

유산균의 Casein Phosphopeptide(CPP) 생산 및 단백질 분해 활성

조윤희 · 오세종*

전남대학교 동물자원학부

Casein Phosphopeptide (CPP)-Producing Activity and Proteolytic Ability by Some Lactic Acid Bacteria

Yoonhee Cho and Sejong Oh*

Division of Animal Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Abstract

Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption in humans. Lactic acid bacteria (LAB) are capable of synthesis of cell-surface proteinase, which can hydrolyze milk protein and release several types of peptides in the medium. This study was conducted to characterize proteinase of LAB and to evaluate the CPP production from bovine milk. The content of CPP of milk produced by cell-free extract of LAB was determined based on the quantity of decomposed peptide from casein using the *O*-phthaldialdehyde (OPA) method. The proteolytic activity of LAB was assayed using fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled casein. Casein appeared to be a better substrate than whey proteins for extracellular proteinases of LAB. During fermentation, milk proteins were hydrolyzed by extracellular proteinase of LAB, resulting in an increase in the amount of free NH_3 groups. Overall, the results presented here indicate that CPP produced by LAB may be a promising material for novel applications in the dairy industry.

Key words: casein phosphopeptide, casein phosphopeptide, lactic acid bacteria, proteolytic activity

서 론

칼슘은 식이지방의 흡수를 억제하고, 식물성 스테롤의 콜레스테롤 저하 효과를 촉진시킴으로써 칼슘의 섭취량이 증가하면 혈액 내의 콜레스테롤, 지방 등을 저하시켜준다. 그 섭취량이 부족하게 되면 뼈의 성장, 유지에 영향을 주어 골다공증이나 골절과 같은 뼈 질환을 유발하고, 고혈압, 고지혈증 등의 각종 질병에 영향을 준다(Kim, 1993; Lee *et al.*, 1993, 2002; Park and Lee, 2002). 식품 중 칼슘 공급원으로는 생선, 우유, 탄산칼슘 및 채소 등이 있으며 평균흡수율은 우유에 존재하는 칼슘이 가장 높은 것으로 알려져 있다. 우유나 유제품의 칼슘 흡수율이 높은 것은 유당에 칼슘 흡수촉진 작용이 있을 뿐 아니라 casein phosphopeptide(CPP)가 존재하기 때문이라고 밝혀졌다. CPP는 우유의 주요 단백질인 casein에 trypsin 등의 단백질 분해 효소를 작용시켜 얻어지는 물질로 phosphoserine과 같

이 아미노산에 인을 많이 함유하고 있는 것이 특징이다. 또한, CPP는 칼슘이온과 결합하여 가용성 염을 형성하여 소장 내에서 칼슘이 흡수되는 것을 촉진시키기 때문에(Naito, 1986), 유제품 섭취시 칼슘 흡수율이 가장 좋다고 알려져 있다(Kitts and Yuan, 1992; Schaafsma, 1997). CPP는 비교적 안정한 물질로서 식품에 첨가하여도 가공하는 중에 분해 및 풍미의 손상이 거의 없으며, 다양한 소비자의 기호에 맞는 상품화가 가능한 것으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 2008).

유산균은 유당 등 당류를 분해하며 젖산을 50% 이상 생산하는 세균이다. 젖산을 포함하여 유산균에 의해 생산된 각종 대사산물 등은 유해세균의 생육을 저지할 수 있으며 과거부터 식품, 사료 및 의약품 등에 많이 이용되고 있다. 유산균은 *E. coli*나 yeast와 비교했을 때 낮은 proteinase 생산활성을 지니지만 우유에 존재하는 casein을 peptide 수준이나 아미노산 수준까지 분해시켜 이용할 수 있다. 아미노산은 유산균의 생육에 필요한 성분이나, 우유 중에는 소량 존재하기 때문에 casein을 아미노산 수준으로 분해시킬 수 있는 복잡한 proteolytic system을 가지고 있다. 유산균의 proteolytic system은 micelle로 존재하는 casein을

*Corresponding author : Sejong Oh, Division of Animal Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea. Tel: 82-62-530-2116, Fax: 82-62-530-2129, E-mail: soh@chonnam.ac.kr

분열시키는 작용과 큰 peptide를 가수분해 시켜 작은 peptide나 아미노산 상태로 흡수시킬 수 있는 운반 작용을 포함한다(Law and Haandrinkman, 1997).

