



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0013378
(43) 공개일자 2022년02월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23J 3/34 (2006.01) A23J 1/20 (2006.01)
A23L 2/66 (2006.01) A23L 33/18 (2016.01)
- (52) CPC특허분류
A23J 3/343 (2013.01)
A23J 1/205 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7040839
(22) 출원일자(국제) 2020년05월29일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년12월13일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/065022
(87) 국제공개번호 WO 2020/239998
국제공개일자 2020년12월03일
- (30) 우선권주장
19177371.2 2019년05월29일
유럽특허청(EPO)(EP)
20156159.4 2020년02월07일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (71) 출원인
아를라 푸즈 에이엠비에이
덴마크, 디케이-8260 비비 제이, 쉐테르웨즈 14
- (72) 발명자
쇠렌센, 한스 페테르
덴마크, 쉐테루프 6920 비데베크, 쉐테루프바이
24, 아를라 푸즈 내
베르텔센, 한스
덴마크, 쉐테루프 6920 비데베크, 쉐테루프바이
24, 아를라 푸즈 내
쇠렌센, 아테나 쿨데
덴마크, 쉐테루프 6920 비데베크, 쉐테루프바이
24, 아를라 푸즈 내
- (74) 대리인
윤대웅

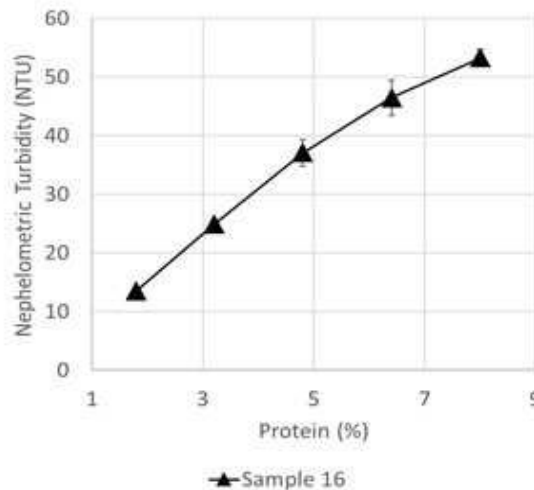
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 맛 좋은 광범위하게 가수분해된 유청 단백질 가수분해물

(57) 요약

본 발명은 가수분해도가 높고, 맛이 좋으며, 한외여과를 거치지 않고도 탁도가 낮은 신규한 유청 단백질 가수분해물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 새로운 유청 단백질 가수분해물의 제조 방법, 새로운 유청 단백질 가수분해물의 용도 및 이러한 새로운 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 식품에 관한 것이다.

대표도 - 도1b



(52) CPC특허분류

A23L 2/66 (2013.01)

A23L 33/18 (2016.08)

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 유청 단백질 가수분해물의 제조 방법:

- a) 총 고형분 함량을 기준으로 적어도 50 중량%의 양으로 유청 단백질을 포함하는 유청 단백질 용액을 제공하는 단계,
- b) 다음 효소 조합 중 하나를 사용하여 효소적 가수분해를 수행하는 유청 단백질 용액을 효소 가수분해하는 단계:
 - i) 바실러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 및 적어도 하나의 트립신-유사 프로테아제를 포함
 - ii) 바실러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 및 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제를 포함
 - iii) 바실러스 아밀로리퀘파시엔스로부터의 적어도 하나의 바실로리신, 적어도 브로멜라인, 및 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제를 포함
- c) 가수분해도(DH)가 15% 이상인 경우 효소를 불활성화시켜 효소적 가수분해를 중지시켜 유청 단백질 가수분해물을 얻는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방법은 단계 c)에서 얻은 유청 단백질 가수분해물을 농축 및/또는 건조하는 단계 d)를 추가적으로 포함하는 것인, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단계 a)의 유청 단백질 용액은 총 고형분 함량을 기준으로 최대 10 중량%의 양의 지질을 포함하는 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단계 b)의 효소적 가수분해는 40℃ 내지 75℃ 범위의 온도에서 수행되는 것인, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 c)에서 효소의 불활성화는 적어도 80℃, 바람직하게는 80℃ 내지 130℃의 온도로 가열하는 것인, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 단계 c)에서 수득된 유청 단백질 가수분해물의 어떤 한 외여과 단계도 포함하지 않는 것인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유청 단백질 용액이 우유 혈청 단백질 농축물, 유청 단백질 농축물, 우유 혈청 단백질 분리물, 및/또는 유청 단백질 분리물을 포함하는 것인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유청 단백질 용액이 유청 단백질 용액의 2 중량% 이상의 양의 단백질을 포함하는 것인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 c)의 효소적 가수분해는 가수분해도(DH)가 15 내지 35일 때 효소를 불활성화함으로써 중지되는 것인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 b)의 효소적 가수분해가 다음 효소 조합 중 하나를 사용하여 수행되는 것인, 방법:

- i. 바실러스 종으로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스 오리제로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 및 미생물 유래의 적어도 하나의 트립신-유사 프로테아제를 포함
- ii. 바실러스 리케니포르미스로부터의 적어도 하나의 서브틸리신, 아스퍼질러스 오리제로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 및 아스퍼질러스 오리제로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제를 포함
- iii. 바실러스 아밀로리퀘파시엔스로부터의 적어도 하나의 바실로리신, 적어도 아나나스 코모수스로부터의 적어도 하나의 브로멜라인, 및 아스퍼질러스 오리제로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제를 포함

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 수득가능한 유청 단백질 가수분해물.

청구항 12

다음을 포함하는 유청 단백질 가수분해물:

유리 아미노산 및 펩타이드, 및

가수분해도가 적어도 15%이고

펩타이드 총량의 25 중량% 이하는 분자량이 2500 Da 이상인 펩타이드이고, 및

가수분해물 내 총 아미노산 함량의 15 중량% 이하는 유리 아미노산을 갖고, 및

상기 4% w/w 단백질 용액 중 유청 단백질 가수분해물은 0.08% w/v 이하의 카페인 용액에 상응하는 쓴맛 점수를 갖는다.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 유청 단백질 가수분해물은 가수분해도가 15 내지 35%인 것인, 유청 단백질 가수분해물.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 상기 유청 단백질 가수분해물은 4%(w/w) 단백질 용액에서 비탁 탁도(NTU)가 100 이하인 것인, 유청 단백질 가수분해물.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유청 단백질 가수분해물은 가수분해물 내의 총 단백질 함량의 2 내지 15 중량%의 양의 유리 아미노산을 포함하는 것인, 유청 단백질 가수분해물.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유청 단백질 가수분해물은 항산화 활성을 갖는 것인, 유청 단백질 가수분해물.

청구항 17

제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유청 단백질 가수분해물의 항산화 활성은 1.5 중량% 단백질 용액에서 소거율이 54 내지 60인 것으로 측정되는 것인, 유청 단백질 가수분해물.

청구항 18

제11항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 식품.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 식품은 2 내지 25 중량%의 가수분해된 단백질을 포함하는 식품에 상응하는 양의 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 것인, 식품.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 식품은 유제품, 음료, 셰이크, 젤, 샷 및 푸드바로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 식품.

청구항 21

제11항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 식품 성분으로서 유청 단백질 가수분해물의 용도.

청구항 22

제11항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 pH가 6.5-8.0인 UHT 안정 음료의 제조에 있어서 식품 성분으로서의 유청 단백질 가수분해물의 용도.

청구항 23

제11항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 스포츠 영양제로 사용하기 위한 음료의 제조에 있어서 식품 성분으로서의 유청 단백질 가수분해물의 용도.

청구항 24

제11항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 임상 음료의 제조에 있어서 식품 성분으로서의 유청 단백질 가수분해물의 용도.

청구항 25

제11항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 탄산 음료의 제조에 있어서 성분으로서의 유청 단백질 가수분해물의 용도.

청구항 26

제11항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 항산화제로서의 유청 단백질 가수분해물의 용도.

청구항 27

제11항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 탄산 음료.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 가수분해도가 높고, 맛이 좋으며, 한외여과를 거치지 않고 탁도가 낮은 신규 유청 단백질 가수분해물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 새로운 유청 단백질 가수분해물의 제조 방법, 새로운 유청 단백질 가수분해물의 용도 및 이러한 새로운 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유청 단백질 가수분해물을 다양한 식품의 성분으로 사용하는 것은 잘 알려져 있다. 유청 단백질 가수분해물은 일반적으로 분리 유청 단백질 또는 농축 유청 단백질과 같은 유청 단백질 물질을 식품 등급의 단백질 분해 및/또는 펩티드 분해 제제를 사용하여 원하는 가수분해 정도까지 가수분해하여 제조한다. 일부 상황에서는 예를 들어 낮은 항원성을 갖는 유청 단백질 가수분해물 또는 장에서 잘 흡수되는 가수분해물을 제조하기 위해 가수분해도가 높은, 15% 이상, 예를 들어 20-30%의 가수분해도가 높은 유청 단백질 가수분해물을 준비하는 것이 바람직하다. 그러나 기존의 유청 단백질 가수분해물은 가수분해가 너무 광범위하여 높은 가수분해도를 얻을 경우 쓴맛

이 나기 때문에 식품이나 음료에 다량으로 사용하기에는 부적합한 문제점이 있었다.

[0003] WO 02/19 837 A1은 향미, 기능성 및 ACE-I 억제 특성이 개선된 분리 유청 단백질(WPI) 기질로부터 유청 단백질 가수분해물을 제조하는 공정을 개시하고 있다. WO 02/19 837 A1은 가수분해도가 최대 10%, 예를 들어 3-10%일 때 가수분해가 종료되도록 효소 가수분해를 제어함으로써 유청 단백질 가수분해물의 쓴맛 문제를 논의하고 쓴맛 문제를 해결한다.

[0004] 따라서, 가수분해도가 높고(가수분해도 15% 이상) 낮은 항원성 및 개선된 흡수 특성을 갖지만 동시에 불쾌한 쓴맛이 없는 유청 단백질 가수분해물이 유리할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 발명자들은 놀랍게도 유청 단백질의 효소적 가수분해를 위한 효소의 특정 조합을 사용하여, 유청 단백질 가수분해물은 높은 수준의 가수분해로 얻어지는 반면, 맛이 적당하고 쓴맛이 없거나 최소한 허용되는 수준의 쓴맛이 있다는 점을 발견하였다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 유청단백 가수분해물에 쓴맛을 줄이는 처리를 가하지 않고, 가수분해도가 적어도 15% 이상이고, 4% w/w 단백질 용액이 0.08% w/v 이하의 카페인 용액에 상응하는 쓴맛 점수를 갖는 유청 단백질 가수분해물의 제조 방법에 관한 것이다.

[0007] 바람직하게는, 본 발명의 방법은 한외여과 단계 없이 탁도가 낮아 외관이 투명한 유청 단백질 가수분해물의 제조 방법에 관한 것이다.

[0008] 특히, 본 발명의 목적은 가수분해도가 높을 때의 불쾌한 쓴맛과 함께 상술한 종래기술의 문제점을 해결한 유청 단백질 가수분해물을 제공하는 것이다.

[0009] 따라서, 본 발명의 일 양태는 다음을 포함하는 유청 단백질 가수분해물의 제조 방법에 관한 것이다:

[0010] a) 총 고형분 함량을 기준으로 적어도 50 중량%의 양으로 유청 단백질을 포함하는 유청 단백질 용액을 제공하는 단계,

[0011] b) 다음 효소 조합 중 하나를 사용하여 효소 가수분해를 수행하는 유청 단백질 용액을 효소 가수분해하는 단계:

[0012] i) 바실러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 및 적어도 하나의 트립신-유사 프로테아제를 포함

[0013] ii) 바실러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 및 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제를 포함

[0014] iii) 바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의 적어도 하나의 바실로리신, 적어도 브로멜라인, 및 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제를 포함

[0015] c) 가수분해도(DH)가 15% 이상인 경우 효소를 불활성화시켜 효소적 가수분해를 중지시켜 유청 단백질 가수분해물을 얻는 단계.

[0016] 본 발명의 다른 양태는 하기를 포함하는 유청 단백질 가수분해물에 관한 것이다:

[0017] 유리 아미노산 및 펩타이드, 및

[0018] 가수분해도가 적어도 15%이고

[0019] 펩타이드 총량의 25 중량% 이하의 분자량이 2500 Da 이상인 펩타이드이고, 및

[0020] 가수분해물 내 총 아미노산 함량의 15 중량% 이하의 유리 아미노산을 갖고, 및

[0021] 상기 4% w/w 단백질 용액 중 유청 단백질 가수분해물은 0.08% w/v 이하의 카페인 용액에 상응하는 쓴맛 점수를 갖는다.

[0022] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 식품을 제공하는 것이다.

[0023] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 음료를 제공하는 것으로, 여기서

유청 단백질 가수분해물은 가수분해된 유청 단백질 2 내지 25 중량%에 해당하는 양으로 음료 내에 존재한다.

[0024] 본 발명의 또 다른 양태는 식품 성분으로서의 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물의 용도이다.

과제의 해결 수단

[0025] 정의

[0026] 본 발명을 더 상세히 논의하기 전에, 다음 용어 및 관례를 먼저 정의할 것이다:

[0027] 본 발명의 단수 특성 또는 제한에 대한 모든 언급은 대응하는 복수 특성 또는 제한을 포함해야 하며, 언급된 문맥에서 달리 명시되거나 명백하게 반대되는 암시가 없는 한 그 반대의 경우도 마찬가지이다.

