

119017-
3

정밀여과
공법을
이용한
맞춤형
유단백질
강화
기술개발
및
제품화

최
종
보
고
서

2021

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)

맞춤형혁신식품 및 천연 안심소재 연구개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004056-01

정밀여과공법을 이용한 맞춤형 유단백질 강화 기술 개발 및 제품화

2022.04.18

주관연구기관 / 매일유업(주)
제1협동연구기관 / 국민대학교
제2협동연구기관 / 한양대학교

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

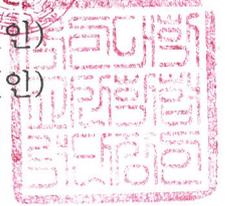
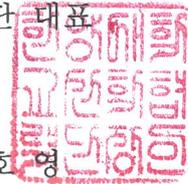
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “정밀여과공법을 이용한 맞춤형 유단백질강화 기술 개발 및 제품화”(개발기간 : 2019. 05. 20 ~ 2021. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.04.15

주관연구기관명 : 매일유업(주) 대표이사
제1협동연구기관명 : 국민대학교 산학협력단 대표
제2협동연구기관명 : 한양대학교 산학협력단 대표



주관연구책임자 : 고 호 영
제1협동연구책임자 : 임 지 영
제2협동연구책임자 : 이 현 규

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

최종보고서										보안등급	
										일반[<input checked="" type="checkbox"/>], 보안[<input type="checkbox"/>]	
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명		맞춤형혁신식품 및 천연안심소재사업		
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)						
공고번호					총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)						
					연구개발과제번호		119017-3				
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB1804	80%	LB1704	20%			%			
	농림식품과학기술분류	PA0103	50%	PA0105	30%	PA0299	20%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문									
		영문									
연구개발과제명		국문	정밀여과공법을 이용한 맞춤형 유단백질강화 기술 개발 및 제품화								
		영문	Development of protein enriched milk and beverage products using customized milk protein microfiltration technology								
주관연구개발기관		기관명	매일유업(주)			사업자등록번호		844-81-00466			
		주소	(우)03142 서울특별시 종로구 종로1길 50 더케이타워 A동			법인등록번호					
연구책임자		성명	고호영			직위		부장			
		연락처	직장전화				휴대전화				
			전자우편				국가연구자번호				
연구개발기간		전체	2019. 05. 20 - 2021. 12. 31(2년 8개월)								
		1차년도	2019. 05. 20 - 2019. 12. 31(8개월)								
		2차년도	2020. 01. 01 - 2020. 12. 31(12개월)								
		3차년도	2021. 01. 01 - 2021. 12. 31(12개월)								
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계		
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계
총계		452,000	39,400	262,000					491,400	262,000	753,400
1차년도		118,000	10,300	68,400					128,300	68,400	196,700
2차년도		157,000	13,700	91,000					170,700	91,000	261,700
3차년도		177,000	15,400	102,600					192,400	102,600	295,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편		비고			
								역할		기관유형	
공동연구개발기관		국민대학교	임지영	교수							
		한양대학교	이현규	교수							
연구개발담당자 실무담당자		성명	박준규			직위		연구원			
		연락처	직장전화				휴대전화				
			전자우편				국가연구자번호				

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022 년 02 월 25 일

연구책임자: 고 호 영

주관연구개발기관의 장: 매일유업 대표이사
 제1협동연구개발기관의 장: 국민대학교 산학협력단 대표
 제2협동연구개발기관의 장: 한양대학교 산학협력단 대표

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



< 요약 문 >

사업명		맞춤형혁신식품 및 천연안심소재사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)					연구개발과제번호		119017-3
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB1804	80%	LB1704	20%		%
	농림식품 과학기술분류	PA0103	50%	PA0105	30%	PA0299	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		정밀여과공법을 이용한 맞춤형 유단백질강화 기술 개발 및 제품화					
전체 연구개발기간		2019. 05. 20 - 2021. 12. 31(2 년 8개월)					
총 연구개발비		총 753,400 천원 (정부지원연구개발비: 452,000 천원, 기관부담연구개발비 : 301,400 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(3) 종료시점 목표(7)	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							

연구개발 목표 및 내용	최종 목표		<ul style="list-style-type: none"> ○ 소화율 향상을 고려한 맞춤형 유단백질 정밀여과 분리 기술, 단백질 열안정성 확보가공 공정을 통한 단백질강화우유 제품화 ○ 농축 미변성 유청단백질의 응집 억제 공정 설계를 통한 clear type 유청단백질 음료 개발 ○ 프리미엄 고부가가치 유제품 생산을 통한 국내낙농산업 경쟁력 확보 및 국민보건향상
	전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> ○ 유성분의 변화(단백질 함량과 조성변화 중심) 및 가공조건 (살균, 균질, 멸균)에 따른 물리화학적 변화 분석 ○ 단백질 소화율 평가 체계 구축 및 이를 통한 우유 단백질 소화속도 및 이용을 평가 ○ 정밀여과공법을 이용한 단백질우유 시제품 생산 ○ 정밀여과 공법으로 제조된 단백질 강화우유 시제품의 물리화학적 특성 및 저장 안정성(농후화) 분석 ○ 정밀여과 공법으로 제조된 단백질 강화 시제품의 소화율 및 칼슘 흡수율 평가 ○ 생산 공정 최적화를 통한 현상 설비 확대 적용 및 미변성 유청을 이용한 clear type 유청단백질 음료 시제품 생산 ○ 유청단백질 상호작용 조절을 통한 가열 응집억제 가공조건 분석 ○ Clear type 유청단백질 음료 시제품의 소화흡수율 평가
	1차년도	목표	○ 정밀여과공법을 이용한 유단백질의 막여과분리 기술 현황 분석, 가공조건에 따른 유성분의 물리화학적 변화 분석 및 단백질 소화율 평가 체계 구축
내용		<ul style="list-style-type: none"> ○ 정밀여과공법을 이용한 유단백질(micellar casein/미변성유청)의 선별적 막여과분리 및 microfiltration pilot 설비 도입 ○ 유성분의 변화(단백질 함량과 조성변화 중심) 및 가공조건 (살균, 균질, 멸균)에 따른 물리화학적 변화 분석 ○ 단백질 소화율 평가 체계 구축 및 우유 단백질 소화속도 및 이용을 평가 	

연구개발 목표 및 내용	2차년도	목표	정밀여과공법으로 제조된 단백질 강화 우유 개발, 이의 물리화학적 특성 및 저장안정성 분석 및 <i>In vivo</i> 실험을 통한 소화흡수율 평가
		내용	○ 정밀여과공법을 이용한 유단백 밸런스 우유(카세인, 유청 단백질의 비율 조정 8:2 → 5:5) 시제품생산 ○ 정밀여과 공법으로 제조된 단백질강화 우유 시제품의 물리화학적 특성 확인 및 저장 중 발생하는 농후화 현상의 원인 규명 분석 ○ 정밀여과 공법으로 제조된 단백질 강화 시제품의 소화율 및 칼슘 흡수율 평가
	3차년도	목표	여과공법을 이용한 유청단백질 분리 및 응집억제 가공 조건 분석을 통한 clear type 유청음료 개발
		내용	○ 막여과 기술을 이용한 유청단백질 분리 공정 설정 및 이를 활용한 유청단백음료 시제품 생산 ○ 관능, 미생물, 이화학 검사를 통한 품질 확인 및 보존테스트를 통한 유통기한 예측 ○ 유청단백질 상호작용 조절을 통한 clear type 유청단백질 음료의 응집억제 가공 조건 분석 ○ Clear type 유청단백질 음료 시제품의 소화흡수율 평가

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 막여과공법을 이용한 맞춤형 유단백질의 분리, 농축 기술 개발 ○ 고부가가치 기술 개발을 통한 유제품의 활용 범위 확장 ○ 프리미엄 유제품 생산 및 유제품 소화흡수율 향상 기술 확보 ○ 특허출원 1건, 시제품 생산 2건, SCI급 학술논문게재 3건, 학술대회발표 8건 등
--------	---

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 영양 맞춤형 유제품 개발을 통한 프리미엄 유가공 시장 창출 ○ 새로운 생산기술 기반 확보 및 경쟁력 강화를 통한 해외수출 확대 ○ 제품 판매 활성화에 따른 원유사용의 확대 및 낙농농가의 소득 증대에 기여 ○ 과학적 데이터 기반 제품생산을 통한 소비자 신뢰도 제고
---------------------------	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유	
-----------------------	--

연구개발성과의 등 록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	3건	1건										

연구시설·장비 종합정보시스템 등 기록 현황	구입 기관	연구시설 ·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호

국문핵심어 (5개 이내)	정밀여과	우유단백질	단백질강화우유	소화율	맞춤형분리
영문핵심어 (5개 이내)	Micro-filtration	Milk protein	Protein enriched milk	Digestibility	Customized separation

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	6 page
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	10 page
2-1. 1차년도 세부연구목표 및 수행내용	10 page
2-2. 2차년도 세부연구목표 및 수행내용	41 page
2-3. 3차년도 세부연구목표 및 수행내용	86 page
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	125 page
3-1. 연구수행결과	125 page
3-1-1. 정성적 연구개발 성과	125 page
3-1-2. 정량적 연구개발 성과	134 page
3-2. 목표 달성 수준	145 page
4. 목표 미달 시 원인분석	146 page
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	147 page
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	147 page

1. 연구개발과제의 개요

- 고령사회로 접어들고 건강한 노년(active aging)의 중요성이 증가함에 따라 영양적, 건강적 혜택을 제공할 수 있는 고단백 식음료의 중요성도 함께 증가하고 있음.
- 우유는 우수한 품질의 단백질을 제공할 수 있으며, 부족하기 쉬운 대표적 무기질인 칼슘을 풍부하게 함유하고 있으나 제품의 형태, 조직감, 풍미, 소화율, 안전성 등에 대한 소비자의 요구가 다양해짐에 따라 소비자의 요구를 충족시킬 수 있는 새로운 제품에 대한 필요성이 대두되고 있음.
- 새로운 제품의 개발을 위해서는 신기술이 필요하며 우유단백질의 선별적 막분리기술은 다양한 소비자의 영양적 요구를 충족시킬 수 있는 맞춤형 유제품 생산을 위하여 유용하게 활용될 수 있음.
- 현재 사용되고 있는 우유단백질 소재의 종류와 특징은 표 1과 같음.

표 1. 상업용 우유단백질 소재의 종류와 특징

종류	단백질 (%)	구성성분	가공방법	특징
MPC/MPI*	35/90*	82% casein, 18% whey	탈지유의 열처리 및 UF 농축 후 분무건조	변성 응집된 형태로 존재
MCC	> 80	86% Casein	탈지유의 MF 농축 후 분무건조	Casein이 micelle의 형태로 존재
Na-CNate	> 80	Na-CNate	탈지유의 등전침전 후 NaOH 로 중화	Casein micelle로부터 CCP 용 해 (micelle 구조 붕괴)
WPC/WPI	34~90	Whey	치즈유청의 열처리 UF 농축 후 분무건조	치즈 유래 지방, GMP 함유, 유청단백질 변성
SPC	80	Whey	탈지유의 MF 농축 후 여과물의 분무건조	미변성 유청단백질 함유

MPC: milk protein concentrate, MCC: micellar casein concentrate, Na-CNate: sodium caseinate, WPC: whey protein concentrate, WPI: whey protein isolate, SPC: serum protein concentrate, UF: ultrafiltration, MF: microfiltration, CCP: colloidal calcium phosphate

- 우유 유래 단백질 소재는 저장성이나 유통편이성을 위하여 건조 분말의 형태를 사용하는 것이 일반적이나, 소비자형 최종제품을 생산하는 업체의 경우에는 분말의 형태로 단백질의 함량 또는 고형분 함량을 표준화하는 경우보다 액상형 농축소재를 이용하는 것이 관능적인 측면이나 가공효율성에서 장점을 가질 수 있음.
- 우유단백질 분말 생산을 위한 분무건조 과정에서는 예비농축이나 분무과정 중에 발생하는 온도 상승으로 지방의 산화, Maillard 반응이 가속화되어 제품의 관능적 품질이 감소하는 것으로 보고됨(Smith et al. 2016).

- 분무건조과정 중 건조실 내 단백질 부착으로 인한 회수율 저하는 경제적 이윤을 감소시킬 수 있으며 건조 후에도 단백질의 변성 등에 의한 수화능력 감소와 같은 물리화학적 기능성의 열화가 나타남(Augustin and Udabage, 2007; Ozmen and Langrish, 2003).
- 단백질 소재의 경우 대부분 풍미 향상을 목적으로 사용되지 않기 때문에 관능적 품질의 중요성이 과소평가되는 경우가 많으나, 단백질 소재에 의한 이취 발생은 제품의 품질 저하와 밀접한 관련이 있음(Childs and Drake, 2010).
- 탈지유의 등전침전 후 casein에 Na, Ca, K 등을 중합하여 제조하는 caseinate는 수화, 거품형성, 에멀전 등 다양한 성질에 관한 연구가 충분히 진행된 반면, 탈지유로부터 정밀여과 공정을 이용하여 유청을 제거하여 생성된 micellar casein은 물리화학적 성질에 대한 연구가 매우 제한적으로 이루어짐.
- 아래의 그림과 같이 micellar casein의 제품 응용을 위해서는 다양한 환경조건에서 일어나는 식품성분과의 상호작용에 대한 연구가 필수적임(그림 1).

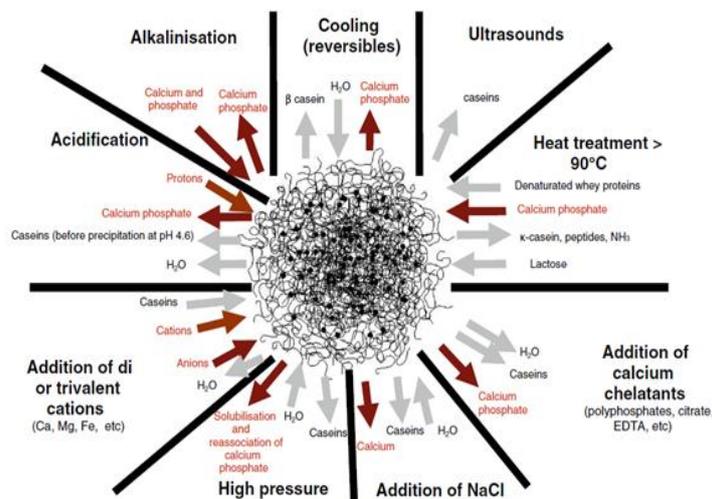


그림 1. Micellar casein의 물리화학적 성질에 영향을 미치는 인자(Gaucheron, 2004)

- 우유 카제인은 아미노산 공급 속도가 상대적으로 느린 것으로 알려져 있으며, 근육 발달과 휴식 시간 동안의 섭취 단백질의 합성 등을 도와주기 때문에 운동선수용 단백질 강화식품에 사용됨. 한편, 유청 단백질은 체내 흡수력이 좋고 일부는 면역 글로불린을 함유하고 있어 근육 증가와 면역 효과가 있다고 알려짐. 따라서, 유제품에 존재하는 단백질은 아미노산을 공급하여 지속적인 근육발달에 도움을 줄 수 있음.
- 우유단백질은 단백질 내 혹은 단백질 간의 상호작용에 의해 제품의 질감과 생체이용률을 결정 지을 수 있음(그림 2).



그림 2. 다양한 가공변수 및 구성조건에 영향을 받는 단백질 상호작용(Patel, 2015)

○ Lamothe(2012)에 따르면 치즈의 경우 단백질함량과 비례하여 위장 단계에서 느리게 소화된다고 보고됨(그림 3). 특히 카제인의 농도가 높아지고 지방 함량이 낮아지면 단백질 매트릭스의 밀도가 증가하고 지방 분포로 인해 조직적인 특성에 영향을 미쳐 위장 및 십이지장 소화에 영향을 미침. 이 결과를 통해 식품 내에서의 단백질 조성은 매트릭스를 조절하여 체내 소화흡수율에 영향을 미칠 것으로 판단됨.

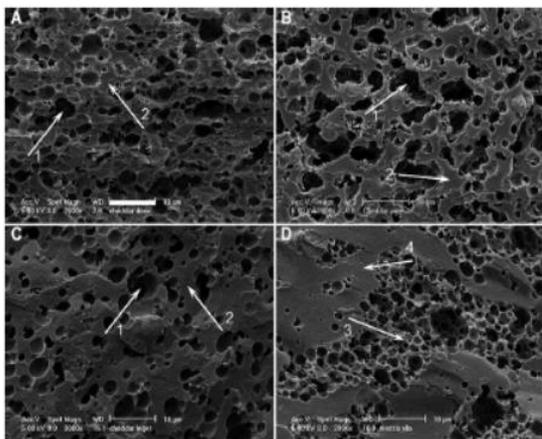


Fig. 1 Scanning electron micrograph of mild Cheddar (A), aged Cheddar (B), light Cheddar (C) and Mozzarella (D) cheese. Arrows show spaces that were filled with fat (1), protein matrix (2), fat pools (3) and protein fibers (4). Bar = 10 μm.

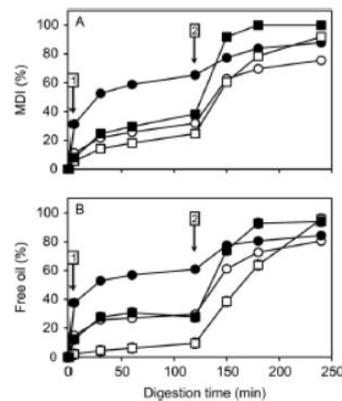


Fig. 3 Kinetics of matrix degradation (A) and free oil release (B) during digestion of mild Cheddar (○), aged Cheddar (●), light Cheddar (□) and Mozzarella cheese (■) in a simulated gastro-intestinal environment. Arrows indicate the point of addition of gastric (1) and duodenal (2) juices. Standard error for MDI and free oil was 1 and 3.4% respectively.

그림 3. 치즈형태별 주사현미경 사진(A) 및 매트릭스 분해도(B) (Lamothe, 2012)

○ 본 연구과제에서는 정밀여과를 이용하여 맞춤형 우유단백질의 분리기술을 개발하고 단백질 강화우유의 제품화에 적용하며, 여과된 미변성 단백질의 농축을 통한 clear type 단백질 음료 제품화를 이루고자 함.

● 정밀여과공법을 이용한 맞춤형 우유단백질 강화기술 개발 및 제품화 핵심개념(그림 4)

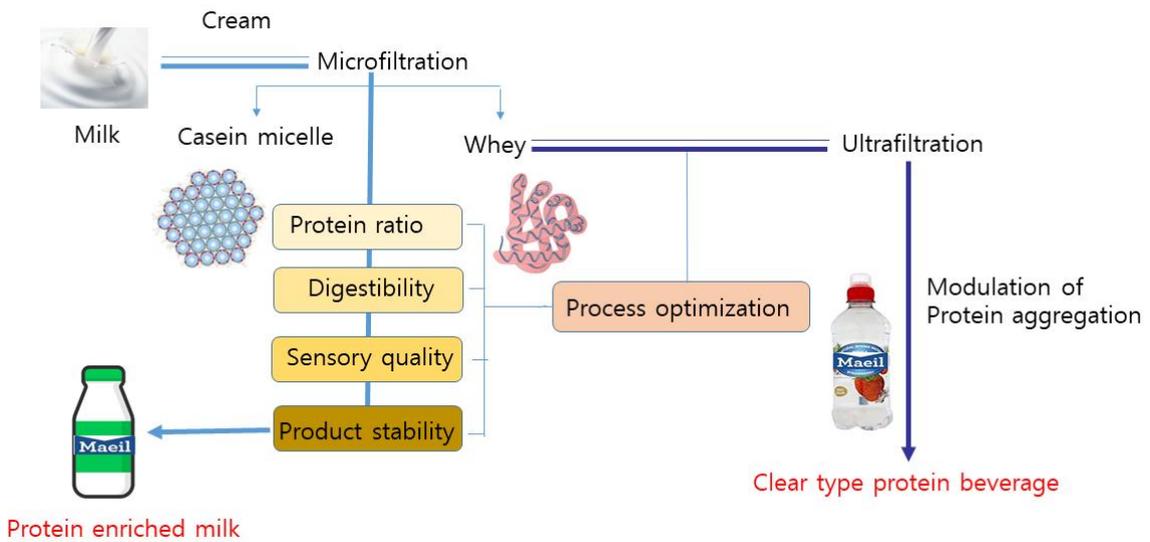


그림 4. 연구개발의 핵심 개념

● 핵심기술

- 액상의 micellar casein과 미변성 유청단백질의 비율 조절이 가능한 맞춤형 유단백질 막분리 기술 개발
- 우유성분의 조성 및 함량 변화, 가공공정에 따른 물리화학적 변화와 소화율 변화의 통합적 고찰
- 단백질 강화 시유 및 clear type 유청단백질 음료의 안정성(열, 산) 확보기술

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2-1. 1차년도 세부 연구목표 및 수행 내용

[주관기관 : 매일유업(주)]

I. 세부 연구목표

1. 정밀여과공법을 이용한 제품 시장현황 및 글로벌 유업체 기술현황 분석
2. 맞춤형 유단백질 분리를 위한 정밀여과 pilot 설비 도입
3. 유단백질 선별적 막여과 분리를 위한 최적 가공조건 설정

II. 연구개발 수행내용

1. 정밀여과공법을 이용한 제품 시장현황 및 글로벌 유업체 기술현황 분석

1) 국내 기술 수준 및 시장 현황

- 본 연구의 핵심기술은 정밀여과 (microfiltration, MF)를 이용한 우유단백질의 선별적 분리기술로서 국내 유가공산업에서는 적용된 바 없음.
- 국내 유가공산업에서의 정밀여과(microfiltration, MF)를 이용한 기술은 현재 자사(매일유업) 상하목장에서 적용되고 있음. 이 기술을 이용하여 영양소 파괴를 최소화하고 있으며, 유해 세균 및 미생물을 99.9% 제거함.
- 남양유업에서 수입 진행하였던, '초유콜로스' 제품은 정밀여과 공법을 이용하여 무균화 처리를 적용한 제품이며, 서울우유의 '목장의 신선함이 살아있는 우유' 제품은 정밀여과 공법을 HTST 살균과 함께 적용하여 우유 속 미생물 및 유해세균을 99.99% 제거하여 우유의 풍미를 보존함.
- 한외여과(ultrafiltration)과 역삼투(reverse osmosis)막을 이용한 분리기술은 오늘날 30~80%의 단백질 함량을 갖는 다양한 유청분말과 유청단백질농축(whey protein concentrate, WPC)를 제조하는데 이용되고 있음.
- 그 외 현재 자사에서 판매중인 '소화가 잘 되는 우유'는 한외여과를 이용하여 유당을 50% 이상 걸러내는 Lactose Free 공법을 이용하여 유당을 분해하여 단맛은 줄이고, 우유 고유의 맛을 강조한 제품임.

2) 해외 기술 수준 및 시장 현황

- 현재 정밀여과를 이용하여 whey protein을 **추출**하는 기술을 도입한 국가 및 유업체는 Germany의 Arla, France의 filiere-laitiere, Finland의 Valio, India의 Neilson 등이 있음.

표 2. 정밀여과를 이용하여 유청단백질과 micellar casein을 분리하여 적용한 제품

회사 / 국가	사진	제품명	특징
Nutrition Planet (그리스)		100% Micellar Casein	<ul style="list-style-type: none"> · MF를 이용하여 생산한 micellar casein · 열과 산에 의한 변성일어나지 않음 · 분말 형태
Ingredia (프랑스)		Prodiet Fluid	<ul style="list-style-type: none"> · 92%의 micellar casein을 함유함 · lactose-free버전 있음 · 액상 형태
AltisEndurance Sports (미국)		Micellar casein	<ul style="list-style-type: none"> · MF를 이용하여 생산한 micellar casein · 감미료 무첨가 및 lactose-free · 분말 형태
Il tuo integratore (이탈리아)		90% Whey protein	<ul style="list-style-type: none"> · vanilla flavour · UF와 MF를 이용한 whey protein concentrate · 분말 형태

- 정밀여과를 이용하여 whey protein과 casein을 분리한 제품은 출시되어 있지만, 대부분의 제품이 분말 형태로 판매 진행 중임.
- 본 연구과제의 목표인 MF 필터를 통한 유단백 분리 및 단백질 강화 유제품은 기존의 powder 형태의 제품과는 다르게, 공정상에서 액체형태로 유단백 분리 및 추출하여 액상형태의 제품을 제조하려는 기술임.
- 기존 고단백질 제품의 단점으로는 유단백질 분말 생산을 위한 분무건조 과정 중에 발생하는 온도 상승으로 인한 지방의 산화, maillard 반응의 가속 등으로 인한 단백질 풍미 저하가 있음(Smith et al. 2016). 이를 개선한 제품 출시를 목표로 연구를 진행하고자 함.

3) 국내외 단백질 강화 제품 시장 현황

- 서울우유에서 기존 우유 대비 1.8배 단백질 함량이 높은 밀크랩 고단백 저지방 우유(단백질 11 g/200 mL)를 판매하고 있으며, 단백질 분말을 이용하여 단백질 함량을 증량함.

MilkLabX 밀크랩 고단백저지방 - “단백질과 칼슘 일반우유 대비 1.8배”

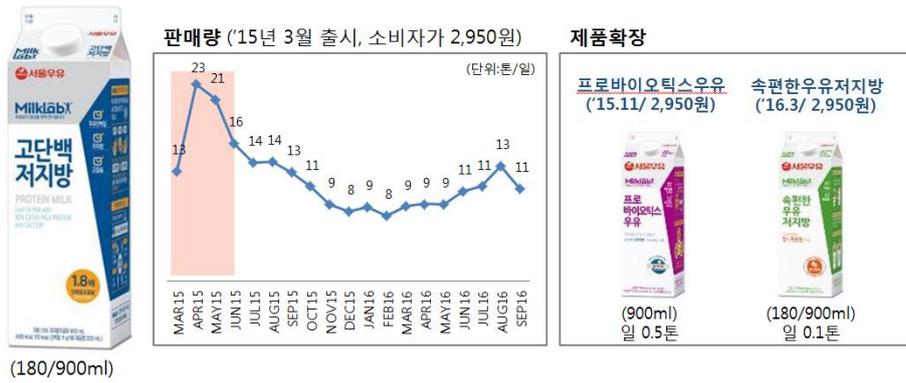


그림 5. 고단백 ‘밀크랩’ 제품 (서울우유)

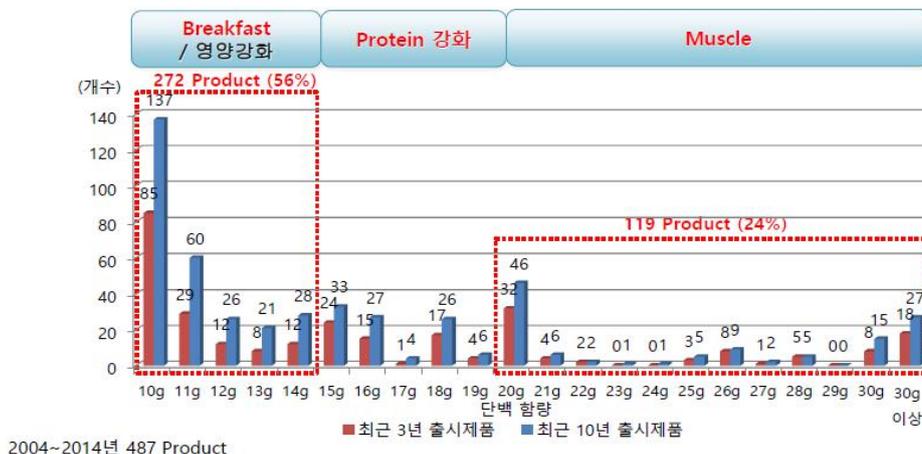
- 남양유업에서는 단백질 기준대비 1.2배 증량, 칼슘 1.2배 증량 및 지방 함량을 40% 감소한 슈퍼밀크(단백질 3.8g / 100 mL, 칼슘 120 mg / 100 mL, 지방 2 g / 100 mL)를 새로 출시하였음.

제품명	사진	주요성분	제품특징
하루근력		<ul style="list-style-type: none"> 로이신 280 mg 사코밸러스복합물 0.1% 유당 0.8 g 	<ul style="list-style-type: none"> 단백질 10% 증량 (3.3g / 100mL) 칼슘 150% 증량 (250 mg / 100mL) 비타민 A,D 보강

그림 6. 고단백 ‘하루근력’ 제품 (남양유업)

- 단백질 강화우유 제품은 유제품이 발달한 유럽을 중심으로 2013년부터 시장이 확장되기 시작하였음. 아침 식사대용으로 마실 수 있는 단백질 및 영양강화 컨셉의 제품부터 단백질을 20g 이상 첨가하여 근육 강화를 컨셉으로 한 제품의 출시도 점차 증가하고 있음.

단백질 함량별 신제품 현황



*source : Innova Database

그림 7. 단백질 함량별 신제품 현황

- 네슬레는 단백가공유 제품인 ‘BOOST’ 를 출시하며 국내 시장 진출을 시작하였고, 그 밖의 다른 글로벌 유업체 역시 국내 시장으로 런칭 준비중에 있는 것으로 확인 됨. 그러나, 현재 국내시장 진입을 목표하고 있는 외국 제품들은 운동하는 젊은층을 대상으로한 가공유 제품으로 그 품목이 한정되어 있음.



그림 8. 단백질 강화 가공유 제품 (네슬레)

- 외국의 고단백 우유 제품은 ‘영양보충’ 을 컨셉으로 온 가족 또는 성장기 아이들의 뼈 성장과 근육 강화를 강조하는 제품들의 출시가 많이 이루어지고 있음.
- 백색 우유는 칼슘과 단백질의 함량을 증량시켜 성장기의 어린이와 청소년들을 겨냥한 제품으로, 단백질의 함량은 5~10 g/100 mL로 판매되고 있음.
- 해외 고단백 가공유 제품은 ‘프로틴 셰이크’ 또는 ‘프로틴 밀크 셰이크’ 형태로 출시 되었으며 단백질 함량 10g 대의 식사대용 또는 20g 이상의 근육 회복/형성의 형태로 구분되어 판매 되고 있음.

Fair life	Valio Plus	Anchor Protein+
		
<ul style="list-style-type: none"> • Superior Nutrition you can Feel good about • 조합농가에서 직접 기른 작물로 소를 키워 생산된 우유로만 만든 제품 • Ultra-Filtered Milk • 단백질함량 5.4g/100ml • 칼슘함량 130mg/100ml • Whole, 2%, 0%, 초콜릿 	<ul style="list-style-type: none"> • 온가족의 뼈와 근육 강화 • 단백질은 근육 및 뼈 강도를 유지하며 운동 후 회복을 위해 좋음 • Ultra-Filtered Milk+protein powder • 단백질함량 5g/100ml • 칼슘함량 130mg/100ml • 1.5%, 0%, 초콜릿 	<ul style="list-style-type: none"> • 성장을 위한 최고의 영양 • 높은 칼슘과 단백질 함량으로 성장하는 어린이와 청소년의 뼈와 근육 강화 • Ultra-Filtered Milk+탈지유 • 단백질 6g/100ml • 칼슘 180mg/100ml • 지방 1.5%

그림 9. UF 공정을 이용하여 생산 된 유제품

- 대부분의 글로벌 유업체는 UF 및 nanofiltration(NF)를 이용하여 유당분해유제품을 제조하고 있으며 전 세계적으로 유당분해우유의 시장이 빠르게 증가하고 있음.

- 핀란드의 Valio 社는 우유에서 filtration을 통해 유청을 분리하여, 분말 형태의 제품을 제조하여 사용함.
- 현재 판매중인 단백질 강화 우유 제품은 우유에 단백질 분말을 첨가하여 단백질의 함량을 증가시키는 제품이며 본 연구과제에서 개발하고자 하는 정밀여과공법을 이용하여, 유단백질을 선별적으로 분리한 후 단백질을 강화한 제품의 컨셉과 뚜렷한 차이를 나타냄.

2. 맞춤형 유단백질 분리를 위한 정밀여과 pilot 설비 도입

1) 정밀여과(Microfiltration) pilot 설비 도입 현황

- 맞춤형 유단백질 분리 연구를 위해, 정밀여과설비 도입 필요성이 대두되었음.
- 정밀여과설비 도입 시 논의한 고려사항
 - ① 단백질을 분리하는 데 적합한 filter size 사용 가능 여부
 - ② 향후 scale up 진행 시, 공장 설비를 이용한 공정에 즉시 적용 할 수 있는 test가 가능한 장비
 - ③ 장비의 성능 적합성 여부 및 설비 가격 확인 진행

2) 유단백질 선별적 분리에 적합한 filter size 조사 진행

- 사료 검증(논문)을 통한 size 선택 및 해당 filter 사용한 설비 검토 진행
- 정밀여과공법을 이용하여 유단백질을 분리한 문헌을 참고한 결과 casein과 whey protein 은 0.1 μm 의 필터 사이즈 막을 통해 분리되었음.

표 3. MF 필터를 통한 casein과 whey protein의 분리

Filter Size	분리대상	reference
0.1 μm	casein, whey protein	Dairy Science and Technology. 76:255-265 (1996)

- Micellar casein size 범위는 0.15 ~ 0.23 μm 정도인 것으로 확인 됨.

표 4. Micellar casein 크기 range 문헌조사

Filter size (μm)	Micellar casein size (μm)	Reference
0.15	0.154 ~ 0.23	Biological properties and health aspects (2016)
0.2	~ 0.2	Journal of Dairy Science. 93:1444-1451(2009)
0.15	~ 0.15	Food and Function. (2012)

- 본 연구과제에서 주관기업은 0.1 μm 의 micro-filter와 0.005 μm 의 ultra-filter (ultrafiltration, UF)을 갖춘 파일릿 설비를 도입할 예정임. 해당 파일릿 설비를 통해 여과형식으로 whey protein과 casein을 크기에 따라 분리할 수 있음.

3) 공장규모의 scale up을 위한 검토 진행

- 향후 공장 설비 규모로의 확대를 위한 설비 검토 진행

- 기존 자사에서서는 소화가 잘되는 우유(Ultrafiltration, UF) 제품과 상하목장 슬로우 밀크(Microfiltration, MF) 제품을 생산하는 데 2종의 filter를 사용 중에 있으며, 향후 공장규모로의 Scale up을 위하여 기존 설비의 공정도 재검토 진행 및 설비 운행 확인
- 2020년도 상반기 도입예정인 microfiltration 파일럿 설비의 활용도 증진 방안 고려하여 상하공장 실제 운행 진행.

4) 설비 도입 현황

- 설비 업체인 Tetra pak 협의 완료 (19년 11월) 및 해당 설비 발주 진행 완료
- 2020년 3월 매일유업 연구소 도입 예정
(설비 제작 기간 : 약 5개월, 설비 제작 진행 및 설비 운송 기간, 설비 설치 및 사용 방법 교육, 설비 시운전 진행 기간 포함)



그림 10. 정밀여과 설비

- Pilot plant 설비 Spec
Feed flow : 100 ~ 200L/hr 및 온도 설정 가능, microfilter / ultrafilter 교환가능
설비 규모 : Approx.L = 2,500 mm, W = 1,300 mm, H = 2,000 mm
Feed in 90 kg/h 투입 시 45 kg/h of permeate, 45 kg/h of retentate

[제1 협동기관 : 국민대학교]

I. 세부 연구목표

- Micellar casein powder 및 native serum powder를 이용한 모델 단백질강화우유 제조
- 유성분의 변화(단백질 함량 및 조성, 칼슘 등)가 열안정성에 미치는 변화 분석
- 단백질 강화우유 모델에서 가공처리가 거대입자 생성 및 입자크기 분포변화에 미치는 효과 분석
- 주관 연구기관의 막 분리 조건에 따른 단백질의 profile 변화 분석

II. 연구개발 수행내용

1. 연구 방법

1) 시료의 제조

- Micellar casein isolate(MC; Refit Micellar Casein Isolate 88, FrieslandCampina ingredients, 85 %)과 whey protein isolate(WPI; Hilmar™ 9020 Whey Protein Isolate, Hilmar ingredients, 89.5 %)를 혼합하여 총단백질이 5%가 되도록 MC:WPI의 비율이 100:0, 80:20, 50:50, 20:80, 0:100으로 조정하였음. 시료를 각각 110 bar와 50 bar에서 2단계 균질을 실시하고, 95℃에서 30 분간(121℃, 1초 살균과 동일조건)살균을 실시하였음(주관기관 제공).

2) 미변성유청단백질 함량 측정

- MC과 WPI의 비율이 조정된 시료 및 균질/살균 된 시료의 미변성 유청단백질 함량 분석을 위하여 각 시료를 1 M의 HCl로 pH 4.6으로 조정한 후 원심분리(5,000 × g, 20℃, 20분)하여 상정액(supernatant)를 회수하였음. 상정액의 단백질량은 BCA assay(Walker, 2009)를 이용하여 측정하였음.

3) 열안정성(Heat stability)

- 시료의 열안정성은 비살균 시료를 대상으로 heat coagulation time(HCT)과 Fonterra에서 제안한 열안정성 측정법 등 두 가지 방법을 이용하여 측정하였음.

(1) HCT

- 시료 3 mL를 60℃ water bath에서 1분간 예열한 뒤, 130℃의 oil bath에서 미세한 응집물이 생성될 때까지 소요된 시간을 육안으로 관찰하여 측정하였음.

(2) Fonterra heat stability test

- 시료 10 mL를 60℃ water bath에서 10분 방치하고, 120℃의 oil bath에서 15분 유지한 후 원심분리(3,000 × g, 25℃, 10분)하여 침전물의 무게를 측정하였음.

4) 용해도(Solubility) 분석

- 용해도는 시료를 원심분리(6,000 × g, 25°C, 20분)하여 상징액에 존재하는 단백질을 정량한 후 원심분리 전 단백질 함량 대비, 원심분리 후 상징액의 단백질 함량(%)로 계산하였으며, 시료의 단백질 함량은 BCA assay(Walker, 2009)를 이용하여 측정하였음.

5) 무기질(칼슘, 인) 분석

- 시료의 총칼슘(인), 가용성칼슘(인)의 함량을 유도결합플라즈마분광기(ICP-OES; Optima 8300, PerkinElmer, USA)를 이용하여 측정하였음. 총칼슘 및 인의 함량은 염산을 이용하여 시료를 침전시킨 후 4,500 x g에서 원심분리하여 얻은 상징액으로부터 분석하였으며, 가용성 칼슘과 인은 시료를 100,000 x g에서 1시간 동안 초원심분리 후 얻어진 상징액을 이용하였음. ICP-OES 분석 시 carrier gas는 Ar을 사용하였으며 plasma flow는 12 L/min, nebulizer gas flow rate는 0.55 L/min, auxiliary gas flow rate는 0.2 L/min으로 하였음. 무기질 분석 시 파장은 칼슘 317.933, 인은 213.617 nm에서 측정하였음.

6) 혼탁도(turbidity) 변화 분석

- 살균에 따른 시료의 혼탁도 변화는 시료를 50배 희석한 후 spectrophotometer(Ultrospec 2100 pro, Amersham Bioscience)를 이용하여 633 nm에서 측정하였음(Yang et al., 2014).

7) 색도(Chromaticity) 분석

- 색차계(konica minolta, CR-400, DP-400)를 이용하여 시료의 종류 및 살균에 의한 L, a, b 값의 변화를 측정하였음.

8) 단백질 profile 분석

- 살균 전 후 시료에 존재하는 개별 단백질 변화를 SDS-PAGE 및 Native-PAGE로 분석하였음. 전기영동장치는 Biorad mini gel electrophoresis unit(Biorad Laboratories, Richmond, CA, USA)을 이용하였으며 4-20% acrylamide gradient gel을 이용하여 단백질을 분리하였음. 단백질 band intensity는 Biorad ChemiDac XRS system(Biorad)을 이용하여 이미지 분석을 실시하였음.

9) 시료의 입자크기 분포 변화 분석

- 살균 전 후 시료의 입자크기 분포 변화를 particle size analyzer(Horiba LA-960 Laser Scattering Particle Size and Distribution Analyzer, Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였음. 입도는 시료 3 mL을 주입하고 균일한 속도로 교반하며 측정하였음.

10) Size exclusion chromatography(SEC)를 이용한 단백질 거대응집체 분석

- 가열에 의한 단백질의 거대 응집체 형성은 Dalgleish et al.(2015)의 방법에 따라 SEC를 이용하여 분석하였음. 동결건조 시료를 20 mg/mL의 농도로 증류수에 환원시킨 후 0.45 μm의 PVDF filter로 여과하여 Sephacryl S-500HR(GE healthcare Bioscience, Uppsala, Sweden) resin이 충전된 column(15 mm x 450 mm)에 1mL 주입하였음. 시료는 0.02% sodium azide를 함유한 Bis-Tris-Propane buffer(20 mM, pH 7.0)를 이용하여 MPLC(LC-Forte/R, YMC, Japan)로 용출하였으며 214 nm에서 단백질의 용출 여부를 확인하였음. 단백질의 peak fraction은 5 mL씩 분취하여 회수하였으며 SDS-PAGE를 이용하여 peak fraction의 단백질 profile을 분석하였음.

11) 통계분석

- 정량적 분석은 3회 이상 반복 측정하였으며 SPSS statistics V. 21(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계적 유의성을 확인하였음. 처리구간의 유의적 차이($p < 0.05$)는 ANOVA와 Duncan의 다중비교검정법을 사용하였음.

2. 실험 결과

1) 미변성유청단백질 함량

- 1차년도에는 정밀여과(microfiltration)로 제조된 유단백질 소재를 이용하여 고단백(5% 단백질 함량) 환원유를 제조하고 casein과 유청단백질의 비율 변화가 물리화학적 특성에 미치는 영향을 분석하고자 하였음.
- Casein 소재로는 정밀여과로 제조된 micellar casein(MC)를 이용하였으나, 미변성유청단백질(native whey)의 경우에는 상업용 소재의 구입이 불가하여, 분리대두단백질(WPI)을 유청단백질 소재로 사용하였으며 MC와 WPI를 혼합하여 5%의 총단백질 함량을 가진 다양한 비율의 시료를 제조하였음.
- 일반시유의 살균과정에서 열에 의한 casein과 유청단백질의 상호작용은 많은 연구가 진행된 반면, 고단백질 조건과 casein과 유청단백질의 비율이 조정된 환경에서 일어나는 상호작용에 대한 연구는 매우 제한적으로 이루어졌음.
- 그림 11에 나타낸 바와 같이 살균 전에는 시료 내 WPI의 비율이 증가함에 따라 pH 4.6 가용성단백질 함량이 비례적으로 증가한 반면, 살균 후에는 시료간의 폭의 차이가 현저히 감소하였음.

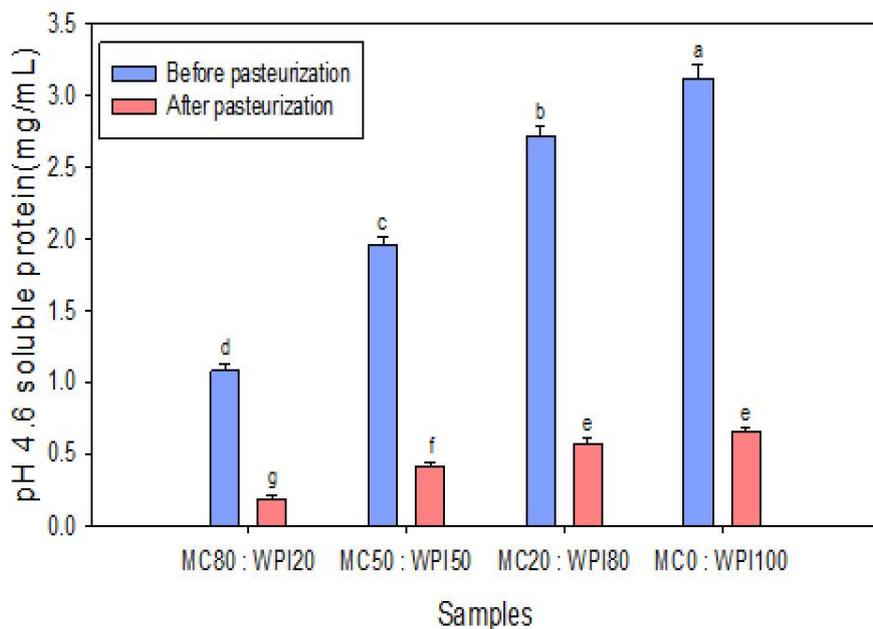


그림 11. 살균 전 후 pH 4.6 가용성 단백질의 변화

Different letters of the bars indicate significant differences ($P < 0.05$).

- 살균과 같은 열처리 과정에서 유청단백질은 변성되어 스스로 응집되거나 casein과 회합하여 복합체를 형성함. 복합체의 형성에는 유청단백질에서는 β -lactoglobulin(β -LG)과

casein에서는 주로 κ -casein과 α_{s2} -casein이 일차적으로 관여하는 것으로 알려져 있음 (Donato and Guyomarch, 2009).

- Casein과 유청단백질의 상호작용은 유청단백질이 비율이 정상적인 시유(80:20)보다 증가하는 경우에는 보다 가속화될 것으로 예상되며, 단백질 상호작용의 결과로 생성된 거대입자는 열안정성의 감소를 비롯하여 저장기간의 증가 시 침전물의 생성을 초래할 가능성이 존재하므로 향후 멸균제품의 제조 시에는 보다 정밀한 검토가 필요할 것으로 생각 됨.

2) 열안정성(Heat stability)

(1) HCT

- 시료를 130℃의 oil bath에서 유지시키며 응집물이 생성될 때까지 소요된 시간(HCT)으로 측정된 열안정성의 측정 결과는 표 5와 같음.
- 열안정성은 유청단백질의 비율이 증가함에 따라 유의적으로 감소한 반면, MC는 존재하지 않고 WPI만 존재하는 경우에는 다시 증가하는 것으로 나타남을 근거로 할 때, 열안정성의 감소와 casein과 유청단백질의 상호작용은 밀접한 상관관계를 나타내는 것으로 판단 됨.

표 5. 시료 별 가열응고시간(HCT)의 변화

Samples	HCT (min)
MC 100 : WPI 0	5.77 ± 0.25 ^a
MC 80 : WPI 20	4.12 ± 0.13 ^c
MC 50 : WPI 50	2.33 ± 0.18 ^d
MC 20 : WPI 80	1.28 ± 0.12 ^e
MC 0 : WPI 100	4.62 ± 0.22 ^b

Different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$).

(2) Fonterra heat stability test

- HCT는 열안정성의 측정법으로 널리 사용되는 방법이지만 하나 측정 과정 중 균일한 교반이 필요한 동적인 측정법이며 처음 응집물이 형성을 오차 없이 발견하기 위해서는 측정자의 숙련이 요구됨.
- 이러한 단점을 보완하기 위하여 Fonterra사는 oil bath에서 일정시간 유지 시킨 후 원심분리하여 침전물의 무게를 측정하는 정적인 분석법을 제안하였으며, 동일한 시료를 Fonterra 방법으로 측정한 결과는 표6과 같음.
- Fonterra 방법으로 측정한 결과에서는 침전물의 무게가 작을수록 높은 열안정성을 의미하며, 그 경향은 HCT 측정 결과와 일치하였음. 앞서 언급한 바와 같이 유청단백질만을 함유한 시료에서는 casein과 유청단백질이 혼합되어 있는 경우보다 유의적으로 높은 열안정성을 나타냈음.

표 6. Fonterra 법으로 측정한 열안정성

Samples	Sediment weight (g)
MC 100 : WPI 0	0.12 ± 0.01 ^d
MC 80 : WPI 20	0.15 ± 0.01 ^c
MC 50 : WPI 50	0.32 ± 0.01 ^b
MC 20 : WPI 80	0.42 ± 0.01 ^a
MC 0 : WPI 100	0.14 ± 0.01 ^{cd}

Different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$)

3) 용해도

- 시료의 용해도를 측정한 결과 casein은 유청단백질과 비교하여 낮은 용해도를 나타냈음. 살균은 casein만을 함유한 MC100을 제외하고는 모든 시료에서 유의적인 용해도의 감소를 나타냈음(그림 12).
- MC는 분산성능이 우수하지 못하여 완전한 분산을 위해서는 12시간 이상이 소요되는 것으로 알려져 있으며(da Silvar et al., 2018), MC의 낮은 분산능력은 제조과정 중 casein이 non-micellar form으로 유리되기 때문으로 설명되고 있으며, 건조과정에서 일어나는 casein micelle의 구조 변화도 MC의 분산특성을 낮추는 주요한 원인으로 보고되었음(Baldwin, 2010).
- 본 결과를 근거로 할 때 분말단백질 소재를 활용한 단백질 강화우유의 제조법은 단백질의 불안정을 초래할 가능성이 있으며, 따라서 단백질의 건조과정 없이 정밀여과 농축을 통한 단백질강화 시유 제조법은 차별적 특성을 부여할 수 있을 것으로 판단됨.

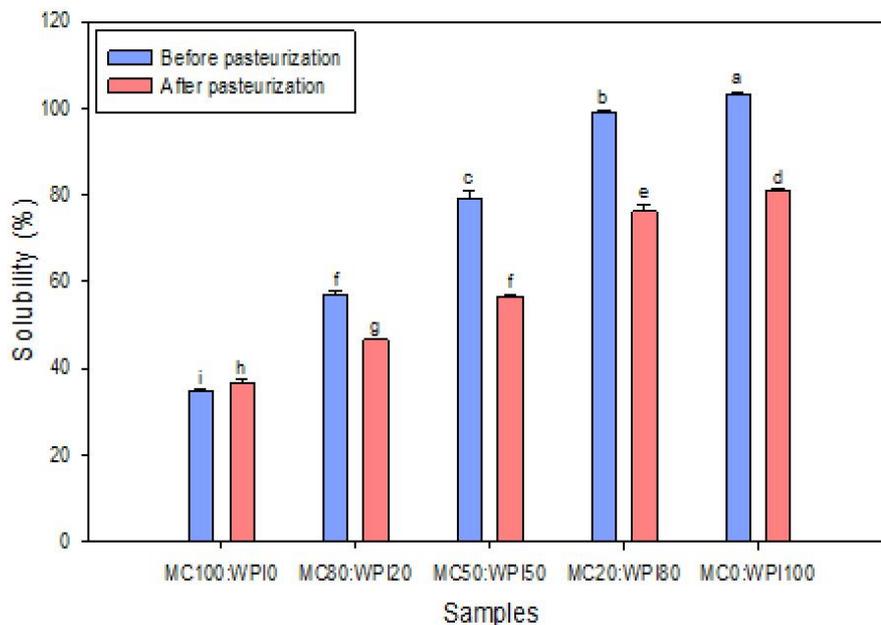


그림 12. 시료의 용해도

Different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$).

- 따라서, 2차년도에서는 동일단백질 함량 수준에서, 분말환원유와 액상단백질 농축유의 용해도를 비롯한 기타 물리화학적 특성 비교를 통하여 제품의 차별성을 부각시킬 수 있을 것으로 판단 됨.

4) 칼슘 및 인 함량

- 칼슘과 인은 casein micelle 구조 형성에 중요한 역할을 담당하며 열안정성에도 영향을 주는 요인임. 단백질과 결합하여 존재하는 교질상 칼슘(유기태칼슘)은 체내 흡수율이 염의 형태나 이온의 형태로 존재하는 용해상 칼슘과 비교하여 유의적으로 높은 것으로 알려짐.
- 우유에 존재하는 칼슘의 2/3는 casein submicelle을 연결하는 cementing agent로 작용하는 인산칼슘으로 시료 내 casein의 비율이 감소할수록 총 칼슘은 비율은 유의적으로 감소하였으며, 반면 용해상 칼슘의 농도는 증가하는 경향을 나타냈음(표 7).
- 이와 같은 결과는 단백질 강화 우유에서 casein의 비율이 증가하면 생체이용성이 우수한 교질상칼슘이 자연적으로 증가하여 별도의 칼슘 강화과정이 없이도 칼슘을 첨가하는 효과를 나타낼 가능성이 있음을 시사함.

표 7. 시료 별 총칼슘과 인 그리고 용해성 칼슘과 인 함량

Mineral (mg/L)	MC : WPI 100 : 0	MC : WPI 80 : 20	MC : WPI 50 : 50	MC : WPI 20 : 80
Total Ca	673 ± 0.5	558 ± 0.7	376 ± 2.7	256 ± 0.7
Soluble Ca	298 ± 0.9	345 ± 1.1	325 ± 0.4	184 ± 0.3
Total P	221 ± 0.7	244 ± 0.4	237 ± 1.3	241 ± 0.9
Soluble P	209 ± 1.7	200 ± 0.4	166 ± 1.1	111 ± 1.9

5) 탁도(turbidity)

- 입자의 크기가 크고 산란계수가 증가하면 탁도는 증가함. 용액의 탁도는 단백질의 농도와 용해도에 의하여 변화하며, 단백질 응집을 나타내는 척도로 사용할 수 있음(Ju and Kilara, 1998).
- 시료의 초기 탁도는 MC의 비율이 높을수록 증가하였으나, 살균 시 일어난 탁도의 증가 정도는 MC:WPI의 비율이 50:50으로 존재할 때 가장 큰 폭으로 상승하여 단백질 상호작용의 정도는 casein과 유청단백질의 비율이 1:1 수준으로 존재할 때 최대값을 나타내는 것으로 생각됨(그림 13).

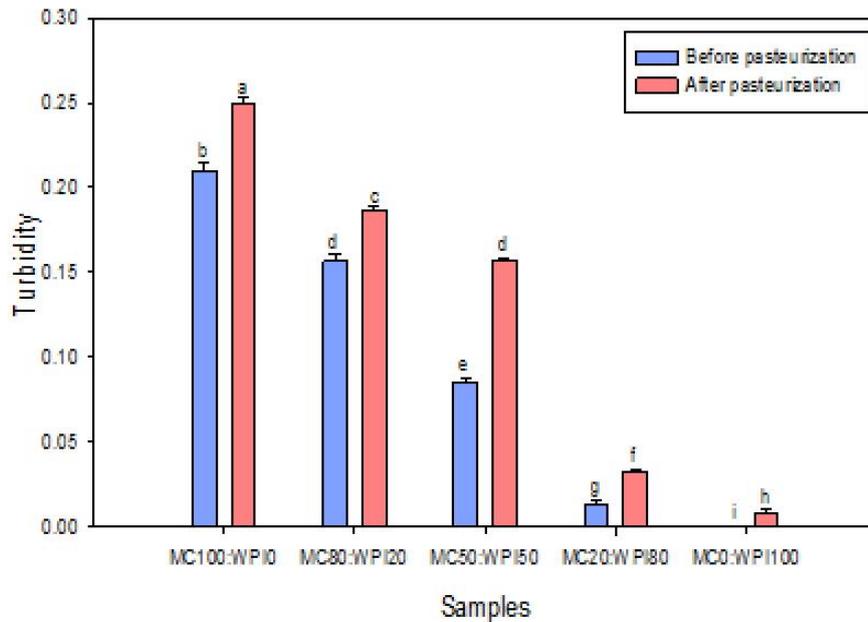


그림 13. 시료별 탁도

Different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$).