본 연구는 여러 곳에서 순수 분리한 22종의 유산균을 대상으로 proteolytic 활성을 평가하여 CPP 생산을 극대화시킬 수 있는 유산균을 선발하고자 하였으며 Cottage 치즈 및 요구르트와 같은 발효유제품 제조에 기초자료를 제공할 목적으로 수행하였다.

재료 및 방법

유산균의 분리

김치, 치즈, 요구르트 및 신생아의 분변을 시료로 사용하여 MRS agar(Difco, USA)에 37°C에서 48시간 동안 배양한 다음 유백색 집락을 띄는 균주를 선택하여 순수 분리하였다. 균주의 보존을 위하여 모든 균주를 MRS broth에 3회 계대 배양한 다음, 원심분리(VS-4000N, Vision, Korea; 4,000 rpm, 20 min)하여 세포 침전물에 탈지분유(10%), glucose(2%), yeast extract (0.3%)가 함유된 배지를 제조하여 혼합하였다. 이것을 vial에 1 mL씩 분주하여 동결건조하고 -80°C의 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

유산균의 16S rDNA 추출

유산균은 MRS broth에 접종한 다음 37°C에서 18시간 2차 계대 배양하여 배양액 2 mL을 원심분리기(MICRO 17TR, Hanil, Korea)를 이용하여 8,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 세포 침전물은 0.85% NaCl로 2회 세척하였다. 세척 후, lysozyme(10 mg/mL) 0.5 mL을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 처리하였다. Proteinase K(10 mg/mL) 20 µL와 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) 25 µL를 첨가한 후, 60°C에서 30분 처리하였다. 동량의 Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol(25:24:1)을 첨가하여 현탁한 후, 원심분리기(MICRO 17TR, Hanil, Korea)를 이용하여 14,000 rpm으로 5분 동안 4°C에서 원심분리하여 상층액만 취한 다음 다시 반복하였다. 상층액 양의 1/2 volume의 3 M ammonium acetate(pH 4.8)와 2 volume의 100% alcohol를 첨가하고 -20°C에서 1시간 정치하였다. 14,000 rpm으로 5분 동안 4°C에서 원심분리 하여 세포 침전물을 확인하고, 상층액을 완전히 제거한 후에 70% ethanol 1 mL을 넣고 다시 14,000 rpm으로 5분 동안 4°C에서 원심분리 하였다. 상층액 제거 후, 증류수 100 µL를 넣고 잘 녹여준 다음, RNase A(10 mg/mL) 1 µL를 첨가하고 37°C에서 1시간 처리하였다.

유산균의 동정

유산균의 16S rDNA를 증폭하기 위해 forward primer (341f): (5'-TAC GGG AGG CGA CAG-3')와 reverse primer

(534r): (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')를 사용하였다. PCR premix(Bioneer, Cat No. K-2012)에 증류수 17 µL, forward primer 1 µL, reverse primer 1 µL, DNA 1 µL를 첨가하여 혼합한 후 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 처리 후, 94°C에서 1분, 62°C에서 40초, 72°C에서 40초로 30 cycles을 반복하였으며, 72°C에서 40초로 반응을 종료하였다. PCR 반응산물을 0.8% agarose gel로 전기영동을 실시하여 확인하였으며, PCR product purification kit(Intron, Korea)를 사용하여 정제하였다. DNA 염기서열은 ABI 3730xl 자동 염기서열 분석기를 이용하였으며, 분석결과를 NCBI blast(www.ncbi.nih.gov/blast/)의 database를 이용하여 조사하였다.

유산균 세포 추출물의 제조

MRS broth 200 mL에 유산균 2 mL을 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 다음 원심분리(VS-4000N, Vision, Korea; 3,000 rpm, 15 min, 4°C)하여 유산균 세포를 회수한 후 여기에 50 mM Tris buffer (pH 7.0)를 첨가하여 ice에서 초음파분쇄기(VCX500, Sonics & Materials, USA)를 이용하여 균체를 파쇄하였다. 그 후 다시 원심분리를 하여 상층액을 회수한 다음 500 Da 투석막을 이용하여 4°C에서 48시간 동안 투석한 다음, 다음실험을 위한 시료로 사용하였다.