[0028] 본 명세서에 언급된 모든 백분율은 달리 명시되지 않는 한 중량 백분율이다. 또한, "건조물 중량 기준"과 "건조물 기준"이라는 용어는 동일한 개념을 나타내며 같은 의미로 사용된다.

[0029] 예를 들어 1% w/w에서와 같은 용어 "w/w"는 1 중량%의 화합물을 포함하는 조성물을 지칭한다.

[0030] "맛 좋은"이라는 용어는 먹기 및/또는 마시기에 충분히 좋은 맛을 갖는 것, 즉 인간 소비자에게 허용 가능하거나 만족스러운 맛을 갖는 것을 의미한다.

[0031] 달리 정의되지 않는 한, 여기에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0032] 유청 단백질 용액:

[0033] 본 발명의 맥락에서, "유청 단백질 용액"에서와 같은 용어 "용액"은 액체 및 고체 화합물 또는 단백질 입자와 같은 반고체 입자의 조합을 함유하는 조성물을 포함한다. "용액"은 현탁액 또는 슬러리일 수 있다. 그러나, "유청 단백질 용액"은 바람직하게는 펄핑 가능하고 유청 단백질 용액의 액체 양은 바람직하게는 70-98%, 더욱 바람직하게는 80-96%이다. 유청 단백질 용액에 사용되는 액체는 일반적으로 물이다.

[0034] 유청 단백질 용액은 일반적으로 유청 단백질 용액의 2 중량% 이상의 단백질을 포함한다. 본 발명의 일 실시예에서, 유청 단백질 용액은 유청 단백질 용액의 2 내지 20 중량% 범위의 단백질을 포함한다. 바람직하게는, 유청 단백질 용액은 유청 단백질 용액의 5 내지 15 중량% 범위의 양의 단백질을 포함한다.

[0035] 가수분해에 사용되는 유청 단백질 용액은 유청 단백질을 포함하는 조성물을 물과 같은 액체에 분산시켜 수득한다. 바람직하게는, 유청 단백질 용액은 우유 혈청 단백질 농축액, 유청 단백질 농축액, 우유 혈청 단백질 분리물 및/또는 유청 단백질 분리물 중 임의의 것을 물과 혼합하여 제조된다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에서, 유청 단백질 용액은 우유 혈청 단백질 농축물, 유청 단백질 농축물, 우유 혈청 단백질 분리물 및/또는 유청 단백질 분리물을 포함한다.

[0036] 본 발명의 유청 단백질 용액은 총 고형분 함량에 대하여 적어도 50%의 유청 단백질을 포함한다. 유청 단백질의 함량이 총 고형분 함량의 50% 미만인 경우, 전체 분자 구성(단백질, 탄수화물, 지질 및 미네랄의 비율)이 달라지고 효소가 다르게 작용하여 수득되는 제품도 달라진다.

[0037] 유청 단백질 외에도, 유청 단백질 용액은 카제인과 같은 소량의 다른 단백질을 포함할 수 있다.

[0038] 유청 단백질 용액은 일반적으로 단백질 외에 다른 성분으로 구성된다. 유청 단백질 용액은 유청 또는 우유 혈청에서 일반적으로 발견되는 미네랄, 탄수화물 및/또는 지질의 기타 성분을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 유청 단백질 용액은 유청 또는 우유 혈청에 고유하지 않은 성분을 포함할 수 있다. 그러나, 이러한 비천연 우유 성분은 식품 생산에 사용하기에 적합해야 하고 안전해야 한다.

[0039] 총 고형분 함량을 기준으로, 유청 단백질 용액의 단백질 함량이 낮을수록, 유청 단백질보다 지질, 탄수화물(주로 유당) 및 기타 단백질의 함량이 높아진다.

[0040] 유청 단백질 용액은 예를 들어 유당, 올리고당 및/또는 유당의 가수분해 생성물(즉, 포도당 및 갈락토오스)과 같은 탄수화물을 포함할 수 있다. 유청 단백질 용액은 예를 들어 총 고체 함량을 기준으로 0 내지 10 중량% 범위의 탄수화물을 포함한다.

[0041] 유청 단백질 분리물(WPI) 및 우유 혈청 단백질 분리물(SPI)은 유당과 같은 탄수화물의 양이 매우 적다. 따라서, WPI 또는 SPI를 사용하여 유청 단백질 용액을 제조하는 경우, 유청 단백질 용액의 탄수화물 함량은 총

고형분 함량을 기준으로 0 내지 1 중량% 범위이다. 유청 단백질 농축물(WPC) 또는 우유 혈청 농축물(SPC)를 사용하여 유청 단백질 용액을 제조하는 경우, 유청 단백질 용액 중 탄수화물의 함량은 총 고형분 함량을 기준으로 2 내지 8 중량% 범위인 것이 바람직하다.

[0042] 유청 단백질 용액은 또한 트리글리세리드 및/또는 인지질과 같은 다른 유형의 지질을 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명의 맥락에서, 용어 "지방" 및 지질은 동일한 의미를 가지며 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0044] 본 발명에 따른 유청단백 용액은 총 고형분에 대하여 50% 이상의 유청 단백질을 포함하여야 한다.

[0045] 유청 단백질 용액의 단백질 함량이 전체 고형분 함량의 50% 미만인 경우, 가수분해 후 수득되는 유청 단백질 가수분해물은 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물을 정의하는 특성을 갖지 않을 수 있다. 즉, 4% 단백질 용액에서 불쾌한 쓴맛이 없고, 가수분해도가 15% 이상이고, 유리 아미노산이 15 중량% 이하이고, 분자량이 2500 Da 이상인 펩타이드가 펩타이드 총량의 25 중량% 이하인 것일 수 있다.

[0046] 총 고형분 함량을 기준으로 50% 이하의 유청 단백질 함량을 가진 유청 단백질 용액은 다량의 미네랄, 지방 및 탄수화물을 포함한다. 유청 단백질 함량이 고형분 중량의 50% 이하이고 미네랄, 지방 및 탄수화물 함량이 높은 유청 단백질 가수분해물을 만드는 것은 바람직하지 않다. 어떠한 이론에도 구속되지 않고, 본 발명의 발명자들은 미네랄이 일부 효소의 활성에 영향을 미칠 수 있다고 생각한다. 이는 지질과 탄수화물에도 적용될 수 있다. 다량의 지질, 미네랄 및 탄수화물도 유청 단백질 가수분해물의 맛 및 탁도에 영향을 줄 수 있다.

[0047] 바람직하게는, 유청 단백질 용액은 총 고형분 함량을 기준으로 적어도 60 중량%, 예를 들어 총 고형분 함량을 기준으로 적어도 70 중량%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 80 중량% 이상의 양으로 유청 단백질을 포함한다. 본 발명의 보다 바람직한 일 실시예에서, 유청 단백질 용액은 총 고형분 함량을 기준으로 적어도 85 중량%의 양으로 유청 단백질을 포함하고, 가장 바람직한 것은 총 고형분 함량을 기준으로 적어도 90 중량%의 유청 단백질을 포함한다.

[0048] 유청 단백질 용액에 존재하는 단백질은 주로 유청 단백질이어야 한다. 그러나 예를 들어 카제인과 같은 소량의 다른 단백질이 존재할 수 있다. 따라서 본 발명의 일 실시예에서, 유청 단백질 용액은 단백질 총량을 기준으로 90 중량% 이상의 양으로 유청 단백질을 포함한다. 바람직하게는, 유청 단백질 용액은 단백질 총량을 기준으로 95 중량% 이상의 양으로 유청 단백질을 포함한다. 따라서, 본 발명의 추가적인 실시예들에서, 유청 단백질 용액은 단백질의 총량을 기준으로 최대 10 중량%의 카제인 또는 기타 비유청 단백질을, 바람직하게는 최대 5 중량%, 보다 바람직하게는 단백질 총량을 기준으로 최대 3 중량%의 카제인 또는 기타 비유청 단백질을 포함한다.

[0049] 유청 단백질 용액의 지방 함량이 높으면 수득한 단백질 가수분해물의 투명도와 맛에 영향을 미친다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에서, 유청 단백질 용액은 총 고체 함량을 기준으로 최대 10 중량%, 예를 들어 총 고체 함량을 기준으로 최대 8 중량%, 훨씬 더 바람직하게는 유청 단백질 용액은 총 고형분 함량을 기준으로 최대 6 중량%의 지질을 포함한다.

[0050] 유청 단백질 농축액을 사용하여 유청 단백질 용액을 제조하는 경우 지질/지방 함량은 총 고형분 함량의 약 6-8 중량%이다. 반대로 유청 단백질 분리물을 사용하여 유청 단백질 용액을 제조하는 경우, 유청 단백질 용액에는 기본적으로 지방이 없다.

[0051] 본 발명의 바람직한 실시예에서, 유청 단백질 용액은 기본적으로 지방이 없다. "기본적으로 지방이 없는"이라는 용어는 유청 단백질 용액의 지질 함량이 총 고형분 함량을 기준으로 1 중량% 미만, 바람직하게는 0.5 중량% 미만, 더욱 더 바람직하게는 총 고형분 함량을 기준으로 0.1 중량% 미만임을 의미한다.

[0052] 유청 단백질 용액의 지방 함량이 총 고형분 함량을 기준으로 최대 0.5%로 낮을 경우, 본 발명의 방법에 따라 제조된 유청 단백질 가수분해물의 외관이 투명해질 것이다. 바람직하게는, 유청 단백질 용액 중 지질 함량은 총 고형분 함량을 기준으로 0.3 중량% 미만이고, 더욱 바람직하게는 총 고형분 함량을 기준으로 0.2 중량% 미만이다.

[0053] 본 발명의 바람직한 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물은 유청 단백질 분리물 및/또는 우유 혈청 단백질 분리물의 유청 단백질 용액을 사용하여 수득된다. 유청 단백질 분리물 및/또는 우유 혈청 단백질 분리물을 가수분해에 사용할 경우 지방 함량이 낮아진다(0.5% 이하). 이를 통해 가수분해도(DH>15%)가 높고 맛이 좋을 뿐만 아니라 한외여과 단계 없이 외관이 투명한 유청 단백질 가수분해물을 제조할 수 있다. 바람직하게는, 유청 단백질 용액은 물에 혼합된 유청 단백질 분리물 또는 우유 혈청 단백질 분리물이다.

- [0054] 유청 단백질:
- [0055] 본 발명의 일 양태에서, 유청 단백질 가수분해물은 유청 단백질을 포함하는 용액의 가수분해에 의해 수득된다.
- [0056] 본 발명의 맥락에서, 용어 "유청 단백질"은 유청 또는 우유 혈청에서 발견되는 단백질에 관한 것이다. 유청 단백질 용액의 유청 단백질은 유청 또는 우유 혈청에서 발견되는 단백질 종의 하위 집합일 수 있거나 유청 및/또는 우유 혈청에서 발견되는 단백질 종의 완전한 세트일 수 있다. 유청 단백질은 치즈 생산의 부산물로 생성되는 액체 물질인 유청에서 분리된 구형 단백질의 혼합물이다. 유청 단백질은 우유 또는 응고 우유의 혈청 단계에 존재하는 단백질이다. 우유의 혈청 단계의 단백질은 유청 단백질 외에도 우유 혈청 단백질이라고도 한다.
- [0057] "우유 혈청"이라는 용어는 카제인과 유지방구가 정밀여과 또는 대공극 한외여과에 의해 우유에서 제거되었을 때 남아 있는 액체와 관련이 있다. 우유 혈청은 "이상적인 유청"이라고도 한다.
- [0058] "우유 혈청 단백질" 또는 "혈청 단백질"이라는 용어는 우유 혈청에 존재하는 단백질에 관한 것이다.
- [0059] "유청"이라는 용어는 우유의 카제인이 침전되어 제거된 후 남은 액체 상등액과 관련이 있다. 카제인 침전은 예를 들어 우유의 산성화 및/또는 레닛 효소의 사용에 의해 달성된다.
- [0060] 스위트 유청, 산성 유청 및 카제인 유청과 같은 여러 유형의 유청이 존재한다.
- [0061] 본 발명의 유청 단백질 용액에 존재하는 유청 단백질은 다양한 유청 공급원, 예를 들어 카제인 유청, 산성 유청 또는 스위트 유청으로부터 유래될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 바람직한 일 실시예에서, 유청 단백질 용액의 유청 단백질은 스위트 유청으로부터 유래한다. 스위트 유청은 주로 단백질 베타-락토글로불린(BLG), 알파-락트알부민(ALA) 및 카제이노마크로펩타이드(CMP)로 구성된다. 그러나 스위트 유청은 면역글로불린, 오스테오폰틴, 락토페린 및 지방구 막 단백질과 같은 다른 단백질을 포함할 수 있다. CMP는 카제인 유청 또는 산성 유청에는 존재하지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서, 유청 단백질 용액의 유청 단백질은 CMP가 완전히 또는 부분적으로 제거된 스위트 유청에서 유래한다. 이것은 변형된 스위트 유청이라고 할 수 있다. 스위트 유청에서 CMP를 제거하면 모유에 가까운 트레오닌 및 트립토판 함량의 단백질 물질이 생성된다.
- [0063] 본 발명의 맥락에서, 용어 "베타-락토글로불린"은 또한 "BLG"로 지칭될 수 있다. 이 용어는 상호교환적으로 사용될 수 있으며 포유류 종의 BLG에 해당한다. 또한, 용어 "알파-락트알부민"은 본 발명의 맥락에서 "ALA"로 지칭될 수 있고 포유류 종의 알파-락트알부민에 해당한다.
- [0064] 본 명세서에서 "스위트 유청"이라는 용어는 레닛형 치즈를 제조하는 동안 우유를 응고시키고 걸러낸 후 남은 액체를 의미한다. "스위트 유청"은 체다 치즈나 스위스 치즈와 같은 레닛형 경질 치즈를 생산하는 과정에서 수득된다. 스위트 유청은 카파-카제인을 파라-카파-카제인과 펩타이드 카제이노마크로펩타이드(CMP)로 분해하여 카제인 미셀을 불안정하게 만들고 카제인을 침전시키는 레닛 효소를 우유 조성물에 첨가하여 수득된다. 레닛 침전 카제인을 둘러싸고 있는 액체를 스위트 유청이라고 한다. 스위트 유청의 pH 값은 5.2 및 6.7의 사이이다.
- [0065] 스위트 유청은 약 10-15 중량%의 단백질과 약 75-80%의 유당으로 구성된 치즈 생산 제품이다. 스위트 유청의 단백질은 주로 유청 단백질이지만 소량의 카제인도 존재할 수 있다. 유청 단백질에는 베타-락토글로불린(약 55-65%), 알파-락트알부민(약 18-25%), 소 혈청 알부민, 면역글로불린, 카제이노마크로펩타이드(CMP), 오스테오폰틴, 락토페린 및 유지방구 막 단백질이 포함된다.
- [0066] "카제인 유청"(때로는 신맛 유청 또는 산성 유청이라고도 함)이라는 용어는 카제인/카제인염 생산에서 수득한 유청과 관련이 있다. 본 발명의 맥락에서, 카제인 유청은 산성 유청과 동일하지 않다. 카제인 유청은 정밀여과를 통해 카제인/카제인염을 분리한 후 얻은 유청 분획물이다. 카제인 유청은 CMP를 포함하지 않는다.
- [0067] 산성 유청이라는 용어는 코티지 치즈 및 퀵와 같은 산성 유형 치즈를 생산하는 동안 얻은 유청에 사용된다. 산성 치즈의 제조에서 카제인은 산 침전에 의해 우유에서 제거된다. 즉, 우유의 pH 값을 카제인의 등전점인 4.6 미만으로 낮추고 카제인 미셀이 분해되어 침전된다. pH는 종종 3.8에서 4.6 범위로 감소된다. 산 침전 카제인을 둘러싼 액체는 종종 산성 유청이라고 하며 CMP를 포함하지 않습니다.
- [0068] 본 발명의 일 실시예에서, 유청 단백질 용액에 사용되는 유청 단백질은 산성 유청 또는 카제인 유청이 아니다.
- [0069] 본 발명에서 유청 단백질 용액에 사용되는 유청 단백질은 유청 단백질 농축물(WPC), 우유 혈청 단백질 농축물(SPC), 유청 단백질 분리물(WPI) 또는 유청 단백질 분리물(SPI)일 수 있다. 유청 단백질 농축물과 유청 단백질

