가수분해도를 측정했음. 이미 한시간 후 가수분해도 11%에 도달하였다. 가수분해는 한시간후에는 서서히 진행. 이는 생성된 galatose에 의한 저해로 인한 것이라고 사료됨. Lactase를 첨가하여 3시간 배양후 유당함량 3.85%인 가수분해도 22%에 도달했음. 효소와 유산균을 동시 첨가했을 때 가수분해도는 이보다 낮았음. 이는 유산균에 의해 생성된 젖산이 pH를 낮추기 때문일 것으로 사료됨. 효소와 스타터의 분리첨가는 높은 가수분해도를 초래했음.

효소사용량과 배양시간에 따른 가수분해도는 다음과 같음.

배양시간/효소사용량	1.5%	3%
1시간	11%	16%
2시간	15%	21%
3시간	22%	27%

효소첨가량을 높이면 강한 가수분해로 인해 glucose, galactose 함량이 높음. glucose/galactose 관계는 올리고당생성에 대한 정보를 제공함. 그러나 이 관계는 별로 변하지 않았음. 올리고당함량은 가수분해 전후의 유당, glucose, galactose, 함량에서 합계를 보면 알 수 있음. 유당에서 glucose 와 galactose를 뺀, 올리고당 생성은 전체 탄수화물에서 1..5%를 차지하여 단지 소량의 올리고당이 생성된 것을 알 수 있음. 올리고당은 단당류인 글루코즈, 갈락토즈보다 음료의 용해성이 떨어지므로 올리고당이 많이 생성되면 음료의 관능검사점수가 낮게 나타남.

3시간 가수분해후 유당, 글루코즈, 갈락토즈 함량은 유당 22%, 글루코즈 37%, 갈락토즈 39.5%를 나타냈다. 이러한 유당 분해로 인해 유당 불내증을 해소시키는 도움이 될 것임.

나) 유청음료의 유당함량

유청분말에 WPC-35 가수분해물, 프로바이오틱스, 설탕, 시트르산을 첨가한 음료를 4℃ 냉장 온도와 실온에서 6주 동안 보관한 후 유당을 측정된 값을 table. 19에 나타내었음. 6주 동안의 기간이 지남에 따라 유당 함량은 냉장 저장 시 3.85, 3,760, 3.650, 3.555의 값을 나타내었고, 실온 저장 시 3,855, 3,435, 3,345, 2.875의 값을 나타내었음.

고형분, 회분, 총질소함량은 저장기간 중 변하지 않았으나 유청의 고형분에서 주성분인 유당함량은 감소를 보임. 저장온도와 저장기간 모두 유의한 영향을 끼쳤다. 냉장시에는 2 주 지나서 분해발생했음. 실온에서는 (20℃)저장시에는 이미 2주에 3.76 %의 유당 분해를 나타냈음. 저장 기간이 지날수록 유당 함량은 실온 저장한 시료에서 더 큰 폭으로 감소하는 경향을 나타내었음.

Table 18. lactose content of health beverage using whey during the storage period.

storage	sample	
	cold room	Room
0	3.850 ±0.014 ^a	3.855 ±0.007 ^a
2	3.760 ±0.014 ^b	3.435 ±0.021 ^b
4	3.650 ±0.014 ^c	3.345 ±0.021 ^c
6	3.555 ±0.021 ^d	2.875 ±0.021 ^d

4) 단백질(Crude protein)의 변화

유청음료에서 단백질은 열처리시 변성화되어 음료외관의 혼탁하게하고 침전물을 생성하므로 부정적이나 소량의 유청단백질은 거품을 안정화 시키므로 필요함 (Adler-Nissen 1979). 본 연구에서는 변성화된 유청단백질의 상당 부분은 원심분리시 제거되었음.

유청분말에 WPC-35 가수분해물, 프로바이오틱스, 설탕, 시트르산을 첨가한 음료를 4℃ 냉장 온도와 실온에서 6주 동안 보관한 후 단백질을 측정된 값을 table 20에 나타내었음.

6주 동안의 기간이 지남에 따라 단백질 함량은 냉장 저장 시 0.68, 0.670, 0.640, 0.625의 값을 나타내었고, 실온 저장 시 0.678, 0.620, 0.60, 0.59의 값을 나타내었음.

음료의 제조 직후 단백질 함량은 냉장 저장한 시료와 실온 저장한 시료는 동일한 값을 나타냈지만, 저장 기간이 지날수록 냉장 저장한 시료보다 실온 저장 한 시료가 다소 큰 감소폭을 나타내었다. 이는 유산균 발효 중 단백질이 분해되어 나타나는 결과로 사료됨.

Table 19. Crude protein protein of health beverage using whey during the storage period.

storage	sample	
	cold room	Room
0	0.680 ±0.014 ^a	0.678 ±0.021 ^a
2	0.670 ±0.014 ^{ab}	0.620 ±0.014 ^b
4	0.640 ±0.014 ^{bc}	0.600 ±0.014 ^b
6	0.625 ±0.007 ^c	0.590 ±0.014 ^b

5) 적정산도(Titration Acidity test)의 변화

유청분말에 WPC-35 가수분해물, 프로바이오틱스, 설탕, 시트르산을 첨가한 기능성 음료를 4℃ 냉장 온도와 실온에서 6주 동안 보관한 후 적정산도를 측정한 값을 표 21 에 나타내었음.

산성유청을 원료로 사용했으므로 사용한 스타터에 의해 유당은 이미 glucose 와 galactose 로 부분적으로 분해되었다. 전체 산에서 젖산함량은 주성분으로서 0,47%를 나타냈음.

유청음료의 산도는 저장기간 동안 냉장온도에서 0.47%에서 0.550

% 으로 약간만 상승했음. 실온에서는 0.66%까지 증가했다. 여기서는 저장온도 영향이 나타남. 저장기간은 매우 유의하게 나타났다. 여기에는 스타터의 작용에 기인한 부분도 있을 것으로 사료됨.

Table 20. Titration Acidity of health beverage using whey during the storage period.

storage	sample	
	cold room	Room
0	0.470 ±0.000 ^c	0.470 ±0.014 ^c
2	0.515 ±0.007 ^b	0.565 ±0.021 ^b
4	0.525 ±0.007 ^b	0.595 ±0.021 ^b
6	0.550 ±0.014 ^a	0.660 ±0.014 ^a

Fig 4. TA of health beverage using whey during the storage period.

6) pH의 변화

유청분말에 WPC-35 가수분해물, 프로바이오틱스, 설탕, 시트르산을 첨가한 기능성 음료를 4℃ 냉장 온도와 실온에서 6주 동안 보관한 후 pH를 측정한 값을 table 22에 나타내었음. 6주 동안의 기간이 지남에 따라 pH의 값은 냉장 저장 시 3.99에서 3.91로 감소하는 값을 나타내었고, 실온 저장 시 3.445까지 감소했음.

유당 가수분해한 유청에서 스타터첨가한 첫시간에 유산균의 활동으로 빠른 pH 저하가 발생했음. 산 생성시작할 때의 신속한 산생성과정은 부분적으로 가수분해에 생성된 glucose 때문일 것으로 사료됨. 이는 유산균에 의해 직접 젖산을 생성함.

유청음료제조시 pH 4.0이상에서는 열처리시 음료의 탁도가 높아짐. 따라서 침전물을 생성하는 단백질응고를 감안해야 함. 유청음료에서 pH와 침전물 형성은 밀접한 관계에 있음. 즉, 높은 pH에서 단백질의 응집물인 침전물형성이 많이 발생함.

원료유청의 pH는 음료를 제조할 때 최종음료의 pH가 설탕첨가후에 4.0이하의 값을 갖기위해, 시트르산을 첨가하여 4.0으로 조정했음. 외국에서 시판되는 유청음료는 평균 3.88.로서 pH를 조정하는 이유는 유청단백질의 응고는 4.0이상에서 대두되므로 이를 피하기 위해서임(Trantik 과 Krgew 1988, Holsinger 1974).

Table 21. PH of health beverage using whey during the storage period.

storage	sample	
	cold room	Room
0	3.990 ±0.000 ^a	3.985 ±0.007 ^a
2	3.960 ±0.000 ^b	3.950 ±0.000 ^a
4	3.935 ±0.007 ^c	3.935 ±0.007 ^a
6	3.910 ±0.014 ^d	3.445 ±0.643 ^a

7) NPN(Non Protein Nitrogen)의 변화

유청분말에 WPC-35 가수분해물, 프로바이오틱스, 설탕, 시트르산을 첨가한 음료를 4℃ 냉장 온도와 실온에서 6주 동안 보관한 후 NPN을 측정된 값을 table 23과 Fig.5 에 나타내었음. 저장기간동안 단지 약간의 상승된 수치를 나타냈음. 4℃ 저장한 시료의 NPN 함량은 20℃ 저장한 시료보다 약간 낮은 수치를 보임.

6주 동안의 기간이 지남에 따라 비단백태 질소 함량은 냉장 저장 시 0.065%에서 0.074%로 약간 증가하는 값을 나타내었으며, 실온 저장 시 0.076%까지 증가하였음. 냉장시료와 실온 저장한 시료의 큰 차이는 관측되지 않았음. NPN 증가는 유산균 발효 중 단백질이 분해되어 분해산물인 유리 아미노산 및 기타 비단백태 질소화합물들이 생성되어 질소함량의 증가에 의한 현상으로 사료됨.

Table 22. NPN content of health beverage using whey during the storage period.

storage	sample	
	cold room	Room
0	0.065 ±0.001 ^a	0.065 ±0.001 ^a
2	0.067 ±0.001 ^a	0.066 ±0.001 ^a
4	0.072 ±0.000 ^a	0.074 ±0.002 ^a
6	0.074 ±0.001 ^a	0.076 ±0.001 ^a

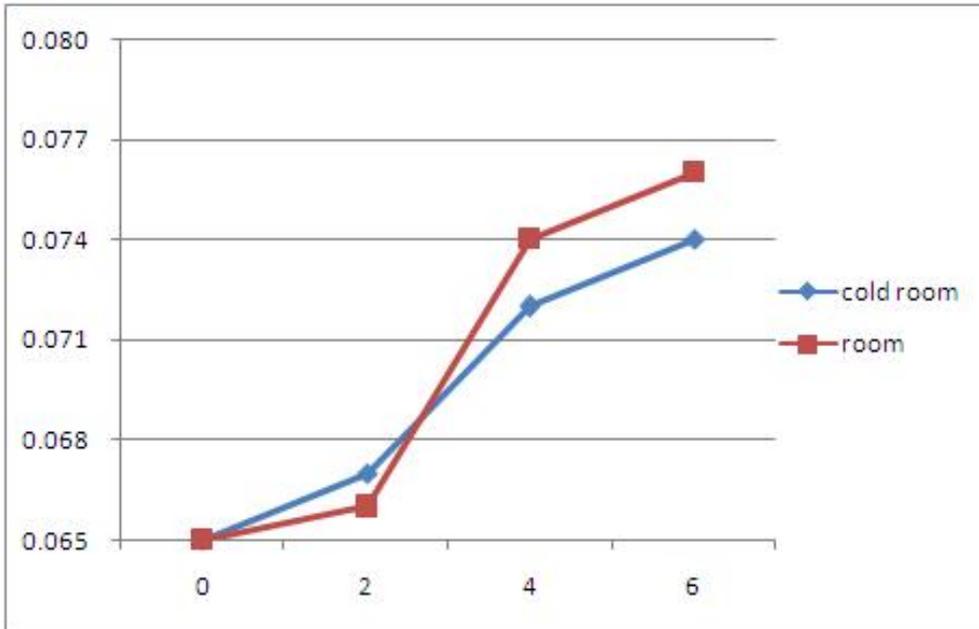


Fig 5. NPN contents of health beverage using whey during the storage period.

8) 음료의 미생물학적 안전성

가) ABT를 첨가한 기능성 음료의 미생물학적 안전성

1. 총균수 (total cell number)의 변화

Fig. 6은 기능성 음료들의 총균수의 변화를 나타내었음. 파우더 상태에서 각각 4°C와 실온에서 ABT 및 음료 믹스를 저장하여, 실험에 이용할 때마다 물에 타서 실험에 사용하였음. 대조군의 총균수는 7일째 증가하였다가 유지하는 추세를 나타내었으며, ABT를 첨가한 경우에는 유산균의 영향으로 초기 균수가 높게 나타났으나, 그 균수는 7, 14일을 지나면서 5 Log CFU/mL를 벗어나지 않았음.

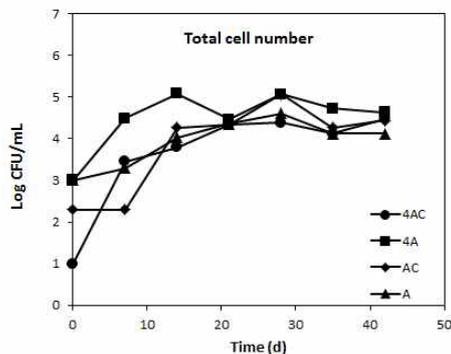


Fig. 6. Total cell number per milliliter of functional beverage using ABT strains during storage. 4AC, Control stored at 4°C; 4A, ABT sample stored at 4°C; AC, Control stored at room temperature; A, ABT sample stored at room temperature.

2. 저온성 세균수 (psychrotrophic bacterial count)의 변화

Fig. 2는 기능성 음료들의 저온성 세균수의 변화를 나타내었음. 저온성 세균수는 저장기간 동안에 총균수와 유사하게 증가하였으나, 각 군별로는 유의적 차이는 보이지 않았음.