Sodium caseinate 분해물 및 Casein phosphopeptide(CPP) Enrichment의 제조

Sodium caseinate 분해물 제조는 Adamson과 Reynolds (1995), Corsetti 등(2003)의 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다. Sodium-caseinate(Armor) 12.5 g을 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5) 250 mL에 녹인 후, 투석한 유산균 세포질 상층액 100 µL와 chloramphenicol을 0.1 g/L 넣고 천천히 교반하면서 37°C에서 48시간 반응시킨 다음, -20°C에서 반응을 정지시켜 sodium-caseinate hydrolysate를 제조하였다.

제조된 sodium caseinate 분해물 시료에 2 N HCl를 이용하여 pH 4.6(±0.2)으로 조정한 다음 원심분리(14,000 rpm, 10 min, 4°C)하였다. 상층액을 취하여 2 N NaOH로 pH 7.0(±0.2)으로 조정하고 최종 volume 1%의 calcium chloride를 넣고 잘 혼합한 후 상온에서 한 시간 방치하였다. 최종 volume 만큼 ethanol을 넣고 혼합하여 원심분리(MICRO 17TR, Hanil, Korea; 7,000 rpm, 10 min, 4°C)한 다음 침전물을 회수하여 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

Casein phosphopeptide(CPP) 함량 평가

상기방법으로 동결 건조된 CPP enrichment를 1 g/mL이 되도록 potassium phosphate buffer에 녹인 후 원심분리하여 상층액을 시료로 o-phthaldialdehyde(OPA) 방법을 사용하여 시료중의 CPP 함량을 평가 하였다(Church *et al.*,

1983). OPA 방법은 di-sodium tetraborate 7.62 g과 SDS 0.2 g을 증류수 150 mL에 녹이고, OPA(97%) 0.16 g을 4 mL의 에탄올에 각각 용해시켰다. 그 다음 dithiothreitol 99%(DTT) 0.176 g을 넣고 총 volume이 200 mL이 되도록 증류수로 맞춰 OPA reagent를 만들었다. OPA reagent 3 mL과 단백질 가수분해물 400 μ L을 혼합하여 2분 후에 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 serine를 이용하여 그 함량을 계산하였다.

Casein 분해활성 측정

유산균 배양상등액과 유산균 세포질에 존재하는 proteinase의 활성을 평가하기 위하여 fluorescein isothiocyanate(FITC)가 표지된 casein을 기질로 사용하여 형광 spectrophotometer (Synergy HT, BIO Tek, Winooski, USA)를 이용하여 평가하였다. FITC-labeled casein(Sigma, Product Code PF0100) 기질 20 μ L에 시료 10 μ L를 incubation buffer(20 mM sodium phosphate-150 mM sodium chloride, pH 7.6)에 혼합하여 37°C 항온수조에서 60분간 반응시켰다. 이때, 유산균 배양상등액은 pH를 6.5로 조정하여 바로 실험하였고, 세포 침전물은 50 mM tris buffer(0.5 g/mL)에 용해시켜 실험하였다. 반응후에 trichloroacetic acid(TCA)를 150 μ L 첨가한 후 37°C 항온수조에서 30분 동안 불활성화 시킨 후 10분간 원심분리한 후 상등액 10 μ L와 assay buffer(500 mM tris buffer, pH 8.5) 1 mL을 잘 혼합하여 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 535 nm의 조건에서 측정하였다.

유리 칼슘함량 측정

유산균을 10% 탈지분유에 배양하여 원심 분리한 다음 상등액을 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 시료로 사용하였다. 대조구로는 10% 탈지분유에 lactic acid를 이용하여 pH를 4.5로 조정하여 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 다음 상등액을 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 평가하였다. 칼슘 함량은 Quantichrom™ calcium assay kit (BioAssay systems, USA)를 사용하여 96-well plate에 각

각 5 μ L씩 넣고 612 nm에서 흡광도를 측정하였으며, calcium standard curve와 비교하여 함량을 계산하였다.