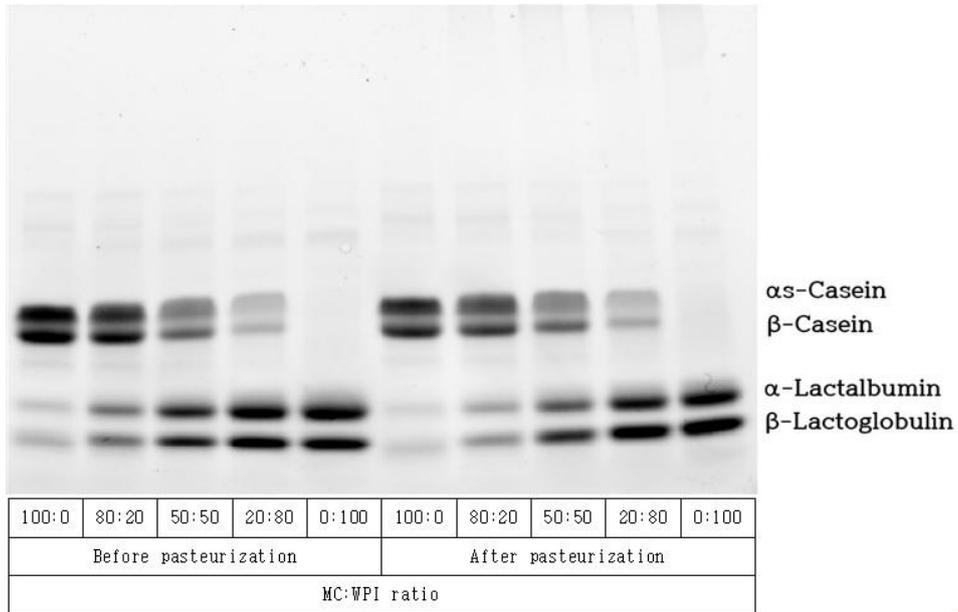
- 열처리의 증가나 저장과정 중 유청단백질의 변성에 의하여 입자 크기가 빛을 산란시킬 수 있는 수준 이상으로 증가하게 되면 탁도의 증가가 일어나게 되며 용해성 단백질의 함량과는 반비례의 상관관계를 나타낸다고 보고되었음(Banavara et al., 2003).
- Martin et al.(2007)은 탈지분유의 제조 공정(예를 들어 열처리 강도)에 따라 환원 된 탈지분유의 탁도에 차이가 존재함을 보고하였으며, 탁도의 차이가 무엇을 의미하는지 정확하게 설명하기는 어렵지만 유청단백질이 casein micelle의 표면에 부착되어 나타나는 응집체의 수나 상대적 크기 또는 refractive index의 증가와 관련이 있다고 보고하였음.

6) 단백질 상호작용

- 각 시료 단백질 profile을 SDS-PAGE와 native-PAGE로 분석한 결과, SDS-PAGE에서는 살균에 의한 단백질의 변화양상이 확인되지 않았으나, native-PAGE로 분석한 결과에서는 단백질 상호작용으로 인한 거대분자의 형성이 뚜렷하게 확인되었음(그림 14 (A), (B))
- 살균에 의한 거대분자의 생성은 유청단백질 비율이 증가함에 따라 비례적으로 증가하였으며, 거대분자의 형성으로 단백질이 gel을 투과하지 못한 high molecular weight compounds의 band 증가가 관찰되었음.
- 살균 전 후 개별적 유청단백질인 α -LA, β -LG과 casein micelle의 상호작용을 비교한 결과 잔여 β -LG band가 α -LA 보다 더 많이 소실되어 상대적으로 더 빠르게 변성이 일어나는 것으로 생각되며, 이 결과는 Buaulieu et al.(1999)의 보고가 일치하였음(그림 15).
- Corredig and Dalgleish (1996)은 β -LG의 변성이 빠르게 일어난 후, α -LA의 응집을 가속화하며 비가역적인 변화로 전환시킨다고 보고하였음. 기존의 연구보고에 의하면 β -LG과 일차적으로 복합체를 형성하는 casein은 casein micelle의 표면에 위치하는 κ -CN으로 알려져 있으나(Singh and Latham, 1993), α_s - β -casein 보다 적은 존재비율(3:3:1)로 시료에 존재하여 전기영동의 이미지에서는 κ -CN의 변화가 뚜렷하게 확인되지 않았음.

- 유청단백질과 반응하는 casein의 상대적 변화량의 측정 결과 α_s -casein 보다는 β -casein 이 상대적으로 큰 변화량을 나타냈음. β -casein은 casein 중 소수성이 가장 큰 casein임을 고려할 때 유청단백질과 casein의 상호작용에는 소수성결합이 관여할 가능성을 나타냄.

(A) SDS-PAGE



(B) Native-PAGE

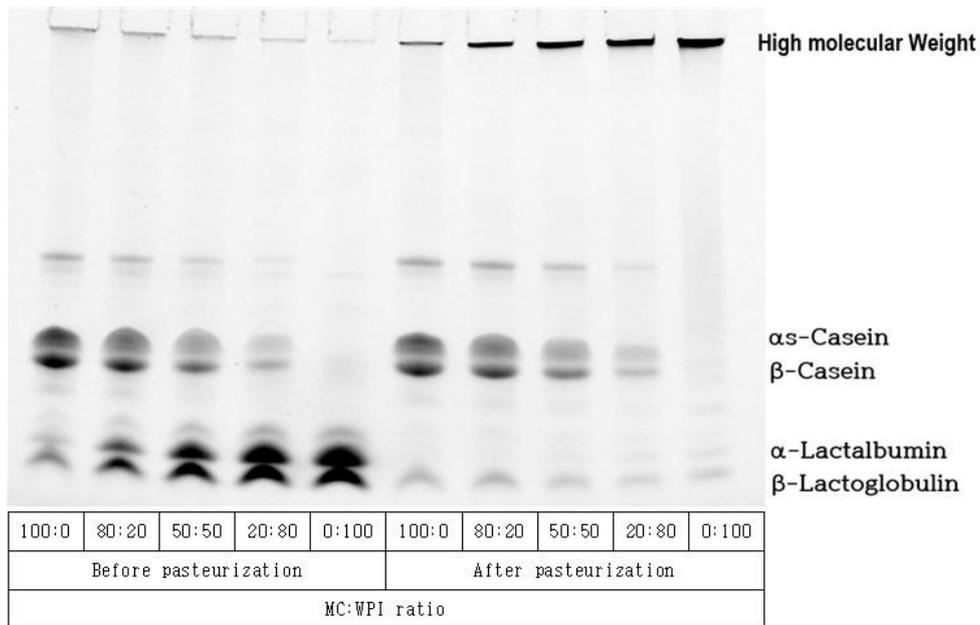
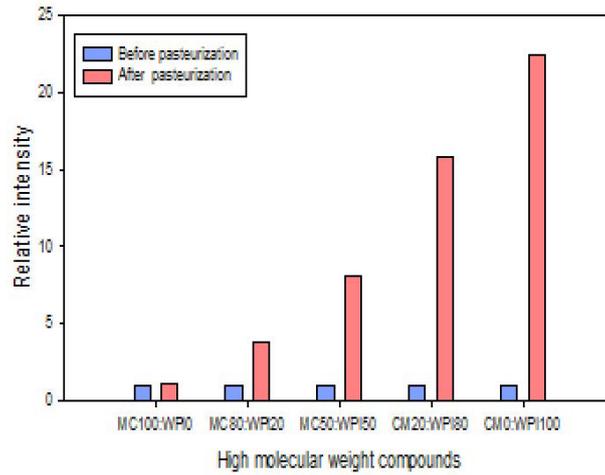
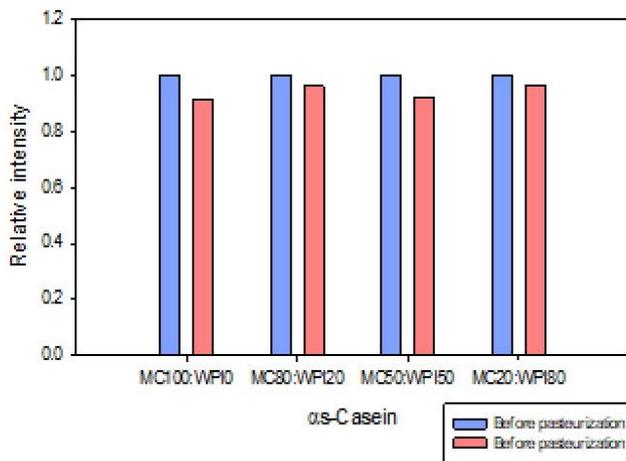


그림 14. 시료의 SDS-PAGE (A) 및 native-PAGE (B)

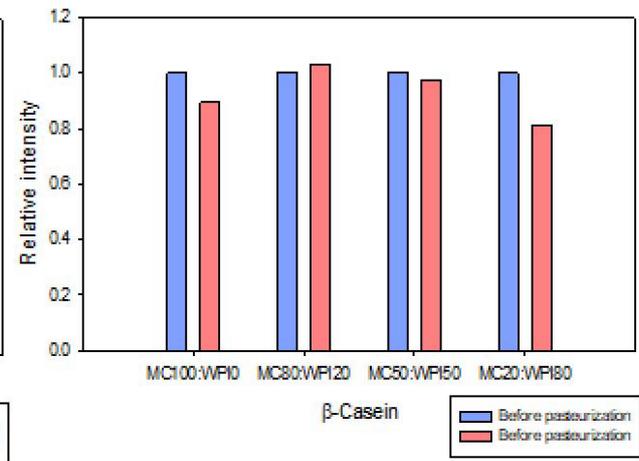
(A)



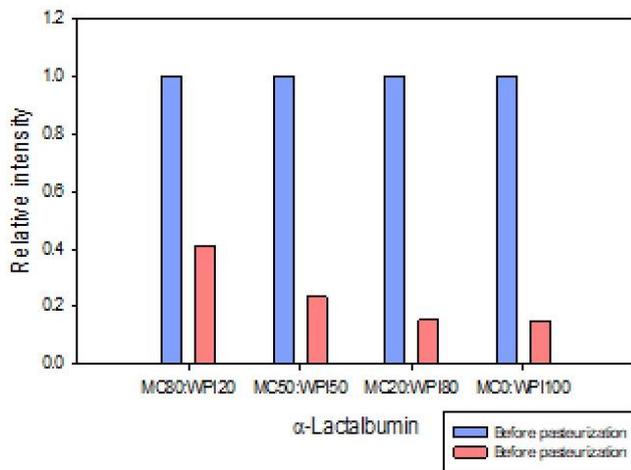
(B)



(C)



(D)



(E)

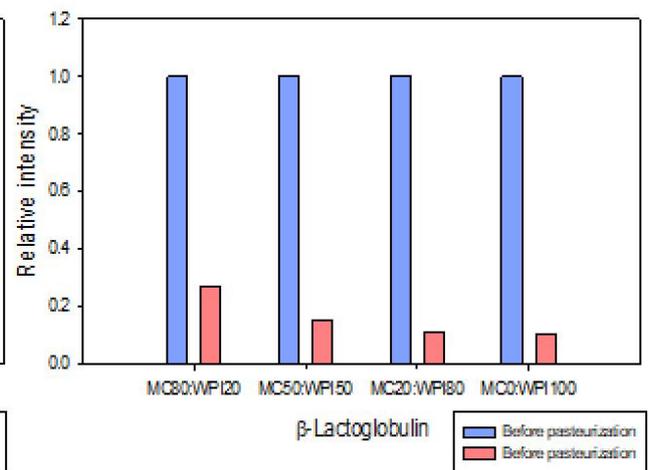


그림 15. Native-PAGE에 나타난 밴드 강도 변화.

고분자화합물 (A), α_s -casein (B), β -casein (C), α -lactalbumin, and β -lactoglobulin

7) 색도

- 살균 전 후 시료의 색 특성(color attributes) 변화를 측정한 결과는 표 8과 같음.

표 8. 살균 전후 시료의 색도 변화

Samples	Pasteurization	L*	a*	b*
MC:WPI	Before	82 ± 0.1	-3.1 ± 0.1	-4.1 ± 0.1
100:0	After	85 ± 0.1	-3.8 ± 0.0	-3.4 ± 0.0
MC:WPI	Before	79 ± 0.1	-3.5 ± 0.0	-4.2 ± 0.1
80:20	After	81 ± 0.0	-3.6 ± 0.0	-3.9 ± 0.0
MC:WPI	Before	66 ± 0.1	-2.9 ± 0.0	-5.4 ± 0.1
50:50	After	71 ± 0.1	-2.1 ± 0.0	-2.7 ± 0.0
MC:WPI	Before	38 ± 1.2	0.5 ± 0.0	-4.5 ± 0.0
20:80	After	39 ± 0.1	-0.2 ± 0.0	-9.1 ± 0.1
MC:WPI	Before	30 ± 0.4	-0.2 ± 0.0	1.6 ± 0.2
0:100	After	37 ± 0.1	-0.1 ± 0.0	-4.6 ± 0.1

- 시료의 유청단백질 함량이 증가함에 따라 명도를 나타내는 L* 수치가 감소하였으며, 육안으로도 명도의 차이 구별이 가능하였음. 이 같은 차이는 유청단백질 분말 소재가 가지는 특성으로 판단되며, 실제 유청단백질 분말 소재를 환원시켜 단백질 강화우유를 제조 시 액상농축우유와는 명도의 차이가 나타날 가능성이 있는 것으로 판단 됨.
- 살균과정에서는 명도가 오히려 증가하는 경향을 나타냈으며, 이 결과는 가열처리(65°C, 30 분)나 초음파처리에 의하여 명도가 증가한다는 Bermudez-Aguirre et al.(2008)의 보고와 일치하였음.
- 살균과정에 의한 갈변현상과 관련이 있는 황색도(b*)는 음의 값을 유지하였으며, 단백질의 종류가 갈변현상에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각할 수 있음.

8) 입자크기 변화

- 유청단백질의 첨가 비율이 살균에 의한 거대응집체의 형성에 미치는 효과를 분석하기 위하여 살균 전 후 시료의 입자크기 분포 변화를 particle size analyzer를 이용하여 분석하였음(그림 16).
- MC와 WPI의 평균입자크기(mean diameter)는 각각 0.118과 1.268 μm 으로 유청단백질의 입자크기가 약 10배 이상 더 큰 것으로 나타났으며, 이는 WPI의 제조과정에서 이미 유청단백질의 변성이 상당 부분 진행되었음을 나타냄.
- 열안정성이 우수한 casein은 살균 후에도 평균 입자의 크기는 0.164 μm 로 크게 변화하지 않았으나, 유청단백질의 경우 153 μm 으로 100배 이상 증가되었음.

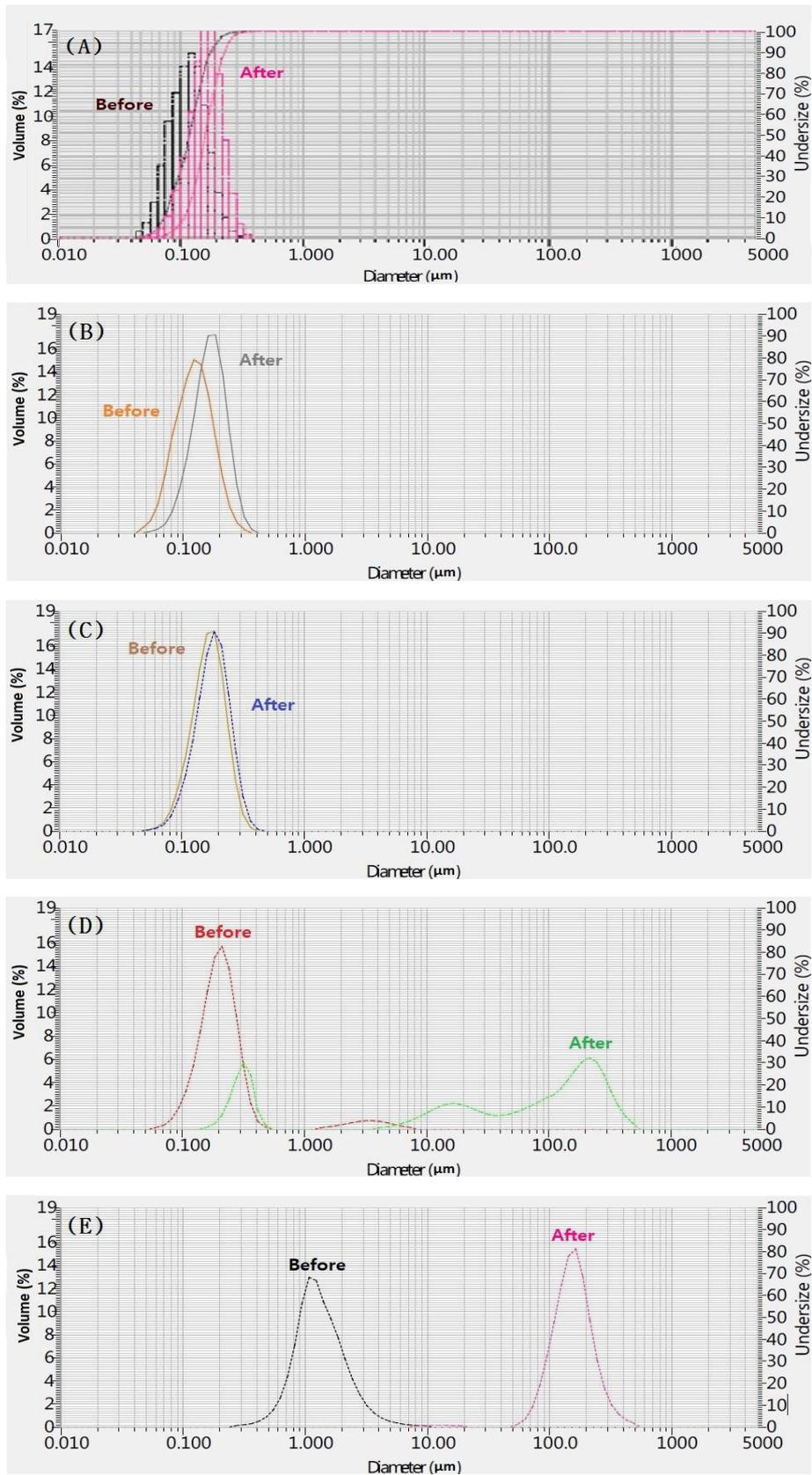


그림 16. 살균전후 시료 별 부피입자크기분포 변화.

(A) MC0:WPI100, (B) MC80:WPI20, (C) MC50:WPI50, (D) MC20:WPI80, and (E) MC0:WPI100

- 시료 내 유청단백질의 비율이 casein과 동일하거나 낮은 경우에는 살균 후에도 입자의 분포는 모두 1 μm 이하의 분포를 보인 반면, MC20:WPI80에서는 1 μm 이상의 거대입자 분포가 약 79% 수준으로 증가하였음(표 9).
- 유청단백질로만 이루어진 MC0:WPI100 시료의 경우, 살균 후 단백질 분포는 모두 100 μm 이상인 반면, MC20:WPI80 시료는 casein과의 응집으로 인한 다양한 크기의 입자분포가 확인되었음.
- Beaulieu et al.(1999)은 casein과 유청단백질의 비율을 달리하여 제조한 모델 용액을 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 가열한 경우 유청단백질의 비율이 80:20에서 40:60으로 증가함에 따라 단백질 응집체의 크기 분포는 매우 다양해진다고 보고하였으며, 크고 불균일한 입자의 형성을 transmission micrograph를 통하여 확인하였음.
- Anema and Li(2003)는 탈지분유의 환원 후 다양한 온도에서 가열하며 유청단백질의 변성이 casein micelle의 입자 크기에 미치는 영향을 조사한 결과 가열에 의한 micelle의 크기 증가는 유청단백질의 변성도와 비례함을 보고하였음. 그러나, 현재까지 유청단백질의 비율이 증가한 조건에서 가열에 의한 입자 크기 변화를 구체적으로 연구한 바가 없으며, 주로 입자 크기의 형성을 평균입자 크기 변화로 설명함으로써 거대단백질의 응집체에 대한 정량적 분석은 부족한 편임.

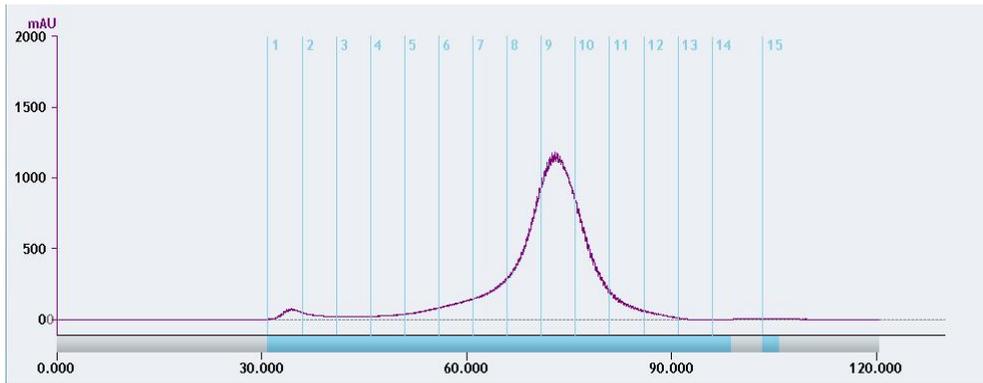
표 9. MC20:WPI80 and MC0:WPI100 시료의 부피크기분포 변화.

Pasteurization	MC20:WPI80		MC0:WPI100	
	Before	After	Before	After
< 0.51 μm (%)	94.3	21.0	1.9	0
0.51-1.005 μm (%)	0	0	26.0	0
> 1.005 μm (%)	5.6	78.9	72.0	100
< 10.097 μm (%)	100	100	27.9	0.2
> 10.097 μm (%)	0	0	72.0	99.7

9) 거대응집체 형성 단백질 profile 분석

- 입자크기 분포 분석결과 거대단백질 응집체 형성이 확인 된 MC20:WPI80 비율의 시료를 size exclusion chromatography를 이용하여 분석한 결과는 그림 17에 나타내었음.
- 살균 전 후 입자크기 분포 변화는 particle size analyzer의 분석 결과와 유사하게 80분에서 용출되는 작은 입자크기의 시료는 감소된 반면(size exclusion chromatography에서는 작은 입자의 단백질이 늦게 용출), 입자 크기가 증가하여 resin의 pore를 통과하지 못하고 빠르게 용출되는 다양한 분자량의 단백질 분포가 확인되었음.
- 각 peak를 구성하는 단백질을 분석하기 위해 fraction collector를 이용하여 5 mL씩 수집한 peak fraction을 SDS-PAGE를 이용하여 응집체의 구성 성분을 분석한 결과는 그림 18과 같음.

(A) MC20:WPI 80 (살균 전)



(B) MC20:WPI80 (살균 후)

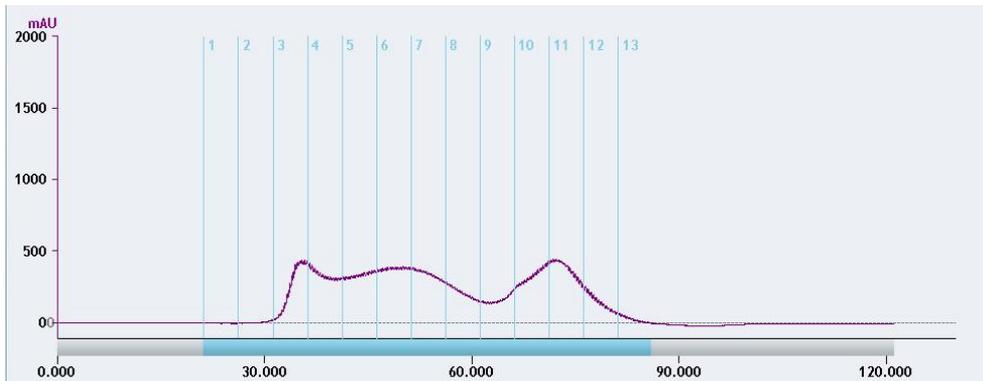


그림 17. MC20:WPI80 시료의 크기배제크로마토그램

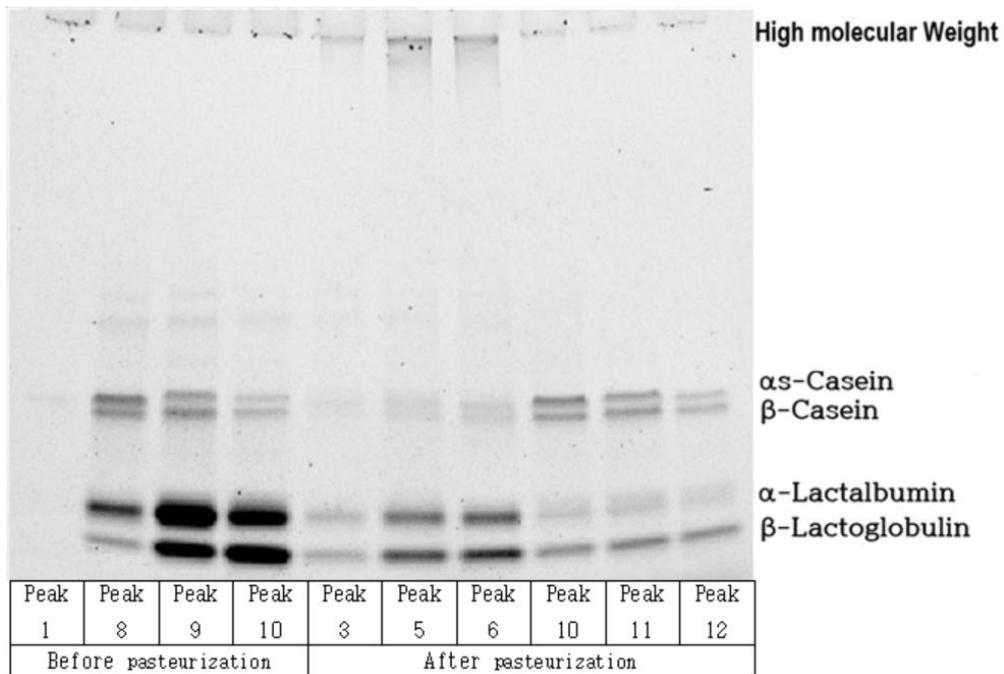


그림 18. 그림 17에서 회수된 피크 분석의 SDS-PAGE 결과

- 살균 전 시료 단백질 profile을 분석한 결과 peak fraction의 단백질 용출 순서는 casein이

먼저 용출된 후 유청단백질의 비율이 후에 용출되는 패턴을 나타낸 반면, 가열 후에는 유청 단백질의 용출이 먼저 나타나 가장 큰 거대입자는 유청단백질간의 자체응집으로 생성되며, 다양한 분자량의 casein-유청단백질 복합체 형성이 이루어짐을 확인하였음.

- 이상의 결과를 근거로 할 때 단백질 강화 우유 제조에 있어 casein과 유청단백질의 비율이 일반적 시유와 유사한 80:20보다 증가하는 경우 살균과정에서 단백질 응집에 차이를 나타냄으로써 입자크기의 변화를 나타낼 가능성을 시사하였음.
- 그러나, 1차년의 연구는 건조과정을 통하여 생산된 유단백질을 환원하여 만든 모델시스템에 대한 연구로서 건조과정을 거치지 않은 액상 우유환경에서는 어떠한 변화가 나타나는지 2차년 연구에서 주의 깊게 비교 분석할 필요성이 있는 것으로 판단 됨.

<1차년도>

[제2 협동기관 : 한양대학교]

I. 세부 연구목표

- 단백질의 *in vitro* 및 *in vivo* 소화흡수율 평가체계 구축
- 유단백질 함량 및 조성변화에 따른 *in vitro* 소화율 분석
- 유단백질 조성변화에 따른 *in vivo* 단백질 소화흡수율 및 이용률 분석

II. 연구개발 수행내용

1. 단백질의 *in vitro* 소화율 평가체계 구축

1) 단백질의 *in vitro* 소화율 평가방법 문헌조사(10편)

- *In vitro* 단백질 소화율에 관하여 문헌 조사한 결과를 아래와 같이 표 10에 정리하였음. 소화율 측정법으로는 ① Kjeldahl법을 이용한 질소정량법, ② 소화액 pH 측정을 통한 단백질 분해율 측정법, ③ 단백질 흡광도 측정법, ④ Ninhydrin 아미노질소 측정법이 있음. 이 중 질소 정량법은 소화 전과 후의 시료의 질소 함량을 Kjeldahl법으로 측정하여 질소 함량의 차이를 통해 소화율을 측정하는 방법이 보편적으로 사용되고 있으며 조사한 10편의 논문 중 3편의 논문이 질소정량법으로 소화율을 측정하였음.
- 소화율 측정 시 소화 조건으로 인공 장액(simulated intestinal fluid, SIF)을 이용하여 소화율을 측정한 논문이 2편, 인공 위액(simulated gastric fluid, SGF)와 장액을 모두 이용한 소화율 분석이 8편으로 확인되었음. 소화시간은 인공 장액을 단독 이용시 15분 동안 분석하였으며, 인공 위액과 장액을 병용 시 각각 2시간 동안 처리한 바 있음.
- 단백질 소화율 실험에서 소화효소로는 pepsin, pancreatin, trypsin, chymotrypsin이 사용됨. 조사한 10편의 논문에서 사용된 소화효소는 pepsin(1편), pepsin+pancreatin(4편), pepsin+trypsin(1편), pepsin+chymotrypsin(1편), pepsin+trypsin+chymotrypsin(2편), pepsin+pancreatin+trypsin+chymotrypsin(1편)으로 진행되었음. 소화효소 사용이 다양하게 존재하므로 이에 대한 예비 실험이 필요하다고 판단됨.

표 10. *In vitro* 단백질 소화율 연구방법

Protein	Enzyme	Evaluation of protein digestion	Reference
Milk	Pepsin, pancreatin	Bradford method	Journal of Agriculture and Food Chemistry. 63: 6787-6798 (2015)
Milk	Pepsin, trypsin, chymotrypsin	Kjeldahl method	Food Chemistry 217: 476-482 (2017)
Milk	Pepsin, pancreatin, trypsin, chymotrypsin	SDS-PAGE analysis and immunoblotting	Food Chemistry 190: 581-587 (2016)
Milk	Pepsin, pancreatin	Fluorescamine assay	Journal of the Science of Food and Agriculture. 99: 3069-3077 (2019)
Milk	Pepsin	SDS PAGE analysis and immunoblotting	Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 46: 325-328 (2000)
Beef	Pepsin, pancreatin	Ninhydrin method	Food Science and Technology. 55: 612-620 (2014)
Buckwheat	Pepsin, trypsin	Lowry method TCA-NSI method	Journal of Food Engineering. 82: 568-576 (2007)
Chicken	Pancreatin, trypsin, chymotrypsin	Absorbance method	Animal Feed Science and Technology. 248: 106-113 (2019)
Soybean	Pepsin, trypsin	Kjeldahl method	Plant Foods for Human Nutrition. 68: 124-130 (2013)
Tofu	Trypsin, chymotrypsin, peptidase	Kjeldahl method	Journal of Food Technology. 3: 182-187 (2005)

2) 단백질의 *in vitro* 소화율 예비 실험

(1) 단백질 분해에 대한 조건 확립(소화효소 결정 예비실험)

- 소화효소 사용이 다양하게 존재하여 이에 대한 예비 실험이 필요하다고 판단함.

① 시료준비

- 본 실험에 사용된 우유는 매일유업의 ESL 우유(단백질 함량 3 g/100 mL)제품을 사용하였으며, 효소미처리균, 위 환경만을 조성한 pepsin 처리균, 위와 장 환경을 모두 조성한 pepsin+pancreatin 처리균, 위와 장 환경을 모두 조성한 pepsin+trypsin 처리균으로 실험군을 나누어 실험을 진행하였음.

② 실험방법

- 실험방법은 시료를 37°C에서 1 M HCl를 이용하여 pH 2로 조절함. 2% pepsin이 첨가된 1 mM HCl를 제조하고 시료에 제조된 1 mM HCl을 1:12.5 (pepsin:protein) (w/w)의 비율로 첨가하였음. 37°C에서 140 rpm으로 2시간동안 교반 후, 이를 0.5 M NaOH를 이용해 pH 7으로 조정하여 pepsin의 효소활성을 불활성화시켰음. Pancreatin(0.4%)이 첨가된 0.1 M NaHCO₃을 제조하여 장관의 효소용액을 제조 후 1:62.5 (pancreatin:protein) (w/w)의 비율로 효소용액을 첨가하였음. 37°C에서 140 rpm으로 2시간 동안 교반 후, 동량의 10% trichloro acetic acid (TCA)를 첨가하고 9,900 g에서 15분간 원심분리한 뒤, TCA 가용성 분획의 흡광도를 280 nm에서 측정하였음. 소화율은 일정시간동안의 흡광도 변화로 나타냄.

③ 실험결과

- 각 군에 따른 소화 처리 후, TCA에 의한 단백질을 침전시킨 결과 효소 미처리군, pepsin 효소 처리군, pepsin+pancreatin 효소 처리군 순으로 단백질의 침전정도가 적게 나타났으며, 이는 인체의 점차적인 소화 진행에 따른 단백질의 분해정도의 변화를 의미하는 것으로 생각 됨(그림 19).



그림 19. 소화 시간에 따른 효소미처리군, pepsin처리군, pepsin+pancreatin처리군의 침전 단백질 변화 (왼쪽부터 180 min, 210 min, 240 min)

- TCA 가용성 분획의 흡광도를 280 nm에서 측정한 결과, 효소미처리군은 효소처리군 pepsin, 효소처리군 pepsin+pancreatin에 비해 흡광도가 낮게 나타났으며, pancreatin을 넣은 120 min이후에는 효소처리군 pepsin에 비해 효소처리군 pepsin+pancreatin의 흡광도가 더 높게 나타났음(그림 20).

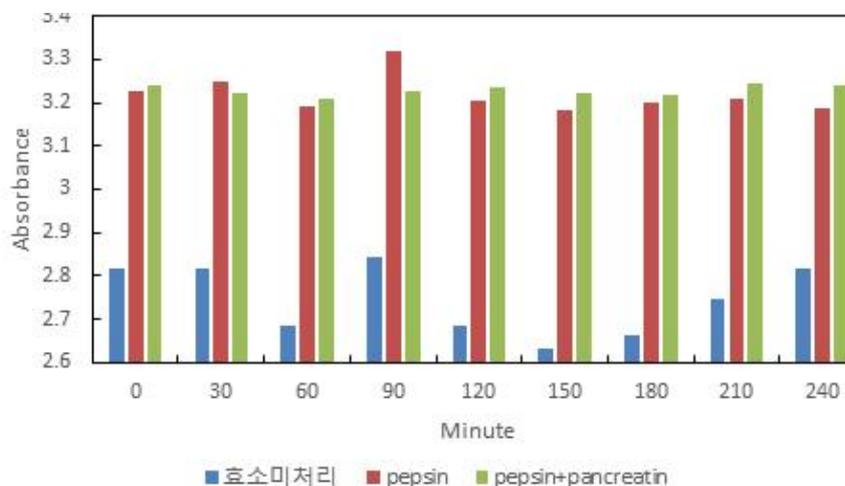


그림 20. 소화시간에 따른 단백질의 흡광도 변화

- TCA 가용성 분획의 흡광도를 280 nm에서 측정한 결과, 장 환경을 조성한 120분 이후로 효소처리군 pepsin+trypsin은 효소처리군 pepsin+pancreatin에 비해 흡광도가 낮게 나타났음(그림 21). 따라서 본 실험에서는 pepsin+pancreatin을 소화효소로써 이용 하는 것이 적합하다고 판단 됨.

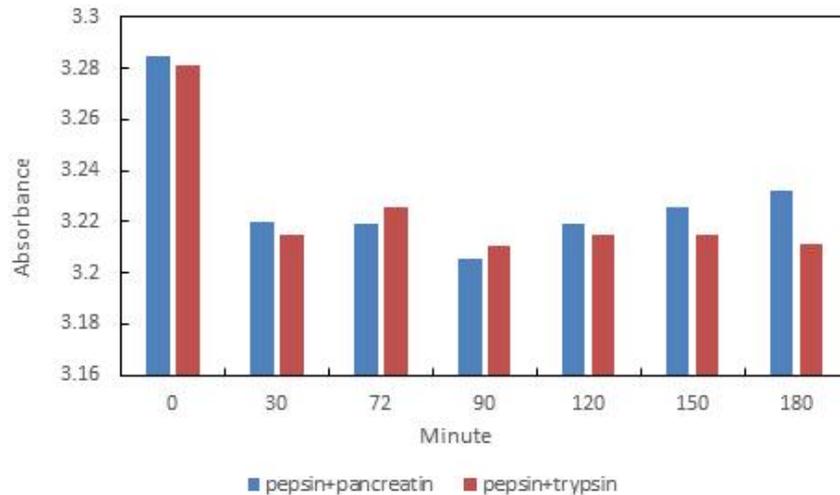


그림 21. 소화시간에 따른 단백질의 흡광도 변화

(2) 단백질 분해율 측정법 확립

① 방향족 아미노산 측정법(UV spectrophotometry 법)

- 단백질 정량법에는 UV spectrophotometry, Biuret method, Lowry method, Bradford method, BCA method 등이 있는데, 이 중 자외선 흡광도를 측정하는 방법인 UV spectrophotometry는 단백질에 포함되어 있는 방향족 아미노산인 tryptophan, tyrosine, phenylalanine 등의 아미노산이 280 nm 파장의 빛을 잘 흡수하는 원리를 이용한 단백질 정량법임.
- 실험방법은 시료를 37°C에서 1 M HCl를 이용하여 pH 2로 조정하고 2% pepsin이 첨가된 1 mM HCl를 제조하였음. 시료에 제조된 1 mM HCl을 1:12.5 (pepsin:protein) (w/w)의 비율로 첨가한 후 37°C에서 140 rpm으로 2시간 동안 교반 후, 이를 0.5 M NaOH를 이용해 pH 7으로 조절하여 pepsin의 효소활성을 불활성화 하였음. Pancreatin(0.4%)이 첨가된 0.1 M NaHCO₃을 제조하여 장관의 효소용액을 제조 후 1:62.5(pancreatin:protein) (w/w)의 비율로 효소용액을 첨가하고 37°C에서 140 rpm으로 2시간동안 교반한 후, 동량의 10% trichloro acetic acid(TCA)를 첨가하였음. 시료를 9,900 g에서 15분간 원심분리한 뒤, TCA 가용성 분획의 흡광도를 280 nm에서 일정시간의 소화율은 펩신 처리 시간 0분을 기준으로 일정 시간동안 증가된 흡광도로 계산하였음.

② 질소정량법(킬달법)

- 킬달법을 이용한 질소정량법은 시료에 황산을 가해 유기성 질소를 분해한 후 발생된 암모니아를 알칼리 용액으로 적정하여 질소량을 산출하는 원리로 본 실험에는 자동화된 장치를 이용하여 분석하였음.

- 실험방법은 시료 3 g을 300 mL 킬달 분해 플라스크에 넣고 분해촉진제(황산, 황산칼륨)와 진한 황산 12 mL를 넣고 분해장치에서 약 50 분 분해하여 분해액의 색이 투명한 연푸른색이 될 때 상온으로 냉각시켰음. 냉각 후 분해된 시험용액에 80 mL의 증류수를 첨가하고 25 mL 혼합지시약이 섞인 포집용액을 플라스크에 넣고 수산화나트륨 용액 50 mL를 넣은 후 증류장치에서 약 4분간 증류하여 증류액의 색이 녹색으로 변화하면 0.1 M 염산용액을 이용해 종말점이 옅은 핑크색에 달할 때까지 적정하였음. 적정에 사용된 산의 양을 기록하며 같은 방법으로 시료를 제외한 공시험(blank test)를 병행하여 분해, 증류, 적정을 실시하였으며 시료 중의 질소함량(%)은 다음 식에 의해 계산하였음.

$$\text{질소함량(\%)} = \frac{(\text{HCl 소비량} - \text{blank 소비량}) \times \text{HCl 몰농도} \times 14.01}{\text{검체량(mg)}} \times 100$$

③ 결론

- UV spectrophotometry 법은 측정소요 시간이 짧고 단백질 변성이 없다는 이점이 있음에도 불구하고 buffer, pH, salt, purines, pyrimidines, nucleic acids 등에 영향을 받아 킬달법과 비교하였을 때 UV spectrophotometry 법은 미량의 분석 등의 정확도가 높지 않아 데이터의 재현성이 높지 않은 것으로 나타남. 따라서 본 *in vitro* 단백질 소화율의 실험 방법은 킬달법을 사용하는 것으로 결정하였음.

2. 단백질의 *in vivo* 소화흡수율 평가체계 구축

- 단백질의 *in vivo* 소화흡수율 및 단백질 이용률 평가방법 문헌(10편)을 조사한 결과는 표11에 나타냈음. 실험동물은 Sprague-dawley rat(3편), wistar rat(3편), albino rat(1편), Balb/c mice(1편)을 사용하였으며 주로 수컷을 이용함. Sprague-dawley(SD) rat은 사람의 소화기관과 유사한 단위동물로 단백질의 소화율 등 단백질의 품질을 분석하기 위해 체성분과 근육량 측정 시 널리 사용되고 있음.
- 식이투여 방식은 모두 사료혼합(10편)으로 나타났으며 군 당 개체수는 최소 8마리에서 최대 24마리였으며, 8마리(5편)가 가장 많이 사용됨.
- 측정 항목으로는 체중, 음수섭취량, 식이섭취량, 대변 내 질소함량, 섭취 질소함량 등이 있었음. 동물의 단백질 이용률은 주로 단백질 효율(protein efficiency ratio, PER)과 순단백질 효율(net protein ratio, NPR)로 평가하였으며, 단백질 소화흡수율은 주로 진성소화율(true digestibility, TD), 겉보기 소화율 (apparent digestibility, AD)로 평가하였음.
- 소화흡수율 평가에 사용되는 대변 수집을 위해서는 10 편의 논문 중 2편의 논문에서 wire-bottom cage를 사용하였고, 8편의 논문에서 metabolic cage를 사용하였음.
- AOAC법에 의해 단백질 함량은 모두 10%로 고정 되어야 하므로 유단백질 함량에 따른 분석은 의미가 없음을 파악되어 유단백질 변화에 대한 동물실험은 제외하였음.
- 따라서, 본 실험에서의 동물실험은 군 당 8마리로 SD rat을 이용하였으며 4주간 동물 사육을 진행하였음. 분석항목은 TD, AD, PER, NPR으로 하였으며 정확한 사료섭취량 측정 및 대변 수집을 위하여 대변수집기간에는 metabolic cage를 사용하는 것으로 결정하였음.

표 11. *In vivo* 단백질 소화흡수율 및 단백질 이용률 연구 문헌 조사

Protein	Animal	Number	Measurement	Reference
Milk	Albino rat	8	-Net protein efficiency ratio -Protein efficiency ratio	Journal of food science Technol. 53: 2548-2557 (2016)
Milk	Balb/c mice	8	-Plasma histamine level	Journal of Dairy Science. 88: 1654-1660 (2005)
Milk	SD rat	19, 10	-Plasma hormone and intestinal disaccharidase activity -Gut growth	Biology of the Neonate. 74: 314-322 (1998)
Milk/ soy protein	Wistar rat	24	-Protein efficiency ratio	Food&Function. 9: 1500-1509 (2018)
Milk rice bran protein rice endosperm protein soy protein	SD rat	10, 8	-Protein efficiency ratio -Net protein ratio -Net protein utilization -True digestibility -Biological value -Protein digestibility corrected amino acid score	Food Chemistry. 172: 766-769 (2015)
Soy faba bean maize casein wheat gluten	Wistar rat	10	-Protein efficiency -Net protein utilization -Food efficiency -Apparent total digestibility -Corrected faecal digestibility -Biological value	British Journal of Nutrition. 121: 496-507 (2019)
Wheat tortilla corn tortilla	Wistar rat	8	-Protein efficiency ratio -Protein digestibility -Biological value -Net protein utilization	Food and Nutrition Research. 60: 31382 (2016)
Soy corn zein	SD rat	10	-Protein efficiency ratio -Protein digestibility -Net protein ratio -Biological value	Food and Nutrition Sciences. 2: 1105-1113 (2011)
Chickpea seed	Wistar rat	8	-Protein digestibility corrected amino acid score(PDCAAS)	Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 11006-11010 (2008)
Sweet potato	SD rat	6	-Protein digestibility corrected amino acid score -True digestibility	PLoS one 10(4): e0120121 (2015)

3. 유단백질 함량 및 조성변화에 따른 *in vitro* 단백질 소화율 평가

1) 유단백질 함량 및 조성변화에 따른 *in vitro* 단백질 소화율 평가 방법

(1) 시료 준비

- Micellar casein isolate (MC; Refit Micellar Casein Isolate 88, FrieslandCampina ingredients, 85 %)과 whey protein isolate(WPI; Hilmar™ 9020 Whey Protein Isolate, Hilmar ingredients, 89.5 %)를 혼합하여 총 단백질이 5%가 되도록 MC:WPI의 비율이 100:0, 80:20, 50:50, 20:80, 0:100으로 조정하였음. 시료를 각각 110 bar와 50 bar에서 2단계 균질을 실시하고, 95°C에서 30 분간(121°C, 1초 살균과 동일조건)살균을 실시하였음.

표 12. *In vitro* 실험군

Experimental group	Protein amount (%)	Casein (%)	Whey protein (%)
3.4%-100:0		100	0
3.4%-80:20	3.4%	80	20
3.4%-50:50		50	50
3.4%-20:80		20	80
5.0%-100:0		100	0
5.0%-80:20	5.0%	80	20
5.0%-50:50		50	50
5.0%-20:80		20	80

(2) 질소정량 방법(킬달법)

- (주) 매일유업으로부터 제공받은 시료를 세팅된 표준화 방법으로 소화율 분석을 진행하였음. 시료를 37°C에서 1 M HCl를 이용하여 pH 2로 조정하고 2% pepsin이 첨가된 1 mM HCl를 제조하였음. 시료에 제조된 1 mM HCl을 1:12.5 (pepsin:protein) (w/w)의 비율로 첨가하고 37°C에서 140 rpm으로 2시간동안 교반 후, 이를 0.5 M NaOH를 이용해 pH 7로 조절하여 pepsin의 효소활성을 불활성화 하였음. Pancreatin(0.4%)이 첨가된 0.1 M NaHCO₃을 제조하여 장관의 효소용액을 제조 후 1:62.5(pancreatin:protein) (w/w)의 비율로 효소용액을 첨가하였음. 37°C에서 140 rpm으로 2시간동안 교반 후, 동량의 10% trichloro acetic acid (TCA)를 첨가하여 7,000 g에서 15분간 원심분리한 뒤, 분리된 상등액을 분석시료로 사용하였음.
- 총 질소(total nitrogen)함량은 자동 킬달 기기를 이용하여 AOAC법에 따른 질소정량법(킬달법)으로 측정하며, 단백질 소화율(protein digestibility)은 아래의 식을 이용하여 산출함.

$$\text{Protein digestibility(\%)} = \frac{\text{NPN after digestion} - \text{NPN before digestion}}{\text{Total nitrogen before digestion} - \text{NPN before digestion}} \times 100$$

2) 유단백질 함량 및 조성변화에 따른 *in vitro* 단백질 소화율 결과

- 단백질 함량별 군 간의(3.4%, 5%) 단백질 소화율에는 큰 차이를 보이지 않았으며, 단백질 함량 3.4%, 5%에서 모두 20:80 < 50:50 < 80:20 < 100:0 순으로 단백질 소화율이 높게 나타났음. 이 결과는 casein의 비율이 높을수록 단백질 소화율이 높게 나타났음(그림 22).
- 이러한 원인은 whey protein은 casein과 비교하여 효소적 가수분해에 저항성이 높다는 선행 연구 결과와 일치함(Séverin과 Wen, 2006).

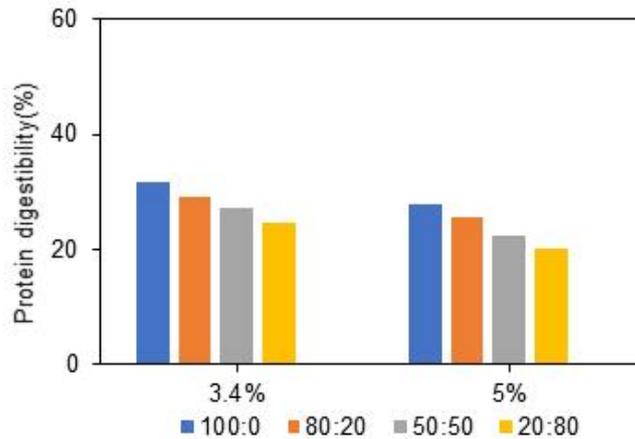


그림 22. 유단백질 함량 및 조성변화에 따른 *in vitro* 소화율

4. 유단백질 조성변화에 따른 *in vivo* 단백질 소화흡수율 및 이용률 평가

1) 유단백질 조성변화에 따른 *in vivo* 소화흡수율 및 이용률 평가 방법

(1) 사료 제작

- 사료의 단백질 함량은 단백질 이용률 평가방법인 단백질 효율(protein efficiency rate, PER)을 측정하기 위해 사료의 총 단백질 양을 10%로 고정하였음. Casein(85.2%) 및 whey protein(89.5%)의 단백질 순도를 고려하여 비율별로 적응기간에 투여한 AIN-93M을 기반으로 사료를 배합하였음. 급원 단백질 순도에 따라 총 중량에 차이가 생기는 부분은 corn starch의 배합을 늘려 조정하였음(표 13).

표 13. Casein 및 whey protein의 비율에 따른 사료 조성

Ingredient (g)	CW-10:0	CW-8:2	CW-5:5	CW-2:8	N-Free
Casein(85.2%)	117.37	93.90	58.69	23.47	-
Whey protein(89.5%)	-	22.35	55.87	89.39	-
Sucrose	100	100	100	100	100
Dextrose	155	155	155	155	155
Corn starch	488.32	489.44	491.13	492.83	605.69
Cellulose	50	50	50	50	50
Soybean oil	40	40	40	40	40
Mineral mix	35	35	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10	10	10
L-Cystein	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
TBHQ	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
Total	1000	1000	1000	1000	1000

(2) 동물실험

- 80 ± 20 g인 4주령의 Sprague-Dawley rat (SD rat, Koatech, Korea)를 분양받아 1주간의 적응기간 동안 순화시킨 후 실험에 사용함. 순화기간 중 일반식은 AIN-93M (Saeronbio, Korea)를 자유 급이하고, 정제수를 음수병에 넣어 자유 섭취시킴. 명암은 12시간(day light 7:30~19:30)을 주기로, 실내온도와 습도가 일정한 사육조건을 유지하였음.
- 40마리의 SD rat은 군 당 8마리씩 Table 13과 같이 5개 실험군으로 나누었으며 케이지 당 2마리의 rat을 사육하였음. 4주간 casein과 whey protein의 비율을 달리한 사료를 급이함.
- 4주간 매주 2회 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하였음.

표 14. 동물실험 실험군

Experimental group	Protein amount(%)	Casein(%)	Whey protein(%)
CW-10:0		100	0
CW-8:2		80	20
CW-5:5	3.4%	50	50
CW-2:8		20	80
N-free		0	0

(3) 단백질 소화흡수율 및 이용률 평가

- 2, 3주차에 대사케이지에 개별 사육하여 하루 적응시킨 후, 3일 동안의 사료섭취량을 측정하고 대변을 수집하였음.
- 채취한 분변은 falcon tube에 넣어 4°C에서 보관함. 분변은 65°C에서 48시간 건조하여 냉각 후 칭량하였으며 킬달법에 따라 질소함량을 측정하였음.
- 체중, 사료섭취량 및 분변을 이용하여 단백질 효율(protein efficiency rate, PER), 순단백질 효율(net protein ratio, NPR), 진성소화율(true digestibility, TD)을 산출하여 단백질 소화흡수율 및 이용률을 다음의 공식에 의하여 계산하였음.

$$PER = \frac{\text{체중증가량 (g)}}{\text{단백질 섭취량(g)}}$$

$$NPR = \frac{\text{체중증가량 (g)} + \text{Protein free군의 체중감소량 (g)}}{\text{단백질 섭취량 (g)}}$$

$$TD = \frac{\text{질소섭취량 (g)} - \{\text{대변 내 질소량 (g)} - \text{Protein free군의 대변 내 질소량 (g)}\}}{\text{질소섭취량 (g)}} \times 100$$

(4) 체성분 분석

- 4주간의 실험이 끝난 후 dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) 촬영을 통해 체지방량 (fat mass), 체지방량(lean mass), 골밀도(bone mineral density, BMD)를 측정하였음.

2) Casein 및 whey protein의 비율에 따른 *in vivo* 단백질 소화흡수율 및 이용률 결과

(1) 체중, 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율

- 체중 및 체중증가량은 군 간의 유의적 차이가 나타나지 않았음. 식이섭취량은 CW-10:0이 CW-5:5 및 CW-2:8에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 높은 값을 나타내었음. 식이효율은 CW-5:5이 CW-10:0 및 CW-8:2에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 높은 값을 나타내었음(표 15).

표 15. Casein 및 whey protein의 비율에 따른 rat의 체중, 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율

	CW-10:0	CW-8:2	CW-5:5	CW-2:8
Body weight (g)	279 ± 9.18 ^a	269 ± 2.66 ^a	275 ± 3.97 ^a	264 ± 3.62 ^a
Body weight gain (g)	170 ± 7.23 ^a	163 ± 2.07 ^a	167 ± 3.33 ^a	154 ± 0.92 ^a
Feed intake (g/day)	20.2 ± 0.50 ^a	19.1 ± 0.16 ^{ab}	18.3 ± 0.31 ^b	18.3 ± 1.79 ^b
Feed efficiency ratio (%)	29.9 ± 0.49 ^b	30.4 ± 0.33 ^b	32.9 ± 0.88 ^a	30.6 ± 0.22 ^{ab}

CW, casein:whey protein; Data are expressed as mean ± SEM. The values with different letters in the same row indicate significant differences at $p < 0.05$.

(2) 단백질 소화흡수율 및 이용률

- 단백질 효율(PER) 및 순단백질 효율(NPR)은 CW-5:5와 CW-2:8이 CW10:0과 CW-8:2보다 높게 나타남. 질소섭취량은 군 간의 유의적 차이가 나타나지 않았으며, 식이에서 whey protein 비율이 증가함에 따라 대변 내 질소함량은 감소하였음. 진성 소화율(TD)은 CW-2:8이 다른 모든 군에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 높게 나타남(표 16).

표 16. Casein 및 whey protein의 비율에 따른 rat의 단백질 소화흡수율 및 이용률

	CW-10:0	CW-8:2	CW-5:5	CW-2:8
Protein efficiency ratio (%)	2.99 ± 0.05 ^b	3.04 ± 0.03 ^b	3.29 ± 0.09 ^a	3.06 ± 0.02 ^{ab}
Net protein ratio (%)	3.31 ± 0.04 ^b	3.37 ± 0.03 ^b	3.57 ± 0.07 ^a	3.40 ± 0.02 ^{ab}
Nitrogen intake (g/rat)	1.02 ± 0.04 ^a	0.98 ± 0.02 ^a	0.97 ± 0.02 ^a	1.03 ± 0.03 ^a
Fecal nitrogen (g/rat)	0.12 ± 0.00 ^a	0.09 ± 0.01 ^b	0.09 ± 0.00 ^b	0.07 ± 0.01 ^c
True digestibility (%)	92.7 ± 0.22 ^b	93.2 ± 0.25 ^b	93.5 ± 0.15 ^b	94.8 ± 0.22 ^a

CW, casein:whey protein; Data are expressed as mean ± SEM. The values with different letters in the same row indicate significant differences at $p < 0.05$.

