



우유에서 생리활성 펩타이드의 생산

설국환 · 장운기 · 김민경 · 한기성 · 정석근 · 박범영 · 함준상*

농촌진흥청 국립축산과학원

Production of Bioactive Peptides from Milk

Kuk-Hwan Seol, Oun-Ki Chang, Min-Kyung Kim, Gi-Sung Han, Seok-Geun Jeong,
Beom-Young Park and Jun-Sang Ham*

National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

ABSTRACT

Milk-derived bioactive peptides have been found to exhibit various physiological activities such as angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory, antibacterial, and antioxidative effects. Bioactive peptides can be used in the formulation of functional foods, nutraceuticals, and natural drugs because of their beneficial effects. However, the degree of variability in the composition, functionality, and sensory properties of such peptides has greatly limited their use in the food industry. In this review, we discuss the main peptides obtained from milk proteins and summarize findings from previous studies on the production and biological activities of these peptides. In addition, we compare the methods used to separate and identify the structure of the bioactive peptides and highlight current investigations into engineering and implementation of technologies that would allow more efficient isolation of bioactive peptides for functional food production. To improve human health, further molecular biology studies will also be required to elucidate the complex network of interactions between food microorganisms and the digestive system.

Keywords : Bioactive peptides, milk proteins

서 론

우유는 생물학적 및 생리학적 특성을 가진 활성 펩타이드의 전구체로 작용하는 아미노산이 풍부하고 균형 잡힌 공급원이기 때문에, 영양 식품으로 알려지고 있다. 생리활성 펩타이드는 신체 기능이나 상태에 긍정적으로 작용하는 특정 단백질 단편으로 정의되며, 건강에 상당한 영향을 미칠 수 있다(Kitts & Weiler, 2003). 우유 유래 생리활성 펩타이드는 opioid, 면역 증강, 항균, 항산화, 항혈전 등과 같은 다양한 생리활성이 발견되고 있다. 이러한 생리활성 펩타이드는 설사, 고혈압, 혈전증, 충치, 항산화 스트레스, 광물질 흡수

장애 및 면역 결핍의 치료에 사용될 수 있다. 생리활성 펩타이드는 기능성 식품, 치료식, 그리고 천연 약품으로 사용될 수 있다(Haque *et al.*, 2009).

펩타이드는 원래 단백질 아미노산 서열에서는 불활성이거나 특정 효소에 의한 단백질 분해 과정에서 방출되어 대사 과정에서 기능적 특성을 나타내는 특정 아미노산 서열이 생산될 수 있다(Korhonen & Pihlanto, 2006). 생리활성 펩타이드는 우유의 소화과정에서도 생산될 수 있다. 우유의 섭취 후 성분은 소화되고 위장관에서 흡수된다. 분해는 위의 산성 pH 조건에서 펩신에 의해 시작된다. 이 단계 후 분해물은 펩신, 트립신, 키모트립신, 그리고 다른 펩티다제에 의해 다양한 길이의 펩타이드를 생산하기 위해 가수분해된다. 생리적 효과를 발휘하기 위해 생리활성 펩타이드는 흡수 후에 말초기관 같은 목표지점까지 도달하여야 한다. 원래의 단백

* Corresponding author: Jun-Sang Ham, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea. Tel: +82-31-290-1692, Fax: +82-31-290-1697, E-mail: hamjs@korea.kr

질과 펩타이드 단편들이 혈류로 상당량 들어간다는 것을 보여주는 상당한 증거가 있다. 활성 펩타이드는 생물학적 조절자나 신경전달자로 작용한다. 이들은 위장관, 장상피, 또는 흡수 후 혈류에서 다양한 기능을 나타낸다(Shimizu, 2004). 이후 펩타이드는 용모의 펩티다제에 의해 상피세포의 표면에서 더욱 분해되어 더 짧은 펩타이드나 활성이 없는 아미노산으로 분해된다. 이 문제는 위장관 단계에서 생산된 생리활성 펩타이드가 생리적 효과를 생체에서 발휘하기 위해서는 위나 장의 분해에 대해 보호될 필요가 있음을 나타낸다(Roufik *et al.*, 2006). 우유 섭취에 의한 생리활성 펩타이드 생산 및 위장관 전이동안 비특이적 펩티다제에 의한 효소 분해에 대한 정보는 유단백질로부터 실험실적으로 생리활성 펩타이드를 다음과 같은 방법으로 생산하는 기초가 되었다: (1) 소화 효소에 의한 효소적 가수분해, (2) 단백질 분해성 스타터 컬처에 의한 우유의 발효, 그리고 (3) 미생물이나 식품에서 유래된 효소에 의한 단백질 분해.

여러 연구에서 상기 방법의 조합이 짧은 기능성 펩타이드의 생산에 효과적임이 밝혀졌다(Korhonen, 2009). 20년 전부터 우유, 케이스인, 그리고 유청에서 다른 특성을 가진 많은 생리활성 펩타이드에 대한 연구가 이루어졌다. 게다가, 유 단백질은 건강증진 기능성 식품의 원료로 관심이 높아지고 있다.