결과 및 고찰

유산균의 동정

22종에 대한 유산균을 16S rDNA sequence에 근거하여 동정한 결과는 Table 1에 표시된 바와 같다. MRS agar에 유산균을 도말하여 순수한 colony를 분리한 다음 Gram 염색하여 현미경으로 관찰한 결과 그 형태와 동정 결과가 모두 일치하였다. 선발된 유산균은 유산구균이 10균주, 유산간균이 12균주로 나타났다. 유산구균의 경우 대부분 유이분변에서 채취된 것으로 *Enterococcus faecalis*가 10균주 중 5균주로 나타났고, 유산간균의 경우 *Lactobacillus plantarum*이 12균주 중에서 10균주로 대다수를 차지하는 것으로 나타났으며 이들은 모두 김치에서 분리되었다. 일차적인 동정은 API 50 CH를 이용하였으며, 여기서 얻어진 결과와 16S rDNA 분석 결과와 다소 다른 균주가 있었으나, 16S rDNA 분석결과가 99%의 정확성을 지니는 것으로 나타나 16S rDNA 동정결과를 기초로 선발된 미생물의 속명과 종명을 결정하였다(Table 1).

유산균의 CPP 생산 활성 비교

CPP의 함량 평가는 결합되어 있는 칼슘을 측정하여 간접적으로 평가할 수 있으나, 우유 중에 존재하는 칼슘이 너무 많아 정확한 비교가 어려운 단점이 있다. 이와 같은 단점을 개선하기 위하여 peptide 양을 평가하여 CPP 함량을 추정하기도 하는데, 이는 sodium-caseinate로부터 CPP를 생산할 때 많이 사용되는 방법이다(Corsetti *et al.*, 2003). CPP는 casein 중 serine의 hydroxyl(-OH) 잔기에 인산기가 결합되어 있는 형태이기 때문에 serine의 함량을 조사함으로써 간접적으로 CPP 함량을 평가할 수 있다. 본 실험에서는 CPP의 이러한 특성을 이용하여 22종 유산균을 우유배지에서 배양한 다음, 상등액에 존재하는 유리된 serine의 양을

Table 1. Identification of lactic acid bacteria by 16S rDNA sequence

Strains	Species Identification	Origin	Strains	Species Identification	Origin
A-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KCCM 35464	A-12	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pig feces
A-2	<i>Enterococcus faecalis</i>	Kimchi	A-13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Kimchi
A-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Kimchi	A-14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Kimchi
A-4	<i>Enterococcus faecalis</i>	Kimchi	A-15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Kimchi
A-5	<i>Enterococcus faecalis</i>	Kimchi	A-16	<i>Enterococcus durans</i>	Dairy product
A-6	<i>Enterococcus faecalis</i>	Kimchi	A-17	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Kimchi
A-7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KCCM 35471	A-18	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Infant feces
A-8	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Infant feces	A-19	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KCCM 40464
A-9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KCCM 11322	A-20	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Kimchi
A-10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Kimchi	A-21	<i>Enterococcus durans</i>	Pig feces
A-11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Kimchi	A-22	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Kimchi

KCCM, Korea Culture Center of Microorganisms

조사함으로써 배양 전 serine의 양과 비교하였다(Fig. 1).

본 실험에 사용된 *O*-phthaldialdehyde(OPA) 방법은 염기성 반응 조건에서 환원성 물질 존재 하에 아미노기와 반응하여 강한 형광을 발생하기 때문에 많이 사용되며 빠르고 간단하여 peptide나 유리 아미노산의 함량 측정 방법에 손쉽게 적용할 수 있다(Church *et al.*, 1983).

Serine의 함량을 측정하여 CPP 함량을 간접 추정할 결과 peptide 함량은 0.760 mg/mL로 측정되었다. 비록 본 방법이 CPP 함량을 정확하게 측정 하는 것은 아니지만 손쉽게 사용할 수 있다는 장점이 있다고 판단되었다.