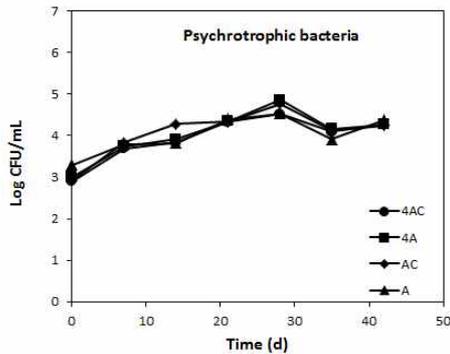


Fig. 7. Psychrotrophic bacterial count per milliliter of functional beverage using ABT strains during storage. 4AC, Control stored at 4°C; 4A, ABT sample stored at 4°C; AC, Control stored at room temperature; A, ABT sample stored at room temperature.

3. 대장균 및 대장균군의 변화

기능성 음료의 미생물에서 성분규격은 대장균군이 음성이어야 함. 본 연구에서 만든 기능성 음료의 경우, 대장균 및 대장균군이 나타나지 않았음.

4. 유산균의 변화

Fig. 3은 기능성 음료들의 유산균수의 변화를 나타내었음. 대조군에서는 유산균을 확인할 수 없었으나, ABTF를 첨가한 경우, 초기균으로 약 5 Log CFU/mL를 나타내었으며, 저장기간 동안 감소하는 추세를 나타냈음. 저장 1주에서 냉장보관의 경우 급격히 떨어졌으나, 실온과 냉장 저장 시, 약 3 Log CFU/mL 이상으로 유지되는 것을 확인하였음.

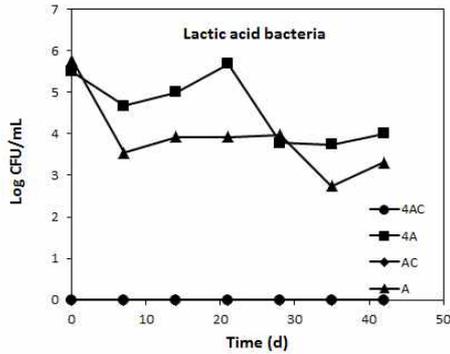


Fig. 8. Lactic acid bacterial count per milliliter of functional beverage using ABT strains during storage. 4AC, Control stored at 4°C; 4A, ABT sample stored at 4°C; AC, Control stored at room temperature; A, ABT sample stored at room temperature.

나) NK34를 첨가한 기능성 음료의 미생물학적 안전성

1. 총균수 (total cell number)의 변화

Fig. 1은 기능성 음료들의 총균수의 변화를 나타내었음. NK34 기능성 음료를 각각 4°C와 실온에서 저장하여, 실험에 사용하였음. 총균수는 초기에는 NK34균을 첨가하였을 때에는 약 5.1 Log CFU/mL를 나타내었으나, 저장 7일째부터는 균수를 확인할 수 없었음. 대조군에서는 0일부터 42일까지의 모든 저장기간 동안 확인할 수 없었음.

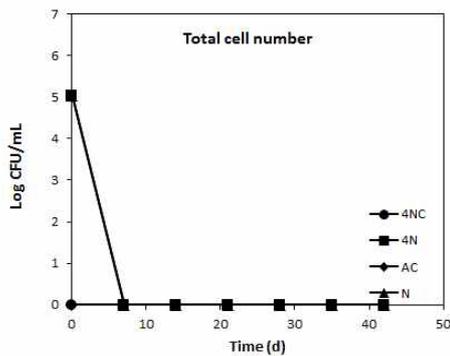


Fig. 9. Total cell number per milliliter of functional beverage using NK34 strains during storage. 4NC, Control stored at 4°C; 4N, NK34 sample stored at 4°C; NC, Control stored at room temperature; N, NK34 sample stored at room temperature.

2. 저온성 세균수 (psychrotrophic bacterial count)의 변화

Fig. 2는 기능성 음료들의 저온성 세균수의 변화를 나타내었음. 저온성 세균수도 총균수와 마찬가지로, 초기에는 NK34균을 첨가하였을 때에는 약 5.1 Log CFU/mL를 나타내었으나, 저장 7일째부터는 균수를 확인할 수 없었음. 대조군에서는 0일부터 42일까지의 모든 저장기간 동안 확인할 수 없었음.

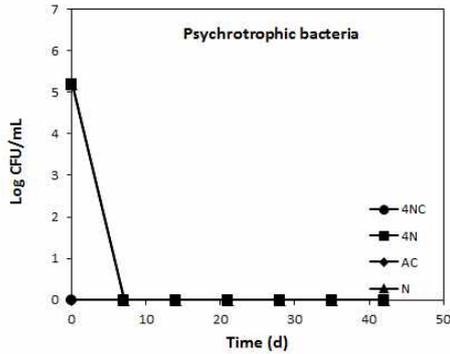


Fig. 10. Psychrotrophic bacterial count per milliliter of functional beverage using NK34 strains during storage. 4NC, Control stored at 4°C; 4N, NK34 sample stored at 4°C; NC, Control stored at room temperature; N, NK34 sample stored at room temperature.

3. 대장균 및 대장균군의 변화

기능성 음료의 미생물에서 성분규격은 대장균군이 음성이어야 함. 본 연구에서 만든 기능성 음료의 경우, 대장균 및 대장균군이 나타나지 않았음.

4. 유산균의 변화

Fig. 3은 기능성 음료들의 유산균수의 변화를 나타내었음. 대조군에서는 유산균을 확인할 수 없었으나, NK34균을 첨가하였을 때, 초기에는 약 5.1 Log CFU/mL를 나타내었으나, 저장 7일째부터는 균수를 확인할 수 없었음. 대조군에서는 0일부터 42일까지의 모든 저장기간 동안 확인할 수 없었음.

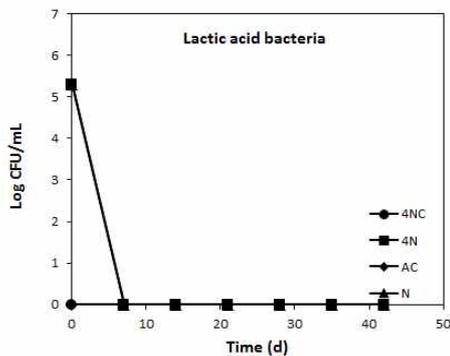


Fig. 11. Lactic acid bacterial count per milliliter of functional beverage using NK34 strains during storage. 4NC, Control stored at 4°C; 4N, NK34 sample stored at 4°C; NC, Control stored at room temperature; N, NK34 sample stored at room temperature.

9) 관능검사

저장기간중 관능검사는 냉장시 실온에서 보다 변화가 적은 4°C 에 저장한 음료를 비교시료로 했음. 음료의 외관은 10점 만점에 90.35점의 좋은 점수를 나타냄(table

24). 국내에서도 유청음료가 개발되어 출시된 적이 있으나 저장기간 중 침전물 형성으로 인한 혼탁함 문제를 관찰할 수 있었음. 이 침전물은 유청단백질의 침전물로서 포장의 바닥에 혼탁한 침전을 형성함으로써 외관에 불리하게 작용함. 이때 온도와 저장기간이 유의한 영향을 끼쳤음. 본 연구에서는 열처리시 변성화된 유청단백질과 배양 중에 생성되는 침전물은 다시 원심분리에 의해 제거(6,000RPM 10분)되었으므로 개발한 음료에서 이런 문제는 관측되지 않았음. 본 연구에서는 맑고 투명한 음료가 개발되어 외관에서 좋은 점수를 나타냈음. 저장한 음료에서 약간의 거품 생성을 관찰할 수 있었다. 이 거품은 6주시료에서는 매우 약했음.

유청단백질은 열처리후 저장기간중 유청의 가열에 의해 protein-lipid-인지질 complex 생성함으로써 거품생성을 유발함(Fox 1989). 이는 냉장저장시 파괴되어 거품을 생성한다고 보고되었음(Coony 1974). 거품생성은 유청음료에서 아미노산 사슬의 소수성/친수성 에 의해서도 발생함. 이들은 유청단백질 분자에서 액체표면으로 향하여 거품을 생성함(Kinsella 1988). 본 연구에서 유청음료의 저장기간중 낮은 거품생성은 시료의 단백질함량이 낮아 크지 않았음.

유청음료의 미각은 양호한 것으로 평가되었음. 관능평가에서 유청특유의 뒷맛은 관찰되지 않았음. 인공감미료첨가는 mouthfeel 미각이 떨어지므로 본 연구에서는 설탕을 사용했음. 음료의 미각은 전체적으로 10점 만점에 8.125점으로 양호했음. 저장기간중 4℃ 와 20℃에서 별다른 차이는 관측되지 않았음.

음료의 제조공정에서 배양은 2단계로 실시했음. 우선 스타터에 의해 pH 5.2 까지 37℃에서 3시간 배양. 이어서 시트르산을 첨가하여 pH 4.0으로 조정했다. 이를 통해 단순히 시트르산만 첨가한 것 보다 미각 개선효과와 동시에 배양시간을 단축할 수 있었음.

유청음료 특유의 소비자 기호도를 떨어트리는 짠맛은 시트르 산 첨가에 의해 개선되어 다른 음료와 비교에서도 미각면에서 비견할 만 했음. 고형분함량과 미각평가에는 상관관계 있어 고형분함량이 낮으면 물맛으로 평가됨. 다이는 설탕첨가에 의해 어느 정도 보강된 것으로 사료됨. 풍미는 대개 신선하다고 평가. 미각은 유당 가수분해 결과 음료는 저장초기에 7.99점을 나타냈음. 음료의 높은 유당함량으로 인해 풍미성분을 발생했기때문일 것으로 사료됨(Holsinger 1987). 전체적으로 볼 때 적은 미각변화가 관찰되었음. 4℃ 저장한 시료는 20℃ 에 저장한 음료에 비해 적은 미각 변화를 나타냄.

Table 23. The sensory evaluation score for whey beverages (0 weeks)

storage	sample								
	appearance		taste		aroma		overall acceptability		
0	room	9.035	±0.021 ^a	8.125	±0.021 ^a	7.990	±0.014 ^a	8.230	±0.028 ^a
	cold room	9.035	±0.021 ^a	8.130	±0.014 ^a	7.995	±0.007 ^a	8.240	±0.014 ^a
2	room	8.955	±0.007 ^b	8.000	±0.014 ^b	7.965	±0.007 ^{ab}	8.190	±0.014 ^a
	cold room	8.995	±0.007 ^b	8.065	±0.021 ^b	7.980	±0.028 ^{ab}	8.220	±0.000 ^a
4	room	8.240	±0.014 ^c	7.700	±0.014 ^c	7.945	±0.007 ^b	8.050	±0.014 ^b
	cold room	8.980	±0.000 ^b	7.910	±0.014 ^c	7.935	±0.021 ^b	8.160	±0.014 ^b
6	room	7.950	±0.014 ^d	7.450	±0.021 ^d	7.835	±0.021 ^c	7.890	±0.014 ^c
	cold room	8.950	±0.014 ^c	7.705	±0.007 ^d	7.880	±0.014 ^c	7.925	±0.021 ^c

유당분해로 인해 생성되는 glucose는 설탕첨가량을 감소시키는 장점이 있다. 인공 감미료가 미각을 저하시키므로 유당가수분해는 설탕감소를 시키는데 적합하므로 치즈소비가 확대됨에 따라 이로부터 얻어지는 유청의 부가가치를 높이는 방안으로써 상업용유청음료를 제조할 경우 천연의 단맛을 얻으며 상당량의 설탕을 절약할 수 있고 이에 따라 열량역시 감소할 수 있음. 이러한 저칼로리 제품은 청소년을 위한 음료나 스포츠음료에 적합함. 이 음료에 CO₂ 를 이용하여 탄산음료로 제조가능함. 일반적인 탄산음료는 에너지함량이 단지 당 에 의존하나 유청음료는 조성면에서 영양상으로 더 나은 효과를 나타냄. 실온저장 음료와 냉장저장 음료의 관능검사를 실시한 결과 전체적인 기호도 면에서는 약간의 차이가 있었으나 대체로 냉장 저장한 음료의 선호도가 조금 높았음.

마. WPC 가수분해물의 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통한 고혈압 저하 활성 평가

1) *In vitro*의 WPC 가수분해물의 ACE 저해활성 분석

여러 가지 효소를 이용하여 WPC를 가수분해한 시료의 ACE (Angiotensin converting enzyme) 저해활성 분석 결과를 Fig 1에 나타내었음. 가장 좋은 활성을

나타낸 것은 Protease S와 Pepsin이 96%의 억제력을 보였으며 M이 89%, Alcalase와 Trypsin이 각각 86%, 68%로 나타났음. 따라서 본 연구의 결과 모든 WPC 가수분해물에서 ACE 저해활성이 50% 이상인 것으로 나타났으며, WPC 가수분해물이 혈압 강하에 효과적일 것으로 사료됨.