유 단백질 유래 생리활성 펩타이드의 생산, 기능적 특성, 그리고 응용은 많은 논문(Clare & Swaisgood, 2000; Kilara & Panyam, 2003; Korhone, 2009; Korhone & Pihlanto, 2003, 2006, 2007; Meisel, 2005; Pihlanto & Korhonen, 2003; Silva & Malcata, 2005)에서 지속적으로 리뷰되었다. 특히, 펩타이드 생산을 위한 단백질원으로 케이스인과 유청의 특성(Chatterton *et al.*, 2006; Madureira *et al.*, 2007; Smithers, 2008) 관련과, 최근에는 식품 적용(Hartmann & Meisel, 2007; Korhonen, 2009)과 생리활성 펩타이드(BIOPEP) 데이터베이스가 전구 단백질에서 생리활성 펩타이드를 얻기 위한 목적으로 단백질 분해 공정을 설계하는데 대단히 유용하다는 것을 발견하였다(Minkiewicz *et al.*, 2008). 본 원고에서는 생리활성 유 펩타이드의 생산, 분리 및 구조에 관련한 최근 연구를 소개하고자 한다.

본 론

1. 생리활성 펩타이드의 생산

케이스인을 트립신이나 키모트립신의 조합으로 분해하여 CPPs를 분리하는 방법을 FitzGerald(1988)가 언급한 이래 현재는 papain, thermolysin, 그리고 alcalase 등 몇몇 효소가 CPPs의 생산을 위해 사용된다. 케이스인의 가수분해는 원심분리에 의해 분리될 수 있는 아미노산 서열을 생산하고, UF(ultrafiltration)

에 의해 농축할 수 있다. 일단 제품이 얻어지면 CPPs를 완전히 분리하는 세가지 방법이 적용될 수 있다: (1) 침전을 위해 칼슘 클로라이드를 첨가하고 용액으로부터 CPPs 추출을 위한 에탄올이나 다른 용매를 첨가, (2) 상층액 성분은 크로마토그래피에 의해 CPPs를 분리, (3) 침전을 위해 첨가된 칼슘클로라이드는 CPPs를 함유하는 용액의 농축을 위한 UF로 분리. CPPs 표준방법과 동일한 방법으로 우유에서 많은 펩타이드가 효소에 의한 가수분해, 단백질분해 스타터컬처에 의한 우유의 발효, 그리고 미생물이나 식품에서 유래된 효소에 의한 단백질 분해 방법으로 생산된다. 많은 연구에서 상기 방법의 조합이 짧은 기능성 펩타이드 생산에 효과적이었다(Korhonen, 2009).

유청 발효에서 펩타이드의 방출을 최대화하기 위한 전략으로 추가적인 효소가 사용된다(Matar *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2009; Ortiz *et al.*, 2009; Quiros *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2008; Ueno *et al.*, 2004). 그런데, 유청에서 펩타이드 생산은 기질이 펩타이드 생산을 위한 미생물 성장을 보증할 수 없는 한계가 있지만, 많은 펩타이드가 실험조건 개선과 단백질 첨가를 통해(Matar *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2009; Sinha *et al.*, 2007) 유청 용액의 직접 발효로부터 생산되었다.

미생물 발효와 단백질 분해에 의한 펩타이드 생산은 특별한 주목을 받고 있다. 다른 종류의 유산균 또는 단백질 분해 효소는 제품 생산동안과 제품의 추가적 분해에 의해 많은 생리활성 펩타이드 생산에 사용된다. 발효를 통한 다른 단백질의 방출은 잘 보고되어 있다(FitzGerald & Murray, 2006; Gobetti *et al.*, 2007; Matar *et al.*, 2003). 원료 단백질과 특정 효소의 사용은 활성 펩타이드 생산에 중요한 역할을 한다. 펩타이드의 기능적 및 생물학적 특성은 원 단백질 및 단백질에 작용하는 효소에 따라 방출되는 펩타이드의 특정 아미노산 서열에 달려 있다. 단백질에서 원하는 생물학적 활성 펩타이드의 방출 가능성, 구조 및 특성은 많은 논문에서 논의되었다. 최근에 Dziuba와 Darewicz(2007) 및 Minkiewicz 등(2008)은 유 단백질에서 생리활성 펩타이드에 대한 연구는 단백질의 선택과 특정 치료 효과가 있는 기능성식품을 생산하는 특정 활성을 가진 펩타이드가 풍부한 단백질 체인에서 가수분해가 용이한 결합을 예측할 수 있는 단백질분해 공정 설계가 유망하다고 하였다.