(3) 체성분 측정 결과

- 체지방 및 제지방 함량은 군 간의 유의적 차이가 나타나지 않았음. 골밀도는 whey protein 비율이 증가함에 따라 감소하였으며, CW-10:0군이 CW-2:8에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 높은 값을 나타내었음(Fig. 19).

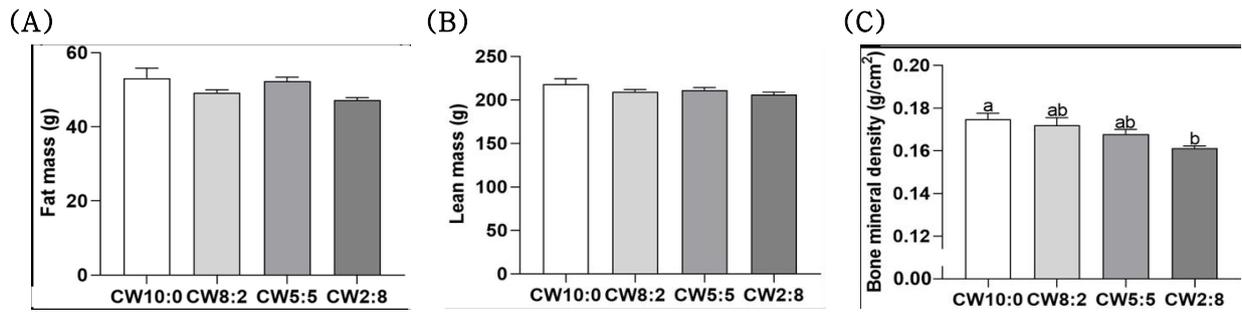


그림 23. Casein 및 whey protein의 비율에 따른 rat의 (A) 체지방량, (B) 체지방량, (C) 골밀도
 Data are expressed as mean \pm SEM. The values with different letters indicate significant differences at $p < 0.05$.

2-2. 2차년도 세부 연구목표 및 수행 내용

[주관기관 : 매일유업(주)]

I. 세부 연구목표

1. 정밀여과공법을 이용한 단백질 강화 제품 시험생산(Pilot 설비 이용)
2. 시제품의 보존검사 진행
3. 시제품의 관능검사 진행

II. 연구개발 수행내용

1. Filtration pilot 설비 도입 전 선행연구

- Pilot 설비 생산 제품의 최적 살균조건 확립을 위해 현재 주관기관에서 운영중인 제품들의 살균조건 별 샘플 제조 및 분석을 통한 사전 데이터 축적 진행
 - (1) 살균 온도 조건,
 - (2) 단백질 함량 차이에 따른 샘플의 *in vitro* 단백질 소화율 및 이화학적 특성 분석 (20년 2월~20년 4월 진행)(표 17)

표 17. 살균 조건 및 단백질 함량 별 시료의 제조

시료	단백함량(%)	살균조건	살균온도(℃)	살균시간
1	3.4	LTLT	63±1	30분
2		HTST	73±1	15초
3		UHT(살균)	130 이상	2초 이상
4		UHT(멸균)	140 이상	3초 이상
5	5.0	LTLT	63±1	30분
6		UHT(멸균)	140이상	3초 이상

- 샘플의 단백질함량 이외의 영양성분은 일반 시유와 동일함.
- MF 설비 도입 이전의 연구로 고단백질 우유(5%)의 제조는 MPI(Milk Protein Isolate)를 첨가하여 시료의 단백질 함량을 조정하였음.

1) 물리화학적 특성 변화 분석 (제1협동기관-국민대학교와 공동진행)

(1) 열안정성(Heat stability) 분석

- 시료 10 mL를 60℃ water bath에서 10분간 유지하고 120℃의 oil bath에서 15분간 유지한 후 원심분리(3,000 x g, 10분, 25℃)하여 침전물의 무게를 측정하였음.
- 침전물의 무게는 살균에 적용되는 열처리 강도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타냈음 (표 18).

표 18. 살균조건에 따른 시료의 침전물 무게 변화

Sample	Sediment (g)
Raw milk	0.252 ± 0.019 ^{bc}
LTLT	0.217 ± 0.008 ^c
HTST	0.287 ± 0.019 ^{ab}
UHT(130°C)	0.324 ± 0.008 ^a
UHT(140°C)	0.302 ± 0.022 ^a

(2) Native-PAGE를 이용한 단백질 상호작용 분석

- 단백질 고유의 전하에 의해서만 분리하는 Native-PAGE의 전기영동장치는 Biorad mini gel electrophoresis unit(Biorad Laboratories, Richmond, CA, USA)을 이용하였으며 4-20% acrylamide gradient gel을 이용하여 단백질을 분리하였음. 단백질 band intensity는 Biorad ChemiDac XRS system(Biorad)을 이용하여 이미지 분석을 실시하였음(그림 24).
- 원유를 살균한 시료에서는 열처리 후 고분자단백질 밴드(High Molecular Weight, HMW)의 증가가 관찰되었음. UHT살균시료에서는 특히 whey protein 밴드가 LTLT 및, HTST 시료와 비교하여 감소하는 경향이 나타났으며, 특히 whey protein 중 β -lactoglobulin의 밴드의 감소가 뚜렷하였음. 고분자 단백질밴드는 whey protein이 살균과정에서 변성되어 casein과 함께 거대중합체를 형성하는 것으로 확인되었음.

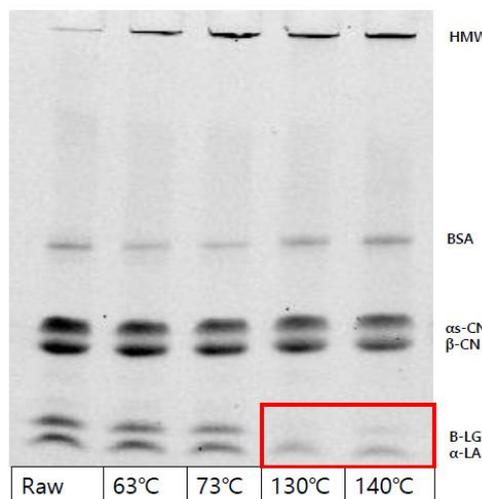


그림 24. 살균조건에 따른 시료의 Native-PAGE 결과

2) *In vitro* 단백질 소화율 실험(제2협동기관-한양대학교와 공동진행)

(1) 질소정량 및 소화율 계산방법

- 제2 협동연구기관에서 1차년도에 확립한 소화율 시험법으로 소화율 분석을 실시하였음.
- 총 질소(total nitrogen)함량은 micro automatic 켈달기기를 이용하여 AOAC법에 따른 질소정량법(켈달법)으로 측정하였으며 단백질 소화율(protein digestibility)은 아래의 식을

이용하여 산출하였음.

$$\text{Protein digestibility (\%)} = \frac{\text{NPN after digestion} - \text{NPN before digestion}}{\text{Total nitrogen before digestion} - \text{NPN before digestion}} \times 100$$

(2) *In vitro* 단백질 소화율 실험 결과

- 살균조건에 따른 시료의 단백질 소화율 분석 결과, 살균조건 HTST에서 가장 높은 단백질 소화율을 나타내었으며, HTST > UHT(130℃) > UHT(140℃) > LTLT 순으로 단백질 소화율이 높게 나타났다.
- 우유 속의 whey protein은 72~75℃, 15 분 살균 조건(HTST)에서 변성이 가장 적게 일어나므로 HTST 열처리 조건에서 단백질 변성이 감소하여 *in vitro* 소화율이 상대적으로 높게 나타났을 것으로 생각 됨(그림 25).

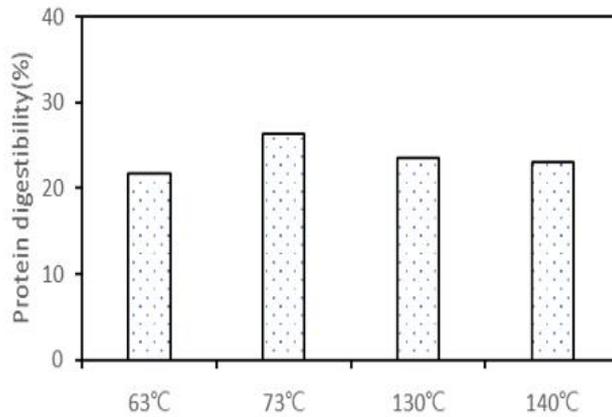


그림 25. 살균조건에 따른 시료(단백질 함량 3.4%)의 *in vitro* 단백질 소화율 비교

- 단백질 강화(단백함량 5%)시료의 살균조건 별(LTLT, UHT(140° C)) 샘플의 단백질 소화율 실험결과, LTLT 살균 조건 샘플과 비교하여 UHT(140℃) 시료의 단백질 소화율이 더 높은 경향을 나타내었음(그림 26).

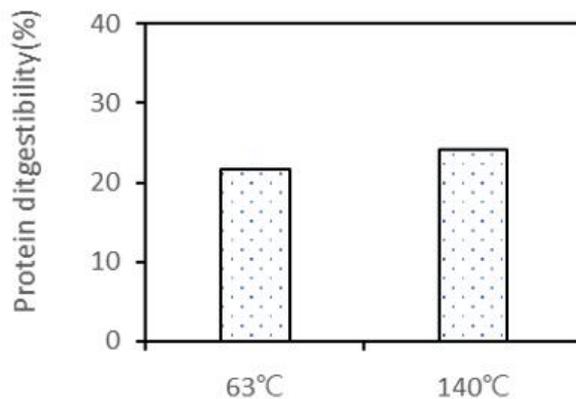


그림 25. 살균조건에 따른 시료(단백질 함량 5%)의 *in vitro* 단백질 소화율 비교

- 소화율에 영향을 미칠 수 있는 요인을 고려하여 (1)유단백질 비율 조건 및 총단백질 함량, (2) 농축 단백질우유 vs. 단백질 분말 첨가, (3)제품의 살균 조건 총 3가지 변수로 설정하고 표 19와 같이 총 6군을 실험군으로 선정하고 시료를 제조하였음.

표 19. 정밀여과를 이용한 시료 생산

시료	단백질함량(%)	Casein : Whey 비율	살균 조건	단백 원료
1	3.3	8 : 2	UHT	단백 분리 농축유 (MF 파일럿 설비 유래)
2		6 : 4		
3		5 : 5		
4	5.5	8 : 2	HTST	MPI
5			UHT	
6			UHT	

2. 정밀여과공법을 이용한 단백질 강화 제품 시험생산(Pilot 설비 이용)

○ MF pilot 설비 도입

- TetraPak의 filtration pilot 설비(MF/UF pilot, TPFS, TetraPak, Silkeborg, Denmark)는 매일유업 중앙연구소에 입고되어 유틸리티 설치 공사 완료(그림 26)
- 설비 시운전 진행 microfilter / ultrafilter의 압력 및 유량을 조절하여 목적하는 CF값 설정 및 농축도 측정 (milkoscan, TS, brix 측정) 진행
- Membrane: 0.1 μm pore size spiral-wound PVDF membrane, 0.01μm pore size spiral membrane(Alfa Laval)
- 설비 크기 : Length = 2.5 m, Width = 1.3 m, Height = 2 m
- 운전 압력: inlet pressure 0.5 bar/outlet pressure 1.0 bar
- feed flow : 100 ~ 200L/hr
- Feed in 90 kg/h → 45 kg/h of permeate, 45 kg/h of retentate (CF2 조건)



그림 26. 매일유업 중앙연구소 정밀여과 파일럿 설비

○ 여과기술을 이용한 casein:whey protein 비율 조정 우유 및 단백질 강화우유 시 생산

- 정밀여과를 이용하여 분자량이 다른 casein과 whey를 분리하고자 하였으며, 이전 연구를 참고하여 상대적으로 분자량이 큰 casein은 retentate로, 분자량이 작은 whey는 permeate에 잔류하게 될 것이라는 가설로 filtration 진행함.
- 단백질량 3.3%, casein:whey protein 비율을 조정한 시료(6:4, 5:5)의 제조는 탈지유를 filtration 과일렛 설비에 투입 후, spiral-wound 필터(PVDF 0.1 μm)를 사용하여 농축계수 CF4 조건으로 (inlet pressure 0.5 bar/outlet pressure 1.0 bar) 정밀여과하여 retentate와 permeate를 얻어냄. 시간별 분획물의 brix 값 측정을 통해 retentate 및 permeate의 안정화를 확인하였으며, retentate와 permeate의 총 단백질 함량 및 casein, whey protein의 단백질 함량은 켈달법을 이용하여 확인하였음.
- Retentate와 permeate 내 casein, whey의 단백질 함량을 기반으로 목표한 casein:whey의 비율로 시료를 재조합하여 제조한 후 spiral membrane(Alfa Laval, 0.01 μm)를 이용, 한외여과하여 유단백질 농축을 진행하였음.
- 단백질량 5.5% casein:whey protein 비율(8:2) 시료의 제조는 spiral-wound 필터(PVDF 0.1 μm)를 사용하여 농축계수 CF4 조건으로 (inlet pressure 0.5 bar/outlet pressure 1.0 bar) 정밀여과한 retentate와 permeate를 혼합하여 제조하였으며, 단백질량 5.5% 분말첨가 시료는 5.5% casein:whey protien 비율(8:2) 시료와 영양성분 함량을 유사하게 맞추기 위하여 혼합탈지분유(Skim milk powder)와 Milk Protein Isolate(QU-8302, Arla Foods Ingredients)를 혼합하여 제조하였음(그림 27, 그림 28).
- CF(concentration factor)는 다음의 공식으로 계산하였음.

$$CF = [\text{permeate(L/h)} + \text{retentate(L/h)}] / \text{retentate(L/h)}$$

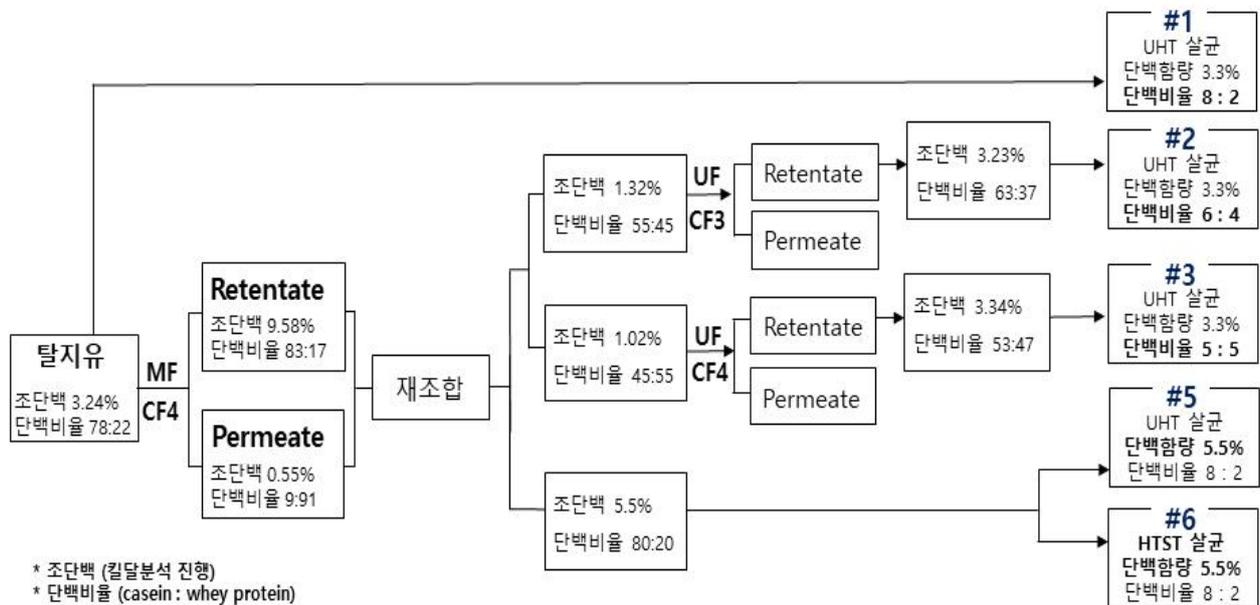


그림 27. 시료 제조 공정 모식도



그림 28. 정밀여과로 제조된 시료 6종의 외관

- Microfilter(CF 4)를 통해 얻은 retentate, permeate의 총 단백질량과 각각의 casein, whey protein의 함량은 표 20과 같음.

표 20. 정밀여과(CF 4)의 retentate 및 permeate 단백질 성분 및 brix(%)

시료	총단백질함량(%)	Casein	Whey protein	비율	Brix (%)
탈지유	3.23	2.53	0.7	78 : 22	10.28
MF retentate	9.5	7.6	1.54	83 : 17	17.83
MF permeate	0.55	0.05	0.5	9 : 91	6.43

- 시료의 casein 및 whey protein의 함량은 Qi et al.(2015)의 방법을 변형하여 측정함. 시료 (20 g)에 1 N HCl을 이용하여 casein의 등전점인 pH 4.6으로 조정한 후, 24,000 x g, 4°C 조건으로 40분간 원심분리 후 침전물(casein) 및 상징액(whey)의 단백질 함량을 측정하였음.
- 단백질 분석은 식품공전의 단백질 분석법에 나와있는 켈달분석법(Kjeldahl apparatus(Buchi Kjeldahl K-314 distillation unit, Switzerland))을 이용하여 다음과 같은 방법으로 진행하였음.
- 시료 (액체 3 g, 고체 0.2 g)을 켈달 분해 플라스크에 넣고 분해촉진제(K₂SO₄, Se)와 진한 황산을 첨가하여 고온의 분해장치에서 샘플을 분해한 후 상온으로 냉각시킴. 분해된 시험용액에 증류수 및 수산화나트륨 용액 첨가 후, 0.1N HCl 용액을 이용해 종말점까지 적정함. 적정에 사용된 산 용액의 양은 기록하며, 같은 방법으로 시료를 제외한 공시험(blank test) 진행. 시료 중의 단백질함량(%)을 다음 식을 이용하여 계산함.

$$\text{단백질함량(\%)} = \frac{[\text{산 소비량(mL)} - \text{blank 산 소비량(mL)}] \times \text{질소계수}(6.38) \times 0.1401}{\text{시료량 (g)}}$$

- 모든 시료는 생크림(지방함량 38.5%)을 첨가하여 지방 함량 2% 수준으로 제조하였으며, 균질 압 150 bar 처리 후 살균을 진행하였음. UHT 살균은 130°C 이상에서 2초 이상 살균을 진행, HTST 살균 조건은 73±1°C, 15초 살균을 실시하였음.

○ Filtration pilot 설비를 이용하여 생산한 제품의 이화학적 규격 및 영양성분 분석

1. 시제품의 이화학적 규격

- 제조 샘플 6종의 이화학적 규격(pH, 산도, 비중, T.S.) 및 다양한 방법을 이용하여 시료의 casein:whey 비율을 측정함(켈달분석, Native-PAGE, SDS-PAGE).
- 6종 시료 모두 pH, 산도는 일반 시유와 유사한 값을 나타내었으며, 단백질함량 5.5% 시료에서 단백질함량 3.3% 시료대비 높은 비중 및 총고형분 함량을 나타냄.
- 켈달분석은 산침전법을 통한 상층액 및 침전물의 단백질 함량을 측정하였음.

표 21. 제조 시료 6종의 이화학적 규격

	Protein (3.3%)			Protein (5.5%)		
	8 : 2	6 : 4	5 : 5	RP(UHT)	MF(UHT)	MF(HTST)
pH	6.73	6.75	6.78	6.73	6.74	6.78
산도(%)	0.125	0.115	0.12	0.13	0.13	0.13
비중	1.032	1.032	1.031	1.039	1.039	1.038
총고형분(%)	11.07	11.10	11.24	15.19	13.24	13.47

RP(UHT), 단백질분말을 이용하여 환원하여 UHT 살균한 고단백질 우유; MF(UHT), 정밀여과로 생산하여 UHT 살균한 고단백질 우유; MF(HTST), 정밀여과로 생산하여 HTST 살균한 고단백질 우유
고단백질우유의 casein:whey 단백질 비율은 모두 8:2임

표 22. 제조 시료의 casein : whey ratio 비율(켈달, Native-PAGE, SDS-PAGE)

	Protein (3.3%)			Protein (5.5%)		
	8 : 2	6 : 4	5 : 5	RP(UHT)	MF(UHT)	MF(HTST)
산침전 분리 후 켈달분석	89:11	81:19	78:22	80:20	90:10	80:20
Native-PAGE ¹	81:19	74:26	71:29	86:14	89:11	74:26
SDS-PAGE ²	75:25	59:41	54:46	78:22	80:20	73:27

Native-PAGE¹(그림 29), SDS-PAGE² (그림 30)

- 제조한 시료의 casein:whey 비율 확인 결과, 단백질함량 3.3% 시료의 casein:whey 비율은 목표한 것과 일부 상이하게 나타남. 이는 살균과정에서 whey protein 자체 응집 및 whey protein-casein complex 형성에 의한 영향으로 사료됨(표 22).
- Whey protein은 80℃~90℃의 온도조건에서 빠르게 변성되는 것으로 알려져 있으며(Donovan., 1987; Parris., 1991) 이로 인해 UHT 살균시료와 달리, HTST 살균시료에서 casein:whey 비율이 목적인 비율과 유사하게 측정됨.
- Whey protein 자체 응집 및 whey protein-casein complex 형성을 검증하기 위하여 Native-PAGE를 이용하여 UHT 살균시료에서 high-molecular band의 형성을 확인하였음.

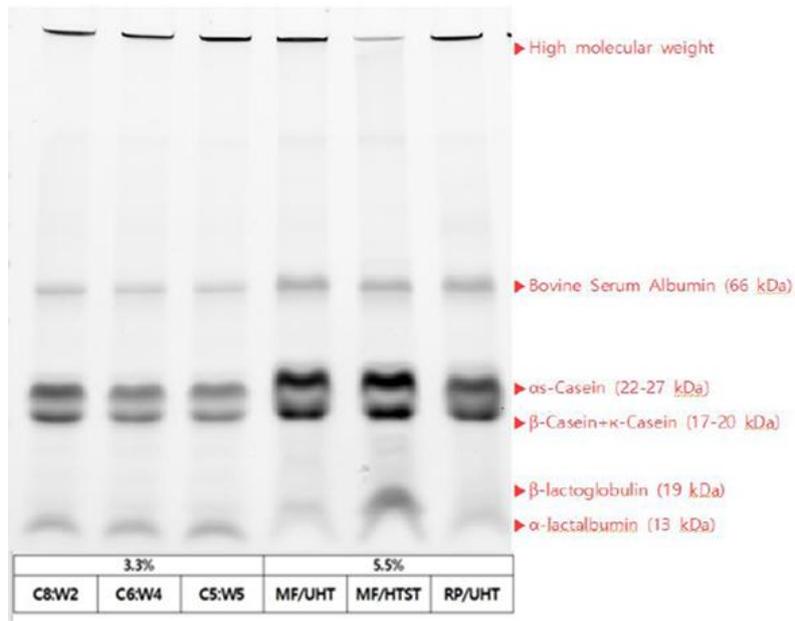


그림 29. 제조한 시료의 casein:whey 비율 분석을 위한 Native-PAGE

- 살균조건에 의한 영향을 제외하고 단백질 고유의 분자량에 따라 비율을 정량하기 위해 단백질의 이황화결합 끊고 정량하는 SDS-PAGE 이미지 분석을 진행하였음.
- 전기영동장치는 Biorad mini gel electrophoresis unit(Biorad Laboratories, Richmond, CA, USA)을 이용하였으며 Any kD acrylamide gradient gel을 이용하여 단백질을 분리하였음. 단백질 band intensity는 Biorad ChemiDac XRS system(Biorad)을 이용하여 이미지 분석을 실시하였음.

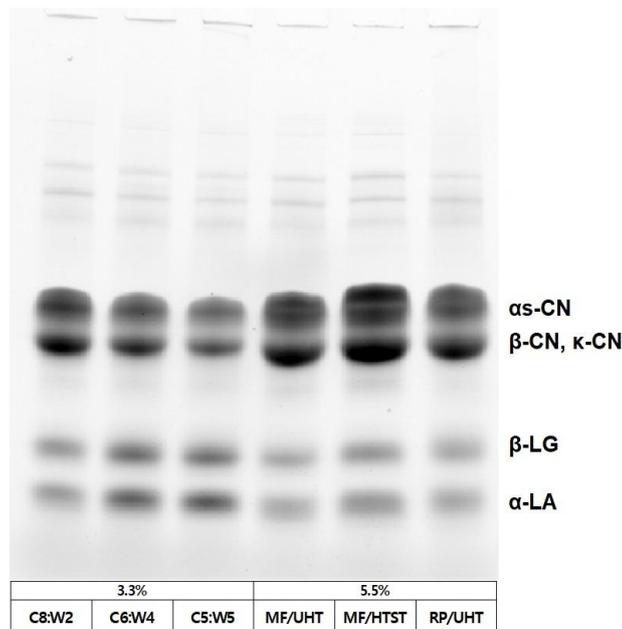


그림 30. 제조한 시료의 casein:whey 비율 분석을 위한 SDS-PAGE

2) RP-HPLC 분석을 이용한 시료 단백질 비율(casein:whey) 분석 방법 설정

- SDS-PAGE 이미지분석에 의한 단백질 비율 검증 방법 이외에 보다 정량성이 강화된 분석 방법의 확보를 위하여 HPLC를 이용한 우유단백질 정량 분석법을 확보하고자 하였음.
- 연구 발표된 문헌을 토대로 가장 인용빈도가 높은 Bonfatti et al(2008)의 방법을 기준으로 시료의 전처리를 진행하였으며, 이동상의 gradient 속도, column 온도, 용출속도 등을 변형하며 우유단백질의 분리조건을 최적화 하였음.
- HPLC 분석분석 장비는 Agilent社 1260 HPLC(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며, column은 YMC-Pack C8 column(250 X 4.6 mm, 5 μ m, 300 Å, YMC Corporation, Japan)을 장착한 후 분석 진행하였으며 연구문헌 대비 실제 분리 결과는 그림 31과 같음.
- κ -casein, β -casein, β -LG은 각각 문헌의 보고와 유사하게 분리 되었으나, α -casein과 α -LA peak의 분리가 완벽히 이루어지지 않았으며, 지속적으로 온도 및 용매 조건을 변경하여 진행한 실험에서도 더 이상의 분리는 이루어지지 않았음. 이에 따라, 다른 조건의 column을 사용하여 추가 실험을 진행하였음.
- YMC Triart Bio C4(4.6 x 250 mm, 30 nm), YMC Triart C8(4.6 x 250 mm, 20 nm) column을 이용하여 동일한 시료의 HPLC 분석을 추가 진행함. 새로운 column을 이용하여 분석한 실험 결과의 경우 α -casein과 α -LA이 peak의 분리는 이루어진 반면, β -casein과 α -LA의 retention time이 겹쳐서 나타났음(그림 32).

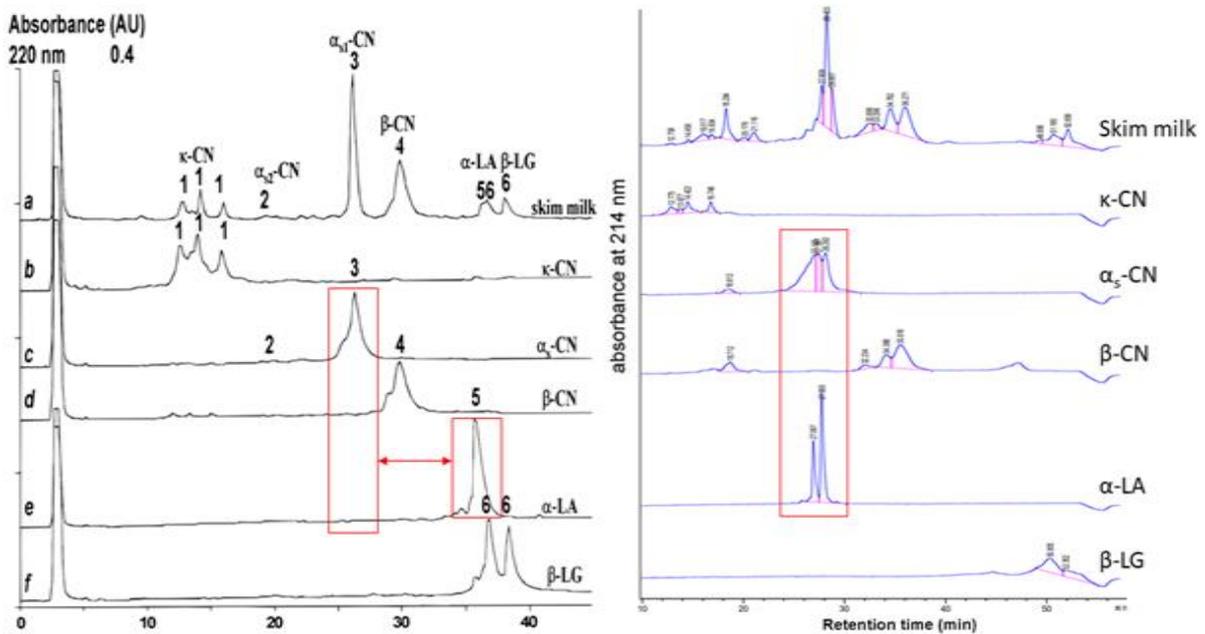


그림 31. 역상 HPLC-YMC-pack C8 컬럼을 이용한 탈지유 단백질 분리
(좌) Bonfatti et al(2008)의 보고, (우) 실제분리 결과

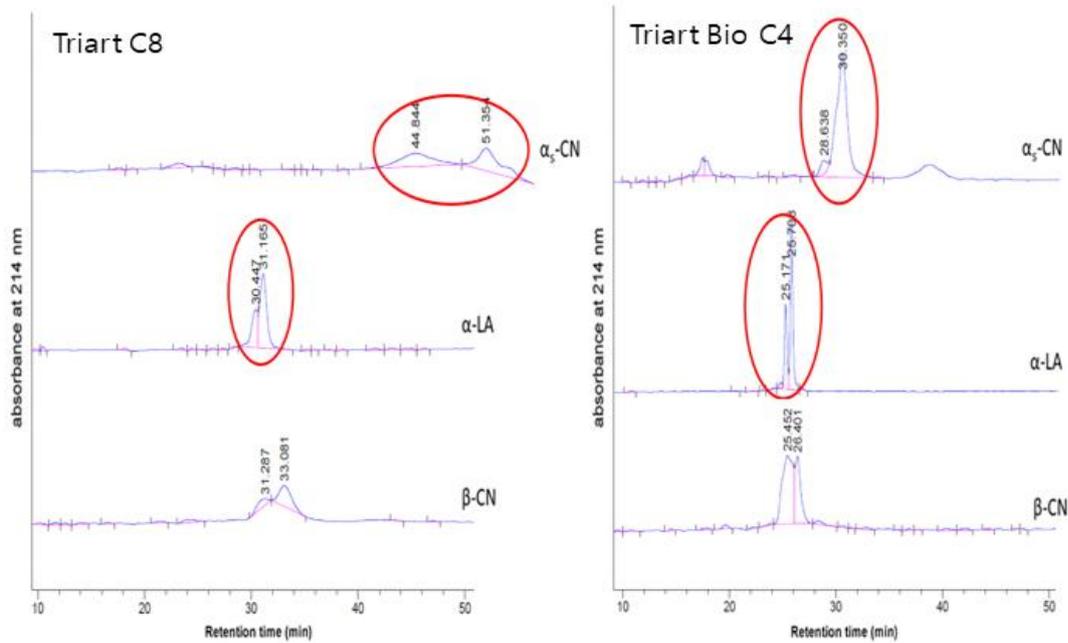


그림 32. 역상 HPLC-YMC Triart C8(좌) 및 Triart bio C4(우) 컬럼을 이용한 탈지유 단백질 분리

3. 9대영양소 및 칼슘 함량 분석

- 제조 샘플 6종의 9대영양소(열량, 탄수화물, 당류, 단백질, 지방, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤, 나트륨) 및 칼슘 함량 분석결과는 표 23에 제시하였음.

표 23. 시료의 9대영양소 및 칼슘 공인분석 결과

	Protein (3.3%)			Protein (5.5%)		
	8 : 2	6 : 4	5 : 5	RP(UHT)	MF(UHT)	MF(HTST)
Sodium (mg/100 mL)	41.49	42.29	42.94	65.17	41.13	41.69
Protein (g/100 mL)	3.3	3.36	3.3	5.52	5.77	5.73
Calorie (Kcal/100 mL)	52.8	51.7	53	69.5	61.6	61.4
Fat (g/100 mL)	2.03	1.86	1.98	2.06	2.04	2.06
Cholesterol (mg/100 mL)	6.18	5.6	6.15	8.08	7.98	8.29
Carbohydrate (g/100 mL)	2.9	5.4	5.3	7.2	5.0	5
Trans fat (g/100 mL)	0.05	0.04	0.05	0.06	0.05	0.05
Saturate fat (g/100 mL)	1.11	1.03	1.09	1.12	1.11	1.11
Calcium (mg/100 mL)	110.66	99.46	101	165.22	173.68	175.85
Sugars (g/100 mL)	4.4	4.68	4.15	5.64	4.46	3.96

* RP, milk prepared using protein reconstitution.

4. 성능지표의 목표 대비 달성 정도

- 본 실험에서 filtration pilot 설비를 통해 생산한 정밀여과 공정에 따른 retentate 및 permeate의 단백질함량 결과를 토대로 성능지표의 목표 대비 달성 정도는 다음과 같음(표 24).

표 24. 정밀여과의 정량적 성과지표의 목표대비 달성도

평가항목(주요성능)	단위	정량적 목표	생산결과
부피농축계수(VCF)	-	3	3
농축물 내 총단백질 농도	%	9	9.58
농축물 내 casein 농도	%	8	7.6
농축물 내 유당함량	%	0.1	4.9

- 부피농축계수(VCF)는 ‘투입된 우유의 부피(L) / 농축된 우유의 부피(L)’ 의 값으로, CF4 기준으로 유량을 설정했을 시, 투입된 우유의 유량은 45.96L/h 이며, 농축 우유의 유량 15.32 L/h로 목표로 설정한 부피농축계수 3을 충족함. 농축물 내 총 단백질 농도와 casein 농도는 침전물의 켈달 단백질 정량분석을 이용하여 각각 분석하였음.
- 당해년도 샘플 제조 시 동물시험을 진행함에 있어 실험군 간의 차이를 (1)단백질 총 함량 및 유단백질 비율 변경, (2) 정밀여과농축 단백질유 vs. 분말단백질 첨가로 설정하였음
- 단백질 외 변수 요인 없이, 비교하기 위해 유당은 일반 시유와 유사한 수준으로 제조하였으며, 추후 시장성을 고려하여 유당분해컨셉의 우유제품으로 제품생산을 검토할 예정임.

3. 시제품의 관능평가 진행

- 매일유업 중앙연구소 관능전문패널을 대상으로 casein : whey protein 비율별 시료 및 고단백(단백함량 5.5%) 시료의 관능검사를 진행하였음(표 25).
- 관능검사 방법은 묘사분석법을 이용하여 진행
- 검사항목은 외관(투명함, 흰색 강도), 우유향미(고소함, 분유취, 크림향, 비린취).텍스처(물음, 지방감, 점도)의 평가 진행
- 묘사분석의 결과(Table 24) 단백질함량 3.3% 우유시료 대비 단백질함량 5.5% 시료의 바디감이 강하게 느껴지며, 분유취가 증가함.
- 단백질과우더를 첨가하여 제조한 시료(단백함량 5.5%, RP-UHT)는 황색 성상이 짙었으며(외관), 정밀여과를 이용한 단백질강화 시료에 비해 바디감과 분유취가 강하다는 의견이 있음.
- 단백질함량 3.3% 시료간의 비교에서 whey 비율이 증가할수록 느끼한 풍미와 바디감이 강함.

표 25. 정밀여과를 이용한 생산 시료의 관능평가 결과

시료	묘사 분석 결과
단백함량 3.3% ratio(8 : 2)	- 흰색, 일반우유와 비슷한 외관 - 고소하여 크림향 및 버터향 상승
단백함량 3.3% ratio(6 : 4)	- 흰색, 일반우유와 비슷한 외관 및 풍미 - 일반 우유 대비 바디감이 약하게 느껴짐
단백함량 3.3% ratio(5 : 5)	- 흰색, 일반우유와 비슷한 외관 및 풍미 - 일반 우유 대비 바디감이 약간 약하게 느껴짐 - 끝맛이 일반 우유보다 느끼함
단백함량 5.5% RP(UHT)	- 외관의 황색 성상이 짙게 나타나고, 전반적으로 우유대비 진한 색상 - 분유취가 강하며, 해외 우유 풍미로 인지됨 - 바디감이 강하고 후미에 이미/이취가 느껴짐

4. 시제품의 이화학 보존검사 진행

- 이화학 보존검사는 식품공전 상에 명시 되어있는 우유의 산도(%) 규격(젖산으로 0.18 이하) 및 자체 pH 규격(6.5 ~ 7.0)을 기준으로 하여 측정함.
- 시료의 보존기간이 경과함에 따라 이화학적 규격이 소폭 변화 하였으나(산도 증가, pH 감소) 식품 공전 이내의 규격을 유지하는 것으로 확인함.

5. 시제품의 미생물 보존검사 진행

- 파일럿 설비 생산 시료의 미생물 검사는 10℃ 보관 제품의 일반세균 및 대장균군 검사 진행 (주 3회 측정 실시). 미생물 검사는 3M 건조필름배지를 이용하여 검사 진행하였으며, 시료의 규격은 식품공전에서 제시한 세균수 (n=5, c=2, m=10,000, M=50,000) 및 대장균군 (n=5, c=2, m=0, M=10) 기준으로 측정함.
- 모든 시료에서 대장균군은 측정되지 않았으며, 단백질함량 5.5%(HTST) 시료의 일반세균 검사 결과, 14일차 규격 이탈되어 안전계수 1.5를 적용하여 예상유통기한은 10℃ 보관에서 9일로 설정. UHT살균 시료군의 일반세균은 18일차 규격 이탈되어 안전계수 1.5 적용하여 예상유통기한을 10℃ 보관에서 12일로 설정.
- 이번 시료 생산과정에 있어서 실제 설비와 다른 파일럿 설비를 이용한 시생산을 진행함. 실제 충전 설비에서는 파일럿 설비와 달리 무균상태에서 제품의 충전이 이루어지며, 따라서 상용화 생산시 유통기한은 예상유통기한 결과보다 연장될 것으로 예상됨.

<2차년도>

[제1 협동기관 : 국민대학교]

I. 세부 연구목표

- 주관연구기관의 pilot plant에서 제작한 시료를 이용한 단백질강화우유의 물리화학적 특성 분석
- 단백질강화우유(살균/멸균 타입)의 저장기간에 따른 농후화 진행(외관, 점도, 색도, 입도) 여부 분석
- 농후화 원인 규명을 위한 단백질 변화 분석, plasmin/plasminogen 활성분석
- 시제품의 정량적 성능지표 제시

II. 연구개발 수행내용

1. 연구 방법

1) 정밀여과 공법으로 제조된 단백질 강화 우유 시제품 분석

(1) 시료

- 정밀여과(microfiltration, MF) 공법으로 casein과 whey protein의 비율이 조정된 시료, 정밀여과 공법으로 단백질을 강화하여 살균처리를 달리한 시료 및 우유단백질 분말을 환원하여 동일한 단백질 함량으로 조정한 시료(Reconstitution of protein powders, RP)를 주관기관으로부터 제공받아 사용하였음.

(2) 용해도 및 용해도 측정 후 침전물의 단백질 profile 분석

- 용해도는 시료를 원심분리($6,000 \times g$, 25°C , 20분)하여 상징액에 존재하는 단백질을 정량한 후 원심분리 전 단백질 함량 대비, 원심분리 후 상징액의 단백질 함량(%)로 계산하였으며, 시료의 단백질 함량은 BCA assay(Walker, 2009)를 이용하여 측정하였음.
- 용해도 분석 후 침전물에 존재하는 단백질 양과 profile을 BCA assay와 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였음. 전기영동장치는 Biorad mini gel electrophoresis unit(Biorad Laboratories, Richmond, CA, USA)을 이용하였으며 Any kD acrylamide gradient gel을 이용하여 단백질을 분리하였음. 단백질 band intensity는 Biorad ChemiDac XRS system(Biorad)을 이용하여 이미지 분석을 실시하였음.

(3) 혼탁도

- 시료를 100배 희석한 후 spectrophotometer(Ultrospec 2100 pro, Amersham Bioscience)를 이용하여 633 nm에서 측정하였음(Yang et al., 2014).

(4) 무기질(칼슘, 인) 분석

- 시료의 총 칼슘(인), 가용성칼슘(인)의 함량을 유도결합플라즈마분광기(ICP-OES; Optima 8300, PerkinElmer, USA)를 이용하여 측정하였음. 총 칼슘 및 인의 함량은 염산을 이용하여 시료를 침전시킨 후 $4,500 \times g$ 에서 원심분리 하여 얻은 상징액으로부터 분석하였으며, 가용성 칼슘과 인은 시료를 $100,000 \times g$ 에서 1시간 동안 초원심분리 후 얻어진 상징액을 이용하였음.
- ICP-OES 분석 시 carrier gas는 Ar을 사용하였으며 plasma flow는 12 L/min, nebulizer gas flow rate는 0.55 L/min, auxiliary gas flow rate는 0.2 L/min으로 하였음. 무기질 분석 시 파장은 칼슘 317.933, 인은 213.617 nm를 사용하였음.

(5) 단백질 profile 분석

- 시료에 존재하는 개별 단백질 변화 및 저장 기간 중 단백질 profile 변화는 native-PAGE로 분석하였음. 시료의 단백질 profile 분석은 용해도 분석과 동일한 방법을 사용하였음.
- 저장 기간 중 단백질 분해에 의한 저분자 펩타이드 생성여부는 trichloroacetic acid(TCA, 12%) 가용성 단백질의 양을 BCA assay로 정량하여 표현하였음. 저장기간은 제품의 유통기한을 고려하여 3주 동안의 변화를 분석하였음.

(6) 색도

- 색차계(konica minolta, CR-400, DP-400)를 이용하여 저장기간에 따른 시료의 L, a, b 값의 변화를 측정하였음.

(7) 점도(Viscosity)

- 점도계(RVDV-I+, Brookfield, Millbury, Ohio, USA)를 이용하여 저장기간에 따른 시료의 점도 변화를 측정하였음. 점도 분석 방법은 Manzoor et al.(2019)의 방법에 따라 Spindle NO.3을 이용하여 100 rpm에서 측정하였음.

(8) 시료의 입자크기 분포 변화 분석

- 저장기간에 따른 시료의 입자크기 분포 변화를 particle size analyzer(Horiba LA-960 Laser Scattering Particle Size and Distribution Analyzer, Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였음. 입도는 시료 1 mL을 주입하고 균일한 속도로 교반하며 측정하였음.

(9) 단백질 2차 구조 분석

- 저장기간에 따른 시료의 2차 구조 변화는 Fourier transform Infrared spectroscopy(FT-IR) Spectrometer(Vertex 70, Bruker Optics, Ettlingen, Germany)를 이용하여 분석하였음. 분석은 동결 건조 시료의 KBr pallet 제작하여 1700-1600 cm^{-1} (Amide I) 범위에서 진행하였으며 단백질 2차 구조의 각 peak는 Origin 9.0 software(OriginLab, Northampton, MA)의 Gaussian function fitting 방법으로 식별하였음. 단백질 2차 구조의 과장 범위는 Qi et al.(2015)과 Carbonaro and Nucara (2010)의 보고를 준용하였음.

(10) Transmission electron microscopy(TEM)

- Raynes et al(2017)의 방법을 변형하여 TEM 이미지 분석을 진행하였음. Carbon-coated grids를 glow-discharge 이용하여 grid 표면을 친수성으로 만들었고, carbon-coated 300-mesh copper grids에 시료를 흡착시킨 후, uranyl acetate (2% w/v)로 염색하여 준비하였음. 120 kV 전압에서 Transmission Electron Microscopy (TEM, Talos L120C, FEI, Hillsboro, OR, USA)를 이용하여 관찰하였음.

(11) 제타전위(zeta-potential)

- 시료를 100배 희석하여 Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK)를 이용하여 제타전위를 측정하여 저장기간 중 단백질의 안정성 변화를 분석하였음.

(12) Plasmin 활성 분석

- Plasmin 활성은 Richardson and Pearce.(1981)와 Raynes et al.(2018)의 방법을 변형하여 진행하였음. 시료(우유)와 0.4 M trisodium citrate 용액을 3:1로 혼합한 후, 원심분리(27,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10 min)하여 상정액을 분석에 이용하였음. Plasmin activity는 urokinase(30 unit)를 첨가하여 비활성형 plasminogen을 활성형으로 변환시켜 측정한 total plasmin activity와 urokinase의 첨가 없이 plasmin의 활성만을 측정한 plasmin activity로 구분하여 표현하였음.

(13) 시판 제품 plasmin 활성도 분석

- 시판 제품의 살균 방식에 따른 plasmin 활성도를 비교하기 위해 최근 제조된 제품을 대형 마트에서 구입하여 분석에 이용하였음. 살균방식은 초고온(UHT, ultra-high temperature) 살균, UHT 멸균, 저온(LTLT, low temperature long time) 살균 및 고온(HTST, high temperature short time) 살균 4종류에 해당하는 시료들을 각각 구입하였으며, 원유의 plasmin 활성과 비교분석 하였음. Plasmin의 활성은 전술한 1. 12) Plasmin 활성 분석과 동일하게 실시하였음.

2) 농후화 원인 규명을 위한 단백질 변화 분석

(1) Plasmin의 농도와 저장온도의 효과 분석을 위한 시료의 제조

- UHT 살균으로 제조된 무지방 우유에 bovine plasmin(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 0, 0.5, 10, 15 U/L 농도가 되도록 첨가하고, 각각 23 $^{\circ}$ C와 37 $^{\circ}$ C에서 배양하며 단백질의 농후화 진행정도를 관찰하였음. 저장기간 중 sodium azide(0.02%)와 Bronopol(0.0005%)을 첨가하여 바람직하지 않은 미생물의 성장을 억제하였음.

(2) 단백질 profile 분석

- 저장 기간 중 Plasmin 첨가 수준 및 저장온도별 단백질 profile 변화는 Native-PAGE를 이용하여 분석하였음. 시료의 단백질 profile 분석은 1. 2) 용해도 분석과 동일한 방법을 사용하였음. 저장 기간 중 단백질 분해에 의한 저분자 펩타이드 생성여부는 TCA(12%) 가용성 단백질을 분석하여 나타냈음.

(3) 시료의 입자크기 분포 변화 분석

- 시료의 저장기간에 따른 농후화 진행여부를 관찰하기 위해 입자크기 분포 변화를 particle size analyzer(Horiba LA-960 Laser Scattering Particle Size and Distribution Analyzer, Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였음.

(4) Transmission electron microscopy(TEM)

- Glow-discharge 이용하여 carbon-coated grid 표면을 친수성으로 변환하고, carbon-coated 300-mesh copper grids에 시료를 흡착시킨 후, uranyl acetate(2% w/v)로 염색하여 시료를 준비하였으며 120 kV 전압에서 Transmission Electron Microscopy (TEM, Talos L120C, FEI, Hillsboro, OR, USA)를 이용하여 시료 단백질의 미세구조를 관찰하였음.

(5) 침전물(Sediment) 분석

- 시료의 저장기간에 따른 농후화 진행여부를 관찰하기 위해 원심분리(27,000 ×g, 4°C, 10 min)를 이용하여 침전된 단백질의 양을 BCA assay로 분석하였음.

(6) 단백질 2차 구조 분석

- Plasmin 첨가 수준 및 저장온도에 따른 단백질의 2차 구조 비율 변화는 전술한 1. 9) 단백질 2차구조 분석과 동일하게 실시하였음.

(7) 통계분석

- 정량적 분석은 3회 이상 반복 측정하였으며 SPSS statistics V. 21(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계적 유의성을 확인하였음. 처리 구간의 유의적 차이(p<0.05)는 two way ANOVA를 사용하여 시료와 저장 기간에 따른 상호작용의 유무를 확인하였음. 시료와 각 저장 기간별 차이는 ANOVA와 Tukey의 다중비교검정법을 사용하여 분석하였음.

2. 연구 결과

1) 정밀여과 공법으로 제조된 시료의 이화학적 특성 분석

(1) 용해도

- 일반시유의 살균과정에서 열에 의한 casein과 whey protein의 상호작용은 많은 연구가 진행된 반면, 고단백질 조건과 casein과 whey protein의 비율이 조정된 환경에서 일어나는 상호작용에 대한 연구는 매우 제한적으로 진행되었음.
- 정밀여과 공법으로 제조되어 초고온 살균된 우유의 용해도를 측정한 결과 whey protein 비율 증가 시 용해도가 감소하였으며, 침전된 단백질 양은 증가하였음(그림 33).
- 1차년 분말 단백질을 환원시켜 제조하고 동일한 조건에서 측정한 우유의 용해도(C8:W2 = 47%; C5:W5 =56%)와 비교하여 개선된 용해도가 특성을 나타냈음.
- 단백질 함량을 5.5%로 증가시킨 고단백 우유(casein:whey=8:2)의 경우에도 MF로 제조한 시

료가 단백질 분말을 환원시켜 제조한 시료(RP/UHT)와 비교하여 유의적으로 높은 용해도와 적은 침전단백질량을 보였음(그림 34).

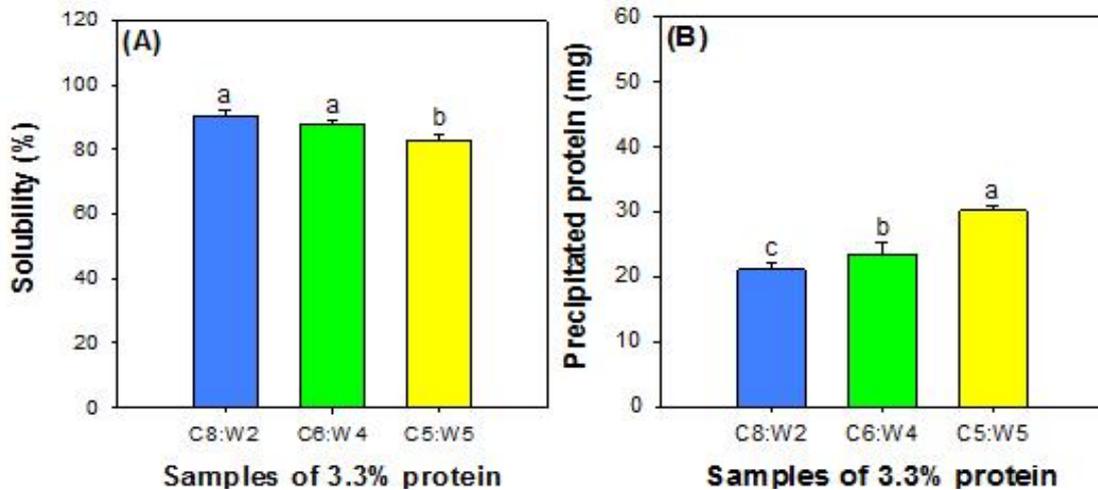


그림 33. 정밀여과로 제조된 다양한 casein:whey protein 비율을 가진 UHT 살균유(3.3% 단백질)의 용해도(A) 및 침전단백질양(B)

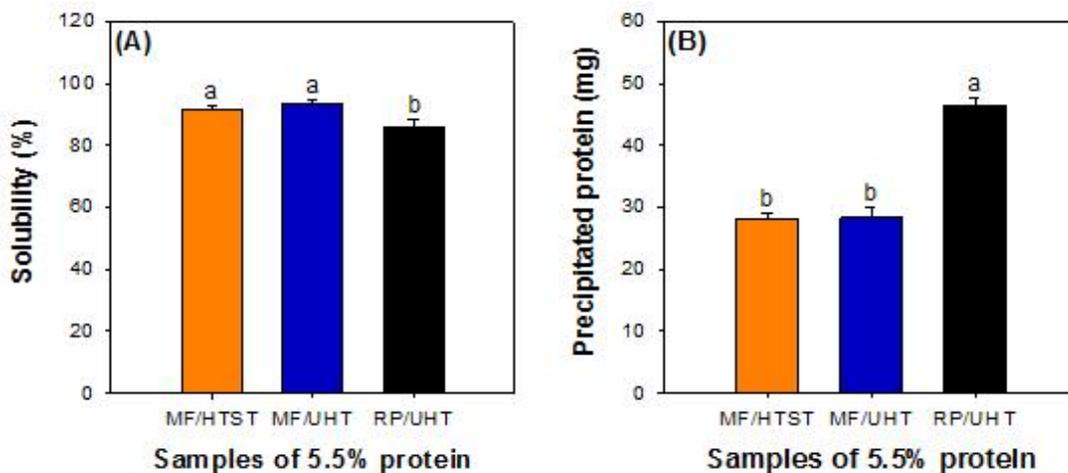


그림 34. 다양한 살균조건에서 제조된 고단백 우유(단백질 5.5%)의 용해도(A) 및 침전단백질양(B) MF, milk prepared using microfiltration; RP, milk prepared using protein reconstitution. Casein: whey = 8:2

- 침전된 단백질의 profile을 SDS-PAGE로 분석한 결과 RP/UHT에서 주로 casein의 침전량이 뚜렷하게 증가된 것으로 나타났음(그림 35).
- 고단백 우유의 생산 시 단백질 분말을 첨가하는 경우 분말의 제조과정에서 거치게 되는 열처리 정도, 염의 농도에 따라 용해도에 영향을 미칠 수 있는 것으로 보고 됨(Singh, 1992).

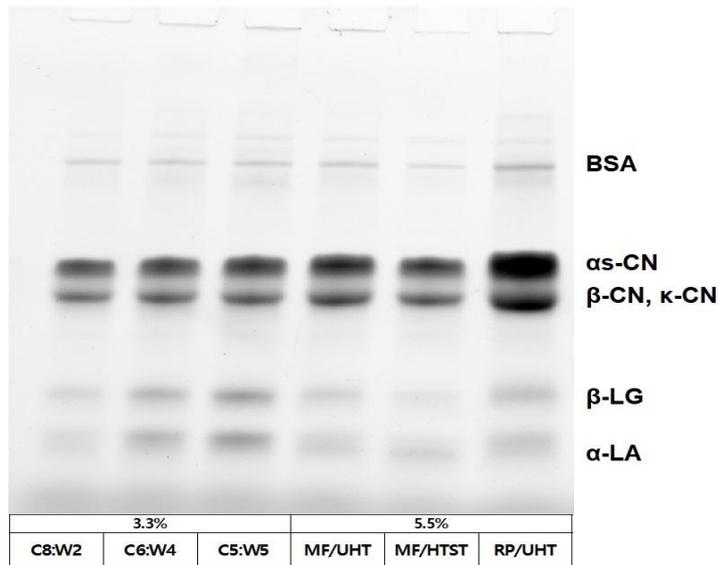


그림 35. 고단백 우유(단백질 5.5%) 침전단백질의 SDS-PAGE

(2) 탁도(turbidity)

- 입자의 크기가 크고 산란계수가 증가하면 탁도는 증가함. 용액의 탁도는 단백질의 농도와 용해도에 의하여 변화하며, 단백질 응집을 나타내는 척도로 사용할 수 있음(Ju and Kilara, 1998).
- 열처리의 증가나 저장과정 중 whey protein의 변성에 의하여 입자 크기가 빛을 산란시킬 수 있는 수준 이상으로 증가하게 되면 탁도의 증가가 일어나게 되며 용해성 단백질의 함량과는 반비례의 상관관계를 나타낸다고 보고되어 있음(Banavara et al., 2003).
- 정밀여과로 제조한 고단백 우유의 탁도는 살균방법에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았으나, RP/UHT에서는 상대적으로 높은 탁도를 나타냈음(그림 36).