분리물의 차이점은 제품의 구성, 특히 단백질 함량에 있다. 유청 단백질 분리물은 농축액보다 순도가 높으며, 유청 단백질을 "분리"하기 위해 기타 비단백질 성분이 부분적으로 제거되었다. 따라서 분리 유청 단백질은 단백질 비율이 더 높으며 사실상 유당, 탄수화물, 지방 및 콜레스테롤이 없을 정도로 충분히 순수할 수 있다.

[0070] 본 문맥에서 "유청 단백질 농축물(WPC)" 및 "혈청 농축물(SPC)"이라는 용어는 유청 단백질의 건조 및 액체 조성물을 모두 포함한다. 본 발명에서 사용되는 WPC 및 SPC의 단백질 함량은 전체 고형분 함량을 기준으로 50 중량% 이상이다. 그러나 유청 단백질 농축물은 더 많은 양의 유청 단백질, 예를 들어 건조 물질 함량을 기준으로 80 중량%의 유청 단백질을 포함할 수 있다. 액체 유청의 건조 부분은 건조 제품이 50 중량% 이상의 유청 단백질을 포함하도록 유청에서 충분한 비단백 성분을 제거하여 수득된다.

[0071] 본 발명에서 사용되는 WPC 또는 SPC는 일반적으로 다음을 포함한다:

[0072] 총 고형분 함량에 대한 단백질 50-89 중량%

[0073] 총 단백질 함량에 대한 BLG 15-70 중량%

[0074] 총 단백질 함량에 대한 ALA 8-50중량%

[0075] 총 단백질 함량에 대한 CMP 0-40중량%.

[0076] 대안적으로, 그러나 또한 바람직한 것은 다음을 포함하는 WPC 또는 SPC이다:

[0077] 총 고형분 함량에 대한 단백질 50-89 중량%

[0078] 총 단백질 함량에 대한 BLG 15-80 중량%

[0079] 총 단백질 함량에 대한 ALA 4-50 중량%

[0080] 총 단백질 함량에 대한 CMP 0-40 중량%.

[0081] 바람직하게는, WPC 또는 SPC는 다음을 포함한다:

[0082] 총 고형분 함량에 대한 단백질 50-89 중량%

[0083] 총 단백질 함량에 대한 BLG 15-80 중량%

[0084] 총 단백질 함량에 대한 ALA 4-50 중량%

[0085] 총 단백질 함량에 대한 CMP 0-40중량%.

[0086] 보다 바람직하게는, WPC 또는 SPC는 다음을 포함한다:

[0087] 총 고형분 함량 대비 단백질 70-89 중량%

[0088] 총 단백질 함량에 대한 BLG 30-80 중량%

[0089] 총 단백질 함량에 대한 ALA 4-35 중량%

[0090] 총 단백질 함량에 대한 CMP 0-25중량%.

[0091] "유청 단백질 분리물" 및 "혈청 단백질 분리물"이라는 용어는 일반적으로 유당과 콜레스테롤이 거의 없는 것으로 간주되고 총 고형 함량을 기준으로 90 중량% 이상의 유청 단백질 함량을 갖는 건조 또는 액체 조성물에 해당한다. 유청 단백질 분리물은 예를 들어 총 고형분 함량을 기준으로 92 중량% 이상의 유청 단백질을 포함할 수 있다. 바람직하게는, WPI 및 SPI는 총 고체 함량을 기준으로 90-100 중량% 단백질, 예를 들어 총 고체 함량을 기준으로 92-99 중량% 단백질을 포함한다.

[0092] WPI 또는 SPI는 바람직하게는 다음을 포함할 수 있다:

[0093] 총 고형분 함량에 대한 단백질 90-100 중량%

[0094] 총 단백질 함량에 대한 BLG 15-70 중량%

[0095] 총 단백질 함량에 대한 ALA 8-50 중량%

[0096] 총 단백질 함량에 대한 CMP 0-40 중량%.

[0097] 대안적으로, 그러나 또한 바람직하게는 WPI 또는 SPI는 다음을 포함할 수 있다:

- [0098] 총 고형분 함량에 대한 단백질 90-100 중량%
- [0099] 총 단백질 함량에 대한 BLG 30-80 중량%
- [0100] 총 단백질 함량에 대한 ALA 4-35 중량%
- [0101] 총 단백질 함량에 대한 CMP 0-25 중량%.
- [0102] 바람직하게, WPI는 바람직하게는 다음을 포함할 수 있다:
- [0103] 총 고형분 함량에 대한 단백질 90-100중량%
- [0104] 총 단백질 함량에 대한 BLG 60-70 중량%
- [0105] 총 단백질 함량에 대한 ALA 10-20 중량%
- [0106] 총 단백질 함량에 대한 CMP 10-20 중량%.
- [0107] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물의 제조에 사용되는 유청 단백질 용액은 건조 물질을 기준으로 50-98 중량%, 예를 들어 70-97 중량%, 바람직하게는 72-95 중량%, 더욱 더 바람직하게는 건조 물질을 기준으로 75-95 중량% 범위의 유청 단백질의 총량을 포함한다.
- [0108] 임의의 적합한 유청 단백질 공급원을 사용하여 본 발명에 따른 유청 단백질 용액을 제조할 수 있다. 본 발명에 따른 유청 단백질 용액에 사용되는 유청 단백질은 바람직하게는 예를 들어, 소, 양, 염소, 버팔로, 낙타, 라마, 암말, 말 및/또는 사슴의 우유와 같은 포유동물 우유로부터의 유청 단백질이다. 본 발명의 일부 바람직한 실시 예에서, 유청 단백질은 소의 우유로부터 유래된다.
- [0109] 유청 단백질 용액은 탈염 유청 단백질 용액인 것이 바람직하다. 유청 단백질 용액의 미네랄 함량은 낮은 것이 바람직하다. 나트륨, 칼슘, 칼륨, 마그네슘, 및 인산염과 같은 미네랄의 농도가 낮은 것이 영양 및 건강상의 관 점에서 단백질 가수분해물에서 바람직하기 때문이다. 또한, 나트륨과 칼슘을 포함한 미네랄은 유청 단백질과 상호 작용하여 유청 단백질 가수분해물의 제품 탁도, 응집 행동 및 내열성에 영향을 미칠 수 있다. 고농도에서 특히 나트륨, 칼슘 및 아연을 포함한 일부 미네랄은 일부 프로테아제의 단백질 분해 활성을 억제하거나 촉진할 수 있으므로 이러한 이온의 고농도 존재는 프로테아제의 협력 절단 패턴을 변경할 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에서, 유청 단백질 용액의 미네랄 함량은 전체 고형분을 기준으로 10% 이하, 보다 바람직하게는 8% 이하이다. 본 발명의 맥락에서, 용어 "광물"은 회분 함량을 지칭한다. "광물"과 "회분"라는 용어는 같은 의미로 혼용되어 사용될 수 있다. 따라서 유청 단백질 용액의 미네랄 함량은 유청 단백질 용액의 회분 함량으로 이해해야 한다.
- [0110] 본 발명의 일 실시예에서, 유청 단백질 용액은 총 단백질 함량의 30 중량% 이상의 BLG, 예를 들어 40 중량% 이상의 BLG를 포함한다. 가장 바람직하게는, 유청 단백질 용액은 총 단백질 함량을 기준으로 50 중량% 이상의 BLG를 포함하고, 더욱 더 바람직하게는 유청 단백질 용액은 총 단백질 함량을 기준으로 55 중량% 이상의 양으로 BLG를 포함한다. 본 발명의 또 다른 실시예에서, 유청 단백질 용액은 총 단백질 함량을 기준으로 30 내지 95 중량%의 BLG, 예를 들어 총 단백질 함량을 기준으로 40 내지 90 중량%의 양으로 BLG를 포함하고, 훨씬 더 바람직하게는 총 단백질 함량을 기준으로 45 내지 80 중량% 범위의 BLG를 포함한다.
- [0111] 본 발명의 맥락에서, 용어 "유청"은 우유에서 카제인이 제거될 때 남은 액체 조성물에 관한 것이다. 카제인은 예를 들어 미셀라 카제인이 없거나 본질적으로 포함되어 있지 않지만 천연 유청 단백질을 포함하는 액체 투과물을 제공하는 정밀 여과에 의해 제거된다. 이 액체 투과물은 때로 이상적인 유청, 혈청 또는 우유 혈청으로 지칭된다.
- [0112] 유청 단백질 용액의 단백질은 가능한 한 본래의 상태에 가까운 것이 바람직하고 온건한 열처리가 있는 경우에만 처리하는 것이 바람직하다.
- [0113] 효소 가수분해:
- [0114] 본 발명에 따른 방법에서 단계 b)는 유청 단백질 용액을 효소 가수분해에 적용하는 것에 관한 것으로, 여기서 효소 가수분해는 하기 효소 조합 중 하나를 사용하여 수행된다:
- [0115] i. 바실러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 및 적어도 하나의 트립신-유사 프로테아제를 포함하는 효소 조합