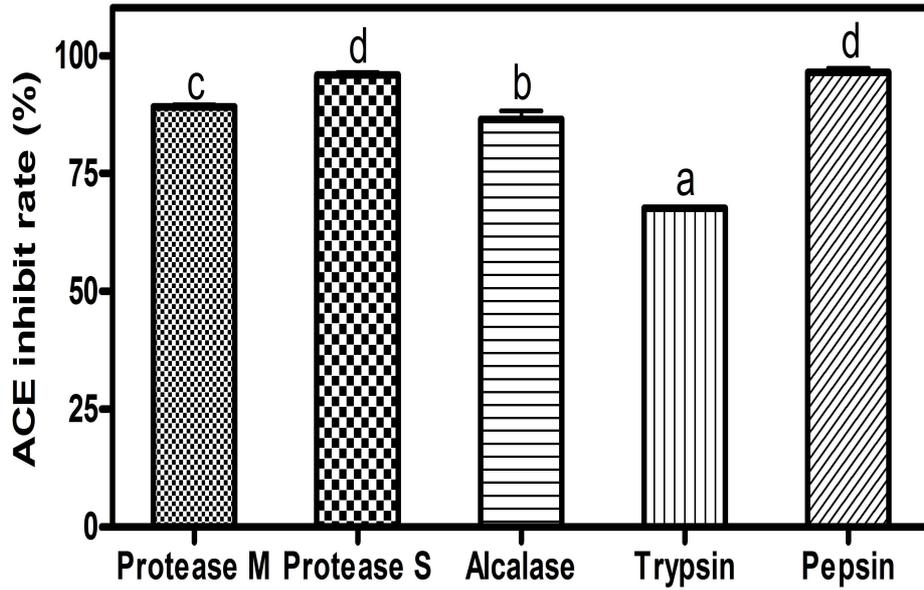


Fig. 12. ACE inhibitory activity of various WPC hydrolysates

Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

2) SHR 모델을 이용한 WPC 가수분해물의 고혈압 강화효과

가) 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율에 미치는 영향

실험기간 중 체중증가량 및 평균 식이섭취량과 식이효율에서는 유의적인 차이를 보이지 않았음(Table 1).

Table 23. Effects of various WPC hydrolysates on Body weight gains, Food intake and FER in SHR rats

	Body weight gain (g)	Food intake (g/day)	FER (%)
WKY ¹⁾	131.3±9.0 ^{ns3)}	15.5±0.4 ^{ns}	0.11±0.03 ^{ns}
SHR	128.0±5.7	16.3±0.2	0.12±0.01
WPC	123.4±9.7	15.5±0.3	0.13±0.01
Protease M	123.4±6.4	15.4±0.2	0.13±0.01
Protease S	133.0±3.9	16.0±0.3	0.14±0.00
Trypsin	127.0±5.0	15.7±0.1	0.10±0.01

¹⁾WKY: Normal control group (Wistar kyoto rat), SHR: Hypertension group (Spontaneous hypertension rat), WPC: SHR + WPC, Protease M: SHR +WPC hydrolysates used protease M, Protease S: SHR + WPC hydrolysates used protease S, Trypsin: SHR + WPC hydrolysates used trypsin

²⁾Mean±SE.

³⁾ns: not significant

나) 장기무게에 미치는 영향

실험식이 섭취가 SHR의 체중 100g당 조직의 무게에 미치는 영향은 Table 2에 나타내었음. 간, 신장, 심장, 대동맥의 무게에서는 각 군 간의 유의적 차이를 나타내지 않았으며, 비장무게에서는 WKY군에 비해 SHR군의 무게가 유의적으로 증가한 것으로 나타났으며, 실험식이를 보충섭취한 군에서는 유의적 차이가 없는 것으로 나타남.

Table 24. Effects of various WPC hydrolysates liver, heart, spleen and kidney in SHR rats

(g/100g B.W)

	Liver	Kidney	Heart	Aorta	Spleen
WKY ¹⁾	8.00±0.66 ^{2)ns3)}	1.98±0.08 ^{ns}	1.17±0.11 ^{ns}	0.09±0.01 ^{ns}	0.51±0.03 ^{a4)}
SHR	8.48±0.20	1.81±0.23	1.16±0.02	0.13±0.02	0.58±0.01 ^b
WPC	8.14±0.29	1.92±0.09	1.14±0.05	0.11±0.02	0.56±0.03 ^{ab}
Protease M	7.64±0.21	1.82±0.05	1.11±0.04	0.10±0.02	0.56±0.03 ^{ab}
Protease S	8.10±0.16	1.94±0.04	1.17±0.02	0.13±0.01	0.55±0.01 ^{ab}
Trypsin	8.06±0.21	1.90±0.03	1.13±0.02	0.14±0.02	0.54±0.01 ^{ab}

¹⁾WKY: Normal control group (Wistar kyoto rat), SHR: Hypertension group (Spontaneous hypertension rat), WPC: SHR + WPC, Protease M: SHR +WPC hydrolysates used protease M, Protease S: SHR + WPC hydrolysates used protease S, Trypsin: SHR + WPC hydrolysates used trypsin

²⁾Mean ± SE.

³⁾ns: not significant

⁴⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

다) WPC 가수분해물이 혈압강하에 미치는 영향

WPC 가수분해물의 보충섭취 전과 후의 혈압을 비교한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 실험식이를 섭취 전에는 각 그룹간의 유의적 차이를 보이지 않았으나, 9주 동안 실험식이를 보충 섭취한 결과, WKY군이 130 mmHg인 것에 비해 SHR군에서는 223.8 mmHg로 약 58% 혈압이 증가한 반면 WPC군은 SHR군에 비해 24%, Protease군은 34%, Protease S군은 36%, Trypsin군에서는 44% 혈압상승을 억제하는 것으로 나타났다. 본 연구결과 WPC 자체의 보충섭취 보다는 WPC를 가수분해한 물질을 보충섭취 하였을 경우 혈압강하에 효율적인 효과를 보이는 것으로 나타났다.

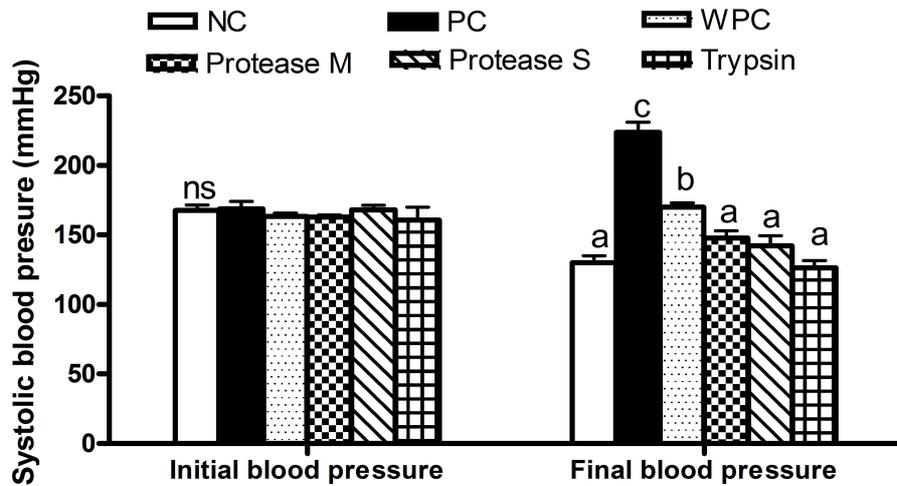


Fig. 13. Effect of various WPC hydrolysates supplementation on systolic blood pressure in SHR

WKY : Normal control group (Wistar kyoto rat, WKY)
 SHR : Hypertension group (Spontaneous hypertension rat, SHR)
 WPC: Hypertension + WPC
 Protease M : Hypertension + WPC hydrolysates used protease M,
 Protease S : Hypertension + WPC hydrolysates used protease S
 Trypsin : Hypertension + WPC hydrolysates used trypsin
 Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

라) WPC 가수분해물 보충섭취가 혈압의 변화에 미치는 영향

각각의 실험식이를 보충 투여하는 동안 1주일에 한 번씩 혈압측정 결과를 Fig 3에 나타내었음. WKY에서는 0주에서 4주까지는 유의적 차이를 나타내지 않았고 8주차에서 2주차에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였으며 9주차에서는 유의적으로 감소하는 결과를 나타내었음. 그에 반해 SHR군에서는 4주 이후 혈압이 상승하는 경향을 보였으며, 8주차에서는 혈압의 상승정도가 유의적으로 증가하였으며 그 수준은 9주차에서 지속되는 것으로 타나났음. WPC군에서는 3주차에 비해 4주차에서 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으나 9주차에서 4주차 혈압에 비해 상승하는 것으로 나타나 지속적인 투여에는 효과가 다소 감소하는 것으로 나타났으며, Protease M군에서는 2주차에서 다소 증가하는 경향을 보였으나 유의적이지는 않았으며 3주차부터 감소하는 경향을 보였으며 이는 9주차까지 지속적으로 유지되는 경향을 보였음. Protease S에서는 0주차에 비해 4주차부터 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며 9주차에서 그 효과는 0주차에 비해 유의적으로 감소함으로써 확실한 효과를 보임. Trypsin군에도 4주차까지는 혈압상승 억제효과를 보였으며 5주차부터 감소효

과를 보이며 9주차에서는 통계적 유의성을 나타내었음. 이 결과 SHR군에서는 혈압이 점차 증가하는데 반해 WPC 및 WPC 가수분해물을 보충 투여 하였을 때는 혈압상승을 억제 또는 강하하는 효과를 가지는 것으로 나타났음.

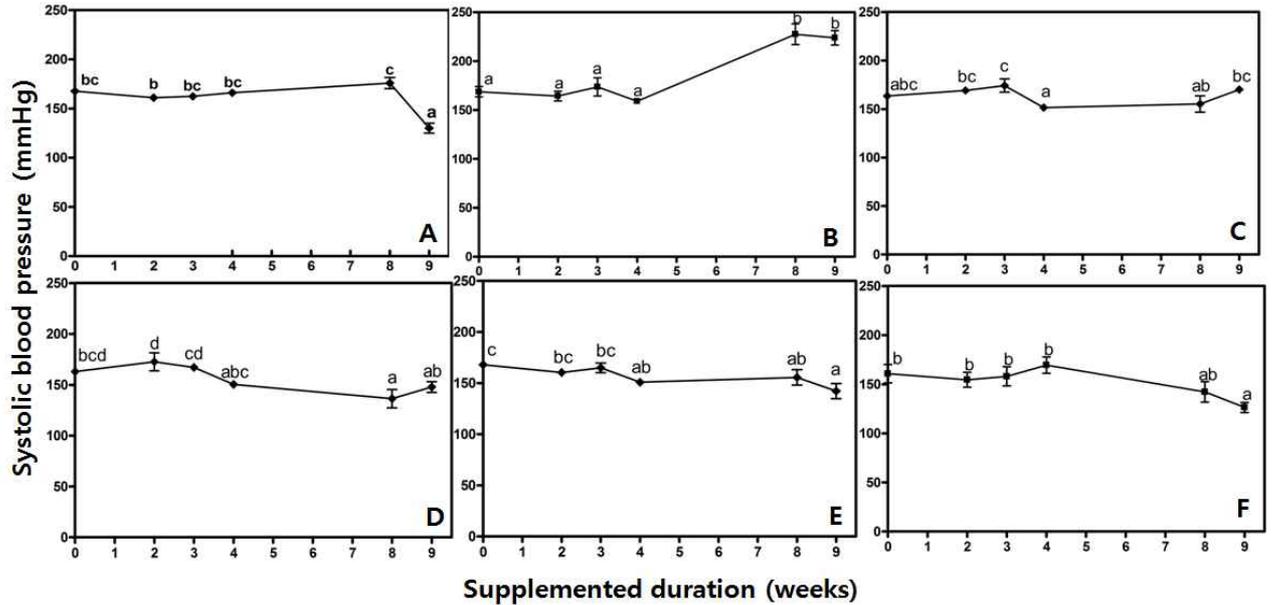


Fig 14. Change in systolic blood pressure of SHR after supplementation of various WPC hydrolysates diet for 10 weeks.

- A: Normal control group (Wistar kyoto rat, WKY), WKY
 - B: Hypertension group (Spontaneous hypertension rat, SHR), SHR
 - C: Hypertension + WPC, WPC
 - D: Hypertension +WPC hydrolysates used protease M, Protease M
 - E: Hypertension + WPC hydrolysates used protease S, Protease S
 - F: Hypertension + WPC hydrolysates used trypsin, Trypsin
- Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

마) WPC 가수분해물 보충섭취가 혈중 지질 농도에 미치는 영향

다양한 WPC 가수분해물을 보충 섭취한 SHR의 혈중 지질을 측정된 결과는 Table 3에 나타내었음. TG의 농도는 WKY와 SHR 사이의 유의적 차이는 없었으나 SHR군에서 다소 낮은 경향을 보였으며, WPC, Protease M, Protease S군에서 유의적 차이를 보이지 않음. 그에 반해 Trypsin군은 WKY군과 같은 수준의 농도를 나타내었음. TC와 HDL, LDL 콜레스테롤의 농도는 WKY에 비해 SHR를 비롯한 모든 실험식이군에서 유의적으로 낮게 나타났으며 실험식이 보충섭취군 간의 차이는 없었음. GOT 농도는 WKY군에 비해 SHR군에서 유의적으로 높은 결과를 보였으며 Protease S와 Trypsin군에서 WKY군과 같은 유의적 수준으로 감소시키는 탁월한 효과를 보였다. GPT의 분석결과에서는 유의적 차이가 없는 것으로 나타남.

