

## 유기농 유청 단백질 가수분해의 최적 효소 선발

서형주 · 신중철\* · 김재환\* · 장주현 · †한성희\*\*

고려대학교 의생명융합학과, 고려대학교 대학원, \*네오크레마,  
\*\*BK21Plus 인간생명사회환경상호작용융합사업단, 고려대학교

### Optimal Enzyme Selection for Organic Whey Protein Hydrolysis

Hyung Joo Suh, Jung Cheul Shin\*, Jae Hwan Kim\*, Joo Hyun Jang and †Sung Hee Han\*\*

Dept. of Integrated Biomedical and Life Science, Graduate School, Korea University, Seoul 02841, Republic of Korea.

\*NeoCremar Co. Ltd., Seoul 05836, Republic of Korea.

\*\*BK21Plus, College of Health Science, Korea University, Seoul 02841, Korea

#### Abstract

The purpose of this study was that the optimal hydrolysis conditions of endo- and exo-type enzymes were selected to utilize organic cheese byproducts. Optimal substrate concentration and optimum enzyme ratio were measured by using 4 kinds of endo-type enzymes (alcalase, neutrase, protamex, and foodpro alkaline protease) and two exo-type enzymes (flavourzyme and prozyme 2000P) for whey protein hydrolysis were analyzed using liquid chromatography. As a result, the optimal endo-type enzyme through the first enzyme reaction was selected as alcalase, and as a result of the secondary enzyme reaction, flavourzyme was selected as the Exo type enzyme. The concentration of whey protein substrate for optimal primary and secondary enzyme reactions was 10%. In addition, the optimum ratio of enzyme was 0.5% of alcalase and 0.2% of flavourzyme, which showed low molecular weight chromatography pattern compared to 2% of alcalase and 1% of flavourzyme hydrolyzate. Therefore, hydrolyzing the endo-type enzyme alcalase at a concentration of 0.5% for 10 hours and then hydrolyzing the exo-type enzyme flavourzyme at a concentration of 0.2% for 4 hours was considered to be the optimum condition.

Key words; whey protein, alcalase, flavourzyme, endo type, exo type

#### 서 론

유청(whey)은 치즈 제조 과정 중 얻어지는 부산물로서 치즈(우유농축물 커드)를 제외한 나머지 수용성 부분을 총칭으로 말하고 있다. 유청은 치즈를 만드는 카제인을 제외한 대부분의 유효성분인 단백질, 유당, 무기질, 비타민, 무기성분들을 함유하는 부산물로서 영양적 또는 생리학적으로 높이 평가되고 있다(Kimball & Jefferson 2001; Kim 2015). 유청은 크게 sweet whey(pH 6~7)와 acid whey(pH 5이하)로 나누어진다. Sweet whey는 치즈 제조 시 린넛을 가하여 우유로부터 카제

인과 지방의 응고물인 커드 제거로 얻어지며, acid whey는 탈지유에서 식용산을 사용하여 pH 4.3~4.6 수준이 되도록 조정하여 얻어지게 된다(Kosikowski FV 1979). 통상적으로 만들어지는 sweet whey의 경우는 대부분이 치즈 제조 시 린넛 분리를 통해 부산물로서 만들어지고, acid whey는 카제인나트륨, 카제인칼슘 등을 만든 이후의 부산물로 만들어지게 된다. Sweet whey는 acid whey보다 미네랄 함량은 낮지만, 상대적으로 단백질, 유당 및 지방 함량이 높게 나타난다(Siso MG 1996). 유청 성분 중에서도 특히 유청단백질은 영양성, 생리활성과 더불어 폭넓은 식품학적 기능을 가지고 있기 때문에,

† Corresponding author: Sung Hee Han, Bk21Plus, College of Health Science, Korea University, Seoul 02841, Korea. Tel: +82-2-940-2764, Fax: +82-2-940-2859, E-mail: sungheeh3@gmail.com

여러 식품에 다양하게 이용될 수 있어, 이에 대한 연구가 활발하게 수행되고 있다(Lagrange V 1998; Son 등 2003). 특히, 최근에는 유청 단백질이 대장암, 간의 해독, 통풍, 혈중 콜레스테롤, 면역력 및 어린이의 뼈 성장 촉진 등에 대한 생리활성 효과가 있다고 보고되어 관심이 더욱 증가하고 있다(Hayes & Cribb 2008; Pal 등 2010). 따라서, 이러한 치즈 부산물을 이용한 기능성 소재 원료를 분리하는 기술 개발이 요구되고 있는 실정이다.

