



## 생리활성 펩타이드를 함유하는 치즈 유청단백질 가수분해물로부터 기능성 건강음료 개발에 관한 연구: 총설

†유성호<sup>1,2</sup> · †서건호<sup>3</sup> · 천정환<sup>3</sup> · 김현숙<sup>4</sup> · 송광영<sup>3\*</sup> · 임종수<sup>3</sup> · 윤성식<sup>2</sup> · 백현동<sup>1</sup> · †윤여창<sup>1</sup>

<sup>1</sup>건국대학교 동물생명과학대학 축산식품생명공학전공

<sup>2</sup>연세대학교 자연과학대학 생명과학기술학부

<sup>3</sup>건국대학교 수의과대학 및 KU 식품안전센터

<sup>4</sup>건국대학교 수의과대학 수의생리학전공

## Studies on the Development of Improved Health Beverages containing Bioactive Peptide from Hydrolysates of Cheese Whey Protein: A Review

†Sung-Ho Yoo<sup>1,2</sup>, †Kun-Ho Seo<sup>3</sup>, Jung-Whan Chon<sup>3</sup>, Hyun-Sook Kim<sup>4</sup>, Kwang-Young Song<sup>3\*</sup>,  
Jong-Soo Lim<sup>3</sup>, Sung-Sik Yoon<sup>2</sup>, Hyun-Dong Paik<sup>1</sup> and †Yoh-Chang Yoon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dept. of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, College of Animal Bioscience & Technology,  
Konkuk University, Seoul 143-701, Korea*

<sup>2</sup>*Division of Biological Science and Technology, College of Science and Technology,  
Yonsei University, Wonju 220-710, Korea*

<sup>3</sup>*KU Center for Food Safety and College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea*

<sup>4</sup>*Dept. of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea*

### Abstract

Recently, functional foods and bioactive components in foods have drawn the attention and interest of food scientists, nutritionists, health professionals, and general consumers. Bioactive whey protein is a highly concentrated milk serum isolate or concentrate, which is high in protein (80~90% protein by weight), carbohydrate- and sugar-free, and nonfat or very low in fat. Bioactive whey protein enhances both healthy and deficient immune systems. In general, ultrafiltered whey protein contains various whey protein concentrate peptides, which could be used for manufacturing probiotics added to health beverages. Hence, the objective of this paper was to review the published literature on research of new functionally improved health beverages using various bioactive components extracted from milk and dairy products.

Keywords: Cheese whey protein, hydrolysates, health beverage, bioactive peptide

생리활성 펩타이드의 정의는 신체 기능이나 상태에 긍정적으로 작용하는 특정 단백질 단편으로 정의되며, 건강에

상당한 좋은 영향을 미칠 수 있다(Kitts and Weiler, 2003). 특히, 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 흡수장애 및 면역 결핍의 치료에 사용될 수 있다(Fig. 1). 따라서 생리활성 펩타이드

\* These authors contributed equally to this study.

\* Corresponding author: Kwang-Young Song, KU Center for Food Safety and College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Tel: +82-2-450-4121, Fax: +82-2-3436-4128, E-mail: drkysong@gmail.com

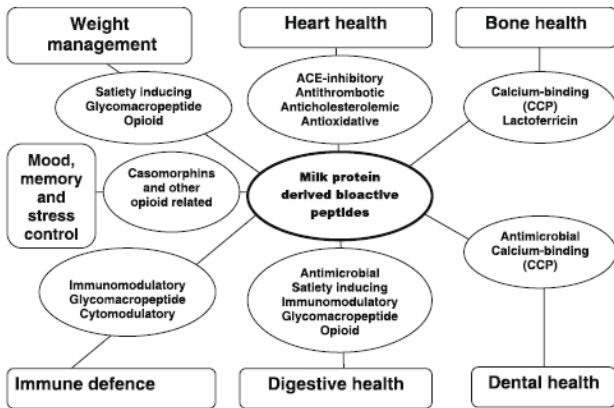


Fig. 1. Functionality of milk protein-derived bioactive and their potential health targets (Korhonen, 2009)

는 기능성 식품, 치료식, 그리고 천연 약품으로 사용될 수 있다(Haque *et al.*, 2009). 최근에는 치즈 제조시 생성되는 유청에서 다양한 생리활성 펩타이드 활용에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다. 유청(whey)은 치즈 제조 시 커드로부터 방출되는 불투명하고 황록색을 띤 액체로서, 최근 치즈 소비가 늘어남에 따라 그 생산량도 늘어나고 있으며, 탈지분유 대용품 등으로 사용되고 있는 유가공 부산물이다(Ronsivalli and Vieira, 1990). 세계적으로 치즈 생산의 증가와 더불어 유청의 생산 역시 증가하는 추세에 있다. 지역별로 보면 유럽 공동체의 생산량이 가장 높으며, 그 다음이 미국, 소련, 프랑스 그리고 독일의 순이고, 한국의 생산량은 아직까지는 많지 않으나 앞으로 증가될 것으로 예상된다(Song and Oh, 2012). 과거에는 폐수처리 되거나 사료용으로 사용되었던 유청이 최근에는 식품의 재료, 첨가물 및 고급식품으로의 이용이 적극적으로 검토되고 있다(Marshall, 1994; McIntosh *et al.*, 1998).

유청의 이용은 과거에는 액체상태로 동물에게 사료로 이용되었으나, 그 후 중세시대에는 의약품, 정력제, 피부 방한제로써 이용하였으며, 화상을 완화시키거나 체력을 회복시키고, 질병을 치료하는 의약품이나 연고의 구성성분으로서도 이용된 것으로 기록되었다(McIntosh *et al.*, 1998). 유청에는 두 가지인 sweet whey와 acid whey로 분류되는데, sweet whey는 rennet type enzyme을 사용한 제품의 제조 부산물이고, acid whey는 pH를 5.1 이하로 산성화시켜 응고물을 형성시켜 만드는 부산물이다(Park *et al.*, 1988; Park and Hong, 1992). 최근 유청에 관한 많은 연구와 이를 이용한 여러 제품들이 소개되고 있는데, 주류 개발(Rory, 1981), 빵, 음료, 소시지 및 발효식품들의 개발(Smith, 1976), 음료, 제과류에의 이용(Ernest, 1982), 유아식(Fox, 1978)과 특이치방식이에의 이용(Creig, 1979)에 관한 연구가 보고되었다.

유청은 기능적, 영양적, 생활동적 기능 등의 다양한 기능을 내재한 단백질이 풍부한 혼합물을 포함하고 있고, 한외여과 시 유청단백질로 생산 및 제조가 가능하며(Jayaprakasa *et al.*, 1993), 한외여과에 의한 농축은 가열농축에 비하여 에너지가 절약되고, 단백질이나 비타민의 열에 의한 변성을 막을 수 있으며, 농축을 함으로써 관리가 용이하고 부패를 방지할 수 있다(Yan *et al.*, 1979).

유청단백질은 다양한 기능적, 영양적 및 생리활성적 기능을 가지는 단백질이 풍부한 혼합물로서(Yamauchi, 1992), 주로 branched chain amino acid(측쇄아미노산)와 tryptophan이 풍부하여 스포츠 영양 제품(Smith *et al.*, 1996), 대장암의 예방 효과(Gallaher and Schmidl, 1998), 콜레스테롤 조절(Anon, 1994) 및 면역 증강(Bounous *et al.*, 1993) 등의 다양한 기능을 가지고 있는 것으로 보고된 바 있다. 따라서 우수한 영양적 가치와 물리적 기능 특성 때문에 널리 이용되어온 유청단백질이 최근에는 생리활성 펩타이드 생산 소재로 주목을 받게 되었고, 이에 대한 연구가 전 세계적으로 활발하게 진행되고 있다(Fig. 2).

현재까지 우유 단백질 유래 생리활성 펩타이드는 opioid peptide(Zioudrou *et al.*, 1979), 칼슘 흡수 촉진 펩타이드(Kitts and Yuan, 1992), 혈압 강하 펩타이드(Pihlanto-Leppälä *et al.*, 1998), 면역 증강 펩타이드(Migloire-Samour *et al.*, 1989), growth factor(Azuma 등, 1989), 혈소판응집저해 펩타이드(Meisel and Schlimme, 1990) 등이 있다. Angiotensin converting enzyme (ACE)는 angiotensin I의 C-말단 dipeptide(His-Leu)를 절단하여 활성형인 angiotensin II로 전환시켜 혈압을 상승시킴과 동시에 생체 내에서 혈압강하 작용을 갖는 bradykinin을 분해한다. 고혈압은 이 분해효소를 활성화시키는 것이

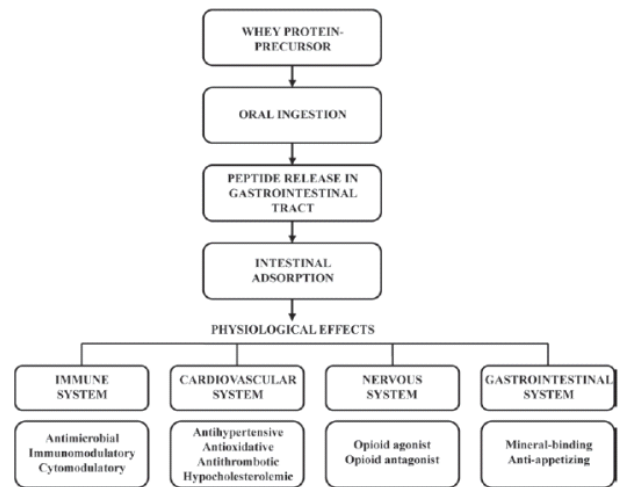


Fig. 2. Physiological framework of bioactivity of whey peptides (Madureira *et al.*, 2010).

원인이 된다고 널리 알려져 있으므로 이러한 ACE의 작용을 억제함으로써 고혈압 예방이 가능한 것이다.

한국식품공전의 건강기능성 식품의 정의는 “인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조, 가공한 식품”이며, 여기서 기능성이라 함은 “인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다.”라고 규정하고 있다. 경제성장과 함께 건강 지향적 식품에 대한 선호도가 증가하고 있어 다양한 형태의 기능성 음료들이 상품화 되고 있으나, 예를 들면, 저칼로리 식품섭취에 의한 비만, 당뇨병 등 성인병 예방 치료에 효능이 있는 건강 보조식품에 대한 선호도가 증가하는 추세이고, 더불어 고령화 사회, 국민소득의 증가와 질병 예방 차원에서 건강에 대한 관심이 커지고 있을 뿐만 아니라, 건강기능성식품에 관한 법률이 시행되어 더 많은 대기업이 건강보조식품 시장에 진출할 전망이다. 아울러 최근의 well-being 붐을 타고 life cycle에 맞는 제품, 쉽고 간편하게 섭취할 수 있는 제품들을 선호될 것이다 (Noh, 1999). 하지만 한국에서는 유청과 이를 이용한 식품 개발에 관한 연구가 매우 부족한 실정이다.

따라서 본 총설 논문에서는 유청단백질을 단백질 가수분해 효소로 처리한 가수분해물을 한외여과로 농축한 후, 다양한 probiotic 유산균과 배합하여 건강기능적인 면에서 효과가 있는 기능성 음료 제품의 개발 이용가능성을 알아보고자 이미 발표된 다양한 문헌 등을 정리하여 서술하였다.