Table 25. Effects of various WPC hydrolysates on lipid profiles in SHR rats

	T G (mg/dL)	T C (mg/dL)	H D L (mg/dL)	L D L ⁵⁾ (mg/dL)	G O T (U/I)	G P T (U/I)
WKY ¹⁾	82.8±7.6 ²⁾³⁾	95.8±6.9 ^b	41.0±2.8 ^b	38.2±7.0 ^b	106.25±4.2 ^a	41.00±2.9 ^{ns4)}
SHR	74.7±4.3 ^{ab}	49.0±2.3 ^a	25.0±1.6 ^a	9.1±1.2 ^a	142.50±11.5 ^b	40.17±2.0
WPC	78.9±5.8 ^b	49.6±5.4 ^a	25.4±1.9 ^a	8.4±3.3 ^a	134.60±6.5 ^b	43.80±3.6
Protease M	82.0±5.4 ^b	48.2±2.1 ^a	22.4±0.9 ^a	9.4±1.9 ^a	122.10±9.9 ^{ab}	45.40±1.7
Protease S	78.8±4.4 ^b	55.8±6.7 ^a	22.2±0.8 ^a	17.8±6.8 ^a	110.80±1.9 ^a	40.40±0.7
Trypsin	62.3±1.5 ^a	51.2±2.0 ^a	26.8±1.7 ^a	11.9±1.2 ^a	106.33±3.7 ^a	48.33±3.4

¹⁾WKY: Normal control group (Wistar kyoto rat, WKY), SHR: Hypertension group (Spontaneous hypertension rat, SHR), WPC: Hypertension + WPC, Protease M: Hypertension +WPC hydrolysates used protease M, Protease S: Hypertension + WPC hydrolysates used protease S, Trypsin: Hypertension + WPC hydrolysates used trypsin

²⁾Mean±SE.

³⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

⁴⁾Ns means not significant

⁵⁾LDL(Friedewald's analysis) = TC - (HDL + TG/5)

바) WPC 가수분해물 보충섭취가 혈중 지질과산화 및 총항산화능에 미치는 영향

혈장의 지질과산화(Conjugated Dienes, CD)와 총항산화력(Total radical trapping antioxidant potential, TRAP) 분석 결과는 table 4에 나타내었음. TRAP 측정법은 혈장 내 a-tocopherol, ascorbate, urate, protein sulfhydryl groups 등의 항산화제들의 복합된 활성을 측정하여 혈장의 총 유리기 포집 항산화능을 측정하는 방법으로 본 연구에서는 각 그룹간의 유의적 차이를 나타내지 않았음. CD는 산화적 스트레스로 인한 혈장 내 초기 과산화 상태에서 생성되는 물질로써 대표적인 지질과산화물임. 본 연구의 결과에서는 각 군 간의 유의적 차이를 보이지 않는 것으로 나타났음.

Table 26. Effects of various WPC hydrolysates on total antioxidant capacity (TRAP) and lipid peroxidation (CD) status in SHR rats

	TRAP (mM)	CD (mM)
WKY ¹⁾	1.21 ± 0.00 ^{2)ns3)}	4.02 ± 0.38 ^{ns}
SHR	1.23 ± 0.01	3.82 ± 0.08
WPC	1.06 ± 0.14	4.38 ± 0.26
Protease M	1.02 ± 0.17	4.10 ± 0.23
Protease S	1.20 ± 0.03	3.93 ± 0.14
Trypsin	1.22 ± 0.01	4.16 ± 0.11

¹⁾WKY: Normal control group (Wistar kyoto rat, WKY), SHR: Hypertension group (Spontaneous hypertension rat, SHR), WPC: Hypertension + WPC, Protease M: Hypertension + WPC hydrolysates used protease M, Protease S: Hypertension + WPC hydrolysates used protease S, Trypsin: Hypertension + WPC hydrolysates used trypsin

²⁾Mean ± SE.

³⁾Ns means not significant

사) WPC 가수분해물 보충섭취가 적혈구 항산화효소활성에 미치는 영향

식이로 섭취하는 항산화제와 마찬가지로 체내 존재하는 catalase와 GSH-Px와 같은 항산화 효소체계는 체내 항산화 능력을 좌우하는 중요한 인자라고 할 수 있음. 따라서 본 연구에서는 WPC 가수분해물의 보충섭취가 체내 항산화 체계에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 적혈구의 catalase와 GSH-Px 분석을 시행하였음. (Table 5) 분석결과, catalase 농도에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았음. GSH-Px 농도는 WKY와 SHR, WPC, Protease S군 사이의 유의적 차이가 없는 것으로 나타났으며, Protease M과 Trypsin군에서는 SHR군에 비해 유의적으로 낮은 활성을 가지는 것으로 나타났음. 이는 Protease M과 Trypsin을 이용한 PWC 가수분해물 자체의 항산화물질이 산화적 스트레스를 직접적으로 방어하는 기전으로 혈액 내 항산화체계에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료됨.

Table 27. Effects of various WPC hydrolysates on erythrocyte antioxidant enzyme status (catalase and GSH-Px) in SHR rats

	Catalase (K/g Hb)	GSH-Px (U/g Hb)
WKY ¹⁾	1652.44 ± 168.70 ^{2)ns3)}	109.01 ± 11.06 ^{ab4)}
SHR	2095.26 ± 181.53	143.34 ± 11.86 ^b
WPC	2064.46 ± 245.04	142.14 ± 17.12 ^b
Protease M	1548.15 ± 179.27	94.20 ± 8.77 ^a
Protease S	2089.39 ± 364.83	150.81 ± 25.09 ^b
Trypsin	1503.12 ± 149.08	96.73 ± 10.59 ^a

¹⁾WKY: Normal control group (Wistar kyoto rat, WKY), SHR: Hypertension group (Spontaneous hypertension rat, SHR), WPC: Hypertension + WPC, Protease M: Hypertension + WPC hydrolysates used protease M, Protease S: Hypertension + WPC hydrolysates used protease S, Trypsin: Hypertension + WPC hydrolysates used trypsin
²⁾Mean ± SE.
³⁾Ns means not significant
⁴⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

아) WPC 가수분해물 보충섭취가 백혈구의 DNA 손상도에 미치는 영향

9주간 5% SHR에 WPC 가수분해물을 보충 투여 시 유전독성에 대한 영향을 알아보기 위하여 comet assay를 이용하여 백혈구의 DNA 손상정도를 분석하였음. (Table 6) Tail DNA는 WKY와 SHR 사이에 유의적 차이가 나타나지 않았으며 WPC군을 비롯한 WPC 가수분해물을 보충 투여 시에도 유의적인 차이를 나타내지 않았음. Tail length에서는 WKY군과 SHR군 사이의 차이는 보이지 않았으며, SHR군과 실험식이 섭취군들 사이에도 유의적 차이를 나타내지 않았음. 그러나 WKY와 Protease M과 Protease S, Trypsin군 사이에서 유의적 차이를 보였으며 그 수준은 WKY에 비해 Protease M과 Protease S, Trypsin군에서 낮은 결과를 보임.

Table 28. Effects of various WPC hydrolysates on leukocytes DNA damage in SHR rats

	Tail DNA (%)	Tail Moment	Tail Length (mm)
WKY ¹⁾	7.09±0.68 ^{2)ab3)}	1.48±0.23 ^{ab}	14.88±1.31 ^c
SHR	7.42±0.23 ^{ab}	1.56±0.10 ^{ab}	12.42±0.32 ^{abc}
WPC	8.06±0.73 ^b	2.32±0.32 ^c	13.96±0.97 ^{bc}
Protease M	7.30±0.65 ^{ab}	1.58±0.27 ^b	12.24±1.08 ^{ab}
Protease S	7.02±0.46 ^{ab}	1.42±0.12 ^{ab}	11.66±0.58 ^{ab}
Trypsin	5.92±0.34 ^a	0.92±0.06 ^a	10.83±0.22 ^a

¹⁾WKY: Normal control group (Wistar kyoto rat, WKY), SHR: Hypertension group (Spontaneous hypertension rat, SHR), WPC: Hypertension + WPC, Protease M: Hypertension +WPC hydrolysates used protease M, Protease S: Hypertension + WPC hydrolysates used protease S, Trypsin: Hypertension + WPC hydrolysates used trypsin

²⁾Mean±SE.

³⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

자) WPC 가수분해물 보충섭취가 신장의 DNA 손상도에 미치는 영향

고혈압은 신장의 RAS (Rennin angiotensin system) 기전에 의해 영향을 받으며 이는 신장조직의 세포에도 영향을 미칠 것으로 생각되어짐. 따라서 본 연구에서는 신장조직의 DNA 손상정도를 분석하였으며, 그 결과를 Table 7에 나타내었음. Tail DNA는 WKY에 비해 SHR군에서 유의적으로 손상정도가 증가하였으며 WPC, Protease M, Protease S, Trypsin군에서 SHR보다 손상정도가 유의적으로 감소하였으며 Protease S군과 Trypsin군에서 손상정도가 가장 적은 것으로 나타났음. 이 결과는 tail moment와 tail length에서도 같은 경향을 보였으며 Trypsin군에서 DNA 손상정도가 SHR에 비해 유의적으로 가장 낮은 것으로 나타났음. 본 연구의 결과 Trypsin을 이용한 WPC 가수분해물의 보충섭취가 항유전독성에 탁월한 효과를 나타내는 것으로 나타났음.

Table 29. Effects of various WPC hydrolysates on kidney tissue DNA damage in SHR rats

	Tail DNA (%)	Tail Moment	Tail Length (mm)
WKY ¹⁾	13.57 ± 2.23 ^{2)ab3)}	12.05 ± 2.64 ^{cd}	55.02 ± 9.54 ^c
SHR	18.35 ± 1.08 ^c	14.47 ± 1.04 ^d	47.24 ± 2.93 ^{bc}
WPC	14.33 ± 0.96 ^b	8.93 ± 1.45 ^{bc}	34.46 ± 5.40 ^{ab}
Protease M	12.50 ± 0.68 ^{ab}	8.73 ± 1.41 ^{bc}	38.34 ± 4.59 ^{ab}
Protease S	10.17 ± 1.36 ^a	7.13 ± 0.90 ^{ab}	33.99 ± 3.89 ^{ab}
Trypsin	9.71 ± 0.53 ^a	3.79 ± 0.52 ^a	24.24 ± 2.28 ^a

¹⁾WKY: Normal control group (Wistar kyoto rat, WKY), SHR: Hypertension group (Spontaneous hypertension rat, SHR), WPC: Hypertension + WPC, Protease M: Hypertension + WPC hydrolysates used protease M, Protease S: Hypertension + WPC hydrolysates used protease S, Trypsin: Hypertension + WPC hydrolysates used trypsin

²⁾Mean ± SE.

³⁾Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$.

차) 결론

WPC 및 여러 가지 효소를 이용한 WPC 가수분해물을 이용하여 혈압강하효과를 분석하기 위하여 시료의 ACE 억제력을 분석한 결과, 표준물질에 비해 Protease M이 억제력이 가장 높은 것으로 나타났으며, 그 다음으로 S와 WPC의 억제력이 높은 것으로 나타남. In vitro 모델에서 ACE 활성 억제에 효과가 있는 시료를 선택하여 본 태성고혈압 모델인 SHR을 이용하여 10주간 보충투여를 실시하였음. 그 결과, 체중 및 식이효율에서는 유의적 차이가 없었으며, 장기무게에서도 유의적 차이를 보이지 않았다. 비장의 무게에서 SHR군에서 유의적으로 높은 수치를 보였으나 실험식이를 섭취한 군에서는 통계적 유의성이 없는 것으로 나타남. 이는 고혈압이 비장의 무게에 영향을 미치는 것으로 사료되어 짐. 처음 혈압과 마지막 혈압을 비교하였을 때, 처음 혈압에서는 군별 유의성이 없는 것으로 나타난 반면, 마지막 혈압에서는 SHR군에서 가장 높은 수치를 나타내었으며, WPC, Protease M, Protease S, Trypsin군에서는 SHR군에 비해 유의적으로 낮은 수치를 보임. 뿐만 아니라 WPC군이 비해 가수분해물들이 효과가 월등했으며 WKY과 같은 수준을 나타내었음. 주별 혈압의 변화를 분석한 결과, WKY군에서는 유의적 차이를 보이지 않았으나 SHR군에서는 점차적

인 혈압 상승 경향을 보인 반면, 실험식이를 섭취하였을 때는 혈압이 유지(WPC, Protease M)되거나 강하(Protease S, Trypsin)되는 효과가 있는 것으로 나타났다. 혈중 지질양상 분석 결과, GOT 농도는 WKY군에 비해 SHR군에서 유의적으로 높은 결과를 보였으며 Protease S와 Trypsin군에서 WKY군과 같은 유의적 수준으로 감소시키는 탁월한 효과를 보임.

항유전독성에 대한 결과는 신장의 DNA 손상정도 분석에서 WKY군에 비해 SHR군에서 손상정도가 증간한데 반해 실험식이를 보충섭취 하였을 경우, 손상정도가 감소하는 것을 알 수 있었음.