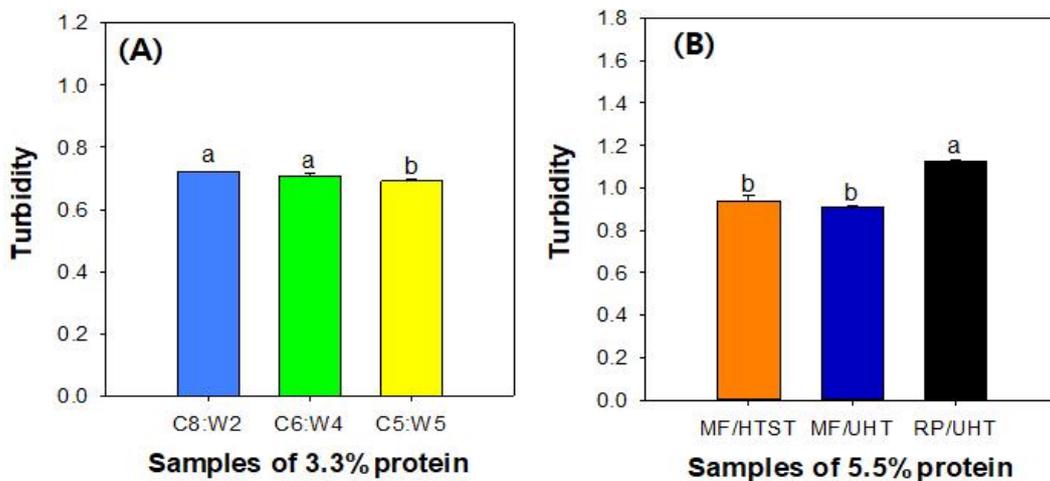


그림 36. 다양한 casein:whey protein 비율(A) 및 살균방법에 따른 고단백우유(B)의 탁도 비교.

- 탈지분유의 제조 공정(예를 들어 열처리 강도)에 따라 환원된 탈지분유의 탁도에 차이가 존재함을 보고하였으며, whey protein이 casein micelle의 표면에 부착되어 나타나는 응집체의 크기와 개수 또는 굴절율의 증가와 관련이 있을 수 있다고 보고된 바 있음(Martin

(3) 칼슘 및 인 함량

- 우유에 존재하는 칼슘의 2/3는 casein sub-micelle을 연결하는 cementing agent로 작용하는 인산칼슘으로 알려져 있으나, 유단백질 비율에 따른 총 칼슘 및 용해상 칼슘은 시료간의 유의한 차이를 나타내지 않았으며, 총 인 및 용해상 인도 칼슘과 비슷한 경향을 나타냈음 (그림 37(A), (B), (C)).
- 제조 방법이 다른 단백질 강화우유(5.5%)의 총 칼슘은 RP/UHT에서 유의적으로 낮은 것으로 보였으나, 용해상 칼슘에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았음(그림 37(B)). 또한 용해상 인 함량은 RP/UHT에서 유의적으로 높은 것으로 보였으나, 총 인에서는 유의한 차이를 나타내지 않았음(그림 37(D)).

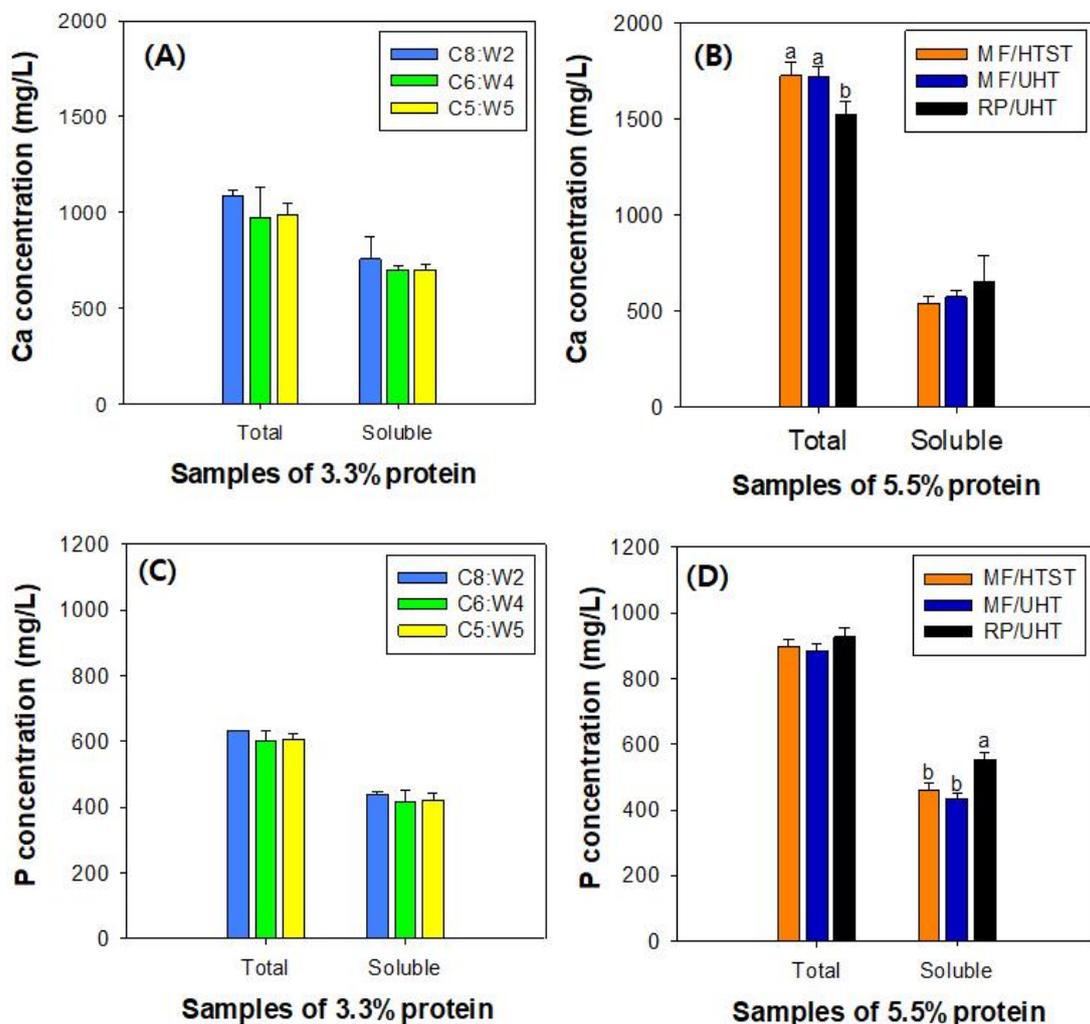


그림 37. 시료에 존재하는 총칼슘, 이온성칼슘, 총 인, 이온성 인 함량

(4) 단백질 profile 분석

① Native-PAGE

- Casein과 whey protein의 상호작용은 whey protein 비율이 정상적인 시유(80:20)보다 증가하는 경우에 보다 가속화될 것으로 있으며, 단백질 상호작용의 결과로 생성된 거대입자는

- 열안정성의 감소를 비롯하여 저장기간의 증가 시 침전물의 생성을 초래할 가능성이 있음.
- 정밀여과 공법으로 제조되어 UHT 살균 된 우유(3.3%)는 casein과 whey protein의 비율을 변화시킨 경우에도 열처리에 의한 high molecular weight compounds(HMW)의 band의 강도에는 유의적 차이가 관찰되지 않았으며, 따라서 C5:W5의 비율까지는 C8:W2에 비교하여 고분자 단백질 중합체의 생성에 차이를 나타내지 않는 것으로 판단됨.
 - 고단백 우유의 경우에도 native PAGE 분석 결과에서는 시료간의 명확한 차이가 확인되지 않았음(그림 38).

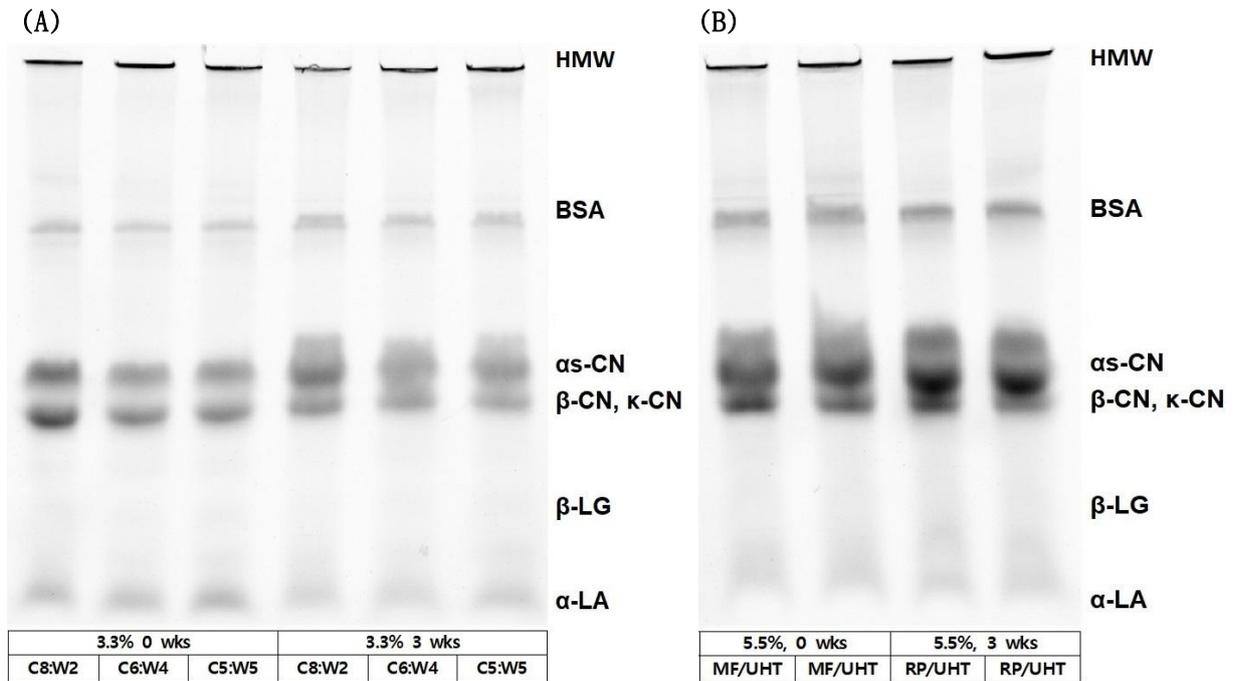


그림 37. 시료의 Native-PAGE

② TCA soluble peptides

- 단백질 분해 양상의 변화를 확인하기 위하여 냉장 저장기간에 따라 12% TCA 가용성 펩타이드 양을 측정된 결과 모든 시료(3.3% 단백질 시료, 5.5% 단백질 시료)에서 시료의 종류와 저장기간에 따라 유의적인 차이가 관찰되었음(그림 39).
- 우유에 존재하는 강한 내열성을 가진 단백질 분해효소인 plasmin은 UHT 살균에서도 잔존하여 단백질 분해를 일으키는 것으로 있음(Zhang et al., 2018). RP/UHT의 경우 더 높은 단백질 분해율을 나타내는 정확한 이유를 확인하기 위해서는 추후 보완 연구가 필요할 것으로 생각 됨.
- 3주간의 저장 시에는 고단백 우유의 경우에도 단백질 분해에서 문제가 발생할 가능성은 매우 낮으나, 향후 멸균우유의 제조 시에는 저장기간에 따른 단백질 분해의 증가 및 농후화의 발생에 대한 검토가 필요할 것으로 판단 됨.

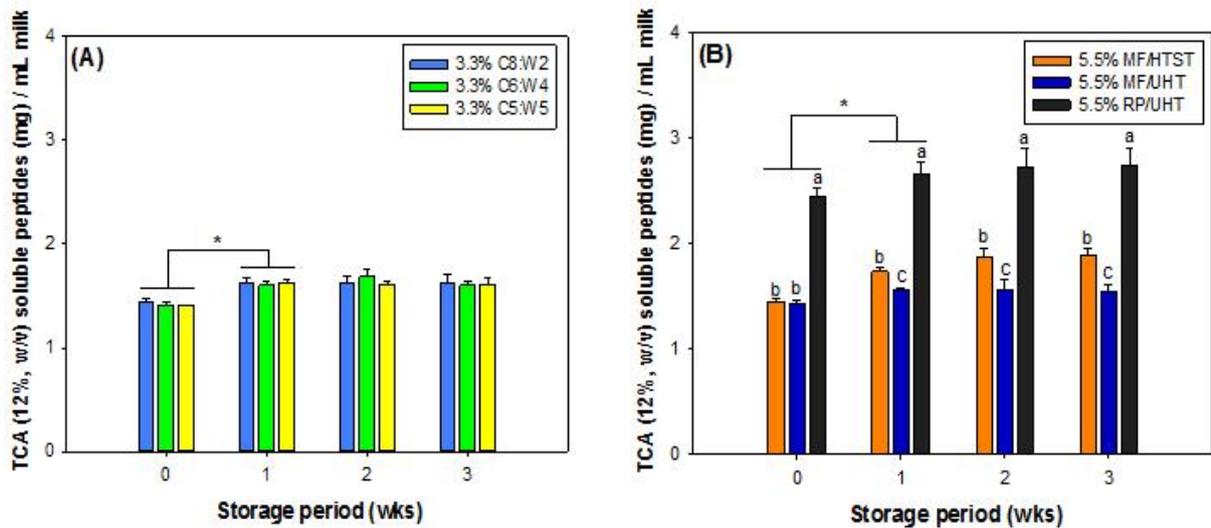


그림 39. 저장 기간 중 TCA 가용성 펩타이드 함량의 변화

(5) 색도(Chromaticity) 분석

- 시료의 색 특성(color attributes)을 색도계를 이용하여 측정한 결과, whey protein 비율이 증가함에 따라 명도를 나타내는 L* 값이 유의적으로 감소하였으며, 갈변현상과 관련이 있는 b* 값은 증가하는 것으로 확인되었음(표 26).
- 고단백 우유의 경우에는 RP/UHT 시료에서 b* 값의 증가가 보다 뚜렷하게 나타났으나 모두 육안으로 식별 가능한 수준은 아니므로 실제로 제품을 접하는 소비자에게 특별히 거부감을 일으키진 않을 것이라 생각됨

표 26. 시료의 색도 변화

protein concentration (%)	Storage periods (wks)	Sample s	Color attribute		
			L*	a*	b*
3.3	0	C8 : W2	89.8±0.02 ^a	-3.8±0.01 ^b	3.78±0.02 ^c
		C6 : W4	89.7±0.01 ^c	-3.5±0.01 ^a	4.76±0.01 ^b
		C5 : W5	89.7±0.01 ^b	-3.5±0.02 ^a	4.93±0.01 ^a
	3	C8 : W2	89.3±0.06 ^a	-3.7±0.02 ^b	3.92±0.02 ^b
		C6 : W4	89.1±0.06 ^b	-3.5±0.02 ^a	4.80±0.09 ^a
		C5 : W5	89.0±0.02 ^b	-3.5±0.02 ^a	4.85±0.01 ^a
5.5	0	C8 : W2	88.6±0.02 ^c	-3.5±0.05 ^b	3.61±0.01 ^c
		C6 : W4	90.9±0.01 ^a	-4.0±0.01 ^c	4.23±0.04 ^b
		C5 : W5	90.4±0.01 ^b	-3.4±0.01 ^a	7.31±0.00 ^a
	3	C8 : W2	87.1±0.02 ^c	-3.8±0.01 ^b	3.83±0.01 ^c
		C6 : W4	90.1±0.03 ^a	-4.3±0.01 ^c	4.36±0.01 ^b
		C5 : W5	89.7±0.02 ^b	-3.6±0.00 ^a	7.54±0.01 ^a

(6) 점도

- 우유의 열처리는 β -lactoglobulin(β -LG)과 κ -casein과 α_{s2} -casein이 일차적으로 관여하는 단백질 복합체 형성의 원인이 되며 우유의 점도는 살균 온도와 단백질 복합체의 양에 영향을 받는다고 보고되었음(Anema et al., 2004).
- 정밀여과 공법으로 유단백질 비율을 조정한 우유(3.3%) 및 제조방법이 다른 단백질 강화우유(5.5%)의 점도를 분석한 결과, 시료 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았음.
- 시료와 저장기간에 따른 두 요인의 상호적인 변화는 3.3% 단백질 우유에서는 1주차부터 유의적으로 증가하는 것으로 나타났으며, 5.5% 단백질 시료에서는 0주차부터 지속적으로 증가하는 것으로 확인되었음(그림 40 (A),(B)).

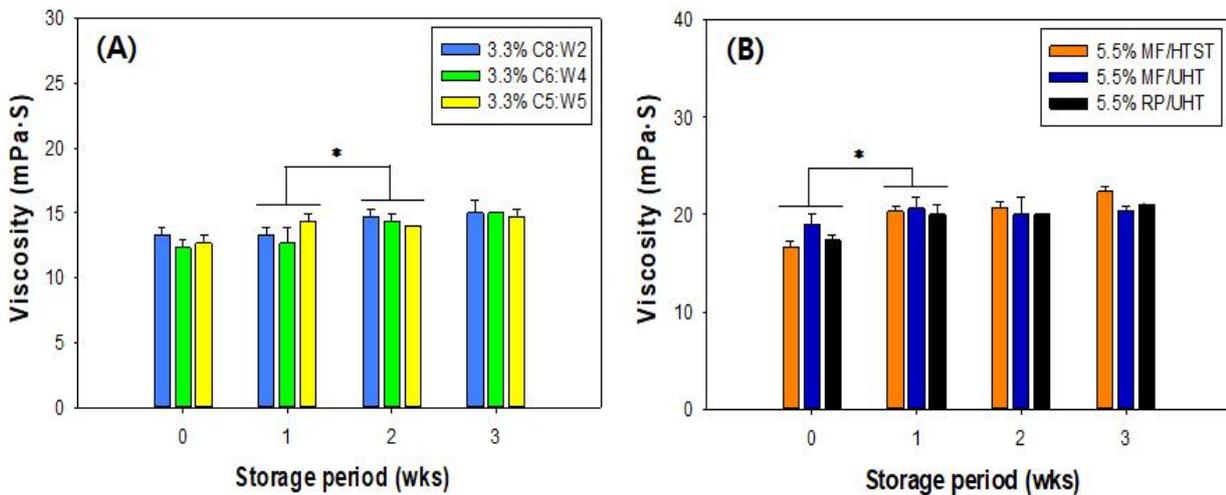


그림 40. 저장기간 중 시료의 점도 변화

- 고단백 우유의 경우 단백질 증량에 의해 저장기간이 연장됨에 따라 점도의 변화가 증가할 수 있을 것으로 생각되며, 유통기간이 6개월에 이르는 멸균우유의 형태로 제조하는 경우 제품의 품질에 직접적 영향을 미칠 가능성이 있는 것으로 생각됨.

(7) 시료의 입자크기 분포 변화 분석

- 저장 기간 중 시료의 입자크기 분포 변화를 particle size analyzer를 이용하여 분석하였음
- 3.3% 단백질 시료 간의 차이는 casein: whey protein의 비율과 관계없이 저장기간 동안 입자 크기 분포의 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았으며, 이와 같은 결과는 1차 년도의 연구 결과와 동일한 경향을 나타냈음(그림 41).
- 모든 시료에서 나타나는 입자크기의 전반적 증가는 일부 균질 후 저장기간 중 발생할 수 있는 지방구의 응집과 연관이 있을 것으로 생각 됨.
- 특히 RP/UHT 시료의 경우 저장 기간이 2주 이상 경과함에 따라 거대입자의 생성이 빠르게 증가하였으며, 이 같은 결과를 근거로 할 때 정밀여과를 이용한 고단백 우유의 생산은 분말을 강화하여 제조한 고단백우유와 비교하여 상대적으로 높은 안정성을 가지고 있는 것으로 판단 됨(그림 42).

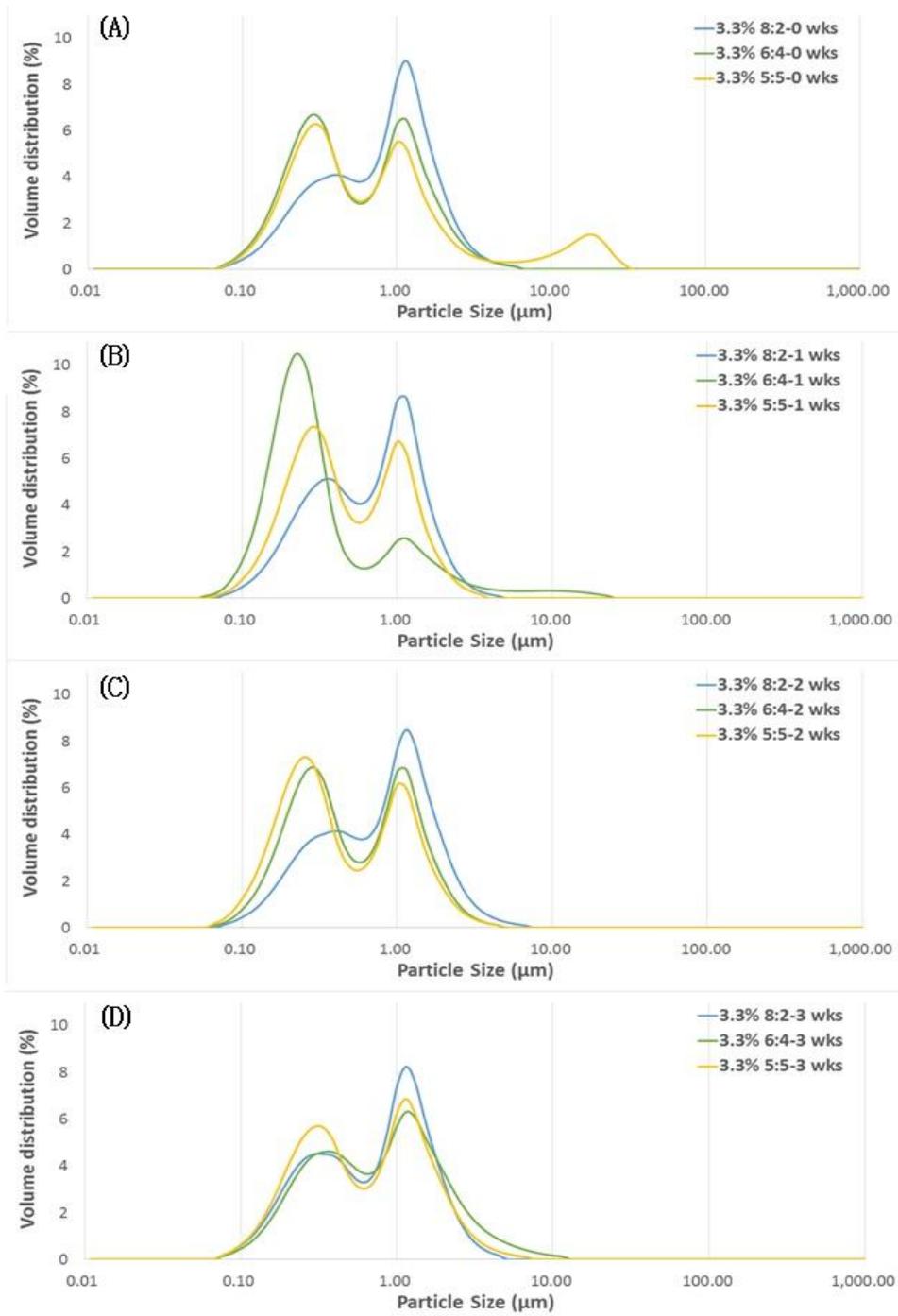


그림 41. 다양한 casein: whey protein 비율을 가진 시료의 냉장저장 기간 중 입자크기 분포 변화
 (A) 0, (B) 1, (C) 2, (D) 3 주

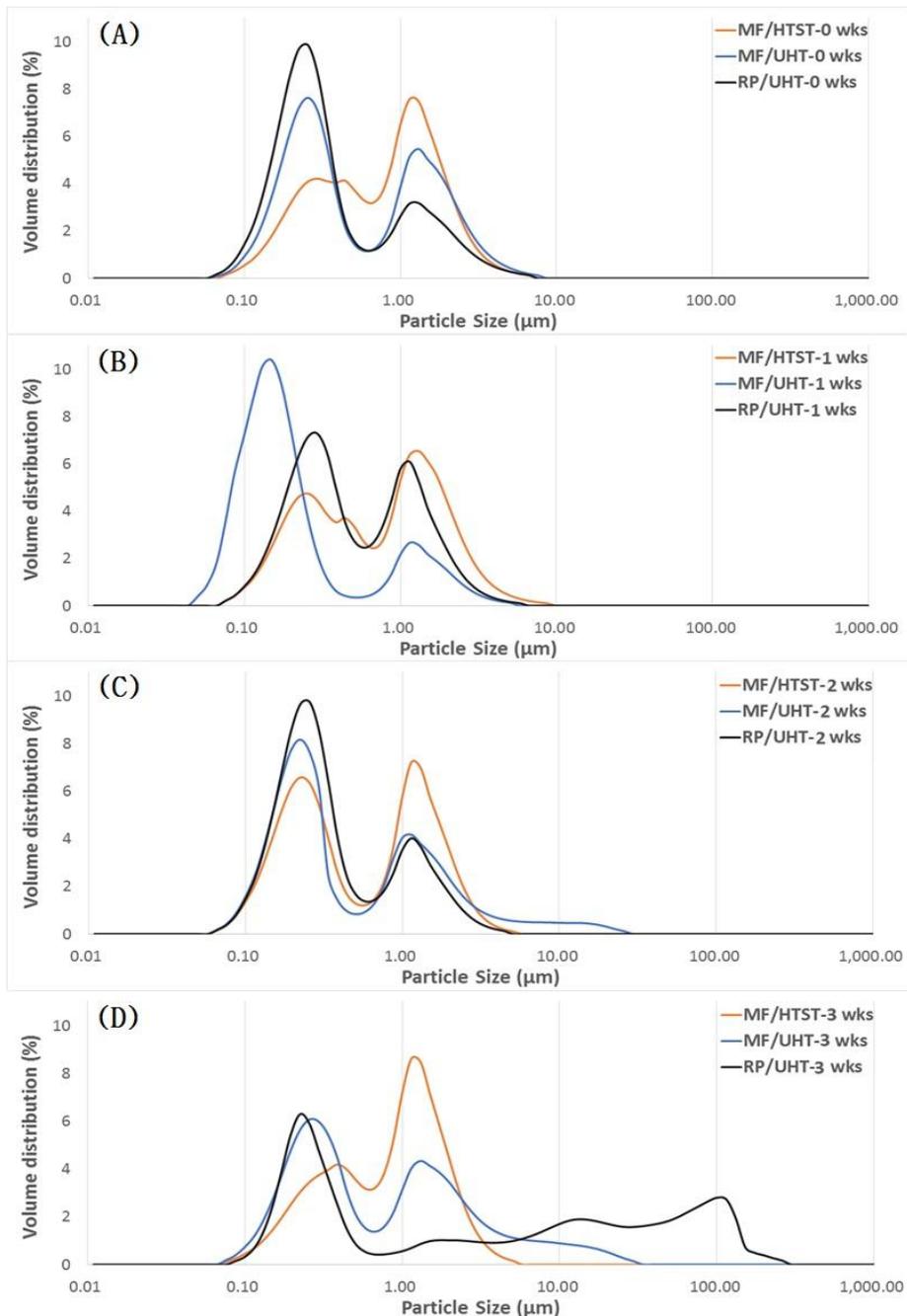


그림 42. 다양한 살균 조건에서 제조된 고단백 우유의 냉장저장 기간 중 입자크기 분포 변화
(A) 0, (B) 1, (C) 2, (D) 3 주

(8) 단백질 2차 구조 분석

- 유제품에서 단백질 구조를 이해하고 제어하는 것은 제품에 필요로 하는 구조, 질감 및 안정성을 조절하는 데 필수적이며, 새롭고 다양한 제품을 만들어 내는 데 기여할 수 있다고 보고 됨(Markoska et al., 2020).
- 유단백질 비율에 따른 우유(3.3%)의 단백질 2차 구조의 차이를 확인하기 위해 FT-IR을 이용하여 Amide I spectrum을 분석하고, 그림 43과 같이 gaussian function fitting을 이용하여 2차 구조를 식별하여 그 비율을 분석하였음(표 27).

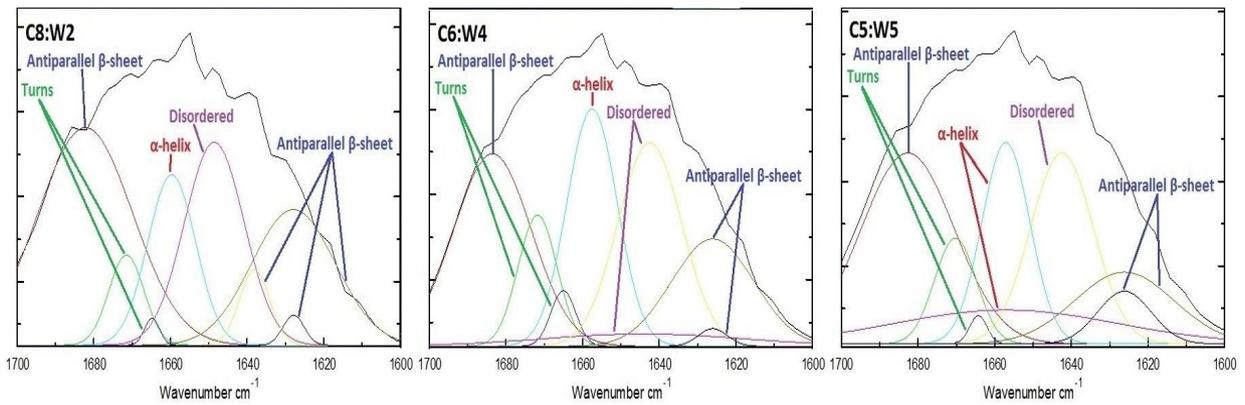


그림 43. Casein: whey protein 비율 조정 시료의 Gaussian curve-fitting

Gaussian function curve fitting was performed on spectra of MF-milk with different casein:whey protein ratios after subtracting the baseline from 1,600 to 1,700 cm^{-1} .

표 27. FT-IR을 이용한 casein: whey protein 비율 조정 시료의 2차구조 분석

Sample	Antiparallel β -sheet (1694-1682 and 1640-1620)	Turns (1682-1662)	α -helix (1660-1650)	Disordered (1650-1640)
C8:W2	44	13	20	23
C6:W4	33	19	25	23
C5:W5	36	15	27	22

Unit of wavelength, cm^{-1} ; unit of secondary structure %.

- RP/UHT(peak 높이=1.429)는 MF/UHT(peak 높이=0.604)에 비교하여 2배 이상의 복잡한 2차 구조를 갖는 것으로 나타났으며(그림 44), Antiparallel β -sheet의 비율이 증가하는 것으로 확인됨(표 28).

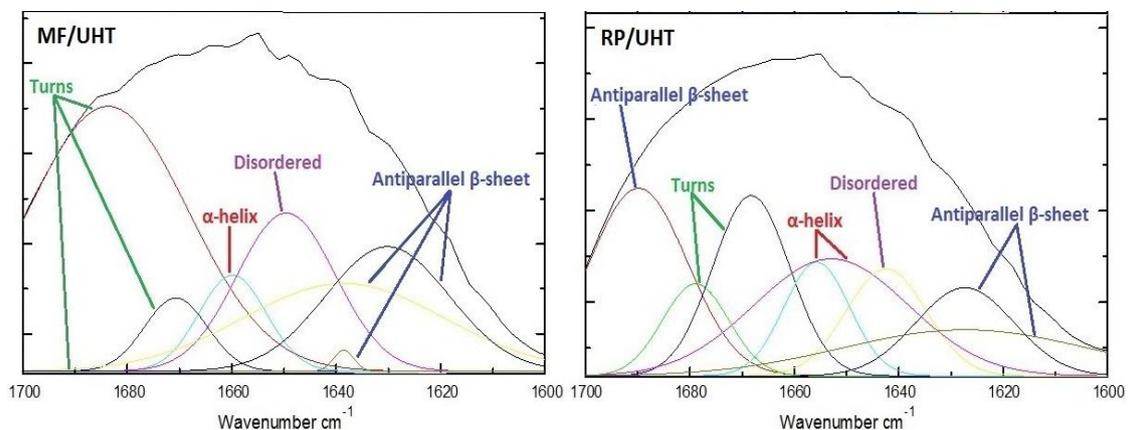


그림 44. 고단백 우유 시료의 Gaussian curve-fitting

Gaussian function curve fitting was performed on spectra of high protein milk after subtracting the baseline from 1,600 to 1,700 cm^{-1} .

표28. FT-IR을 이용한 고단백질 우유의 2차구조 분석

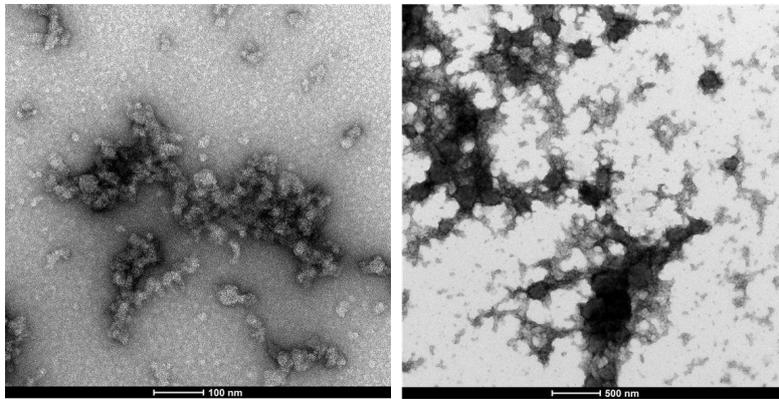
Sample	Antiparallel β -sheet (1694-1682 and 1640-1620)	Turns (1682-1662)	α -helix (1660-1650)	Disordered (1650-1640)
MF/UHT	28	41	12	19
RP/UHT	35	29	25	11

- β -sheet와 turns의 함량은 열처리에 의해 서로 변형될 수 있으며, 그 둘의 손실은 α -helix의 증가로 연결될 수 있음(Ye et al., 2017) RP/UHT는 건조 과정의 가열로 인한 이중 처리된 가열에 의해 α -helix의 증가를 나타냈을 것으로 판단 됨.
- 시유의 저장기간 중 antiparallel β -sheet 구조가 증가함에 따라 농후화 민감성이 증가한다는 보고(Mukherjee et al., 2007)를 근거로 할 때 정밀여과를 이용한 고단백우유는 유단백질 분말을 첨가하여 제조한 경우와 비교하여 특히 장기 저장 시 우수한 안정성을 나타낼 수 있을 것으로 생각 됨.

(9) Transmission electron microscopy (TEM)

- 입자 크기 분포 분석 결과에서 차이를 나타냈던 저장 3주차 MF/UHT와 RP/UHT 시료의 단백질 미세구조를 TEM을 이용하여 분석하였음(그림 45).

(A) 5.5% MF/UHT



(B) 5.5% RP/UHT

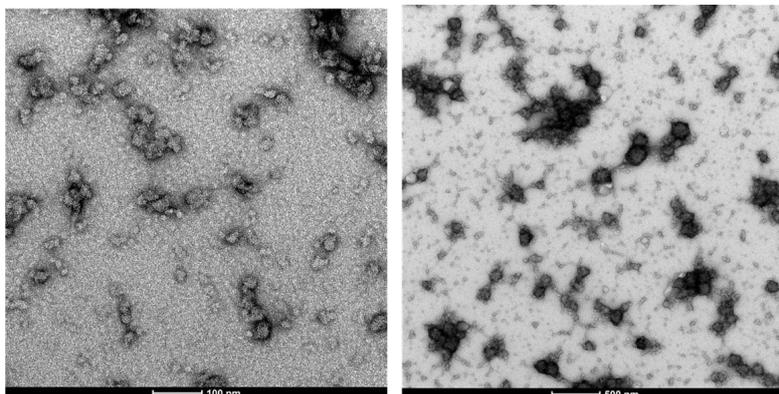


그림 45. 시료의 Transmission electron microscopy image

(A) MF/UHT (5.5% protein), (B) 5.5% RP/UHT (5.5% protein).

- RP/UHT 시료는 MF/UHT와 비교하여 상대적으로 단백질 간의 결합이 치밀하게 형성되어 있었으며, 이는 Li et al.(2020)이 저온 살균 우유에서 5일차에 발생하는 단백질 응집 이미지와 유사한 결과를 보였음.

(10) Zeta-potential 측정을 통한 시유의 저장안정성 분석

- 정밀여과 공법 혹은 단백질 분말 환원 시료들의 교질 안정성의 변화를 확인하기 위해 시료의 저장 3주간 제타 전위의 변화를 분석하였음(그림 46, 47).
- 모든 시료는 3주간의 저장기간 중 제타 전위의 급격한 변화를 일으키지는 않았으며, -35~-40 mV 수준의 안정한 분포를 보였음. 또한, 정밀여과를 이용하여 HTST 살균법으로 제조한 시료와 UHT 살균법으로 제조한 시료 간에도 뚜렷한 차이는 나타나지 않았음.

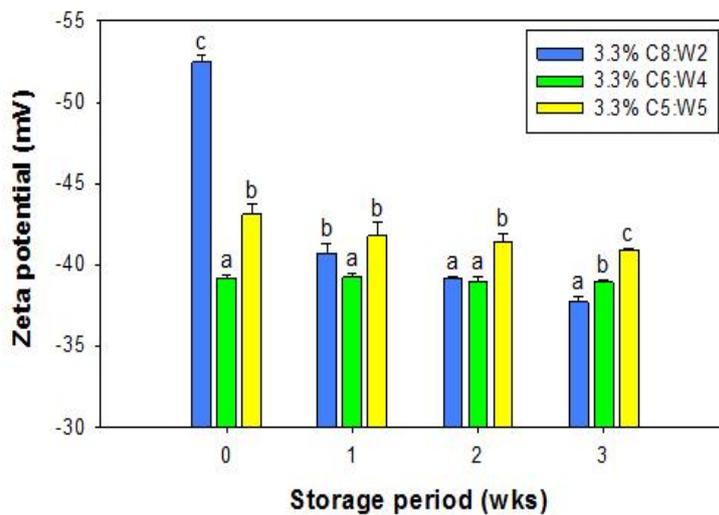


그림 46. 저장 기간 중 casein: whey protein 비율 조정 시료의 제타 전위 변화

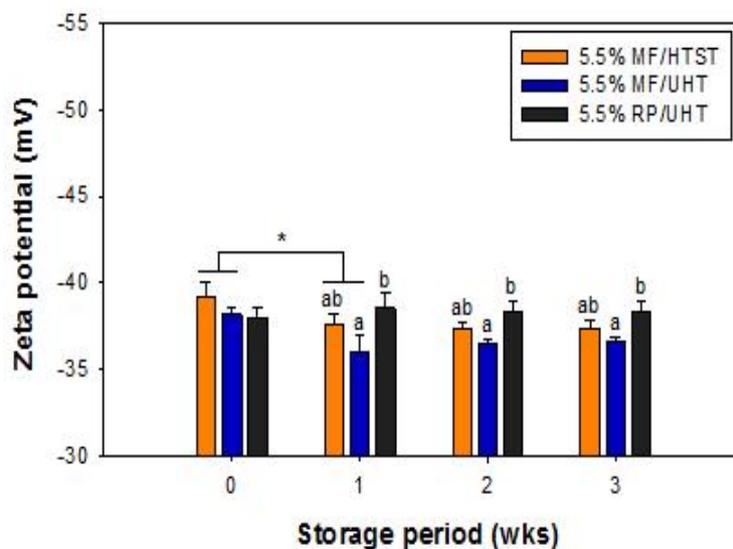


그림 47. 저장 기간 중 고단백 우유 시료의 제타 전위 변화

(11) Plasmin 활성 분석

- 정밀여과 공법으로 제조한 시료(단백질 함량 3.3%)의 plasmin 활성도 및 총 plasmin 활성도는 casein과 whey protein 비율을 변화시킨 경우에도 저장기간 중 유의적인 차이는 나타나지 않았음(그림 48).
- 우유 내에서 plasmin은 casein micelle에 존재하는 것으로 알려져 있으나, 그 활성은 또한 whey protein의 영향을 받으며, 우유에서 whey protein을 제거한 경우 plasmin의 활성이 증가했다고 보고됨(Aaltonen and Ollikainen, 2011)

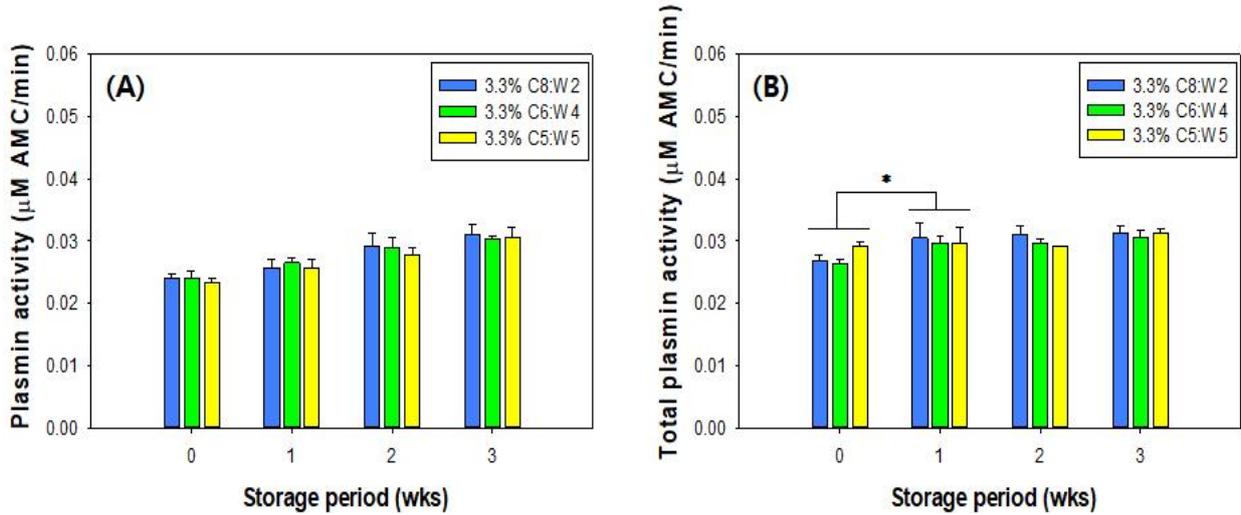


그림 48. 저장 기간 중 casein: whey protein 비율 조정 시료의 plasmin 활성 변화.

- 고단백질 우유(5.5%)의 plasmin 활성도를 비교한 경우에도 단백질의 강화방법에 대한 영향보다는 살균방법에 의한 영향이 가장 큰 것으로 나타났으며, 살균온도가 낮은 MF/HTST 시료가 UHT 시료들(MF/UHT, RP/UHT)에 비해 유의적으로 높은 plasmin 활성 및 총 plasmin 활성도를 나타냈음($P < 0.05$, 그림 49).

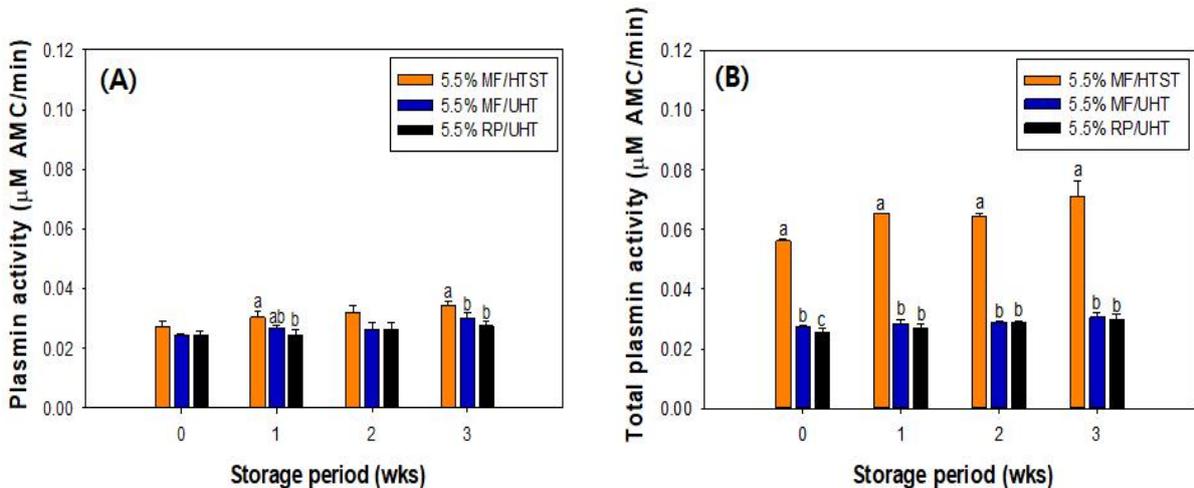


그림 49. 저장 기간 중 고단백 우유 시료의 plasmin 활성 변화.

- Plasmin activator inhibitor는 살균조건에 의해 거의 비활성화 되지만 plasminogen 및 plasminogen activator는 완전히 비활성화 되지 않음. 따라서 살균 후 저장기간이 증가함에 따라 plasminogen에서 plasmin으로의 전환이 증가하여 단백질 분해 작용이 증가할 수 있다고 보고 됨(Anema, 2019).
- 정밀여과 공법으로 제조 시 plasmin, plasminogen 및 plasminogen activator는 casein (retentate)에 남아 존재하지만 plasminogen activator inhibitor (permeate)는 막을 통해 빠져나가 더 높은 plasmin 활성이 나타날 수 있다고 보고되어 있음(Anema, 2019). 그러나, 본 실험의 결과에서는 단백질 제조인 RP/UHT와 정밀여과 제조인 MF/UHT 시료 간에는 plasmin 활성 및 총 plasmin 활성 모두 유의적인 차이는 나타나지 않았음.

(12) 시판 제품 plasmin 활성 분석

- Plasmin은 우유에 자연적으로 내재하는 단백질분해효소로, 내열성이 매우 강하여 UHT 살균 후에도 단백질의 분해를 일으키며 일부 잔존해있음. 특히 살균과정에서 생성된 β -lactoglobulin과 κ -casein의 분해는 UHT 살균유의 장기저장에서 나타나는 농후화와 밀접한 관련이 있는 것으로 보고 됨(Newstead et al., 2006).
- 다양한 국내 시유 제품의 plasmin 활성도 및 총 plasmin 활성도를 측정하여 살균방식에 따른 제품의 평균값을 그래프에 표기하였음(그림 50).

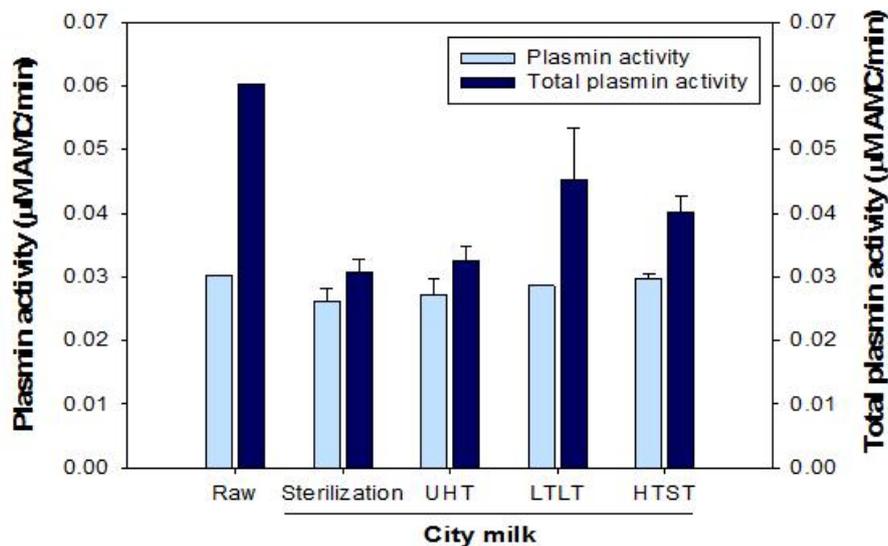


그림 50. 다양한 살균 조건으로 제조된 국내 시판 우유의 plasmin 활성 변화.

- 국내 제조 시유 회사의 살균방식에 따른 plasmin 활성은 원유와 비교하여 감소했지만, 상당 부분 시유 잔존하였으며, total plasmin activity에서는 살균방법에 따른 차이가 보다 뚜렷하게 확인되었음.
- 이 결과는 낮은 살균온도에서는 plasminogen activator inhibitor가 불활성화되어, plasminogen이 plasmin으로 활성 되는 속도가 증가함으로써 살균온도가 낮을수록 총 plasmin 활성도는 증가하는 것을 설명될 수 있음(Saint Denis et al., 2001).

- UHT 살균 및 멸균 처리를 한 제품은 총 plasmin 활성도에서 원유 대비 50% 정도 낮은 활성도를 보였으며 이 결과는 Korycha et al. (1983)의 보고와 유사하였음.

2) 농후화 원인 규명을 위한 단백질 변화 분석

(1) 단백질 profile 분석

① Native-PAGE

- UHT 살균 무지방 우유에 plasmin을 각각 2.5, 10, 15 U/L 가 되도록 첨가하고 plasmin의 첨가 농도 및 저장온도(23°C, 37°C)에 따른 단백질 분해 패턴의 변화를 Native-PAGE를 이용하여 분석하였음.
- 상온에서 변화가 느린 plasmin 저농도(PL 2.5 U/L) 처리 군은 3주차에 BSA(bovine serum albumin)와 β -casein이 가장 먼저 분해되었으며, α_s -casein band는 5주차까지 band가 일부 확인되었음(Fig. 27). β -casein은 casein 중 소수성이 가장 큰 casein임을 고려할 때 plasmin은 소수성 아미노산에 상대적으로 높은 친화력을 보이는 것으로 생각됨.
- Zhang et al.(2018)에 따르면 상온에서 저장했을 때 plasmin이 1주차부터 β -casein과 α_s -casein의 분해에 영향을 미치며, 우유에서 낮은 비율로 존재하는 κ -casein도 4주차에 유의적인 감소가 나타나는 것으로 보고되어 있으며, 본 실험의 결과와 일치하였음.

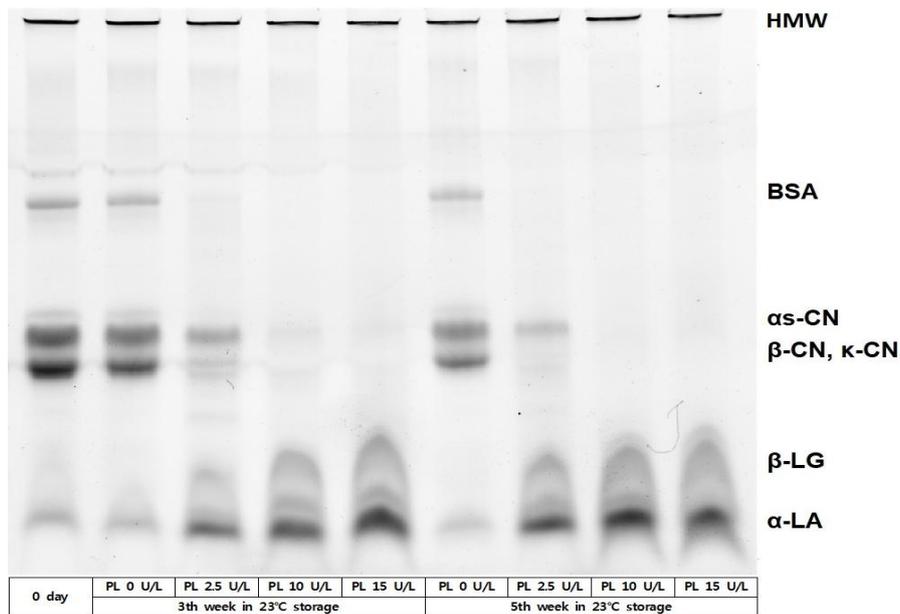


그림 51. Plasmin의 첨가 탈지유의 저장기간(23°C) 중 단백질 분해패턴 변화(Native-PAGE)

② TCA soluble extract

- Plasmin에 의한 단백질 분해 양상 변화를 확인하기 위하여 12% TCA 가용성 펩타이드 양을 분석하였음.
- 23°C 저장 및 37°C 저장 모두 시료와 저장기간에 따른 두 요인의 상호적인 변화에서 유의적으로 증가하는 것으로 나타났으며, plasmin을 처리하지 않은 시료도 저장기간에 따른 단백질 분해로 펩타이드 양이 지속적으로 증가하는 것이 확인되었음(그림 52).

- 23°C 저장조건에서는 plasmin의 농도 의존적으로 지속적인 분해가 일어나는 것으로 확인되었으나, 37°C 저장조건에서는 23°C에 비해 상대적으로 빠른 분해가 일어나면서, 분해 후 응집 및 침전이 동반한 3주부터는 불규칙적인 변화를 나타냈으며 이는 OPA assay 결과와 일치하였음.