## 유청(Whey)

유청(chese whey)은 치즈 제조 시 나오는 액체 성분으로 불투명한 황록색을 띠고, 고형분 함량 6.0~6.5%를 함유하고 있는 물질이다. 특히 비타민, 무기물질을 풍부하게 함유하고 있는 높은 영양가를 가지고 있다(Kosikowski, 1982). 전 세계적으로 치즈 산업이 발달할수록 유청의 생성량은 많아지게 되어, Ronsivalli와 Vieira(1990)는 미국과 유럽에서 생산되는 많은 유청 생산량을 보고하였으며, 1991년에 한국에서는 8,500 ton이 생산되었다 (Bae *et al.*, 2000). 유청에는 단백질과 유당, 비타민, 무기질, 필수아미노산, 유산 및 효소들이 포함되어 있고, 우수한 유효작용, 거품 생성, 기포 형성, 젤라틴화, 용해성 등 여러 기능적인 특성으로 인하여 과거에는 폐기 처분되었던 물질이 최근에는 새로운 식품재료와 식품첨가물로서 이용가치가 높다(Kee and Hong, 1993ab; Kim *et al.*, 1994). 유청은 액체 상태로 동물에게 처음 이용하였고, 그 후 중세시대에는 의약품, 정력제, 피부 방향제로써 이용되었으며, 화상을 진정시키거나 체력을

회복시키고 질병을 치료하는 약제나 연고의 구성 성분으로도 이용하였다고 한다(Kosikowski, 1979; McIntosh *et al.*, 1998). 또한 임상효과로는 해독작용에 관여하는 간의 보호, 위질환 치료, 통풍의 치료, 그리고 혈장 콜레스테롤을 낮춰 동맥경화를 간접적으로 치료하는 등 매우 다양하다고 한다 (Yoon *et al.*, 2010).

치즈 유청농축물에 포함된 당단백질 중에 immunoglobulin, lactoferrin과 같은 물질은 면역부활효과작용이 보고된 바 있으며(Yoon, 1991), 유청의 당을 다량 포함한 부분에 존재하는 glycoposphopeptide의 경우는 면역부활당단세포에 대하여 강한 증식활성을 나타낸다고 보고되었다(Yeum *et al.*, 1997). 유청을 농축, 건조하는 이외에 각종 membrane을 이용하여 유청성분을 농축 또는 분리시킬 수 있는 한외여과 (ultrafiltration), 역삼투(reverse osmosis), 전기투석(electrodialysis) 등의 막분리 방법을 사용하는 기술이 많이 개발되어 사용되고 있으며, 이와 같은 여러 가지 방법으로 제조된 각종 유청 제품은 그 용도가 매우 광범위하다. 유청을 역삼투 방법으로 염류를 제거하고 농축한 후, 건조된 탈염 유청분말 (desalted whey powder)은 유당, 유청단백질을 보강하기 위해 많이 사용되고, 기타 육가공, 제과, 제빵 그리고 청량음료 등 식품공업의 원료 또는 첨가물로 이용된다. 역시 역삼투 방법으로 유당성분을 분리하면 양질의 유청단백질을 얻을 수 있으므로 식품 공업에 다양하게 사용될 수 있고, 특히 유당불내증을 방지할 수 있다. 또한 분리된 유당은 알코올 생산을 위한 탄수화물 공급원 및 효모 생산을 위한 기질로서 사용되기도 한다(Kee and Hong, 1993ab; Kim *et al.*, 1994).

현재 몇몇 외국에서는 유청 투과액을 원료로 하여 *Kluyveromyces fragilis*에 의해 알콜 또는 알콜음료를 공업적으로 생산하고 있고, 유청 투과액에 효모를 성장시켜 세포를 분리, 건조시키거나, 배양액을 모두 농축, 건조했을 때 조단백질의 함량이 45%에 이르기 때문에 이것을 사료 자원으로 이용할 수 있으며, 식품으로도 이용 가능하다. 또한 lactic acid나 penicillin과 같은 유기화합물을 생산할 수 있으며, 유당을 glucose나 galactose로 분해하여 syrup으로 만들어 이용할 수 있다. 유청을 한외여과 방법으로 농축한 농축 유청이나 이를 건조한 유청 분말은 다시 치즈 제조 시 첨가하거나, 여러 식품 제조 시 원료로 사용할 수 있고, casein 제조 시 부산물로 나오는 acid whey powder는 Ricotta cheese 등 몇 종류의 치즈 응고제로 사용되기도 한다(Kim *et al.*, 1994). 몇 년 전만 해도 유청에서 유래한 상업적 제품들은 당 또는 산유청, 변형 농축물 종류의 유청제품에 불과했다. 그러나 현재는 식품, 사료, 제약, 화장품 산업에서 매우 다양한 형태의 제품으로 생산되고 있다(Lagrange, 1998). 이러한 원료 유청에 다양한 기술을 적용하여 여러 가지 제품이 만들어지고 있다. 식품

에 주로 이용되는 유청제품에는 유청분말(whey powder), 저유당 유청(reduced lactose whey), 저염유청(reduced mineralized whey), 유청단백질(whey protein concentrate) 그리고 유당(lactose)이 있으며, 최근에는 이러한 제품을 원료로 이용한 기능성 제품들이 판매되고 있다(Yoon *et al.*, 2010).

## 유청단백질(Whey Protein)

우유단백질의 18%를 차지하는 유청단백질은 우유 구성 성분 중 탈지유를 20°C에서 pH 4.6으로 조정하였을 때 침전되는 casein을 제거한 나머지 용액 즉, 유청(whey 혹은 serum)에 포함된 성분 중의 하나이다(Morr and Ha, 1993). 유청단백질은 구상 단백질로써 pepsin과 trypsin 등의 단백질 분자 효소에 의해 쉽게 분해되지 않기 때문에, 우유 allergy의 주요 원인이 될 수 있다(Kananen *et al.*, 2000). 반면, 물리적 처리로서 열처리는 유청단백질의 소화율을 개선할 수 있으며, 기능적 특성에도 영향을 줄 수 있어 유제품에 다양하게 적용되고 있다(Singh and Newstead, 1992). 또한 유청단백질은 90°C에서 15분간 열처리 후 효소 처리하는 것이 바람직하고(van der Ven *et al.*, 2001), 열에 의해 쉽게 변성되어 불용화 되는 특성을 가지고 있다(Hong and Creamer, 2002). 유청은 비단백 성분을 제거하여 양질의 유청단백질을 농축시켜 건조한 농축유청단백질(WPC: whey protein concentrate)과 분리유청단백질(WPI: whey protein isolate)이 있다. 농축유청단백질에는 여과, 투석, 기타 물리적 분리 기술을 통하여 단백질 함량을 34%부터 80% 사이로 농축시킨 다양한 제품(WPC34, WPC50, WPC75, WPC80)들이 있고, 분리유청단백질은 단백질의 함량이 90% 이상인 유청제품을 말한다. 탈염 유청분말은 유당과 유청단백질이 농축된 형태로 되어 있기 때문에, 조제분유 제조 시 우유성분에 유당과 유청단백질을 보강하기 위해 많이 이용되고 있으며, 육가공, 제과, 제빵 그리고 청량음료 등 식품공업의 원료 또는 첨가물로 이용된다. 또 역삼투압 방식으로 분리된 유당은 유제품, 제빵, 육제품, 스낵, 제과 및 여러 가지 식품과 영양제에 다양한 용도로 이용되고 있다(Lagrange, 1998).

유청에 함유된 주요 단백질로는  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, bovine serum albumin, immunoglobulin, lactoferrin, transferrin 및 무기질이 많이 함유되어 있다(Morr and Ha, 1993).  $\beta$ -lactoglobulin은 유청단백질의 성분 중 가장 많이 함유되어 있고, 162개의 아미노산 잔기로 이루어진 분자량 18.4 kDa의 단백질이며, 중성 pH에서 dimer로서 존재한다(Ye *et al.*, 2000). 또한 native  $\beta$ -lactoglobulin은 Cys66~Cys119 및 Cys66~Cys160 위치에 두 개의 disulfide bond(S-S)와 Cys121 위치에 하나의 free sulphhydryl group(-SH)을 가지며(Gezimati *et al.*, 1996),

bovine  $\beta$ -lactoglobulin은 Asp64와 Val118의 위치가 서로 다른 유전적 변이체(genetic variant) A와 B가 있다(Hambling *et al.*, 1992). 순수 정제된  $\beta$ -lactoglobulin은 열에 강하고, 강산성의 조건하에서도 견고한 분자구조를 유지하고 있어, 위내에서 pepsin에 의해 쉽게 소화되지 않을 뿐만 아니라 pepsin과 chymotrypsin에 의해 쉽게 분해되지 않아, 가수분해율이 1% 미만인 결과가 나왔다(Reddy *et al.*, 1988; Asselin *et al.*, 1989). 따라서 유청단백질을 함유한 조제유를 먹이는 경우, 이러한 모유 중에는 거의 존재하지 않는 외래성 단백질이기 때문에 우유 allergy를 일으키는 주요 원인물질(allergen)로 알려져 있다(Kinsella, 1988; Papiz *et al.*, 1996). 이와 같이  $\beta$ -lactoglobulin의 난소화성에서 기인하는 바람직하지 못한 특성을 변화시키기 위해서 변화를 유도하는 물리적 변화와 효소적 가수분해가 이루어져야 한다.

$\alpha$ -Lactalbumin은 열에 매우 안정한 유청단백질로 간주되어 왔으며, 실험 결과  $\alpha$ -lactalbumin이 pH 6.7과 65.2°C에서 변성되고, 변성의 80%가 냉각되면 다시 자연상태로 돌아간다고 보고하였다(Ruegg *et al.*, 1977).  $\alpha$ -Lactalbumin은 62~63°C에서 변성되고, pH 6.5에서 냉각시키면 90%가 원형화(renaturation)된다고 하였다(de Wit and Klarenbeek, 1984). 다른 연구에서는  $\alpha$ -lactalbumin을 77°C에서 열처리를 실시한 후 냉각할 경우, 오직 10%만이 비가역적 변성을 일으켰고, 95°C에서 가열 후 15분간 유지하면 40%만이 원형화 된다고 보고되었다(Chaplin and Lyster, 1986). 이러한 비가역적 변성의 경향이 높은 것은  $\alpha$ -lactalbumin이 고도의 열저항성을 갖기 때문인 것으로 추정되었다(Bernal and Jelen, 1984).  $\alpha$ -Lactalbumin 내의 칼슘이온은 lysine과 aspartic acid를 carboxyl화하며, 두 개의 물 분자와 결합되어  $\alpha$ -lactalbumin의 분자구조를 안정화시키는 기능을 가지고 있어(Permyakov and Berliner, 2000; Noyelle and van Deal, 2002), 열처리 후에도 냉각시키거나 칼슘 이온을 첨가하면 가역적으로 원형화되는 특성을 가진다(Bernal and Jelen, 1984).  $\alpha$ -Lactalbumin의 물리적인 변화요인 중 pH의 변화로써 native  $\alpha$ -lactalbumin은 단백질 1 mole당  $\text{Ca}^{++}$  2 mole이 결합되어 있고(Pelkin *et al.*, 1993), pH 4 이하에서는 칼슘 이온이 해리되어 분자 구조가 변화된 apo- $\alpha$ -lactalbumin(calcium이 제거된  $\alpha$ -lactalbumin)으로서 unfold 상태이며(Swaisgood, 1988), apo- $\alpha$ -lactalbumin은 1가 및 2가 양이온에 민감하게 반응한다(Kronman, 1981).  $\alpha$ -Lactalbumin은 66°C의 낮은 온도의 가열 처리에 의해 열변성되는데, 단백질 1 mole당 1 mole 이하의 칼슘이 결합되었을 때 apo- $\alpha$ -lactalbumin의 경우 약 35°C에서도 열변성이 일어나지만, 칼슘 이온의 첨가에 의해 열변성 온도가 약 66°C로 변화된다고 보고하였다(Relkin, 1996). 또한 칼슘이 없는 조건하에서 100°C에서 약 10분간의 심한 열처리는

disulfide 결합된 dimer, trimer를 형성하지만 monomeric protein 으로서도 변할 수 있다고 보고하였다(Chaplin and Lyster, 1986).