펩타이드 생산에서 고려될 다른 요인은 온도와 pH이며, 이들이 우유 단백질 결합을 촉매하는 효소의 용량에 영향을 미치기 때문이다(Cheison *et al.*, 2010). 뿐만 아니라, 단백질의 분해는 가수분해 시간에 달려 있다. 분해시간의 변화는 펩타이드의 기능성에 영향을 미친다. 우유에서 펩타이드를 생산하는 동안 단백질의 분해시간에 대한 시험은 활성 분해물을 생산하는 효소작용의 가장 적절한 시간에 대한 정보를

준다; 시간이 짧으면 불완전한 가수분해를, 시간이 길면 단백질의 과도한 분해로 불활성 아미노산들을 생산한다. 가수분해 시간과 활성 수준 사이의 관계를 확립하기 위해 우유에서 가수분해물의 분해 동역학곡선(kinetic curve)이 실험을 통해 제시되었다(Brandelli *et al.*, 2008; Hernandez-Ledesma *et al.*, 2002; Miguel *et al.*, 2005, 2007, 2009; Quiros *et al.*, 2007). 동역학 분해를 통해 최대의 생물학적 작용과 최대의 기능적 활성을 가진 아미노산 서열을 생산하는 정확한 효소작용시간을 발견할 수 있다. 특정 분자 크기로 조절하는 것은 식이용도의 단백질 분해물 개발에 필수적 단계이다(Otte *et al.*, 2007). 그런데, 펩타이드의 생성과 안정성은 전통적 유제품에서 조절되지 않으므로 특정 건강 유익성이 보증될 수 없다(Korhonen, 2009). 펩타이드의 조성, 기능성, 그리고 관능적 특성의 변화 정도는 식품산업에서의 사용에 커다란 제한이 되고 있다. 효소적 가수분해가 유단백질 농축 활성 펩타이드의 기능적 특성과 아미노산 조성에 미치는 영향에 대한 연구가 필요하다.

펩타이드의 실험적 생산에 대한 모든 정보는 지난 20년간 다양한 기능성을 갖는 많은 생리활성 펩타이드를 얻는데 기초로 작용했다. 다음은 가장 일반적으로 사용되는 연구기술이다: 단백질 분해효소 단독 또는 다양한 조합에 의한 단백질 가수분해; 가수분해물에서 생물학적 활성의 확인; 구조의 결정과 가수분해물에서 분리된 펩타이드의 활성과 구조 확인을 위한 합성(Haug *et al.*, 2007); 동물 모델과 인체에서 펩타이드의 생리적 활성에 대한 연구; 그리고 생리활성 펩타이드의 상업적 적용.

유 단백질은 가장 잘 알려진 원료물질이지만, 생리활성 펩타이드의 상업적 생산은 적절한 대규모 기술의 부족으로 제한되고 있다(Korhonen, 2009). 가수분해로 얻어진 결과의 대부분은 실험실 반응조에서 얻어졌다(Bouhallab & Bougle, 2004; Bouhallab *et al.*, 2002). 게다가, 효소 비용이 높고 가수분해의 연속공정이 불가능하여 생산 비용을 상승시킨다. 효소적 가수분해와 함께 미생물 발효는 동물이나 식품 단백질에서 생리활성 펩타이드의 생산에 적용할 수 있는 자연적 기술을 제공한다. 현재까지 막 반응조(membrane reactors)는 효소를 회수하고 펩타이드를 대규모로 가공하는 가장 좋은 방법을 제공한다(Korhonen & Pihlanto, 2006). 그런데, 막 반응조에서 부착(fouling)의 문제 때문에 펩타이드 생산에서 연속공정이 사용되지 못하고 있다.

2. 생리활성 펩타이드의 분리

단백질의 절단에 의한 펩타이드의 방출을 통해 여러가지 아미노산 서열이 생산되지만 일부는 분자량이 높고 활성이 없다. 원심분리는 가수분해의 불용성 물질을 제거하는 첫

번째 단계이다. 가수분해의 상층액은 보통 특정 분자량 이하 펩타이드를 분획하기 위해 UF를 사용한다. UF는 또한 펩타이드를 농축하는데도 사용하며(Cheison *et al.*, 2006; Tolkarach & Kulozik, 2004, 2005), 단백질 가수분해물의 활성을 개선하는 추가적인 조절 수단으로 제안된다. 그런데, 막-펩타이드 상호작용에 의한 오염문제가 특히 케이션 가수분해물의 UF에서 나타난다. 최근에, high-resolution membrane이 대량의 활성 펩타이드 여과에서 좋은 해법이 될 수 있음을 발견한 연구들이 있다(Ounis *et al.*, 2008; Saxena *et al.*, 2009). 아미노산 서열이 상이한 용액의 분획에 사용되는 다른 방법으로 액체크로마토그래피(HPLC; Hernandez-Ledesma *et al.*, 2002), 이온교환 크로마토그래피, 고해상 역상 및 모세관 액체 크로마토그래피(2D-LC; Kim *et al.*, 2007; Megias *et al.*, 2009), 그리고 RP-HPLC가 있다. 시료는 컬럼에서 일정한 유속으로 송출되고, 아미노산 분획은 자동으로 수집된다. 현재, 크로마토그래피와 막 분리 기술은 다양한 식품 단백질의 가수분해물에서 생리활성 펩타이드 분획을 농축하는데 적절한 방법으로 보인다. 그런데, 이러한 기술로 분리되는 펩타이드의 양이 작아 생산에 제한이 되고 있다. 이러한 점은 대규모 생산을 위해 새로운 기술 개발이나 최적화가 필요함을 보여준다(Korhonen & Pihlanto, 2006).