효소적 단백질 분해는 용해성이 증가하고, 생물학적 활성 펩타이드를 유리시키는 것으로 밝혀져 있어, 효소에 의한 가수분해물에 대한 연구가 지속되고 있다(Bae 등 2012; Spellman 등 2003). 그러므로, 치즈로부터 분리된 유청 단백질을 기능성 소재로 이용하기 위해서는 가수분해의 최적 조건을 선별하는 것이 매우 중요하다(Lagrange V 1998; Ortiz & Wagner 2002). 특히 가수분해 조건에 따라 그 가수분해의 특성이 달라지게 된다. 효소는 단백질을 rough하게 가수분해하는 endo type 효소와 단백질의 말단부터 분해하는 exo type의 효소 조합 및 가수분해 순서에 따라 그 특성이 달라지게 된다(Villanueva 등 1999).

한편, 유기가공 식품은 건강을 보다 지향하는 소비자의 니즈로서, 지속적으로 그 시간이 증가하고 있으나, 유기가공식품에 적용할 수 있는 유기농 소재가 매우 제한적이기 때문에, 소비자의 다양한 니즈에 기존 제품이 부응하고 있지 못하고 있는 상황이다.

따라서 본 연구에서는 유기농 치즈 부산물을 활용한 기능성 바이오 소재 개발을 위하여 endo type 및 exo type 효소의 최적 가수분해 조건을 선정함으로써, 유청 단백질 가수분해물을 통한 고부가가치 식품기술 개발 및 적용의 기초 자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 유청 단백질 및 가수분해 효소

본 실험에 사용한 유청단백질은 (주)네오크레마에서 제공받아 사용하였다. 치즈부산물로부터 분리된 유청 단백질을 가수분해하기 위한 효소를 선별하기 위하여 특성이 다른 2가지, endo type과 exo type의 효소를 탐색하였다. Endo type protease 3종과 exo type protease 효소 2종을 선별하여 endo-exo 효소의 순서로 실험을 수행하였다. 선별된 효소는 식품가공에 사용할 수 있는 효소들로 식품공전, 식품첨가물공전 등 국내법에 근거하여 선별하였으며, 안정적인 공급이 가능한 제조사의 제품으로 선별하였다. 또한, 효소의 활성과 수율 및 생산성을 고려하여 열 안정성 및 pH 안정성과 같이 효소의 기초적인 특징을 고려하여 선별하였다.

### 2 유청 단백질 가수분해물의 제조

유기농 치즈부산물로부터 분리된 유청 단백질(whey protein)을 50°C 정도의 정제수에 10%(w/w) 되도록 녹여 slurry를 제조하였다. 온도를 80~85°C까지 승온하면서 NaOH를 이용하여 pH 8.1~8.5 정도로 맞춘 후, 다시 유청 단백질 용액의 온도를 50~55°C로 재조정하였다.

### 3. 1차 효소 반응 및 2차 효소반응

먼저 endo type 효소를 이용한 1차 효소 반응을 위한 최적 효소를 선정하기 위하여 endo type 가수분해효소는 *Bacillus licheniformis* 유래 alcalase(Novo Nordisk, Clayton, NC, USA), *B. amyloliquefaciens* 유래 neutrase(Novo Nordisk), *B. licheniformis* 유래 protamex(Novo Nordisk), *B. licheniformis* 유래 foodpro alkaline protease(DuPont Industrial Biosciences, Wilmington, DE, USA) 등 4종을 이용하여 반응 시간에 따른 pH 변화를 측정하였다. 즉, 앞서 제조한 유청 단백질 가수분해물 slurry에 각각의 endo type 가수분해효소를 기질농도 대비 2%(w/v)를 첨가하여 반응온도 50~55°C에서 10시간 동안 반응하여 pH를 측정하였다.

1차 효소 반응 결과를 토대로 선정한 alcalase endo type 효소를 이용하여 50~55°C에서 4시간 동안 반응시킨 효소분해 1차 산물에 각각의 exo type 효소는 *Aspergillus oryzae* 유래 flavourzyme(Novo Nordisk)과 *A. oryzae* 유래 prozyme 2000P (DuPont Industrial Biosciences)를 첨가하여 가수분해하였다. 반응 종료 후 가수분해도를 측정하여 exo type 효소를 선정하였다.