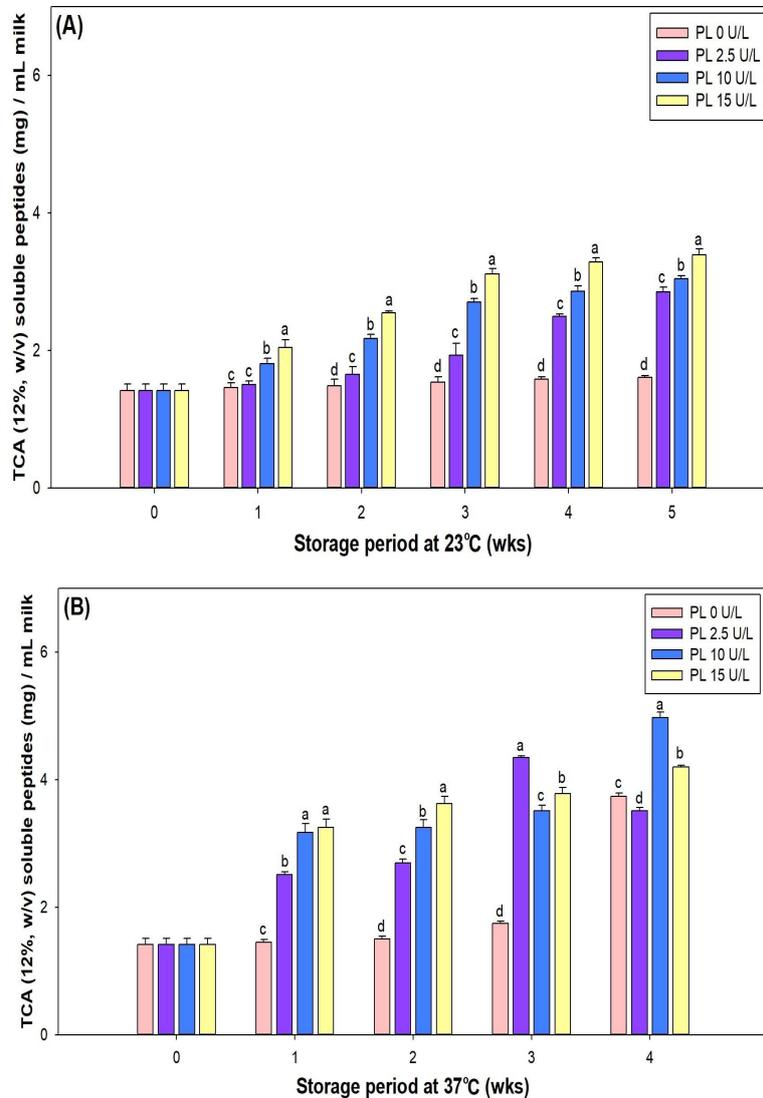


그림 52. Plasmin이 첨가된 탈지유의 저장기간 중 TCA 가용성 펩타이드의 변화
(A) 23°C 저장 (B) 37°C 저장

(2) 시료의 입자크기 분포 변화 분석

- UHT 살균 무지방 우유에서 plasmin 처리 농도에 따른 단백질 농후화 현상을 관찰하기 위해 23°C 저장에서 5주, 37°C 저장에서 4주 동안 입자 크기를 관찰하였음(그림 53, 54).
- 23°C에서 보관한 시료에서는 3주까지는 모든 시료에서 plasmin 처리 농도에 따른 입자 크기 분포의 증가를 나타냈으며, 일정 크기에 다다르면 다시 분해되거나, 침전되어 입자 크기가 감소하는 것으로 생각 됨. 특히 고농도로 처리된 시료(PL 15 U/L)에서는 100 μm 이상의 거대 입자 비율이 2, 3주 각각 2.3%와 54%였으나, 4주차에는 0%로 감소하였음(그림 53).

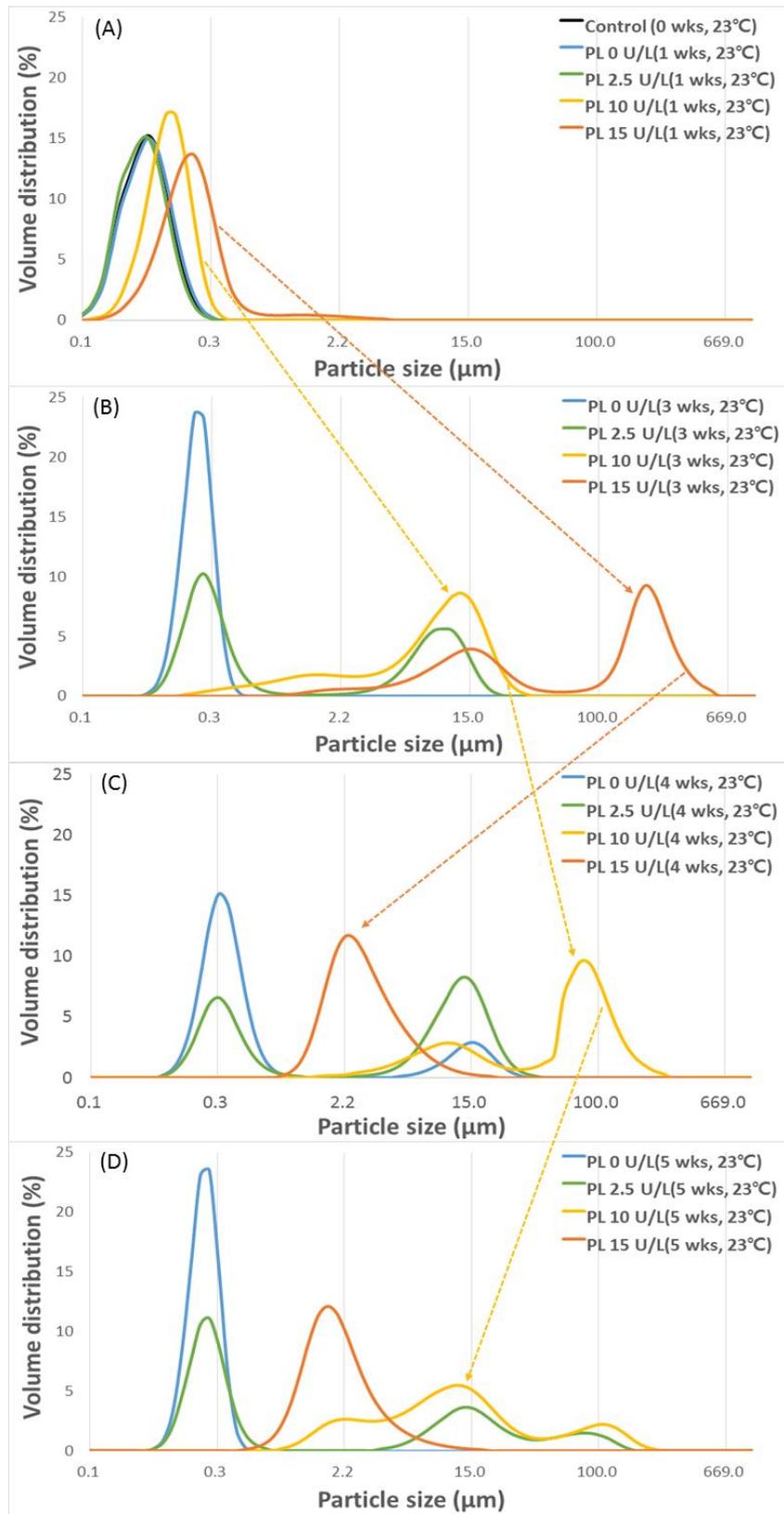


그림 53. Plasmin이 첨가된 탈지유의 저장기간(23°C) 중 입자크기 분포 변화
 (A) 1 주, (B) 3 주, (C) 4 주, (D) 5 주

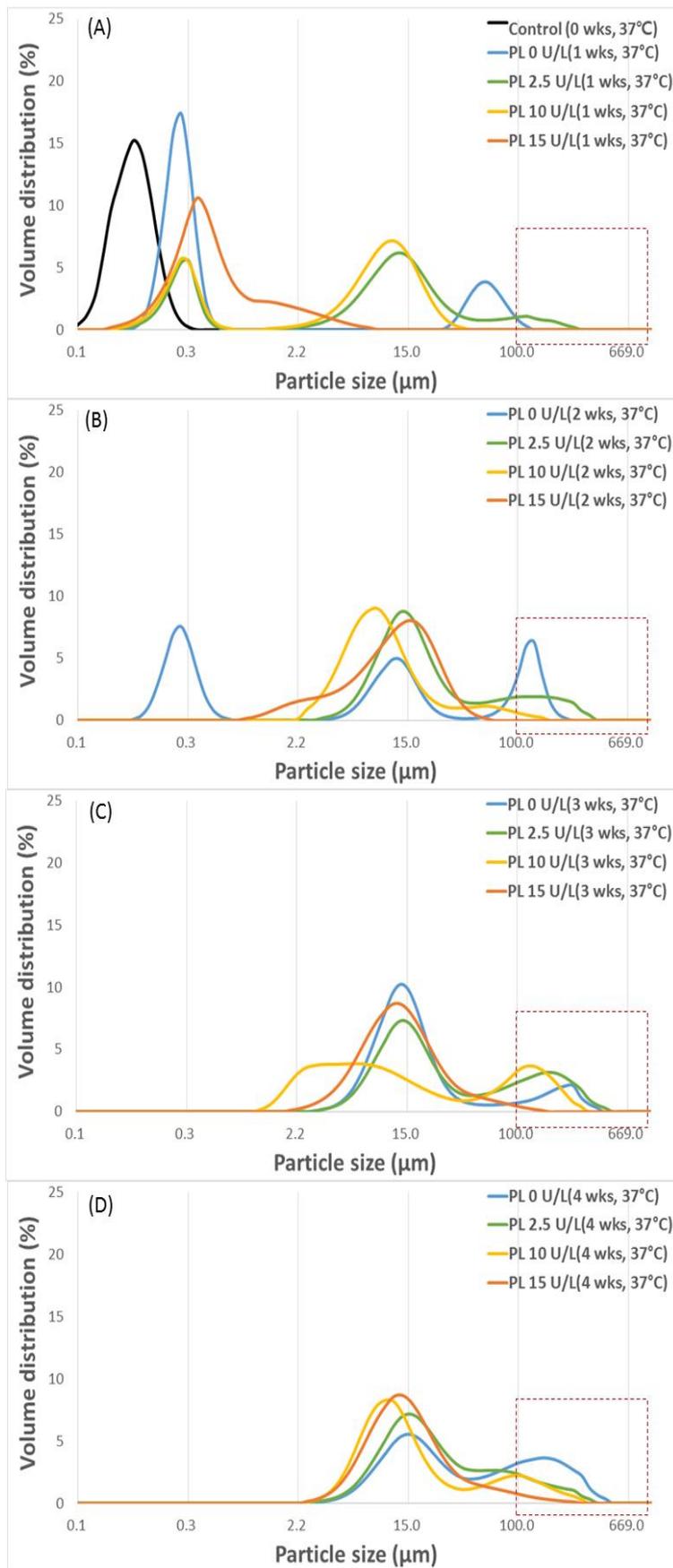


그림 54. Plasmin이 첨가된 탈지유의 저장기간(37°C) 중 입자크기 분포 변화
(A) 1 주, (B) 3 주, (C) 4 주, (D) 5 주

- 37°C에서 보관한 시료에서는 plasmin 활성이 높게 나타나, 단백질 분해가 빨랐던 고농도의 plasmin이 처리된 시료(PL 15 U/L)에서는 단백질 응집으로 인한 입자 크기 분포 증가가 느리게 나타났으며, 저농도의 plasmin이 처리된 시료(PL 2.5 U/L)에서 거대입자 비율의 증가가 뚜렷이 확인되었음(그림 54).
- Plasmin의 활성 온도에 대해 언급한 보고들은 많으나, plasmin의 분해속도가 농후화에 미치는 영향에 대해서도 연구보고가 없는 실정임. 본 연구 결과는 plasmin과 농후화의 직접적 관련성 및 분해속도와의 관계를 직접적으로 확인한 의미 있는 결과로 판단 됨.

(3) Transmission electron microscopy(TEM)

- Plasmin에 의한 단백질의 분해 및 응집으로 인한 농후화 현상을 시각적으로 확인하기 위해 TEM 이미지 분석을 진행하였음(그림 55)

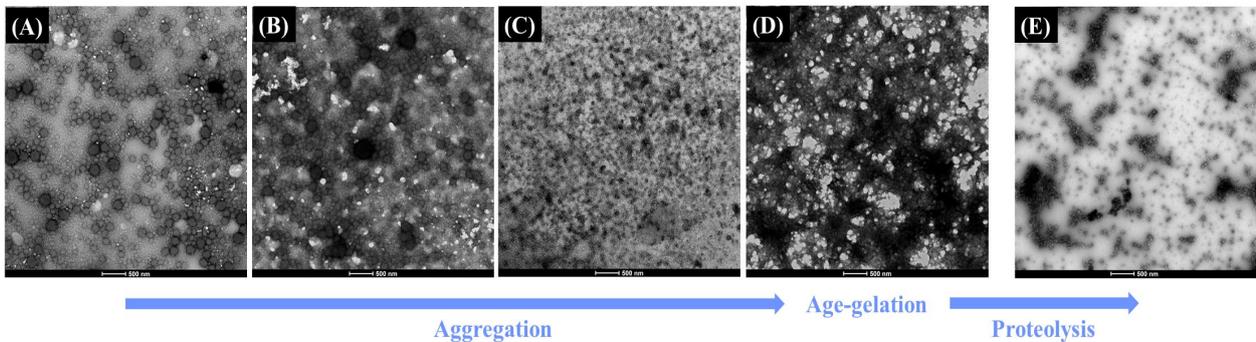


그림 55. Plasmin이 첨가된 탈지유의 저장기간 중 TEM 이미지 변화

(A) Plasmin 무첨가 23°C 3주 저장, (B) Plasmin 2.5 U/L 첨가 23°C 3주 저장, (C) Plasmin 10 U/L 첨가 23°C 3주 저장, (D) Plasmin 15 U/L 첨가 23°C 3주 저장, (E) Plasmin 15 U/L 첨가 37°C 3주 저장

- 23°C에서 3주 동안 저장한 고농도의 plasmin 처리 시료(PL 15 U/L)는 단백질 간의 응집이 증가하고 단백질의 교차 결합이 증가 되어있는 것으로 나타났음(그림 55(D)). 반면, 37°C에서 동일하게 3주 동안 저장한 고농도의 plasmin 처리 시료(PL 15 U/L)는 plasmin에 의해 빠르게 분해되어 단백질 간의 결합을 관찰 할 수 없었음(그림 55(E))

(4) 침전물 분석

- 시료의 농후화로 인해 용해도가 감소하여 침전되는 단백질 양을 분석하기 위해 원심분리를 이용하여 침전된 단백질 양을 확인하였음.
- 23°C에서 저장된 시료는 저농도의 plasmin 처리 시료(PL 2.5 U/L) 및 plasmin을 처리하지 않은 시료(PL 0 U/L)에서 주차에 따른 침전 단백질 증가를 나타냈으나, 고농도의 plasmin 처리 시료(PL 10, 15 U/L)에서는 침전 단백질의 양이 빠르게 증가한 반면, 일정 시간이 지난 뒤 다시 감소하는 것으로 확인되었음(그림 56). 이는 입자 크기 분포의 증가가 일정 수준까지 증가하였다가 감소하는 경향과 일치하였음(그림 53).

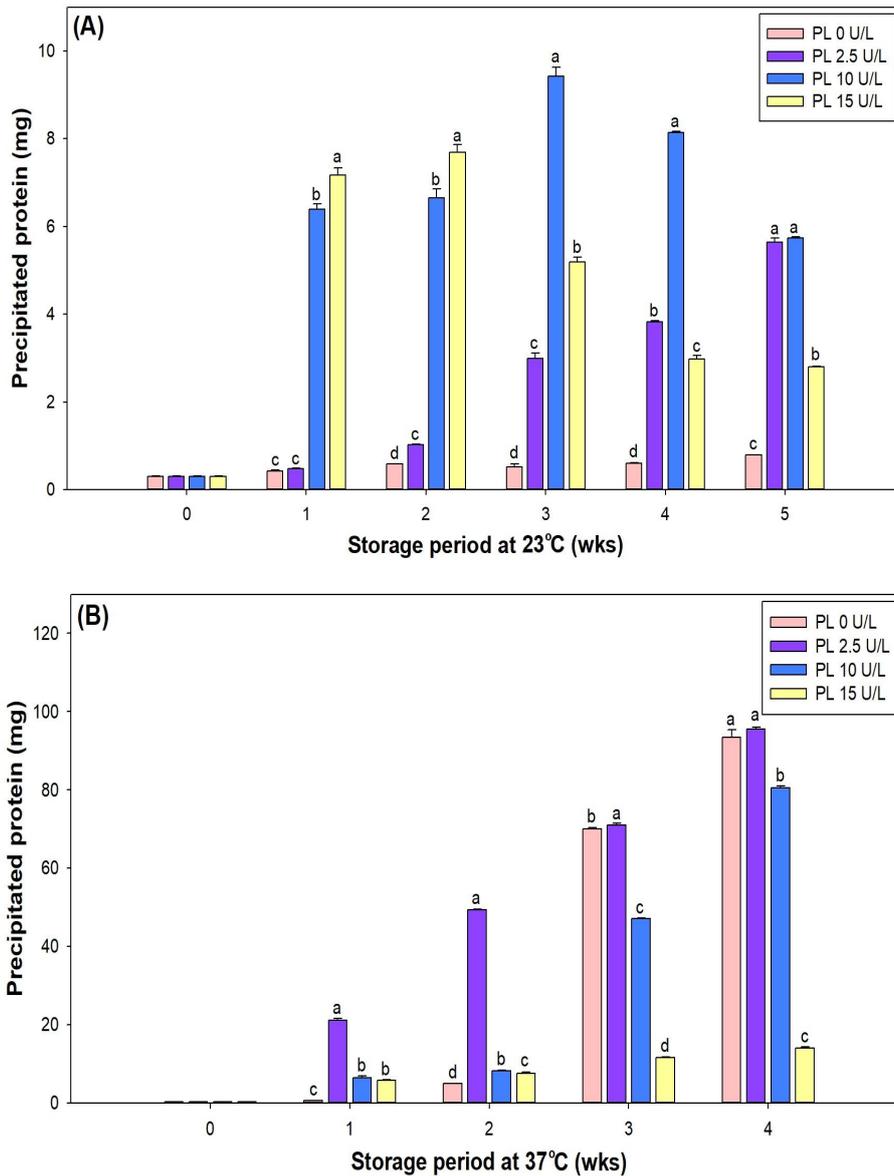


그림 56. Plasmin이 첨가된 탈지유의 저장기간 중 침전물 단백질량의 변화
(A) 23°C 저장 (B) 37°C 저장

- 37°C에서 저장된 시료는 모든 시료에서 저장 기간에 따라 침전물은 증가하였으며, 고농도로 plasmin을 처리한 PL 15 U/L는 저장기간에 따른 침전 단백질 증가폭이 현저히 낮은 것으로 나타났음.
- 23°C 저장의 비해 37°C 저장에서는 전반적으로 침전된 단백질 양이 10배까지 증가하는 유의적인 차이를 보였으며 저장기간 중 세균의 증식은 나타나지 않았음. 따라서 저장 온도간의 침전 단백질 양 차이는 plasmin 활성의 차이에서 나타난 것으로 판단됨.

(5) 단백질 2차 구조 분석

- Plasmin에 의한 단백질 농후화에 따른 2차 구조의 변화를 분석하기 위해 FT-IR을 이용하여 Amide I spectrum(1,700-1,600 cm^{-1})을 분석하였으며, gaussian function fitting 방식으로 단백질 2차 구조를 식별하여 비율을 확인하였음.
- 23°C 저장에서의 농후화는 PL 15 U/L 3주차에 최초 발생한 것으로 판단되어, 농후화가

plasmin 고농도 처리 군(PL 15 U/L)에서 발생한 시점을 기준으로 단백질 2차 구조를 분석하였음.

- Plasmin에 의해 단백질 분해는 Antiparallel β -sheet 비율 증가와 turn 구조의 감소와 상관관계가 있는 것으로 관찰되었으며, α -helix는 농후화가 일어나기 전에는 증가하다가 농후화 발생 시 감소하는 것으로 확인되었음(표 29).

표 29. Plasmin이 첨가된 탈지유의 저장기간(23℃, 3주)중 단백질 2차 구조 변화

Sample of 23℃ storage	1694-1682 and 1640-1620 Antiparallel β -sheet	1682-1662 Turns	1660-1650 α -helix	1650-1640 Disordered	1620-1610 β -sheet
0 wks	31	24	25	15	5
PL 0 U/L	29	30	18	23	0
3 wks					
PL 0.5 U/L	33	24	23	20	0
PL 10 U/L	35	21	22	22	0
PL 15 U/L	61	13	8	6	12

- Mukherjee et al.(2007)은 다량의 Antiparallel β -sheet는 가용성 펩타이드 응집체 생성을 일으켜 저장기간 중의 침전과 관련되어 있다고 보고하여 가용성 펩타이드 응집체의 증가는 plasmin에 의한 농후화 현상과 높은 상관성을 나타내는 것으로 생각 됨.
- Plasmin이 농후화를 일으키는 가장 잘 알려진 기작은 plasmin에 의해 κ -casein(κ -CN)이 casein micelle로부터 절단되어 β -LG와 κ -CN의 교차 결합을 통해 β κ -complex를 생성해 우유가 응집 및 분해되는 것으로 알려져 있음(McMahon, 1996). 본 실험 결과에서는 37℃ plasmin이 높은 활성을 갖는 것으로 파악되며, 그로 인해 분해속도가 너무 빨라지면 오히려 응집이 일어나지 않아 농후화가 일어나지 않는 것을 증명하였음.
- 유제품에서 단백질 구조를 이해하고 제어하는 것은 필요한 구조, 질감 및 안정성을 조절하는 데 중요하며, 이는 새롭고 더 복잡한 제품을 만들어 내는 데 기여할 수 있다고 보고됨(Markoska et al., 2020). 따라서 단백질 구조의 변화를 파악하는 것은 제품의 유통기한 및 품질 향상에 기여할 수 있을 것으로 생각 됨.

<2차년도>

[제2 협동기관 : 한양대학교]

I. 세부 연구목표

- Casein 및 whey protein의 비율에 따른 *in vivo* 소화흡수율 평가
- 열처리 조건에 따른 *in vivo* 소화흡수율 평가
- 단백질 함량에 따른 *in vivo* 소화흡수율 평가

II. 연구개발 수행내용

1. 정밀여과 공법으로 제조된 우유의 *in vivo* 소화흡수율 평가

1) 시료준비

- 모든 샘플은 생크림(지방함량 38.5%)을 첨가하여 지방 함량 2% 수준으로 제조하였으며, 균질압 150 bar 처리 후 살균을 진행함. UHT 살균은 130°C 이상, 2초 이상 살균을 진행, HTST 살균 조건은 73 ± 1°C, 15초 살균을 진행하였음(주관기관 제공). 각 시료의 단백질 함량, casein과 whey protein의 비율, 열처리 조건, 단백질 강화방법은 다음과 같음(표 30). 각 시료는 동결건조 후 동물실험에 사용하였음.

표 30. 시료의 단백질 함량, casein 및 whey protein의 비율, 열처리 조건, 단백질 강화방법

Sample	Protein (%)	Casein:whey	Pasteurization	Fortification
3.3%, 8:2, UHT		8:2	UHT	-
3.3%, 6:4, UHT	3.3%			MF
3.3%, 5:5, UHT		6:4	UHT	concentration
5.5%, MF (UHT)		5:5	HTST	MF
5.5%, MF (HTST)	5.5%			concentration
5.5%, RP (UHT)		8:2	UHT	Powder addition

2) 동물실험

- 4주령의 Sprague-Dawley rat (SD rat, Orientbio, Korea)를 분양받아 1주간의 적응기간 동안 순화시킨 후 실험에 사용함. 실험기간 동안 AIN-93G (Saeronbio, Korea)를 자유 급이하고, 정제수를 음수병에 넣어 자유 섭취시킴. 온도 23 ± 3°C, 상대습도 55 ± 15%, 환기횟수 10-20 회/hr, 조명시간 12시간(오전 8시 소등 - 오후 8시 점등) 및 조도 150-300 Lux로 유지함.
- 48마리의 SD rat은 군 당 6마리씩 표 8와 같이 8개 실험군으로 나누었으며 케이지 당 2마리의 rat을 사육하였으며, 실험군은 casein 및 whey protein의 비율, 열처리 방법, 단백질 함량에 따라 구성됨(표 31).
- 동물의 군 분리는 순화기간 후 동물의 체중을 측정하여 순위화하고, 각 군의 평균체중이 균일하게 분포하도록 무작위 분배함.

표 31. 동물실험 실험군

Number	Sample	Protein (%)	Casein:whey	Pasteurization	Fortification
1	3.3%, 8:2, UHT		8:2	UHT	-
2	3.3%, 6:4, UHT	3.3%			
3	3.3%, 5:5, UHT		6:4	UHT	MF
4	5.5%, UHT, MF		5:5	HTST	MF
5	5.5%, HTST, MF	5.5%			
6	5.5%, UHT, powder		8:2	UHT	Powder
7	Normal diet	-	-	-	-
8	N-free				

- 매주 각 군의 평균 체중을 기준으로 투여량을 설정하며, G7군과 G8군은 G1군의 투여량과 동일하게 조정하였음.
- 8주간 매주 2회 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하였음.

3) Grip strength test를 통한 근력 평가

- 실험 당일 실험동물의 앞발을 그립에 균형 있게 잡도록 하며, 잡은 그립에서 앞발이 떨어질 때의 약력을 측정함(3번 측정치 중 가장 높은 값을 기록)
- 해당 실험은 투여 28일 및 53일차에 실시

4) Forced swimming test (FST)를 통한 지구력 평가

- 사료 투여 8주차에 실시하며, 2일 전부터 매일 10분간 수영연습을 실시함.
- 시험물질 투여 60분 후 FST를 실시함.
- FST 실시 시 수조의 온도는 23 ± 2℃로 유지하며 동물 체중의 약 5% 무게의 추를 꼬리에 달아 동물에게 부하를 주도록 하였음.
- 수조에 동물을 넣은 후 수영하는 시간을 측정함. 단, 동물이 수면 아래로 내려간 후 5초 이내에 떠오르지 않으면 수영을 중단하고 그때까지의 시간을 기록하였음.

5) 단백질 소화흡수율 평가

- 6주차에 개별 케이지에 사육하여 하루 적응시킨 후, 4일 동안의 사료섭취량을 측정하고 분변을 수집하였음.
- 채취한 분변은 conical tube에 넣어 4℃에서 보관함. 분변의 전처리에는 65℃에서 48시간 건조하여 냉각 후 칭량함. 블렌더를 이용해 가루로 준비한 대변을 킬달법에 따라 질소 함량을 측정함.
- 사료섭취량 및 분변을 이용하여 겉보기 소화율(apparent digestibility, AD)과 진성소화율(true digestibility, TD)을 산출하여 단백질 소화흡수율을 평가하였음.

$$AD = \frac{\text{질소섭취량 (g)} - \text{대변 내 질소함량 (g)}}{\text{질소섭취량 (g)}} \times 100$$

$$TD = \frac{\text{질소섭취량 (g)} - \{\text{대변 내 질소량 (g)} - \text{Protein free군의 대변 내 질소량 (g)}\}}{\text{질소섭취량 (g)}} \times 100$$

6) 체성분 분석

- 8주간의 실험 종료 후, 희생 전 dual energy x-ray absorptiometry (DEXA; Medilors, korea)를 이용하여 체중(body mass), 체지방 함량(fat mass), 근육량(lean mass), 골밀도 (bone mineral density, BMD), 골무기질 함량(bone mineral content, BMC)등의 체성분을 비파괴적인 방법으로 측정하였음.

2. 정밀여과 공법으로 제조된 우유의 *in vivo* 소화흡수율 평가 결과

1) 체중, 체중증가량, 식이섭취량

(1) 체중

- 적응기간 후 실험군들의 평균 체중은 104.6 g으로 실험군간에 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 식이투여 후 1주차부터 N-free그룹과 다른 실험군들과의 체중 차이가 관찰되었음(그림 57).

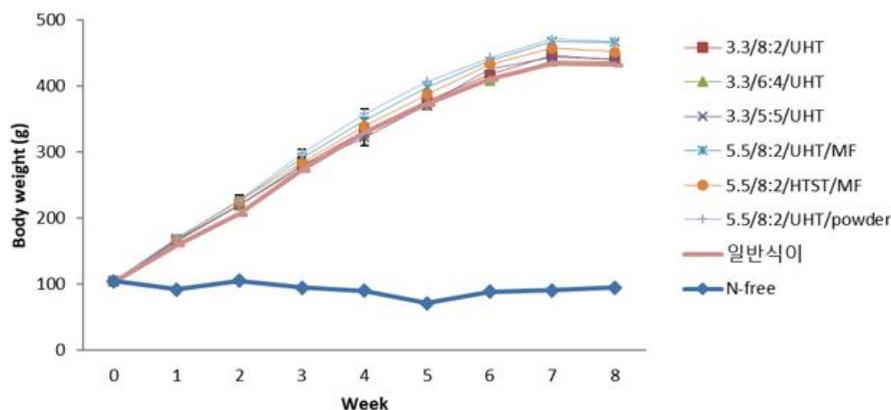


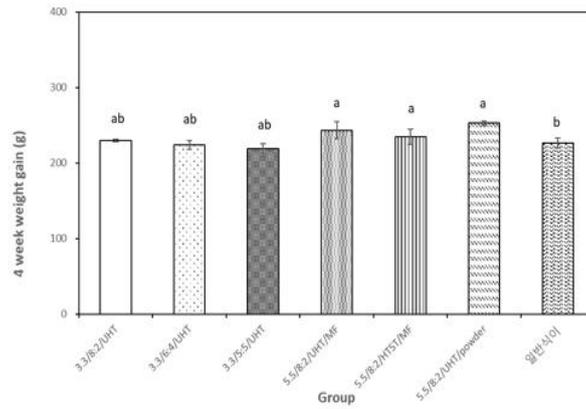
그림 57. 실험처리군 별 rat의 체중 변화

(2) 체중증가량

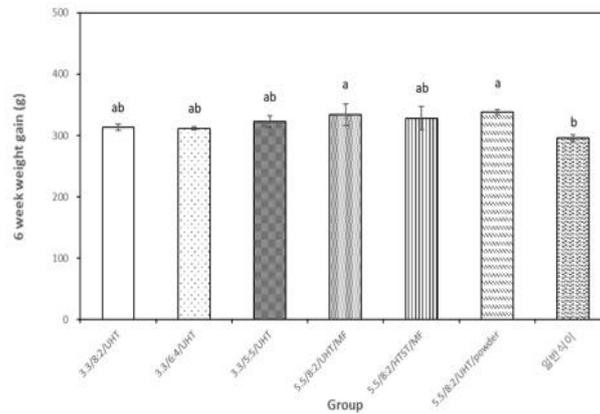
① Casein 및 whey protein 비율에 따른 결과

- 단백질 3.3% 함량 그룹인 casein:whey protein(8:2), casein:whey protein(6:4), casein:whey protein(5:5)을 비교하면 4주까지는 casein 함량이 높은 시료를 투여한 순서로 높은 체중 증가(8:2 > 6:4 > 5:5)가 나타나나 유의적이지는 않았음. 그러나 6주차에는 4주차와 다르게 casein:whey protein(5:5)군의 체중증가량(322.4 g)이 casein:whey protein(8:2)(313.1 g)와 casein:whey protein(6:4)(304.3 g)에 비해 높게 나타났으며 casein과 whey protein 비율에 따른 경향은 나타나지 않았음. 6주차 이후에는 실험군간 체중증가량의 차이가 나타나지 않았음(그림 58).

(A)



(B)



(C)

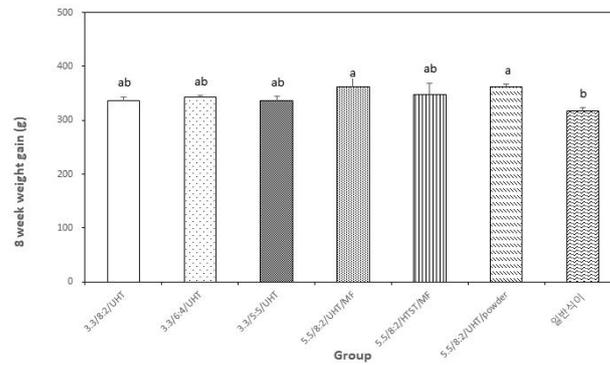


그림 58. 실험군별 rat의 (A) 4주차, (B) 6주차, (C) 8주차 체중증가량
Data are expressed as mean \pm SEM.
The values with different letters indicate significant differences at $p < 0.05$.

② 열처리조건에 따른 결과

- UHT 및 HTST 열처리 조건에 따른 체중 증가량 비교 결과, 시료 투여 기간 동안 유의적인 차이는 나타나지 않았으나, MF-UHT군의 체중증가량은 4,6,8주차에 각각 243.4, 337.9, 361.88 g으로 MF-HTST(234.6/328.2/347.1 g)에 비해 높은 값을 나타냈음.
- MF 및 powder 첨가를 통한 단백질 증량 샘플을 비교하면, 통계적 유의성은 없었으나 6주차까지 powder-UHT(337.9 g)군이 MF-UHT(333.7 g)에 비해 높은 체중증가를 나타냈음. 실험 종료인 8주차에는 실험군간의 차이가(0.6 g) 거의 나타나지 않았음(그림 58).

③ 단백질 함량에 따른 결과

- 단백질 3.3%와 5.5% 함량 그룹을 전반적으로 비교하면 실험종료 8주차까지 유의적인 차이를 보이지는 않았으나 모든 5.5% 단백질 함량군이 3.3%함량 군보다 체중증가 정도가 높았음. 5.5%는 일반식이군에 비해 유의적인 ($p < 0.05$) 체중증가를 보였으며 주차 경과에 따라 그 격차가 증가함. 3.3% 투여군은 일반식이군보다 체중이 증가하였으며, 이는 같은 열량 식이에서 탄수화물에 비해 단백질의 에너지 급원 비중이 높은 실험군의 체중이 증가하는 Chevalier. L 등(2009)의 선행연구와 일치함. 따라서 일반식이를 포함한 7가지 실험군의 체중은 일반식이군 < 단백질 함량 3.3% 투여군 < 단백질 함량 5.5% 투여군 순으로 증가하였음(그림 58).

(2) 식이섭취량

- 식이섭취량은 N-free군을 제외하고, 8주차까지 모든 실험군간의 유의적인 차이가 나타나지 않음. 1주차에서 5주차까지 체중이 증가함에 따라 사료섭취량은 지속적으로 증가하였으며 6주차부터는 감소하는 경향을 나타냈음(그림 59).

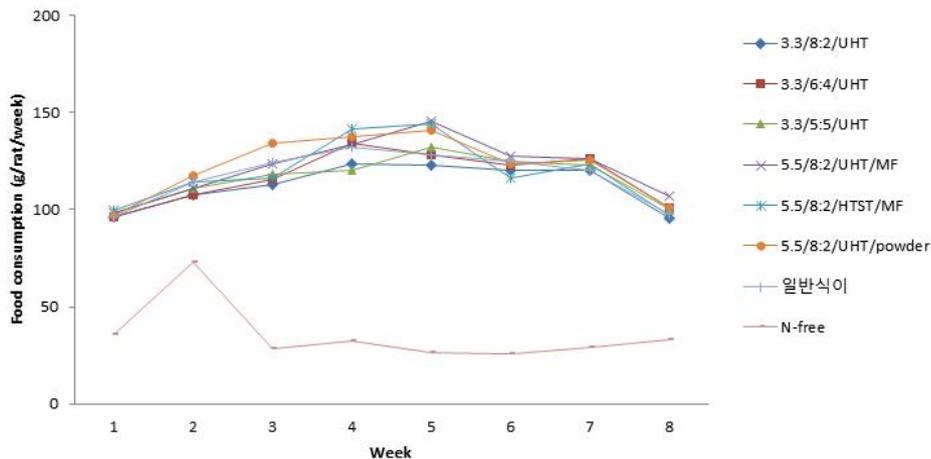


그림 59. 동물사육기간 중 식이섭취량의 변화

2) Grip strength test를 통한 근력 측정 결과

① Casein 및 whey protein 비율에 따른 결과

- 단백질 3.3% 함량 그룹인 casein:whey protein(8:2), casein:whey protein(6:4), casein:whey protein(5:5)을 비교하면 casein:whey protein(5:5)군은 casein:whey

protein(8:2)군에 비해 유의적으로($p<0.05$) 높은 grip force값을 보였으며, 전체적으로 casein에 비해 whey protein 비율이 높은 실험군(5:5 < 6:4 < 8:2) 순서로 grip force값이 증가함(Fig. 58). Casein 및 whey protein의 비율별 섭취에 따른 근력 평가가 진행된 연구는 없으나 Lafoux 등(2016)의 선행연구에서 노화 랫드(22주 이상)에서 casein에 비해 whey protein 식이를 한 군의 grip force값이 상대적으로 높은 결과를 보고하였음. 따라서 본 연구에 사용한 성장기 랫드(8주)에서도 whey protein 함량이 높은 것이 근력이 높게 나와 결과가 유사하다고 할 수 있음.

② 열처리조건에 따른 결과

- 단백질 5.5% 함량 그룹인 MF-UHT와 powder-UHT를 비교하면 유의적이지는 않으나, powder-UHT군의 grip force의 값은 1.930 kg, MF-UHT군은 2.009 kg으로 MF-UHT군이 powder-UHT군에 비해 grip force값이 높은 것을 확인함. 또한 HTST 및 UHT 열처리 조건에 따른 차이는 보이지 않았음(그림 60).

③ 단백질 함량에 따른 결과

- 단백질 3.3% 및 5.5% 함량별 실험군의 grip force 비교 결과, 5.5%군(2.01 kg)이 3.3%군(1.77 kg)에 비해 유의적으로($p<0.05$) 높은 값을 나타냈음(그림 60).

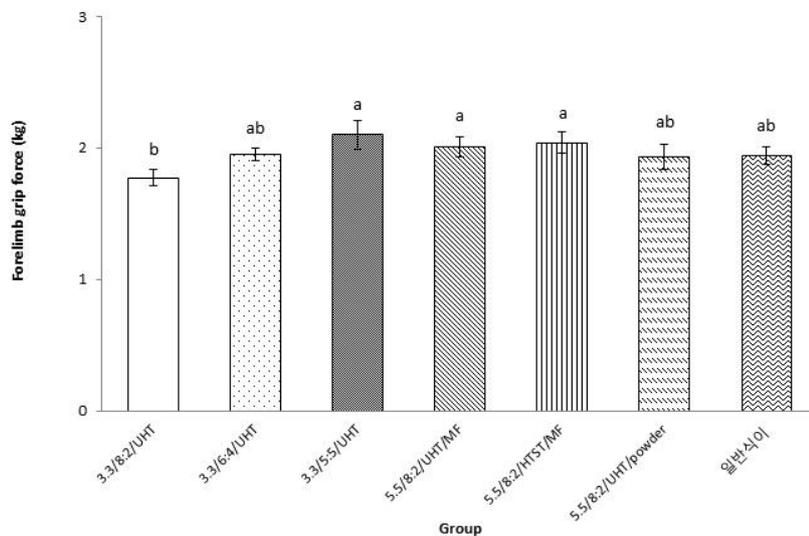


그림 60. 실험군에 따른 grip force

3) Forced swimming test(FST)를 통한 지구력 측정 결과

① Casein 및 whey protein 비율에 따른 결과

- 실험동물의 지구력을 측정하기 위해 casein 및 whey protein의 비율에 따른 forced swimming test (FST)를 진행한 결과, swimming time은 casein:whey protein(6:4)군(12.94 min)이 casein:whey protein(8:2)군(8.07 min)에 비해 유의적으로($p<0.05$) 높은 값을 나타냄. 앞서 측정한 grip test결과와 달리 casein 및 whey protein 비율에 따른 FST값은 8:2 < 5:5 < 6:4 순서로 나타났음(그림 61).

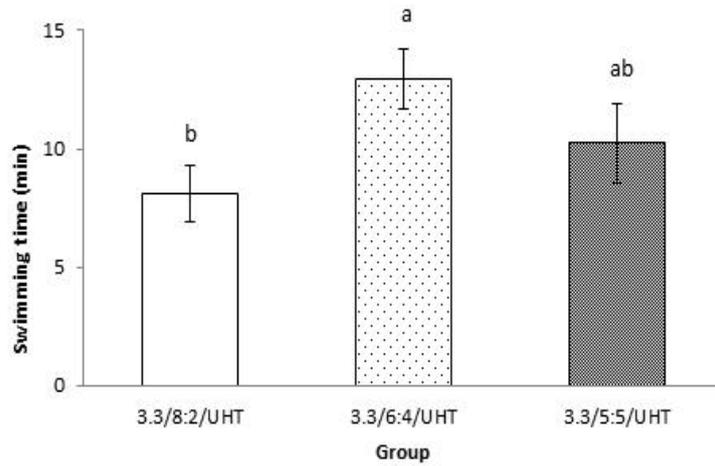


그림 61. Casein 및 whey protein의 비율에 따른 수영시간

② 열처리 조건에 따른 결과

- 5.5% 함량 그룹인 MF-UHT와 powder-UHT군의 유의적인 차이는 나지 않았으나, powder-UHT군이 MF-UHT군에 비해 swimming time이 높게 나타남. HTST 및 UHT 열처리 조건에 따른 차이는 관찰되지 않았음(그림 62).

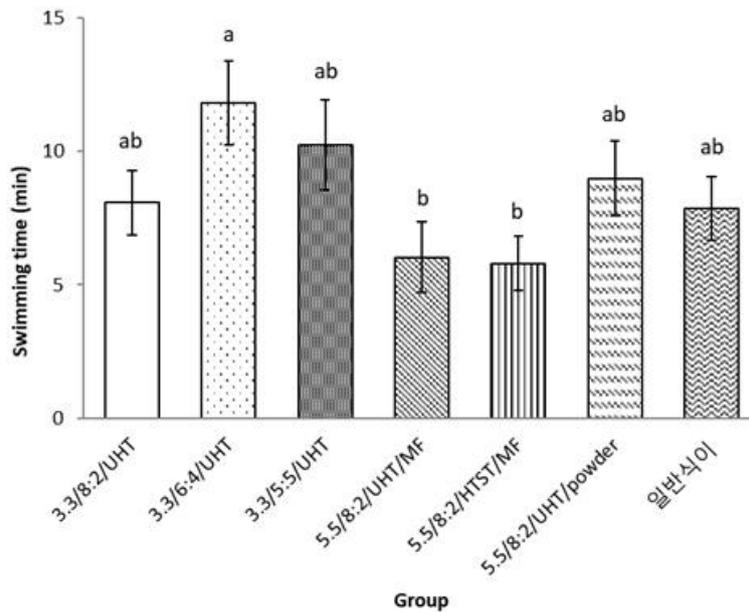


그림 62. 실험군별 수영시간

③ 단백질 함량에 따른 결과

- 단백질 3.3% 및 5.5% 함량별 실험군 비교 결과, 5.5%군과 3.3%군의 유의적인 차이는 나타나지 않았으나, 3.3%군에 비해 5.5%군에서 swimming time 값이 낮게 나타남. 3.3% 함량 내 casein:whey protein(6:4)군이 5.5%함량 내의 MF-UHT, HTST-MF군에 비해 유의적으로 ($p < 0.05$) swimming time이 높았으며 전반적으로 보았을 때도 3.3% 단백질 함량군은 5.5%군에 비해 swimming time이 높게 나타났음(그림 62). 이러한 원인으로서는 단백질 함량 5.5%군이 3.3%군에 비해 전반적으로 체중이 높기 때문에 swimming time이 낮게 나타날 수 있다고 사료됨.

4) 단백질 소화흡수율 평가

- 실험군의 질소섭취량(N intake)은 0.79-0.87 g으로 군 간의 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 대변 질소함량(Fecal N)은 MF-UHT군이 다른 실험군들에 비해 유의적으로($p<0.05$) 낮게 나타남(표 32).

표 32. 실험군별 단백질 소화흡수율

Group	N intake (g/rat)	Fecal N (g/rat)	TD (%)	AD (%)
3.3%, 8:2, UHT	0.80±0.04 ^a	0.19±0.01 ^a	77.45±1.99 ^b	74.90±2.07 ^b
3.3%, 6:4, UHT	0.81±0.01 ^a	0.20±0.01 ^a	78.13±1.19 ^b	75.72±1.20 ^b
3.3%, 5:5, UHT	0.83±0.01 ^a	0.20±0.01 ^a	80.49±1.37 ^b	78.03±1.37 ^b
5.5%, UHT, MF	0.87±0.05 ^a	0.11±0.03 ^b	89.23±3.95 ^a	86.88±4.02 ^a
5.5%, HTST, MF	0.79±0.07 ^a	0.17±0.02 ^a	79.61±2.96 ^b	76.93±3.18 ^b
5.5%, UHT, powder	0.87±0.03 ^a	0.19±0.01 ^a	80.80±1.20 ^b	78.48±1.27 ^b

Data are expressed as mean ± SEM. The values with different letters indicate significant differences at $p<0.05$.

① Casein 및 whey protein의 비율에 따른 결과

- AD와 TD 모두 실험군간 유의적인 차이는 나지 않았으나 8:2 < 6:4 < 5:5 순서로 단백질 소화흡수율(AD, TD)이 나타났으며, casein에 비해 whey protein 비율이 높을수록 소화율이 증가하는 경향을 보임(표 32). 이는 casein과 whey protein의 소화흡수율을 비교한 Barbara 등(2006)의 선행논문을 참고했을 때, whey protein이 casein에 비해 질소소화율(%)이 높게 나타난 것과 같은 경향을 나타냈음.

② 열처리조건에 따른 결과

- 5.5% 함량 그룹인 MF-UHT와 powder-UHT군의 유의적인 차이는 나지 않았으나, powder-UHT군이 MF-UHT군에 비해 단백질 소화흡수율(AD, TD)이 높게 나타남. UHT 및 HTST 열처리 조건에 따른 소화흡수율 비교 결과, 유의적이지는 않으나 MF-UHT군(86.88g)이 MF-HTST(76.93g)에 비해 높은 값을 나타냈음(표 32). Lacroix, M (2006)등의 선행연구에서 14일 동안 우유단백질을 포함한 사료식으로 적응시킨 후 하루 동안 열처리조건(HTST, UHT)에 따른 소화율을 평가하였으나 유의적인 차이가 나지 않았음. 본 연구에서는 열처리 조건(HTST, UHT)에 따른 시료를 성장기 rat에 6주간 투여함에 따라 이러한 결과가 도출되었음.

③ 단백질 함량에 따른 결과

- 단백질 3.3% 및 5.5% 함량별 실험군 비교 결과, 5.5% 8:2군이 3.3%, 8:2군에 비해 유의적으로($p<0.05$) 높은 소화흡수율(AD, TD)을 나타냈음(표 32).

5) 체성분 분석

(1) 체지방 및 제지방 함량

- 일반식이군을 제외한 실험군 비교결과, 3.3% 함량 내 casein:whey protein(5:5)군 (71.62%)의 체중 대비 근육량(lean mass)이 가장 높게 나타났으며, 5.5%의 powder-UHT군 (68.23%)에 비해 유의적으로($p<0.05$) 높은 값을 나타냄. 또한 casein:whey protein(5:5)군과 5.5%의 MF-UHT군의 체중 대비 지방 함량(fat mass)은 다른 군들에 비해 유의적으로 ($p<0.05$) 낮은 값을 보임(그림 63).

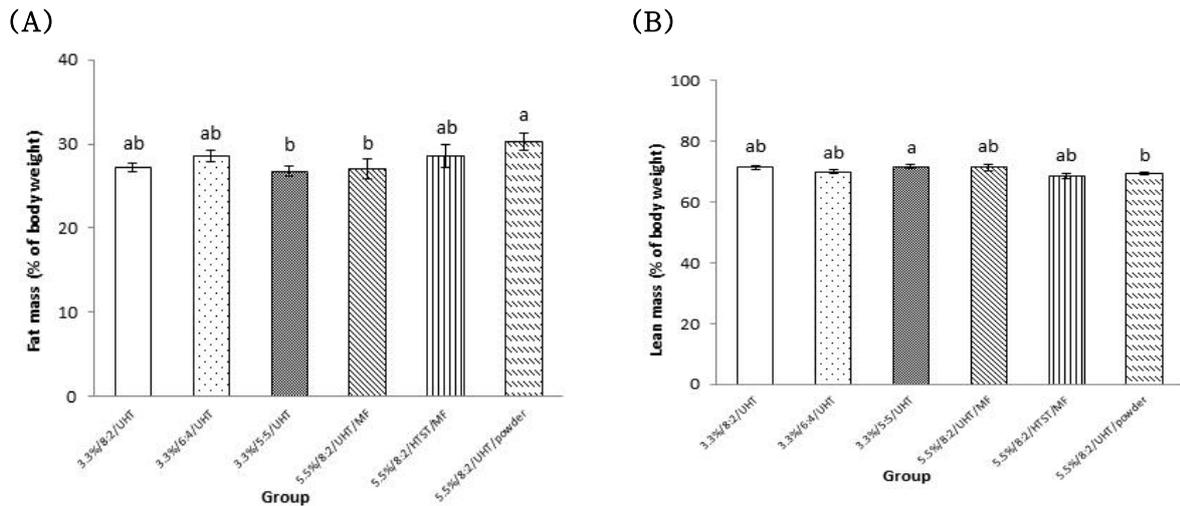


그림 63. 실험군별 체중 대비 (A) 체지방량 및 (B) 제지방량

① Casein 및 whey protein 비율에 따른 결과

- 체중대비 근육량(lean mass)은 실험군간 유의적인 차이는 나지 않았으나, casein:whey protein(5:5)군에서 가장 높은 값을 보임(Fig. 61). 8주차의 grip strength test결과와 연관 지어 볼 때, casein에 비해 whey protein 함량이 높은 식이를 한 실험군에서 근육량의 증가와 더불어 근력의 향상이 이루어졌다고 사료됨. 실험군간 체중대비 지방 함량(fat mass)에는 유의적인 차이가 나타나지 않았음(표 33).

표 33. 실험군별 체지방량, 제지방량, 골 무기질 함량, 골밀도

Group	Total Mass(g)	FAT(g)	LEAN(g)	BMC(g)	BMD(g/cm ³)
3.3%/8:2/UHT	442.13±5.33 ^{ab}	118.04±2.95 ^{ab}	314.46±3.99 ^a	9.63±0.20 ^a	0.205±0.003 ^a
3.3%/6:4/UHT	420.37±11.18 ^{ab}	117.95±5.72 ^{ab}	293.27±5.36 ^a	9.15±0.27 ^a	0.204±0.004 ^a
3.3%/5:5/UHT	416.27±8.21 ^b	109.08±4.45 ^b	297.95±3.87 ^a	9.24±0.17 ^a	0.198±0.002 ^a
5.5%/8:2/MF(UHT)	424.29±21.23 ^{ab}	113.27±10.64 ^{ab}	301.69±10.62 ^a	9.34±0.30 ^a	0.210±0.003 ^a
5.5%/8:2/MF(HTST)	429.52±21.24 ^{ab}	121.02±10.36 ^{ab}	299.11±10.01 ^a	9.40±0.31 ^a	0.203±0.004 ^a
5.5%/8:2/RP(UHT)	462.86±21.25 ^a	137.58±7.14 ^a	315.48±1.06 ^a	9.79±0.29 ^a	0.209±0.004 ^a

Data are expressed as mean ± SEM. The values with different letters indicate significant differences at $p<0.05$.

② 열처리에 따른 결과

- 실험군간의 유의미한 차이는 나타나지 않았음(표 33).

③ 단백질 함량에 따른 결과

- 단백질 3.3% 및 5.5% 함량별 실험군 비교 결과, 5.5% 8:2군이 3.3%, 8:2군에 비해 체중이 유의적으로($p < 0.05$) 높게 나타났음(표 33).

(2) 칼슘 흡수 측정 결과

① Casein 및 whey protein의 비율에 따른 결과

- 칼슘의 생체 이용률은 칼슘 흡수율과 골밀도(bone mineral density, BMD)를 통해 확인할 수 있으며, 칼슘의 흡수정도는 골밀도를 지표로 간접적인 확인이 가능함. 실험군간 유의적인 차이는 나타나지 않으나 칼슘흡수정도를 나타내는 골밀도(bone mineral density, BMD)는 5:5 < 6:4 < 8:2 순서로 나타났으며, whey protein에 비해 casein 비율이 높은 실험군일수록 높은 경향을 보임(표 33). 이는 casein 입자에 칼슘이온이 결합된 상태로 존재하여, casein 비율이 whey protein에 비해 상대적으로 높을수록 골밀도가 증가한 것으로 사료됨.

② 열처리에 따른 결과

- BMD에 대한 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 MF-HTST(0.210 g/cm³)군은 MF-UHT(0.203 g/cm³)군에 비해 높은 값을 보였음(표 33).

③ 단백질 함량에 따른 결과

- 칼슘흡수정도를 나타내는 골밀도는 유의적이지는 않으나 5.5% 8:2군(0.210 g/cm³)이 3.3%, 8:2(0.205 g/cm³)군에 비해 미세한 차이로 높은 값을 나타냈음(표 33).

2-3. 3차년도 세부 연구목표 및 수행 내용

[주관기관 : 매일유업(주)]

I. 세부 연구목표

1. 유청단백질 분리 공정 설정
2. Clear type 유청단백질 음료의 시제품 제조
3. 시제품의 관능평가 및 품질관리 지표 설정

II. 연구개발 수행내용

1. 유청단백질 분리 공정 설정

1) Filtration 설비를 활용한 유청단백질 분리

- Filtration Pilot 설비를 활용하여 정밀여과(Microfiltration)과 한외여과(Ultrafiltration) 및 정용여과(Diafiltration) 공정을 적용하는 실험 진행
- 유청 단백질의 분리는 일반적으로 알려져 있는 우유 단백질의 성분들의 입자크기를 참고하여 정밀여과, 한외여과를 사용하였으며, 유청단백질의 순도를 높이기 위하여 정용여과를 적용한 실험을 진행 함.
- 유청단백질 분리에 사용한 Filtration 설비의 규격은 다음과 같음.
 - 설비 크기 : Length = 2.5 m, Width = 1.3 m, Height = 2 m
 - Feed flow : 100 ~ 200L/hr
 - 운전 압력: inlet pressure 0.5 ~ 0.7 bar/outlet pressure 1.0 ~ 1.7 bar
 - Fiter의 규격은 아래 표 34와 같음.

표 34. 여과공정에 사용한 Filter 규격

Filtration	Manufacturer	Pore size (μm)	Membrane type
Microfiltration	Synder Filtration	0.1	L-piral-wound membrane
Ultratfiltration	Alfa Laval	0.01	
Diafiltration			

- 유청단백질 분리는 정밀여과 농축도(CF 4, 유량 Retentate : Permeate = 1:3) 설정하여 카제인과 유청을 분리하였고, 필터를 통과하여 여과되어 나오는 permeate를 샘플링 하였음
- 유청단백질의 농축 및 순도 향상을 위해 농축도(CF 5, 유량 Retentate : Permeate = 1:4)를 설정하여 한외여과 진행하였으며, 필터를 통과하지 못하고 농축되는 Retentate를 샘플링 하였음.