3. 생리활성 펩타이드의 구조

펩타이드의 구조 결정은 아미노산 서열을 기술하는데 사용된다. 생리활성 펩타이드의 최근 연구는 새로운 치료 또는 기능성 식품성분 고안을 위한 필수 정보로서, 펩타이드의 구조-활성 관계를 명확히 하는 것을 목적으로 한다. HPLC 크로마토그래피, Edman 분해 및 최근의 분자량분석기(MS)는 펩타이드 동정에 가장 일반적으로 사용되는 기술이다(Ounis *et al.*, 2008; Quiros *et al.*, 2007). 그런데, 크로마토그래피와 MS의 개발은 유 단백질 내에 존재하는 펩타이드의 생리활성과 펩타이드 형성 패턴 결정 및 펩타이드의 구조 해석에 새로운 전기를 열었다. HPLC와 MS는 펩타이드를 분리한 후에 불활 가스와의 충돌로 단편을 만든다. 유도된 단편의 분자량은 소수성, 분자 크기 및 순수 하전에 따라 조성을 분석하는데 사용된다. 얻어진 결과는 이전에 결정된 단백질 단편의 이론적 질량과 비교된다. 이와 유사하게 생리활성 펩타이드의 가능성도 이전에 보고된 서열과의 비교로 결정된다.

다음의 연구는 HPLC-MS 방법에 기초한다. (1) 식품 시료(우유, 요구르트 및 치즈)에 존재하는 펩타이드의 정제 또는 몇 가지 성분의 증량. (2) 원래 또는 효소적으로 분해된 펩타이드의 MS 분석에 의한 펩타이드의 구조적 특성. (3) 가능한 생리활성 서열의 예측을 위한 컴퓨터 모의실험(*In silico*).

(4) 순수한 펩타이드나 모의 펩타이드의 합성. (5) 적절한 생물학적 또는 세포학적 분석을 통한 생리활성의 확인(Careri & Mangia, 2003; Mamone *et al.*, 2009).

MS 같은 새로운 유도 방법들이 새로운 검출법으로 개발되었다. 최근에, 표준 ESI-MS/MS(Electrospray ionization tandem mass spectrometry)에 의한 펩타이드의 분리가 *Enterococcus faecalis*로 발효된 우유에서 펩타이드를 분리하기 위해 연구되었다. 단일의 전구체 이온에서 다단계 질량 분석이 가능한 quadruple ion trap이 적당하였다. 펩타이드의 다른 하전 상태는 하전 역필터링 후 분자량 결정에 의해 확인되었다. 이 방법으로, 가장 좋은 단편은 proline(Pro)에 인접한 전형적 이온으로 검출되는 m/z 364.2와 574.3으로 관찰되었다. 이후 서열 분석과 데이터베이스 검색으로 이 펩타이드는 β -casein

f(133-138; Quiros *et al.*, 2007)로 동정되었다. 이러한 결합 방법의 가능성을 잘 보여주는 것은 물소 모짜렐라 치즈의 생산 동안 유청에서 자연적으로 방출된 펩타이드의 특성분석이다(Simone *et al.*, 2009). 장관 암세포에 발휘되는 면역증강 효과 및 항산화 특성 연구와 함께 이루어진 MS 구조 분석은 케이션 단편에서의 유도와 작용 기작에서 모두 활성이 있는 두 개의 후보 펩타이드를 동정하였다. 우유(Gomez-Ruiz *et al.*, 2002)와 Manchego 치즈 숙성중(Hernandez-Ledezma *et al.*, 2004) ACE 억제 아미노산 서열 형성이 다중반응탐색 기술을 이용하여 관찰되었다. 또한, 많은 ACE 억제 펩타이드가 세 개의 C-terminal 각각에 소수성 아미노산 잔기와 C-terminal 끝에 프롤린(Pro)을 가지고 있다(Meisel, 2005). Pro를 갖는 짧은 서열들이 MS 방법으로 검출되었고, Pro 잔기의 항고혈

Table 1. Peptides isolated from proteins hydrolysate of casein and whey of milk (Urista *et al.*, 2012)