22종의 유산균에서 *E. faecalis* A-4 및 A-5, 그리고 *L. plantarum* A-9균주를 제외한 나머지 19균주는 대조구보다 높은 peptide의 함량을 가지고 있었으며, 가장 높은 균주는 *E. faecalis* A-2 균주로 1.244 mg/mL로 나타났다. 그 밖에도 *L. rhamnosus* A-18 균주가 1.237 mg/mL, *E. faecalis* A-11 균주가 1.171 mg/mL, *L. plantarum* A-10 균주가 1.137 mg/mL로 나타났다(Fig. 1). 그러나 *E. faecalis* A-2 균주는 10^6 cfu/mL 수준으로 접종된 우유발효 실험에서 pH 4.5에 도달하는 시간이 30시간이 걸려 발효유에 적용하기에는 다소 무리가 있었지만 *L. rhamnosus* A-18 균주는 배양 12시간에 pH 4.5에 도달하여 발효유 제조에 무리가 없을 것으로 판단되었다(결과 미제시).

Shihata와 Shah(2000)는 OPA방법을 이용하여 *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*의 유산균에 단백질 가수 분해 활성이 있다고 보고하였으며 Koroleva 등(1983), Klaver 등(1993), Singh와 Sharma(1983)도 유산균에 단백질 가수 분해 활성이 있다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서 평가된 일부 유산균은 간접적으로 CPP 생산 능력이 있다고 판단되며, 이를 이용하여 CPP

생산 능력이 있는 유제품의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

유산균의 Proteolytic 활성 비교

단백질 분해효소는 우유 중의 단백질에 작용하는데, 우유에 존재하는 casein은 가수분해되어 phosphoserine을 함유한 CPP 형태로 분해된다. CPP는 체내에 칼슘 흡수를 촉진시켜 주는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 우유 단백질인 casein에 형광물질인 fluorescein isothiocyanate (FITC)를 표지시켜 측정하는 방법을 사용하였다. 우유 중의 casein은 fluorescein thiocarbamoyl 형태로 FITC와 반응하고, 이 기질이 trypsin, chymotrypsin, elastase, subtilisin, thermolysin 등과 같은 단백질 분해효소에 의해 가수분해 되는 성질을 이용하여 casein 분해 활성을 형광도로 측정하는 방법이다(Twining, 1984).

본 실험에서는 유산균의 proteolytic 활성 측정을 위해 단백질 분해효소 중 하나인 trypsin을 대조구로 하여 casein을 분해시키는 능력을 비교하였다.

유산균은 종류에 따라 다양한 종류의 단백질 분해효소를 생산하는데 endopeptidase, aminopeptidase, dipeptidase 등이 알려져 있으며 단백질 분해효소는 세포질내에도 존재하지만 많은 경우 세포밖으로 분비된다(Law and Haandrinkman, 1997).

본 실험에 사용된 유산균의 경우, 세포내(intracellular) 효소와 세포외(extracellular) 효소로 각각 나누어 proteolytic 활성을 평가하였다. 세포내 효소에 의한 proteolytic 활성은 *E. faecalis* A-6 균주가 가장 높은 것으로 나타났으며, 세포외 효소에 의한 proteolytic 활성은 *L. plantarum* A-14 균주에서 가장 높게 나타났다(Fig. 2). 본 실험 결과 proteinase 활성은 *E. faecalis* A-2와 A-6, *E. durans* A-21