### 유청단백질 가수분해물의 특성

우유의 단백질은 영양적, 기능적 이용성을 증진할 수 있는 단백질 가수분해물의 개발에 이용되는 중요한 단백질원으로 casein과 cheese whey로부터 제조되며(Clemente, 2000; Clemente and Chambers, 2000), 치즈 생산의 부산물인 whey에서 분리되어 이용할 수 있는 단백질이 whey protein이다(Fig. 3). 최근 가공 및 막 분리기술의 발달에 따라 유청단백질은 주요 단백질원 또는 식품에 기능성을 부여하는데 주로 이용되고 있으나, 난소화성의 구조적 특성 때문에 활용에 어려움이 많았다. 이러한 난소화성 특성을 해결하기 위해 여러 가지 생체 내 소화효소를 단일 또는 혼합하여 가수분해하려는 연구가 진행되고 있다(Pintado *et al.*, 1999).

유청단백질의 가수분해에 대한 연구는 가수분해 산물의 잠재적인 기능성과 식품 성분으로의 활용 가능성을 증진시킬 수 있기 때문에 다양하게 시도되고 있으며(FitzGerald and Meisel, 1999; van der Ven *et al.*, 2001), 가수분해에 의해 유청단백질은 항원성 감소 및 다양한 기능적 특성인 기포성, 용해성, 유화력 및 점성 등을 개선시킬 뿐만 아니라(Kinsella, 1988), 유청단백질 가수분해물은 유아식과 다양한 임상영양식에 널리 이용되고 있다(Gonzalez-Tello *et al.*, 1994).

다양한 효소를 이용한 유청단백질 가수분해에 관한 연구 중 유청단백질의 trypsin 가수분해에 대해서 유청단백질을 90°C에서 1시간 가열처리한 다음 기질에 대한 효소의 비율을 100:1로 하여 pH 8과 55°C의 조건에서 3시간 동안 가수분해한 것이 가수분해율이 가장 높게 나타났다고 하였다. 또한 가수분해도는 약 8%였으며, 친수성이 높은 peptide의 분자량 분포는 약 500~5,000 Da라고 하였다(Jost and Monti, 1977).

Monti와 Jost(1978)는 열변성된 유청단백질의 효소적 가수분해에 의한 용해도 실험에서 pH 8로 조정된 후, 55°C에

서 trypsin 처리구의 용해도가 거의 100%로 가장 높았다고 보고하였다. 이러한 결과는 trypsin이 유청단백질의 친수성 부위에 작용하여 친수성 단편을 생산하는데 그 이유가 있다고 하였으며, trypsin은 열변성된 유청단백질의 용해도를 높일 수 있는 가장 강력한 단백질 분해효소라고 보고하였다. de Wit과 Klarenbeek(1984)은 유청단백질을 60°C 이상의 온도로 가열처리시켰을 때 구상구조가 점차적으로 파괴되었다고 하였고, Lieske와 Konrad(1994)는 이러한 구조적 변화가 disulfide bond 또는 hydrophobic interaction과도 관련이 있다고 보고하였다.

식품성분으로 생체조절기능을 가지는 단백질, peptide, 지질 및 당 등을 열거한 바 있으며, 최근 들어 기능성 식품에 대한 연구가 대단히 활발하게 진행되고 있다. 생리활성 펩타이드로서는 우선 식품에 존재하는 호르몬류와 효소저해제 등과 소화 또는 가공과정 중에 분해 생성되는 잠재적 생리활성 펩타이드로 구분될 수 있으며, 이중 후자에 대한 연구는 많은 주목을 받고 있다(Fiat *et al.*, 1993).

물리적, 화학적 또는 효소 처리에 의한 단백질의 변형화는 단백질 구조와 형태를 변하게 할 뿐 아니라, 물리화학적 성질과 구조와 형태를 변화시킨다(Chobert *et al.*, 1988). 단백질의 기능적, 영양적 특성을 향상시키기 위한 단백질의 변형화에 효소를 이용한 단백질 가수분해방법을 널리 사용하고 있다(Fox *et al.*, 1982). 단백질 가수분해에 의해 생성된 peptide들은 단백질보다 작은 분자량과 2차 구조를 가지고 있으며, 등전점 부근에서의 용해도 증가와 점도의 감소 그리고 원래 단백질과는 다른 foaming, gelling과 emulsifying 효과를 기대할 수가 있다. Peptide들은 식품가공 공정에서 다양하게 사용되어질 수 있지만, 단백질 가수분해에 의해 생성되는 peptide들은 기능성의 유용함에 대한 정보는 매우 적다(Adler-Nissen *et al.*, 1983).

우유단백질은 가수분해효소에 의해 기질의 특이성이 모든 식품단백질 중 가장 잘 밝혀진 것 중의 하나로서 pepsin, papain, trypsin, chymotrypsin 등의 많은 가수분해효소를 이용하여 casein과 whey를 가수분해한 많은 실험들이 이루어졌다. 그 중 whey는 cheese와 casein 제조 시 생산되는 부산물로서, 우수한 영양적 가치와 기능적 특성을 가지고 있어 다른 단백질 보충 단백질로 이용되거나, 대체단백질로 사용할 수 있다. 그러나 whey protein은 단백질 분해효소에 의해서 분해되기 어려운 3차 구조의 구상단백질로서, 열처리에 의해서 쉽게 변성되어 불용화되고(Ribadeau-Dumas, 1988), 구조적 특성에 의해서 섭취 후에 소화되기 어렵다는 문제 때문에 *in vitro*에서 여러 가지 생체내의 소화 효소와 이들 효소 조합에 의한 가수분해에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다(Yoon *et al.*, 2010).

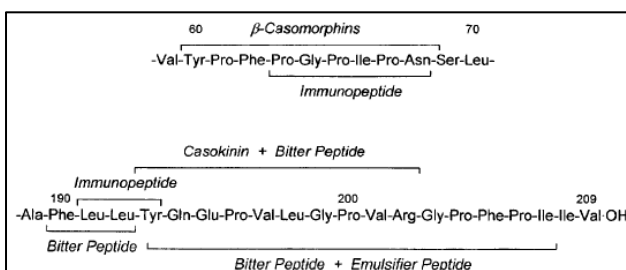


Fig. 3. Schematic representation of the multifunctional activities in milk protein-derived peptides; strategic zones in the primary structure of bovine  $\beta$ -casein (Meisel and Schlimme, 1990).

## 유청단백질 가수분해물의 생리학적 기능

유청단백질이 우수한 영양적 가치와 물리적 기능 특성을 공급하는 면에서 오히려 생리학적 기능을 더 많이 부여한다는 개념이 부각된 것은 비교적 최근의 일이다.

### 1. 대장암의 예방 효과

동물실험을 통하여 유청단백질 식품은 대장암을 예방하는 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 유청단백질을 동물에게 급여했을 경우, 육류나 콩을 급여한 동물에서 보다 암의 발생율이 50% 감소되었다(Chmile, 1997). 또한 유청의 항종양 효과와 영양학적 유의한 효과에 관한 연구내용도 보고된 바 있다(Chmile, 1997; Lagrange, 1998). 다양한 유청단백질 분획물이 대장암의 진행에 대처하는 잠재력이 총 유청단백질 제품보다 더 크다고 믿어 왔다. 사람에게 대한 임상실험의 기대와 식이에서 보호단백질의 공급량의 가능한 식품을 위한 예비실험 개발이 수행되어 왔다.

### 2. 콜레스테롤 수준을 조절하는 작용

동물실험에서 지방성분이 많은 사료에 유청단백질을 혼합하여 쥐에게 섭취시켰을 경우에 콜레스테롤의 분비가 급격히 올라갔으며, 지방성분이 전혀 없는 사료에 유청단백질을 혼합하여 쥐에게 먹었을 때는 콜레스테롤의 합성이 억제되었다(Anonymous, 1991; Nagaoka, 1991). 또 다른 실험에서는 대두단백질, casein, 유청단백질을 동일한 양으로 쥐에게 투여하였을 때 casein의 급여 시 콜레스테롤치가 3배 증가하였고, 대두단백질의 경우는 2배 증가하는 반면, 유청단백질을 주었을 때는 오히려 30% 감소하는 경향을 보였다(Anonymous, 1991; Nagaoka, 1991). 이러한 점을 이용하여 최근 일부에서는 유청단백질을 함유하고 콜레스테롤을 감소시키는 건강보충제가 개발되어 “Enjoy”라는 제품이 시판되고 있는 실정이다(Lagrange, 1998). 유년기에 콜레스테롤 수치가 높은 사람은 성인이 되어도 그 상태를 계속 유지한다는 이론에 기인하여 많은 연구자들이 조제분유에 있는 지방 성분이 혈중 콜레스테롤 양에 미치는 영향에 대하여 연구하고 있다. 최근의 새로운 연구에 의하면 새끼돼지에 유청단백질을 먹었을 때 혈중 콜레스테롤치가 낮게 나타났는데, 이것은 유년기에 유청단백질을 섭취시킴으로써 성인이나 노년기에 콜레스테롤치를 감소시킬 수 있는 가능성을 제시하고 있다(Anonymous, 1994).

### 3. 어린이 뼈 성장 촉진

WPC-80은 조직배양 실험에서 조골세포의 성장과 증식을 증가시킨다. 골다공증을 방지하기 위해서는 칼슘 섭취

가 필수적이라는 것은 잘 알려져 있지만 뼈의 신진대사에 관계하는 단백질 섭취도 중요하다. 뼈에는 조골세포나 파골세포와 같은 여러 가지 세포가 존재하여 각각 중요한 작용을 하면서 뼈를 형성한다. 조골세포는 분화하여 콜라겐 등의 골기질을 형성하는 세포이며, 파골세포는 칼슘을 뼈로 흡수하므로 뼈의 재형성이나 혈청 칼슘농도를 조절하는 세포이다. Whey 중에 함유되어 있는 MBP(milk-based protein)는 농도에 의존해서 조골세포의 증식과 콜라겐 합성을 활성화할 뿐만 아니라, 파골세포에 직접 작용하여 그 형성과 분화를 억제한다. MBP를 배합한 사료를 골다공증 모델 쥐에 3주간 투여한 결과 MBP 투여군 쥐의 대퇴골 파단응력과 파단 에너지가 함께 증가하였다(Yukihiro, 1997). 따라서 MBP는 뼈 대사의 개선 및 골다공증의 예방과 개선에 유요한 효과를 나타내기 때문에 MBP를 이용한 제품이 개발되고 있다.