Protein source	Enzymes/microorganisms	Peptide sequence	Biological-physiological activity	References
β -Lg, α -La	Trypsin	LDAQSAPLR, VFK, VGINXW, LAHK	ACE inhibitory	Pihlanto-Leppala <i>et al.</i> (2000)
Na-Casein, β -casein, β -Lg, α -La	Pepsin, trypsin, K-proteinase, thermolysin	LYQQP	ACE inhibitory	Otte <i>et al.</i> (2007)
α ₂ -Casein	Lactobacillus different	LKKISQYYQKFAWPQYLKT	Antibacterial	Lopez-Exposito and Recio(2006)
κ -Casein	<i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i> IFO 13953	AAHPPHLSM	Antioxidative	Kudoh <i>et al.</i> (2001)
β -Lg	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , pepsin and corolase PP	ALIHPP, TGGVL, VLGAMAPL	ACE inhibitory Antioxidative	Hernandez-Ledesma <i>et al.</i> (2002)
β -Casein	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	SLVTPPPGPI	ACE inhibitory	Ashar and Chand(2004)
β -Casein	<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactococcus lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	SLVTP	ACE inhibitory	Gobbetti <i>et al.</i> (2000)
β -Casein	Proteinase from <i>E. faecalis</i>	LHLPLP	ACE inhibitory	Quiros <i>et al.</i> (2007)
α -Casein	Trypsin	PPVAPPPVPGT	ACE inhibitory	Townsend <i>et al.</i> (2004)
β -Lg	Thermolysin	VTP, VTPPPG, LLP	ACE inhibitory	Hernandez-Ledesma <i>et al.</i> (2002)
β -Casein	Pepsin	Not mentioned	ACE inhibitory	Miguel <i>et al.</i> (2009)
Na-Casein	Alcalase	CPP	Antioxidative	Kim <i>et al.</i> (2007)
Na-Casein	Enzyme culture of bacterium plants	Not mentioned	Antioxidative	Phelan <i>et al.</i> (2009)
Na-Casein	Alcalase	PPGIA, PLPLL	ACE inhibitory	Mao <i>et al.</i> (2007)
Whey proteins	Alcalase		Antioxidative	Peng <i>et al.</i> (2009)
β -Lg	N-proteinase	SAPLVT	ACE inhibitory	Ortiz <i>et al.</i> (2009)

Notes: ACE, angiotensin, Lg, lactoglobulin and La, lactalbumin.

압 효과가 ACE 억제 약품과 비교되었다. 탈지유를 *helveticus* 추출물로 가수분해하여 얻어진 발린-프롤린-프롤린(VPP)과 IPP가 ACE 억제 활성이 있음이 발견되었다(Sipola *et al.*, 2001, 2002). 또한, Takano(2002)가 얻은 주목할 만한 결과는 *helveticus* 중에서 분리한 protease로 발효시킨 우유에서 억제 bipeptide (TP)가 검출되었다는 것이다. ACE 억제 펩타이드 활성은 케이신과 유청 밀크에서 다른 서열로 동정되었다. Quiros 등(2007)은 *E. faecalis*로 발효시킨 β -케이신에서 LHLPLP와 LVYFPFG-PIPNSLPQNIPP를 동정하였다. Mao 등(2007)은 알칼라제에 의한 케이신 가수분해에 의하여 β -케이신에서 PLPIL과 κ -케이신에서 PPEIN을 발견하였다. Didelot 등(2006)은 유산균과 분해효소를 사용한 치즈에서 ACE 억제가 우수한 TLAHL을 동정하였다. 반대로 Tsai 등(2008)과 Miguel 등(2009)은 6,000과 3,000 Da 이하 펩타이드에서 ACE 활성이 가장 높다고 하였다. 또한, opioid 펩타이드는 amino 말단에 tyrosine 잔기, 다음에 프롤린, 그리고 세 번째나 네 번째 위치에 보통 tyrosine이나 페닐알라닌 같은 다른 방향족 잔기가 있는데, 이는 opioid 펩타이드가 유청의 발효나 β -casomorphins, α -casomorphin, α -lactorphin, 그리고 β -lactophins의 가수분해로 생산되기 때문이다. 다른 다양한 특성 및 효과와 관련된 특징적 서열이 많은 연구에 나타나 있다. Table 1과 2는 2000년부터 지금까지 케이신과 유청에서 얻어진 펩타이드에 대한 결과를 요약하고 있다.

이런 관점에서, 상기에 기술된 새롭고 보완적인 분석 방법을 결합하면 생리활성에 관련된 구조적 특징과 유 생리활성 펩타이드의 구조-기능 관계를 결정하는데 크게 기여할 것이다(Mamine *et al.*, 2009).