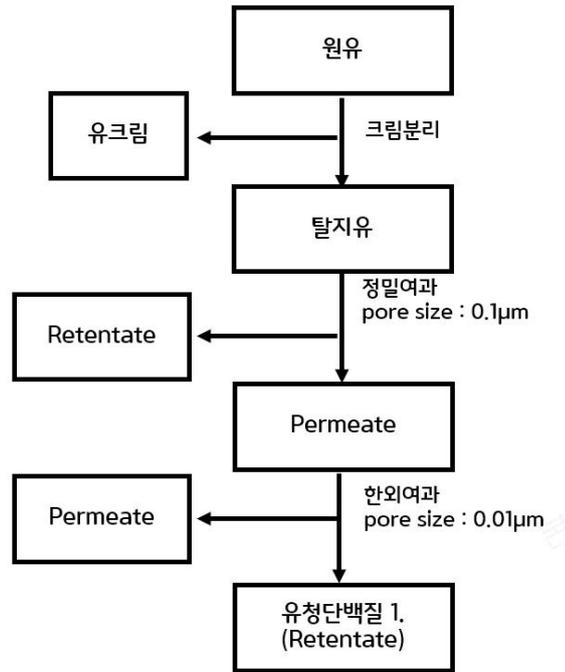


그림 64. 유청단백질 시료 제조 공정 모식도

- 한외여과하여 얻어낸 Retentate에는 유청단백질 이외에도 소량의 카세인과 당류가 혼합되어있으며 탁한 색택을 갖는 특성을 보임(표 35)

표 35. 한외여과 유청단백질 규격

Brix (°)	TS (%)	pH	Protein (%)	Casein (%)	Whey protein (%)	Sugars (%)	Fat (%)
9.95	9.46	6.84	2.91	0.15	2.76	5.7	0

2) 정용여과를 활용한 고순도 유청단백질 제조

- 유청단백질의 순도를 높이기 위해 정용여과 공정을 적용하여 한외여과를 통한 유청단백질분리 공정이후 추가적으로 RO수(Reverse osmosis water)를 투입하며 순환 시키는 공정을 추가하였음(그림 65).
- Brix 10 수준의 한외여과 Retentate를 Brix 3 수준의 Retentate가 얻어질 때까지 RO수와 정용여과 실시하였으며 정용여과 실시 후 유청단백질은 당류가 제거되어 정용여과 실시 전 5~6% 수준에서 0.2% 수준으로 대부분 제거되었으며 일부 잔존하던 카세인도 제거효과도 확인되었음(표 36)
- 성상은 한외여과 Retentate 대비 탁도의 감소가 육안으로 확인되었음(그림 66)
- 정용여과하여 순도를 높인 유청단백질 원료는 추후 실험에서 음료 제조 목적으로 사용하고 자 하였으며, 동결건조하여 성분 규격을 분석하였음(표 37)

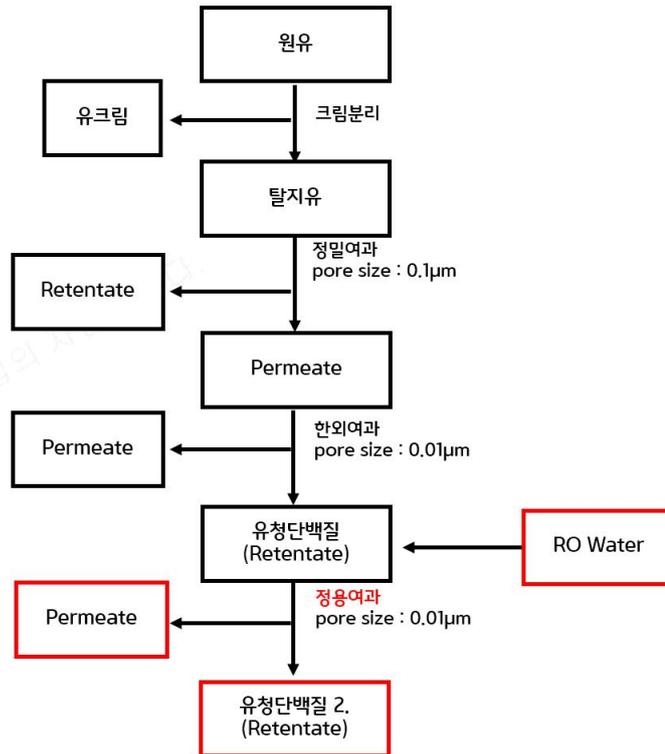


그림 65. 정용여과를 적용하여 순도를 높인 유청단백질 시료 제조 공정 모식도

표 36. 정용여과를 적용하여 순도를 높인 유청단백질 시료의 규격

Brix (°)	TS (%)	pH	Protein (%)	Casein (%)	Whey protein (%)	Sugars (%)	Fat (%)
3.92	3.08	7.02	2.83	0	2.83	0.2	0



그림 66. 한외여과 및 정용여과 적용 유청단백질 용액의 정상 (좌)정용여과 유청단백질, (우) 한외여과 유청단백질

표 37. 동결 건조 유청단백질 영양성분 분석 결과

영양성분	함량(%)	분석방법
탄수화물	0.41	식품공전일반성분시험법
당류	0.39	식품공전기기분석법
지방	0.01	식품공전 식품별규격 확인시험법
단백질	2.89	식품공전일반성분시험법
수분	96.50	식품공전상압가열건조법
회분	0.19	식품공전일반성분시험법

2. Clear type 유청단백질 음료의 시제품 제조

1) 유청단백질의 안정화를 위한 공정 검토

- 일반적인 유청단백질의 변성은 70℃ 열처리 온도 조건에서 β-Lactoglobulin의 구조 변경 및 응집에 의해 발생하는 것으로 알려져 있음.
- 제품화에 있어서 필요한 열처리 조건은 일반적으로 130℃ 이상의 고온에서 순간 살균을 하기 때문에 살균 시, 유청단백질의 안정화는 반드시 고려되어야 함.
- 유청단백질은 열과 pH 조건에 따른 안정성에 대해 다양한 연구가 보고되고 있으며 유청단백질의 변성을 제어하기 위한 다양한 연구가 이루어지고 있음.
- 제 1협동 기관인 국민대에서 실험 진행한 유청단백질의 열안정성 결과를 참고하였으며, 그 결과 pH를 산성 조건으로 설정하는 것이 단백질 변성 및 성상 변화에 효과적인 것으로 확인되어 이를 제품 개발 공정 및 제품에 적용하고자 하였음.

2) Clear 타입 유청단백음료의 제조

- 유청단백음료 제조에 있어서는 산성 pH일 때 열처리에 안정한 것으로 확인 되었으나, 음료는 pH에 따라 산미 등의 관능 변화가 발생하며 이로 인해 제품 관능에 영향을 주기 때문에 pH에 따른 관능 영향을 확인하기 위하여 중성 pH(pH 6.5~7.0), 산성 pH(pH 3.0~3.5)의 시료를 제조하여 풍미 및 관능 선호도를 확인하고자 하였음.

(1) 중성 pH 유청단백음료

- 유청단백음료는 단백질 함량 3%를 함유하는 투명한 성상의 제품으로 개발을 검토 하였으며, 이를 위해 중성 pH에서도 내열성을 가진 유청단백질(Arla Foods Ingredients, 분리유청단백 Lacprodan ISO.Water)을 사용하여 음료 시료를 제조하였음.
- 제조방법은 배합비율에 맞게 원료 계량 후, 정제수에 유청단백분말, 설탕, 수크랄로스, 식염을 사용하였고 향료를 첨가하여 조유를 완료하였음(표 38, 39)
- 조유액은 50℃ 온도로 예열한 후, 균질압 150 bar(1st 100bar, 2nd 50bar)에서 균질 및 140℃에서 3~5초간 살균 후 냉각하였으며 이때, UHT pilot 설비를 사용하여 Tubular 열교환기를 이용한 살균 및 냉각을 진행하였음(그림 67)
- 제품 충전은 500mL PET 용기에 진행함(PET 용기는 열수로 세척 및 UV 살균 후 사용함)

표 38. 중성 pH 유청단백음료 리치머스캐트향 배합비율

원료명	배합비(%)	비고
분리유청단백	3.0	Lacprodan ISO.Water
정백당	3.2	
수크랄로스	0.0068	
식염	0.08	
합성향료	0.1	2종(리치향, 머스캐트향)
정제수	93.6132	
합계	100	

표 39. 중성 pH 유청단백음료 레몬라임향 배합비율

원료명	배합비 (%)	비고
분리유청단백	3.0	Lacprodan ISO.Water
정백당	3.2	
수크랄로스	0.0068	
식염	0.08	
합성향료	0.15	3종(레몬향, 라임향, 꿀향)
정제수	93.5632	
합계	100	



그림 67. UHT Pilot 설비

(2) 산성 pH 유청단백음료

- 단백질음료는 단백질 함량 3%를 함유하는 투명한 성상의 제품으로 개발 하고자 하였으며 열안정성을 부여하기 위해 pH를 3으로 설정한 음료를 제조하였음.
- 산미를 보다 자연스럽게 하고자 과일 플레이버(시트러스 계열)로 제품 개발 검토하였으며 원료는 동결 건조한 유청단백질과 정제수, 산도조절제, 감미료(설탕, 수크랄로스), 과즙농축액, 향료를 사용하였음(표 40, 41).

표 40. 유청단백음료 자몽 배합비율

원료명	배합비 (%)	비고
유청단백질	3.5	UF whey 동결농축
정백당	3.2	
레드자몽농축액	0.14	65 Brix, 스페인산
수크랄로스	0.0068	
구연산	0.21	
사과산	0.21	
합성향료	0.088	2종(자몽향)
정제수	92.6252	
합계	100	

표 41. 유청단백음료 레몬라임 배합비율

원료명	배합비 (%)	비고
유청단백질	3.5	UF whey 동결농축
정백당	3.2	
레몬농축액	0.14	50 Brix, 스페인산
수크랄로스	0.0068	
구연산	0.21	
사과산	0.18	
천연향료	0.005	라임추출물
합성향료	0.13	2종(레몬향, 라임향)
정제수	92.6265	
합계	100	

- 제조 방법은 일부 정제수에 동결건조한 유청단백 원료를 배합비율에 맞게 계량 후, 용해시켜 용액 1을 제조하였고, 남은 일부 정제수에 산미료(구연산, 구연산나트륨), 과즙농축액, 산도조절제, 감미료를 배합비율에 맞게 계량 용해하여 용액 2를 제조하였음.
- 용액 2번에 용액 1번을 첨가 혼합하여 용액 3번을 제조하였고, 용액 3번에 향료를 배합비율에 맞게 첨가하여 조유를 완료하였음.
- 조유액은 50℃ 온도로 예열한 후, 균질압 150 bar(1st 100bar, 2nd 50bar)에서 균질 및 140℃에서 3~5초간 살균 후 냉각하여 500 mL PET 용기에 충전함(이 때, PET 용기는 열수로 세척 및 UV 살균 후 사용)

3. Clear type 유청단백질 음료의 관능평가

- 관능검사는 제품개발과 관련하여 유청단백음료 자체의 기호성을 확인함과 동시에 플레이버 선정에 참고하는 것을 목적으로 관능검사를 진행하였음.
- 관능검사는 매일유업 중앙연구소 소속의 연구원 20~50대 인원 30명을 대상으로 진행하였으며 9점 척도의 선호도 검사를 진행하였음.
- 세부속성으로는 외관, 플레이버 향미, 단맛, 농도, 깔끔함 속성의 기호 및 강도를 평가하였

으며 이미·이취에 대한 특성도 분석하였음.

(1) 중성 pH 유청단백음료

- 중성 pH 유청단백음료는 2개 플레이버(레몬라임, 리치머스켓) 관능검사 진행하였으며 종합 기호도 9점을 척도로 검사한 결과 리치머스켓이 5.9, 레몬라임이 5.7 점으로 확인되었음 (그림 68).

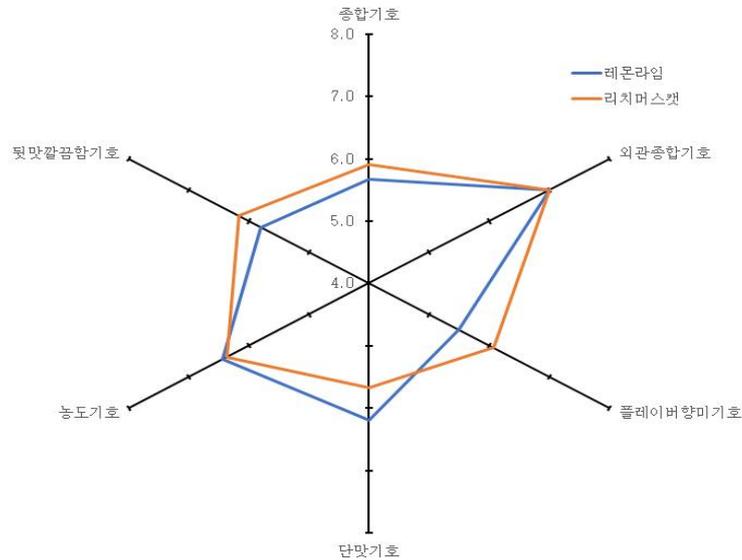


그림 68. 중성 pH 유청단백음료 관능 선호도 검사 결과

- 외관은 투명한 성상의 액체에 대한 기호성이 높게 나타났으며 농도와 뒷맛 깔끔한 요인에서는 중간 보다는 깔끔한 음료로 평가되었음(표 42; 농도 기호, 뒷맛깔끔함 기호 >5점).
- 레몬라임 플레이버에서는 향미 강도가 높은 것으로 평가됐으며, 강한 향미는 인위적인 향미로 느껴 기호성은 떨어지는 것으로 나타났음.
- 단맛 강도는 희망 강도 대비 높게 평가된 것으로 보아, 단맛을 소폭 줄이는 배합비의 검토가 필요할 것으로 사료됨
- 유청단백음료에서 관능에 부정적 영향을 주는 요인으로는 이미·이취가 있으며 열처리에 따른 황화합물 생성이 풍미 저하에 영향을 주기 때문에 배합비 설정 시, 플레이버 선정 및 강도 설정이 중요함.

표 42. 중성 pH 유청단백음료 관능 선호도 검사 결과

	종합 기호	외관 종합 기호	향미 기호	향미 강도	단맛 기호	단맛 강도	단맛 희망 강도	이미 이취 강도	농도 기호	농도 강도	뒷맛 깔끔함 기호	뒷맛 깔끔함 강도
레몬 라임	5.7	7.0	5.5	6.0	6.2	5.5	4.7	4.2	6.4	4.6	5.8	5.7
리치 머스 켓	5.9	7.0	6.1	5.6	5.7	5.3	4.7	4.3	6.4	4.7	6.2	5.7

(2) 산성 pH 유청단백음료

- 산성 pH 유청단백음료는 2개 플레이버(자몽, 레몬라임) 관능검사 진행하였으며 종합기호도 9점 척도로 검사한 결과 자몽이 6.5, 레몬라임이 6.4 점으로 확인되었음(그림 69).

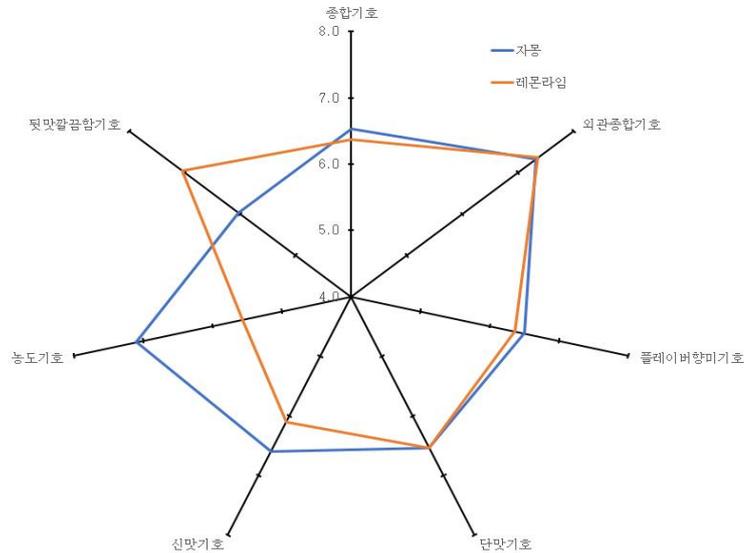


그림 69. 산성 pH 유청단백음료 관능 선호도 검사 결과

- 산성 pH 유청단백음료는 2개 플레이버(자몽, 레몬라임) 관능검사 진행하였으며 종합기호도 9점을 척도로 검사한 결과 자몽이 6.5, 레몬라임이 6.4 점으로 확인되었음.
- 산성 pH 설정 시, 후미에 짝찌름한 관능 변화가 발생하며 이와 어울릴 수 있는 자몽, 레몬, 라임을 사용한 플레이버 및 배합비를 설정하였음. 그 중 자몽 본연의 관능 특징인 산미, 고미가 유청단백질의 이미·이취를 마스킹하는 역할을 하여 기호성이 높게 나타난 것으로 사료됨.
- 산성 pH 음료는 중성 pH 음료 대비 관능성이 향상되는 것으로 확인되며 pH 감소에 따른 산미 발생이 기호성에 긍정적인 영향을 주며 중성 pH 유청단백음료와 감미료 배합량이 동일함에도 단맛에서 긍정적으로 나타남(표 43)

표 43. 산성 pH 유청단백음료 관능 선호 검사 결과

	종합 기호	외관 종합 기호	향미 기호	향미 강도	단맛 기호	단맛 강도	단맛 희망 강도	이미 이취 강도	농도 기호	농도 강도	뒷맛 깔끔함 기호	뒷맛 깔끔함 강도	후미 텃텃함 강도
자몽	6.5	7.3	6.5	6.5	6.5	5.5	6.6	5.1	4.2	7.1	3.8	6.0	5.6
레몬 라임	6.4	7.4	6.4	5.9	6.5	5.4	6.1	5.1	4.3	7.0	3.8	5.6	5.4

- 유청단백질의 살균(또는 멸균) 시, 단백질의 열안정화를 위해선 산성 pH의 적용이 불가피하며 관능검사 결과에서도 중성 pH 대비 산성 pH에서 기호성이 향상되는 것으로 보아 제품 품질 안정성 및 관능을 위해 산성 pH 조건의 적용이 적합할 것으로 예상됨.

(3) 제품화

- 관능 및 제조 공정상 적합한 산성 pH로 음료 제조하고자 하였으며, 단백질량 15g/500 mL을 제공하는 제품으로 개발 검토하였음(그림 70).
- 제품의 특징으로는 단백질량 뿐만 아니라 무유당, 무지방 조건에 충족되는 제품임.
- 실제 제품 생산 시, 동결건조를 통한 원료화가 아닌 정용여과를 통해 분리한 Retentate(유청단백질 용액)를 직접 사용한 배합비, 공정 설정 및 생산이 가능할 것으로 예상됨.
- 시제품에서는 미량의 천연색소를 첨가하는 것을 검토하였으며, 실제 플레이버가 연상되는 색택을 부여함으로 기호성이 증가할 것이라 사료됨.



그림 70. 유청단백음료 시제품

4. Clear type 유청단백질 음료의 이화학 평가 및 품질관리 지표설정

- 시제품의 이화학적 규격(pH, 산도, 비중, Brix)을 측정하였으며 샘플 보존 중 이화학 규격 및 미생물 변화를 확인하고 품질 변화가 나타나는 시점까지를 유통기한으로 설정하였음.
- 제품의 보존테스트는 25°C 항온에서 60일간 보존하며 10일 간격으로 이화학검사 및 미생물 검사를 진행하였음(그림 71).
- 보존 기간 동안 이화학, 미생물학적 변화는 없는 것으로 확인 되었기에, 품질 관리 지표의 설정은 최종 관능으로 설정해야 할 것으로 사료됨.
- 시제품이 아닌 실제 상용화 제품 생산 시에는 충전설비의 조건에 따라 유통기한 설정에 큰 차이가 나타날 것으로 사료되며, 실제 생산되고 있는 유사 제품들에서는 6개월에서 1년까지의 유통기한 설정하고 있기에 이와 유사한 수준으로 설정 가능할 것으로 예상됨.

1) 이화학적 평가

- 시제품으로 생산한 유청단백음료 2종의 이화학 규격에 큰 차이는 없음(표 44)
- Clear type 유청단백질 음료의 이화학적 규격은 항온(25°C) 60일 보존 동안 이화학 규격의 변화가 나타나지 않았음.



그림 71. 향은 보존 중인 유청단백음료 시제품

표 44. 유청단백음료 이화학 검사 결과

	이화학 규격			
	Brix	비중(15℃)	pH	산도
레몬라임	7.24	1.021	3.19	0.55
자몽	7.31	1.021	3.32	0.60

(2) 미생물학적 평가

- 미생물 검사는 3M 건조필름배지를 이용하여 검사 진행하였으며, 시료의 규격은 식품공전에 서 제시한 세균수 (n=5, c=2, m=10,000, M=50,000) 및 대장균군 (n=5, c=2, m=0, M=10) 기 준으로 측정하였음.
- 시제품 생산에서 멸균 수준의 열처리를 진행하였으나, 제품의 충전은 무균적이 아니었음 에도 미생물은 불검출 되었으며, 이는 낮은 pH의 특성이 허들로 작용하여 미생물의 생육이 어려웠을 것으로 사료됨(표 45).
- 열처리 및 낮은 pH 조건으로 세균에 의한 변질 영향은 낮으며, 곰팡이에 의한 품질 저하 가능성은 존재하나 보존 60일 동안 곰팡이로 인한 포자 형성은 육안으로 확인되지 않았음.

표 45. 유청단백음료 미생물 검사 결과

시료명	미생물 규격		
	일반세균(cfu/mL)	대장균(cfu/mL)	
레몬라임	1	불검출	불검출
	2	불검출	불검출
	3	불검출	불검출
	4	불검출	불검출
	5	불검출	불검출
자몽	1	불검출	불검출
	2	불검출	불검출
	3	불검출	불검출
	4	불검출	불검출
	5	불검출	불검출

<3차년도>

[제1 협동기관 : 국민대학교]

I. 세부 연구목표

- 농축미변성단백질 용액(주관기관 제공)의 단백질 농도, 살균조건, pH에 따른 단백질 응집 변화 분석(외관관찰, 혼탁도 분석)
- 단백질 refolding 향상소재(아미노산류) 및 응집억제 소재(당알코올류)의 단백질 응집 억제 효과 분석
- 단백질 상호작용 억제기전 분석

II. 연구개발 수행내용

1. 연구 방법

1) 정밀여과 공법으로 제조된 농축미변성단백질 분석

(1) 시료

- 저온(약 10°C)에서 정밀여과(microfiltration, MF) 및 diafiltration을 거쳐 제조한 분리유청단백질(WPI)를 주관기관으로부터 제공 받아 사용하였음. 제조한 pilot 시료의 특성을 비교하기 위하여 현재 시판 중인 상업용 WPI 중 다른 특성을 보유한 시료를 확보하여 함께 분석에 사용하였음. 각 시료의 특성, 단백질 함량 및 약어는 표 46에 제시하였음.

표 46. 연구에 사용한 분리유청단백질(WPI)

Sample	Manufacturer	Characteristics	Protein (%)	pH ¹	Abbreviation
PRONATIV® 95 LOW LACTOSE	PRONATIV	Normal WPI	89	6.2	NOW
Lacprodan® ISO.Water	Arla food	Heat stable at neutral pH	88	6.9	NSW
PRObev™ 90	MILK SPECIALTIES	Heat stable at acid pH	84.6	2.9	ASW
Pilot WPI	Maeil dairies Co.	Native WPI	88.6	6.8	MFW

pH¹ at 3% (w/v).

(2) 무기질 분석

- 시료의 무기질(인, 칼슘, 마그네슘, 나트륨)함량은 유도결합플라즈마분광기(ICP-OES; 5100 synchronous Vertical Dual View spectrometer, Agilent, Cheadle, UK)를 이용하여 측정하였음. 시료를 1%의 농도로 제조하고 질산과 과산화수소를 첨가한 후 120°C에서 4시

간 동안 가열 분해 후 분석하였음. ICP-OES 분석 시 측정 파장은 인 177.434 nm, 칼슘 396.847 nm, 마그네슘 279.553, nm 나트륨은 589.592 nm를 사용하였음.

(3) 입자크기 분포 및 제타전위(zeta-potential) 분석

- 시료를 0.5%의 농도로 용해시켜 입자크기 분포 및 제타전위를 각각 Zetasizer와 Nano ZS(Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK)를 이용하여 측정하였음.

(4) 시차 주사 열량계(Differential scanning calorimeter) 분석

- 각 시료의 열적 특성은 시차 주사 열량계(DSC 200 F3 Maia; NETZSCH, Selb, Germany)를 통하여 분석하였음. 시료(약 1.4 mg)를 알루미늄 팬으로 옮기고 밀봉한 후 5°C/분의 가열 속도로 10~150°C의 범위에서 스캔하였음. 기기는 인덱스 표준(fusion temperature = 156.61°C 및 fusion enthalpy = 28.67 J/g)을 사용하여 보정하였으며 시료의 열량 변성 곡선 및 열량 측정 엔탈피는 기기에 장착된 NETZSCH Proteus Thermal Analysis Version 5.2.1 소프트웨어를 이용하여 산출되었음.

2) 시료의 열에 의한 단백질 응집 변화 분석

(1) 단백질 용액 제조

- WPI 용액의 농도는 주관기관의 결정에 따라 3%로 고정하였음. 각 WPI는 24시간 수화시켜 사용하였으며 원심분리(3,000 × g, 4°C, 30분)하여 얻어진 상정액을 회수하여 사용하였음. 시료의 총 단백질 함량은 원심분리 후 3%로 보정하였으며, 원심분리 과정에서는 초기 단백질의 90% 이상이 회수되었음.

(2) 열처리

- 시료의 열처리는 water bath(SB-651, EYELA, Japan)를 사용하였음. 열처리의 강도는 상업용 살균 방법인 LTLT(Low temperature long time), HTST(High temperature short time)와 UHT(Ultrahigh temperature pasteurization)의 방법을 고려하여 3가지 열처리 방식을 적용하여 각각 60°C, 75°C, 90°C에서 30분 가열조건으로 실시하였음. 열처리 직후 시료는 얼음물을 이용하여 신속하게 냉각하였음.

(3) 혼탁도

- 시료의 혼탁도는 탁도계(TB 250, Lovibond, UK)를 이용하여 측정하였으며 혼탁도의 보편적 표현 단위인 NTU(Nephelometry Turbidity Unit)로 표현하였음. 시료의 혼탁도가 탁도계의 측정 상한 범위(<1100 NTU)를 초과하는 경우에는 시료를 증류수에 일정비율로 희석하여 측정한 후 희석농도를 곱하여 나타냈음.

(4) 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)

- 시료(3%, w/v)를 syringe filter(0.45 μm, PVDF, Millipore Corporation, Bedford, MA)를 사용하여 여과한 후 Sephacryl S-500 resin(GE Healthcare Bioscience, Uppsala, Sweden)

으로 충전된 컬럼(EC015/750, YMC)에 주입하였음. 다중 분취 액체 크로마토그래피 시스템(LC-Forte/R, YMC, Kyoto, Japan)을 이용하여 sodium phosphate buffer(50 mM, pH 7.0)로 시료를 용출하였으며(1 ml/min) YUV-3400 검출기(YMC, Kyoto, Japan)를 사용하여 214 nm에서 피크를 검출하였음.

3) 단백질 응집억제 효과분석

(1) 당알코올 및 아미노산의 첨가효과

- 당알코올로는 maltitol, erythritol(JKNUTRA, Korea), solbitol(Bread Garden, Korea)을 사용하였으며, 아미노산으로는 aspartic acid, glutamic acid, lysine, arginine와 tyrosine을 첨가한 후 가열하여 탁도에 미치는 효과를 측정하였음.

(2) 초음파 처리

- 단백질 응집에 대한 초음파의 처리 효과는 Ultrasonic probe(Model VCX 750, Sonics & Materials Inc., Newtown, CT, USA)를 사용하여 확인하였음. 시료의 열처리 전과 후에 각각 5, 15분 동안 초음파 처리를 진행하고 초음파 처리가 입자크기 분포 변화에 미치는 효과를 particle size analyzer(Horiba LA-960 Laser Scattering Particle Size and Distribution Analyzer, Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였음.

(3) 무기질 및 casein 제거효과

- 무기질 및 casein 제거는 pH의 조정 및 투석을 통하여 이루어졌음. 시료를 증류수에 10% (w/v)의 농도로 분산시킨 후 4°C의 조건에서 밤새 수화시켰음. 시료는 35% HCl을 사용하여 pH 2로 조정한 후 0.2M HCl 용액에서 상온, 6시간의 조건으로 Dialysis tubing cellulose membrane(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 투석하였음. 이후 증류수에서 4°C, 3일의 조건으로 투석을 진행하였음. 투석이 완료된 시료를 수집하여 10M NaOH를 이용하여 pH 7로 조정한 후 동결건조를 진행하였음. Casein을 추가로 제거하는 시료의 경우 시료를 분산시킨 후 pH 4.6으로 조정하여 수화를 진행하였으며 이후 원심분리(24,000 × g, 4°C, 1시간)하여 상정액을 수집하여 동일한 투석과정을 적용하였음. 이후 진술한 열처리 과정을 거쳐 탁도에 미치는 효과를 측정하였음.

4) 단백질 상호작용 기전 분석

(1) 표면 소수성 측정

- 시료의 표면 소수성은 소수성 dye인 bromophenol blue(BPB) binding method(Feng et al., 2015)을 일부 수정하여 사용하였음. 시료(5 mg/mL, 1 mL)를 상온에서 BPB(200 µL)와 혼합하여 10분간 방치한 후 4,000 x g에서 15분 동안 원심분리하였음. 선택적으로 결합된 BPB의 양은 아래의 식에 의하여 구하였으며 흡광도는 microplate reader(Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 595 nm에서 측정하였음.

$$\text{Bound BPB} = \frac{200 (\mu\text{g}) \times (A_{595} \text{ Control} - A_{595} \text{ Sample})}{A_{595} \text{ Control}}$$

(2) Thiol group 측정

- Total 및 free thiol group은 Ellman 시약(5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid(DTNB))을 이용하여 pH 3과 7 조건에서 측정하였음(Feng et al., 2015). Free thiol group의 경우 시료(3%, w/v)를 sodium phosphate buffer(100 mM, pH 7.0)에 DTNB 용액(4 mg/mL)을 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 측정하였으며 total thiol group의 측정 시에는 8 M urea가 포함된 sodium phosphate buffer 사용하였음. 시약의 첨가 후 나타나는 발색 강도는 microplate reader를 이용하여 412 nm에서 측정하였음. Thiol group의 함량은 cysteine을 표준물질로 하여 작성된 표준 곡선을 이용하여 계산하였음.

5) *In vitro* 단백질 소화율

- 시료 용액의 *in vitro* 단백질 소화율은 Feng et al. (2015)의 방법을 일부 수정하여 측정하였음. 시료(0.75 mg/mL)를 glycine buffer(33 mM, pH 1.8)에 분산시키고 pepsin(40 U/mg protein)의 존재 하에 37°C에서 90분 동안 위장 조건에서 단백질 분해를 실시하였으며 일정 간격으로 trichloroacetic acid(20%, w/v)을 첨가하여 소화를 중지하고 1시간 동안 얼음에 방치하였음. 이후 시료를 4,000 x g, 4°C 조건에서 15분간 원심 분리한 후 상정액의 흡광도를 분광광도계(Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)를 사용하여 280 nm에서 측정하였음. 소장 소화는 위 소화 후 10 M NaOH를 사용하여 pH를 8로 조정시켜 펩신 분해를 중지하고 trypsin(6.55 U/mg protein)과 α -chymotrypsin(0.33 U/mg protein)을 사용하여 37°C에서 4시간 동안 진행하였음. 시료의 소화 곡선은 Gatellier and Sante-Lhoutellier(2009)의 수학적 모델을 사용하여 구하였음.

6) 통계분석

- 데이터는 평균 \pm 표준 편차로 표시하였으며 분석 실험은 3회 반복 측정하였음. 결과의 통계 분석은 SPSS 통계 소프트웨어 28(SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였으며, 일원 분산 분석에서 결과가 유의한 차이($p < 0.05$)를 나타내면 Duncan의 다중 비교 검정을 수행하여 그룹 간의 통계적 유의성을 확인하였음.

2. 연구 결과

1) 정밀여과 공법으로 제조된 시료의 이화학적 특성 분석

(1) 무기질 함량

- 우유의 무기질은 열 안정성에 큰 영향을 미치며 유제품의 품질과 안정성에 중요한 역할을 담당함. 따라서 ICP-OES를 이용하여 다른 열안정성 특성을 가진 상업용 WPI 시료와 본 연구에서 제조된 pilot WPI 시료의 무기질 조성을 비교분석하였음(표 47).
- 산과 중성 pH 영역에서 각각 높은 안정성을 가진 것으로 표시된 ASW와 NSW는 NOW와 MFW 시료와 비교하여 매우 낮은 칼슘 함량과 상대적으로 높은 인 함량을 나타냈음. 또한, NSW는 낮은 칼슘 함량과 함께 유의적으로 높은 나트륨 함량이 관찰되었으며 이러한 무기질 성분 profile 변화는 WPI소재의 특징적 열안정성과 높은 상관 관계를 가지는 것으로 판단 됨.
- 무기질 중 2가의 양이온인 칼슘은 β -lactoglobulin(β -LG)의 음전하에 의한 분자간 반발을 줄

- 임으로써 가열에 의한 유청단백질 응집을 촉진하는 것으로 보고됨(Simons et al., 2002).
- 한편 인의 첨가는 이용 가능한 칼슘과 결합하여 Ca^{2+} 로 인한 β -LG 응집체의 형성을 효과적으로 감소시킬 수 있다고 보고됨(Blanpain-Avet et al., 2020).
 - 나트륨의 경우 정전기적 반발을 제한하여 단백질 수화를 감소시키고 단백질 응집을 유도함(Vardhanabhuti and Foegeding, 2008; Hussain et al., 2012).

표 47. 유도결합플라즈마분광기로 측정된 분리유청단백질 용액의 무기질 함량

	Mineral (mg/100 g power)			
	P	Ca	Mg	Na
NOW	201	356	59	77
NSW	193	62	8	436
ASW	2,134	24	4	23
MFW	266	457	61	129

(2) 입자 크기 분포 분석

- 단백질 입자 크기는 단백질 침전과 관련이 있으므로 시료 입자 크기 분포, 평균 입자 크기 및 다분산지수(PDI)를 Zetasizer를 사용하여 분석하였음(그림 72, 표 48).
- MFW 시료의 평균 입자 크기(99 nm) 및 입자 분포는 NSW(98 nm)와 유사하게 나타난 반면 ASW는 16 nm로 유의적으로 더 작은 평균 입자 크기를 나타냈음. NOW는 가장 큰 평균 입자를 나타내었지만 입자 크기 분포를 반영하는 PDI 값은 0.33으로 다른 시료에 비해 낮게 나타나 균일한 크기의 단백질 응집체를 형성하고 있는 것으로 판단됨.

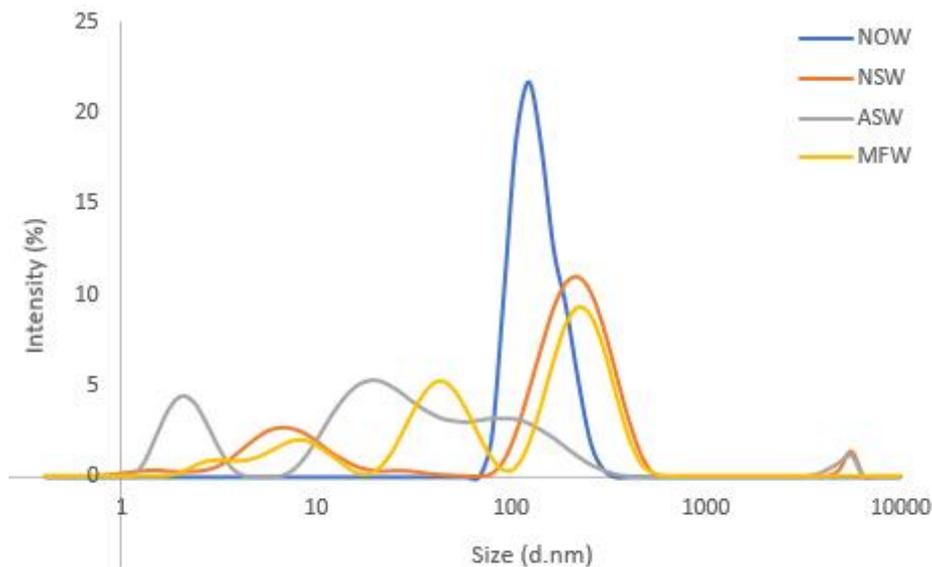


그림 72. 분리유청단백질 용액의 입자크기분포

표 48. 분리유청단백질 용액의 평균입자크기, PDI, 및 제타전위.

	Mean particle size (nm)	PDI ¹	Zeta potential (mV)
NOW	231.9	0.33	-14.3
NSW	98.25	0.68	-24.7
ASW	16.07	0.64	13.9
MFW	98.51	0.49	-12.5

PDI¹: polydispersity index

- Carter and Drake(2021)는 상업용 WPI의 입자 크기가 30~84 nm 범위에 있다고 보고하였음. 주요 유청 단백질인 β -LG은 중성 pH 조건에서 단량체 또는 이량체의 형태로 존재하며, 응집되지 않은 상태의 β -LG의 입자 크기는 약 5-10 nm 정도로 알려져 있음(Ryan et al., 2012).
- 상대적으로 높은 PDI 값을 갖는 MFW의 평균 입자 크기는 MF 과정 동안 비공유결합에 의한 단백질 응집체 형성에 기인할 수 있음(Carter et al., 2021).
- 특정 용도 특성을 가진 상업용 WPI의 제조공정을 알 수 없으므로 입자 크기 분포의 차이에 대한 정확한 이유는 알 수 없으나 무기질 조성의 조정 및 단백질 응집체 형성이 열 안정성에 미치는 영향은 향후 분석이 필요할 것으로 판단됨.

(3) 제타 전위(zeta-potential)

- 제타 전위는 주어진 pH 및 이온 환경에서 평균 단백질 전하를 나타내며 정전기적 상호작용에 대한 단백질의 반응성을 의미함(Carter and Drake, 2021).
- 용해 시 산성 pH를 나타내는 ASW 용액(3%, w/v)은 13.9 mv의 양의 제타 전위 값을 보인 반면, 중성 pH를 나타내는 다른 3개의 WPI시료는 -12.5 ~ -24.7mV의 제타 전위 값을 나타냈음. 일반적으로 농축유청단백질 용액의 제타 전위는 약 -24 mV로 보고되어 (Laiho et al , 2015) 본 연구와 유사한 값을 보였음.
- WPI의 증가된 제타 전위는 열에 의해 유도된 단백질 응집체의 구조 형성을 제어하여 열 안정성을 개선시킬 수 있으므로 유청 단백질 음료의 바람직한 외관과 저장 안정성에 도움을 줄 수 있음(Ryan and Foegeding, 2015).

(4) 시차 주사 열량계(DSC)에 의한 WPI의 열적특성 분석

- DSC는 고분자 시료의 열적 특성을 평가하기 위하여 사용됨. DSC 분석을 통해 얻어진 흡열 열 그래프는 변성 온도와 엔탈피 값 등의 열량 변화의 정량적인 정보를 얻을 수 있으며 그 결과는 그림 73과 표 49에 나타냈음.

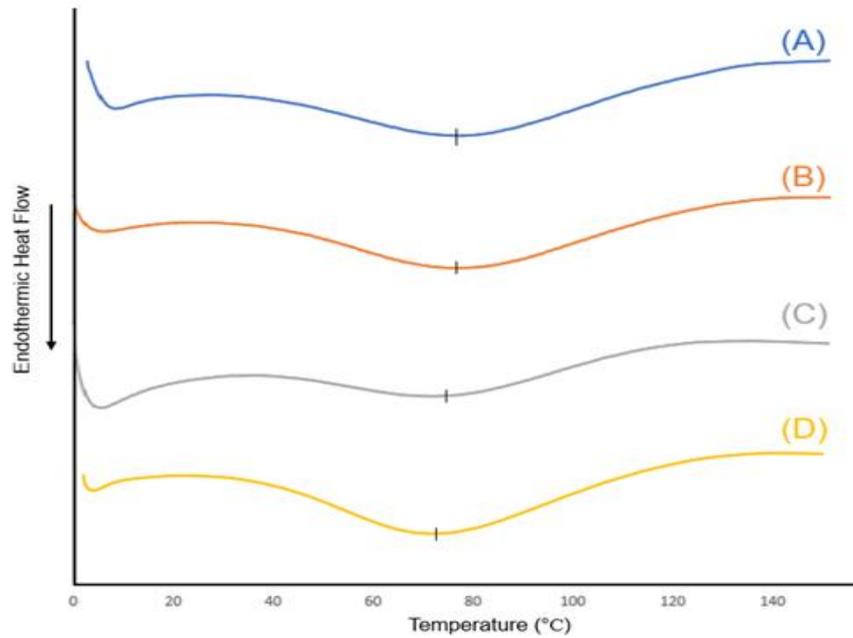


그림 73. 분리유청단백질 용액의 시차주사열량측정
(A) NOW, (B) NSW, (C) ASW, and (D) MFW

표 49. 분리유청단백질 용액의 변성온도 및 엔탈피

	Temperature (°C)		Td (°C)	ΔH (J/g)
	Onset	Endset		
NOW	40.0	122.3	77.8	136.9
NSW	42.2	121.0	77.0	140.1
ASW	41.1	111.9	76.2	76.2
MFW	39.7	115.5	73.1	170.6

Td: denaturation temperature, ΔH: enthalpy (J/g)

- 모든 시료는 77°C 부근에서 흡열 피크를 나타냈음. 이는 WPI 단백질 조성 중 가장 높은 함량의 β-LG의 변성 온도와 일치하였음(Dissanayake and Vasiljevic, 2009, Aouzelleg and Bull, 2004).
- 시료의 변성 온도는 NOW, NSW, ASW 및 MFW가 각각 77.8°C, 77.0°C, 76.2°C 및 73.1°C로 pilot 제품인 MFW가 상대적으로 낮은 변성 온도를 나타냄으로써 다른 시료와 비교하여 상대적으로 낮은 열안정성을 보였음(표 49).
- 엔탈피의 값은 2차 구조의 함량과 상관관계가 있으며 변성되지 않은 단백질의 함량과 상관성을 나타냄(Haque et al., 2015). 시료의 엔탈피 값은 NOW, NSW, ASW 및 MFW가 각각 136.9, 140.1, 76.2 및 170.6 J/g 이었으며 미변성된 단백질의 함량이 높은 MFW 시료(pilot 제품)에서 가장 높은 것으로 확인되었음.

2) 열처리에 의한 단백질 응집 변화 분석

(1) 혼탁도

- 단백질 입자 크기가 크고 산란계수가 증가하면 탁도는 증가함. 따라서 단백질의 혼탁도는 단백질의 농도와 용해도에 따라 변화하며, 단백질 응집을 나타내는 척도로 사용될 수 있음 (Ju and Kilara, 1998).
- 일반적으로 clear type 단백질 음료는 pH 3 ~ 7에서 240 mL당 6 g의 단백질과 24 g의 설탕을 함유하는 음료로써 < 50 NTU의 탁도 기준을 만족시키는 것으로 정의되고 있음 (Etzel et al., 2004). 따라서 본 연구에서는 clear type 유청단백질 음료의 혼탁도 목표 수준을 <50 NTU로 설정하였음.

① 원심분리

- 제조된 MFW(pilot WPI)를 가열 전 원심분리를 이용하여 침전되는 단백질을 제거한 경우 현저한 혼탁도 감소효과를 나타냈으며, 이 때 원심분리로 인하여 제거되는 불용성 단백질의 함량을 BCA assay로 측정된 결과 90% 이상의 수율을 나타내었기 때문에 원심분리 단계의 적용은 열처리 이후 형성되는 혼탁도를 감소시키는 데 효과적인 것으로 나타났음(표 50)

표 50. 정밀여과로 제조된 분리유청단백질용액(3%, w/v)의 원심분리 여부에 따른 혼탁도 변화

		Nephelometry turbidity units (NTU)	
		pH 3.5	pH 4
Before heating	Without centrifugation	3,516 ± 79	4,646 ± 118
	With centrifugation	14 ± 0.03	101 ± 0.12
After heating	Without centrifugation	1,916 ± 24	18,690 ± 221
	With centrifugation	13 ± 0.6	11,482 ± 3

MFW: microfiltrated WPI (pilot product, 3%), MFW was centrifugation at $3,000 \times g$ at $4^\circ C$ for 30 min before heating ($90^\circ C$, 5 min).

② 열처리

- 시료의 여우유의 살균방법인 LTLT(Low temperature long time; $60^\circ C/30$ min), HTST(High temperature short time; $75^\circ C/30$ min) UHT(Ultrahigh temperature pasteurization; $90^\circ C/30$ min)의 열처리 강도를 모사한 조건에서 열처리에 의한 WPI 시료의 혼탁도와 외관 이미지는 다음과 같음(표 51, 그림 74)
- 살균 온도가 높아짐에 따라 혼탁도는 증가하는 경향을 나타냈으며, 제품의 특성에 제시된 바와 같이 ASW는 산성조건에서 다른 WPI보다 상대적으로 낮은 혼탁도를 나타냈음.
- HTST 수준에서는 pH 5에서 gel이 형성되었으며, UHT 조건에서는 pH 4와 5 조건에서 gel이 형성되어 혼탁도 측정이 불가능하였음.
- pH 3의 조건에서는 모든 살균 처리에서 clear type 단백질 음료의 정의를 충족시키는 것

으로 확인되었음.

표 51. 열처리 및 가열조건에 따른 분리유청단백질용액(3%, w/v)의 혼탁도 변화

Heating	Sample	Nephelometry turbidity units (NTU)		
		pH 3	pH 4	pH 5
60°C/ 30 min	NSW	7	2,001 ± 102	5,260 ± 74
	ASW	1.45	355 ± 0.3	728 ± 0.8
	MFW	4.52	826 ± 0.9	842 ± 0.4
75°C/ 30 min	NSW	14	4,010 ± 4	-
	ASW	1.74	842 ± 0.5	-
	MFW	4.38	7,386 ± 40	-
90°C/ 30 min	NSW	28	-	-
	ASW	10	-	-
	MFW	21	-	-

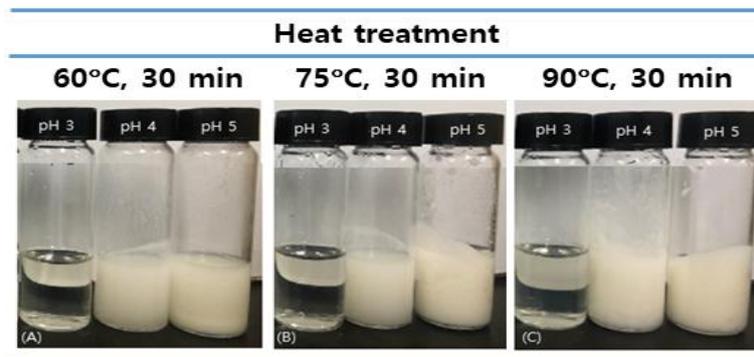


그림 74. 열처리 및 가열조건에 따른 분리유청단백질용액(3%, w/v)의 외관 변화 이미지

③ pH

- 단백질은 pH에 따라 순전하(net charge)가 변화하며 분자간의 정전기적 반발력이 달라지게 되므로 단백질의 응집에 의하여 발생하는 혼탁도에 중요한 영향을 미침.
- 보다 넓은 pH의 영역에서 WPI의 혼탁도 변화 및 외관특성을 측정한 결과는 다음과 같음 (표 52. 그림 75).
- 산성 pH 조건(pH 3)에서는 모든 시료가 투명 용액의 기준(<50 NTU)을 만족하였으나 등전점 주변의 pH(pH 4~5)에서는 과도한 응집으로 인하여 측정이 불가하였음.
- pH 7에서는 다른 시료들은 낮은 혼탁도를 나타내어 열에 안정한 형태를 나타내었으나 MFW 시료는 다른 시료보다 상대적으로 높은 혼탁도 수치를 보였음.
- MFW 시료의 혼탁도가 상대적으로 높은 이유는 명확하지 않으나, 저온(10°C)에서 실시하는

우유의 정밀여과 과정에서 용해된 β -casein과 같은 잔존 casein이 혼탁도 증가에 원인이 될 수 있음이 보고되었음(Coppola et al., 2014). 따라서 정밀여과에 사용되는 MF membrane 이나 실시 온도와 같은 조건에 대한 세심한 주의가 필요할 것으로 생각 됨.

- MFW 시료를 이용한 투명한 음료 제형을 위해서는 pH 3과 수준의 산성 조건이 바람직하나 단백질 음료의 pH가 낮아질수록 짝은맛이 비례적으로 증가하며, 기호도를 감소시키는 이유로 작용할 수 있음(Carter and Drake, 2021).
- 그러므로, 투명도를 유지하며 관능적 품질을 감소시키지 않는 pH 조건에 대한 고려가 필요할 것으로 판단 됨.

표 52. 분리유청단백질용액(3%, w/v, pH 3-7)의 90°C 30분 가열에 의한 혼탁도 변화

		Nephelometry turbidity units (NTU)				
		pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
Before heating	NOW	6 ± 0.1 ^b	3,770 ± 10 ^a	2,125 ± 5 ^b	12 ± 0.1 ^c	9 ± 0.1 ^b
	NSW	10 ± 0.1 ^a	1,371 ± 24 ^c	818 ± 8.9 ^d	9 ± 0.2 ^b	7 ± 0.1 ^b
	ASW	2 ± 0.1 ^c	807 ± 16 ^d	5,565 ± 30 ^a	3 ± 0.1 ^d	2 ± 0.1 ^c
	MFW	9 ± 0.1 ^a	3,172 ± 16 ^b	2,008 ± 22 ^c	168 ± 0.9 ^a	102 ± 0.1 ^a
After heating	NOW	19 ± 0.1 ^c	Coagulation	Coagulation	5,949 ± 14 ^a	63 ± 0.1 ^b
	NSW	37 ± 0.0 ^a	Coagulation	Coagulation	449 ± 0.2 ^c	43 ± 0.0 ^c
	ASW	6 ± 0.0 ^d	Coagulation	Coagulation	5,300 ± 7.6 ^b	29 ± 0.1 ^d
	MFW	32 ± 0.0 ^b	Coagulation	Coagulation	Coagulation	18,282 ± 13 ^a

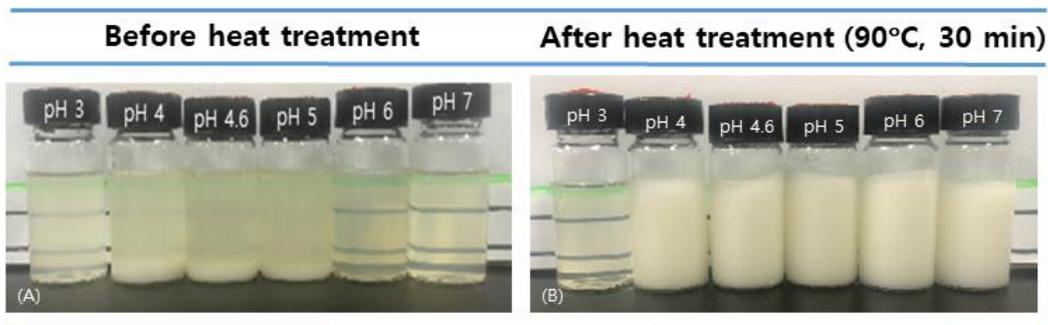


그림 75. 분리유청단백질용액(3%, w/v, pH 3-7)의 90°C 30분 가열에 의한 외관 변화 이미지

- 투명한 음료 제형이 가능한 산성 pH 영역을 보다 자세히 관찰하기 위하여 pH 3.5 ~ 3.8 로 WPI 용액의 pH를 조정 한 후 열처리에 의한 혼탁도 변화를 측정하였음(표 53. 그림 76).

표 53. 선성 pH(pH 3.5-3.8)의 분리유청단백질 용액 90℃ 30분 가열에 의한 혼탁도 변화

	Nephelometry turbidity units (NTU)			
	pH 3.5	pH 3.6	pH 3.7	pH 3.8
NOW	203 ± 0.06 ^a	427 ± 0.92 ^a	10,386 ± 16 ^a	10,526 ± 12 ^a
NSW	Coagulation	Coagulation	Coagulation	Coagulation
ASW	28 ± 0.08 ^c	47 ± 0.13 ^c	144 ± 0.64 ^c	2,570 ± 1.8 ^c
MFW	97 ± 0.25 ^b	393 ± 0.15 ^b	2,928 ± 5.75 ^b	6,180 ± 39 ^b

WPI: 3% (w/v)

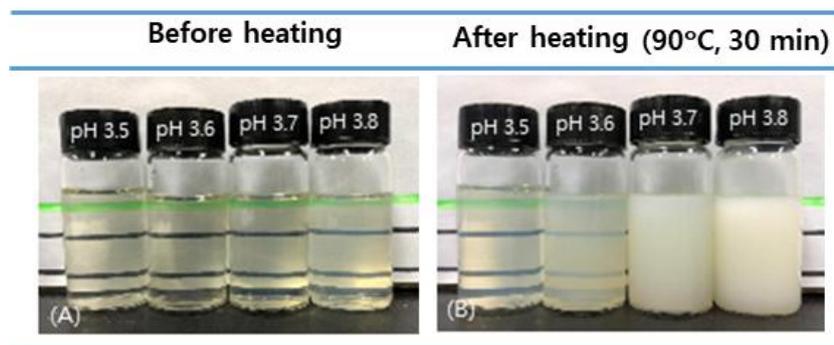


그림 76. 선성 pH(pH 3.5-3.8)의 분리유청단백질 용액 90℃ 30분 가열에 의한 외관 변화 이미지

- NSW 시료는 산성 pH 조건에서 모두 gel을 형성하였으며 ASW 시료는 상대적으로 안정하였음. 모든 시료는 pH의 상승에 따라 혼탁도가 유의적으로 상승하였으며 formulation을 통하여 clear type 단백질음료 혼탁도 목표치인 < 50 NTU 수준으로 조절하기 위한 기준으로 pH 3.6을 일차적으로 정하고 연구를 진행하였음.

(2) 크기 배제 크로마토그래피

- 크기 배제 크로마토그래피는 가열에 의한 시료의 분자량 분포 변화를 확인할 수 있으며 열처리 후 각 시료의 입자 크기의 변화를 확인하기 위하여 실시하였음.
- 가열 전 시료의 크로마토그램은 차이를 나타내지 않았으며 열처리 이후 모든 시료에서 단백질이 응집하여 분자량의 크기가 증가하는 경향을 나타내었음. 그 중 MFW 시료가 단백질 응집으로 인한 거대 입자들의 분포가 다른 시료와 비교하여 큰 것으로 나타났음(그림 78).
- 한편 산에서 안정한 ASW 시료는 다른 시료와 비교하여 작은 분자량으로 존재하는 단백질의 비율(peak at 100-120 min)이 더 많은 것으로 나타나 혼탁도 측정 결과와 일치하는 경향을 나타냈음(표 53).

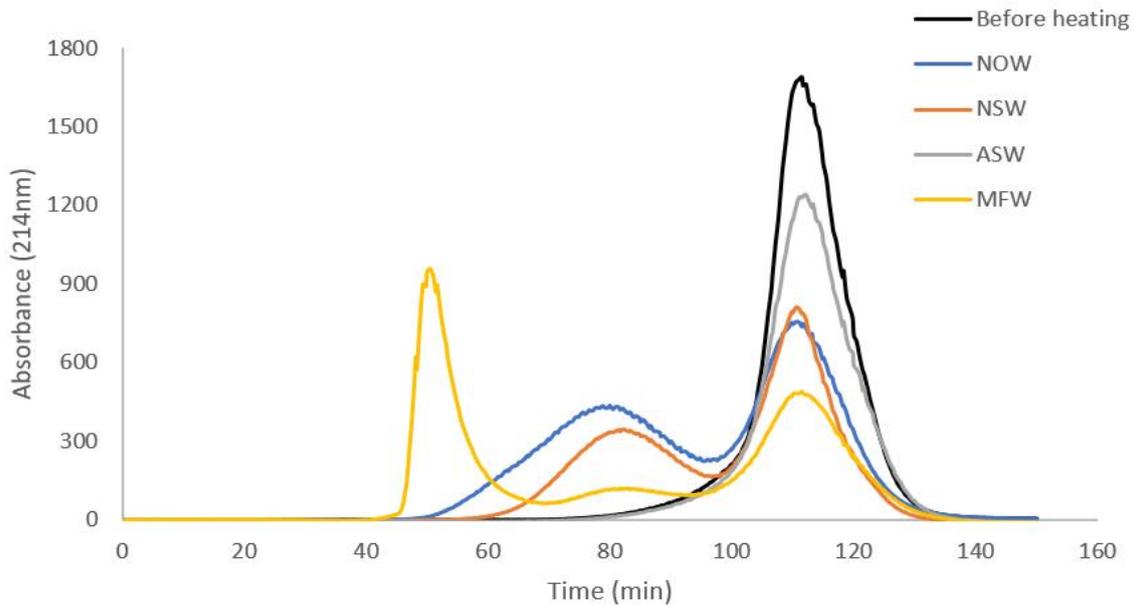


그림 77. 열처리 분리유청단백질 용액의 크기배제크로마토그래피에 의한 용출패턴 변화

3) 단백질 응집억제 효과 분석

(1) 당 알코올 첨가로 인한 응집억제 효과

- 단백질 응집억제 소재로서 당알코올의 효과를 분석하였음. MFW 시료에 다양한 당알코올을 각각 2.5, 5, 10% 가 되도록 첨가하고 열처리(90°C, 30 min)하여 혼탁도의 변화를 측정하였음(그림 78).