- [0116] ii. 바실러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 및 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제를 포함하는 효소 조합
- [0117] iii. 바실러스 아밀로리퀘파시엔스로부터의 적어도 하나의 바실로리신, 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제, 및 적어도 브로멜라인을 포함하는 효소 조합.
- [0118] 본 발명의 발명자들은 놀랍게도 유청 단백질 용액의 언급된 세 가지 효소 조합 중 어느 하나를 첨가하여 효소 가수분해를 수행할 경우 가수분해도가 15% 이상이고, 유리 아미노산 함량이 15% 이하이고, 유청단백 가수분해물의 맛이 좋고 쓴맛 펩타이드 함량이 낮은 유청 단백질 가수분해물이 생성된다는 사실을 발견했다. 본 발명자들은 언급된 효소 조합 i 내지 iii으로 가수분해에 의해 제조된 유청 단백질 가수분해물이 4% w/w 단백질 용액에서 쓴맛이 없음을 발견하였다.
- [0119] 본 발명의 c) 단계는 가수분해도(DH)가 15% 이상인 경우 효소를 불활성화시켜 효소적 가수분해를 중지시켜 유청 단백질 가수분해물을 얻는다. 가수분해도(DH)는 가수분해에 의해 절단된 원래 단백질의 펩타이드 결합의 백분율로 정의된다.
- [0120] 본 발명의 일 실시예에서, 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제는 아스퍼질러스 오리재 및/또는 아스퍼질러스 플라부스로부터의 세린 엔도펩티다제이다. 아스퍼질러스의 세린 엔도펩티다제는 바람직하게는 서브틸리신-유사 세린 엔도펩티다제(EC 3.4.21)이다.
- [0121] 본 발명의 일 실시예에서, 효소 조합 i)은 바실로리신과 같은 바실러스로부터의 메탈로 엔도펩티다제를 추가적으로 포함한다. 따라서, 일 실시예에서 효소 조합 i)은 다음을 포함한다:
- [0122] 바실러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 바실러스로부터의 적어도 하나의 메탈로 엔도펩티다제, 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 및 적어도 하나의 트립신-유사 프로테아제.
- [0123] 본 발명의 추가적인 일 실시예에서, 효소 조합 ii)는 바실러스로부터의 메탈로 엔도펩티다제, 예컨대 바실로리신을 추가적으로 포함할 수 있다. 따라서, 일 실시예에서, 효소 조합 ii)는 다음을 포함한다:
- [0124] 바실러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 바실러스로부터의 적어도 하나의 메탈로 엔도펩티다제, 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 및 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제.
- [0125] 본 발명의 일 실시예에서, 아스퍼질러스로부터의 류실 아미노펩티다제는 오스퍼질러스 오리재로부터의 것이다.
- [0126] 일 실시예에서, 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제는 서브틸리신이다. 서브틸리신은 바람직하게는 바실러스 리케니포르미스로부터의 것이다.
- [0127] 본 발명의 다른 실시예에서, 메탈로 엔도펩티다제는 바실로리신이다. 바실로리신은 바람직하게는 바실러스로부터, 더 바람직하게는 바실러스 아밀로리퀘파시엔스로부터의 것이다. 본 발명의 바람직한 실시예에서, 바실로리신은 바실러스 서브틸리스로부터의 것이 아니다.
- [0128] 본 발명의 맥락에서, 용어 "트립신-유사 프로테아제"는 미생물 기원의 프로테아제이다. 바람직하게는,
- [0129] 미생물 기원의 트립신 유사 프로테아제는 푸사리움 속, 특히 푸사리움 옥시스포럼으로부터의 것이다. 따라서 예를 들어 "트립신-유사 프로테아제"라는 용어에는 미생물 기원이 아닌 판크레아틴이 포함되지 않는다. 반대로, 판크레아틴은 예를 들어 트립신, 키모트립신, 아밀라아제 및 리파아제를 포함하는 췌장 유래 효소의 혼합물이다. 또한 "트립신-유사 프로테아제"라는 용어는 "트립신"과 혼동되어서는 안 된다.
- [0130] 또 다른 실시예에서, 브로멜라인은 아나나스 코모수스로부터의 것이다. 브로멜라인은 시스테인 엔도펩티다제이다.
- [0131] 본 발명의 한 실시양태에서, 단계 b)의 효소적 가수분해는 하기 효소 조합 중 하나를 사용하여 수행된다:
- [0132] i) 바실러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 및 적어도 하나의 트립신-유사 프로테아제를 포함하는 효소 조합,
- [0133] ii) 바실러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 및 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제를 포함하는 효소 조합,
- [0134] iii) 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제 및 메탈로 엔도펩티다제의 조합, 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나

의 세린 엔도프로테아제, 및 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제를 포함하는 효소 조합,

[0135] iv) 바실러스 아밀로리케파시엔스의 적어도 하나의 바실로리신, 적어도 브로멜라인, 및 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 류실 아미노 펩티다제를 포함하는 효소 조합.

[0136] 본 발명의 바람직한 실시예에서, 단계 b)의 효소적 가수분해는 하기 효소 조합 중 하나를 사용하여 수행된다:

[0137] i) 바실러스 종으로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스 오리재로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 및 미생물 기원의 적어도 하나의 트립신-유사 프로테아제를 포함하는 효소 조합,

[0138] ii) 바실러스 종으로부터의 적어도 하나의 서브틸리신, 아스퍼질러스 오리재로부터의 적어도 하나의 세린 엔도 펩티다제, 및 아스퍼질러스 오리재로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제를 포함하는 효소 조합,

[0139] iii) 바실러스 종으로부터의 바실로리신 및 서브틸리신의 적어도 하나의 조합, 아스퍼질러스 오리재로부터의 적 어도 하나의 세린 엔도프로테아제, 및 아스퍼질러스 오리재로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제를 포함 하는 효소 조합,

[0140] iv) 바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의 적어도 하나의 바실로리신, 아나나스 코모수스로부터의 적어도 브로 멜라인, 및 아스퍼질러스 오리재로부터의 적어도 하나의 류실 아미노 펩티다제를 포함하는 효소 조합.

[0141] 본 발명의 바람직한 실시예에서, 효소 조합은 다음과 같다:

[0142] i) EC 3.4.21.62 그룹으로부터의 적어도 하나의 효소, EC 3.4.21 그룹으로부터의 적어도 하나의 추가적인 효소, 및 EC 3.4.21.4 그룹으로부터의 적어도 하나의 추가적인 효소를 포함하는 효소 조합,

[0143] ii) EC 3.4.21.62 그룹으로부터의 적어도 하나의 효소, EC 3.4.21 그룹으로부터의 적어도 하나의 추가적인 효소, 및 EC 3.4.11 그룹으로부터의 적어도 하나의 추가적인 효소를 포함하는 효소 조합,

[0144] iii) EC 3.4.21.62 그룹으로부터의 적어도 하나의 효소, EC 3.4.24.28 그룹으로부터의 추가적인 효소, EC 3.4.21 그룹으로부터의 적어도 하나의 추가적인 효소 및 EC 3.4.11 그룹으로부터의 적어도 하나의 추가적인 효 소를 포함하는 효소 조합,

[0145] iv) EC 3.4.24.28 그룹으로부터의 적어도 하나의 효소, EC 3.4.22.32 그룹으로부터의 적어도 하나의 추가적인 효소 및 EC 3.4.11 그룹으로부터의 적어도 하나의 추가적인 효소를 포함하는 효소 조합.

[0146] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시예에서, 효소 조합은 다음과 같다:

[0147] i) 바실러스 리케니포르미스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스 오리재로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 및 푸사리움 옥시스포룸으로부터의 적어도 하나의 트립신-유사 프로테아제, 선택적 으로 또한 바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의 바실로리신을 포함

[0148] ii) 바실러스 리케니포르미스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스 오리재로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제 및 아스퍼질러스 오리재로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제를 포함

[0149] iii) 바실러스 리케니포르미스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제, 바실러스 아밀로리케파시엔스로부터 의 바실로리신, 아스퍼질러스 오리재로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제 및 아스퍼질러스 오리재로부터 의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제를 포함

[0150] iv) 바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의 적어도 하나의 바실로리신, 아나나스 코모수스로부터의 적어도 브로 멜라인 및 아스퍼질러스 오리재로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제를 포함.

[0151] 바실러스 리케니포르미스로부터의 세린 엔도펩티다제는 바람직하게는 서브틸리신이다.

[0152] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시예에서, 효소 조합은 다음과 같다:

[0153] i) 바실러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제(EC 3.4.21.62), 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 세 린 엔도펩티다제(EC 3.4.21), 및 적어도 하나의 트립신-유사 프로테아제(EC 3.4.21.4)를 포함

[0154] ii) 바실러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제(EC 3.4.21.62), 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다 제(EC 3.4.21) 및 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제(EC 3.4.11)를 포함

[0155] iii) 바실러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제(EC 3.4.21.62), 바실로리신(EC 3.4.24.28), 아스퍼질 러스로부터의 적어도 하나의 세린 엔도펩티다제(EC 3.4.21.63,) 및 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 류실

아미노펩티다제(EC 3.4.11)를 포함

[0156] iv) 바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의 적어도 하나의 바실로리신(EC 3.4.24.28), 적어도 브로멜라인[EC 3.4.22.32], 및 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제(EC 3.4.11)를 포함.

[0157] 본 발명의 유청 단백질 가수분해물의 제조 방법에 사용되는 효소 조합 i) 내지 iv)는 언급된 1차 효소 이외의 다른 효소를 포함할 수 있다. 용어 "1차 효소"는 제제에서 가장 풍부한 효소를 의미한다. 다음 목록에서 Uniprot 수탁 번호는 특정 명명에 주석이 달린 프로테아제를 식별하기 위해 괄호 안에 제공된다. 예를 들어, 효소 조합은 펩티드 가수분해효소(AOA364MDR7), 서브틸라아제 패밀리 단백질(I8A6W5), 편갈리신 메탈로펩티다제 M36(AOA2P2H013), 중성 프로테아제 2(AOA364MH70), 아스페르길로웍신-1(B8NLY9), 류실 아미노펩티다제 A(Q2U1F3), 류실 아미노펩티다제 2(Q2ULM2), 디펩틸 펩티다제 4(Q2UH35), 디펩티딜 펩티다제 5(Q9Y8E3), 중성 프로테아제 1(Q2U1G7), 중성 프로테아제 2(P46076), 알칼리성 프로테아제 1(P12547) 및 프롤릴 올리고펩티다제 패밀리 단백질(B8NBM3)로 이루어진 군으로부터 선택되는 효소에 대해 높은 서열 동일성(95-100%)을 갖는 하나 이상의 효소를 포함할 수 있다.

[0158] 본 발명의 일 양태에서, 효소 조합 i)의 1차 효소는 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제 및 트립신-유사 프로테아제이다. 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제는 바람직하게는 서브틸리신이고, 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제는 바람직하게는 서브틸라제 패밀리 단백질이다. 본 발명의 일 실시예에서, 효소 조합 i)은 아미노펩티다제(펩티드 가수분해효소, 및 류실 아미노펩티다제와 같은), 메탈로 엔도펩티다제(바실로리신 및 편갈리신 메탈로펩티다제, 중성 프로테아제와 같은), 프롤릴 올리고펩티다제 패밀리 단백질, 및 아스페르길로웍신-1(아스파라긴산 엔도펩티다제) 중 하나 이상을 추가적으로 포함할 수 있다. 효소 조합 i)에 존재하는 효소의 적어도 80%는 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스의 세린 엔도펩티다제 및 트립신-유사 프로테아제인 것으로 예상된다. 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제를 포함하는 제제의 예는 Protamex(Novozymes A/S)이다. Protamex는 또한 바실로리신을 포함한다. 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제를 포함하는 제제의 예는 Promod 782(Biocatalysts Ltd) 및 프로테아제 A 아마노 2 SD(Amano Enzyme Ltd)이며, 여기서 1차 효소는 아스퍼질러스 오리채로부터의 세린 엔도펩티다제이다. Promod 782 및 프로테아제 A 아마노 2 SD는 또한 효소 펩타이드 가수분해효소, 류실 아미노펩티다제, 편갈리신 메탈로펩티다제 M36, 프롤릴 올리고펩티다제 패밀리 단백질, 중성 프로테아제 2 및 아스페르길로웍신-1을 포함하며 1차 효소는 세린 엔도펩티다제이다. 트립신-유사 프로테아제는 예를 들어 Formea TL 1200 BG(Novozymes A/S)로부터 제공될 수 있다.

[0159] 본 발명의 일 양태에서, 효소 조합 ii)는 1차 효소로서 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제 및 아스퍼질러스로부터의 류실 아미노펩티다제를 포함한다. 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제는 바람직하게는 서브틸리신이고, 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제는 바람직하게는 서브틸라제 패밀리 단백질 및 알칼리성 프로테아제이다. 아스퍼질러스로부터의 류실 아미노펩티다제는 예를 들어 펩티드 가수분해효소, 류실 아미노펩티다제 A 및 류실 아미노펩티다제 2 중 하나 이상일 수 있다. 본 발명의 실시예에서, 효소 조합 ii)는 메탈로 엔도펩티다제 중 하나 이상을 추가적으로 포함할 수 있다; 편갈리신 메탈로펩티다제 M36, 중성 프로테아제 1 및 중성 프로테아제 2. 효소 조합 ii)는 또한 아스페르길로웍신-1(아스파라긴산 엔도펩티다제), 디펩틸 펩티다제 4 및 디펩티딜 펩티다제 5를 포함할 수 있다. 효소 조합 ii)에 존재하는 효소의 적어도 80%는 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제 및 아스퍼질러스로부터의 류실 아미노펩티다제일 것으로 예상된다. 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제를 포함하는 제제의 예는 서브틸리신을 포함하는 알칼라제(Novozymes A/S)이다. 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제를 포함하는 제제의 예는 프로테아제 A 아마노 2 SD 및 Promod 782이며, 상기 1차 효소는 아스퍼질러스 오리채로부터의 세린 엔도펩티다제이다. Promod 782 및 프로테아제 A 아마노 2 SD는 또한 효소 펩타이드 가수분해효소, 류실 아미노펩티다제, 편갈리신 메탈로펩티다제 M36, 프롤릴 올리고펩티다제 패밀리 단백질, 중성 프로테아제 2, 아스페르길로웍신-1을 포함하며, 1차 효소는 세린 엔도펩티다제이다. 아스퍼질러스의 류실 아미노펩티다제를 포함하는 제제의 예는 1차 효소가 류실 아미노펩티다제인 플라보자임 Conc BG(Novozymes A/S)이다. 플라보자임 Conc BG는 또한 류실 아미노펩티다제 A, 류실 아미노펩티다제 2, 디펩틸 펩티다제 4, 디펩티딜 펩티다제 5, 중성 프로테아제 1, 중성 프로테아제 2, 알칼리성 프로테아제 1을 포함하며 1차 효소는 류실 아미노펩티다제이다.