결론

우유와 건강 발효제품에서 분리한 활성 펩타이드에 대한 연구는 최근에 증가하였고, 상당한 성공을 거두었다. 기능적 잠재성이 다양하다는 것이 증명되어 식품 및 제약 산업에서 생산에 흥미를 불러오고 있다. 그런데, 대규모로 펩타이드 분리가 가능하기 위해서는 여러 가지 측면에서 연구되어야 한다. 단백질원 측면에서 치즈의 유청이 펩타이드 생산에 경제적 이점이 있다. 분리공정, 단백질원에 효소의 작용, 생산되는 펩타이드의 활성과 효소처리에 의한 가스분해 과정에서 발생할 수 있는 독성 가능성 등에서 여러 가지 어려움이 발견될 수 있다. 대규모 생산은 단백질의 가수분해나 발효를 위한 반응조를 고안하는 것이 필수적이기 때문에 제한된다. 현재, 생산될 수 있는 가수분해물의 양은 UF와 크로마토그래피로 분리될 수 있는 양에 제한된다. 펩타이드의 안정성, 활성 시간, 그리고 펩타이드 섭취로 인한 부가적 반응에 대한 정보를 얻을 수 있는 *in vivo* 연구가 필요하다. 활성 펩타이드의 아미노산 서열과 기능성에 대한 최신 보고는 특정한 생리적 기능을 가진 펩타이드 생산에 중요하다. 식품 미생물과 소화계 사이의 복합적 상호작용 회로를 더욱 이해하기 위해 분자생물학을 포함하는 연구들이 인체 건강을 증진하기 위해 필요하다.

참고문헌

1. Ashar, M. N. and Chand, R. 2004. Fermented milk containing ACE inhibitory peptides reduces blood pressure in

Table 2. Peptides isolated by milk fermentations, whey and milk products (Urista *et al.*, 2012)

Protein source	Enzymes/microorganisms	Peptide sequence	Biological-physiological activity	References
Whole milk	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus lactis</i>	LNVPGEIVE, NIPPLTQTPV, DKIHPF, VIGSPPEINK	ACE inhibitory	Gobbetti <i>et al.</i> (2000)
Skimmed milk	Lactobacillus extract <i>helveticus</i> ICM1004	VPPIPP	ACE inhibitory	Pan <i>et al.</i> (2004)
Dust milk	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , Pepsin and pancreatin	TPTT	ACE inhibitory/ antihypertensive	Tsai <i>et al.</i> (2008)
Whole milk bovine	<i>Enterococcus faecalis</i>	LHLPLP	ACE inhibitory/ antihypertensive	Quiros <i>et al.</i> (2007)
Whey milk fermented	Lactobacillus different	TGVP	ACE inhibitory	Nielsen <i>et al.</i> (2009)
Whey from a some cheese	Quimotrypsin, pepsin and trypsin	WLAHK, TLAHL	ACE inhibitory	Didelot <i>et al.</i> (2006)
Yogurt from bovine milk	Lactobacillus	Not mentioned	ACE inhibitory	Donkor <i>et al.</i> (2007)
Hydrolysates of commercial cheese	Alcalase	PPEIN, PLPLL	ACE inhibitory	Mao <i>et al.</i> (2007)

- middle-aged hypertensive subjects. *Milchwissenschaft-Milk Science International* 59(7-8):363-366.
2. Nouhallab, S. and Bougle, D. 2004. Biopeptides of milk: caseinophosphopeptides and mineral bioavailability. *Reproduction, Nutrition and Development* 44(5):493-498.
 3. Bouhallab, S., Cinga, V., Ait, O. N., Bureau, F., Neuville, D. and Arhan, P. 2002. Continuous hydrolysis of casein-macropeptide in a membrane reactor: kinetic study and gram scale production of antithrombotic peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(3):7127-7130.
 4. Brandelli, A., Bizani, D., Morrissy, A. C. and Dominguez, P. M. 2008. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. *International Journal of Food Microbiology* 121(2):229-233.
 5. Careri, M. and Mangia, A. 2003. Analysis of food proteins and peptides by chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1000(1-2):609-635.
 6. Chatterton, E. W., Smithers, G., Roupas, P. and Brodtkorb, A. 2006. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin-technical implications for processing. *International Dairy Journal* 16(11):1229-1240.
 7. Cheison, S. C., Schmitt, M., Loeb, E., Tetzl, T. and Ulrich, K. 2010. Influence of temperature and degree of hydrolysis on the peptide composition of trypsin hydrolysed of β -lactoglobulin: analysis by LC-ESI-TOF/MS. *Food Chemistry* 121(2):457-467.
 8. Cheison, S. C., Wang, Z. and Xu, S. Y. 2006. Hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor: I. Characterization of permeate flux and product recovery by multivariate data analysis. *Journal of Membrane Science* 283(1-2):45-56.
 9. Clare, D. A. and Swaisgood, H. E. 2000. Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science* 83(6): 1187-1195.
 10. Didelot, S., Bordenave, J. S., Rosenfeld, E., Fruitier, A. I., Piot, J. M. and Sannier, F. 2006. Preparation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory hydrolysates from unsupplemented caprine whey fermentation by various cheese microflora. *International Dairy Journal* 16(9):976-983.
 11. Donkor, O. N., Henriksson, A., Singh, K. T., Vasiljevic, T. and Shah, P. N. 2007. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal* 17(11):1321-1331.
 12. Dziuba, M. and Darewicz, M. 2007. Food proteins as precursors of bioactive peptides-classification into families. *Food Science and Technology International* 13(6):393-404.
 13. FitzGerald, R. J. 1998. Potential uses of caseinophosphopeptides. *International Dairy Journal* 8(5):451-457.
 14. FitzGerald, R. J. and Murray, B. A. 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology* 59(2):118-125.
 15. Gobetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F. and Addeo, F. 2000. Production of angiotensin-I-converting-enzyme inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology* 66(9):3898-3904.
 16. Gobetti, M., Minervini, F. and Rizzello, C. G. 2007. Bioactive peptides in dairy products. In: Hui Y. H. (ed.) *Handbook of food products manufacturing*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc, pp.489-517.
 17. Gomez-ruiz, J. A., Ramos, M. and Recio, I. 2002. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides in Manchego cheese manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal* 12(8):697-706.
 18. Haque, E., Chand, R. and Kapila, S. 2009. Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. *Food Reviews International* 25(1):28-43.
 19. Hartmann, R. and Meisel, H. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology* 18(2):163-169.
 20. Haug, A., Hostmark, A. T. and Harstad, O. M. 2007. Bovine milk in human nutrition-a review. *Lipids Health and Disease* 6(25):1-25.
 21. Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M. and Recio, I. 2004. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(6):1504-1510.
 22. Hernandez-Ledesma, B., Recio, I., Ramos, M. and Amigo, L. 2002. Preparation of ovine and caprine-lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine-lactoglobulin hydrolyzed with thermolysin. *International Dairy Journal* 12(10):805-812.
 23. Kilara, A. and Panyam, D. 2003. Peptides from milk proteins and their properties. *Critical reviews. Food Science and Nutrition* 43(6):607-633.
 24. Kim, S. Y., Je, J. Y. and Kim, S. K. 2007. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius*

- belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. Journal of Nutritional Biochemistry 18(1):31-38.
25. Kitts, D. D. and Weiler, K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. Current Pharmaceutical Design 9(16):1309-1323.
 26. Korhonen, H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. Journal of Functional Food 1(2): 177-187.
 27. Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2003. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. Current Pharmaceutical Design 9(16):1297-1308.
 28. Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. International Dairy Journal 16(9):945-960.
 29. Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2007. Bioactive peptides from food proteins. In: Hui Y. H. (ed.) Handbook of food products manufacturing. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons Inc., pp.5-37.
 30. Kudoh, Y., Matsuda, S., Igoshi, K. and Oki, T. 2001. Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953. Journal Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 48(1):44-50.
 31. Lopez-Exposito, R. and Recio, I. 2006. Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. International Dairy Journal 16(11):1294-1305.
 32. Madureira, R. A., Pereira, I. C., Gomez, P. A., Pintado, E. M. and Malcata, F. X. 2007. Bovine whey proteins-overview on their main biological properties. Food Research International 40(10):1197-1211.
 33. Mamone, G., Picariello, G., Caira, S., Addeo, F. and Ferranti, P. 2009. Analysis of food proteins by mass spectrometry-based techniques. Journal of Chromatography A 1216(43): 7130-7142.
 34. Mao, X. Y., Ni, J. R., Sun, L. W., Hao, P. P. and Fan, L. 2007. Value added utilization of yak milk casein for the production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. Food Chemistry 103(4):1282-1287.
 35. Matar, C., LeBlanc, J. G., Martin, L. and Perdigon, G. 2003. Biologically active peptides released in fermented milk: role and functions. In: Farnworth E. R. (ed.) Handbook of fermented functional foods. Functional foods and nutraceuticals series. Boca Raton, FL: CRC Press, pp.177-201.
 36. Matar, C., Valdez, J. C., Medina, M., Rachid, M. and Perdigon, G. 2001. Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. Journal of Dairy Research 68(4):601-609.
 37. Megias, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Alaiz, M., Giron, C. J. and Millan, F. 2009. Purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from sunflower protein hydrolysates by reverse-phase chromatography following affinity purification. Food Science and Technology 42(1): 228-232.
 38. Meisel, H., Walsh, D. J., Murray, B. A. and FitzGerald, R. J. 2006. ACE inhibitory peptides. In: Mine Y. and Shahidi, F. (eds) Nutraceutical proteins and peptides in health and disease. Nutraceutical science and technology. New York: CRC Press, Taylor and Francis Group, pp.269-315.
 39. Miguel, M., Contreras, M. M., Aleixandre, A. and Recio, I. 2009. ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysates. Food Chemistry 112(1):211-214.
 40. Miguel, M., Manso, M. A., Lopez, R., Alonso, M. J. and Salaices, M. 2007. Effects and antihypertensive properties of κ -casein macro peptide. International Dairy Journal 17(12):1473-1477.
 41. Miguel, M., Muguera, B., Sanchez, E., Delgado, M. A., Recio, I., Ramos, M. and Aleixandre, M. A. 2005. Changes in arterial blood pressure of milk fermented by *Enterococcus faecalis* CECT 5728 spontaneously hypertensive rats. British Nutritional Journal 3(1):1-9.
 42. Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M. and Darewicz, M. 2008. BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. Journal of AOAC International 91(4):965-980.
 43. Nielsen, S. M., Marinussen, T., Flambard, B., Sorensen, I. K. and Otte, J. 2009. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: effect of bacterial strain, fermentation pH and storage time. International Dairy Journal 19(3):155-165.
 44. Ortiz, P., Gomez, J. A., Rastall, R. A., Mills, D., Cramer, R., Pihlanto, A., Korhonen, H. and Jauregi P. 2009. Production of novel ACE inhibitory peptides from β -lactoglobulin using Protease N Amino. International Dairy Journal 19(2):69-76.
 45. Otte, J., Shalaby, S. M., Zakora, M., Prippa, A. H. and Shabrawy, S. A. 2007. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. International