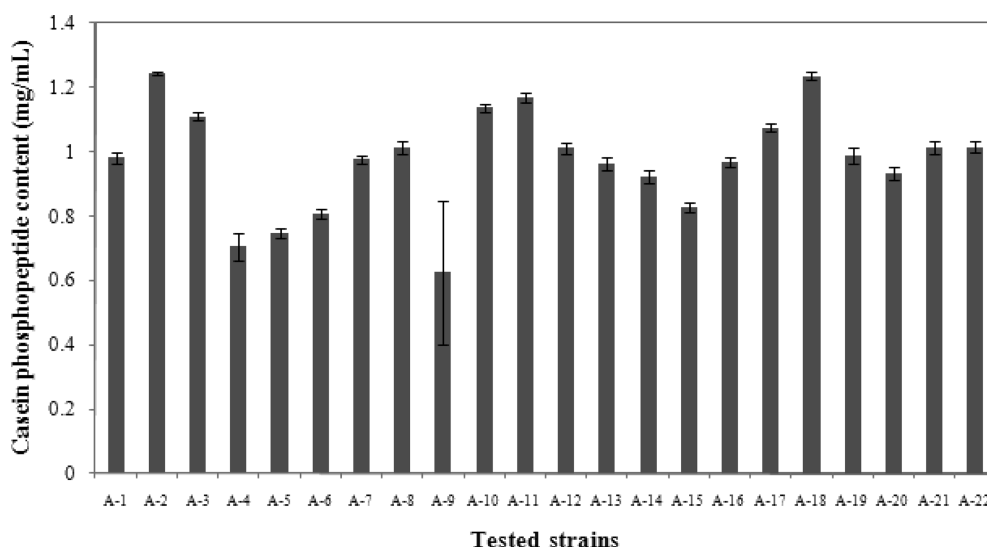


Fig. 1. Casein phosphopeptide (CPP) content of cell-free supernatants prepared from reconstituted skim milk fermented by lactic acid bacteria at 37°C. CPP content calculated by *o*-phthaldialdehyde spectrophotometric method. Results are means of at least four experiments.

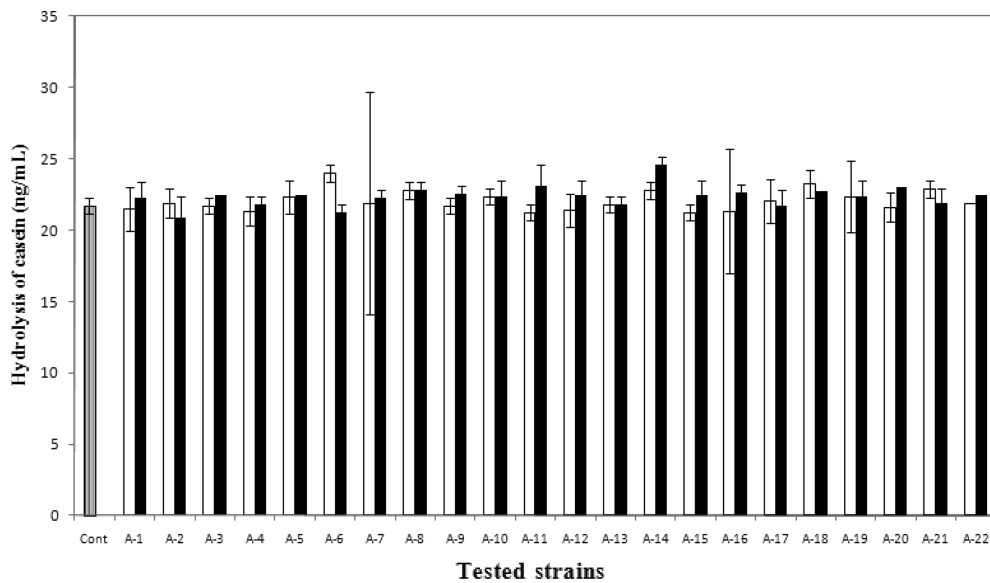


Fig. 2. Hydrolysis of fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled-casein by intracellular extracts (□) and extracellular extracts (■) of 22 strains of lactic acid bacteria. Proteolytic activity measured using FITC labeled -casein and reaction mixture. The excitation wavelength was 485 nm and the emission wave wavelength was 535 nm.