### 4. 면역 증강 활성

임과구(lymphocyte) 배양 시 유청단백질을 첨가하였을 때, 증식이 증대되었다고 보고하였고(Wong and Watson, 1998), 생체 내에서 면역계의 필수 물질인 glutathione sulphhydryl (GSH)의 농도 상승과 IgM 생성 증가에 다른 단백질원보다는 높게 작용한다고 보고하였다(Bounous, 1989). 마우스에 유청단백질을 급여한 것이 다른 종류의 단백질을 급여한 것보다 항원 항체 반응에 있어 높은 항체 생성도를 나타내고, 비만세포와 간세포에서의 glutathione의 농도를 높여주는 것으로 나타났다(Bounous *et al.*, 1989). 유청단백질은 단백질의 변성도에 따라 면역력에 영향을 주는 것으로 나타났다(Bounous and Gold, 1991). 또한 유청단백질을 B형 간염결핵 환자들에게 투여 시, 간의 회복에 영향을 주는 것으로 나타났다(Watanabe *et al.*, 2000). HIV-혈청 환자에 관하여 수행된 연구에서 적당량의 칼로리 섭취를 유지하는 환자에게 농축유청단백질을 전체 단백질 섭취의 중요한 부분으로 첨가하여 먹었을 때 몸무게가 증가하고, 단핵세포의 글루타치온 함량이 정상적인 수준으로 증가되어 유청단백질의 면역 증강 특성이 확인되었다(Bounous *et al.*, 1993). 생체방어를 위한 면역반응의 초기 단계에서 호중구나 대식세포의 탐식작용 등이 관여하게 되는데, Fiat *et al.*(1993)은 많은 peptide가 탐식작용 등을 촉진함으로써 면역 증강 효과를 나타내는 것으로 보고하였으며, 우유와 모유의  $\alpha_s$ - 및  $\beta$ -casein, immunoglobulin, 그리고 대두 globulin, ovalbumin, 쌀 단백질 등에서 탐식작용 촉진 peptide가 발견되었다(Migloire-Samour *et al.*, 1989). 이들 peptide들은 탐식작용 활성화, 항체 생산 증가, 병원균 감염에 대한 방어작용 등의 효과가 있는 것으로 알려졌다. Lymphocytes 배양 시 유청단백질을

첨가하였을 때 증식이 증대되었다고 보고하였고(Wong and Watson, 1998), 생체 내에서의 glutathione sulphhydryl (GHS)의 농도 상승과 lymphocytes의 증대에도 관여한다고 보고되었다(Bounous, 2000). 마우스에 유청단백질을 급여한 것이 다른 종류의 단백질을 급여한 것보다 항원항체 반응에 있어 높은 항체 생성도를 나타내었고, 비장세포와 간세포에서의 glutathione의 농도를 높여주는 것으로 나타났다(Bounous *et al.*, 1989).

HIV-혈청 양성 환자에 관하여 수행된 연구에서 적당량의 칼로리 섭취를 유지하는 환자에 농축유청단백질을 전체 섭취단백질의 중요한 부분으로 첨가하여 먹었을 때 몸무게가 증가하고, 단백질세포에서의 glutathione의 함량이 정상적인 수준으로 증가되었다(Bononus *et al.*, 1993). 이러한 연구는 동물실험을 통하여 유청단백질의 면역 증강의 특성을 확인하였다. 유청단백질의 lactoferrin은 장세포의 성장에 관여하는 것으로 잘 알려져 있다. 이의 섭취는 정상적인 소화 기능의 빠른 복구를 유도할 수 있다. 또한 lactoferrin이 면역체계 세포 또한 촉진함으로써 면역능력이 손상된 사람들이나 노인층에 lactoferrin의 보충은 큰 효과를 나타낸다고 한다(Hagiwara *et al.*, 1995, 2003).

## 5. 비만 치료 보조효과

유청단백질은 동물실험을 통해서 식욕억제 호르몬인 cholecystokinin(CCK)을 방출하는데 성공하였으며, 그 결과 유청 peptide를 20~30 g을 투여하여 CCK를 자극함으로써 식욕을 감퇴시켰다. 한편, 유청 peptide는 체내 대사율을 증가시키고, glucagon을 일정한 속도로 흐르게 하여 지방이 축적되는 것을 방지함으로써 체중 감소의 효과를 나타내는 것으로 알려지기도 하였다(Zemel, 2003).

## 6. 항산화성

Glutathione(GSH)은 3종의 amino acid 즉 glutamate, cysteine, glycine이 결합되어 peptide 형태를 이룬 tripeptide 물질로서 건강 유지와 질병 생성에 있어서 이 물질의 중요성이 매우 큰 것으로 알려져 있다. 인간의 건강 유지에서 이 물질의 기능은 체내의 면역체계가 지속적으로 작용하고, 세포 내로 반입되는 독성물질을 제독시키며, 세포의 손상을 방지해 주는데 있어서 세포 내의 glutathione 함유율을 유지하는 것이 중요하다. 우유 내 구성물질인 유청단백질은 생명 유지와 성장에 기여하는 영양원으로써의 기능과 경구섭취로 인한 면역계, 내분비계, 신경계 등의 생체조절에 관한 생리조절 인자로서의 기능을 가지고 있다. 또한 유청단백질은 glutathione의 구성 성분인 cysteine과 glycine, glutamate가 풍부하며, 이들 황이 포함된 아미노산들은 체내의 항산화력을 유지하

고, 세포분열시 DNA를 안정하게 하기 때문에 중요하다. 이 중 마우스에 분리 유청단백질 급여 시 면역계의 필수물질은 glutathione sulphhydryl(GSH)의 농도 상승과 IgM 생성 증가에 다른 단백질원보다도 활성이 높은 것으로 보고되었다(Bounous *et al.*, 1989).

다양한 생리 기능성 중에서 노화 예방에 관련된 것으로는 항산화 활성과 SOD-유사활성 등을 들 수 있다. 산소는 대기 중의 21%를 점하며, 생명유지에 절대적으로 필요하지만, 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인에 의하여 superoxide radical ( $O_2^-$ )과 hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ) 등과 같은 반응성이 매우 큰 활성산소(reactive oxygen species)로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성을 지니고 있다. 유청 단백질은 cysteine과 methionine이 풍부하며, 이들 황이 포함된 아미노산들은 체내의 항산화력을 유지하고, 세포분열시 DNA를 안정하게 하기 때문에 중요하다(Aimutis, 2004). 이 중 분리 유청단백질은 면역계의 필수물질인 glutathione sulphhydryl(GSH)의 농도상승과 IgM 생성 증가에 다른 단백질원 보다도 높게 작용한다고 보고되었다(Bounous *et al.*, 1989). Lindmark-MaËnsson과 Akesson(2000)는 우유에 함유되어 있는 superoxide dismutase나 glutathione peroxidase와 같은 효소들과 lactoferrin, ascorbic acid, tocopherol, carotenoids와 같은 비효소적인 성분들이 항산화작용을 한다고 보고하였다. 유청단백질의 lactoferrin은 자유 철분과 superoxide radical의 형성을 촉매하는 2가 금속이온과 결합하여 이동시키는 기능을 갖고 있다(Gutteridge, 1981). 따라서 금속이온에 의한 산화작용을 억제할 수 있고, 이런 측면에서 항산화 특성이 있다고 하는 것이다. 일본의 특허에서는 철분-lactoferrin의 결합 형태로 철분 보강 유지와 지방을 포함한 기능성 식품에 특허가 등록되었다. 이 결합체는 식품에서 철분도 제공하면서 유지류의 산화를 억제하는 두 가지 작용을 할 수 있다(Tomita, 1991).

## 7. Opioid Peptide

Enkephalin 등의 내인성 peptide는 진통, 마취, 평활근 수축 등에 관여하는 endorphin으로 작용하는데, 식품 중에도 이들과 유사한 작용을 하는 opioid peptide가 존재하는 것으로 알려져 있다. 식품 중의 opioid peptide는 진통, 마취 이외에도 장관 연동, 동맥 이완, 혈압 강하, 수면 조절, 식이섭취 조절에도 관여하는 것으로 보고되었다. 이러한 opioid peptide로 카제인으로부터  $\beta$ -casomorphin이 보고된 이래, 우유와 모유의  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ -casein,  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin에서 많이 발견되었고, 밀의 gluten 가수분해물에서도 보고된 바 있다. 한편, opioid antagonist 활성의 peptide도 분리되었는데, 이들은 opioid 활성은 갖지 않으면서 opioid antagonist



peptide는 우유와 모유의  $\kappa$ -casein 및 lactoferrin에서 발견되었다(Drewnowski, 1992).

### 8. 혈소판 응집저해 펩타이드

혈관 내에서 혈액이 응고하게 되면 혈전이 형성되어 혈액 순환이 방해받게 되는데, 이 결과 심근경색, 뇌졸중, 폐동맥 경색증, 혹은 부종이나 염증을 유발할 수도 있다. Fibrinogen, fibronectin, laminin 등의 세포 접착성 단백질은 세포의 수용체인 integrin과 접착성을 나타내는데, 이들 단백질에 포함되어 있는 RDG(Arg-Asp-Gly) 등의 특정 peptide 서열이 그 상호작용에 관여하고 있으며, 따라서 RDGS(Arg-Asp-Gly-Ser) 등 RDG(Arg-Asp-Gly) 서열을 갖는 peptide는 혈소판 응집 및 압의 전이에 대한 저해활성을 나타냄으로써 혈전저해 효과를 나타낸다고 알려져 있다(Jolles *et al.*, 1992). 모유의 lactoferrin과 우유의  $\kappa$ -casein, 쌀 단백질, 대두 단백질 된장 등에서 혈전저해 peptide를 함유하고 있는 것으로 보고된 바 있다(Jolles *et al.*, 1992).

### 9. 항원성

유청단백질은 구상단백질로서 단백질 분해효소에 의하여 쉽게 분해되지 않기 때문에 알레르기원으로 작용한다(Kananene *et al.*, 2000). 특히 유아에 있어서 우유를 포함한 식품알레르기가 빈번하게 일어나는 원인은 장관과 면역체계가 발달하지 않은 상태에서 모유에 함유되지 않은 외래의 거대분자를 흡수할 경우에 체내로 유입된 항원의 처리가 완전하지 못하면서 기인하며(Schoch, 1988),  $\alpha$ -casein과  $\beta$ -lactoglobulin이 가장 강력한 알레르기원으로 지적되고 있다(Baldo, 1984). 특히  $\beta$ -lactoglobulin은 lactose와 함께 높은 온도로 가열하면 lactose- $\beta$ -Lg 복합체가 형성되어 강한 항원적 잠재력을 가지게 된다(Otani *et al.*, 1991).

$\alpha$ -Lactalbumin과  $\beta$ -lactoglobulin은 가열처리에 의해 그 구상구조의 변성을 유도함으로써 효소의 작용을 잘 받도록 할 수 있으며(Yamauchi *et al.*, 1992), 항원성을 감소시키기 위해서 흔히 가수분해(Rango *et al.*, 1993) 및 유산발효 등의 방법을 사용하고 있으나, 이러한 과정을 거치는 동안에 고미펩타이드가 생성되거나 원래의 생리적 기능을 상실하는 문제점을 안고 있다(Schoch, 1998). 한편, 이외에도 겔여과(Pihlanto-Leppälä *et al.*, 1996; Maubois and Ollivier, 1997) 및 고압처리(Okamoto *et al.*, 1991; Van Beresteijn *et al.*, 1994)를 통해서  $\beta$ -lactoglobulin을 선택적으로 제거하여 항원성을 낮추기도 한다.

최근까지도 peptide의 항원성에 대하여 정확한 분자량의 크기가 규정되지는 않았지만, 5 kDa 이하의 것은 아주 약하거나 거의 나타내지 않은 경향이 있고, 아미노산이 10개 이

하로 구성되어 있는 oligopeptide는 항원성이 없는 것으로 보고되고 있으나(Adda *et al.*, 1985), peptide의 분자량과 항원성에 관해서는 연구자들 사이에 서로 다른 견해를 가지고 있다. Haurowitz(1986)는 10 kDa 이하의  $\beta$ -lactoglobulin 단편은 guinea-pig PCA 시험에서 항원성이 없었다고 보고하였고, Otani 등(1990)은 casein 가수분해물에서 유래되는 peptide의 경우 항원성을 나타내는 최소분자량은 3.5~5 kDa 이라고 하였다. 또한 Yoon 등(2010)은 약 5 kDa 이하의 분획의 경우 생성되는 항체가 극히 적은 양이거나 관찰되지 않았다고 하였다 그러나 이러한 연구 결과는 실험동물을 이용하여 얻은 것이므로, 이를 그대로 인체에 적용하는 데는 무리가 따른다고 하겠다.