[0160] 본 발명의 일 양태에서, 효소 조합 iii)은

[0161] 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제, 바실러스로부터의 메탈로 엔도펩티다제, 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제 및 아스퍼질러스로부터의 류실 아미노펩티다제를 1차 효소로 포함한다. 바실러스로부터의 세린 엔도펩

티다제는 바람직하게는 서브틸리신이고, 바실러스로부터의 메탈로 엔도펩티다제는 바람직하게는 바실로리신이고, 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제는 바람직하게는 서브틸라제 패밀리의 단백질 및 알칼리성 프로테아제이다. 아스퍼질러스로부터의 류실 아미노펩티다제는 예를 들어 펩티드 가수분해효소, 류실 아미노펩티다제 A 및 류실 아미노펩티다제 2 중 하나 이상일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 효소 조합 iii)은 메탈로 엔도펩티다제 중 하나 이상을 추가적으로 포함할 수 있다; 편갈리신 메탈로펩티다제 M36, 중성 프로테아제 1 및 중성 프로테아제 2. 효소 조합 ii)는 또한 아스페르길로펩신-1(아스파라긴산 엔도펩티다제), 디펩티딜 펩티다제 4 및 디펩티딜 펩티다제 5를 포함할 수 있다. 효소 조합 iii)에 존재하는 효소의 적어도 80%는 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제, 바실로리신, 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제 및 아스퍼질러스로부터의 류실 아미노펩티다제이다. 바실러스의 세린 엔도펩티다제(서브틸리신)와 바실로리신을 모두 포함하는 제제의 예는 Promod 950L(Biocatalysts Ltd) 및 Protamex이다. 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제를 포함하는 제제의 예는 프로테아제 A 아마노 2 SD 및 Promod 782이다. Promod 782 및 프로테아제 A 아마노 2 SD는 또한 효소 펩티드 가수분해효소, 류실 아미노펩티다제, 편갈리신 메탈로펩티다제 M36, 프롤릴 올리고펩티다제 패밀리의 단백질, 중성 프로테아제 2 및 아스퍼길로펩신-1을 포함하며, 1차 효소는 세린 엔도펩티다제이다. 아스퍼질러스로부터의 류실 아미노펩티다제를 포함하는 제제의 예는 1차 효소가 류실 아미노펩티다제인 플라보자임 conc BG이다. 플라보자임 conc BG는 또한 효소 류실 아미노펩티다제 A, 류실 아미노펩티다제 2, 디펩티딜 펩티다제 4, 디펩티딜 펩티다제 5, 중성 프로테아제 1, 중성 프로테아제 2 및 알칼리성 프로테아제 1을 포함하며, 1차 효소는 류실 아미노펩티다제이다.

[0162] 본 발명의 일 양태에서, 효소 조합 iv)는 1차 효소로서 바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의 바실로리신, 브로멜라인 및 아스퍼질러스로부터의 류실 아미노펩티다제를 포함한다. 아스퍼질러스로부터의 류실 아미노펩티다제는 예를 들어 펩티드 가수분해효소, 류실 아미노펩티다제 A 및 류실 아미노펩티다제 2 중 하나 이상일 수 있다. 본 발명의 실시예에서, 효소 조합 iv)는 메탈로 엔도펩티다제 중 하나 이상을 추가적으로 포함할 수 있다; 편갈리신 메탈로펩티다제 M36, 중성 프로테아제 1 및 중성 프로테아제 2. 효소 조합 ii)는 또한 디펩티딜 펩티다제 4, 디펩티딜 펩티다제 5 및 알칼리성 프로테아제(아스퍼질러스로부터의 세린 프로테아제)를 포함할 수 있다. 효소 조합 iv)에 존재하는 효소의 적어도 80%는 바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의 바실로리신, 브로멜라인 및 아스퍼질러스로부터의 류실 아미노펩티다제인 것으로 예상된다. 바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의 바실로리신을 포함하는 제제의 예는 뉴트라제이다. 브로멜라인의 예는 Promod 523 MDP이고 아스퍼질러스로부터의 류실 아미노펩티다제의 예는 플라보자임 conc BG이다.

[0163] 첨가되는 효소의 양은 효소의 종류 및 효소의 활성에 의존하기 때문에, 본 발명의 유청 단백질 가수분해물의 제조 방법은 가수분해 단계에서 첨가되는 효소의 양에 제한되어서는 안 된다. 그러나 지침으로서 효소적 가수분해는 효소의 조합으로 수행되며, 상기 효소의 총량은 단백질 100 g 당 0.05 내지 10 g, 예컨대 단백질 100 g 당 효소 0.1 내지 7.5 g의 범위에 있다. 바람직하게는, 효소의 양은 단백질 100 g 당 0.2 내지 5.0 g이다.

[0164] 조합 i 내지 iii에서 3종의 상이한 효소 사이의 비는 예를 들어 1-10:1-10:1-10의 범위, 예컨대 1-8:1-8:1-8의 범위일 수 있다. 그러나, 본 발명은 첨가된 효소의 양에 제한되지 않아야 하는데, 이는 사용된 효소의 활성에 의존할 것이기 때문이다.

[0165] 본 발명의 단계 b)에서 수행되는 효소적 가수분해는 바람직하게는 40℃ 내지 70℃와 같은 40℃ 내지 75℃ 범위의 온도에서 수행된다. 효소 가수분해는 효소가 최적의 활성을 갖는 온도에서 수행되어야 한다. 바람직한 실시예에서, 효소적 가수분해는 45℃ 내지 65℃ 범위의 온도에서 수행된다.

[0166] 단계 c)에서 가수분해가 중단되기 전의 효소적 가수분해 시간은 사용된 효소의 양과 활성에 따라 다르다. 가수분해는 가수분해도가 15% 이상이 될 때까지 계속된다. 단계 b)에서 효소적 가수분해는 바람직하게는 3시간 내지 20시간, 예컨대 3.5시간 내지 15시간, 바람직하게는 4시간 내지 10시간, 더욱 더 바람직하게는 4시간 내지 7시간 범위에서 수행된다.

[0167] 유청 단백질 용액은 효소 가수분해 동안 6 내지 9 범위의 pH를 갖는 것이 바람직하다. 바람직한 실시예에서, 단계 b)에서 효소 가수분해 동안의 pH는 6.5 내지 8.0이다.

[0168] 이 pH 범위에서 효소는 대부분의 활성을 가지며 따라서 가장 효율적으로 단백질을 펩타이드 및 유리 아미노산으로 절단한다. 또한, 이 pH 범위에서 가수분해 과정 동안뿐만 아니라 효소를 비활성화하기 위한 열처리 중에도 응집이 방지된다.

[0169] 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물 제조방법의 단계 c)는 효소를 불활성화시켜 효소적 가수분해를 중지시

킨다. 본 발명의 맥락에서, 용어 "불활성화"는 효소의 비가역적 불활성화를 지칭한다. 효소의 불활성화는 다른 조건에서 효소가 활성화되지 않도록 비가역적이어야 한다.

[0170] 가수분해의 정도가 적어도 15%, 예컨대 적어도 18%, 바람직하게는 적어도 20%인 경우 가수분해가 중지된다. 본 발명의 일 실시예에서, 가수분해도가 15% 내지 35%, 바람직하게는 17% 내지 30%, 훨씬 더 바람직하게는 18% 내지 28% 범위일 때 단계 c)에서 가수분해가 중지된다.

[0171] 단계 c)에서 효소의 불활성화 및 이에 따른 가수분해의 중지는 당업계에서 공지된 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어 온도를 효소가 비활성화되고 변성되는 온도로 수정하여 효소를 불활성화한다. 효소의 불활성화 및 변성은 또한 용액의 pH를 효소가 불활성인 pH로 수정함으로써 이루어질 수 있다.

[0172] 따라서, 본 발명의 일 실시예에서, 단계 c)에서 효소의 불활성화는 효소가 첨가된 유청 단백질 용액을 적어도 80℃의 온도로 가열함으로써 이루어진다. 효소의 불활성화는 바람직하게는 80℃ 내지 130℃, 예컨대 85℃ 내지 125℃, 훨씬 더 바람직하게는 90℃ 내지 120℃의 온도로 가열함으로써 이루어진다. 가열에 의한 단계 c)에서 효소의 불활성화는 예를 들어 10 내지 30초 동안 110℃ 내지 130℃의 온도로 가열하는 것과 같이 짧은 시간 동안 고온으로 가열함으로써 이루어질 수 있다. 대안적으로, 단계 c)에서 효소의 불활성화는 비교적 낮은 온도로 더 긴 시간 동안 가열함으로써 이루어질 수 있다. 이는 5 내지 10분 동안 80℃ 내지 90℃로 가열하는 것을 포함할 수 있다.

[0173] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 단계 c)에서 효소의 비가역적 불활성화는 효소가 첨가된 유청 단백질 용액의 pH, 즉 유청 단백질 가수분해물을 효소가 불활성인 pH로 증가 또는 감소시키는 것을 포함한다. 본 발명의 일 실시예에서, pH는 10 이상의 pH로 증가된다. 다른 실시예에서, pH는 4 이하의 pH로 감소된다.

[0174] 본 발명의 바람직한 일 실시예에서, 상기 방법은 단계 c)에서 수득된 유청 단백질 가수분해물의 한외여과 단계를 포함하지 않는다. 한외여과 단계 없이 특정 효소 조합을 사용하여 소량의 지질, 즉 WPI 또는 SPI를 포함하는 유청 단백질 용액의 효소적 가수분해가 맛이 좋고 외관상 투명한 유청 단백질 가수분해물을 생성한다는 것은 본 발명의 발명자들에게 놀라운 일이었다.

[0175] 당업계에 공지된 유청 단백질 가수분해물은 한외여과되거나 한외여과되지 않은 가수분해물로 나눌 수 있다. 알려진 한외여과되지 않은 단백질 가수분해물은 외관이 불명확하거나 탁할 것이며, 한외여과된 단백질 가수분해물은 일반적으로 외관이 투명하다.

[0176] 본 발명의 맥락에서, 용어 "한외여과"는 1500 Da 내지 50000 Da, 바람직하게는 2000 Da 내지 20000 Da 범위의 컷오프를 갖는 막을 사용한 막 여과를 지칭한다.

[0177] 단백질 가수분해물의 한외여과 동안 지방, 온전한 단백질 및 일부 더 큰 펩티드는 한외여과막에 의해 유지되어 잔류물에 유지되는 반면 유리 아미노산, 더 작은 펩타이드 및 미네랄은 한외여과 투과물에 있다.

[0178] 본 발명의 일 실시예에서, 유청 단백질 용액은 지질 함량이 낮은 WPI 및 SPI의 용액으로 제조된다. 본 발명의 발명자들은 본 발명의 효소 조합으로 유청 단백질 가수분해물을 제조한 결과 가수분해도가 높고 맛이 좋으며 쓴 맛이 적고 외관이 투명한 유청 단백질 가수분해물이 생성된다는 사실에 놀랐다.

[0179] 그러나, 낮은 지질 함량만이 본 발명의 발명자들이 투명한 단백질 가수분해물을 제조할 수 있었던 이유에 대한 유일한 설명은 아니다. 본 발명의 발명자들은 놀랍게도 지질 함량이 낮은 유청 단백질 용액을 언급된 효소 조합 중 어느 하나로 효소적 가수분해될 때, 가수분해도가 15% 이상이고 4% 단백질 용액에서 쓴맛이 없고 외관이 투명한 유청 단백질 가수분해물을 제조할 수 있었다. 외관을 명확하게 하려면 지질 함량이 낮은 유청 단백질 용액을 사용해야 했다. 그러나 낮은 지질 함량이 투명한 가수분해물을 얻은 유일한 이유는 아니다. 본 발명의 발명자들은 놀랍게도 특정 효소 조합에 의한 가수분해가 투명한 가수분해물을 유도한다는 것을 발견하였다. 비교 시험에서 지질 함량이 낮은 다른 유청 단백질 가수분해물이지만 본 발명의 방법에 사용된 것 이외의 다른 효소로 가수분해를 수행한 경우에는 외관이 깨끗하고 쓴맛이 낮은 유청 단백질 가수분해물이 생성되지 않았다.

[0180] 본 발명의 방법에 의해 수득된 유청 단백질 가수분해물은 바람직하게는 농축 및/또는 건조될 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에서, 상기 방법은 단계 c)에서 수득된 유청 단백질 가수분해물을 농축 및/또는 건조하는 단계 d)를 포함한다. 농축은 예를 들어 단위 작업 나노여과, 역삼투 여과 및 증발 중 하나 이상에 의한 것일 수 있다.

[0181] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 건조 단계는 분무 건조, 동결 건조 및 스핀-플레이시 건조, 회전 건조 및/또는 유

동층 건조 중 하나 이상의 단위 작업을 포함한다.