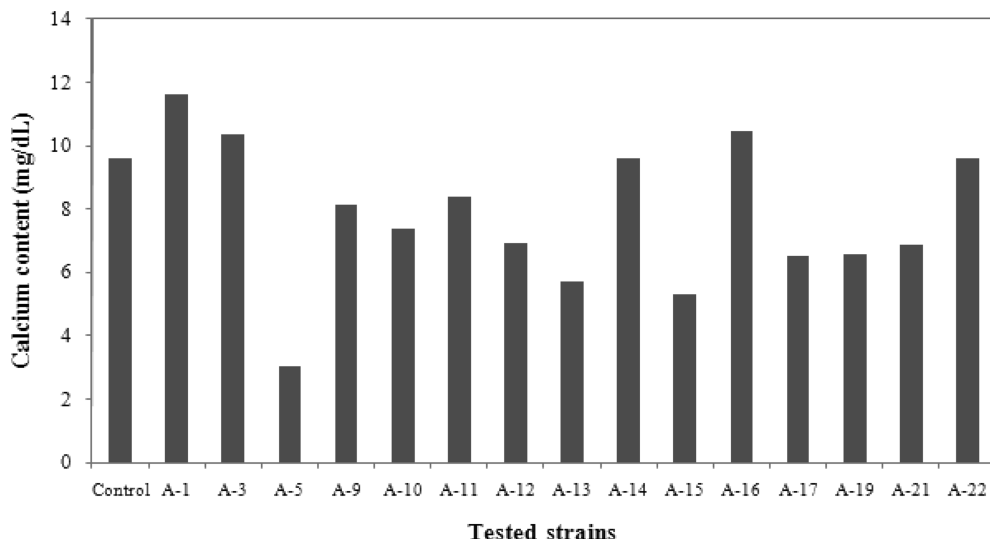


Fig. 3. Comparison of calcium assimilation by cultures of 22 strains lactic acid bacteria. After incubation in 10% reconstitute skim milk, 10 mL of culture were withdrawn and the spent broth was analyzed for calcium content using phenolsulphonaphthalein dye at 612 nm.

균주들의 경우 세포내 활성이 유의적으로 높은 활성을 보였으나, 대부분의 유산균에 있어서 세포내보다 세포외에서 더 높은 것으로 나타났다. 유산균의 proteolytic 활성은 casein을 작은 peptide나 아미노산 수준으로 분해시켜 세포안으로 운반해서 영양물질로 사용하기 때문에 세포외 효소활성이 높다. 유산균의 단백질 가수분해 활성은 궁극적으로 발효제품의 풍미, 조직감 및 쓴맛 등에 결정적인 영향을 미치기 때문에 proteolytic 활성을 인위적으로 조절해서 제품의 품질을 향상시키는 연구가 필요할 것이다(Law and Haandrinkman, 1997).

대조군으로 사용된 trypsin과 유산균의 proteinase 활성을

비교해 보았을 때 그 차이가 크지는 않았지만 세포 침전물이나 배양 상등액에서 모두에서 proteolytic 활성을 보여 이를 이용한 다양한 제품개발을 위한 기초자료로 사용이 가능 할 것으로 판단되었다.

유리 칼슘의 유산균 흡착활성

칼슘은 pH 4.6부근에서 용해성이 최대가 된다. 가용성 상태의 칼슘은 침전되어 분변으로 배설되는 것보다 소장에서의 흡수율이 높다. 본 실험은 유산균에 의해서 칼슘이 얼마나 동화될 수 있는가를 조사하기 위하여 배양 상등액에서의 칼슘 함량을 평가하여 감소 또는 증가된 칼슘

량을 조사하였다. 실험에 사용한 대조구는 사용한 10% 탈지유를 유산균 배양이 아닌 순수한 젖산으로 pH를 조절하여 분석하였다. 대조군의 유리 칼슘함량은 9.604 mg/dL로 측정되었으며, 유산균으로 발효과정을 거친 이후에 가용성 칼슘함량은 몇몇 균주를 제외하고 대부분의 시료에서 이보다 적은 것으로 나타났다. *E. faecalis* A-5 균주의 경우 매우 낮은 유리 칼슘함량을 보여 많은 양의 칼슘이 *E. faecalis* A-5 균주의 세포질로 동화(assimilation)되어 이용되었을 것으로 추정되었다. 그러나 *Leuconostoc mesenteroides* A-1(11 mg/dL), *E. durans* A-16(10.481 mg/dL), 그리고 *L. plantarum* A-3(10.356 mg/dL) 균주의 경우에는 대조구보다 높은 유리 칼슘함량을 나타내었다. 이러한 유리 칼슘의 감소는 세포성분으로 동화되어 이용되었거나 단순 침전에 의한 것으로 생각될 수 있으나, 본 실험에서는 pH를 모두 조정하였기 때문에 단순 침전보다는 유산균 세포에서 동화되었을 것으로 추정되었다. 그러나 유산균 이용성에 대한 기작은 좀더 연구가 진행되어야 명확한 동화기전이 밝혀질 것이다.