### 4. 가수분해도 측정

가수분해 반응 종료 후의 가수분해도는 액체크로마토그래피를 이용하여 측정하였다. 분석에 사용한 column은 내경 7.8 mm, 길이 300~600 mm의 스테인리스관에 thiol화한 10 μm의 실리카겔(protein pak 125)을 충전한 것으로 사용하였으며, 이는 분자량 60,000 이하가 분리 가능한 것이다. 이동상은 0.5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+0.5M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.4), 유속은 0.5 mL/min, 검출 파장은 UV 280 nm에서 수행하였다. 표준용액은 난알부민 50,000 Da, 트립신 24,000 Da, Ribonuclease A 13,700 Da, Neurotensin 1,673 Da, Leucine Enkephalin 555.6 Da을 각각 이동상 1 mL에 용해시켜 사용하였다.

### 5. 최적 기질(유청단백) 농도와 최적 효소 비율 설정

최적의 기질 농도와 최적 효소 비율을 선정하는 것은 scale up 공정 및 산업화 공정에 적용하여 제조원가 및 단백질 가수분해물의 생산량을 확보하기 위한 중요한 지표이다. 따라서, 두 가지 최적 효소를 선정 한 후에 다음과 같이 실험하

였다.

최적의 기질농도를 설정하기 위하여 50℃ 온도의 정제수에 유청 단백을 10, 20 및 30%(w/v)의 농도가 되도록 하여 1시간 동안 200~300 rpm 조건에서 교반하였다. 그리고 선정한 최적 기질농도(10%, w/v)를 통해 최적 효소 비율을 설정하였다. 10% 기질 농도에 endo type protease인 alcalase 효소농도를 기질 대비 1% → 0.5%로 조정하고, exo type protease인 flavourzyme 효소농도를 기질 대비 1% → 0.2%로 조정하였고, 반응온도 50℃로 설정하여 1차 반응시간 4시간, 2차 반응시간은 10시간으로 설정하여 반응을 수행하였다. 반응완료 후 가수분해 정도를 측정하여 최적 효소 비율을 선정하였다.

## 6. 통계분석

실험 결과는 SPSS program(ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계 처리하였으며, 모든 측정 항목에 대한 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하였다. 실험군 간의 유의성은 ANOVA test 후, 구체적인 사후 검증은  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test로 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 1차 효소(Endo type enzyme)의 반응시간별 pH

네 가지 종류의 endo type 효소를 이용하여 유청 단백질 가수분해 반응 실험 결과, 4개 효소 모두 공통적으로 반응 시간이 진행됨에 따라 pH가 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이는 단백질이 분해됨에 따라 생성된 아미노산의 의해 pH가 감소하는 것으로, pH 조정으로 반응을 유지시킬 수 있다고 판단된다.

선정한 4개의 효소 중에서 alcalase는 반응시간 2시간이 되는 시점까지 pH가 가장 빠른 속도로 감소하는 것으로 나타났고, 그 이후 시간부터는 반응 종료 시점까지 일정 pH가 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 반응속도가 빠르게 진행됨에 따라 가수분해 정도가 증가되어 분해된 펩타이드에 의하여 pH가 감소할 수 있음을 알 수 있다. Alcalase의 최적 활성 조건은 온도 50~70℃ 및 pH 6~10이고, 그 활성도는 1.01 AU/g이며, 85℃에 2분간 노출되면 불활성화 되는 특징을 갖는다. Alcalase의 가수분해 반응속도상수는 최적 조건에서 반응 시작 시간으로부터 반응시간 50분까지는 급속히 증가하고, 반응시간 50분부터 약 150분까지 다소 둔감된 반응속도 상수를 나타낸다(Costa 등 2007). 즉, 반응시작 시간부터 약 150분까지는 가수분해 정도가 비례적으로 증가하다가, 그 이후에는 일정한 반응속도를 유지하는 것이다. 이는 Fig. 1과 비슷한 결과를 보여주고 있다. 반응 시간 120분 이후

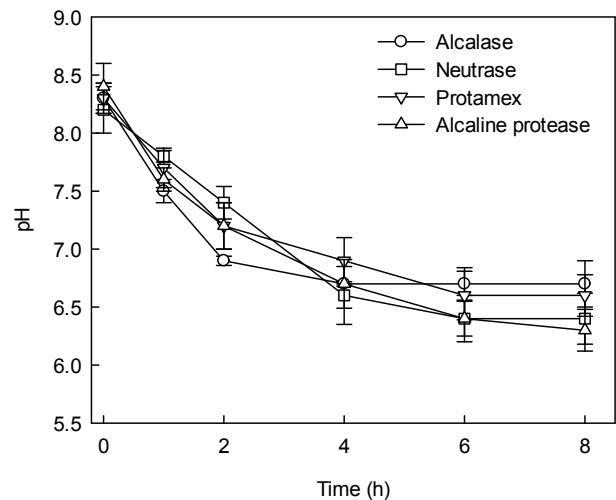


Fig. 1. Effect of endo type protease on pH of whey protein hydrolysate according to reaction times.