따라서 본 연구의 결과, WPC 가수분해물을 이용한 기능성 음료가 개발된다면 보충섭취 시 혈압강하 효과뿐만 아니라 체내 항유전독성에도 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료됨.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구개발목표 및 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (200)	(1차 세부과제) 국제 경쟁력 있는 비숙성 치즈 생산	저온냉각에 따른 원유품질변 화과약 및 비숙성치즈의 제 조	100	원유의 저온 저장기간 동안 일 어나는 성분변화와 저온 저장 기간에 따라 제조된 비숙성 치 즈의 이화학적, 물성학적, 전자 현미경적, 관능적 특성을 조사 하여 원유의 저온 냉각기간이 품질에 끼치는 영향을 연구함.
		치즈베이스 의한 비숙성 치 즈의 제조가능성 및 품 질 조사	100	한외여과 기술로 제조한 치즈 베이스를 이용하여 치즈를 제 조하고 Control 치즈와의 이화 학적, 물성학적, 관능적 특성을 조사하여 비교함.
		WPC 강화 비숙성 치즈 제 조	100	비숙성 치즈의 부산물인 whey 를 이용하여 WPC를 제조하고 그것을 치즈 원료유에 첨가하 여 치즈를 제조함. Control 치 즈와의 이화학적, 물성학적, 관 능적 특성을 조사하여 비교함.
		두유를 첨가한 비숙성 치즈 의 제조	100	Soy milk를 첨가한 원료유로 치즈를 제조하여 Control 치즈 와의 이화학적, 물성학적, 관능 적 특성을 조사하여 비교함.
		비숙성 치즈 및 프로바이오 틱 유산균 스타터 시료 준비	100	프로바이오틱 유산균 스타터를 선발했음.
		비숙성 치즈의 부가가치를 높일 수 있는 플라보노이드 의 탐색	100	양파, 흑미, 밀감의 부산물을 이용하여 플라보노이드를 추출 하여 폴리페놀함량과 항산화효 과를 검증함.
		기존의 확보된 유산균 및 상 업적인 유산균 생리적 특성 연구 및 건강기능성 검증	100	상업용 균주 중 4종류와 본 실 험실에서 분리된 <i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> NK34를 사용하여 실험 된 모든 균주에 대해서 내산성 및 내담즙성을 하였음. 이들 결과를 토대로 혼합균주 SM과

				La-5, <i>Lactococcus lactis</i> NK34를 스타터 균주로 결정하였음.
		생산된 비숙성 치즈의 미생물학적 검사를 통한 안전성 확인	100	총균수, 저온성균 및 유산균의 변화는 모든 cottage cheese sample에서 0, 7, 14일째 확인할 수 없었음. 미생물학적 검사를 통해서 안전성을 확인하였음.
(협동과제) 비숙성 치즈 및 프로바이오틱 유산균 스타터의 <i>in vivo</i> 실험을 통한 콜레스테롤 저하 활성 평가		식이 제조 및 동물 사육	100	고지혈증을 유발한 SD 웅성 쥐에서 콜레스테롤 저하 효과 및 항산화 활성 효과를 검증하기 위해 기능성 스타터를 첨가한 비숙성 치즈를 6주간 투여한 후 12시간 절식 후 희생하였다.
		혈장 지질 측정	100	효소비색법에 의한 정량용 kit 시약(Bioclinal system, 한국)을 사용하여 TG, TC, HDL-cholesterol, GOT, GPT를 분석하였으며 LDL-콜레스테롤은 Friedewald 계산법을 사용하였음.
		간, 변 지질대사물 측정	100	간과 변의 지질대사물을 측정하기 위해 Folch법을 이용하여 지질을 추출하였으며, total lipid, TG, TC 분석을 수행하였음.
		혈장 및 조직의 지질과산화 측정	100	혈장에서 LDL을 추출한 후 CD 분석을 시행하였으며 간의 과산화 지질을 분석하기 위하여 TARS 분석을 수행하였음.
		백혈구 내 DNA 손상의 측정	100	Collins등에 의해 고안된 comet assay 방법을 이용하여 DNA 손상을 측정하였음.
		혈장 내 지용성 항산화비타민 분석	100	혈장 내 단백질을 제거하고 n-hexane으로 지방을 추출한 후 high performance liquid chromatography(HPLC, Dionex, Korea)로 측정하였음.
		적혈구 내 항산화효소 활성 분석	100	catalase 활성은 용혈 된 적혈구에 phosphate buffer와 hydrogen peroxide를 첨가한 후 hydrogen peroxide의 감소량을 spectrophotometer를 이용하여 240nm에서 30초간 측정하였음.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	[제1세부과제] 고부가가치 식품소재인 WPC 가수분해물의 생산 및 기능성 조사	한외여과기법을 이용하여 유청단백질(WPC)을 농축된 형태로 분리	100	유가공분야의 신기술인 한외여과기법을 이용하여 비숙성 치즈 제조의 부산물인 유청에서 탁월한 식품소재인 유청단백질을 농축된 형태로 분리하였음.
		WPC에서 ACE 저해효과 있는 생리활성 펩타이드의 선별적 제조 및 적정조건 파악	100	alcalase(Novozymes, Denmark), protease M(Amano Enzyme, Japan), protease S(Amano Enzyme, Japan), Trypsin(Novozymes, Denmark), Pepsin(Yakuri Pure Chemicals, Japan) 를 사용하여 적합한 효소의 선정과 적정한 가수분해 조건을 탐색하였음.
		WPC 및 WPC 가수분해물 추출물 제조	100	WPC를 선정한 효소와 가수분해 조건에 따라 처리하여 WPC 가수분해물 추출물을 제조하였음.
		WPC 가수분해물의 물리화학적 및 기능성 조사	100	추출한 WPC 가수분해물의 일반성분, 이화학적 특성(pH, 밀도, 기포형성력, 용해도, HMF 함량, -SH기 함량, NPN 함량, 단백질 가수분해도)를 측정하였고, 전기영동을 통해 단백질 밴드를 관찰하였음.
		추출물의 ACE 저해활성 평가	100	WPC 가수분해물의 Angiotensin Converting Enzyme 저해 효과를 측정하여 혈압조절 효과를 관찰하였음.
		비숙성 치즈의 부가가치를 높이기 위해 선정된	100	양파, 흑미, 밀감 중 가장 폴리페놀함량이 높은 양파를

	플라보노이드의 특성 및 기능성 조사		이용하여 다양한 방법으로 항산화능을 측정함.
	건강기능성이 검증된 유산균의 생산최적화	100	<i>Lactococcus lactis</i> NK34의 생산최적화: 탄소원, 질소원, 무기염을 선정하여 반응표면분석을 한 결과, 최대생산점은 1.96% sucrose, 1.14% tryptone, 1.07% yeast extract, 0.14% Tween 80, 0.12% sodium acetate, 0.12% NaCl의 성분에서 9.5 Log CFU/mL로 최대값을 나타냈으며, 기존의 lactobacilli MRS medium 보다 1 Log CFU/mL 증가시켰음.
	유산균을 이용한 WPC의 생물전환에 의한 펩타이드 생성	100	TCC-3, ABTF, <i>Lactococcus lactis</i> NK34에 대해 WPC의 생물전환을 검토한 결과, <i>Lactococcus lactis</i> NK34에서 가장 높은 46.7% ACE 저해 효과를 확인할 수 있었음.
[협동과제] <i>In vitro</i> 및 SHR 모델을 이용한 WPC 가수분해물의 혈압 강하효과 검증	WPC 가수분해물의 ACE 저해활성 평가	100	ACE (Angiotensin converting enzyme) 저해활성을 표준물질 대비 WPC 가수분해물의 억제율을 분석함으로써 동물모델에 적용할 시료를 선별하였음.
	WPC 가수분해물의 혈압 강하효과 검증	100	선별된 가수분해물을 쥐에게 보충투여 함으로써 혈압강하에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 분석 하였음.
	WPC 가수분해물의 보충섭취가 혈중 지질농도에 미치는 영향 평가	100	TG, TC, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, GOT, GPT 농도를 분석함으로써 WPC 가수분해물이 혈중 지질농도에 미치는 영향을 분석하였음.
	WPC 가수분해물의 보충섭취가 항산화체계에 미치는 영향 평가	100	혈장의 TRAP, CD 농도를 분석함으로써 WPC 가수분해물이 혈중 항산화 상태에

				미치는 영향을 분석하였음.
		WPC 가수분해물의 보충섭취가 백혈구 및 신장조직 세포의 DNA 손상에 미치는 영향	100	백혈구 및 신장조직을 이용한 DNA 손상을 분석함으로써 WPC 가수분해물이 항유전독성에 미치는 영향을 분석 하였음.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	달성도 (%)	연구범위
3차 년도 (2011)	[제1세부과제] ACE 저해효과 있는 펩타이드 를 이용한 기 능성 유청음료 의 제조	○ACE 저해 효과있는 펩타이드의 음료 배합비 결정	100	복합시스템에서 ACE 저해 효과있는 펩타이드의 음료 배합비를 결정함.
		○프로바이오틱 함유기능성 건강음료의 배합비 결정	100	프로바이오틱 유산균을 함유하는 WPC 가수분해물을 이용하여 기능성 건강음료의 생산에 필요한 소재의 배합비를 결정함.
		○플라보노이드의 생산최적화	100	비숙성치즈의 부가가치를 높이기 위한 플라보노이드의 생산을 최적화함.
		○기능성 건강음료의 실험실적 제조 및 파일로트 플랜트에서 생산	100	기능성음료를 실험실에서 제조 후 파일로트 플랜트에서 적정하게 생산했음.
		○인스턴트 건강음료믹스의 제조	100	음료믹스의 인스턴트화를 수행했음.
		○기능성 유청음료의 미생물학적 검사와 유통기한 설정	100	대량생산된 기능성 유청음료를 미생물학적 검사를 통해 안전성을 확인하고 유통기한을 설정하고자 함.
	[협동과제] 기 능성 유청음료 의 ACE 저해 활성 및 동물 실험을 통한 고혈압 억제 활성 평가	○유청음료의 ACE 저해활성 평가	100	유청음료의 ACE 저해활성을 분석함으로써 유효농도를 결정하고자 함.
		○식이 제조 및 본태성 고혈압 쥐 (SHR) 사육	100	본태성 고혈압쥐를 이용한 기능성 음료의 혈압 강하효과를 분석하고자 함.
		○혈압 측정	100	주 1회 측정을 통해 주변 혈압변화를 파악함.

		○생화학적 검사	100	혈액 및 조직 내의 지질양상 및 항산화 상태를 분석함으로써 기능성 음료의 효과를 검증함.
		○혈장, 대동맥, 신장의 ACE 활성 측정	100	혈장, 대동맥 및 신장의 ACE 활성을 분석함으로써 기능성 유청음료의 혈압강화에 미치는 영향에 분석함.
		○데이터 분석 및 보고서 작성	100	SPSS program을 이용한 통계 분석을 통하여 각 군 간의 유의수준을 검증함.

제 2 절 연구개발 실적 및 기술발전예의 기여도

1. 연구개발 실적

가. 연구 결과에 대한 학술논문 발표

1) SCI(E)

가) Effects of processing parameters of spray drying on some of the quality attributes of whey protein concentrate hydrolysates.

- 저자: S.H. Yoo, H.M. Jayaprakasha, S.Y.Lee, H.D.Paik and Y.C.Yoon
- 학술지명: Milchwissenschaft 64(1) sp.78-81
- 발행연도: 2009

나) Cytotoxic effects of whey protein hydrolysates prepared by enzymatic hydrolysis

- 저자: G.H.Choi, S.H.Yoo, Y.C.Yoon and H.-D.Paik
- 학술지명: Milchwissenschaft 64(4) p. 406-408
- 발행연도: 2009

다) Production of Ready-to-Reconstitute Functional Beverages by Utilizing Whey Protein Hydrolysates and Probiotics

- 저자: Sabbini Kalyan Kumar, Heddur Manjappa Jayaprakasha, Hyun-Dong

Paik, Soo-Ki Kim, Song Ee Han, A-Ram Jeong, and Yoh Chang yoon
- 학술지명: Korean J. Food Sci. Ani. Resour. Vol.30. No. 4. pp. 575~581
- 발행연도: 2010

라) Production of ready-to-reconstitute functional beverages by utilizing whey protein hydrolysates and probiotics

- 저자: Sabbini Kalyan Kumar, 윤여창, Heddur manjappa jayaprakasha, 백현동, 김수기, 한송이, 정아람
- 학술지명: Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 30(4)
- 발행연도: 2010

마) Angiotensin-converting enzyme inhibitory effects of whey protein hydrolysate prepared using Protamex

- 저자: 조미나, 백현동, 이나경, 윤여창
- 학술지명: Milchwissenschaft 66
- 발행연도: 2011

바) ACE-inhibitory Effect and Physicochemical Characteristics of Yogurt Beverage Fortified with Whey Protein Hydrolysates

- 저자: Sung-Min Lim, Na-Kyoung Lee, Keun-Kyu Park, Yoh Chang Yoon, and Hyun-Dong Paik
- 학술지명: Korean J. Food Sci. Ani. Resour. Vol.31, No. 6 pp.886~892
- 발행연도: 2011

사) 한외여과 농축유로 제조한 모짜렐라 치즈의 품질에 관한 연구

- 저자: 송광영, 서건호, 이시경, 한송이, 김명희, 김송희, 목보람, 윤여창
- 학술지명: Korean J. Food Sci. Ani. Resour. Vol.31, No. 6 pp.907~913
- 발행연도: 2011

아) Characterization of bioactive peptides derived by enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate

-저자: Y.SCHOBBER, S.H.YOO, H.-D.PAIK, E.J.PARK, B.SPENGLER, A.ROMPP, H.M.JAYAPRAKASHA, and Y.C.YOON
- 학술지명: Milchwissenschaft 67(1)
- 발행연도: 2012

2) 학진등재지

가) 유청단백질 가수분해물이 과산화수소로 유도한 인체 백혈구의 DNA 손상과 Repair에 미치는 효과

- 저자: 전경임, 윤여창, 백현동, 박은주
- 학술지명: 대한암예방학회지 제 14권 제 2호 p.146-152
- 발행연도: 2009

나) 치즈유청으로부터 제조한 유청단백질 가수분해물의 특성에 관한 연구
Characteristics of Whey Protein(WPC-30) Hydrolysate from Cheese Whey

- 저자: 윤여창, 안성일, 정아람, 한송이, 김명희, 이창권
- 학술지명: Journal of Animal Science and Tchnology 52(5) 435~440
- 발행연도: 2010

3) 일반학술지

가) 저온 냉각이 원유의 품질에 끼치는 영향에 관한 연구

- 저자: 정아람, 한송이, 김명희, 김송희, 박은주, 윤여창
- 학술지명: Korean J. Dairy Sci. Technol. Vol. 29. No. 1, pp 59~63
- 발행연도: 2011

나) 한외여과로 농축된 원유로부터 제조된 Mozzarella 치즈의 이화학적 특성에 관한 연구; 총설

- 저자: 송광영, 이종익, 천정환, 현지연, 서건호, 윤여창
- 학술지명: Korean J. Dairy Sci. Technol. Vol. 29. No. 2, pp 1~15
- 발행연도: 2011

나. 연구 결과에 대한 특허 출원

1) 특허출원 3건

가) 출원번호: 10-2010-0009216

출원일: 2010.02.01

제목: 산업용 효소인 protamex를 이용한 유청단백질 가수분해물의 안지오텐신 전환 저해효과

나) 출원번호: 10-2010-0031324

출원일: 2010.04.06

제목: 한외여과를 이용한 비숙성 치즈의 제조방법

다) 출원번호: 10-2010-0065347

출원일: 2010.07.07

제목: 기능성 아이스크림의 제조방법

2) 특허 등록 3 건

가) 등록번호: 10-0963862

등록일: 2010.06.08

제목: 농축유청단백질을 이용한 바실러스 폴리퍼멘티쿠스 SCD 배양 배지 조성물

나) 등록번호: 10-1013590

등록일: 2011.01.31

제목: 유지방 가수분해물을 함유한 탁주의 제조방법

다) 등록번호: 10-0979448

등록일: 2010.08.26.