### 10. 항균 펩타이드

Lactoferrin과 같은 우유 단백질의 항균력은 이미 오래전부터 보고되어졌다. Bullen 등(1972)에 의하면 유아의 *E. coli*의 감염에 대해 lactoferrin의 항균력이 검증되었으며, Lahov 등(1971)에 의하면 glycopeptides가 *Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus*에 살균능력을 보였다고 보고하였다. Lactoferrin의 항균 기작은 종래부터 검증되어온 철 결합에 의한 정균작용 이외에 세균막에 직접 결합으로 일어나는 살균기작도 보고되어 있다. Lactoferrin이 그람 음성균의 세포막에 직접 작용하여 세포벽의 구성성분인 LPS(lipopolysaccharide)을 유리시키는 것을 3H 표지법을 사용하여 *E. coli*와 *Salmonella* 균에서 확인하였다.

### 11. 칼슘흡수촉진 펩타이드(Casein Phosphopeptides: CPP)

칼슘 흡수기작은 소장 윗부분에서 일어나는 능동수송과 소장의 아랫부분에서 일어나는 수동수송으로 나눌 수 있다. 흡수되는 칼슘 전체의 비는 후자가 전자에 비하여 매우 높고, 칼슘의 능동수송에 있어 용해되어 있는 칼슘량이 많을수록 흡수가 높아진다. 우유 casein의 trypsin 처리에 의해 얻어지는 CPP는 소화효소에 대하여 저항성이 있고, 소장의 아랫부분까지 도달하여 칼슘과 인산의 양을 증가시킨다. 따라서 용해성 칼슘의 농도가 높을수록 수동수송에 의한 칼슘흡수량이 증대된다. Sato 등(1986)은 쥐의 소장에서 CPP에 의해 칼슘 흡수가 증가되었다고 보고하였다.

### 12. Angiotensin Converting Enzyme(ACE)의 저해효과

순환기계 질병의 원인이 되는 동시에 뇌출혈, 심장병 및 신장병 등과 합병증으로 나타날 경우, 치사율이 매우 높은 만성 퇴행성 질환인 고혈압의 90% 이상을 차지하는 본태성 고혈압은 정상적인 혈압을 유지하는 기구들이 천천히 붕괴되



어 진행되는 질병이다(Frohlich, 1982). 이러한 본 태성 고혈압의 원인 중에서 renin · angiotensin I으로 분해되고, 이는 angiotensin 전환효소(angiotensin-converting enzyme, ACE; (His-Leu)가 절단되어 강력한 혈관수축 호르몬인 angiotensin II로 변하게 된다. 생성된 angiotensin II는 동맥혈관을 수축시켜 혈압을 상승시키고, 부신에서 aldosterone의 분비를 촉진하여 신장의 sodium 및 수분의 재흡수를 증가시키는 역할을 한다. 또한 ACE는 혈관확장, 장의 운동성 증대 등의 작용을 가진 bradykinin을 분해하여 불활성화시킴으로써 결과적으로 혈압을 상승시키는 역할을 한다(Sealey and Laragh, 1990).

이와 같이 혈압의 상승에는 ACE가 크게 관여하므로 혈압의 강하에는 ACE의 저해가 필수적이라 하겠다. 이와 관련하여 1970년대 초 ACE 저해작용을 갖는 peptide인 tetrapeptide가 브라질과 일본산 독사(*Bothrops jararaca*와 *Agkistrodon halys blomhoffii*)의 독액으로부터 분리되었다(Kato and Suzuki, 1971). 이 tetrapeptide는 renin 중 고혈압 환자에서 뿐만 아니라, 정상인에서도 현저한 혈압강하작용을 갖는 것으로 밝혀

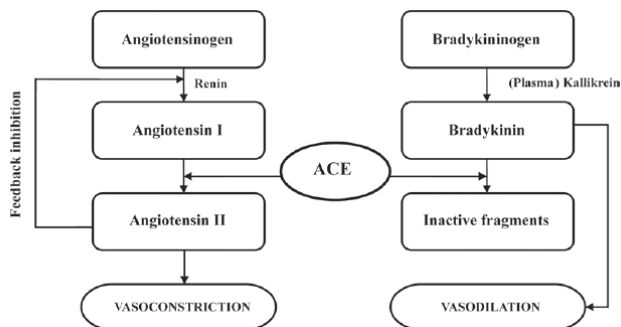


Fig. 4. Schematic representation of the renin-angiotensin system, demonstrating the balance between angiotensin and bradykinin. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) plays a central role in converting angiotensin I to angiotensin II and in deactivating bradykinin (Madureira *et al.*, 2010).

짐으로써 ACE 저해제들의 고혈압 치료제로서의 개발 가능성이 제시되었다(Fig. 4). 그리고 1988년 미국 고혈압 합동 위원회에서는 ACE 저해제를 고혈압 치료제로서 공인하게 됨으로써 고혈압 예방 및 치료에 있어서 ACE 저해제의 중요성이 부각되게 되었다(Nishikawa, 1993).

식품성분 중에서 ACE 저해효과를 나타내는 성분으로는 여러 가지 식품단백질의 효소 가수분해물로부터 얻어진 peptide류를 중심으로 주로 연구되고 있다. 즉, casein(Maruyama *et al.*, 1987), zein(Miyoshi *et al.*, 1991), gelatine(Oshima *et al.*, 1979), 쌀(Muramoto and Kawamura, 1991), 대두(Suh *et al.*, 1994; Cho *et al.*, 2000), 가다랑어육(Kohama *et al.*, 1991)과 내장(Matsumura *et al.*, 1993) 고등어육(Yeum *et al.*, 1992), 오징어(Suh *et al.*, 1997)등의 식품단백질 가수분해물뿐만 아니라, 무화과 유액(Maruyama *et al.*, 1989), 간장(Kinoshita *et al.*, 1993) 등에서 보고되었다.

특히, 식품단백질 유래 ACE 저해 펩타이드를 살펴보면 다음과 같다. 미생물은 자신이 생존하기 위하여 여러 종류의 단백질 분해 효소를 가지고 있으며, 이것은 단백질을 peptide와 아미노산으로 분해한다. 따라서 발효유 중에 함유된 우유 단백질이 분해되면 다양한 peptide가 유리될 수 있다(Table 1). Yamamoto 등(1994)은 일반적으로 유제품 발효에 사용되는 lactic acid bacteria를 사용한 발효유의 ACE 저해활성을 조사한 결과, *L. helveticus*을 사용한 발효유만이 혈압강하효과가 있었고 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 그리고 *L. lactis* subsp. *cremoris*는 효과가 없었다. Kohama 등(1988)은 참치 근육의 acid 추출물을 고압 멸균한 후, 몇 단계의 chromatography를 통하여 Pro-Thr-His-Ile-Lys-Trp-Gly-Asp의 peptide를 동정하였다. 척추동물의 근육 중의 glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase(GAPDH)에 이 peptide와 높은 상동성을 보이는 부위가 있음이 밝혀졌으며, 돼지 유래의 ACE 저해 peptide인 Pro-Ala-Asn-Ile-Lys-Trp-Gly-Asp도 돼지 근

Table 1. Summary of whey protein-derived peptides which are inhibitors of angiotensin-converting enzyme

Source	Sequence	Treatment	Reference
$\alpha$ -Lactalbumin	VGINYWLAHK	Trypsin	
	WLAHK	Trypsin	
	LAHKAL	Pepsin and trypsin	Pihlanto-Leppala <i>et al.</i> , 1998
	YGL	Pepsin, trypsin and chymotrypsin	Pihlanto-Leppala <i>et al.</i> , 1998
$\beta$ -Lactoglobulin	LAMA	Trypsin	
	LDAQSAPLR	Trypsin	
	IFA	Proteinase K	Abubakar <i>et al.</i> , 1998
	ALPMHIR	Pepsin, trypsin and chymotrypsin	Mullally <i>et al.</i> , 1997

육의 GAPDH의 79~86 잔기와 동일한 것으로 밝혀졌다(Hazato and Kase, 1986). 이러한 사실들은 Pro-Thr-his-Ile-Lys-Trp-Gly-Asp가 참치의 고압살균 과정 중 산 분해에 의해서 생성되었을 가능성을 시사한다. 한편, 이 peptide는 토끼 허파의 ACE에 대하여 비경쟁적 저해제로 작용하는 물질로 보고된 바 있다(Kohama, 1989). Lee 등(2012)은 김(*Porphyra yezoensis*)을 HCl 처리하여 가수분해한 후 ACE 저해 물질을 분리하였다. 분리된 저해물질은 분자량이 3,000 Da 미만의 저분자 물질이었으며, glycine, arginine, proline으로 구성된 5개의 oligopeptide라고 추정하였다. 우유단백질로부터 ACE 저해 peptide를 제조할 수 있으며, 크게 2가지 방법으로 접근할 수 있다. 첫 번째는 단백질 분해효소를 사용하는 방법으로 단백질 분해효소가 peptide 결합을 특이적 또는 비특이적으로 분해함으로써 분해 산물인 peptide가 다양한 ACE 저해 효과를 가진 peptide를 제조할 수 있다. 두 번째로는 요구르트나 치즈를 등 발효유제품의 제조 시 발효과정에 의해 미생물이 생성하는 단백질 분해효소에 의해 제조할 수 있다(Fox, 1989). 특히 첨가한 단백질 분해효소와 미생물에 의한 효소에 의해 단백질 분해를 가속화하여 새로운 peptide를 제조하기도 한다(Law, 2001).  $\beta$ -Casein(f177~183)에서도 Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg(IC<sub>50</sub>=15  $\mu$ M)의 peptide가 분리되었다. Casein을 특정효소로 처리하여 얻어진 가수분해물이 *in vitro* 상에서 ACE 저해 작용을 나타냈으며, 자연발생증 고혈압 쥐에 경구 투여했을 때도 약 12%의 혈압저해 효과를 확인하였다(Maruyama *et al.*, 1985). 주로 casein으로부터 ACE 저해 peptide가 분리되었으나, 최근에는 유청단백질 유래 ACE 저해 peptide가 보고되었으며, 이를 Table 1에 나타내었다. Mullally(1997)는  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin의 trypsin 분해물에서 ACE 저해 활동을 보고하였다. 치즈 유청을 protease K로 가수분해한 결과,  $\beta$ -lactoglobulin으로부터 ACE 저해 활성이 높은 Ile-Pro-Ala(f78~80, IC<sub>50</sub>=141  $\mu$ M)의 peptide가 분리되었다. 또한  $\alpha$ -lactalbumin의 trypsin 분해물인 Tyr-Gly-Leu(f50~52)가 ACE 저해활성을 나타내었고,  $\beta$ -lactoglobulin의 trypsin 분해물에서도 Leu-Ala-Met-Ala(f22~25), Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg(f32~40) 및 Val-Phe-Lys(f81~83)가 유리되었다(Pihlanto-Leppälä *et al.*, 1996; 1998).

## 기능성 건강 음료

최근 들어 경제성장 및 식생활 개선, 우리나라 소득수준의 향상에 따른 식생활의 다양화 및 고급화로 인해 맛과 질을 위주로 하는 건강식품에 대한 국민들의 관심이 증대됨에 따라 남녀노소 누구나 즐겨 찾고 손쉽게 구입 섭취할

수 있는 각종 건강 음료들과 기능성 음료들이 속속 개발 생산되어지고 있다(Park *et al.*, 2004). 또한 편식과 과잉 섭취에 의한 영양 불균형, 과잉 영양 그리고 운동 부족으로 인한 성인병의 발병률이 높아지고 있다. 따라서 특수성분을 공급하여 건강을 향유하고, 성인병 예방이 있는 특수식품의 중요함이 더욱 증대되고 있으며, 점차 건강음료를 선호하는 추세이다(Lee, 1984; Schneeman, 1986).