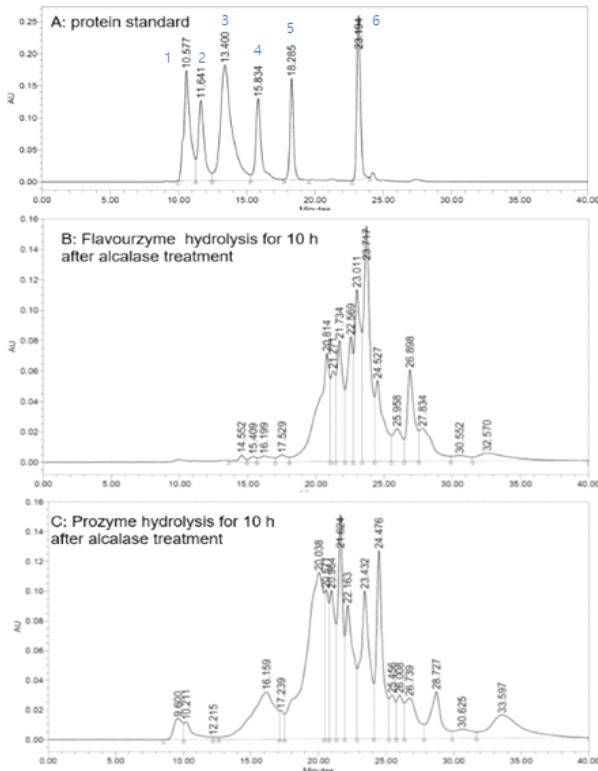
에 일정한 pH를 유지하는 것을 통해 일정한 반응 시간 이후에는 그 가수분해 정도가 일정하게 유지됨을 알 수 있다.

Alcalase를 제외한 나머지 3개의 효소들은 시간이 지남에 따라 지속적으로 pH가 감소하는 결과를 나타냈다. 이것은 neutrase 2.4L, protamax 및 foodpro alkaline protease의 경우는 반응초기에 그 속도가 급격하지 않고, 오랜 시간동안 지속적으로 반응속도가 유지됨을 의미하므로, 산업적인 측면을 고려하였을 때 그 효용성이 떨어진다고 볼 수 있다. 따라서 alcalase를 1차 효소 반응에 적합한 효소로 선정하였다.

### 2. 반응시간에 따른 2차 효소(Exo type protease)의 선정

1차 효소 반응 실험 결과를 토대로 선정한 alcalase를 유청 가수분해물 slurry에 첨가하여 50~55℃에서 4시간 동안 반응시킨 효소분해 1차 산물을 대상으로 2차 효소 반응 실험을 한 결과, flavourzyme이 prozyme 2000P보다 우수한 가수분해 활성을 나타냈다(Fig. 2). Flavourzyme으로 2차 가수분해 반응시킨 후 가수분해물의 분자량 분포도를 살펴보면, prozyme 2000P보다 상대적으로 분자량이 작다는 것을 알 수 있었다. O'Keeffe & FitzGerald(2014)는 동일한 조건에서 여러 exo type 효소를 반응시켰을 때, flavourzyme의 경우, 5 kDa과 1 kDa 이하의 분자량으로 가수분해되어 retention time이 상대적으로 늦춰진다고 보고하였다. 또한, endo type 효소 중에서는 alcalase를 반응시켰을 때, 저분자량의 가수분해물이 생성된다고 보고하였다. 이와 같은 결과와 다른 연구자들의 보고 내용을 종합하여 고려하였을 때, alcalase와 flavourzyme을 가수분해 최적 효소로 선정한 것이 바람직하다고 판단된다.