제목: 유청 단백질 가수분해물과 프로바이오틱(probiotic) 유산균을 첨가한 기능성 음료 및 그의 제조방법

2. 관련분야 기술발전예의 기여도

- 현재 수입 치즈는 2007년 현재 국내소비량의 50%를 차지하고 있어 경쟁력이 낮음 이에 따라 치즈를 개발하려는 움직임이 활발함. 본 연구가 수행됨으로써 국제 경쟁력 있는 기능성 비숙성 치즈 제조 개발에 기여할 수 있음. 따라서 국내 치즈 소비증진에 기여함으로써 우유 소비확대에 기여할 수 있으며, 고부가가치의 고품질의 치즈 공급으로 말미암아 국민의 건강에 크게 기여할 수 있음.
- 수입에 의존하고 있는 비숙성 치즈의 가격 경쟁력과 품질 경쟁력의 확보에 기여할 수 있음. 본 과제에 의해 개발되는 비숙성 치즈가 향후 좋은 모델이 될 수 있음.
- 치즈 부산물인 유청에서 ACE저해효과 있는 생리활성 펩타이드를 선택적으로 생산하는 적정조건을 파악하여 부산물에서 탄산음료와 같은 우유 경쟁식품에 대처 가능한 고부가가치제품을 생산할 수 있음.
- 건강기능성을 가지는 우수 프로바이오틱 유산균 스타터의 선발로 국민 건강 증진과 이 분야 산업기술 향상

제 5 장 연구성과 및 성과활용 계획

제 1 절 기대 성과

- 현재 수입 치즈는 2010년 현재 국내 소비량의 50%를 차지하고 있어 경쟁력이 낮음. 이에 따라 치즈를 개발하려는 움직임이 활발함. 본 연구가 수행됨으로써 국제 경쟁력 있는 기능성 비숙성 치즈 제조 개발에 기여할 수 있음. 따라서 국내 치즈 소비 증진에 기여함으로써 우유 소비 확대에 기여할 수 있으며, 고부가가치의 고품질의 치즈 공급으로 말미암아 국민의 건강에 크게 기여할 수 있음
- 수입에 의존하고 있는 비숙성 치즈의 가격 경쟁력과 품질 경쟁력의 확보에 기여할 수 있음. 본 과제에 의해 개발되는 비숙성 치즈가 향후 좋은 모델이 될 수 있음.
- 치즈 부산물인 유청에서 ACE 저해효과 있는 생리활성 펩타이드를 선택적으로 생산하는 적정조건을 파악하여 부산물에서 탄산음료와 같은 우유 경쟁식품에 대처 가능한 고부가가치 제품을 생산할 수 있음.
- 건강기능성을 가지는 우수 프로바이오틱 유산균 스타터의 선발로 국민 건강 증진과 이 분야 산업기술 향상
- 치즈에 첨가할 수 있는 플라보노이드(양파추출물)의 발굴 및 활용

제 2 절 타 연구에의 응용 및 산업체 활용 방안

1. 치즈유청을 이용한 인스턴트 건강음료에 관한 체계적인 연구로 학문적 기초자료 제공
2. 치즈유청의 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱스를 이용한 건강음료 제조 및 관련 사항에 대한 지적재산권 취득 및 참여기업 또는 관련 기업들에 대한 산업체 기술 이전 실시 예정.
3. 참여기업체 및 음료 관련 중소기업과 연계하여 치즈유청을 활용한 새로운 신상품을 개발하기 위해 기술지도 및 산업화할 계획임.
4. 치즈유청의 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱스를 이용한 인스턴트 건강음료 제조법 및 제조 공정에 대한 기준 모델을 제시함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 국외 논문

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
- 4) 요약

β -lactoglobulin(β -Lg)와 α -lactalbumin(α -La)의 효소를 사용하여 가수분해하였다. 그리고 WPC의 가수분해물은 ACE 활동을 저해하는 것으로 나타났다. 대체적으로 가수분해 하지 않은 기질은 가수분해한 기질보다 매우 낮은 ACE 저해효과를 가진다. 고혈압 예방을 위한 기능성 식품으로써 WPC의 잠재적인 응용성을 검토하였다.

나. Functional and Biological Properties of Peptides Obtained by Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins

- 1) 저자 : S. F. Gauthier
- 2) 저널 : J. Dairy Science
- 3) 발행연도 : 2003
- 4) 요약

이 연구는 WPH가 사용하는 효소를 유청 단백질의 열안정성을 개선하는 목적을 두고 있다. 트립신으로 가수분해한 펩타이드는 열안정성에 개선되어 졌다. 최근 연구에서 가수분해한 유청 펩타이드는 항고혈압 특성을 증명하는 생리적인 기능을 일으킬 수 있다고 보여 졌다. 이 연구는 일정한 펩타이드의 프렉션의 필터링에 의한 가수분해의 분류에 초점을 맞추었다.

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

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

3) 발행연도 : 2007

4) 요약

WPC는 철결합을 위한 가수분해물의 유효성 검사를 하기 위한 9개의 단백질 가수분해효소에 의해 가수분해 하였다. WPC의 가수분해도는 다른 효소(esperase, neutrase, papain, pepsin, protease, trypsin)와 비교하여 pancreation(13.91%), alcalase(13.60%), flavourzyme(12.80%)가 높았다. Alcalase로부터 분해한 펩타이드의 분자량은 6.5kDa보다 낮았다. Alcalase 가수분해물에 의한 Iron-binding은 모든 다른 가수분해물 중에서 97.6%로 가장 높았다. 이러한 분리된 fraction은 Lys(18.09%), Ala(17.24%), and Phe(16.58%) 함량들이 높게 나타났다. Alcalase는 WPC로 분리한 iron-binding 펩타이드에 분리를 위한 가수분해물의 생산하기 위한 다른 효소보다 두드러진 효율성을 보여준다.

라. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates

1) 저자 : Elizabete Lourenco da Cost

2) 저널 : J. Dairy Science

3) 발행연도 : 2006

4) 요약

WPI로부터 획득하여 가수분해물 활력에서 열처리와 효소처리의 영향을 실험하였다. WPI는 65°C~95°C에서 미리 변성하여 Alcalase, α-chymotrypsin 혹은 Proteomix를 사용하여 가수분해하였다. 이렇게 얻어진 가수분해물은 ACE(angiotensin converting enzyme)저해활동과 SHR(spontaneously hypertensive rats)에서 혈압을 낮추는 것에 관하여 연구하였다. α-chymotrypsin 효소는 높은 ACE저해활동이 발견되어졌다. Alcalase 효소로 처리되고 65°C에서 열처리에서 얻어진 가수분해물이 SHR에서 가장 효과적으로 감소되었다.

제 7 장 참고문헌

Abd EL-Salam, M. El-Shibiny, S. Mahfouz, M. B. El-Dein, H. F. El-Atriby, H. M., and Antila, V. 1991. Preparation of whey protein concentrate from salted whey and its use in yogurt. *J. Dairy Res.*, 58, 503

Adler-Nissen, J. 1976. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem.* 24:1090-1093.

Adler-Nissen, J., Eriksen, S., and Olsen, H. S. 1983. Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. In *Plant proteins for human food*; Bodwell, C. E. and Petit, L., Nijhoff, M., and Junk, W. (eds.), The Hague., pp. 207-219

A.O.A.C. 1990. Official method of analysis. Association of Official Analytic Chemists. Washington D.C., U.S.A.

Angevine, N. C. 1973. Quality control of Cottage cheese. *Cult. Diry Prod. J.* 8:30.

Aylward, E. B., J. O'leary, & B. E. Langlois. 1980. Effect of milk storage on Cottage cheese yield. *J. Dairy Sci.* 63:1819-1825.

Bigalke, D. 1985. Cottage cheese quality process control and process standards. *Dairy Food Sanit.* 5:23-24.

Cheryan, M. 1986. Ultrafiltration handbook. Technomic Publishing Co., Pennsylvania.

Clemente, A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Tech.* 11:254.

Driessen, F. M. and van den berg. M. G. 1990. New developments in whey drinks. *IDF Bulletin*, 250, 11-19.

Fiat, A. M., Migliore-Samour, D., Jolles, P., Drouet, L., Sollier, C. B. D. and Cean. J. 1993. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis

on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J. Dairy Sci.* 76:301.

FitzGerald, R. J., and H. Meisel. 1999. Lactokinins: whey protein-derived ACE inhibitory peptides. *Nahrung.* 43:165.

Gallaher, D., and M. Schmidl. 1998. Bioactive and nutraceutical entities found in whey. Paper presented at Institute of Food Technologists, Annual Meeting, June Atlanta, Georgia, USA.

Holsinger V. H.: Whey beverages- A review. 1974. *J. Dairy science*, 57,8

Jayaprakasa, H, M, R, S. Patel, and E. Renner. 1993. Application of ultrafiltration technology for production of whey protein concentrate. Proc X Nat conf IMS on recent Trends in Membrane Science and Technology Jan 21-22, p 123.

Kananen, A., J. Savolainen, J. Mäkinen, U. Perttilä, L. MyllyKoski, and A. Pihlanto-Leppälä. 2000. Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin. *Int. Dairy J.* 10:691

Kosikowski, F. V. 1982a. Characteristics of Cottage cheese from waste and permeate reconstituted retentates. *J. Dairy Sci.* 65:1705.

Kosikowsky, F. V. 1979. Whey utilization and whey products. *J. Food Sci.* 62, 1149-1160.

Law, A. J. R., J. M. Banks, D. S. Home, J. Leaver, and I. G. West. 1994. Denaturation of the whey proteins in heated milk and their incorporation into Cheddar cheese. *Milchwissenschaft.* 49:63.

Marshall, W. E., 1994. In *Functional Foods, Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*(Goldberg I, editor). Chapman and Hall, New York. 242-260.

Maubois, J. L., and G. Ollivier. 1997. Extraction of milk proteins. In *Food Proteins and Their Applications* (Damodaran, S., and A. Paraf, editors).

Mullally, M. M., H.Meisel, and R.J. FitzGerald. Biol. Chem. Hoopé-Seyler., 377:259(1996)

Pahud, J. J., J. C. Monti, and R. Jost. 1985. Allergenicity of whey protein: its modification by tryptic in vitro hydrolysis of the protein. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 4:408.

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

Renner, E., and M. H. Abd. El-Salam. 1991. Ultrafiltration of milk. Page 112 in Application of Ultrafiltration in Dairy Industry. Elsevier Appl. Sci. Publ., London, England.

Tratnik, L. and Krgev, L. 1988. Production of fermented beverage from milk with demineralized whey. Milchwissenschaft. 43(11), 695-698.

Waltsta P & Jenness R 1984 Dairy chemistry and physics. Wiley interscience

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

Zadow, J. A. 1984. The effect of new technology on the nutritional value of dairy products. *Aust. J. Dairy Technol.* 39:104.

SUMMARY

I. Title

Industrialization of internationally competitive fresh cheese and functional whey beverage using cheese by-product

II. Objective and Importance of Research

The problem of Korean cheese lies in low price competitiveness and low yield against imported foreign cheese. To cope with this problem the possibility of unripened cheese production with improved yield and cost saving method must be investigated. The concentration of the materials by using ultrafiltration gets the space-saving effect and easy management. As a result the cheese of quality that is important in domestic dairy farming industry will be able to develop with economic method. The usage of soy as an additive and WPC can also provide the possibility to save raw material. Production of WPC hydrolysates and functional investigation is currently drawing an international attention. The selective production of bioactive peptide with high functional characteristic can provide a possibility for development of new type dairy products. Manufacture of healthy beverage mixture that contain physiological activity peptide and probiotics and productive and store characteristic test of functional healthy beverage offer the example of industrial application of bioactive peptide hydrolysate.