- [0182] 유청 단백질 가수분해물
- [0183] 일 양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 유청 단백질 가수분해물에 관한 것이다:
- [0184] 유리 아미노산 및 펩타이드, 및
- [0185] 가수분해도가 적어도 15%이고
- [0186] 펩타이드 총량의 25 중량% 이하는 분자량이 2500 Da 이상인 펩타이드이고, 및
- [0187] 가수분해물 내 총 아미노산 함량의 15 중량% 이하는 유리 아미노산을 갖고, 및
- [0188] 상기 4% w/w 단백질 용액 중 유청 단백질 가수분해물은 0.08% w/v 이하의 카페인 용액에 상응하는 쓴맛 점수를 갖는다.
- [0189] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 유청 단백질 가수분해물의 가수분해도는 15% 이상이다. 본 발명의 목적은 한 외여과 단계 없이도 불쾌한 쓴맛이 없는 높은 가수분해도를 갖는 유청단백 가수분해물을 제조하는 것이다. 펩타이드가 많은 가수분해물의 쓴맛을 담당한다는 것은 잘 알려져 있다. 일반적으로 가수분해물에 높은 수준의 가수분해를 제공하는 광범위한 가수분해는 쓴맛이 있는 가수분해물을 생성할 것으로 예상된다. 광범위하게 가수분해된 단백질 가수분해물의 쓴맛을 줄이기 위해 가수분해물은 쓴맛 펩타이드와 함께 다시 제거될 수 있는 활성탄으로 처리될 수 있다. 광범위하게 가수분해된 단백질은 펩타이드가 온전한 단백질과 다른 기능을 가지기 때문에 바람직할 수 있다. 예를 들어, 펩타이드는 온전한 유청 단백질보다 열처리에 더 잘 견딘다.
- [0190] 그러나, 본 발명자들은 놀랍게도 유청 단백질 가수분해물에 별도의 쓴맛 펩타이드 제거 처리를 하지 않았음에도 불구하고 불쾌한 쓴맛이 나지 않고 가수분해도가 높은 유청 단백질 가수분해물의 제조방법을 발견하였다.
- [0191] 본 발명의 바람직한 일 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물의 가수분해도는 적어도 18%이고, 더욱 더 바람직하게는 유청 단백질 가수분해물의 가수분해도는 적어도 20%이다.
- [0192] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물은 가수분해도가 15 내지 35%, 예컨대 18 내지 30%, 바람직하게는 18 내지 28%, 훨씬 더 바람직하게는 20 내지 25%이다.
- [0193] 유청 단백질 가수분해물은 유리 아미노산을 포함할 수 있으며, 유리 아미노산이 존재하는 경우 가수분해물 내 총 아미노산 함량의 15 중량% 이하의 양으로 존재한다. 바람직하게는, 유리 아미노산 함량은 총 아미노산 함량의 12 중량% 이하이다. 본 발명의 맥락에서 용어 "총 아미노산 함량"은 유리 아미노산 및 펩타이드 및 단백질에 결합된 아미노산을 포함하여 존재하는 아미노산의 총량을 의미한다.
- [0194] 본 발명의 일부 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물의 유리 아미노산 함량은 총 아미노산 함량의 15 중량% 이하, 예컨대 총 아미노산 함량의 13 중량% 이하, 바람직하게는 총 아미노산 함량의 10 중량% 이하, 더욱 더 바람직하게는, 유리 아미노산의 함량은 총 아미노산 함량의 8% 이하이다.
- [0195] 본 발명의 다른 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물은 가수분해물 내 총 아미노산 함량 대비 2-15 중량%의 양의 유리 아미노산, 바람직하게는 4-13 중량%의 양의 유리 아미노산을 포함한다.
- [0196] 본 발명의 발명자들은 본 발명의 유청 단백질 가수분해물 중의 펩타이드가 2500 Da 이상의 분자량을 갖는 펩타이드를 펩타이드 총량의 25 중량% 이하로 포함함을 발견하였다. 바람직하게는, 유청 단백질 가수분해물은 8 내지 25 중량%, 훨씬 더 바람직하게는 10 내지 20 중량% 범위의 양으로 2500 Da 이상의 분자량을 갖는 펩타이드를 포함한다.
- [0197] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 유청 단백질 가수분해물은 375 Da 이하의 분자량을 갖는 펩타이드를 적어도 10 중량%의 양으로 포함한다. 375 Da 이하의 분자량을 갖는 펩타이드는 예를 들어 10 내지 25 중량% 범위의 양으로 유청 단백질 가수분해물에 존재할 수 있다.
- [0198] 본 발명의 발명자들은 본 발명의 유청 단백질 가수분해물이 가수분해도가 높은 공지된 유장 단백질 가수분해물, 또한 한외여과막을 사용한 막여과 및/또는 활성탄 처리를 거친 경우에 비해 쓴맛이 감소됨을 발견하였다.
- [0199] 유청 단백질 가수분해물의 쓴맛은 카페인의 쓴맛과 비교되었으며, 4% w/w 단백질 용액의 유청 단백질 가수분해물은 0.08% w/v 카페인 용액의 맛보다 쓴맛이 덜하다. 따라서 4% w/w 단백질 용액에서 유청 단백질 가수분해물의 쓴맛 점수는 0.08% w/v 카페인 이하의 쓴맛 점수에 해당한다. 바람직하게는, 본 발명의 4% w/w 단백질 용액

중 유청 단백질 가수분해물의 쓴맛 점수는 0.07% w/v 카페인 이하의 쓴맛 점수에 해당하며, 훨씬 더 바람직하게는 0.065% 카페인 이하의 쓴맛 점수에 해당한다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 4% w/w 단백질 용액 중 유청 단백질 가수분해물의 쓴맛 점수는 0.060% w/v의 쓴맛 점수에 해당한다.

- [0200] 본 발명의 추가적인 일 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물은 4% w/w 단백질 용액에서 100 이하의 비탁 탁도 (NTU)를 갖는다. 본 발명의 추가적인 실시예는 가수분해도가 높고 맛이 좋을 뿐만 아니라 외관도 투명한 유청 단백질 가수분해물을 얻는 것이다. 예를 들어 음료, 젤 및 셰이크에 사용될 수 있고 소비자에게 개선된 호소력을 제공할 수 있기 때문에 깨끗하고 맛 좋은 유청 단백질 가수분해물이 바람직하다.
- [0201] 측정된 비탁 탁도가 4% w/w 단백질 용액에서 100 NTU보다 낮으면 샘플이 투명한 것으로 인식된다. 4% 단백질 용액에서 비탁 탁도가 100 NTU 이상인 경우 측정된 유청 단백질 가수분해물은 투명하지 않은 것으로 인식된다. 비탁 탁도가 40 NTU 미만이면 용액이 명확한 것으로 인식된다. 그러나 탁도가 40 및 100 사이의 NTU인 유청 단백질 가수분해물은 투명할 수 있다(그러나 불명확하거나 탁함). 본 발명의 맥락에서, "투명한"이라는 용어는 용액 뒤의 물체가 보여질 수 있도록, 즉 용액을 통해 볼 수 있도록 약간의 빛이 통과하도록 하는 용액을 지칭한다. "투명"이라는 용어는 무색의 용액을 의미하므로 투시를 제한하지 않고 용액을 통해 볼 수 있다. 따라서 용액은 투명하지만 명확하지 않을 수 있다.
- [0202] 본 발명의 추가적인 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물은 4% w/w 단백질 용액에서 80 이하의 비탁 탁도(NTU), 예를 들어 4% w/w 단백질 용액에서 60 이하의 비탁 탁도(NTU)를 갖는다. 바람직하게는 4% w/w 단백질 용액에서 50 이하의 비탁 탁도(NTU), 훨씬 더 바람직하게는 4% w/w 단백질 용액에서 40 이하의 비탁 탁도(NTU)를 갖는다.
- [0203] 또한 본 발명의 일 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물은 항산화 활성을 갖는다. 바람직하게는 유청 단백질 가수분해물의 항산화 활성은 1.5 중량% 단백질 용액에서 소거율이 54 내지 60인 것으로 측정된다.
- [0204] 유청 단백질 가수분해물은 단백질 이외의 다른 성분, 예를 들어 탄수화물, 지질 및 미네랄을 포함할 수 있다.
- [0205] 본 발명의 일 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물은 총 고형분 함량을 기준으로 8 중량% 이하, 예컨대 총 고형분 함량을 기준으로 6 중량% 이하의 양으로 지질을 포함한다. 또 다른 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물은 총 고형분 함량을 기준으로 1 중량% 이하의 양으로 지질, 예를 들어 총 고형분 함량의 0.5 중량% 이하의 지질 함량을 포함한다.
- [0206] 유청 단백질 가수분해물은 또한 칼륨, 나트륨 및 칼슘과 같은 미네랄을 포함할 수 있다.
- [0207] 본 발명의 일 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물은 3.0 중량% 이하의 양으로 칼륨을 포함한다.
- [0208] 본 발명의 다른 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물은 2 중량% 이하의 양으로 나트륨을 포함한다.
- [0209] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물은 유청 단백질 가수분해물의 고형분 함량 kg 당 4 내지 10 g 범위의 양으로 시트르산을 포함한다.
- [0210] 본 발명의 일 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물은 전체 단백질 함량을 기준으로 0.5 내지 2 중량%의 양으로 온전하거나 비분해된 소 혈청 알부민(BSA)을 포함한다.
- [0211] 본 발명의 바람직한 일 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물은 분말 또는 과립과 같은 건조 조성물의 형태이다.
- [0212] 또 다른 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물은 액체 조성물이다.
- [0213] 식품:
- [0214] 일 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 식품을 제공하는 것에 관한 것이다.
- [0215] 식품은 예를 들어 음료, 셰이크, 젤, 푸드 바, 농축액 또는 액상 샷을 포함하는 유제품 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0216] 바람직한 실시예에서, 식품은 단백질 음료, 단백질 샷, 단백질 셰이크, 단백질 젤 또는 단백질 바의 군으로부터 선택된다. 식품은 또한 유아용 조제유 또는 기타 유아용 영양 제품일 수 있다.
- [0217] 식품이 음료, 셰이크, 젤 또는 샷과 같은 액체 형태인 경우, 식품은 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물을 포함할 수 있다. 유청 단백질 가수분해물은 바람직하게는 2 내지 25 중량% 가수분해 유청 단백질, 바람직하게는 3 내지 20 중량% 가수분해 유청 단백질, 예컨대 3 내지 15 중량% 가수분해 유청 단백질, 훨씬 더 바람직하게는

3 내지 10중량%의 가수분해된 유청 단백질에 해당하는 양으로 음료에 존재한다.

- [0218] 식품이 단백질 바와 같은 바인 경우, 식품은 2 내지 30 중량%의 가수분해된 유청 단백질에 해당하는 양으로 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물의 양은 가수분해된 유청 단백질 3 내지 20 중량%, 예를 들어 4 내지 15 중량%에 해당하는 양으로 바에 존재한다. 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물이 예를 들어 단백질 바와 같은 식품 바에서 사용되는 경우, 유청 단백질 가수분해물이 연화제로 사용될 수 있다. 단백질 바의 단백질 가수분해물의 농도를 증가시키면 연화 효과가 있고 장기간 보관 시 바의 경화를 방지하는 것으로 잘 알려져 있다.
- [0219] 추가적인 양태에서, 본 발명은 2 내지 20 중량%의 가수분해된 유청 단백질에 상응하는 양으로 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 음료를 제공하는 것에 관한 것이다. 음료는 예를 들어 단백질 외에 탄수화물, 비타민 및 미네랄을 포함하는 단백질 음료일 수 있다.
- [0220] 본 발명의 바람직한 일 실시예에서, 음료는 중성 pH, 즉 22℃에서 4% 단백질 용액 중 6.5 내지 8.0 범위의 pH를 갖는다.
- [0221] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물은 탄산 음료의 제조에서 성분으로 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 본 발명의 식품은 탄산 음료이다.
- [0222] 본 발명의 추가적인 실시예는 본 발명의 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 탄산 음료에 관한 것이다.
- [0223] 일 실시예에서, 탄산 음료는 2 내지 10 중량%에 상응하는 양으로 유청 단백질 가수분해물을 포함한다. 탄산 음료는 또한 탄수화물을 포함할 수 있으며, 탄수화물이 존재하는 경우 5 중량% 이하의 양으로 존재합니다. 탄산 음료는 바람직하게는 지방을 포함하지 않는다.
- [0224] 일 실시예에서, 본 발명의 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 탄산 음료의 탄산화 양은 탄산화 0.1 부피(음료에 존재하는 액체 부피 당) 내지 탄산화 4 부피의 범위이다. 보다 전형적으로, 탄산화의 양은 약 1.6 부피 내지 약 3.5 부피의 범위이고, 가장 전형적인 농도는 약 1.7 부피 내지 약 3.0 부피의 범위이고, 탄산화의 양은 가장 바람직하게는 2.0 내지 3.0 부피의 범위이다. 본 발명의 맥락에서 탄산화는 음료에 존재하는 탄산의 양이 액체 혼합물의 부피당 0.1 부피 내지 4 부피 범위인 탄산 단백질 음료를 수득하기에 충분한 양으로 음료를 위한 성분 혼합물에 이산화탄소를 첨가하는 것을 의미한다. 어떤 실시예에서, 상기 방법의 이산화탄소는 멸균 탄산수의 형태로 첨가된다. 다른 실시예에서, 멸균 이산화탄소는 원하는 양의 이산화탄소가 존재할 때까지 액체 혼합물을 통해 버블링된다.
- [0225] 탄산은 음료의 산도를 증가시킨다. 음료에 더 많은 이산화탄소를 첨가할수록 음료의 pH 값은 낮아진다. 그러나, 본 발명의 발명자들은 이산화탄소의 첨가가 5℃의 온도에서 음료의 pH를 최소 pH 5.5-6.0으로 감소시킬 것이라는 것을 발견하였다. 음료 부피당 약 2.5-3.0 부피의 이산화탄소를 첨가하면 음료의 pH가 5℃의 온도에서 약 pH 6.0으로 감소하는 반면, 부피 음료당 약 4 부피의 이산화탄소를 첨가하면 음료의 pH가 5℃의 온도에서 약 pH 5.5로 감소하였다.
- [0226] 따라서, 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 탄산 음료는 5℃의 온도에서 5.5 이상의 pH를 갖는다. pH는 전형적으로 5.5 내지 8.25의 범위, 예를 들어 5.5 내지 7.0의 범위, 바람직하게는 5.8 내지 6.5의 범위일 수 있다. pH는 5.5 이상인 것이 탄산 음료로 바람직하다.
- [0227] 본 발명의 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 탄산 음료는 예를 들어 저온 살균 또는 오토클레이브와 같이 열처리될 수 있다. 본 발명의 발명자들은 본 발명의 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 탄산 음료의 탁도가 예를 들어 20분과 같은 장시간 동안 120℃까지의 온도에서 열처리한 후에도 변하지 않는다는 것을 발견하였다.
- [0228] 본 발명의 추가적인 실시예에서, 탄산 음료는 가수분해되지 않은 유청 단백질 분리와 조합된 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물을 포함할 수 있다.
- [0229] 본 발명의 유청 단백질 가수분해물은 또한 단백질 샷, 단백질 셰이크 또는 단백질 젤의 제조에 사용될 수 있다. 단백질 샷, 셰이크 또는 젤은 가수분해된 유청 단백질 외에 2~20 중량%의 양으로 탄수화물, 비타민 및 미네랄을 포함할 수 있다. 단백질 샷, 단백질 셰이크 또는 단백질 젤의 pH는 바람직하게는 중성, 즉 6.5 내지 8.0 범위의 pH이다.
- [0230] 추가적인 양태에서, 본 발명은 식품 성분으로서 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물의 용도에 관한 것이다. 유청 단백질 가수분해물은 모든 유형의 식품에 식품 성분으로 첨가할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 유청

단백질 가수분해물은 차거나 따뜻한 음료의 제조에서 식품 성분으로 사용된다.