- Dairy Journal 17(5):488-503.
46. Ounis, B. W., Champagne, P. C., Makhlof, J. and Bazinet, L. 2008. Utilization of tofu whey pre-treated by electro-membrane process as a growth medium for *Lactobacillus plantarum* LB17. *Desalination* 229(1-3):192-203.
47. Pan, D., Luo, Y. and Tanokura, M. 2004. Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysates digested by cell free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM 1004. *Food Chemistry* 91(16):123-129.
48. Peng, J., Tang, C. E., Zhen, W. D. and Chen, Z. 2009. Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) protein hydrolysates. *Food Chemistry* 115(2):672-678.
49. Phelan, S. M., Aherne, B. A., O'Sullivan, D., FitzGerald, R. J. and O'Brien, M. N. 2009. Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells. *International Dairy Journal* 19(5):279-285.
50. Pihlanto, A. and Korhonen, H. 2003. Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research* 47(4):175-276.
51. Pihlant-Leppala, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T. and Korhonen, H. 2000. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research* 67(1):53-64.
52. Quiros, A., Ramos, M., Mugerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Alexandre, M. A. and Recio, I. 2007. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal* 17(1):33-41.
53. Roufik, S., Gauthier, S. F. and Turgeon, S. L. 2006. *In vitro* digestibility of bioactive peptides derived from bovine β -lactoglobulin. *International Dairy Journal* 16(4):294-302.
54. Saxena, A., Tripathi, B. P., Kumar, M. and Shahi, V. K. 2009. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview. *Advances in Colloid and Interface Science* 145(1-2):1-22.
55. Shimizu, M. 2004. Food-derived peptides and intestinal functions. *BioFactors* 21(1-2):43-47.
56. Silva, S. V. and Malcata, F. X. 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal* 15(1):1-15.
57. Simone, C. D., Picariello, G., Mamone, G., Stiuso, P., Dicitore, A., Vanacore, D., Chianese, L., Addeo, F. and Ferranti, P. 2009. Characterization and cytomodulatory properties of peptides from Mozzarella di Bufala Campana cheese whey. *Journal of Peptide Science* 15(3):251-258.
58. Sinha, P. R., Rahda, C., Prakash, J. and Kau, P. 2007. Whey protein hydrolysate: functional properties nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry* 101(4):1484-1491.
59. Sipola, M., Finckenberg, P., Santisteban, J., Korpela, R., Vapaatalo, H. and Nurminen, M. A. 2001. Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Physiology Pharmacy Journal* 52(4):745-754.
60. Smithers, W. G. 2008. Whey and whey proteins-from 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal* 18(7):695-704.
61. Tolkarach, A. and Kulozik, U. 2004. Fractionation of whey proteins and peptides by means of membrane techniques in connection with chemical and physical pretreatments. *IDF Bulletin* 389:20-23.
62. Tolkarach, A. and Kulozik, U. 2005. Fractionation of whey proteins and caseinomacropptide by means of enzymatic cross linking and membrane separation techniques. *Journal of Food Engineering* 67(1-2):13-20.
63. Townsend, R. R., McFadden, C. B., Ford, V. and Cadee, J. A. 2004. A randomized, double-blind, placebo controlled trial of casein protein hydrolysate(C12 peptide) in human essential hypertension. *American Journal of Hypertension* 17(11):1056-1058.
64. Tsai, Y. T., Cheng, P. C., Fan, C. K. and Pan, T. M. 2008. Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chemistry* 106(2):552-558.
65. Ueno, K., Mizuno, K. and Yamamoto, N. 2004. Purification and characterization of an endopeptidase that has an important role in the carboxyl terminal processing of anti-hypertensive peptides in *Lactobacillus helveticus* CM4. *Letters in Applied Microbiology* 39(4):313-318.
66. Urista, C. M., Fernandez, R. A., Rodriguez, F. R., Cuenca, A. A. and Jurado, A. T. 2012. Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International* 17(4):293-318.