III. Research Development Contents and Scope.

A. Industrialization of internationally competitive fresh cheese

- Investigation on raw milk quality change during deep cooling and production of unripened cheese
- Possibility cheese production using cheese base and quality investigation
- Production of WPC fortified unripened cheese
- Addition of soy milk for the production of unripened cheese
- Preparation of probiotic lactic acid starter
- Investigation on Flavonoid that can enhance the unripened cheese
- Analysis of physiological characteristics and functionality of starter
- Microbiological test for manufactured cheese

B. Evaluation of cholesterol lowering activity of unripened cheese and probiotics

- Experiment animal and diet
- Measurement of blood serum and lipids
- Measurement of liver, feces, lipids metabolism
- Measurement of hydroperoxide in blood serum and tissues
- Measurement of DNA damage in leukocyte
- Analysis of fat-soluble antioxidative vitamin in blood serum
- Analysis of antioxidative enzyme activity in erythrocyte

C. Production of WPC hydrolysates and investigation on functionality

- Separation of WPC by using ultrafiltration
- Selective production of bioactive peptide and investigation on optimum condition
- Production of WPC and WPC hydrolysates
- Investigation on physico-chemical characteristics and functionality of WPC hydrolysate
- Evaluation of ACE inhibitory activity
- Investigation on flavonoid characteristics and functionality
- Optimization of production of selected lactic acid bacteria
- Production of peptide by biological inversion of WPC

D. Measurement of blood pressure lowering effect of WPC hydrolysates

- Evaluation of ACE inhibitory activity of WPC hydrolysates
- Test for blood pressure lowering effect of WPC hydrolysates
- Evaluation of blood lipid level for WPC hydrolysates supplementary diet
- Evaluation of anti-oxidative system for WPC hydrolysates supplementary diet
- Evaluation of leukocyte and kidney cell DNA damage for WPC hydrolysates supplementary diet

E. Production of functional whey beverage by using ACE inhibitory peptide

- Beverage formulation for ACE inhibitory peptide

- Health beverage formulation that contain probiotics
- Optimization of flavonoid production
- Production of health beverage in laboratory and pilot plant
- Production of instant health beverage mix
- Microbiological test and determination of shelf-life of functional whey beverage

F. Evaluation of ACE inhibitory activity and hypertension suppressive activity of functional health beverage

- Evaluation of ACE inhibitory activity of whey beverage
- Experiment SHR and diet
- Blood pressure measurement
- Biochemical test
- Measurement of ACE inhibitory activity for blood serum, aorta, kidney
- Data analysis and preparation of report

IV. Result and Suggestion for Application

1. Results of this research

- General component content of raw milk (fat, protein, whey, total solids) was decreased in proportion to the length of cold storage.
- The pH of raw milk was decreased in according to the length of cold storage. In electrophoresis images, β -casein which was one of the composition of raw milk was decreased as the period of cold storage
- The content of Ca and P in the serum casein was increased in accordance with the length of cold storage.
- The yield of unripened cheese was decreased according to length of the cold storage of raw milk. The curd of cheese which was made by immediately after offering raw milk had the most excellent texture, appearance, and hardness.
- When the period of cold storage on raw milk was delayed, moisture content would decreased ash, protein and fat contents was similar, water soluble nitrogen compounds, total plate count, psychrotrophic bacteria count tended to increase.
- Springiness and Cohesiveness of cheese decreased as long as the length

of raw milk storage.

- Brittleness was increased. In SEM observation, each cheese which was produced according to cold storage had a rough surface and diameter of micelle was decreased.
- WPC and probiotics containing diet showed positive results particularly in terms of γ -tocopherol in blood serum and lipids metabolism. Cheese containing diet lead to decrease in DNA damage of erythrocyte.
- As the hydrolysis is going on, the lower pH value was shown and density increased up to almost 1.5 times after hydrolysis.
- All the samples were shown increasing foaming capacity with the hydrolyzed time.
- Solubility showed the lowest value at pH 4.0
- The HMF content does not show a regular change as hydrolysis-time goes by.
- The level of free SH group was sharply decreased for half hour and gently decreased thereafter.
- The level of NPN was steadily increased as the time passed by.
- In SDS-PAGE patterns, the bands of relatively large molecular weight became weak or were disappeared and the new bands of molecular weight of less than 6kDa appeared.
- Bitterness score was increased by hydrolysis Especially, that of hydrolysate by Alcalase was very strong
- WPC hydrolysate supplementary diet showed positive result in terms of blood pressure lowering effect.
- Trypsin was selected to produce the health beverage.
- Whey beverages were prepared with hydrolysis WPC, sweetener, citric acid, flavor and probiotics. The samples were stored at 4°C or 22°C for 6 weeks.
- The pH-values reduced from all sample and acidities increased at room temperature
- The specific gravity and bulk density of whey beverages did not receive a remarkable effect in sample during storage.
- The probiotics of whey beverages showed more reduced count in room temperature than in refrigeration storage.
- The viscosity of whey beverages were reduced from all sample.
- Non protein nitrogen content of beverages were increased during the storage period.

- Beverage produced by WPC hydrolysate showed blood pressure lowering effect in SHR model.

2. Suggestion for application of result

- The imported cheese comprise 90% of domestic market. The necessity to retain the competitiveness is now actual. The result of this study can contribute to manufacture the unripened cheese with competitiveness. Thus, the milk consumption can be enhanced and cheese with high quality can contribute the nation's health.
- The unripened cheese that was developed in this study can be ideal model to develop the cheese with price and quality competitiveness.
- The concentration of the materials by using ultrafiltration gets the space-saving effect and easy management. As a result the cheese of quality that is important in domestic dairy farming industry will be able to develop with economic method.
- The selective production of bioactive peptide will be able to contribute the development of milk beverages that competes with a carbonated drink and a soft drink.
- Consequently there is a possibility becoming the contribution in income of the livestock raising farmhouse. Supply of functional milk beverages of a higher value will be able to contribute public health.
- The whey protein hydrolysates which is developed from our researches will be used with the materials of the soybean curd, the noodles, the instant noodle, the ham and the sports beverage etc. Also the whey protein hydrolysates which is competitive will use from the foodstuffs industry. So, it will increase a productivity.
- Our research provides healthy beverage development technique to the domestic beverage industry. The domestic beverage Industries can apply this method to diversify and upgrade of the product.

CONTENTS

Chapter 1. Scope of Research	1
Section 1. Importance of Research	1
Section 2. Objective and Contents of Research	2
1. Objective and Contents of Research	2
2. Objective and Contents of Research by year	2
Chapter 2. Technological Development of Foreign Countries and Korea	7
Section 1. Present state of Technology and Issue	7
Section 2. Future Prospect	7
Section 3. Propriety of tchnical indtrouction	7
Chapter 3. Research and development accomplishment contents and result ·8	
Section 1. Produciton of Internationally Compitative Unripened Cheese	8
1. Introduction	8
2. Research contents and method	8
A. Research contents	8
B. Method of research	9
1) Change of raw milk quality according to deep cooling and manufacture of unripened cheese	9
2) Possibility unripened cheese production using cheese base and quality analysis	10
3) Production of WPC fortified unripened cheese	10
4) Production of soy milk added unripend cheese	11
5) Search for flavonoid that can be enhanced the unripened cheese	12
6) Characteristics of lactic acid bacteria and health functionality	12
7) Microbiological safety of unripened cheese	12
8) Diet and animal feeding	13
9) Sampling of blood and organs	14
10) Lipids analysis of blood serum	14
11) Measurement of lipid metabolite in liver	14
12) Analysis of lipids metabolite in feces	14
13) Measurement of hydroperoxide in blood serum	15
14) Measurement of hydroperoxide in liver	15

15) Measurement of DNA damage in leukocyte by comet assay	15
16) Analysis of antioxidative vitamin in blood serum	15
17) Analysis of catalase in erythrocyte	15
18) Data analysis	16
3. Research result	16
A. Investigation on raw milk quality and production of unripened cheese ·	16
1) Change of raw milk quality according to deep cooling and manufacture of unripened cheese	16
2) Change of pH during deep cooling of raw milk	16
3) Change of mineral(Ca,P,Mg) content in serum casein	17
4) Electrophoresis of casein micelle	17
5) Change of crude β -casein	18
6) Selection of probiotics starter and physiological characteristics	19
7) Production of unripened cheese	20
8) Change of coagulation time	20
9) Curd characteristics during unripened cheese production	21
10) Formation of sludge during unripened cheese production	22
11) Change of pH in unripened cheese	22
B. Physico-chemical analysis of unripened cheese	23
1) Change of moisture in unripened cheese	23
2) Determination of ash in unripened cheese	24
3) Change of protein in unripened cheese	25
4) Change of WSN in unripened cheese	25
5) Change of fat in unripened cheese	26
6) Texture measurement of unripened cheese	27
7) Observation of cheese texture using SEM	29
8) Sensory evaluation	30
9) Change of yield in unripened cheese	31
C. Production of unripened cheese using cheese base and quality analysis.....	32
1) Heat treatment condition of raw milk	32
2) Lactic acid bacteria for cheese production	32
3) Preparation of cheese base	33
4) Cheese production procedure	34
D. Search for flavonoid that can be added to the cheese	35
E. Starter analysis of physiological characteristics and functionality	36
1) starter strain	36

2) Acid and bile acid tolerance	36
3) Antibacterial effect	37
4) Antioxidative effect	37
5) Selection of starter for the unripened cheese	37
F. Microbiological safety of produced unripened cheese	37
1) Change of total plate count	37
2) Change of psychrotrophic bacterial count	37
3) Change of coliform bacteria group	38
4) Change of lactic acid bacteria	38
G. Cholesterol lowering effect of unripened cheese and probiotics starter in vivo	39
1) Influence on bodyweight gain, diet intake amount, diet efficiency	39
2) Influence on organ's weight	40
3) Influence on blood lipids concentration	40
4) Influence on lipids metabolite	41
5) Influence on lipids metabolite in feces	42
6) Influence on blood serum ,liver lipids and oxidation	43
7) Influence on DNA damage of leukocyte	44
8) Influence on antioxidative vitamin in blood	45
9) Influence on catalase enzyme activity of erythrocyte	46
Section 2. Production of WPC and functionality analysis	47
1. Introduction	47
2. Research contents and method	47
A. Research contents	47
B. Method of research	47
1) Isolation WPC by using ultrafiltration	47
2) Selective production of ACE inhibitory bioactive peptide from WPC	48
3) Production of WPC and WPC hydrolysate	48
4) Physico-chemical characteristics and functionality of WPC hydrolysate	48
5) Sensory evaluation of WPC hydrolysate	49
6) Characteristics of flavonoid that can be enhanced the unripened cheese	49
7) Optimized production of probiotic lactic acid bacteria	49
8) Production of WPC by biological inversion	49
9) Evaluation of ACE inhibitory activity of WPC hydrolysate	49
10) Blood pressure lowering effect of WPC hydrolysate	49
11) Effect of WPC hydrolysate supplement on blood lipid concentration	49

12) Effect of WPC hydrolysate supplement on antioxidative system	49
13) Effect of WPC hydrolysate supplement on leuckocyte and DNA damage of kidney cell	49
3. Research resuts	49
A. Produciton of WPC 35 and analysis of general composition	49
1) Production of WPC 35	49
2) General composition of WPC 35	51
B. Produciton of WPC hydrolysate	51
1) Proteolytic enzyme	51
2) Production of hydrolysate	51
C. Physico-chemical characteristics of WPC 35 hydrolysate	51
1) pH	51
2) Bulk density	52
3) Foam expansion	53
4) Solubility	54
5) HMF	56
6) Free sulfhydryl group	57
7) NPN	57
8) Degree of protein hydrolysis	58
9) SDA-PAGE	60
10) ACE-inhibitory activity	62
11) Sensory test	63
12) Analysis of bio-active peptide	64
13) Production of bio-active peptide in pilot plant	73
14) Optimized drying process of WPC hydrolysate	73
D. Optimization of probiotics production, production of peptide using lactic acid bacteria, funcitonality of flavonoid	74
1) Optimization of lactococcus lactis NK 34 medium	74
2) Production of petide by WPC biological inversion	80
3) Antioxidative activity measurement of flavonoid	83
E. Evaluation of blood pressure lowering activity of WPC hydrolysate	85
1) ACE inhibitory activity analysis of WPC hydrolysate in vitro	85
2) Blood pressure lowering activity of WPC hydrolysate by SHR model	86
Section 3. ACE inhibitory effect of functional beverage and evaluation of hypertension suppressive activity in animal experiment	97
1. Scope and content of research	97

2. Reseh content and method	97
A. Research content	97
B. Method of research	97
1) sample	97
2) Reconstitution of WPC 35 beverage	98
3) Analysis of functional health beverage produced from WPC and whey	98
4) Statistical analysis	98
5) Test for ACE inhibitory activity of WPC and WPC hydrolysate	99
6) Blood pressure lowering effect of WPC and WPC hydrolysate	99
7) Sampling of blood and organs	99
8) Analysis of cholesterol, neutral fat, GOT, GPT	99
9) Hydroperoxide and antioxidative effect of blood serum	99
10) DNA damage of leukocyte and kidney cell	99
11) Antioxidative activity of erythrocyte	99
12) Statistical analysis	99
3. Research results	99
A. Functional health beverage using WPC hydrolysate	99
1) Formulation of functional health beverage mix using WPC hydrolysate	99
2) Composition of reconstituted beverage	100
3) Preference by sugar/acid ratio	100
4) Effect of stabilizer on sediment formation of WPC hydrolysate beverage	100
5) Effect of protein content on preference of WPC hydrolysate beverage	101
B. Production of whey beverage	102
C. Physico-chemical properties of WPC hydrolysate beverage	104
1) Total solids	104
2) Ash	105
3) Lactose	106
4) Fat	107
5) Titrable acidity	107
6) pH	108
7) Bulk density	109
8) Specific gravity	110
9) Lactic acid bacteria	111