- [0231] 본 발명의 일 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물은 6.5 내지 8.5 범위의 pH를 갖는 UHT 안정 음료의 제조에서 식품 성분으로서 사용된다.
- [0232] 본 발명의 다른 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물은 스포츠 영양에 사용되는 음료의 제조에서 식품 성분으로 사용된다. 본 발명의 맥락에서, 용어 "스포츠 영양"은 운동 또는 훈련과 관련하여, 즉 근육량을 구축하기에 적합한 영양을 의미한다.
- [0233] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 유청 단백질 가수분해물은 임상 음료의 제조에서 식품 성분으로 사용된다. 본 발명의 맥락에서, 용어 "임상 음료"는 임상적 또는 의학적 징후를 갖는 음료를 지칭한다. 예를 들어, 임상 음료는 건강 관련 효과를 가질 수 있다. 임상 음료는 일반적으로 영양 문제가 있는 입원환자 또는 노인 또는 질병에서 회복하기 위해 미리 소화된 단백질이 필요한 개인이 사용한다. 예를 들어, 임상 음료는 영양 실조 또는 흡수 장애로 고통받는 개인에게 사용되는 음료일 수 있다. 임상 음료는 위장 질환으로 고통받는 개인을 위한 것일 수도 있다. 본 명세서에서 "임상용 음료" 및 "의료용 음료"라는 용어는 동일한 의미를 갖는다.
- [0234] 임상 음료는 예를 들어 2 내지 20 중량%의 가수분해된 유청 단백질을 포함하는 음료에 상응하는 양으로 본 발명의 유청 단백질 가수분해물을 포함할 수 있다. 임상 음료는 음료의 5 내지 50 중량%의 양으로 탄수화물을 포함할 수 있다. 탄수화물의 양은 예를 들어 10 내지 40 중량%, 예를 들어 15 내지 35 중량% 범위일 수 있다. 임상 음료는 또한 지방을 포함할 수 있다. 예를 들어, 임상 음료의 지방 함량은 2 내지 30 중량%, 예컨대 3 내지 20 중량%, 보다 바람직하게는 3 내지 18 중량% 범위일 수 있다.
- [0235] 일 예에서, 임상 음료는 4-10 중량%, 3-15 중량%의 지방 및 10-35 중량%의 탄수화물의 양에 해당하는 본 발명에 따른 가수분해된 유청 단백질을 포함한다.
- [0236] 임상 음료는 바람직하게는 중성 pH 값, 즉 6.5 내지 8.0 범위의 pH를 갖는다.
- [0237] 임상 음료는 투명한 음료, 유백색 음료, 튜브 피드의 형태 또는 액체로 재구성되는 분말 형태일 수 있다.
- [0238] 일 실시예에서, 본 발명의 유청 단백질 가수분해물은 또한 주스 스타일 음료의 제조에 사용될 수 있다. 주스 스타일 음료는 바람직하게는 4-10 중량%의 단백질, 0-1 중량%의 지방 및 15-35 중량%의 탄수화물에 해당하는 양으로 본 발명에 따른 가수분해된 유청 단백질을 포함한다.
- [0239] 임상 음료가 튜브 피드의 형태인 경우, 본 발명에 따른 가수분해된 유청 단백질 4 내지 15 중량%, 탄수화물 약 5 내지 35 중량% 및 지방 약 3 내지 15 중량%를 포함할 수 있다.
- [0240] 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물은 또한 유아용 조제유와 같은 유아 영양에 사용될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 용어 "유아용 조제유"는 후속 조제유, 성장기 조제유 및 조산 조제유를 포함하는 임의의 유형의 유아용 조제유를 지칭한다.
- [0241] 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물을 유아용 조제유에 사용하는 경우, 유아용 조제유의 단백질 함량은 1.6 내지 5.0 g/100 kcal의 범위이다. 유청 단백질 가수분해물 외에도 유아용 조제유는 유당, 올리고당, 지질, 비타민 및 미네랄과 같은 탄수화물을 포함할 수도 있다.
- [0242] 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물은 또한 유아용 조제유 이외의 다른 유아용 영양제, 예를 들어 스무디, 죽 등의 제조에 사용될 수 있다.
- [0243] 본 발명의 유청 단백질 가수분해물은 또한 에멀전의 제조에 사용될 수 있다. 에멀전은 일반적으로 유청 단백질 가수분해물의 분말을 액체, 예를 들어 물 또는 우유, 지방과 같은 액체에 재구성하여 제조한다. 유청 단백질 가수분해물은 물과 지방에 유화 효과가 있다. 분말은 전형적으로 5 내지 15 중량% 단백질에 상응하는 양으로 유청 단백질 가수분해물을 포함할 수 있다. 재구성 후, 에멀전은 2 내지 4 중량%의 양으로 단백질을 포함한다.
- [0244] 단백질의 가수분해는 하전된 기의 수 증가, 예컨대 평균 분자량의 감소 및 반응성 기의 노출과 같은 단백질의 변화를 야기한다. 이는 단백질 가수분해물의 에멀전 형성 및 에멀전 안정화 능력에 영향을 미치는 인자이다. 본 발명의 유청 단백질 가수분해물은 다른 성분과 조합하여 유화제, 안정제 등으로 사용할 수 있다.
- [0245] 본 발명의 유청 단백질 가수분해물은 또한 베이커리 제품, 예를 들어 비스킷, 쿠키 및 크래커에 사용될 수 있다.
- [0246] 추가적인 양태에서, 본 발명은 항산화제로서의 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물의 용도에 관한 것이다.

본 발명의 발명자들은 놀랍게도 본 발명의 유청 단백질 가수분해물이 항산화 효과를 갖는다는 것을 발견하였다. 따라서 유청 단백질 가수분해물은 항산화 펩타이드의 공급원으로 영양 조성물에 사용될 수 있다.

[0247] 따라서, 본 발명은 항산화 효과를 갖는 본 발명의 유청 단백질 가수분해물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 1.5 중량%의 단백질을 포함하는 용액에서 54 내지 60의 소거율로 정의되는 항산화 효과를 갖는 유청 단백질 가수분해물에 관한 것이다. 소거율은 DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) 분석에 의해 측정된다. 소거율은 $100 \times (A_0 - A_s) / A_0$ 로 계산되며, 여기서 A_0 는 샘플이 없을 때의 흡광도이고 A_s 는 샘플이 있을 때의 흡광도이다.

[0248] 본 발명의 양태 중 하나와 관련하여 설명된 실시예 및 특징은 또한 본 발명의 다른 양태에도 적용된다는 점에 유의해야 한다.

[0249] 본 출원에 인용된 모든 특허 및 비특허 참고 문헌은 그 전체가 참고로 본 명세서에 포함된다.

[0250] 본 발명은 이제 다음의 비제한적인 실시예에서 더욱 상세하게 설명될 것이다.

발명의 효과

[0251] 본 발명은 가수분해도가 높고, 맛이 좋으며, 한외여과를 거치지 않고도 탁도가 낮은 신규한 유청 단백질 가수분해물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 새로운 유청 단백질 가수분해물의 제조 방법, 새로운 유청 단백질 가수분해물의 용도 및 이러한 새로운 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 식품에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0252] 도 1a는 본 발명의 효소 조합을 사용하여 제조되지 않았으나 한외여과를 거친 유청 단백질 가수분해물로서, 샘플 16(WPI의 효소적 가수분해에 의해 제조된 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물), 샘플 14(유청 단백질 농축물(WPC)의 효소적 가수분해에 의해 제조된 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물) 및 샘플 13(참조 유청 단백질 가수분해물)에 대한 다양한 단백질 농도에서의 비탁 탁도(NTU)를 나타낸다.

도 1b는 샘플 16(WPI의 효소적 가수분해에 의해 제조된 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물)에 대한 상이한 단백질 농도에서의 비탁 탁도(NTU)를 나타낸다. 표준편차가 주어진다.

도 1c는 샘플 14(WPC의 효소적 가수분해에 의해 제조된 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물)에 대한 다양한 단백질 농도에서의 비탁 탁도(NTU)를 나타낸다. 표준편차가 주어진다.

도 2는 샘플 13, 14 및 16의 다양한 단백질 농도 샘플을 나타낸다. 단백질 농도(w/w)는 왼쪽에서 오른쪽으로 8%, 6.4%, 4.8%, 3.2% 및 1.8%이다. a)는 샘플 16을 나타내고, b)는 샘플 14를 나타내고, 및 c)는 샘플 13을 나타낸다.

도 3은 다양한 카페인 농도의 쓴맛 점수 및 샘플 13, 14, 및 16의 쓴맛 점수를 나타낸다.

도 4는 샘플 13, 15 및 16의 맛과 식감 프로파일의 방사형 그래프를 나타낸다. 최고 및 최저 점수를 가진 속성 간의 차이는 ***로 표시되며 유의 수준은 99.9%이고 $P < 0.001$ 이다(ANNOVA 분석).

도 5는 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 또는 LC-MS/MS(MS)를 사용하여 분석할 때 7-10개 아미노산 및 11-19개 아미노산 범위에서 7 및 19개 아미노산 사이의 펩타이드 백분율을 나타낸다.

도 6은 알파-락트알부민, 베타-락토글로불린 및 베타-카제인으로부터의 모든 펩타이드의 백분율로 나타낸 펩타이드를 포함하는 페닐알라닌을 나타낸다. 분석된 가장 짧은 펩타이드는 5개 아미노산이었다.

도 7은 알파-락트알부민, 베타-락토글로불린 및 베타-카제인으로부터의 5-19개 아미노산의 펩타이드의 백분율 수를 나타낸다.

도 8은 왼쪽부터 열처리를 하지 않은 음료, 6초 동안 143°C에서 직접 UHT 처리한 음료, 6초 동안 간접 UHT 처리한 음료, 및 6.5분 동안 90°C에서 저온살균한 음료를 나타낸다.

도 9는 유청 단백질 가수분해물의 다양한 샘플에서 분해되지 않은 BSA의 양을 결정하는 데 사용된 SDS-페이지 겔의 사진을 나타낸다.

도 10은 음료의 탄산화 및 pH 사이의 상관관계를 나타낸다.

도 11은 유청 단백질 가수분해물을 포함하고 조성물 부피당 2.5 부피의 이산화탄소로 탄산화된 다양한 샘플의 pH를 나타낸다.

도 12는 용액 부피당 2.5 부피 CO₂로 탄산화된 샘플 16의 8% 단백질 용액을 포함하는 샘플의 가열 중 pH 및 탁도를 나타낸다.

본 발명은 이제 하기에서 더 상세히 설명될 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0253] 실시예 1: 분석 방법

[0254] 실시예 1.1: 가수분해도(DH) 측정

[0255] 가수분해도(DH)는 가수분해에 의해 절단된 펩타이드 결합의 백분율로 정의되고, 아래 식 (1)에 따른다. DH 값은 사용 가능한 펩타이드 결합의 수와 관련된 형성된 펩타이드 수에 대한 정보를 제공한다.

[0256] 유청 단백질 가수분해물의 DH는 Adler-Nissen, J. *Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid*. J. Agric. Food Chem. 27, 1256-1262 (1979) 및 Nielsen, P. M., Petersen, D. & Dammann, C. *Improved method for determining food protein degree of hydrolysis*. J. Food Sci. 66, 642-646 (2001)에 설명된 대로 측정되었다.

[0257] 식 (1)에서, h는 절단된 펩타이드 결합의 수를 나타내고 h_{total}은 사용 가능한 총 펩타이드 결합 수를 나타낸다. 따라서 DH는 절단된 펩타이드 결합의 백분율을 제공한다.

[0258] 식 (1): $DH = (\text{유리 아미노 말단 수}) / (\text{사용 가능한 총 펩타이드 결합 수}) \times 100\% = h / h_{\text{total}} \times 100\%$

[0259] 가수분해 후 형성된 유리 알파-아미노기는 o-프탈알데히드(OPA)와 반응하여 340 nm에서 빛을 흡수하는 황색 착물을 형성하므로 분광광도계로 측정할 수 있다. 색상 형성에 따라, DH를 계산할 수 있다.