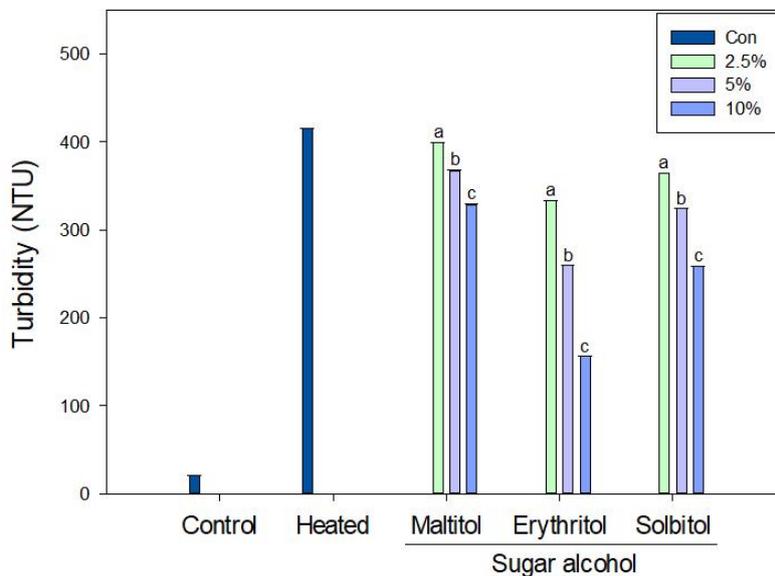


그림 78. 당알코올의 첨가가 열처리에 의한 분리유청단백질(3%, w/v)의 혼탁도 증가에 미치는 효과

시료: 정밀/정용여과에 의하여 제조된 분리유청단백질, 열처리조건: 90°C, 30 min

- 실험에 이용한 당알코올 3종은 모두 농도 의존적으로 혼탁도의 감소 효과를 보였음. 그 중 10% 농도의 erythritol은 가장 높은 혼탁도의 감소 효과를 나타내었으나 투명 단백질 음료의 기준(NTU<50)을 충족시키지는 못하였음.

- LaClair and Etzel.(2010)은 작은 분자량을 가지고 있는 당 알코올이 더 우수한 혼탁도 감소 효과를 보인다고 하였으며, 이는 본 실험의 결과와 일치하였음.

(2) 아미노산

- 단백질 refolding 향상 소재로서 아미노산의 첨가 효과를 평가하였음.
- 다양한 아미노산을 200 mM 수준으로 첨가하고 혼탁도에 미치는 효과를 관찰한 결과 산성 아미노산과 염기성 아미노산이 유의적으로 혼탁도의 감소효과를 나타냈음. 그러나 염기성 아미노산의 경우 열처리 이후 갈색의 변화가 확인되어 clear type 음료의 적용에는 부적합한 것으로 판단되었음
- 산성 아미노산의 첨가 시 나타나는 pH의 변화 없이 혼탁도의 감소 효과가 나타나는 첨가 수준을 찾기 위하여 10, 50 mM의 농도로 산성 아미노산을 이용해 추가 실험을 진행하였으며 10 mM의 농도로 산성 아미노산을 처리했을 때 pH의 변화는 거의 일어나지 않았으며 clear type 단백질 음료의 혼탁도 기준(NTU<50)을 충족시키는 것으로 확인되었음(그림 79).

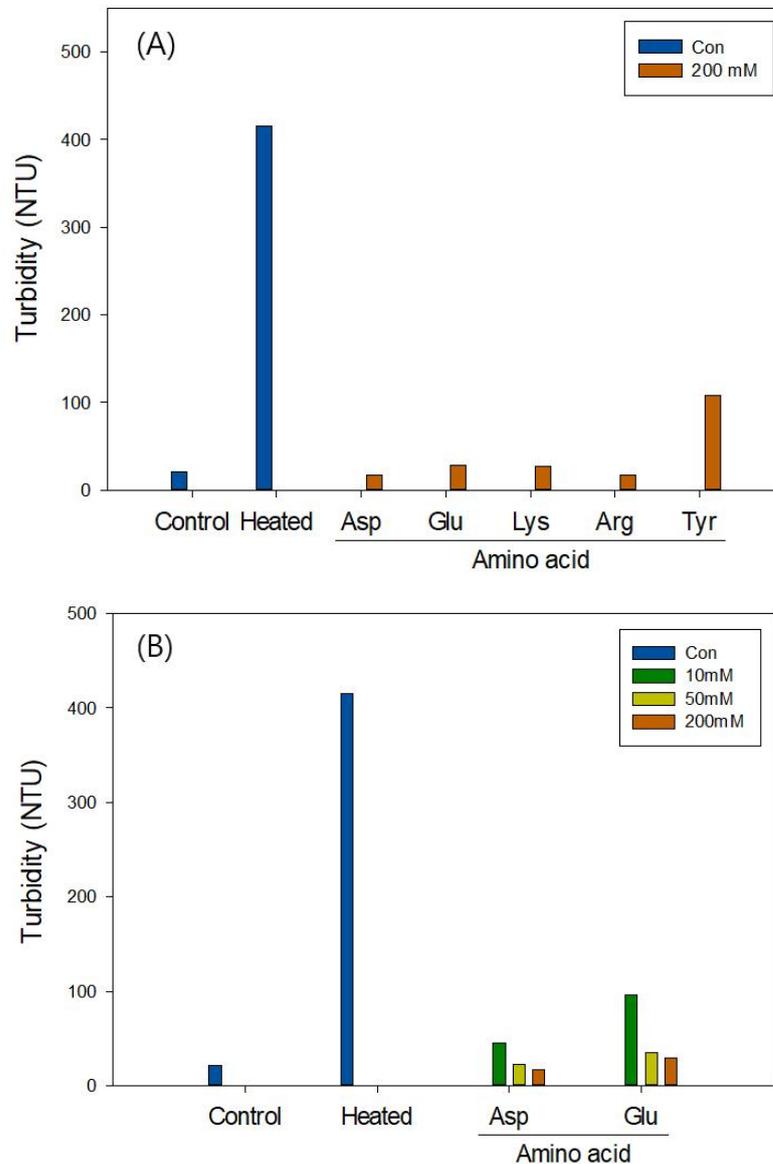


그림 79. 아미노산의 첨가가 열처리에 의한 분리유청단백질(3%, w/v)의 온탁도 증가에 미치는 효과
 시료: 정밀/정용여과에 의하여 제조된 분리유청단백질, 열처리조건: 90℃, 30 min

(3) 초음파 처리로 인한 응집억제 효과

- 식품 산업에서 식품 성분을 변형시키는 비열처리 방법의 관심은 점차 높아지고 있는 추세임. 그 중에서도 고강도 초음파의 사용은 가공식품의 품질과 안전성을 향상시키므로 상당한 주목을 받고 있음(Chandrapala et al., 2011).
- 단백질 용액의 열처리 전 초음파 처리는 탁도의 유의한 감소율을 보였으며 초음파 처리의 강도나 처리 시간이 증가함에 따라 효과적으로 혼탁도의 증가를 감소시켰음(그림 80).
- 그러나, 열처리 이후 450W 강도의 초음파 처리 효과는 오히려 300W보다 낮았는데 이는 강한 초음파 처리 과정 중의 시료의 온도 증가에 의한 것으로 추정됨.

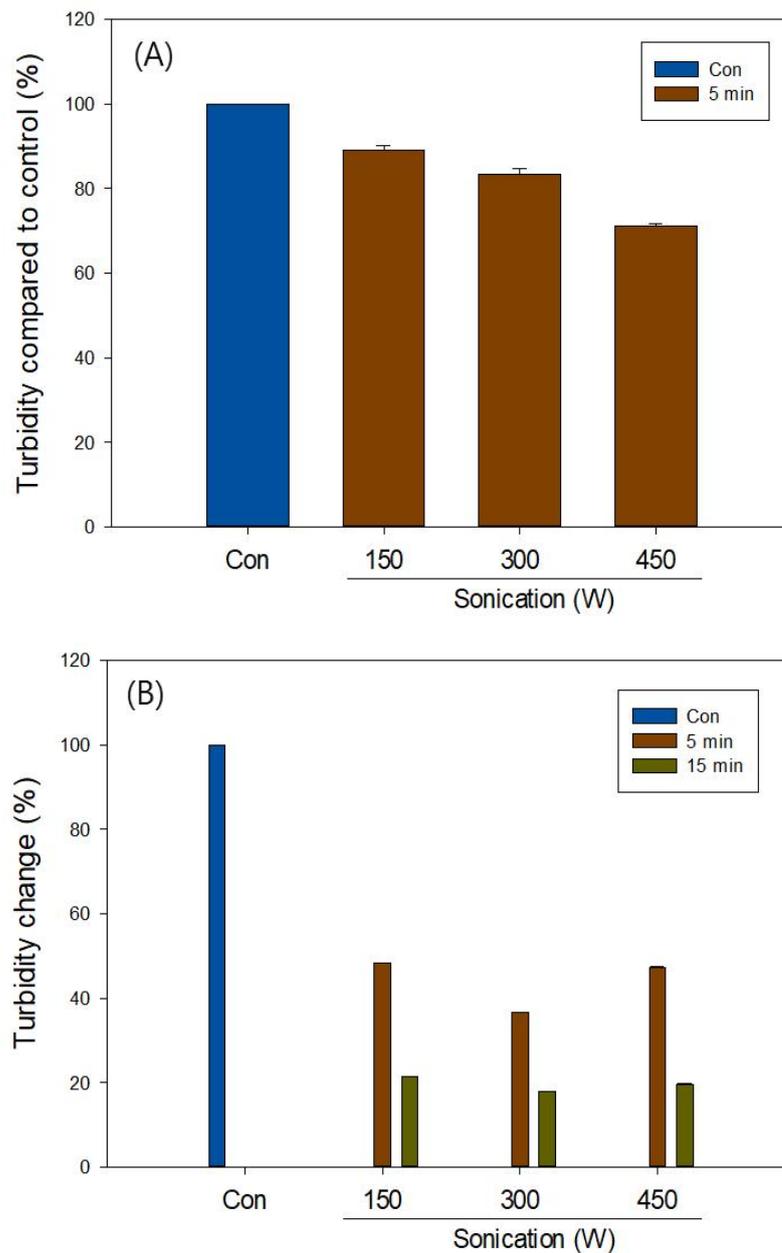


그림 80. 초음파 처리가 열처리에 의한 분리유청단백질(3%, w/v)의 온탁도 증가에 미치는 효과
 시료: 정밀/정용여과에 의하여 제조된 분리유청단백질, 열처리조건: 90℃, 30 min

(4) 무기질 및 잔여 casein 제거

- 유청단백질에 존재하는 무기질 종류 및 함량은 열 안정성에 중요한 영향을 미침. 이에 따라 무기질 조성의 변화가 열처리에 의한 혼탁도 발생에 미치는 효과를 분석하기 위하여 투석과 정밀여과 이후에 잔류할 수 있는 casein의 제거를 통한 추가적인 개선 효과를 측정하였음(표 54, 그림 81).
- 무기질 제거 시료와 무기질 및 casein을 제거한 시료는 기존 시료에 대비하여 높은 탁도 감소율을 나타내었으며 무기질만을 제거한 시료는 투명한 용액의 기준(NTU<50)과 유사한 수준으로 투명도를 유지하였으며 casein까지 제거 후 무기질을 제거한 시료는 투명 용액의 기준을 충족시켰음.

표 54. 분리유청단백질의 무기질 제거 및 잔여 카제인/무기질 제거가 혼탁도에 미치는 영향

	Nephelometry turbidity units (NTU)	
	pH 3.6	
MFW	451	
Dialysis of MFW	57	
Casein removal + dialysis of MFW	22	

Concentration of MFW: 3% (w/w), Heat treatment: 90°C, 30 min

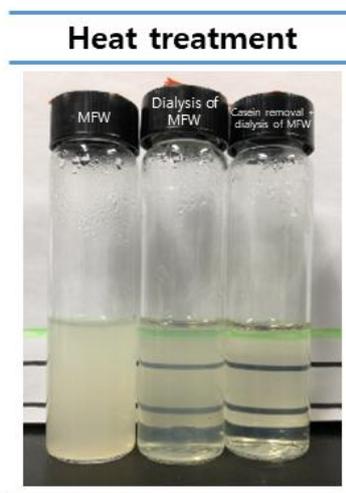


그림 81. 무기질 제거 및 잔여 카제인/무기질 제거 후 가열한 분리유청단백질의 외관 이미지

4) 단백질 상호작용 기전 분석

(1) 표면 소수성 분석

- 단백질 표면 소수성의 변화는 단백질 응집과 혼탁도 상승으로 연결되는 단백질 형태의 변화와 밀접하게 관련되어 있음(Kato and Nakai, 1980). 따라서 표면 소수성의 변화가 시료의 단백질 응집에 미치는 영향을 파악하기 위하여 시료의 pH를 3과 7로 조정한 후 열처리 전후 표면소수성의 변화를 측정하였음(그림 82).

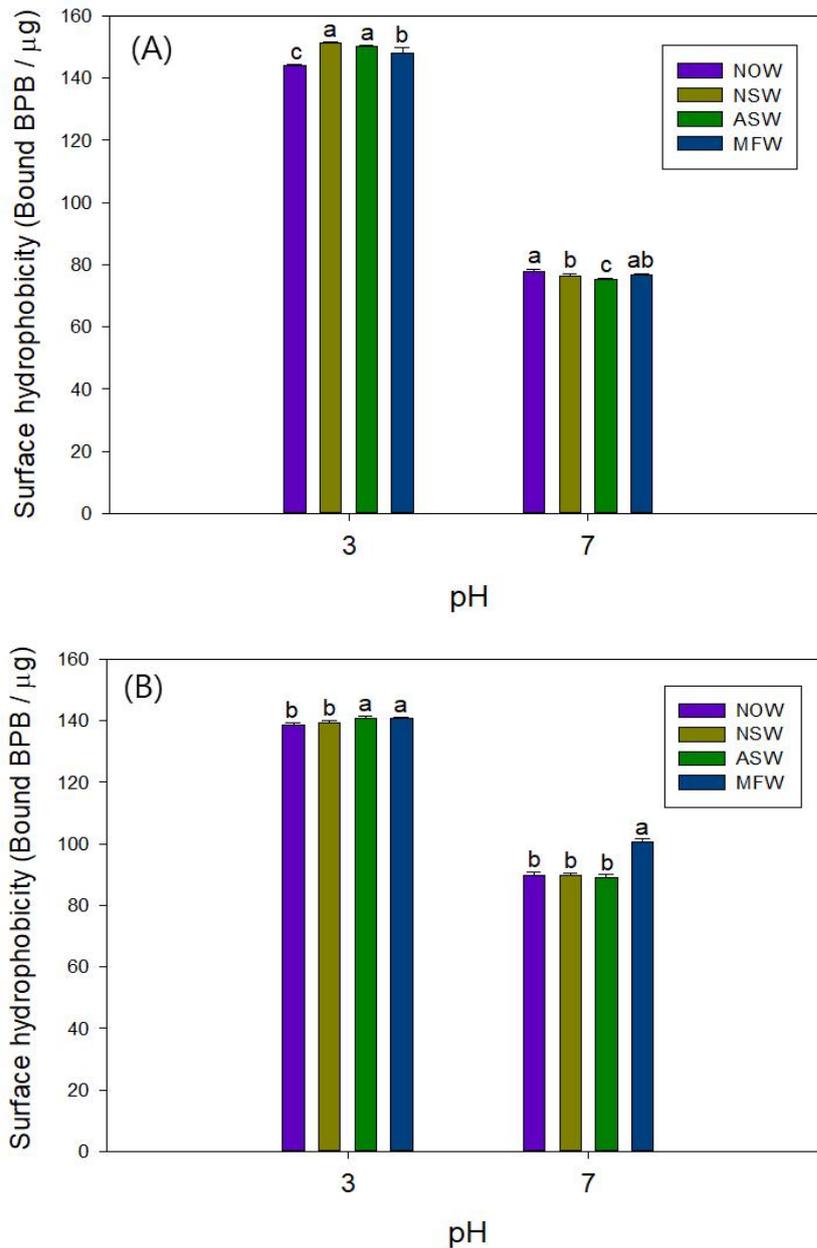
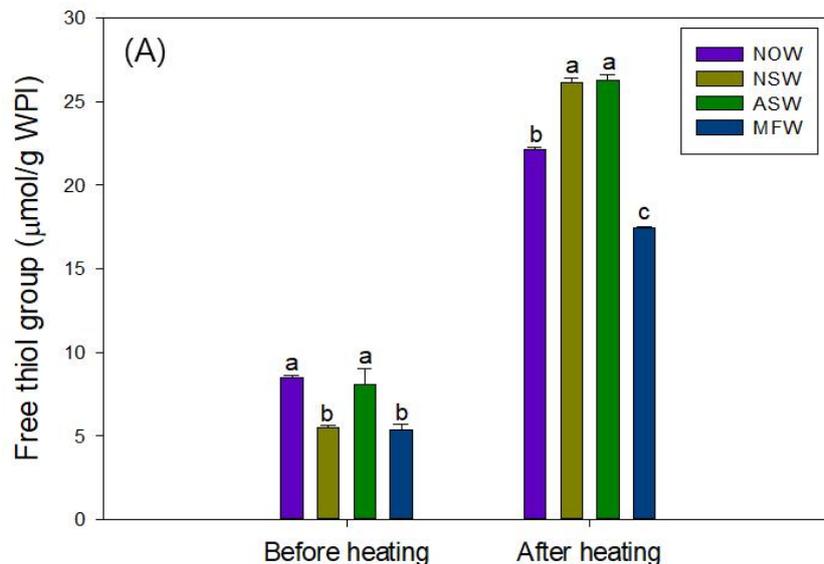


그림 82. pH 3 and pH 7 조건에서 가열 전(A)과 후(B) 표면소수성의 변화

- 열처리 전 pH 3과 7에서 MFW 시료의 표면 소수성을 측정한 결과 일부 WPI 간에 유의한 차이가 있었지만 뚜렷한 구조적 차이를 보이지는 않았으며, 열처리 후 pH 3에서 감소하는 경향을 나타냈음
- 가열에 의한 단백질의 표면소수성 변화는 가열 시 소수성 상호작용으로 인한 표면소수성의 감소 효과와 단백질 접힘 구조의 풀림에 의한 소수성 잔기의 표면 노출에 의한 증가 효과의 두 가지의 변화의 균형에 의하여 결정됨.
- 열처리 후 pH 7에서는 표면 소수성의 증가가 나타났으며 이는 중성 pH에서 단백질 응집은 소수성 상호작용 보다는 이황화결합에 의하여 진행되기 때문에(Ryan et al., 2012) 응집에 의한 소수성의 변화보다는 단백질 구조의 풀림에 의한 소수성 잔기의 노출이 증가하기 때문인 것으로 설명할 수 있음.
- 네 가지의 WPI 시료 중 열처리 이후 시료의 변화율은 MFW 시료가 가장 높았으며 이것은 MFW 가 열 변화에 더 민감하다는 것을 의미함.

(2) Thiol group

- Thiol-disulfide interchange에 의한 공유 결합은 단백질 응집에 중요한 역할을 담당하며 특히 중성 pH에서 단백질 응집이 주원인으로 알려짐. 따라서 pH 3과 7에서 total thiol group과 free thiol group의 변화를 측정하여 상호작용에 미치는 영향을 분석하였음.
- 각 pH에서 시료의 종류에 따라 total 및 free thiol group의 함량에 차이가 나타났음(그림 83). 이는 유청단백질의 원천(cheese whey vs. microfiltered whey) 및 WPI 제조공정에 따라 단백질의 구조에 변화가 나타날 수 있음을 의미하며 이러한 차이는 가열 등에 의한 화학적 반응성의 차이를 나타낼 수 있을 것으로 생각됨.
- 열처리 후 모든 시료에서 free thiol group은 증가하는 경향을 나타내었으며 이는 단백질 접힘 구조의 풀림에 의해 묻혀 있던 thiol 그룹의 노출로 인해 발생한 것으로 보임(그림 83(A),(C)).
- pH 3과 7에서 열처리 전후 total thiol group과 free thiol group 함량은 다른 변화율을 나타냈음. pH 3에서는 거의 일어나지 않았으며 이는 산성 pH 조건(pH 3)에서 β -LG은 양전하를 띄며 이황화결합이 거의 일어나지 않는 것으로 생각할 수 있음(Fuente et al., 2002).
- 한편, pH 7에서는 total thiol group이 모든 시료에서 감소하였음. 이는 중성 pH에서 free thiol group에 의한 단백질 응집이 발생함을 의미하며, MFW 시료의 free thiol group의 낮은 증가폭과 total thiol group의 높은 감소폭은 다른 시료에 비하여 상대적으로 많은 단백질 응집을 일으켰음을 시사함.



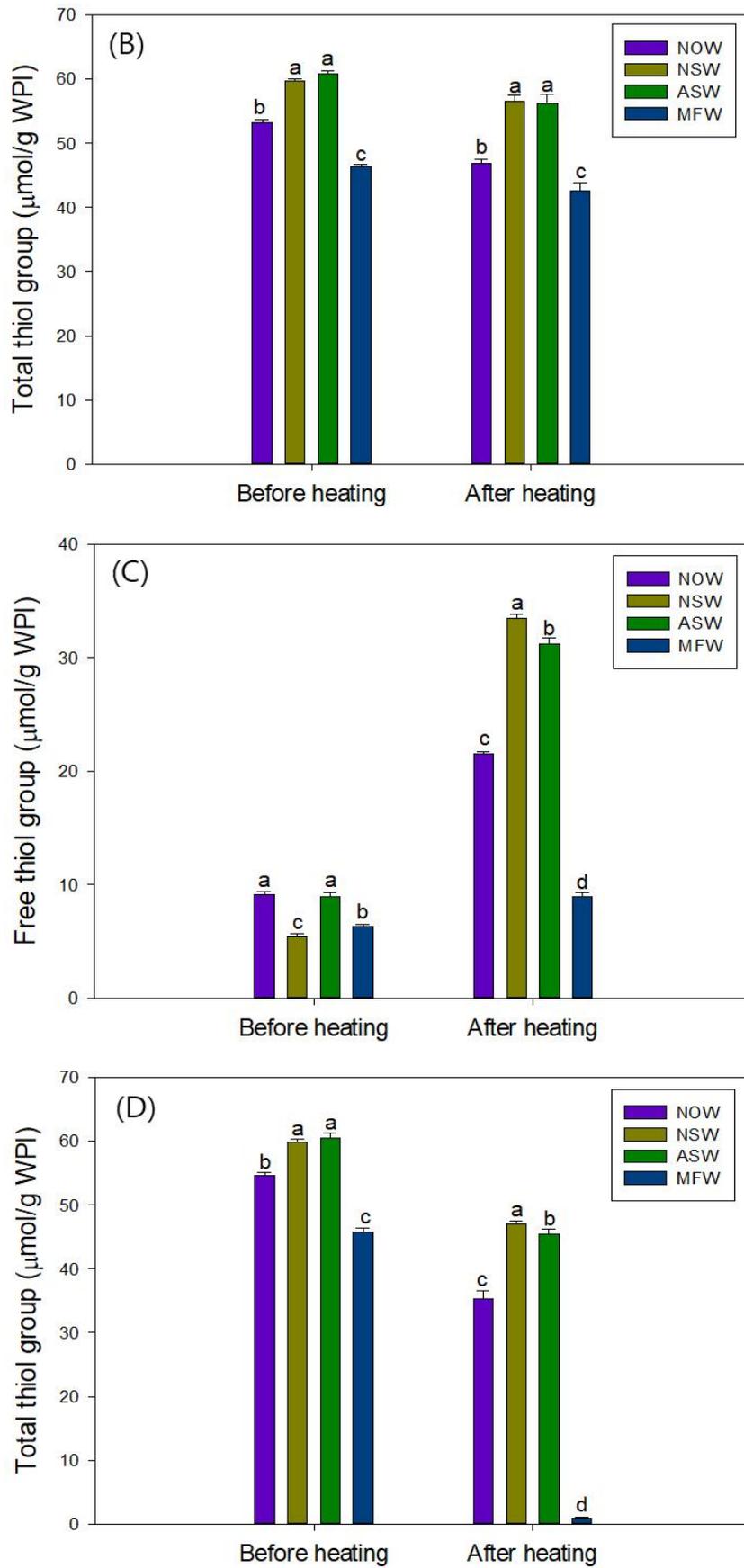


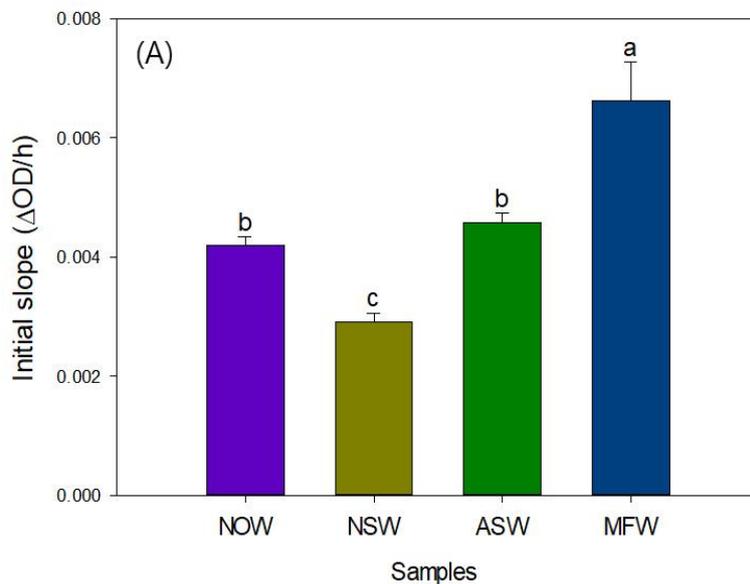
그림 83. 가열 전 후 분리유청단백질 용액의 total 및 free thiol 함량 변화
 (A) free thiol group at pH 3, (B) total thiol group at pH 3, (C) free thiol group at pH 7, and (D) total thiol group at pH 7.

5) 시험관 내 단백질 소화율

- 시험관 내 단백질 소화율(*in vitro* protein digestability)은 소화율 매개변수를 결정하는데 널리 사용되는 방법이며 단백질 분해 효소를 통해 인간의 위장관에서 발생하는 소화 과정을 모방하여 소화 효소에 의해 가수 분해되는 단백질의 백분율을 측정하는 방법임 (Almeida et al., 2015).
- 각 시료의 단백질 소화율은 위 및 장 단계로 나누어 평가하였으며 이로 인하여 분리 유청단백질의 제조 방법이 단백질의 소화율에 미치는 효과를 관찰하고자 하였음.

(1) 위 소화

- 위 소화는 소수성과 방향족 아미노산의 펩티드 결합에 대한 기질특이성을 가진 소화 효소인 pepsin 사용하여 소화를 진행하였음(Sun et al., 2011).
- 위 단계의 소화에서 MFW는 최종소화율을 나타내는 매개변수인 Maximal Degradation에서 유의적으로 높은 수치를 보였으며 소화가 진행되는 속도를 표현하는 매개변수인 Initial slope와 Maximal rate of digestion에서도 유의적으로 높은 값을 나타내었음(그림 84).
- 이는 미변성 MFW 시료가 소화가 상대적으로 빠르게 진행되며 전반적인 소화율이 높음을 의미하며 미가열 유청단백질이 높은 소화율과 생체 이용률을 나타낸다는 보고와 동일한 경향을 나타냈음(Pellegrino et al., 2013).



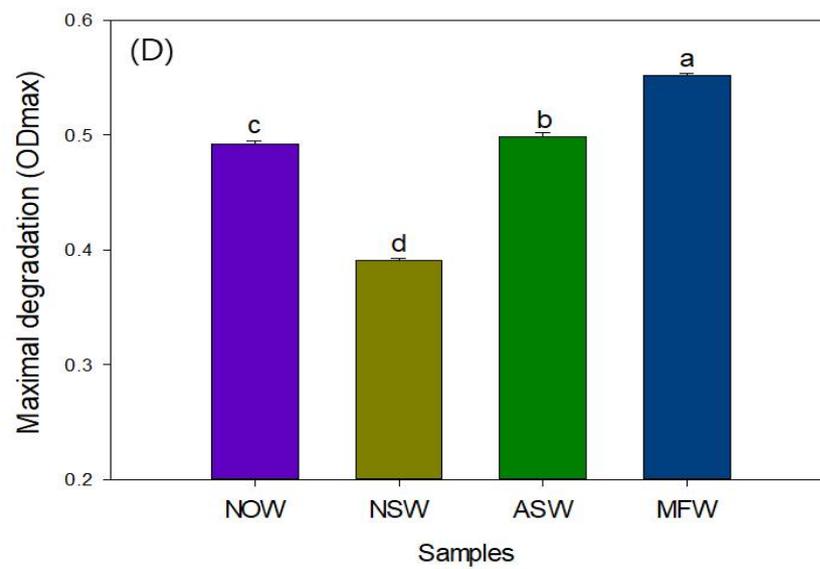
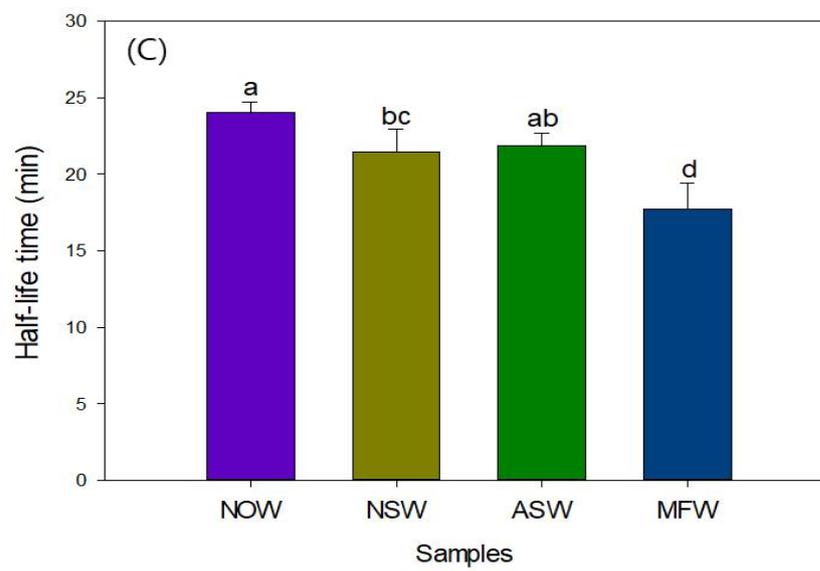
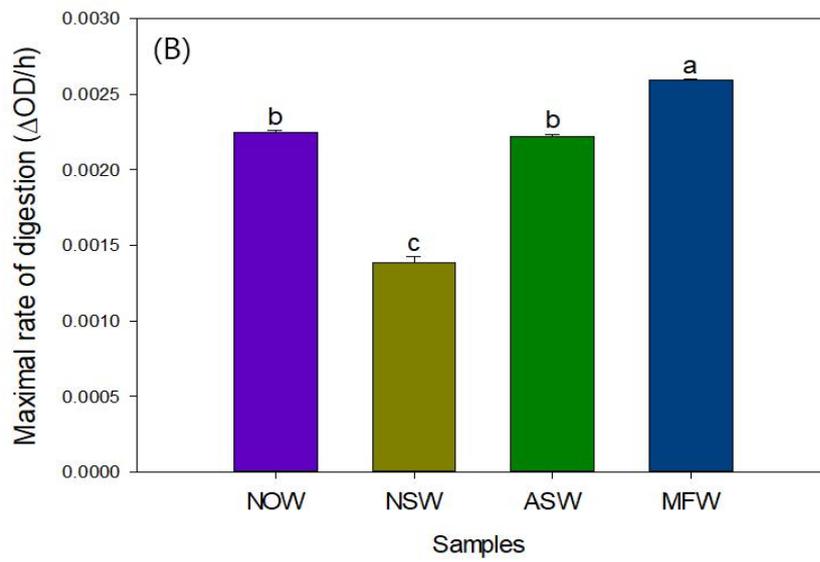
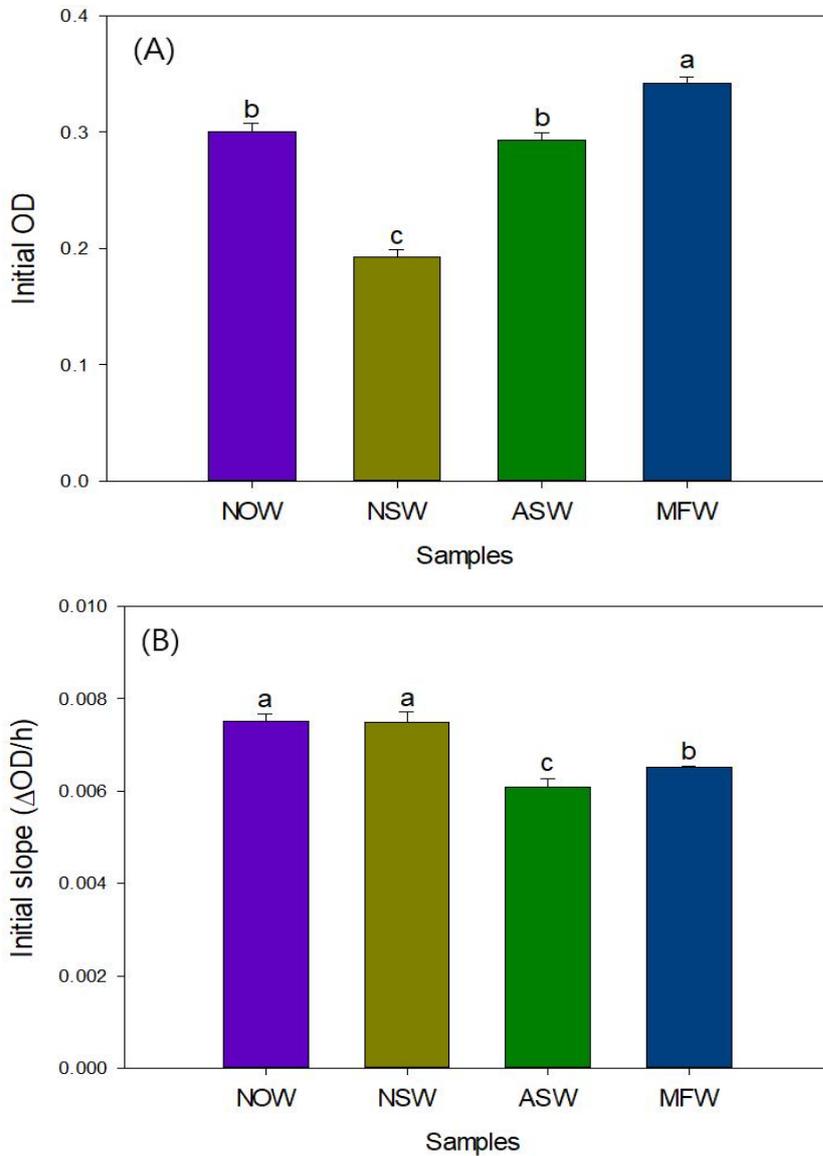


그림 84. Pepsin에 의한 분리유청단백질 용액의 *in vitro* 위 소화지표(*in vitro*)

(2) 장

- 장 소화 단계에서는 Lys 잔기 및 Tyr, Trp 또는 Phe와 같은 소수성 잔기를 절단하는 trypsin과 α -chymotrypsin을 사용하여 소화를 진행하였음(Asante et al., 2014).
- 장 소화율 및 소화 속도를 나타내는 매개변수에서는 MFW 시료가 위 소화와 다르게 다른 시료와 비슷하거나 다소 낮은 값을 보였음(그림 85).
- MFW 시료의 장소화율이 감소한 이유는 확실치 않으나 위 소화에서 비교적 높은 소화 속도 및 소화율 나타내 장 소화에서는 추가적인 소화가 필요한 단백질의 양이 작아지는 것도 장소화율의 감소에 관여하였을 것으로 추정됨.
- 그러나, 최종 소화율을 나타내는 Maximal degradation 값이 다른 시료에 비해 높았으며 위와 장의 전반적 소화 매개변수를 고려할 때 MFW가 가장 높은 소화율을 나타냈음.



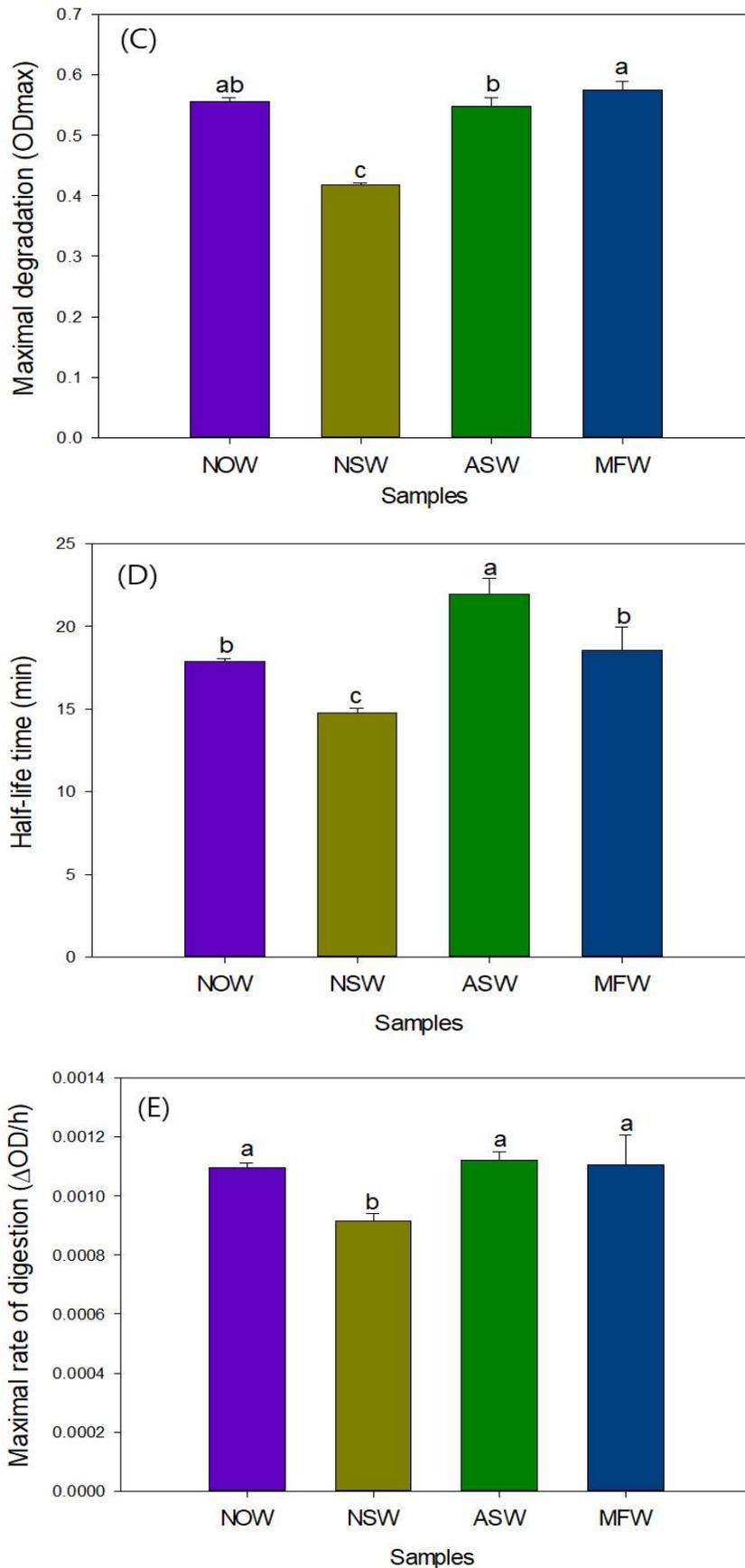


그림 85. Trypsin 및 α -chymotrypsin에 의한 분리유청단백질 용액의 *in vitro* 장 소화 지표

3. 결론

- MFW 시료를 demineralization한 후에 3%(w/v)의 농도로 분산시켜 열처리 이후 혼탁도를 측정 한 결과 기존 MFW 시료(3%, w/v)에 비하여 확연한 혼탁도의 개선 효과를 나타내었음.

- 향후 정밀여과 후 인산 용액 등을 이용하여 정용여과 시 무기질의 가용화를 유도하여 투석과 유사한 무기질 제과효과를 기대할 수 있을 것으로 판단되며 향후 이를 검증하기 위한 추가적 연구가 필요할 것으로 생각 됨. 이와 같은 천연유청단백질의 열안정성 향상을 위한 가공 공정은 특허 출원이 가능할 것으로 판단됨.
- 치즈가공에서 유래한 유청단백질(치즈 유청)에 비해 더 많은 미변성유청단백질을 함유한 MFW 시료는 건강을 중시하는 단백질 음료 소비자에게 더 나은 영양 및 관능적 품질을 제공할 수 있으며 MFW 시료의 열안정성 개선을 통하여 다양한 식품에 적용 범위를 확대할 수 있을 것으로 기대됨.

<3차년도>

[제2 협동기관 : 한양대학교]

I. 세부 연구목표

- 식물성과 동물성 단백질의 *in vivo* 소화흡수율 비교
- 시판 whey protein 및 정밀여과로 제조한 whey protein의 *in vivo* 소화흡수율 비교

II. 연구개발 수행내용

1. 단백질을 이용하여 제조한 시료의 *in vivo* 소화흡수율 평가

1) 시료준비

- 정밀여과를 이용하여 제조한 시료(NWPI, native whey protein isolate)는 탈지유를 정밀여과 한 뒤, 한외여과 및 정용여과하여 유청단백질을 농축하였음. 시판용 whey protein (CWPI, commercial whey protein isolate) 및 soy protein isolate(SPI)을 이용하여 제조한 시료는 정밀여과를 이용해 제조한 시료의 단백질 및 탄수화물 함량에 맞추어 유당을 혼합하여 제조하였음. 모든 시료는 동결건조 후 동물실험에 사용하였으며, 시료의 영양성분은 표 55에 나타내었음.

표 55. 동결건조 시료의 영양성분

	NWPI	CWPI	SPI
Carbohydrate (g/100g)	56.70	62.70	61.30
Protein (g/100g)	28.90	29.00	31.00
Fat (g/100g)	0.00	0.00	0.00

2) 동물실험

- 실험동물은 생후 3주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 오리엔트바이오(Orient Bio. Inc., Seoungnam, Korea) 로부터 공급받아 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였음.
- 사육조건은 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 15\%$ 로 유지하였으며, 12시간 간격으로 조명을 조절하였음.
- 8주간의 시험기간 동안 실험군은 AIN-93G과 nitrogen free 사료를 기본식으로 음수와 함께 제공하였음.
- 18마리의 SD rat은 군 당 6마리씩 SPI 및 CWPI, NWPI 시료 투여군과 nitrogen free (N-free) 식이군으로 분리하였음.
- 동물의 군 분리는 순화기간 후 동물의 체중을 측정하여 순위화하고, 각 군의 평균체중이 균일하게 분포하도록 무작위 분배함.
- N-free군은 단백질 소화율 및 이용률 평가를 위한 것으로 나머지 실험항목에서는 실험을 진행하지 않았음.
- 시료 투여량은 whey protein 음료 500 mL에 함유되어 있는 단백질 15 g을 치환하여 체중당 1.56 g의 단백질을 기준으로 설정하였음.
- N-free군은 다른 군들과 경구투여 조건을 동일시 하기 위해 0.9% NaCl을 10 mL/kg 만큼 투여

하였음.

- 8주 동안 체중은 매주 1회, 사료섭취량은 매주 2회 측정하였음.

2) 단백질 소화흡수율 및 이용률 평가

- 2주차에 대사케이지에서 사육하며 5일 동안의 식이 섭취량을 측정하고 분변 및 소변을 수집하고 킬달법으로 질소함량을 측정하였음.
- 다음 식을 이용하여 진성 소화율(true digestibility, TD), 생물가(biological value, BV), 순단백질 이용률(net protein utilization, NPU)을 구했음.

$$TD (\%) = \frac{\text{ingested N} - (\text{fecal N} - \text{fecal endogenous N})}{\text{ingested N}} \times 100$$

$$BV (\%) = \frac{\text{ingested N} - (\text{fecal N} + \text{urinary N} - \text{fecal endogenous N} - \text{urinary endogenous N})}{\text{ingested N} - (\text{fecal N} - \text{fecal endogenous N})} \times 100$$

$$NPU (\%) = \frac{TD \times BV}{100}$$

3) 근력 평가

- 근력은 grip strength meter를 이용하여 경구투여 4주차 및 8주차에 쥐의 앞발을 T자형 막대에 올려놓고 앞발을 놓을 때까지 뒤로 잡아당겼을 때의 힘을 측정하였음.

4) 체성분 분석

- 실험 종료 후 12시간 동안 금식시키고 케타민과 자일라진을 이용하여 마취시킴.
- 조직 내 지방(%), 체지방량은 Dual Energy X-ray Absorptiometry (DEXA)를 사용하여 분석함.
- 희생 후 뒷다리 가자미근과 족저근을 채취하여 무게를 측정하였음.

5) 혈장 내 류신 함량

- 경구 투여 7주차에 12시간 절식 후, 시료 투여 전 0분, 시료 투여 후 30, 60, 90 및 12분에 경정맥 채혈 후 혈장을 분리하였음.
- 혈장 아미노산은 고성능액체크로마토그래피 (HPLC; Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)로 측정하였음.

2. 식물성과 동물성 단백질의 *in vivo* 소화흡수율 평가

1) 체중, 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율

- 8주차 체중, 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율은 군 간의 유의적 차이가 나타나지 않았음(표 53).

표 56. 체중, 체중 증가량, 식이섭취량, 식이효율

	SPI	CWPI
Final body weight (g)	391.4 ± 6.1	410.6 ± 10.7
Weight gain (g)	313.3 ± 5.8	330.9 ± 9.9
Total feed intake (g)	879.4 ± 11.8	928.6 ± 9.6
Feed efficiency ratio	0.357 ± 0.008	0.356 ± 0.008

Data are expressed as mean ± SEM.

2) 단백질 소화흡수율 및 이용률 평가

- 질소 섭취량, 대변 내 질소함량, 소변 내 질소함량은 군 간의 유의적 차이가 나타나지 않았으며, TD 및 BV, NPU 또한 유의적인 차이가 관찰되지 않았음(표 57).

표 57. 단백질 소화흡수율 및 이용률

	SPI	CWPI
Nitrogen intake (g)	2.93 ± 0.05	2.84 ± 0.07
Fecal nitrogen (g)	0.12 ± 0.00	0.11 ± 0.03
Urinary nitrogen (g)	0.59 ± 0.07	0.46 ± 0.04
True digestibility (%)	96.98 ± 0.16	97.13 ± 0.53
Biological value (%)	88.09 ± 2.58	92.81 ± 1.35
Net protein utilization (%)	85.44 ± 2.56	90.17 ± 0.28

3) 근력 평가

- 근력을 위해 진행된 grip strength test 결과, 4주차 및 8주차에서 군 간의 유의적 차이가 나타나지 않았음(그림 86).

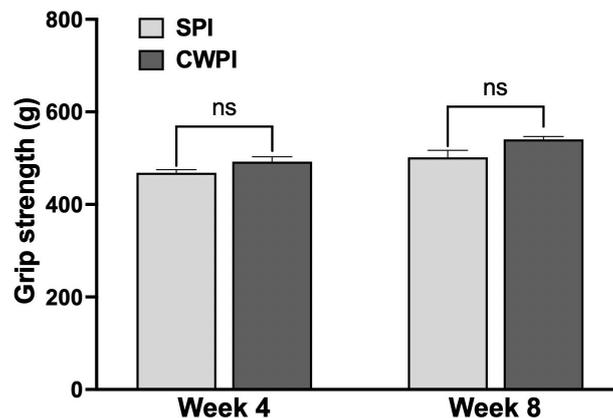


그림 86. 근력 평가

4) 체성분 및 근육 무게

- 체성분(조직 내 지방, 체지방 함량) 및 근육 무게(가자미근 및 족저근)은 군 간의 유의적 차이가 나타나지 않았음(표 58).

표 58. 체성분 및 근육 무게

	SPI	CWPI
Body composition		
Fat in tissue (%)	23.24 ± 0.40	23.97 ± 0.70
Lean mass (g)	259.8 ± 2.5	269.5 ± 5.1
Relative skeletal muscle weight		
Soleus (mg/100g BW)	45.03 ± 1.73	39.09 ± 0.04
Plantaris (mg/100g BW)	110.9 ± 3.2	114.4 ± 1.90

Data are expressed as mean ± SEM. BW, body weight.

5) 혈장 내 류신 함량

- 혈장 내 류신 함량은 CWPI이 SPI에 비해 60분에서 유의적으로($p < 0.05$) 높게 나타났음.
- 시료 투여 전 0분, 시료 투여 후 30, 90, 120분에는 두 군간의 유의적인 차이가 나타나지 않았음(그림 87).

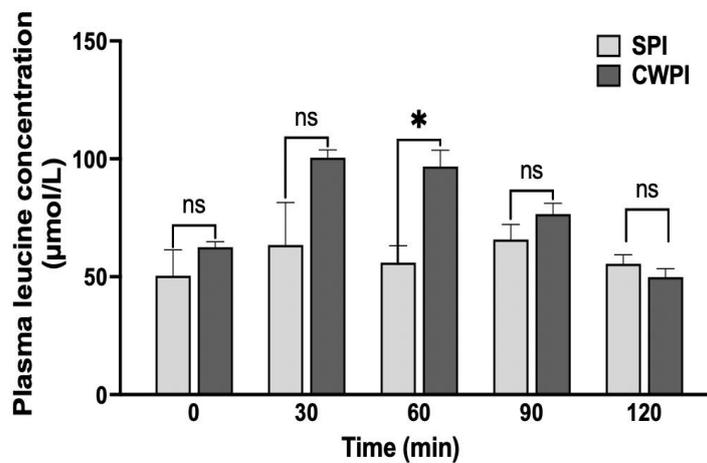


그림. 87. 혈장 내 류신 함량

3. 시판 및 정밀여과로 제조한 whey protein의 *in vivo* 소화흡수율 비교

1) 체중, 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율

- 8주차 체중, 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율은 실험군 간의 유의적 차이가 없었음(표 59).

표 59. 체중, 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율

	CWPI	NWPI
Final body weight (g)	410.6 ± 10.7	415.4 ± 2.7
Body weight gain (g)	330.9 ± 9.9	337.0 ± 1.7
Total feed intake (g)	928.6 ± 9.6	940.9 ± 3.7
Feed efficiency ratio	0.356 ± 0.008	0.358 ± 0.003

2) 단백질 소화율 및 이용률 평가

- 질소 섭취량, 대변 내 질소함량은 군 간의 유의적 차이가 나타나지 않았으며, 소변 내 질소함량은 CWPI가 NWPI보다 유의적으로 높았음($p < 0.05$). TD는 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, BV 및 NPU는 NWPI가 CWPI보다 유의적으로 높았음($p < 0.05$)(표 60).

표 60. 진성 소화율, 생물가, 순단백질 이용률

	CWPI	NWPI
Nitrogen intake (g)	2.84 ± 0.07	3.00 ± 0.06
Fecal nitrogen (g)	0.11 ± 0.03	0.12 ± 0.00
Urinary nitrogen (g)	0.46 ± 0.04*	0.38 ± 0.00
True digestibility (%)	97.13 ± 0.53	97.31 ± 0.13
Biological value (%)	92.81 ± 1.35	95.94 ± 0.12*
Net protein utilization (%)	90.17 ± 0.28	93.13 ± 0.27*

Data are expressed as mean ± SEM. * indicates significant differences at $p < 0.05$.

3) 근력 평가

- 4주차에는 군 간의 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 8주차에는 NWPI가 CWPI에 비해 유의적으로 높았음($p < 0.05$; 그림 88).

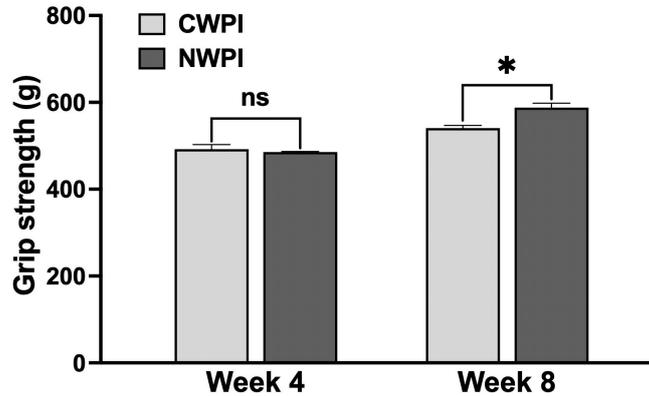


그림 88. 근력 평가

4) 체성분 및 근육 무게

- 조직 내 지방(%)은 군 간의 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 체지방량 및 골격근(가자미근 및 족저근) 무게는 NWPI가 CWPI에 비해 유의적으로 높았음($p < 0.05$; 표 61).