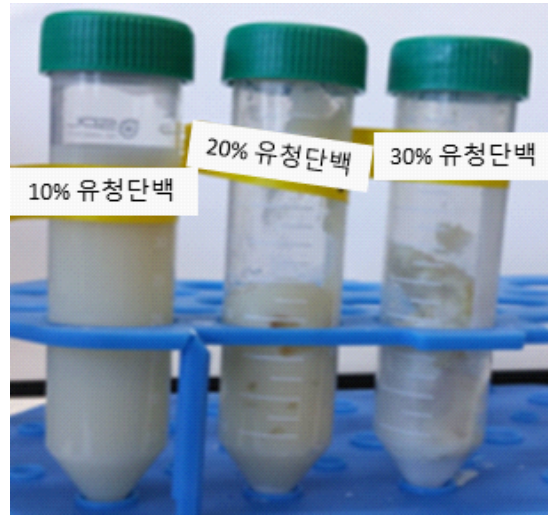
### 3. 최적 기질(유청단백) 농도 및 최적 효소 비율 선정



**Fig. 2. Distribution of molecular weight of whey protein hydrolysate with endo type protease.** (A) Protein standard, 1: bovine thyroglobulin (670 kDa), 2: IgA (from human gamma globulin (300 kDa), 3: IgG (from human gamma globulin (150 kDa), 4: Ovalbumin (44 kDa), 5: Myohlobulin (17kDa); 6: Uridine (0.244 kDa) (B) Flavourzyme; (C) Prozyme.

유청 단백질 기질 농도에 따라 용해한 액상을 확인한 결과 (Fig. 3), 농도가 20 및 30%인 농도에서는 유청 단백질의 응집이 발생하는 것을 확인하였다. 교반기를 이용하여 교반하였으나, 10% 이상의 기질 농도에서는 효소 반응을 할 수 없을 정도로 용해 물성이 좋지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서, 효소 반응을 위해서는 10% 이상의 기질 농도는 적합하지 않으므로, 10% 기질 농도를 대상으로 최적의 효소 비율을 결정하기 위한 실험을 진행하였다. Alcalase 효소 반응을 통하여 생리활성 가수분해물을 제조한 Zhu 등(2006)의 연구에서도 유청단백 기질의 농도를 10%로 하여 유청 단백질 가수분해물의 항산화력을 측정했으므로 보나(Zhu 등 2006), 10% 기질 농도를 최적 기질 농도로 선정하는 것에 무리가 없다고 판단하였다.

최적의 효소 비율을 선정하기 위하여 앞서 선정한 최적의 효소, 반응시간 및 기질농도에서 효소 비율별로 반응시킨 후 분자량을 측정했 결과, 그 가수분해물의 분자량 분포도는 Fig. 4와 같다. 가수분해 반응후의 분자량 pattern은 Fig. 2와

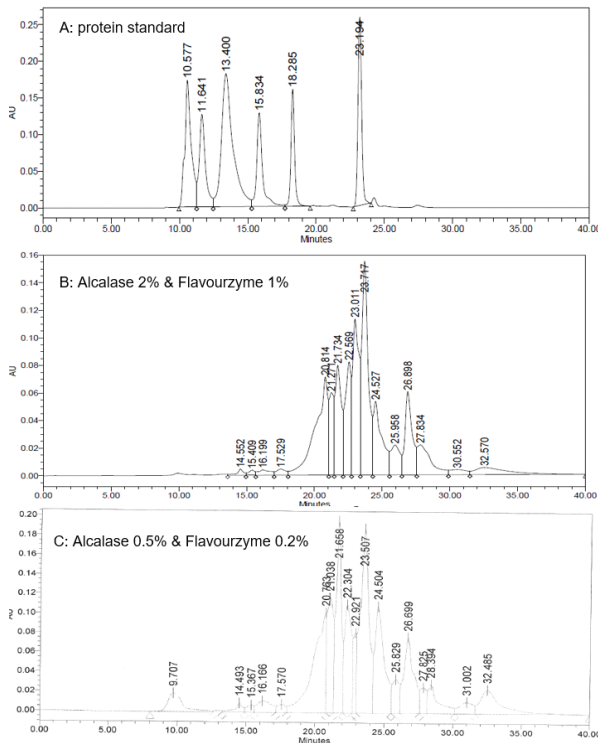


**Fig. 3. Solubility of whey protein in different concentrations**

유사하게 나타났다. 효소 농도에 따른 pattern을 보면 농도에 따른 pattern 차이가 크지 않으며, alcalase 2%, flavourzyme 1%의 가수분해 결과보다 alcalase 0.5%, flavourzyme 0.2%의 가수분해 결과에서 retention time, 30분 이후의 저분자량이 더 많음을 알 수 있다. 효소의 농도에 따른 가수분해 정도가 유의적으로 큰 차이를 보이지 않았고, 식품산업에 응용하기 위한 가공비와 생산성을 고려한다면 alcalase와 flavourzyme을 각각 기질 대비 0.5%와 0.2%로 선정하는 것이 최적 효소 비율이라고 판단하였다.