건강음료에 관한 연구로서는 늙은 호박, 유자와 아카시아 꿀을 이용한 호박 꿀차의 개발 연구(Park, 1995a)와 산채류 중에서 생리기능이 높고 생산량이 많은 수리취와 고려엉퀴를 이용한 발효음료 개발에 관한 연구(Ham, 1997), 한약재 청피와 모려를 이용한 기능성 건강음료의 개발에 관한 연구(Cha, 2002), 매실추출물을 함유한 기능성 음료 개발(Bae, 2000), 참치의 고부가 식품 이용화를 위한 품질 특성 및 기능성 건강음료의 개발(Kim, 2004) 등이 보고되었다. 그러나 우리나라는 선진국과는 달리 간편하게 섭취할 수 있는 건강음료가 몇 종류에 불과하며, 이에 대한 연구와 제품 개발이 활발히 진행되어야 할 것이다. 또한 오미자, 진피, 홍화, 인삼, 홍삼, 동충하초 등 생약재를 이용한 음료 개발(Park, 1995b)에 관한 연구도 활발히 이루어지고 있다. 생약을 이용하여 단독 또는 혼합으로 음료화하여 경이력 향상, 전해질 균형 및 피부 회복 효과를 연구한 논문들(Oh, 2000; Kim, 2002)이 스포츠 분야에서 보고되고 있으나, 아직 연구가 부족하기 때문에 식품영양분야에서 한방자원을 이용하여 기능성 음료를 개발하는 단계와 그 효과를 평가하는 임상실험에 관한 체계적인 연구가 이루어져야 할 것이다. 또한 과일 주스는 생과에 가까운 향미와 영양가를 가지고 있어 과실이 생산되지 않는 시기에 이용할 수 있는 장점을 가지고 있다. 그리고 채소나 과일의 즙액은 생채소나 생과일을 그대로 섭취하는 것보다 장에 부담을 적게 주고, 가느다란 섬유가 적당히 포함되어 있기 때문에 장에 대한 자극이 이상적이므로 소화와 흡수력을 높임과 동시에 배설도 원활하게 한다(Yoon, 1991). 다량의 유효 성분을 많이 섭취할 수 있으며, 몸에 신속하게 소화, 흡수될 수 있는데, 특히 한 종류의 즙액만을 단독으로 섭취하는 것보다 몇 가지의 채소나 과일즙을 혼합하여 섭취할 경우 훨씬 효과가 큰 것으로 보고되고 있다(Walker, 1987).

유청에는 영양 생리적으로 중요한 유청단백질과 기타 유당, 여러 종류의 비타민과 광물질 등을 함유하고 있어, 여러 형태로 식품가공에 이용할 수 있다(Kosikowsky, 1979; Forsum, 1979). 유청을 음료 제조에 이용하기 위해서는 단백질로 인한 침전물 형성을 방지하고, 유청 특유의 향미와 다량의 유당을 분해시키고, 불필요한 광물질을 제거하여 맛을 증진시키는 것이 바람직하다. 따라서 원심분리나 한

외여과장치(ultrafiltration system)와 이온교환(ion exchange) 방법 등을 이용하여 단백질이나 그 외 일부 성분을 분리하고(Matthews, 1984; Therese *et al.*, 1986), 유당을 미생물에 의한 발효나 효소에 의해 가수분해시켜 유청음료의 원료로 이용하는 것이 바람직하다(Hosinger, 1974; Holsinger, 1987). 즉, 유청에 함유된 유당은 유산균에 의해 유산을 생산하고, 알코올 생산균에 의해 알코올을 생산할 수 있다. 또 다른 해결책으로  $\beta$ -D-galactosidase를 이용해 glucose와 galactose로 가수분해시켜 유청음료의 원료로 이용할 수 있다(Therese and Bradley, 1986). 음료를 제조함으로써 유청의 효율적인 이용 및 유당불내증이 있는 사람에게 섭취를 권할 수 있고, 단맛이 증가됨으로써 감미료의 절약으로 경제성 및 칼로리의 증가를 막아 줄 수 있다(Hourigan, 1984). 그러나 유청을 음료로 이용할 경우 유청의 특유한 맛과 냄새는 제품의 기호성을 떨어뜨리며(Holsinger, 1987), 가수분해과정에서 유청의 염이 유당가수분해효소인  $\beta$ -galactosidase에 저해작용(inhibition)을 하는 문제점을 가지고 있다.

유청은 유기산 무기산을 함유하여 인체 내의 삼투압을 조절하는 효과적인 기능을 가지고 있다고 보고하였으며(Wagner *et al.*, 1975), 초콜릿을 첨가한 유청음료를 개발하였고(Kriel and van Tonder, 1979), Zadow(1989)는 유청 발효음료의 시장 확대 가능성이 크다고 시사하였다. 이집트에서는 맥아즙과 단백질이 제거된 유청즙의 혼합물에 유당을 이용하는 효모 중 *Saccharomyces fragilis*를 넣어 발효시킨 것이 향기가 좋은 맥주와 비슷한 음료가 제조되었다고 보고하였다(Mann, 1989). 또한 유청을 한외여과 기술로 농축하고 *Kluyveromyces fragilis* 균을 접종하여 발효시킨 후 무기질을 제거하여 알콜을 제조한 연구도 보고되었다(Wzorek, 1983). Battermann(1986)은 유청이 운동선수의 체력, 순발력 그리고 지구력을 향상시키는데 효과적이라고 주장하였고, 유청음료에 설탕 대용품으로 Aspartame과 Acesulfame-k를 첨가해 뒷맛이 없고 적당한 단맛을 내며 열량을 줄여 식이요법에 효과적인 유청음료 개발을 하였으며, 최근에 *Lactobacillus* 종으로 발효시켜 만든 유청음료와 요구르트가 대장에서 해로운 박테리아의 효소활성은 감소시켰다고 보고하였다(Salminen *et al.*, 1991). 가수분해한 유청단백질을 여러 가지 의학적인 질병(낭포성 섬유증, 췌장 및 간 또는 위장관 장애, 수술)에 이용하면 치료 및 회복이 증진된다고 보고하였고(Smith, 1976), 심장기능 이상을 갖고 있는 유아를 위한 치료영양식으로 유청을 주요 식품으로 한 연구도 수행되었으며(Mathur, 1979), 만성 요독증 환자의 식사에 전기 투석시켜 얻은 유청을 유일한 단백질원으로 이용한 보고도 있었다(Karp, 1971). 강(1971)은 우유 및 유제품, 야채류, 콩류, 곡류, 육류, 난류 등에 유산균을 이용한 제품들에 대해 고찰하였다. 새로운

유청음료의 개발방향에 관하여 주정성분이 없고 소화가 잘되며 탄산이 첨가되지 않되 청량감이 있어야 하고, 밝은 외관이 권장된다고 하였다(Driessen and Van Den Berg, 1990).

한편, 국내에서는 유청의 영양적 특성과 이용에 관하여 보고하였으며(Park *et al.*, 1988), 유청을 발효시켜 인삼과 감미료를 첨가한 후 비발효 유청음료와 비교하였는데(Park and Hong, 1992), 발효된 제품의 경우 이취(off-flavor)로 인해 관능 검사 결과 좋지 않게 평가되었다고 하였다. 유청을 역삼투법으로 농축한 후 유산균을 접종하여 발효시켜 유청음료를 제조한 다음 관능검사를 실시하였고(Song and Oh, 2012), Kee와 Hong(1993ab)은 응유효소를 첨가하여 얻은 유청에 인삼추출물을 첨가하고, 유산균을 접종하여 발효시킨 인삼 유청음료의 이화학적 분석 및 관능적인 평가를 실시한 결과, 인삼을 첨가한 시료가 관능검사에서 열등하게 나타났다고 보고하였다.

결론적으로 우유에서 유래하는 유청단백질을 단백질 가수분해 효소로 처리한 가수분해물을 이용하여 건강기능적인 면에서 효과가 있는 생리활성기능성 음료 제품 등의 개발에 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 농림수산식품기술기획평가원 생명산업기술개발사업(no. 112137-3)에 의해 이루어졌습니다. 또한 한국연구재단 일반연구자지원사업(2012R1A13A-2012009237)의 연구비 지원을 받았습니다.

## 참고문헌

1. Adda, G. and Skehel, J. J. 1985. Are peptides good antigens. *Nature* 316:764-765.
2. Adler-Nissen, J., Eriksen, S., Olsen, H. S. 1983. Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. In *Plant Proteins for Human Food*; Bodwell, C. E. and Petit, L., Nijhoff, M., and Junk, W. (eds.), The Hague. p. 207.
3. Aimutis, W. R. 2004. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *Journal of Nutrition* 134:989S-995S.
4. Anonymous. 1991. Morinaga milk industry finds whey protein lowers cholesterol in rats. *Comline: Biotechnology and Medical Industry of Japan*, pg. CBI910312002.
5. Anonymous. 1994. This lucky piglet got whey protein. *Science News* 146:137-140.

6. Asselin, J., Herbert, J. and Amoit, J. 1989. Effect of *in vitro* proteolysis on the allergenicity of major whey protein. *J. Food Sci.* 54:1037-1039.
7. Assilin, J., Amiot, J., Gauthier, S. J., Mourand, W. and Herbert, J. 1988. Immunogenicity and allergenicity of whey protein hydrolysis. *J. Food Sci.* 53:1208-1211.
8. Azuma, N., Nagaune, S. I., Ishino, Y., Mori, H., Kamigogawa, S. and Yamauchi, K. 1989. DNA synthesis stimulating peptides from human-casein. *Agric. Biol. Chem.* 53:2631-2634.
9. Bae, J. H., Kim, J., Kim, S. I., Lee, W. J. and Lee, S. J. 2000. Development of the functional beverage containing the *Prunus mume* extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32:713-719.
10. Baldo, B. A. 1984. Milk allergies. *Aust. J. Dairy Technol.* 39:120-128.
11. Battermann, W. 1986. Molkeneiweiss fuer den sportiven Bereich. *Deutsche Milchwirt.* 36:1010-1015.
12. Bernal, V. and Jelen, P. 1984. Effect of calcium binding on thermal denaturation of bovin  $\alpha$ -lactalbumin. *J. Dairy Sci.* 67:2452-2454.
13. Bounous, G. 2000. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Research* 20:4785-4792.
14. Bounous, G. and Gold, P. 1991. The biological activity of undenatured whey proteins: The role of glutathione. *Clin. Invest. Med.* 14:296-309.
15. Bounous, G., Baruchel, S., Falutz, J. and Gold, P. 1993. Whey protein as a food supplement in HIV-seropositive individuals. *Clin. Invest. Med.* 16:204-209.
16. Bounous, G., Batist, G. and Gold, P. 1989. Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice; Role of glutathione. *Clin. Invest. Med.* 12:154-161.
17. Bullen, J. J., Rogers, H. J. and Leigh, L. 1972. Iron binding proteins in milk and resistance to *E. coli* infections in infants. *Br. Med. J.* 1:69-75.
18. Cha, W. S., Kim, C. K. and Kim, J. S. 2002. On the development of functional health beverages using *Citrus reticulata*, *Ostrea glgas*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 17:503-507.
19. Chaplin, L. C. and Lyster, R. L. J. 1986. Irreversible heat denaturation of bovine  $\alpha$ -lactalbumin. *J. Dairy Res.* 53:249-258.
20. Chmile, J. F. 1997. Anti-tumor effects of dietary whey protein and its value for head and neck cancer patients. Presentation at International Whey Conference. Chicago, IL. USA.
21. Cho, Y. J., Cha, W. S., Bok, S. K., Kim, M. U., Chun, S. S., Choi, U. K., Kim, S. H. and Park, K. S. 2000. Production and separation of angiotensin converting enzyme inhibitor during *Notto* fermentation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29:737-742.
22. Chobert, J. M., Bertrand-Herb, C. and Nicolas, M. G. 1988. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *J. Agric. Food Chem.* 36:883-892.
23. Clemente, A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Tech.* 11:254-262.
24. Clemente, A. and Chambers, S. J. 2000. Development and production of hypoallergenic protein hydrolysates for use in infant formulas. *Food Allergy Intolerance.* 1:175-184.
25. Creig, T. W. 1979. Dairy derived food ingredients functional and nutritional considerations. *J. Dairy Sci.* 62:1695-1702.
26. de Wit, J. N. and Klarenbeek, G. 1984. Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *J. Dairy Sci.* 67:2701-2710.
27. Drewnowski, A. 1992. Food preference and the opioid peptide system. *Trends Food Sci. Technol.* 3:97-99.
28. Driessen, F. M. and Van Den Berg, M. G. 1990. New developments in whey drinks. *IDF Bull.* 250:11-19.
29. Ernest, J. M. 1982. Whey utilization in foods. *Digest of International Dairy Publications* 47:22.
30. Fiat, A. M., Migliore-Samour, D., Jolles, P., Drouet, L., Sollier, C. B. D. and Cean, J. 1993. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J. Dairy Sci.* 76:301-307.
31. FitzGerald, R. J. and Meisel, H. 1999. Lactokinins: whey protein-derived ACE inhibitory peptides. *Nahrung.* 43: 165-167.
32. Forsum, E. and Hambreus, L. 1977. Nutritional and biochemical studies of whey products. *J. Dairy Sci.* 60: 370-377.
33. Fox, P. F. 1978. Milk and dairy products as food materials. *Proc. Nut. Soc.* 3:247-254.
34. Fox, P. F. 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.* 72:1379-1400.