10) Viscosity	112
11) NPN	113
12) Sensory evaluation	114
13) ACE inhibitory effect	115
D. Functional health beverage produced by whey	116
1) Total solids	116
2) Ash	116
3) Lactose	117
4) Protein	119
5) Titrable acidity	120
6) pH	121
7) NPN	122
8) Microbiological safety	123
9) Sensory evaluation	126
E. Evaluation of blood pressure lowering activity of WPC hydrolysate	128
1) ACE inhibitory activity analysis of WPC hydrolysate in vitro	128
2) Blood pressure lowering activity of WPC hydrolysate by SHR model	130
Chapter 4. Contribution of attainment of objective and relation field	140
Section 1. Goal of research plan and achievement	140
Section 2. Performance of research and contribution of technological development	145
1. Performance of research and development	145
A. The scientific journal announcement of research result	145
B. Patent application of research result	147
2. Contribution of technological development in related field	148
Chapter 5. Application and industrial application plan of research results	149
Section 1. Expected effect	149
Section 2. Application of relevant research and industrial application	149
Chapter 6. Foreign scientific and technical information collected during research	150
1. Foreign scientific publication	150
Chapter 7. References	152

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 1 절 연구개발의 중요성	1
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용	2
1. 연구개발 목표와 내용	2
2. 연차별 연구개발 목표와 내용	2
제 2 장 국내외 기술개발 현황	7
제 1 절 국내외 관련기술의 현황과 문제점	7
제 2 절 앞으로의 전망	7
제 3 절 기술도입의 타당성	7
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	8
제 1 절 국제 경쟁력 있는 비숙성 치즈 생산	8
1. 서론	8
2. 연구내용 및 방법	8
가. 연구내용	8
나. 연구방법	9
1) 저온냉각에 따른 원유품질변화과악 및 비숙성치즈의 제조	9
2) 치즈베이스를 이용한 비숙성 치즈의 제조가능성 및 품질 조사	10
3) WPC 강화 비숙성 치즈 제조	10
4) 두유를 첨가한 비숙성 치즈의 제조	11
5) 비숙성 치즈의 부가가치를 높일 수 있는 플라보노이드의 탐색	12
6) 기존의 확보된 유산균 및 상업적인 유산균 생리적 특성 연구 및 건강기능성 검증	12
7) 생산된 비숙성 치즈의 미생물학적 검사를 통한 안전성 확인	12
8) 식이 제조 및 동물 사육	13
9) 혈액 및 각종 장기의 채취	14
10) 혈장 내 지질 분석	14
11) 간의 지질 생성물 측정	14
12) 분변의 지질 대사물 분석	14
13) 혈장의 과산화지질(CD)측정	15
14) 간의 과산화지질 (TBARS) 측정	15
15) 백혈구 내 DNA 손상의 측정을 위한 comet assay	15

16) 혈장 내 지용성 항산화 비타민 분석	15
17) 적혈구 내 catalase 분석	15
18) 자료의 처리	16
3. 연구결과.....	16
가. 원유품질변화 파악 및 비숙성치즈의 제조.....	16
1) 저온냉각기간에 따른 원유 조성 변화	16
2) 원유의 저온저장 중 pH 의 변화	16
3) Serum casein 중 무기질(Ca, P, Mg) 함량의 변화	17
4) Casein micelle의 전기영동	17
5) Crude β -casein 함량의 변화	18
6) 프로바이오틱스 유산균 스타터 선발 및 생리적 특성파악	19
7) 비숙성 치즈의 제조	20
8) 커드의 응고시간(coagulation time) 변화	20
9) 비숙성 치즈 제조 시 curd 특성	21
10) 비숙성치즈제조중 sludge 생성	22
11) 비숙성 치즈의 pH 변화	22
나. 비숙성 치즈의 이화학적 분석	23
1) 비숙성 치즈의 수분(moisture) 변화	23
2) 비숙성 치즈의 회분(ash) 정량	24
3) 비숙성 치즈의 단백질 변화	25
4) 비숙성 치즈의 수용성 질소 화합물(water soluble nitrogen compounds)의 변화	25
5) 비숙성 치즈의 지방(fat)의 변화	26
6) 비숙성치즈의 물성(texture) 측정	27
7) 주사전자현미경에 의한 비숙성 치즈 조직의 관찰	29
8) 관능검사(Sensory evaluation)	30
9) 비숙성 치즈의 수율(yield) 변화	31
다. 치즈베이스에 의한 비숙성 치즈의 제조가능성 및 품질 조사	32
1) 원료유의 열처리 조건	32
2) 치즈제조에 사용된 유산균	32
3) 치즈베이스제조	33
4) 치즈 제조공정 확립	34
라. 비숙성 치즈의 부가가치를 높일 수 있는 flavonoid 탐색	35
마. 기존의 확보된 유산균 및 상업적인 유산균 생리적 특성 연구 및 건강기능성 검 증	36
1) 사용균주	36
2) 내산성 및 내담즙성	36

3) 항균효과	37
4) 항산화효과	37
5) 비숙성치즈의 스타터 선정	37
바. 생산된 비숙성 치즈의 미생물학적 안전성	37
1) 총균수 (total plate count)의 변화	37
2) 저온성 세균수 (psychrotrophic bacterial count)의 변화	37
3) 대장균 및 대장균군의 변화	38
4) 유산균의 변화	38
사. 비숙성 치즈 및 프로바이오틱 유산균 스타터의 in vivo 실험을 통한 콜레스테롤 저하 활성 평가	39
1) 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율에 미치는 영향	39
2) 장기무게에 미치는 영향	40
3) 혈중 지질 농도에 미치는 영향	40
4) 간의 지질 생성물에 미치는 영향	41
5) 분변의 지질 대사물에 미치는 영향	42
6) 혈장 및 간의 지질과산화에 미치는 영향	43
7) 백혈구의 DNA 손상도에 미치는 영향	44
8) 혈중 지용성 항산화비타민 농도에 미치는 영향	45
9) 적혈구 catalase 효소 활성에 미치는 영향	46
제 2 절 고부가가치 식품소재인 WPC 가수분해물의 생산 및 기능성 조사	47
1. 서 론	47
2. 연구내용 및 방법	47
가. 연구내용	47
나. 연구방법	47
1) 한외여과기법을 이용하여 유청단백질(WPC)을 농축된 형태로 분리	47
2) WPC에서 ACE 저해효과 있는 생리활성 펩타이드의 선별적 제조 및 적정조건 파악	48
3) WPC 및 WPC 가수분해물 추출물 제조	48
4) WPC 가수분해물의 물리화학적 및 기능성 조사	48
5) WPC 가수분해물의 관능검사	49
6) 비숙성 치즈의 부가가치를 높이기 위해 선정된 플라보노이드의 특성 및 기능성 조사	49
7) 건강기능성이 검증된 유산균의 생산최적화	49
8) 유산균을 이용한 WPC의 생물전환에 의한 펩타이드 생성	49
9) WPC 가수분해물의 ACE 저해활성 평가	49
10) WPC 가수분해물의 혈압 강하효과 검증	49

11) WPC 가수분해물의 보충섭취가 혈중 지질농도에 미치는 영향 평가	49
12) WPC 가수분해물의 보충섭취가 항산화체계에 미치는 영향 평가	49
13) WPC 가수분해물의 보충섭취가 백혈구 및 신장조직 세포의 DNA 손상에 미치는 영향	49
3. 연구결과	49
가. WPC 35의 제조와 일반성분 분석	49
1) WPC 35의 제조	49
2) WPC 35의 일반성분	51
나. WPC 가수분해물의 제조	51
1) 단백질 분해 효소	51
2) 가수분해물의 생산	51
다. WPC 35 가수분해물의 이화학적 특성	51
1) pH	51
2) Bulk density	52
3) 거품형성력(Foam expansion)	53
4) 용해도(Solubility)	54
5) HMF(5-hydroxymethyl-2-furfural)	56
6) Free sulfhydryl group(-SH기)	57
7) NPN(Non protein nitrogen)	57
8) 단백질 가수분해도(Degree of protein hydrolysis)	58
9) 전기영동(SDS-PAGE)	60
10) Angiotensin Converting Enzyme 저해 효과(ACE-inhibitory activity)	62
11) 관능검사(Sensory test)	63
12) 가수분해된 유청 단백질의 생리활성 펩타이드 분석	64
13) 파이로트 플랜트에서 생리활성 펩타이드의 생산	73
14) 프로바이오틱 유산균의 생존율을 고려하여 프로바이오틱 유산균을 함유하는 WPC 가수분해물의 건조공정 적정화	73
라. 기능성 유산균의 생산최적화, 유산균을 이용한 펩타이드생성, 플라보노이드의 기능성	74
1) 건강기능성이 우수한 Lactococcus lactis NK34 균주의 배지 최적화	74
2) 유산균을 이용한 WPC의 생물전환에 의한 펩타이드의 생성	80
3) 비숙성 치즈의 부가가치를 높이기 위한 플라보노이드의 항산화 활성 측정	83
마. WPC 가수분해물의 in vitro 및 in vivo 실험을 통한 고혈압 저하 활성 평가	85
1) In vitro의 WPC 가수분해물의 ACE 저해활성 분석	85
2) SHR 모델을 이용한 WPC 가수분해물의 고혈압 강하효과	86

제 3 절 기능성 유청음료의 ACE 저해활성 및 동물실험을 통한 고혈압 억제 활성 평가	97
1. 연구내용 및 범위	97
2. 연구내용 및 방법	97
가. 연구내용	97
나. 연구방법	97
1) 공시재료	97
2) 음료의 제조위한 WPC 35 음료의 재조합	98
3) 유청 단백질 농축물과 유청에서 제조한 기능성 건강음료의 분석	98
4) 통계분석	98
5) WPC 및 WPC 가수분해물에 대한 ACE 활성 억제력 검증	99
6) WPC 및 WPC 가수분해물의 혈압강하효과를 검증하기 위해 혈압 측정	99
7) In vitro 분석에서 효과가 있었던 시료를 선별하여 6주간 보충투여 후 희생 시켰으며, 동물의 혈액과 각종 장기를 채취하여 보관하였음	99
8) 혈장 내 지질 분석을 위하여 혈장 중의 총콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, GOT, GPT를 분석	99
9) 혈장에서 과산화지질 및 총항산화력 측정을 측정	99
10) 백혈구 내 DNA 손상의 측정, 신장세포의 DNA 손상정도를 분석	99
11) 적혈구 내 항산화효소 활성 분석을 실시	99
12) SPSS-PC+ package를 사용하여 통계 처리	99
3. 연구결과	99
가. 유청 단백질 농축물을 이용한 기능성 건강음료	99
1) 유청단백질가수분해물을 주 원료로 사용한 기능성 건강음료의 생산에 필요한 소재의 배합비결정	99
2) 재조합된 음료의 화학적조성	100
3) 음료의 당/산도 비율에 따른 기호도 효과	100
4) 가수분해된 WPC로부터 제조한 음료의 침전물형성에 대한 안정제의 효과	100
5) WPC 가수분해물로부터 제조된 음료의 선호도에 대한 단백질함량의 효과	101
나. 유청을 주 원료로 사용한 음료 제조	102
다. 유청 단백질 농축물을 이용한 음료의 이화학적 성질	104
1) 고형분 (moisture & total solid)의 변화	104
2) 회분(ash)의 변화	105
3) 유당(lactose)의 변화	106
4) 지방(fat)의 변화	107
5) 적정산도(Titration Acidity test)의 변화	107
6) pH의 변화	108
7) Bulk density의 변화	109

8) 비중의 변화	110
9) 유산균수의 변화	111
10) 점도의 변화	112
11) NPN(Non Protein Nitrogen)의 변화	113
12) 관능검사 (Sensory evaluation)	114
13) Angiotensin Converting Enzyme 저해효과	115
라. 유청을 주된 소재로 이용한 기능성 건강음료	116
1) 수분 및 총 고형분 (moisture & total solid)의 변화	116
2) 회분(ash)의 변화	116
3) 유당(lactose)의 변화	117
4) 단백질(Crude protein)의 변화	119
5) 적정산도(Titration Acidity test)의 변화	120
6) pH의 변화	121
7) NPN(Non Protein Nitrogen)의 변화	122
8) 음료의 미생물학적 안전성	123
9) 관능검사	126
마. WPC 가수분해물의 in vitro 및 in vivo 실험을 통한 고혈압 저하 활성 평가	128
1) In vitro의 WPC 가수분해물의 ACE 저해활성 분석	128
2) SHR 모델을 이용한 WPC 가수분해물의 고혈압 강화효과	130
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	140
제 1 절 연도별 연구개발목표 및 달성도	140
제 2 절 연구개발 실적 및 기술발전예의 기여도	145
1. 연구개발 실적	145
가. 연구 결과에 대한 학술논문 발표	145
나. 연구 결과에 대한 특허 출원	147
2. 관련분야 기술발전예의 기여도	148
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	149
제 1 절 기대 성과	149
제 2 절 타 연구에의 응용 및 산업체 활용 방안	149
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	150
1. 국외 논문	150
제 7 장 참고문헌	152

주 의

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