**요약 및 결론**

본 연구에서는 유기농 치즈 부산물을 활용하기 위하여 endo type 및 exo type 효소의 최적 가수분해 조건을 선정하고자 하였다. 유청 단백질 가수분해를 위한 endo type 효소 4종, alcalase, neutrase, protamex, foodpro alkaline protease 및 exo type 효소 2종, flavourzyme, prozyme 2000P을 사용하여 최적 기질농도와 최적 효소 비율을 측정하였고, 가수분해정도는 액체크로마토그래피를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 1차 효소 반응을 통한 최적의 endo type 효소는 alcalase로 선정하였고, 2차 효소 반응 결과, exo type 효소로는 flavourzyme으로 선정하였다. 최적의 1차와 2차 효소 반응을 위한 유청 단백질 기질의 농도는 10%로 나타났다. 또한, 최적 효소 비율은 alcalase 0.5%와 flavourzyme 0.2%의 비율로 나타났으며, 이는 alcalase 2%, flavourzyme 1% 가수분해물에 비하여 저분자량의 크로마토그래피 패턴을 나타냈다. 따라서, 10%의 유청단백 기질농도에 endo type 효소인 alcalase를 0.5%의 농도로 10시간 동안 가수분해한 후, exo type 효소인 flavourzyme을 0.2%의 농도로 4시간 동안 가수분해하는 것이 최적 조건이라고



**Fig. 4. Molecular weight distribution of hydrolyzate according to enzyme concentration.** (A) Protein standard; (B) Primary reaction: alcalase 2%, secondary reaction: Flavourzyme 1%; (C) Primary reaction: alcalase 0.5%, secondary reaction: flavourzyme 0.2%.

판단하였으며, 이는 산업적으로 유기농 치즈 부산물을 이용하여 기능성 바이오 소재를 개발 및 적용하기 위한 유용한 정보가 되리라고 사료된다. 또한, 최적 조건에서 최적 효소에 의해 생성된 가수분해물의 분자량별 정제 연구가 필요할 것이라고 판단된다.

### 감사의 글

본 과제는 농림수산물부 고부가 식품개발사업 지원에 의한 연구로 이에 감사드립니다.

### References

Costa EL, Rocha Gontijo JA, Netto FM. 2007. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *Int Dairy J* 17:632-640

Hand R, Bae HC, Jeong SG, Nam MS. 2012. Isolation of whey protein and hydrolysis pattern of whey protein by proteolytic enzyme. *J Agric Sci* 39:561-568

Hayes A, Cribb PJ. 2008. Effect of whey protein isolate on strength, body composition and muscle hypertrophy during resistance training. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11: 40-44

Kim CH. 2015. Quality characteristics of *seolgiddeok* added with whey protein concentrate (WPC) powder. *Korean J Food Nut* 28:436-445

Kimball SR, Jefferson LS. 2001. Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4:39-43

Kosikowski FV. 1979. Whey utilization and whey products. *J Dairy Sci* 62:1149-1160

Lagrange V. 1998. US whey proteins and new fractions and innovative nutraceuticals. *J Korean Dairy Technol Sci* 16: 106-118

O'Keefe MB, FitzGerald RJ. 2014. Antioxidant effects of enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate on cultured human endothelial cells. *Int Dairy J* 36:128-135

Ortiz SEM, Wagner JR. 2002. Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Res Int* 35:511-518

Pal S, Ellis V, Dhaliwal S. 2010. Effects of whey protein isolate on body composition, lipids, insulin and glucose in overweight and obese individuals. *Br J Nutr* 104:716-723

Siso MG. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresour Technol* 57:1-11

Son MH, Park JH, Lee SC. 2003. Antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from whelk (*Buccinum middendorffi* Verkrü) internal organ. *Food Sci Biotechnol* 12:683-686

Spellman D, McEvoy E, O'cuinn G, FitzGerald R. 2003. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *Int Dairy J* 13: 47-453

Villanueva A, Clemente A, Bautista J, Millán F. 1999. Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-proteases. *Grasas Aceites* 50:472-476

Zhu K, Zhou H, Qian H. 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochem* 41:1296-1302

Received 10 August, 2017

Revised 25 August, 2017

Accepted 09 September, 2017