35. Fox, P. F., Morrissey, P. A. and Mulvihill, D. M. 1982. Chemical and enzymatic modification of food proteins. In Development in food proteins-I. Hudson, B. J. F. (ed.), Applied Science, London. p. 1.
36. Frohlich, E. D. 1982 Hemodynamic factors in the pathogenesis and maintenance of hypertension. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 41:2400-2407.
37. Gallaher, D. and Schmidl, M. 1998. Bioactive and nutraceutical entities found in whey. Paper presented at Institute of Food Technologists, Annual Meeting, June Atlanta, Georgia, USA.
38. Gezimati, J., Singh, H. and Creamer, L. K. 1996. Heat-interactions and gelation of mixtures of bovine  $\beta$ -lactoglobulin and serum albumin. J. Agric. Food Chem. 44:804-810.
39. Gonzalez-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Paez, M. P. and Guadix, E. M. 1994. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular weight range. Biotech. Bioeng. 44:529-532.
40. Gutteridge, J. M. C., Paterson, S. K., Segal, A. W. and Halliwell, B. 1981. Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin. Biochem. J. 199:259-261.
41. Hagiwara, S., Kawai, K., Anri, A. and Nagahata, H. 2003. Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. The Journal of Veterinary Medical Science 65:319-323.
42. Hagiwara, T., Shinoda, I., Fukuwatari, Y. and Shimamura, S. 1995. Effect of lactoferrin and its peptides on proliferation of rat intestinal epithelial cell line, IEC-18, in the presence of epidermal growth factor. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 59:1875-1881.
43. Ham, S. S., Lee, S. Y., Oh, D. H., Kim, S. H. and Hong, J. K. 1997. Development of beverages drinks using mountain edible herbs. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26:92-100.
44. Hambling, S. G., McAlpine, A. S. and Sawyer, L. 1992. P-lactoglobulin. In "Advanced dairy chemistry. Proteins" (P. F. Fox, ed.) p. 141. Essex: Elsevier Appl. Sci. vol 1.
45. Haque, E., Chand, R. and Kapila, S. 2009. Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. Food Reviews International 25:28-43.
46. Haurowitz, F. 1986. Immunochemistry and the biosynthesis of antibodies. John Wiley and Sons Inc., New York.
47. Holsinger, V. H. 1987. Lactose-modified milk and whey. Food Tech. 32:35-40.
48. Hong, Y. H. and Creamer, L. K. 2002. Changed protein structures of bovine  $\beta$ -lactoglobulin B and  $\alpha$ -lactalbumin as a consequence of heat treatment. Int. Dairy J. 12:345-359.
49. Hosinger, V. H. 1974. Whey beverage-A review. J. Dairy Sci. 57:849-859.
50. Hourigan, J. A. 1984. Nutritional implications of lactose. Aust. J. Dairy Technol. 39:114-120.
51. Jayaprakasa, H. M. R., Patel, S. and Renner, E. 1993. Application of ultrafiltration technology for production of whey protein concentrate. Proc. X Nat. Conf. IMS on recent Trends in Membrane Science and Technology Jan 21:123.
52. Jolles, P., Levy-Toledano, S., Fiat, A. M., Soria, C., Gillesen, D., Thomaidis, A., Dunn, F. W. and Chen, J. P. 1992. Analogy between fibrinogen and casein: effect of an undecapeptide isolated from  $\kappa$ -casein on platelet function. Biochem. J. 158:97-103.
53. Jost, R. and Monti, J. C. 1977. Partial enzymatic hydrolysis of whey protein by trypsin. J. Dairy Sci. 60:1387-1393.
54. Kananen, A., Savolainen, J., Mäkinen, J., Perttilä, U., Myllykoski, L. and Pihlanto-Leppälä, A. 2000. Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin. Int. Dairy J. 10: 691-697.
55. Karp, N. R. S. 1971. Electrodialyzed whey-based foods for use in chronicuremia. J. Am. Diet. Asso. 59:568-560.
56. Kato, H. and Suzuki, T. 1971. Bradykinin-potentiating peptides from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. Isolation of five bradykinin potentiators and the amino acid sequences of two of them, potentiators B and C. Biochemistry 10:972-980.
57. Kee, H. J. and Hong, Y. H. 1993a. Ginseng-whey beverage production and sensory properties. J. Korean Soc. Food Nutr. 22:202-207.
58. Kee, H. J. and Hong, Y. H. 1993b. Physicochemical and microbiological properties of ginseng-whey beverages. J. Korean Soc. Food Nutr. 22:208-214.
59. Kim, J. H., Park, S. D., Choi, S. Y., Seong, J. H. and Moon, K. D. 2002. Preparation and antioxidant activity of health drink with extract powders from safflower seed. Korean J. Food Sci. Technol. 34:182-187.

60. Kim, J. S., Park, H. K., Hwang, I. B. and Heo, T. R. 1994. The production of whey beverage with culture of lactic acid bacteria and *Kluyveromyces fragilis* by the use of ultrafiltration. Korean J. Food Sci. Resour. 14: 217-223.
61. Kinoshita, E., Yamakoshi, J. and Kiluchi, M. 1993. Purification and identification of angiotensin-I converting enzyme inhibitor from soy sauce. Biosci. Biotech. Biochem. 57:1107-1110.
62. Kinsella, J. E. 1988. Protein modification: Effects on functional properties and digestibility. In Milk protein; Nutritional, clinical, functional and technological aspects (Barth, C. A., and E. Schlimme, editors). Springer-Verlag, New York, USA.
63. Kitts, D. D. and Weiler, K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. Curr. Pharm. Des. 9:1309-1323.
64. Kitts, D. D. and Yuan, Y. V. 1992. Casein phosphates calcium bioavailability. Trends in Food & Technology 3:31-34.
65. Kohama, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Teramoto, T., Okabe, M. and Mimura, T. 1988. Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from tuna muscle. Biochem. Biophys. Res. Commun. 155(1):332-337.
66. Kohama, Y., Oka, H., Kayamori, Y., Tsujikawa, K., Mimura, T., Nagase, Y. and Satake, M. 1991. Potent synthetic analogues of angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from tuna muscle. Agric. Biol. Chem. 55:2169-2170.
67. Korhonen, H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. Journal of Functional Foods 1: 177-187.
68. Kosikowski, F. 1982. Cheese and fermented milk foods. 2nd ed., Brooktondale, New York.
69. Kosikowsky, F. V. 1979. Whey utilization and whey products. J. Food Sci. 62:1149-1153.
70. Kriel, J. B. and Tonder, J. F. 1979. Whey beverage. J. A chocolate beverage made from sweet whey. S. Afr. J. Dairy Tech. 11:123-130.
71. Kronman, M. J. 1981. Characteristics of the binding of  $Ca^{2+}$  and other divalent metal ions to bovine  $\alpha$ -lactalbumin. J. Biol. Chem. 256:8582-8586.
72. Lagrange, V. 1998. International markets for milk powders. First Annual Concentrated and Dried Milk and Whey Products Symposium. March 30-31, San Francisco, CA.
73. Lahov, E., Edelsten, D., Sode-Mogensen, M. T. and Sofer, E. 1971. Properties of basic glycopeptides from cow milk protein by heat. Milchwissenschaft 26:489-495.
74. Law, B. A. 2001. Controlled and accelerated cheese ripening: The research base for new technologies. International Dairy Journal 11:383-398.
75. Lee, K. B., Shin, Y. K. and Baick, S. C. 2012. Effect of sodium caseinate hydrolysates on angiotensin-I converting enzyme inhibition activity. Korean J. Food Sci. An. 32:652-658.
76. Lee, S. R. 1984. Food and nutrition. Agricultural Village Nutrition Improvement Training Institute 5:14.
77. Lieske, B. and Konrd, G. 1996. Interrelation between pH and availability of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin for proteolysis by papain. Int. Dairy J. 6:359-370.
78. Lindmark-MaËnsson H. B. AË kesson. 2000. Antioxidative factors in milk. British Journal of Nutrition 84(Suppl. 1):S103-S110.
79. Madureira, A., Tavares, T., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., and Malcata, F. X. 2010. Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. Journal of Dairy Science 93:437-455.
80. Mann, E. J. 1989. Whey utilisation-part 1. Dairy Industry International, July. p. 9.
81. Marshall, W. E. 1994. In functional foods, designer foods, pharmafoods, nutraceuticals (Goldberg I, editor). Chapman and Hall, New York. p. 242.
82. Maruyama, S., Mitachi, H., Tanaka, H., Tomizuka, N. and Suzuki, H. 1987. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin-converting enzyme I inhibitors derived from casein. Agric. Biol. Chem. 51:1581-1586.
83. Maruyama, S., Miyoshi, S. and Tanaka, H. 1989. Angiotensin-I converting enzyme inhibitors derived from *Ficus carica*. Agric. Biol. Chem. 53:2763-2767.
84. Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. and Suzuki, H. 1985. Angiotensin-I converting enzyme inhibitors derived from casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. Agric. Biol. Chem. 49:1403-1404.
85. Mathur, B. N. and Shahani, K. M. 1979. Use of total whey constituents for human food. J. Dairy Sci. 62: 99-103.