표 61. 체성분 및 근육 무게

	CWPI	NWPI
Body composition		
Fat in tissue (%)	88.00 ± 5.21	89.07 ± 1.96
Lean mass (g)	269.5 ± 5.10	284.1 ± 2.52*
Relative skeletal muscle weight		
Soleus (mg/100g BW)	39.09 ± 0.04	45.22 ± 0.83*
Plantaris (mg/100g BW)	114.4 ± 1.90	122.7 ± 1.16*

5) 혈장 내 류신 함량

- 혈장 내 류신 함량은 모든 시간에서 군 간의 유의적인 차이가 나타나지 않았음(그림 89).#

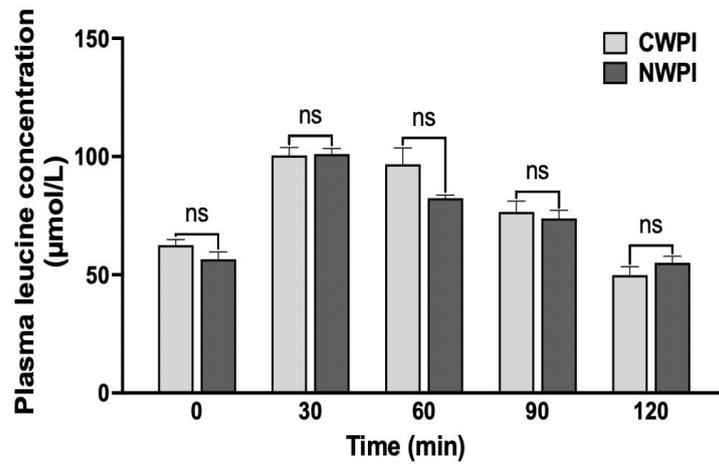


그림 89. 혈장 내 류신 함량

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발 성과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2019)	정밀여과공법을 이용한 맞춤형 유단백질 강화 기술 및 제품화	정밀여과공법 기술을 이용한 제품 시장현황 조사 진행 및 글로벌 유업체 기술현황 분석	- 국내 기술 수준 및 시장 현황 조사 진행 - 글로벌 유업체 filtration 설비 사용 현황 및 이를 이 용한 제품 출시 사례 조사	- 현재 국내에는 모두 MF 를 이용하여 유단백질을 분리한 제품은 없음. - 해외에서 MF 이용하여 적용한 제 품은 대부분 powder 형태 판매 진 행 - 조사 결과 본 연구과제의 미변성 단백질과는 다른 컨셉으로 판단됨.
		맞춤형 유단백질 분리를 위한 정밀여과 pilot 설 비 도입	막여과 분리 조건 조사 결과 를 기반으로 정밀여과 pilot 설비 제작 협의(Tetra pak)	19년 11월 Pilot 설비 발주 진행 및 내년도 상반기 설비 도입 완료 예정
		유단백질 선별적 막여 과 분리를 위한 최적 가공조건 설정	국내·외 논문 및 협력업 체(Tetra pak) 자료를 바 탕으로 유단백질 선별적 막여과에 사용되는 filter 사이즈 설정 진행 및 분리 조건 조사 완료	- 문헌조사를 통해 micellar casein의 사이즈 range 설정 - 신규 도입 예정인 파일럿 설비의 microfilter size 설정. (논문 자료 참고)
	유성분의 변화 (단백질 함량 과 조성변화 중심) 및 가공 조건 (살균, 균질, 멸균)에 따른 물리화학 적 변화 분석	Micellar casein 및 na tive serum powder를 이용한 모델 단백질강 화 우유 제조	- Micellar casein(MC)과 WPI를 다양한 비율로 혼 합하여 총단백질 5%의 시 료를 제조하고, pH 4.6 가용성 단백질 함량을 분 석하였음.	- 살균 전에는 시료 내 WPI의 비 율이 증가함에 따라 pH 4.6 가 용성 단백질이 함량이 비례적 으로 증가한 반면, 살균 후에는 시료 간 함량차가 현저히 감소 하였음.
유성분의 변화(단백질 함량 및 조성, 칼슘 등)가 열안정성에 미 치는 효과 분석		- 시료의 열안정성 분석 - 용해도 분석 - 총 칼슘(인) 및 용해성 칼슘(인) 함량 분석 - 탁도 분석 - 색도 분석 - SDS-PAGE 및 native- P AGE를 이용한 단백질 p rofile 분석	- 열안정성의 감소와 casein과 유청 단백질의 상호작용은 밀접한 상 관관계를 나타냈음. - MC는 유청단백질과 비교하여 낮 은 용해도를 나타냈음. - 시료 내 casein의 비율이 감소 할수록 총 칼슘은 유의적으로 감소하고 용해성 칼슘의 농도 는 증가하는 경향을 나타냈음. - 살균 시 일어난 탁도의 증가 정 도는 MC:WPI의 비율이 50:50으 로 존재할 때 가장 큰 폭으로 상승하였음. - 시료 내 유청단백질 함량이 증 가함에 따라 명도를 나타내는 L* 수치가 감소하였으며, 육안	

			<p>으로도 명도 차이가 구별이 가능하였음.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Native-PAGE의 분석결과 유청 단백질의 함량이 증가함에 따라 고분자화합물의 형성이 증가하였음.
	단백질 강화우유 모델에서 가공처리가 거대입자 생성, 입자크기 분포변화에 미치는 효과 분석	<ul style="list-style-type: none"> - Particle size analyzer를 이용한 시료의 입자크기 분포 변화 분석 - Size exclusion chromatography(SEC)를 이용한 시료의 크기 분포 변화 분석 - SDS-PAGE를 이용한 peak fractions의 단백질 profile 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 열안정성이 우수한 casein은 살균 후에도 평균 입자의 크기는 0.164 μm로 크게 변화하지 않았으나, 유청단백질의 경우 153 μm으로 100배 이상 증가하였음. - 유청단백질의 비율이 casein과 동일하거나 낮은 경우에는 살균 후에도 입자의 크기가 모두 1 μm 이하인 반면, MC20:WPI80에서는 1 μm 이상의 거대입자 분포가 약 79% 수준으로 증가하였으며, SEC에서도 동일한 경향이 관찰되었음. - SEC peak fraction의 SDS-PAGE 분석결과 가장 큰 거대입자는 유청단백질간의 자체응집으로 생성되며, 다양한 분자량의 casein-유청단백질 복합체의 형성이 이루어짐을 확인하였음.
정밀여과공법으로 제조된 맞춤형 유단백의 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 소화흡수율 평가	단백질의 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 소화흡수율 평가 체계 구축	<ul style="list-style-type: none"> - 문헌조사 - 단백질 <i>in vitro</i> 실험 - 단백질 <i>in vivo</i> 실험 	<ul style="list-style-type: none"> - 단백질 <i>in vitro</i>: 실험소화효소 종류, 양, 및 반응 시간 확립, trypsin 사용하지 않는 것 파악, 단백질 분해율 분석으로 킬달 방법 선정함. - 단백질 <i>in vivo</i> 실험: 동물모델, 기간, metabolic cage 사용, 측정방법 등 확립함.
	유단백질 함량 및 조성 변화에 따른 <i>in vitro</i> 단백질 소화율 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 유단백질 함량에 따른 <i>in vitro</i> 소화율 분석 - Casein 및 whey protein의 비율에 따른 <i>in vitro</i> 소화율 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 유단백 함량에 따른 단백질 소화율은 차이를 나타내지 않음. - Casein 및 whey protein의 비율에 따른 <i>in vitro</i> 단백질 소화율은 casein 비율이 높아질수록 증가됨.
	유단백질의 조성변화에 따른 <i>in vivo</i> 단백질 소화흡수율 및 이용률 평가	<ul style="list-style-type: none"> - Casein 및 whey protein의 비율에 따른 <i>in vivo</i> 단백질 소화흡수율 및 이용률 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - Casein 및 whey protein의 비율에 따른 단백질 소화흡수율은 whey protein의 비율이 증가할수록 높은 값을 나타냄.

				<ul style="list-style-type: none"> - 단백질 이용률은 CW-5:5에서 가장 높은 값을 나타내었으며, 나머지 군에서는 casein의 비율이 증가할수록 높은 값을 나타냄.
2차 년도 (2020)	정밀여과공법을 이용한 맞춤형 유단백질 강화 기술 및 제품화	소화율을 고려한 단백질 강화수준 및 조성 최적화 및 단백질 강화 우유 시생산(3종)	<ul style="list-style-type: none"> - Filtration pilot 설비를 이용하여 casein:whey protein 비율 조정 우유 3종 시생산 - 단백질 농축을 통한 고단백 우유(단백함량 5.5%) 시생산 	<ul style="list-style-type: none"> - MF, UF를 활용한 우유 내 casein:whey protein 비율 조정시유 (8:2, 6:4, 5:5) 3종 제조 - 기존 대비 단백질함량 67% 증량한 (단백함량 5.5%) 고단백우유 제조 완료 - 단백질우유의 품질변화 분석을 위한 살균조건에 따른 (UHT, HTST) 고단백우유 제조
		시제품의 관능평가 및 이화학검사, 미생물 보존검사	<ul style="list-style-type: none"> - 관능평가는 묘사분석으로 진행함 - 이화학적(산도, pH, 비중 등) 특성 및 미생물(일반세균, 대장균)검사는 식품공전 기준으로 진행하였으며, 시료는 10℃ 냉장조건에서 보관함 	<ul style="list-style-type: none"> - 관능평가 결과는 (1)단백함량 3.3% 우유시료 대비 단백질함량 5.5% 시료에서 바디감이 강하게 나타났으며, 분유취가 증가함. (2)단백원료에 따라 단백질과우더를 첨가한 시료의 외관은 황색의 색택이 짙었으며, 정밀여과를 이용한 단백질강화 시료에 비하여 바디감이 강하고 이미 이취가 강함. (3)Casein과 whey 비율에 따른 차이는 whey protein 함량이 증가함에 따라 유크림 풍미가 강해졌으며 바디감이 강하게 나타남. - 시료의 이화학적 특성은 보존기간이 경과함에 따라 소폭 변화하였으나, 식품공전 내 우유 유형의 규격 이내로 확인됨. - 모든 시료에서 대장균군은 검출되지 않았으며, HTST 살균 시료에서 보존 14일 차에 일반세균 규격 이탈. UHT 살균 시료의 일반세균은 보존 18일차 규격 이탈.
		시제품의 품질지표 설정	<ul style="list-style-type: none"> - Micro-Filtration을 통해 생산한 시료의 단백질 함량 및 이화학적 특성 	<ul style="list-style-type: none"> - 생산한 시료 6종의 이화학적 특성(pH, 산도) 및 품질규격 설정(비중, Brix)
		예상 유통기한 설정 진행	<ul style="list-style-type: none"> - 제조한 시료를 	<ul style="list-style-type: none"> - HTST 살균처리 시료 및 UHT

			<p>냉장보관하여 안전계수(1.5배) 고려하여 약 3주간(21일) 균수측정 및 이화학적 검사 실시하여 예상유통기한 설정</p>	<p>살균처리 시료의 미생물 규격 이탈은 각각 14일차, 18일차에 발생.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 안전계수 1.5 적용하여 예상유통기한은 HTST 살균 시료는 9일 및 UHT 살균 시료는 12일 설정.
	<p>정밀여과 공법으로 제조된 단백질강화 우유 시제품의 물리화학적 특성 및 저장안정성 (농후화) 분석</p>	<p>주관연구기관의 pilot plant에서 제작한 시료를 이용한 단백질강화우유의 물리화학적 특성 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 용해도 분석 - 탁도 분석 - 총 칼슘(인) 및 용해성 - Particle size 및 Native-PAGE를 이용한 단백질 변화 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 제조된 고 단백질 우유(MF/UHT, 5.5% 단백질)는 단백질분말을 환원시켜 제조한 RP/UHT보다 유의적으로 높은 용해도 특성을 나타냈음. - Casein과 whey protein의 비율이 조정된 시유(단백질 3.3%)의 유통기간(3주 냉장저장)동안 입자크기 분포의 유의적 변화는 관찰되지 않았음 - 정밀여과로 제조한 고단백우유(단백질 5.5%)의 경우에도 저장기간 중 입자크기 분포의 변화는 관찰되지 않은 반면 RP/UHT는 2주 이상 저장 시 입자크기 분포의 유의적 증가가 나타났음.
	<p>단백질강화우유(살균/멸균 타입)의 저장기간에 따른 농후화 진행 (외관, 점도, 색도, 입도) 여부 분석</p>		<ul style="list-style-type: none"> - 색도 변화 분석 - 점도 분석 - Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)을 이용한 단백질 구조 분석 - Transmission electron microscopy (TEM)를 이용한 미세구조 분석 - Zeta potential을 이용한 저장 안정성 분석 - 시료 및 시판제품의 plasmin activity 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 색도는 육안으로 구별되지 않았음. 단백질 비율을 조정한 시료에서도 점도의 차이는 확인되지 않았음. - 저장 중에도 Zeta potential은 모든 시료에서 절대 값 30 이상을 유지하였으며 농후화는 일어나지 않았음. - TEM 분석결과 RP/UHT 단백질 시료가 정밀여과로 제조한 시료와 비교하여 단백질의 응집의 증가가 관찰되었음. - 단백질 2차 구조 분석 결과 농후화와 관련이 있는 antiparallel β-sheet 구조가 RP/UHT 시료에서 유의적으로 증가하는 것으로 나타나, 정밀여과에 의한 고단백우유의 제조는 농후화의 위험성을 낮추는데 효과적으로 나타났음. - 살균온도가 낮을수록 시판중인 우유의 plasmin 활성은 높았으며, 고단백우유에서는 RP/UHT

				가 MP/UHT 보다 높은 plasmin 활성을 보였음.
		<p>농후화 원인 규명을 위한 단백질 변화 분석, plasmin/plasminogen 활성분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 저장온도와 plasmin의 첨가농도에 따른 탈지유 단백질의 입자크기 분포변화 분석 - 단백질의 분해율 분석 - TEM를 이용한 단백질 미세구조 분석 - 저장기간 중 침전물 변화 분석 - FT-IR을 이용한 단백질 구조 변화 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 낮은 온도(23℃) 저장 시에는 plasmin의 농도에 의존적으로 입자크기 분포가 증가하다가 단백질 분해율이 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타냈음. - 고온(37℃) 저장은 단백질 분해 속도가 증가하여 고농도의 plasmin 조건에서는 응집이 일어나지 않고, 저농도에서 응집이 관찰되었음. - TEM 분석과 침전 단백질 양은 입자크기 분포의 변화와 일치하는 경향을 나타냈음. - 단백질 2차 구조 분석에서 농후화된 시료는 antiparallel β-sheet 비율 증가와 turn 구조 감소와 상관관계가 있는 것으로 나타났음.
	정밀여과 공법으로 제조된 단백질 강화 시제품의 단백질 소화율 및 칼슘 흡수율 평가	Casein 및 whey protein의 비율에 따른 <i>in vivo</i> 소화흡수율 평가(8:2, 6:4, 5:5)	<ul style="list-style-type: none"> - 근력 평가 - 지구력 평가 - 단백질 소화흡수율평가 - 체성분 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - Casein 및 whey protein의 비율에 따른 grip force는 whey protein 비율이 높을수록 높은 값을 나타냄. - Casein 및 whey protein의 비율에 따른 swimming time은 casein:whey protein(6:4)군이 casein:whey protein(8:2)군에 비해 유의적으로 높은 값을 보임. - Casein 및 whey protein의 비율에 따른 단백질 소화흡수율은 whey protein의 비율이 높을수록 증가함. - Casein 및 whey protein의 비율에 따른 체중 대비 제지방량은 casein:whey protein(5:5)군에서 가장 높은 값을 나타냄. 골밀도는 casein:whey protein(8:2)군이 가장 높은 값을 나타냄.
		열처리 조건에 따른 <i>in vivo</i> 소화흡수율 평가(UHT, HTST, powder)	<ul style="list-style-type: none"> - 근력 평가 - 지구력 평가 - 단백질 소화흡수율평가 - 체성분 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 열처리 조건에 따른 grip force는 군 간의 유의적 차이가 나타나지 않았음. - 열처리 조건에 따른 swimming time은 군 간의 유의적 차이가 나타나지 않았음.

				<ul style="list-style-type: none"> - 열처리 조건에 따른 소화흡수율은 MF-UHT군이 다른 군들에 비해 유의적으로 높게 나타남. - 열처리 조건에 따른 체중 대비 체지방량은 군 간의 유의적 차이가 나타나지 않았으나, MF-UHT군이 가장 높은 값을 가짐. - 골밀도는 군 간의 유의적 차이가 나타나지 않았음.
		<p>단백질 함량에 따른 <i>in vivo</i> 소화흡수율 평가 (3.3%, 5.5%)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 근력 평가 - 지구력 평가 - 단백질 소화흡수율평가 - 체성분 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 단백질 함량에 따른 grip force는 5.5%군이 3.3%군에 비해 유의적으로 높은 값을 가짐. - 단백질 함량에 따른 swimming time은 군 간의 유의적 차이가 나타나지 않았음. - 단백질 함량에 따른 단백질 소화흡수율은 5.5%군이 3.3%군에 비해 유의적으로 높은 값을 가짐. - 단백질 함량에 따른 체중 대비 체지방량 및 골밀도는 군 간의 유의적 차이가 나타나지 않았음.
3차 년도 (2021)	농축 미변성 유청단백질 의 분리	유청단백질 분리 공정 설정	<ul style="list-style-type: none"> - 한외여과 및 정용여과를 이용한 고순도 유청단백질 분리 공정 설계 	<ul style="list-style-type: none"> - 정밀여과, 한외여과를 통한 탈지유로부터 유청단백질을 분리. - 정용여과를 통해 미량의 카세

공정 설계를 통한 clear type 유청단백질 음료 개발			인 및 유당을 제거하여 유청단백질의 순도를 높임.
	Clear type 유청단백질 음료의 시제품 제조	- 내열성을 갖는 유청단백 음료 배합비 설정 및 제조	- 열에 취약한 유청단백질의 내열성 부여를 위한 산성 pH 유청음료 배합비 설정 - UHT(140℃, 3~5초) 수준의 열처리를 통한 시제품 제조
	시제품의 관능평가 및 품질관리 지표 설정	- 보존검사 진행을 통한 품질지표 설정	- 시제품 항온보존(25℃)하며 이화학, 미생물학적 검사 진행 - 60일 보존일 동안 이화학, 미생물학적 변화 없음. - 관능을 품질지표로하여 플레이버 풍미가 저하되는 시점을 기준으로 유통기한 설정할 수 있을 것으로 사료됨.
유청단백질 상호작용 조절을 통한 clear type 유청단백질 음료의 응집역제 가공 조건 분석	정밀여과 공법으로 제조된 농축미변성단백질 분석	- 무기질 함량 분석 - 입자크기 분포 및 제타전위(zeta-potential) 분석 - 시차 주사 열량계(Differential scanning calorimeter)을 이용한 단백질의 열적 특성 분석	- 산과 중성 pH 영역에서 각각 높은 안정성을 가진 것으로 표시된 시료는 낮은 칼슘 함량과 상대적으로 높은 인 함량을 나타내었음. - 이러한 무기질 성분 변화는 WPI의 특징적 열안정성과 높은 상관관계를 가지는 것으로 판단됨. - 입자크기 및 분포 분석결과 자체제조 시료의 평균 입자 크기는 99 nm로 나타났으며 PDI 값이 0.49로 높은 입자 크기 분포도가 나타났음. - 제타전위 측정 결과 시료 간에 약간의 차이는 있었으나 일반적인 수준의 값과 유사한 수치를 나타내었음. - 열적 특성 분석 결과 자체 제조 시료는 상대적으로 낮은 변성 온도를 나타내어 낮은 열안정성을 보였으며, 미변성 단백질 함량을 나타내는 엔탈피의 값이 높게 나타났음.
		시료의 열에 의한 단백질 응집 변화 분석	- 혼탁도 측정 - 원심분리에 의한 혼탁도 개선 효과 - 살균조건에 따른 단백질 응집 변화 분석 - pH에 따른 단백질 응집 변화 분석 - Size exclusion chromatography를 이용한 분

			<p>자량 분포 변화 분석</p>	<p>T 조건 이상에서는 등전점 주변에서 gel을 형성하였음.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 다양한 pH 조건에 따른 응집 형성 정도를 측정한 결과 산성 pH 조건에서는 모든 시료가 투명 용액의 기준을 만족하였으나 등전점 주변의 pH에서는 과도한 응집이 나타났음. - 분자량 분포 변화 분석 결과 가열 전 시료의 크로마토그램은 차이를 나타내지 않았으며 열처리 이후 모든 시료가 단백질이 응집하여 분자량 크기의 증가를 나타내었음.
		<p>단백질 응집억제 효과 분석(당 알코올, 아미노산, 초음파 처리)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 소재의 첨가(당 알코올, 아미노산)로 인한 응집억제 효과 분석 - 초음파 처리의 응집억제 효과 분석 - 무기질 및 casein 제거를 통한 응집억제 효과 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 당 알코올의 응집억제 효과 분석 결과 농도 의존적으로 혼탁도의 감소를 보였으나 투명 용액의 기준을 충족하지는 못하였음. - 여러 가지의 아미노산 중 산성 아미노산 처리 시 pH의 변화는 거의 일어나지 않았으나 투명 용액의 기준을 충족하였음. - 단백질 용액의 열처리 전 초음파 처리는 혼탁도의 유의한 감소율을 보였으며 처리 강도나 시간이 증가함에 따라 더 높은 감소율을 보였음. - 무기질 제거 시료의 혼탁도 분석결과 기존 시료대비 효과적인 감소효과를 나타내었으나 투명한 용액의 기준(NTU<50)은 충족하지 못하였음. - Casein 제거를 통한 추가적인 혼탁도 감소율 확인 결과 무기질만을 제거한 군보다 높은 혼탁도 감소율을 나타내었으며 투명한 용액의 기준(NTU<50) 또한 충족하였음.
		<p>단백질 응집에 대한 상호작용 기전 분석(표면소수성, 전체 및 유리 thiol 그룹)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 단백질 응집에 대한 표면소수성 변화 분석 - 단백질 응집에 대한 전체 및 유리 thiol 그룹 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 열처리 이후 단백질의 표면소수성 변화 분석 결과 산성 pH 조건에서는 감소하는 경향을 나타냈으나 중성 pH 조건에서는 증가하는 경향을 보였음. - 모든 시료에서 유리 thiol 그룹이 열처리 이후 증가하는 경

				<p>향이 나타났으며 전체 thiol 그룹은 산성 pH 조건에서는 큰 변화가 나타나지 않았으나 중성 pH 조건에서는 감소하는 경향을 보였음.</p>
		<p>시험관 내 단백질 소화율</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 위 소화 - 장 소화 	<ul style="list-style-type: none"> - 위 단계의 소화 매개변수 분석 결과 자체제조 시료가 소화 속도 및 최종소화율이 유의적으로 높게 나타났음. - 장 단계의 소화에서는 위 단계와 다르게 자체제조 시료가 소화 속도 및 소화율이 상대적으로 비슷하거나 낮게 나타났으나 위와 장을 전반적으로 고려하였을 때 가장 높은 소화율을 나타내었음.
<p>Clear type 유청단백질 음료 시제품의 소화흡수율 평가</p>	<p>식물성과 동물성 단백질의 <i>in vivo</i> 소화흡수율 비교</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 단백질 소화흡수율 및 이용률 평가 - 근력 평가 - 체성분 및 근육무게 - 혈장 내 류신 농도 	<ul style="list-style-type: none"> - 식물성과 동물성 단백질의 단백질 소화흡수율 및 이용률, 근력 평가, 체성분 및 근육무게, 혈장 내 류신 농도는 유의적 차이가 나타나지 않았음. 	
	<p>Clear type 유청단백질 음료의 <i>in vivo</i> 소화흡수율 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 단백질 소화흡수율 및 이용률 평가 - 근력 평가 - 체성분 및 근육무게 - 혈장 내 류신 농도 	<ul style="list-style-type: none"> - 정밀여과로 제조한 whey protein은 시판 whey protein에 비해 단백질 이용률이 유의적으로 높았으나, 단백질 소화흡수율에는 차이가 나타나지 않았음. - 정밀여과로 제조한 whey protein은 시판 whey protein에 비해 8주차 grip strength가 유의적으로 높았음. - 정밀여과로 제조한 whey protein은 시판 whey protein에 비해 제지방 함량 및 골격근 무게가 유의적으로 높았음. - 정밀여과로 제조한 whey protein과 시판 whey protein의 혈장 내 류신 함량은 유의적 차이가 나타나지 않았음. 	

(2) 정량적 연구개발 성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	10		5	5	35			25				5	5		10			
최종목표	2	1		1	38	2	16,900		2				3	2	4	1			
실적	1	0		1	0	2	0		2				3	3	8	4			
달성율(%)	50	0		100	0	100	0		100				100	100	100	100			

(3)

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

Article

Changes in Particle Size, Sedimentation, and Protein Microstructure of Ultra-High-Temperature Skim Milk Considering Plasmin Concentration and Storage Temperature

So-Yul Yun and Jee-Young Imm *

Department of Foods and Nutrition, Kookmin University, Seoul 02707, Korea; soyul9175@naver.com
* Correspondence: jyimmm@kookmin.ac.kr; Tel.: +82-2-910-4772; Fax: +82-2-910-5249

Abstract: Age gelation is a major quality defect in ultra-high-temperature (UHT) pasteurized milk during extended storage. Changes in plasmin (PL)-induced sedimentation were investigated during storage (23 °C and 37 °C, four weeks) of UHT skim milk treated with PL (2.5, 10, and 15 U/L). The increase in particle size and broadening of the particle size distribution of samples during storage were dependent on the PL concentration, storage period, and storage temperature. Sediment analysis indicated that elevated storage temperature accelerated protein sedimentation. The initial PL concentration was positively correlated with the amount of protein sediment in samples stored at 23 °C for four weeks ($r = 0.615$; $p < 0.01$), whereas this correlation was negative in samples stored at 37 °C for the same time ($r = -0.358$; $p < 0.01$) due to extensive proteolysis. SDS-PAGE revealed that whey proteins remained soluble over storage at 23 °C for four weeks, but they mostly disappeared from the soluble phase of PL-added samples after two weeks' storage at 37 °C. Transmission electron micrographs of PL-containing UHT skim milk during storage at different temperatures supported the trend of sediment analysis well. Based on the Fourier transform infrared spectra of UHT skim milk stored at 23 °C for three weeks, PL-induced particle size enlargement was due to protein aggregation and the formation of intermolecular β -sheet structures, which contributed to casein destabilization, leading to sediment formation.

Keywords: ultra-high-temperature (UHT) skim milk; plasmin; storage temperature; particle size; sedimentation; microstructure

Citation: Yun, S.-Y.; Imm, J.-Y. Changes in Particle Size, Sedimentation, and Protein Microstructure of Ultra-High-Temperature Skim Milk Considering Plasmin Concentration and Storage Temperature. *Molecules* **2021**, *26*, 2339. <https://doi.org/10.3390/molecules26082339>

Academic Editor: Carmen Cuadrado

Food Science of Animal Resources

Food Sci. Anim. Resour. **2021**, *September* **41**(5), 855–868
DOI: <https://doi.org/10.5851/ksar.2021.41.5>

pISSN : 2654-0772 eISSN : 2656-0780
<http://www.ksar.or.kr>

ARTICLE Effect of Modified Casein to Whey Protein Ratio on Dispersion Stability, Protein Quality and Body Composition in Rats

Eun Woo Jeong¹, Gyu Ri Park¹, Jiyun Kim¹, So-Yul Yun², Jee-Young Imm², and Hyeon Gyu Lee^{1,*}

¹Department of Food and Nutrition, Hanyang University, Seoul 04763, Korea
²Department of Foods and Nutrition, Kookmin University, Seoul 02707, Korea

OPEN ACCESS

Received: July 9, 2021
Revised: July 29, 2021
Accepted: August 5, 2021

***Corresponding author:** Hyeon Gyu Lee
Department of Food and Nutrition,
Hanyang University, Seoul 04763, Korea
Tel.: +82-2-220-1301
Fax: +82-2-220-1226
E-mail: hylee@hanyang.ac.kr

ORCID
Eun Woo Jeong
<https://orcid.org/0000-0002-9883-9810>
Gyu Ri Park
<https://orcid.org/0000-0003-4121-6644>
Jiyun Kim
<https://orcid.org/0000-0002-6254-8002>
So-Yul Yun
<https://orcid.org/0000-0002-4064-5220>
Jee-Young Imm
<https://orcid.org/0000-0003-3152-7051>
Hyeon Gyu Lee
<https://orcid.org/0000-0002-9141-9469>

Abstract The present study was designed to investigate the effects of protein formula with different casein (C) to whey protein (W) ratios on dispersion stability, protein quality and body composition in rats. Modification of the casein to whey protein (CW) ratio affected the extent of protein aggregation, and heated CW-2:8 showed a significantly increased larger particle (>100 μm) size distribution. The largest protein aggregates were formed by whey protein self-aggregation. There were no significant differences in protein aggregation when the CW ratios changed from 10:0 to 5:5. Based on the protein quality assessment (CW-10:0, CW-8:2, CW-5:5, and CW-2:8) for four weeks, CW-10:0 showed a significantly higher feed intake ($p < 0.05$), but the high proportion of whey protein in the diet (CW-5:5 and CW-2:8) increased the feed efficiency ratio, protein efficiency ratio, and net protein ratio compared to other groups. Similarly, CW-2:8 showed greater true digestibility compared to other groups. No significant differences in fat mass and lean mass analyzed by dual-energy x-ray absorptiometry were observed. A significant difference was found in the bone mineral density between the CW-10:0 and CW-2:8 groups ($p < 0.05$), but no difference was observed among the other groups. Based on the results, CW-5:5 improved protein quality without causing protein instability problems in the dispersion.

Keywords: protein quality; milk protein; casein-to-whey protein ratio; particle size; bone mineral density

Article

Whey Proteins-Fortified Milk with Adjusted Casein to Whey Proteins Ratio Improved Muscle Strength and Endurance Exercise Capacity without Lean Mass Accretion in Rats

Eun Woo Jeong ¹, Gyu Ri Park ¹, Jiyun Kim ¹, Youjin Baek ¹, Gwang-woong Go ^{2,*} and Hyeon Gyu Lee ^{1,†}

¹ Department of Food and Nutrition, Hanyang University, Seoul 04763, Korea; bravoadria@hanyang.ac.kr (E.W.J.); opps112@hanyang.ac.kr (G.R.P.); hjy0601@hanyang.ac.kr (J.K.); jyyj16126@hanyang.ac.kr (Y.B.)

² Korean Living Science Research Center, Hanyang University, Seoul 04763, Korea

* Correspondence: gwgo101@hanyang.ac.kr (G.-w.G.); hyeonlee@hanyang.ac.kr (H.G.L.); Tel.: +82-2-2220-1206 (G.-w.G.); +82-2-2220-1202 (H.G.L.)

Abstract: This study investigated the effects of the casein to whey proteins (CW) ratio in milk on body composition, muscle strength, and endurance exercise capacity in rats. Thirty rats were assigned into five groups, and each treatment was administered for eight weeks: (1) control (isocaloric lactose supplementation), (2) CW8:2 (regular milk), (3) CW6:4, (4) CW5:5, and (5) nitrogen-free (lactose). The milk concentration was converted from a human equivalent dose (400 mL/60 kg body weight/day). All the milk-administered groups showed significantly greater growth performance, including body weight and weight gain compared to the isocaloric lactose control ($p < 0.05$). However, different CW ratios in milk had no effect on growth performance. Additionally, body composition, i.e., lean body mass and adiposity, was not affected by the CW ratio. Interestingly, CW6:4 and CW5:5 had significantly higher plasma branched-chain amino acids concentrations than control and CW8:2 ($p < 0.05$). In addition, CW5:5 showed significantly increased grip strength by 12–24% and time to exhaustion by 8–42% compared to the other groups ($p < 0.05$), indicating that the higher whey proteins ratio improved physical performance. We concluded that whey proteins-fortified milk enhances muscle strength and endurance exercise capacity without altering lean mass in rats.

Keywords: milk protein; endurance exercise capacity; muscle strength; whey proteins-fortified milk; casein to whey proteins ratio

Citation: Jeong, E.W.; Park, G.R.; Kim, J.; Baek, Y.; Go, G.-w.; Lee, H.G. Whey Proteins-Fortified Milk with Adjusted Casein to Whey Proteins Ratio Improved Muscle Strength and Endurance Exercise Capacity without Lean Mass Accretion in Rats. *Foods* **2022**, *11*, 574. <https://doi.org/10.3390/foods11040574>

Academic Editors: Meram Chalamaiah and Xiaofeng Ren

Received: 25 December 2021

Accepted: 13 February 2022

Published: 16 February 2022

1. Introduction

Milk plays an important role in human nutrition as a source of various essential nu-

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Changes in particle size, sedimentation, and protein microstructure of ultra-high-temperature skim milk considering plasmin concentration and storage temperature	Molecules	So-Yul Yun	8	스위스	MDPI	SCI	2021.4.17	eISSN 1420-3049	100%
2	Effect of modified casein to whey protein ratio on dispersion stability, protein quality and body composition in rats	Food Science of Animal Resources	Eun Woo Jeong	41	대한민국	Korean Society For Food Science Animal Resources	SCI	2021.9.1	eISSN 2636-0780	100%
3	Whey protein-fortified milk with adjusted casein to whey protein ratio improved muscle strength and endurance exercise capacity without lean mass accretion in rats	Foods	Eun Woo Jeong	-	스위스	MDPI	SCI	2022.2.16	ISSN 2304-8158	100%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국식품과학회	박규리	2020.7.1.	광주김대중컨벤션센터	대한민국
2	한국식품과학회	윤소율	2020.7.3.	광주김대중컨벤션센터	대한민국
3	한국식품영양과학회	윤소율	2020.10.21.	제주국제컨벤션센터	대한민국
4	한국식품영양과학회	안나현	2020.10.22.	제주국제컨벤션센터	대한민국
5	한국식품과학회	백승민	2021.7.8.	대전컨벤션센터	대한민국
6	한국식품과학회	박규리	2021.7.8.	대전컨벤션센터	대한민국
7	한국식품영양과학회	박규리	2020.10.22.	제주국제컨벤션센터	대한민국
8	한국식품영양과학회	김지윤	2021.10.29.	부산백스코	대한민국

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식
2021	유단백 밸런스 우유의 제조	우유내 존재하는 카세인과 유청 단백질의 비율인 8:2 → 5:5 수준으로 조정 하여 소화흡수를 좋게 하는 것으로 목적으로하는 기술임	100%		미정	기술을 통해 제조되는 우유 이외의 부산물의 활용 방안 추가로 고려되어야 함	무	

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2021.12.13
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(10217)
 출원번호 10-2021-0177575 (접수번호 1-1-2021-1440704-74)
 (DAS접근코드F92C)
 출원인명칭 매일유업 주식회사(1-2017-025889-6)
 대리인성명 특허법인 중협(9-2010-100021-9)
 발명자성명 박준규 양진오 고효영 송태석
 발명의명칭 스화가 잘되고 안정성이 개선된 유청 강화 우유의 제조방법, 및 그를 이용하여 제조되는 우유, 발효우유, 음료 조성물 및 액상 조제유

특 허 청 장

품목제조보고서

성명	생년월일		
보고인	김선휘	1964년 10월 04일	
주소	서울특별시 중랑구 중로1길 50, 에이동 (동약동, 더케이아트관 단락)	전화번호	
영업소	매일유업(주)영력공장	영업허가번호	19810262002
소재지	경기도 평택시 진위면 진위서로 63		
품목의 유형	가공유	등록유형, 품목 참조번호	19810262002458
제품명	유단백 펄런스 우유		
유효기간	제조일로부터 14일		
원재료명 또는 성분명, 배합비율	맛장애 기재		
용도 용법	맛장애 기재		
보관방법 및 포장재질	맛장애 기재		
포장방법 및 포장단위	맛장애 기재		
제품정보	성상 유백색-황색의 액체로서 이미, 이취가 없어야 한다 고열탕·자멸탕 식용 여부 []에 []아니오 []해당없음 영·유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식용 여부 []에 []아니오 []해당없음 살균·멸균 제품의 해당 여부 []비살균 []살균 []멸균 기능성을 표시해 판매하는 제품 해당 여부 []에 []아니오 []해당없음 고열탕살균식품용, 장시용 판매하는 제품 해당 여부		
기타	「축산물 위생관리법」 제25조 및 같은 법 시행규칙 제37조 제1항에 따라 위의 품목을 제조하였음을 보고합니다. 2021년 12월 13일 보고인 김선휘 경기도지사 귀하		

품목보고번호 : 19810262002458

처리부서	경기도 축산산림국 동물방역연계과	처리자성명	유진아	처리일자	2021년 12월 13일
------	-------------------	-------	-----	------	---------------

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	소화가 잘되고 안정성이 개선된 유청 강화 우유의 제조방법, 및 그를 이용하여 제조되는 우유, 발효우유, 음료 조성물 및 액상 조제유	대한민국	매일유업(주)	2021.12.31	10-2021-0177575					100%	

지식재산권 활용 유형

* 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
	√		√							

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		
1	축산물	경기도 축산산림국	품목제조보고	19810262002458	2021.12.13	대한민국

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)]

□ 표준화

○ 국내 표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서				
과 제 명	정밀어과공법을 이용한 맞춤형 유단백질 강화 기술 개발 및 제품화			
주관연구기관	매일유업(주)	참여기관	매일유업(주)	
연구책임자	고호영	연구기간	19년 05월 ~ 21년 12월(총 3년)	
총 정부출연금	452,000,000 원			
해당 기술의 제품출시 유형				
시제품(제품출시 예정)	(√)	기존 제품 공정개선	()	
신제품(제품출시 완료)	()	기 타	()	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
카페인·유청 비율 변경 우유 시료 (5%)		○Filtration pilot 설비를 이용하여 과제 2차년도(20) 목표 시제품 제조 진행 - 각 협동기관에서 시료의 특성에 따른 이화학적 특성 및 in vitro 효능 평가 진행 - 추후 생산 설비 공정 및 수출 등 제품화 타당성 검토 후 제품출시 검토 예정	2020년	90%
* 첨부: 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수				
상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.				
2020년 12월 24일 연구책임자 : 고 호 영 (서명 또는 인)				

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서				
과 제 명	정밀어과공법을 이용한 맞춤형 유단백질 강화 기술 개발 및 제품화			
주관연구기관	매일유업(주)	참여기관	매일유업(주)	
연구책임자	고호영	연구기간	19년 05월 ~ 21년 12월(총 3년)	
총 정부출연금	452,000,000 원			
해당 기술의 제품출시 유형				
시제품(제품출시 예정)	(√)	기존 제품 공정개선	()	
신제품(제품출시 완료)	()	기 타	()	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
유청유료 (가정 : 프로틴워터)		Filtration 설비를 이용한 시제품 제조 - 관능검사 진행 - 보존테스트 진행을 통한 이화학적 특성 및 미생물학적 특성 변화 확인 등	2021년	100%
* 첨부: 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수				
상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.				
2021년 12월 14일 연구책임자 : 고 호 영 (서명 또는 인)				

4대 사회보험 가입자 가입내역 확인서					
발급 번호	20200706859627	발급 일시	2020-07-06 14:05		
주민(외국인)등록번호		성명	박나영		
■ 가입 내역(발급일자 현재기준) 1 / 1					
내역 구분	성명	가입자종별	사업장 관리번호	사업장명칭	자격취득일 (신고접수일)
국민연금	박나영	사업장가입자	84481004660	매일유업(주)	2019.07.15 (2019.07.23)
건강보험	박나영	직장가입자	84481004660	매일유업(주)	2019.07.15 (2019.07.23)
산재보험	미가입	미가입	미가입	미가입	미가입 (-)
고용보험	박나영	사업장가입자	84481004660	매일유업(주)	2019.07.15 (2019.07.23)

4대 사회보험 가입자 가입내역 확인서					
발급 번호	2020111784267	발급 일시	2020-11-11 10:58		
주민(외국인)등록번호		성명	윤용원		
■ 가입 내역(발급일자 현재기준) 1 / 1					
내역 구분	성명	가입자종별	사업장 관리번호	사업장명칭	자격취득일 (신고접수일)
국민연금	윤용원	사업장가입자	84481004660	매일유업(주)	2020.04.20 (2020.05.11)
건강보험	윤용원	직장가입자	84481004660	매일유업(주)	2020.04.20 (2020.05.11)
산재보험	윤용원	사업장가입자	12585002470	매일유업(주)평택	2020.04.20 (2020.04.20)
고용보험	윤용원	사업장가입자	84481004660	매일유업(주)	2020.04.20 (2020.04.20)

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	유단백 밸런스우유	2020년	매일유업(주)		식품	2년		
2	유청 단백질음료	2021년	매일유업(주)		식품	2년		

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내 국외			
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2019년	2020년	
1	계약직 고용	매일유업(주)	1		1
2	정규직 고용	매일유업(주)		1	1
합계			1	1	2

□ 고용 효과

구분		고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	2
		생산인력	

비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]



□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
1	인력양성	2020	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				2				2	2				
2	인력양성	2021	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				2			1	1	2				

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

21

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기초법 시행령」 제 42조제 4항제 2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 막여과 분리 기술을 이용한 유단백 밸런스 우유의 개발	○ 정밀여과, 한외여과를 활용한 유단백질 카세인, 유청의 비율을 조정한 우유의 개발 및 보존테스트를 통한 품질지표 설명 및 유통기한 확인	○ 100
○ 막여과 분리 기술을 활용한 유청단백질 분리 공정 설정 및 Clear type 유청 단백질 음료의 제조	○ 정밀여과, 한외여과, 정용여과를 통한 유청단백질의 분리 공정 설정 및 이를 활용한 Clear type 유청단백 음료 개발 및 관능검사를 통한 품질 수준 확인 등 사업화 가능성 검토	○ 100
○ 유성분의 변화 및 가공조건에 따른 물리화학적 변화 분석	○ 단백질 함량 및 조성, 칼슘 변화에 따른 열안정성 변화 분석 및 가공처리가 입자크기에 미치는 효과 분석	○ 100
○ 정밀여과 공법으로 제조된 단백질 강화 우유 시제품의 물리화학적 특성 및 저장안정성 분석	○ 단백질 강화우유의 저장기간에 따른 농후화 진행 여부 분석 및 원인 규명	○ 100
○ 유청단백질 상호작용 조절을 통한 clear type 유청단백질 음료의 응집억제 가공 조건 분석	○ 유청단백질 상호작용 기전 분석 및 응집억제 소재와 비열처리 가공을 통한 clear type 조건 충족 여부 분석	○ 100
○ 단백질의 in vitro 및 in vivo 소화흡수율 평가체계 구축	○ 유단백질 조성변화에 따른 in vitro 및 in vivo 단백질 소화흡수율 분석	○ 100
○ 정밀여과 공법으로 제조된 단백질 강화 시제품의 단백질 소화흡수율 및 칼슘 흡수율 평가	○ Casein 및 whey protein의 비율, 열처리 조건, 단백질 함량에 따른 in vivo 단백질 소화흡수율 평가	○ 100
○ Clear type 유청단백질 음료 시제품의 소화흡수율 평가	○ 시판 및 정밀여과로 제조한 whey protein의 in vivo 소화흡수율 비교	○ 100

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 막여과 기술을 이용하여 개발한 제품들의 사업화로 이루어지지 못함.
사업화를 위해서는 손익구조의 적합성이 고려되어야 하나 국내 원유대가 높은 실정으로 제품화 시, 발생하는 부산물의 활용방안도 동시에 고려되어야하나, 그 활용 방안에 대한 고민이 추가로 필요한 상황임. 단백질 비율을 조정한 우유, 고단백우유, Clear type 유청단백질 음료의 제품화를 위해 막여과 기술을 활용한 공정 및 배합비의 개발은 하였으나 사업화 미진행으로 실제 기술료 발생하지 못함(유업체 중 정밀여과, 한외여과 가능 설비를 보유하고 있는 업체 부재로 기술 이전에도 어려움이 있음)
-

2) 자체 보완활동

- 매일유업(주)에서 운영 중인 성인 영양식 전문 브랜드 '셀렉스'에 해당 과제에서 개발한 기술 및 기대효과를 공유하여 제품화 가능성 지속 검토
 - 부산물의 활용방안 검토 및 배합비 또는 공정 추가 검토를 통한 사업화 가능성 지속 검토
-

3) 연구개발 과정의 성실성

- 세부목표 달성을 위한 실험 설계 및 수행
 - 과제 진행을 위해 Pilot 막여과 장비를 자체 투자, 도입하여 막여과 기술의 전문성을 향상 이를 통한 전문 인력 양성
 - 연구개발계획서 작성시기에는 국내 시장에서 Clear type 유청단백음료가 판매되지 않았으나, 과제 진행 중 Clear type 유청단백음료가 상용화되어 판매됨. 해당 과제를 통해 개발되는 유청단백음료의 차별화 특징을 마련하고자 실험 계획을 추가 수립하는 등 유의미한 성과를 내기 위해 연구 활동 진행함.
-

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 현재 국내 기술 수준으로는 단백질 강화 음료 제품의 경우, 해외에서 생산되어 수입되는 분리유단백분말(MPI), 농축유단백분말(MPC) 등의 유단백 원료를 용해하여 사용하고 있는 실정임. 우유 단백질은 열에 비교적 안정하지만, 생산 과정 중에 받는 열처리에 의해 변성이 발생하여 섭취 후 체내 소화율, 이용률이 떨어질 우려가 있음.
- 우유에 막여과 기술을 사용하게 될 경우, 분말화 등의 공정을 거치지 않아도 되기 때문에 유단백질의 열에 의한 품질 변화가 적다는 것이 특징이며 이로 인해 체내 소화율이 향상되는 것을 기대할 수 있음.
- 국내에서는 우유에 막여과 기술을 활용하여 제균 혹은 유당을 제거하기 위해 사용 중에 있으나, 단백질 분리(카세인/유청)에 대한 연구는 진행되지 않고 있는 실정임. 해외 유업체에서는 단백질의 분리를 목적으로 막여과 기술을 사용 중에 있으나, 본 연구에서는 이러한 기술을 변형하여 차별화 되는 우유의 개발 공정을 설정하고자 하였음

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 막여과 기술은 실제 유가공업체에서 제균 및 영양성분 분리 목적으로 활용되고 있음. 특히 영양성분 분리는 주관기관인 매일유업(주)에서 생산 중인 ‘소화가 잘되는 우유’ 제품에 적용되어 유당불내증을 유발하는 유당을 제거하기 위해 사용 중임. 이에 추가로 단백질의 분리 및 유단백 비율을 조정하는 기술을 개발함에 따라 고부가가치 우유제품의 개발이 가능할 것으로 예상됨.
- 막여과(정밀/정용여과)로 생산된 천연분리유청단백질의 무기질을 제거하여 열안정성을 향상할 수 있는 가공기술(산을 이용한 무기질의 가용화 및 제거)을 도출하였으며 향후 단백질의 맞춤형 용도 부여에 활용할 수 있을 것으로 생각 됨.
- 최근 식물성 식품 시장의 확대 등, 식물성에 대한 소비자 관심이 증가하고 있으며, 동물성 식품에 대한 특징점 고민이 필요한 상황임. 유단백질의 소화율 및 운동성 관련 결과는 동물성 식품인 우유 제품의 판매 활성화에 기여할 수 있는 결과로 활용 가능할 것으로 예상됨

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE	1건
	비SCIE	
	계	1건
국내논문	SCIE	
	비SCIE	
	계	
특허출원	국내	1건
	국외	
	계	1건
특허등록	국내	1건
	국외	
	계	1건
사업화	상품출시	
	기술이전	
	공정개발	1건
제품개발	시제품개발	

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체 평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 맞춤형혁신식품 및 천연안심소재사업 정밀여과공법을 이용한 맞춤형 유단백질강화 기술 개발 및 제품화 연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 맞춤형혁신식품 및 천연안심소재사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.

[별첨 1]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	119017-3		
사업구분	맞춤형혁신식품 및 천연안심소재사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	맞춤형혁신식품 및 천연안심소재사업				주관
총괄과제				총괄책임자	
과제명	정밀여과공법을 이용한 맞춤형 유단백질강화 기술 개발 및 제품화			과제유형	개발
연구개발기관	매일유업(주)			연구책임자	고호영
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2019.05.20 ~2019.12.31	118,000	78,700	196,700
	2차년도	2020.01.01 ~2020.12.31	157,000	104,700	261,700
	3차년도	2021.01.01 ~2021.12.31	177,000	118,000	295,000
	4차년도				
	5차년도				
	계		452,000	301,400	753,400
참여기업	국민대학교 산학협력단, 한양대학교 산학협력단				
상대국			상대국연구개발기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2022. 02. 23

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
매일유업(주)	부장	고호영

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 고호영

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

확약	고호영
----	-----



I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

○ 우유에 함유되어 있는 단백질은 소화율 및 이용률이 식물성 단백질 보다 우수한 것으로 알려져 있으며, 이를 활용한 단백질 강화 식품이 다수 출시되어 판매되고 있음. 본 과제에서 막여과 기술을 활용하여 개발한 단백질 비율을 조정 우유 및 유청단백음료는 시장 트렌드를 예측하여 상용화 되어 판매되고 있는 제품들과의 차별화된 기술이라는 점에서 우수성과 창의성을 부여할 수 있음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

○ 단백질은 근감소증, 체형관리 등을 목적으로 소비자 관심이 증가하고 있으며 관련 제품 출시가 이루어지고 있음. 단백질 식품 시장의 규모가 증가하고 있으나 단백질 함량을 소구하는 제품이 대다수인 상황에 단백질 및 소화율을 컨셉으로 한 제품 개발을 통해 시장 볼륨을 확대 및 우유 소비 확대에 기여할 수 있을 것으로 예상.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

○ 단백질에 대한 관심이 증가하고 있는 국내외 시장에서 컨셉을 달리하며 유용성 결과를 바탕으로 한 차별화된 단백질 우유(음료) 제품 사용화 가능.
○ 단백질의 이화학적 특성 확인 실험을 통해 우유 제품 저장 기간 중 단백질로 인해 발생할 수 있는 품질 변화를 개선하여 보존성 향상을 통한 생산효율 증대 및 폐기물 저감에 기여 가능.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

○ 세부목표 달성을 위한 실험 설계 및 수행
○ 기술 개발 업무를 통해 전문 인력 양성
○ 과제 진행을 위해 Pilot 막여과 장비를 자체 투자, 도입하여 막여과 기술의 전문성을 향상시키고자함

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

○ 유단백비율(유청함량 증량)을 달리한 우유 개발 기술의 특허 진행
○ 유단백비율을 달리한 우유의 영양성 평가 관련 논문 작성
○ UHT 우유의 저장 중 발생하는 품질 변화의 기작 관련 논문 작성

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 소화율 향상을 고려한 맞춤형 유단백질 정밀여과 분리 기술, 단백질 열안정성 확보가공 공정을 통한 단백질 강화우유 제품화	40%	80%	막여과 기술을 통해 우유내 카세인 단백질과 유청단백질의 비율을 조정하는 기술을 통해 기존에 없던 차별화된 우유 제품을 개발하였으며, 열안정성 테스트를 통해 보다 적합한 공정을 설정하여 시제품 생산하였으나, 사업화가 이루어지지 못함,
○ 막여과를 통한 유청단백질의 분리 및 단백질 응집 억제 공정 설계를 통한 clear type 유청단백질 음료 제품화	20%	80%	정밀여과, 한외여과, 정용여과를 활용하여 순도 높은 유청단백질 분리 공정을 설정하였으며, 열에 취약한 유청단백질의 안정화 공정 설계 및 시제품 생산, 사업화 이루어지지 못함.
○ 정밀여과 공법으로 제조된 단백질 강화우유 시제품의 물리화학적 특성 및 저장 안정성(농후화) 분석	20%	100%	우유의 저장 중 plasmin에 의한 농후화 현상 관련 다양한 실험을 통한 (입자크기 분포변화 분석, 단백질 분해율 분석, 단백질 미세구조 분석 등) 원인 및 기작 규명
○ 단백질 소화율 평가 체계 구축 및 이를 통한 우유 단백질 소화속도 및 이용율 평가	20%	100%	유단백질의 비율, 열처리 조건, 단백질 함량에 따른 in vivo 단백질 소화흡수율 평가 및 시판 및 정밀여과로 제조한 유청단백질의 in vivo 소화흡수율 비교

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 본 과제에서는 막여과 기술을 활용한 신규 우유, 음료 제품의 공정 설정 및 제품화를 위한 연구를 진행하였음. 특히 단백질 소재에 대한 관심이 증가하고 있는 시장 트렌드에 맞추어 우유 단백질의 차별화한 제품 개발을 검토함.
- 막여과 기술을 활용한 유단백질 분리 공정을 설정하고, 분리한 단백질의 특성 확인, 열안정화 실험 결과를 활용하여 시제품을 제조함.
- 시제품의 특징점을 확인하기 위해 단백질의 소화흡수율, 체조성 변화 및 지구력 등을 *In vivo* 테스트하여 영양학적 특성을 확인함.
- 막여과 기술을 다양하게 활용하고 있는 해외 유업체와 달리, 국내 유업체에서는 막여과 기술의 활용이 상대적으로 제한되어 있는 실정이기에, 국내에서 기술에 대한 이해 및 활용도를 높이고 국산 원유를 활용한 고부가가치 제품을 개발하고자 함.
- 과제 결과를 통해 국산 원유만을 이용한 차별화 우유 제조가 가능한 특징을 가지고 있으며 또한 원유 이외의 부재료의 첨가가 없는 무첨가우유/클린라벨 제품으로 제품화가 가능할 것으로 기대함.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 단백질은 근감소증, 체형관리 등을 목적으로 소비자 관심이 증가하고 있으며 관련 제품 출시가 이루어지고 있음. 단백질 식품 시장의 규모가 증가하고 있으나 단백질 함량을 소구하는 제품이 대다수인 상황에 단백질 및 소화율을 컨셉으로 한 제품 개발을 통해 시장 볼륨을 확대 및 우유 소비 확대에 기여할 수 있을 것으로 예상.
- 단백질의 이화학적 특성 확인 실험을 통해 우유 제품 저장 기간 중 단백질로 인해 발생할 수 있는 품질 변화를 개선하여 보존성 향상을 통한 생산효율 증대 및 폐기물 저감에 기여 가능.
- 제품생산을 위한 공정을 설정하였으나, 단백질 비율을 조정한 후 부산물로 남는 카세인, 유당의 활용 방안 마련을 통해 제품의 원가구조를 개선하여 사업화 가능성 재점검 필요.

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분야	식품공학
연구과제명	정밀여과공법을 이용한 맞춤형 유단백질 강화 기술 개발 및 제품화			
주관연구개발기관	매일유업(주)		주관연구책임자	고호영
연구개발비 (천원)	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	452,000	301,400		753,400
연구개발기간	2019.05.20~2021.12.31			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(사업화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 소화율 향상을 고려한 맞춤형 유단백질 정밀여과 분리 기술, 단백질 열안정성 확보가공 공정을 통한 단백질강화우유 제품화	① 막여과 기술을 활용한 영양성분 조정(유단백농축, 유단백밸런스, 분리유청단백) 우유의 제조 공정 설정 및 제품화
② 농축 미변성 유청단백질의 응집 억제 공정 설계를 통한 clear type 유청단백질 음료 개발	② 열에 민감한 유청단백질의 열안정화를 실험(pH 조정, 아미노산 첨가, 당알코올 첨가 등)을 통해 clear 타입 유청단백음료 개발 공정 설정 및 제품화 완료. 상용화 되어 판매되고 있는 유청단백음료 사용 원료와의 소화율 비교 검증을 통한 우수성 확인
③ 프리미엄 고부가가치 유제품 생산을 통한 국내 낙농 산업 경쟁력 확보 및 국민보건향상	② 국산 원유만을 사용한 프리미엄 제품 개발 가능성을 확인하여 국내 낙농산업 경쟁력 확보 가능성 확인 또한, 단백질 소화율, 근육형성 등의 결과로 보아 국민 보건 향상에 기여 가능.

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인 증	학술성과			교육 지도	인 력 양 성	정책 활용·홍보		기 타 (타연구 활용액)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	S M A R T	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문	비 S C I			논 문 평 균 I F	학 술 발 표		정 책 활 용
단위	건	건	건	평 균	건	백 만	건	백 만	백 만	백 만	명	백 만	건	건	건	건	명	건	건	

단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건	
가중치	10	10			5	5	35		25					5	5		10	
최종목표	2	1			1	36	2	16,900	2			3		2	4		1	
연구기간내 달성실적	1				1		2		2			3		3	8		4	
연구종료후 성과장출 계획	1	1					1	16,900	1									

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 맞춤형혁신식품 및 천연 안심소재 연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 맞춤형혁신식품 및 천연 안심소재 연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.