요 약

유제품, 김치 및 신생아 분변 등에서 유산균을 분리하여 우유 casein을 분해시켜 배양상등액에 존재하는 serine의 함량을 측정함으로써 간접적으로 CPP 생산을 평가하였다. CPP 생산 능력은 OPA방법으로 측정했을 때 *E. faecalis* A-2 균주가 1.244 mg/mL로 가장 많은 peptide를 생산 하였다. 본 실험에 사용된 유산균의 경우, 세포내 효소와 세포외 효소로 각각 나누어 proteolytic 활성을 평가한 결과 세포내 효소에 의한 proteolytic 활성은 *E. faecalis* A-6 균주가 가장 높은 것으로 나타났으며, 세포외 효소에 의한 proteolytic 활성은 *L. plantarum* A-14 균주에서 가장 높게 나타났다. 가용성 칼슘함량은 *Leuconostoc mesenteroides* A-1(11 mg/dL), *E. durans* A-16(10.481 mg/dL), 그리고 *L. plantarum* A-3(10.356 mg/dL) 균주의 경우에는 대조구보다 높은 유리 칼슘함량을 나타내었다. 따라서 이러한 유산균을 이용한다면 소장 내에서 칼슘 흡수를 극대화시킬 수 있는 장점이 있어 이들 유산균을 이용한 고칼슘 제품 개발이 가능할 것이다.

감사의 글

본 논문은 2006년 농림기술관리센터의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과이며, 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Adamson, N. J. and Reynolds, E. C. (1995) Characterization

- of tryptic casein phosphopeptides prepared under industrially relevant conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **45**, 196-204.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., and Catignani, G. L. (1983) Spectrophotometric assay using *O*-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* **66**, 1219-1227.
- Corsetti, A., Ombretta, M., Fabio, M., Patrick, F. F., and Marco, G. (2003) Production of caseinophosphopeptides from Na-caseinates prepared from the milk of several species by a proteinase of *Lactobacillus helveticus* PR4. *Food Biotechnol.* **17**, 183-192.
- Kim, S. H. (1993) Ca nutrition and osteoporosis in Korea. *Korean J. Nutr.* **26**, 203-212.
- Kitts, D. D. and Yuan, Y. V. (1992) Caseinophosphopeptides and calcium bioavailability. *Trends Food Sci. Technol.* **3**, 31-35.
- Klaver, F. A. M., Kingma, F., and Weerkamp, A. H. (1993) Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Neth. Milk Dairy J.* **47**, 151-164.
- Koroleva, N. S., Lagoda, I. V., Bannikova, L. A., Kosareva, L. V., Popelova, V. V., Rakhimova, N. G., Korelova, D. D., Gudachkova, V. M., and Shkundova, Y. V. (1983) Methods of producing acidophilus cultures. *USSR Patent, S.U.* **100**, 44-74.
- Law, J. and Haandrikman, A. (1997) Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **7**, 1-11.
- Lee, J. W., Hwang, Y. S., Hong, S. N., and Im, H. S. (1993) Effects of dietary calcium levels on blood pressure and calcium metabolism in normotensive female young adults with the hypertension family history. *Korean J. Nutr.* **26**, 728-742.
- Lee, K. S., Shin, Y. S., Jang, Y. H., Kweon, D. H., Prak, K. M., and Jin, Y. S. (2008) Production of casein phosphopeptides using *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* cell immobilization. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**, 59-64.
- Lee, Y. S. and Kim, E. M. (2002) Effect of dietary Ca and Na levels on blood pressure and mineral metabolism in spontaneously hypertensive rats fed high fat diet. *Korean J. Nutr.* **35**, 840-847.
- Naito, H. (1986) The mechanism of enhancement in intestinal calcium absorption with phosphopeptides derived during casein digestion. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **39**, 433-439.
- Park, K. S. and Lee, K. A. (2002) A case study on the effect of Ca intake on depression and anxiety. *Korean J. Nutr.* **35**, 45-52.
- Schaafsma, G. (1997) Bioavailability of calcium. *IDF Bulletin.* **322**, 20-24.
- Shihata, A. and Shah, N. P. (2000) Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* **10**, 401-408.
- Singh, J. and Sharma, D. K. (1983) Proteolytic breakdown of casein and its fraction by lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft* **238**, 148-149.
- Twining, S. S. (1984) Fluorescein Isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Anal. Biochem.* **143**, 30-34.

(Received 2010.1.5/Revised 2010.4.14/Accepted 2010.5.11)