86. Matsumura, N., Fujii, M., Takeda, Y. and Shimizu, T. 1993. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57:1743-1744.
87. Matthews, M. E. 1984. Whey protein recovery process and products. *J. Dairy Sci.* 67:2689-2692.
88. Maubois, J. L. and Ollivier, G. 1997. Extraction of milk proteins. In *Food proteins and their applications* (Damodaran, S., and Paraf, A. editors). Marcel Dekker, Inc. (New York, USA). p. 579.
89. McIntosh, G. H., Royle, P. J., Le Leu, R. K., Regester, G. O., Johnson, M. A., Grinstead, R. L., Kenward, S. and Snithers, G. W. 1998. Whey protein as functional food ingredient. *Int. Dairy J.* 8:425-434.
90. Meisel, H. and Schlimme, E. 1990. Milk proteins: Precursors of bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology* 1:41-43.
91. Migloire-Samour, D., Floch, F. and Joll'es, P. 1989. Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *Journal of Dairy Research* 56:357-362.
92. Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S. 1991. Structure and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an  $\alpha$ -zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* 55:1313-1318.
93. Monti, J. C. and Jost, R. 1978. Enzymatic solubilization of heat-denatured cheese whey protein. *J. Dairy Sci.* 61:1233-1237.
94. Morr, C. V. and Ha, E. Y. W. 1993. Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Crit. Review Food Sci. Nutr.* 33(6):431-476.
95. Mullally, M. M., Meisel, H. and FitzGerald, R. J. 1997. Identification of novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide corresponding to tryptic fragment of bovine beta lactoglobulin. *FEBS Letter.* 402:99-101.
96. Muramoto, M. and Kawamura, Y. 1991. Antihypertensive peptides derived from rice protein. *Shokuhin Kogyo* (in Japanese). 11:18-20.
97. Nagaoka, M. 1991. Gifu University explains mechanism for lowering of rat blood cholesterol by whey proteins. *Comline: Biotechnology Medical Industry of Japan*, pg. CBI910328002.
98. Nishikawa, K. 1993. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Protein, Nucleic Acid and Enzyme* (in Japanese). 38:239-243.
99. Noh, W. S. and Huh, S. H. 1999. Health foods supplementary and functional foods. *Hyoj Munhwa Co.* p. 13.
100. Noyelle, K. and van Deal, H. 2002. Kinetics of conformational changes induced by the binding of various metal ions to bovine  $\alpha$ -lactalbumin. *J. Inorganic Biochem.* p. 88.
101. Oh, J. K., Kim, B. J., Shin, Y. O. and Jung, H. J. 2000. The efficacy of sports drink by using *Schizandra chinensis*. *The Korean Journal of Physical Education* 41:617-633.
102. Okamoto, M., Hayashi, R., Enomoto, A., Kaminogawa, S. and Yamauchi, K. 1991. High pressure proteolytic digestion of food proteins: Selective elimination of  $\beta$ -lactoglobulin in bovine milk whey concentrate. *Agr. Biol. Chem.* 55:1253-1257.
103. Oshima, G., Shimabukuro, H. and Nagasawa, K. 1979. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochim. Biophys. Acta.* 566:128-137.
104. Otani, H., Negoro, H., Hosono, A. 1991. Studies on the antigenicity of cow  $\kappa$ -casein. *Milchwissenschaft* 46:23-26.
105. Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North, A. C. T., Findlay, J. B. C., Sivaprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E. and Kraulis, P. J. 1996. The structure of  $\beta$ -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol binding protein. *Nature* 324:383-385.
106. Park, H. M., Hong, Y. H. and Oh, S. H. 1988. Studies on the development of whey drinks. *Korean J. Dairy Sci.* 10:92-100.
107. Park, I. D. and Hong, Y. H. 1992. Development of fresh cheeses and whey drinks using milk components. *Korean J. Food Sci. Technol.* 24:209-214.
108. Park, S. H., Hwang, H. S. and Han, J. H. 2004. Development of drink from composition with medicinal plants and evaluation of its physiological function. *The Korean Nutrition Society* 37:364-372.
109. Park, S. Y. 1995a. The effect of sport drink on heart rate and lactate exercise. *The Korean Journal of Physical Education* 34:182-190.
110. Park, Y. H. 1995b. A study on the development pumpkin-citron-honey drink. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 24:625-634.
111. Pelkin, P., Launay, B. and Eynard, L. 1993. Effect of sodium and calcium addition on denaturation of apo- $\alpha$ -lactalbumin: A differential scanning calorimetric study.



- J. Dairy Sci. 76:36-47.
112. Permyakov, E. A. and Berliner, L. J. 2000.  $\alpha$ -Lactalbumin: Structure and function. FEBS Lett. 473:269-274.
  113. Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Paakkari, I., Tupasela, T. and Korhonen, H. 1996. Opioid whey protein peptides obtained by membrane filtration. Bull. IDF 311:36-38.
  114. Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T. and Korhonen, H. 1998. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. Int. Dairy J. 8:325-331.
  115. Pintado, M. E., Pintado, A. E. and Mlcata, F. X. 1999. Controlled whey protein hydrolysis using two alternative protease. J. Food Eng. 42:1-13.
  116. Ragno, V., Giampietro, P. G., Bruno, G. and Businco, L. 1993. Allergenicity of milk protein hydrolysate formulae in children with cow milk allergy. Eur. J. Pediatr. 152: S2-S6.
  117. Reddy, I. M., Kella, N. K. D. and Kinsella, J. E. 1988. Structural and conformational basis of the resistance of  $\beta$ -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. J. Agr. Food Chem. 36:737-741.
  118. Relkin, P. 1996. Thermal unfolding of beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin, and bovin serum albumin. A thermodynamic approach. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 36:565-601.
  119. Ribadeau-Duma, B. 1988. Structure and variability of milk proteins. In Milk proteins: Nutritional, clinical, functional and technological aspects (Barth, C., and Schlimme, E. editors). Springer-Verlag. New York. USA.
  120. Ronsivalli, L. J. and Vieira, E. R. 1990. Elementary food science (3rd edition). AVI.
  121. Rory, A. and Delaney, M. 1981. Recent development in the utilization of whey. J. Cultured Dairy Products 16: 1229-1240.
  122. Ruegg, M., Moor, U. and Blance, B. 1977. A calorimetric study of thermal denaturation of whey protein in stimulated milk ultrafiltrate. J. Dairy Res. 44:509-520.
  123. Salminen, S., Gorvach, C. S. and Salminen, K. 1991. Fermented whey drink and yogurt-type product manufactured using *Lactobacillus* strain. Food Technol. 45: 112-113.
  124. Schneeman, B. O. 1986. Special report dietary fiber. Food Tech. 40:120-130.
  125. Schoch, G. 1998. Milk protein and clinical nutrition. In Milk protein; Nutritional, clinical, functional and technological aspects. Springer-Verlag (New York). p. 223.
  126. Sealey, J. E. and Laragh, J. H. 1990. Hypertension; pathophysiology, diagnosis and management (Edited by Laragh, J. H. and Brenner, B. M.). The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis, Raven Press, LTD., New York. p. 1287.
  127. Singh, H. and Newstead, D. F. 1992. Aspects of proteins in milk powder manufacture. In Advanced dairy chemistry-1: proteins (Fox. P. F. editor). Elsevier Science Publishers, England. p. 735.
  128. Smith, G. 1976. Whey protein. Wld Rev. Nutr. Diet. 24:88-116.
  129. Smither, G. W., Ballard, F. J., Copeland, A. D., de Silva, K. J., Dionysius, D. A., Francis, G. L., Goddard, C., Grieve, P. A., Mcintosh, G. H., Mitchell, I. R., Pearce, R. J. and Regester, G. O. 1996. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. J. Dairy Sci. 79:1454-1459.
  130. Song, S. Y. and Oh, S. J. 2012. Global dairy industry and current situation: III. 2010 World dairy report. Korean J. Dairy Sci. Technol. 30:11-16.
  131. Suh, H. J., Cho, S. J., Whang, J. H., Lee, H. and Yang, H. C. 1997. Characterization of angiotensin converting enzyme inhibitor from squid hydrolysate. Food and Biotechnology 6:122-128.
  132. Suh, H. J., Suh, D. B., Chung, S. H., Whang, J. H., Sung, H. J. and Yang, H. C. 1994. Purification of ACE inhibitor from soybean paste. Korean J. Agric. Chem. Boitech. 37:441-446.
  133. Swaisgood, H. E. 1988. Structural changes in milk protein. In Milk proteins: Nutritional, clinical, functional and technological aspects (Barth, C. and Schlimme, E. editors). Springer-Verlag, New York, USA.
  134. Takada, Y. 1997. Whey protein suppresses the osteoclast-mediated bone resorption and osteoclast cell formation. Int. Dairy Journal 7:821-825.
  135. Therese Rexrota, M. and Bradley, R. L. Jr. 1986. Acceptance of frozen desserts made with concentrated, decolorized, deionized hydrolyzed whey permeate. J. Dairy Sci. 69:1225-1231.
  136. Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H. and Kawase, K. 1991. Potent antibacterial

- peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* 74:4137-4142.
137. van Beresteijn, E. C. H., Peeters, R. A., Kaper, J., Meijer, R. J. G. M., Ml Robben, A. J. P. and Schmidt, D. G. 1994. Molecular mass distribution, immunological properties and nutritive value of whey protein hydrolysates. *J. Food Prot.* 57:619-625.
138. van der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D. B. A. and Voragen, A. G. J. 2001. Reversed phase and size exclusion chromatography of milk protein hydrolysates; Relation between elution from reversed phase column and apparent molecular weight distribution. *Int. Dairy J.* 11:83-92.
139. Wagner, K. H., Abi, A. and Maiwald, K. G. 1975. Die ernaehrungsphysiologische Bedeutung von Getraenke fuer die Osmolaritaet. *Milchwiss.* 30:724.
140. Walker, N. 1987. Fresh vegetable and fruit juices. Sejong Publishing Co., Seoul, Korea, p. 32.
141. Watanabe, A., Okada, K., Shimizu, Y., Wakabayashi, H., Higuchi, K., Niiya, K., Kuwabara, Y., Yasuyama, T., Ito, H., Tsukishiro, T., Kondoh, Y., Emi, N. and Kohri, H. 2000. Nutritional therapy of chronic hepatitis by whey protein (non-heated). *J. Med.* 31:283-302.
142. Wong, G. and Wand Watson, D. L. 1998. Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. *J. Dairy Res.* 62:359-377.
143. Wzorek, W. and Kosikowski, F. V. 1983. Attempts at increasing the fermentation of lactose during the production of whey wine. *Acta. Aliment. Polonica* 9:41-51.
144. Yamamoto, N. A. and Takano, T. 1994. Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(4):776-778.
145. Yamauchi, K. 1992. Biologically functional protein of milk and peptides derived from milk proteins. *Bull. IDF.* 272:51-58.
146. Yan, S. H., Hill, C. G. Jr. and Amundson, C. H. 1979. Ultrafiltration of whole milk. *J. Dairy Sci.* 62:23-40.
147. Ye, X., Yoshida, S. and Ng, T. B. 2000. Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin,  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin B and  $\beta$ -lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatograph. *Int. J. Bioch. Cell Biol.* 32:1143-1150.
148. Yeum, D. M., Lee, T. G., Byun, H. S., Kim, S. B. and Park, Y. H. 1992. Angiotensin- I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of mackerel muscle protein. *Bull. Korean Fish. Soc.* 25:229.
149. Yoon, S. L. 1991. Home therapy using vegetable and fruit. Geumyoo publishing Co., Soul, Korea. p. 9.
150. Yoon, Y. C., Ahn, S. I., Jeong, A. R., Han, S. E., Kim, M. H. and Lee, C. K. 2010. Characteristics of whey protein (WPC-30) hydrolysate from cheese whey. *J. Animal Sci. & Technol.* 52:435-440.
151. Zadow, J. G. 1989. Whey utilisation-part 1. *Dairy Industry International* July:9-10.
152. Zemel, M. B. 2003. Mechanism of dairy modulation of adiposity. *J. Nutr.* 133:252S-256S.
153. Zioudrou, C., Streaty, R. A. and Klee, W. A. 1979. Opioid peptide derived from food protein. *J. Biochemical Biochemistry* 254:2446-2449.

---

(Received: August 22, 2013 / Accepted: September 30, 2013)