[0260] 가수분해물을 적절한 농도(0.03-0.08% 단백질)로 물에 재현탁하고 2 부피를 25°C에서 2분 동안 15 부피의 OPA 시약(100 mM Na₂B₄O₇, 0.1% 나트륨도데실-설페이트, 6 mM DL-디티오레이톨, 6 mM o-프탈알데히드 및 2% 에틸 알코올)과 반응시켰다. 농도 계열의 L-세린을 생성하기 위해 유사한 반응이 이루어졌다. 다음으로, 340 nm(A340)에서의 흡광도를 측정하고 OPA와 물의 반응으로부터의 A340 신호를 뺐다. 진정한 DH를 찾기 위해 상등액에서 측정된 세린 당량은 트리니트로벤젠설포닉산 방법에 대해 Adler-Nissen이 제안한 대로 수정되어 [Adler-Nissen J; Agricultural and Food Chemistry, 1979 27 (6) 1256]에 설명된 OPA 방법과 동일한 응답을 제공하였다. 유청 단백질 가수분해물에 사용된 인자는 a=1, b=0.4, h_{total}=8.8이었다.

[0261] 실시예 1.2: 탁도 측정

[0262] 유청 단백질 가수분해물의 비탁 탁도는 명확도와 투명도를 측정하는 데 사용된다. 측정된 비탁 탁도가 4% w/w 단백질 용액에서 100 NTU보다 낮으면 샘플이 투명한 것으로 인식된다. 또한, 측정된 비탁 탁도가 4% w/w 단백질 용액에서 40 NTU보다 낮으면 샘플이 명확한 것으로 인식된다.

[0263] 비탁 탁도를 측정할 때 샘플은 5가지 다른 농도의 단백질, 1.8%, 3.2%, 4.8%, 6.4% 및 8%로 희석되고 비탁 탁도는 Merck의 Turbiquant 3000 IR로 측정된다.

[0264] 실시예 1.3: 총 단백질의 측정

[0265] 샘플의 총 단백질 함량(단백질 등가물)은 다음과 같이 결정된다:

[0266] 1) ISO 8968-1/2 IDF 020-1/2-Milk에 따라 샘플의 총 질소 측정 - 질소 함량 측정 - 파트 172: 킬달 방법을 사용한 질소 함량 측정.

[0267] 2) 단백질의 총량을 다음과 같이 계산: $N \times 6.38$

[0268] 실시예 1.4: 총 아미노산 함량 측정

[0269] 아미노산 조성 분석은 아미노산 보충의 원천인 단백질 가수분해물에 대한 자세한 정보를 제공한다.

[0270] 총 아미노산 함량은 ISO 13903:2005, EU 152/2009의 방법으로 측정하였다. 샘플을 염산 수용액에서 가수분해하

여 샘플의 펩타이드 결합을 끊었다. 가수분해 후, 샘플의 pH를 조정하고 부피를 채우고 여과하였다. 아미노산을 아미노산 분석기에서 분리하고 닌히드린 시약을 사용하여 컬럼 후 유도체화를 사용하여 검출을 수행하고 440 및 570 nm에서 측정하였다. 정량화를 위해 1-포인트 보정이 사용되었다. 품질 보증을 위해 모든 실행에서 사내 표준을 분석하였다.

[0271] 아미노산 분석기에서 분석하기 전에 시스테인과 메티오닌을 산화시켜야 한다. 샘플을 저온에서 과산화수소와 포름산으로 산화시킨 후, 염산 수용액을 사용하여 산 가수분해하였다. 산화 과정은 메티오닌과 시스테인을 산화시켜 가수분해 중 손실을 방지한다. 가수분해 후, 샘플을 상기 기재된 바와 같이 분석하였다.

[0272] 총 트립토판의 정량화: 트립토판은 단백질의 산 가수분해 중에 파괴되기 때문에 다른 아미노산과 같은 방식으로 정량할 수 없으므로 다른 방법을 사용하여 트립토판을 분석했다. 대신, 샘플을 알칼리 처리에 의해 가수분해하고 HPLC 분석에 의해 정량화하였다.

[0273] 각 아미노산에 대한 결과는 발견된 아미노산의 총량으로 정규화된다: [g/100 g 아미노산].

[0274] 실시예 1.5: 유리 아미노산 함량의 측정

[0275] 유청 단백질 가수분해물의 유리 아미노산은 R. Schuster, "Determination of Amino Acids in Biological, Pharmaceutical, Plant and Food Samples by Automated Precolumn Derivatization and HPLC", *Journal of Chromatography*, 431:271-284 (1988) 및 Henderson, J.W., Ricker, R.D. Bidlingmeyer, B.A., Woodward, C., "Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids, Amino Acid Analysis Using Zorbax Eclipse-AAA columns and the Agilent 1100 HPLC," Agilent Publication, 2000의 방법에 따라 결정된다.

[0276] 유리 아미노산은 아미노산을 수용액 또는 산성 용액으로 추출하여 결정된다. 샘플은 분자량 여과에 의해 단백질이 제거될 수 있다. 샘플은 주입 전 유도체화 후 HPLC에 의해 분석된다. 1차 아미노산은 o-프탈알데히드로 유도체화되고 2차 아미노산은 주사 전에 플루오레닐메틸 클로로포메이트로 유도체화된다. 결과는 다음과 같이 제공된다.

[0277] [mg 유리 아미노산/100 g 유청 단백질 가수분해물 분말]

[0278] 실시예 1.6: 유청 단백질 가수분해물의 펩타이드 분포를 측정하는 방법

[0279] 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 사용하여 유청 단백질 가수분해물에서 펩티드의 분자량 분포를 분석했다. SEC는 고분자 유형의 분자를 크기별로 분리하는 데 사용된다. 크기가 다른 성분의 혼합물(여기서는 펩타이드)은 SEC로 분리할 수 있다. 용출 시간은 분자의 크기에 따라 다르다. 분자가 작을수록 용출 시간이 길어진다.

[0280] 샘플은 0.5% w/v 농도로 이동상에 용해되었다. 주입하기 전에 샘플을 0.45 μm 필터를 통해 여과했다. 직렬로 연결된 3개의 TSK G2000 SWXL(125 Å, 5 μx 컬럼에서 크로마토그래피 분리를 수행했다. 0.0375 M 인산염 완충액, 0.375 M 염화암모늄, 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA) 및 25% 아세토니트릴(CH₃CN)의 완충액을 분당 0.7 mL의 유속으로 이동상으로 사용했다. 214 nm에서 측정되는 UV-검출기를 사용하여 펩티드의 검출을 수행하였다.

[0281] 머무름 시간을 기준으로 펩타이드의 분포를 크기에 따라 나누고 분자량에 따라 상대적인 양을 부여한다.

[0282] **실시예 2: 효소 조합의 스크리닝**

[0283] 유청 단백질의 효소 가수분해에 사용하기 위해 총 55가지 다른 효소 조합을 테스트했다. 얻어진 유청 단백질 가수분해물의 투명도, 쓴맛, 가수분해도, 펩타이드 조성을 분석하였다. 가수분해 실험은 0.5 리터 규모로 이루어졌다.

[0284] 다양한 효소 조합을 테스트하는 데 사용된 효소는 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제(EC 3.4.21.62), 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제(EC 3.4.21), 미생물 기원의 트립신-유사 프로테아제(EC 3.4.21.4), 아스퍼질러스로부터의 아미노펩티다제(EC 3.4.11), 바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의 메탈로엔도펩티다제(EC 3.4.24.28), 아나나스 코모수스로부터의 엔도프로테아제(브로멜라인)(EC 3.4.22.32), 아스퍼질러스 니거로부터의 프롤린 특이적 엔도펩티다제(EC: 3.4.21.26), 아스퍼질러스 오리제로부터의 아미노펩티다제 제제(EC 3.4.11, 지오바실러스 스테아로더모필러스로부터의 메탈로엔도펩티다제 제제(EC 3.4.24) 및 바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의 엔도펩티다제 제제(EC 3.4).

[0285] 실험에 사용된 효소 제제는 다음과 같다:

- [0286] 바실러스 속으로부터의 세린 엔도펩티다제를 포함하는 Protamex(Novozymes A/S)(서브틸리신) 및 바실로리신.
- [0287] 아스퍼질러스 오리제로부터의 세린 엔도펩티다제를 포함하는 프로테아제 A 아마노 2 SD(Amano Enzymes Ltd.)
- [0288] 아스퍼질러스 속의 세린 엔도펩티다제를 포함하는 Promod 782 MDP(Biocatalysts Ltd.)
- [0289] 미생물 기원의 트립신-유사 프로테아제를 포함하는 Formea TL 1200 BG(Novozymes A/S)
- [0290] 바실러스 속으로부터의 세린 엔도펩티다제를 포함하는 Promod 950L(Biocatalysts Ltd.)(서브틸리신) 및 바실로리신.
- [0291] 아스퍼질러스 오리제로부터의 류실 아미노펩티다제를 포함하는 플라보자임 conc BG(Novozymes A/S)
- [0292] 바실러스 리케니포르미스로부터의 세린 엔도펩티다제를 포함하는 Alcalase AF 2.4 L(Novozymes A/S) (서브틸리신)
- [0293] 바실러스 아밀로리퀘파시엔스로부터의 메탈로엔도펩티다제(바실로리신)를 포함하는 뉴트라제 conc BG(Novozymes A/S)
- [0294] 아나나스 코모수스로부터의 시스테인 엔도펩티다제를 포함하는 Promod 523 MDP(브로멜라인)(Biocatalysts Ltd.)
- [0295] 아스퍼질러스 니거의 프로린 특이적 엔도펩티다제를 포함하는 Maxipro PSP(DSM).
- [0296] 아스퍼질러스 오리제로부터의 아미노펩티다제를 포함하는 Flavorpro 766(Biocatalyst Ltd.)
- [0297] 지오바실러스 스테아로더모필러스로부터의 메탈로엔도펩티다제를 포함하는 Thermoase PC10F(Amano Enzymes Ltd.)
- [0298] 바실러스 아밀로리퀘파시엔스로부터의 엔도펩티다제를 포함하는 프로틴 NY100(Amano Enzymes Ltd.)
- [0299] 55가지 효소 조합이 유청 단백질의 가수분해에 사용되었다. 가수분해를 위한 기질로서 분리유청단백(WPI) 용액(Arla Food 성분의 Lacprodan DI-9224)을 사용하였다. 모든 실험에 대한 WPI 용액의 단백질 농도는 8 중량%였다. 가수분해 반응은 첫 번째 효소를 첨가한 후 6시간의 반응 시간 및 pH=7에서 pH-stat로 50℃에서 수행하였다. 6시간의 가수분해 후, 효소를 불활성화시키기 위해 90초의 유지 시간으로 99℃로 가열하여 가수분해를 중지시켰다. 사용된 효소의 양은 단백질 100 g 당 효소의 양으로 표 1에 나와 있다. 각 가수분해 실험의 제품은 동결 건조되었고 투명도(탁도 측정의 형태로), 가수분해 정도, 맛 평가 및 점수를 포함한 추가 분석에 사용되었다. 결과는 하기 표 1에 주어진다:
- [0300] NEU: Neutrase를 나타냄
- [0301] FZ: Flavourzyme conc BG를 나타냄
- [0302] Alca: Alcalase AF 2.4 L을 나타냄
- [0303] PA: Protease A Amano 2 SD를 나타냄
- [0304] FTL: Formea TL 1200 BG를 나타냄
- [0305] PM782: Promod 782 MDP를 나타냄
- [0306] FP766: Flavourpro 766을 나타냄
- [0307] MP PSP: Maxipro PSP를 나타냄
- [0308] THER: Thermoase PC10F를 나타냄
- [0309] PRO: Protin NY100을 나타냄
- [0310] PM950: Promod 950L을 나타냄
- [0311] PTM: Protamex를 나타냄
- [0312] 표 1에 제시된 실험에 사용된 효소는 96-웰 스케일의 실험을 기반으로 더 많은 효소 중에서 선택되었다. 이러한 시험에는 다양한 효소 조합을 사용한 가수분해와 명백한 투명도 및 열 안정성 및 가수분해(SDS-PAGE)의 시각적 점수가 포함되었다. pH-stat 가수분해 및 분석을 위한 더 많은 양의 물질을 허용하기 위해 표 1에 제시된 조합을 위에서 설명한 대로 500 ml 규모로 수행했다. 따라서 표 1에 제시된 효소는 무작위로 선택되지 않았다. 표 1

의 일부 효소 조합은 다른 용량으로 반복되었다(예: 조합 1-3).

[0313] 용어 "Visual a inact."은 표 1에서 "불활성화 후 육안 검사"를 나타낸다.

표 1

[0314]

샘플 ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Enz 1 (dose)	PTM 0.156	PTM 0.312	PTM 0.625	PTM 0.625	PA 0.312	PA 0.312	0.312PA	PTM 0.312	PTM 0.312	PM 950 3.125
Enz 2 (dose)	PA 0.156	PA 0.312	PA 0.625	PM782 0.625				PA 0.312	PA 0.312	PA 0.312
Enz 3(dose)	FTL 0.156	FTL 0.312	FTL 0.625	FTL 0.625	FTL 0.312	FZ 0.312	FP766 0.312	FZ 0.312	FZ 0.312	FZ 0.312
Visual a inact.	명확	명확	명확	명확	명확	탁함	탁함	탁함	탁함	명확
DH-%				22.1						31.5
쓴맛	4%	4%	4%	>4%	4%	4%	4%	8%	8%	8%
>2500 Da (5%)	36.4	28.6	20.9	17.6	34.5	27.7	41	21.1	33.7	11.7
샘플 ID	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Enz 1 (dose)	Alca 1.05	PA 0.312	PA 0.312	THER 0.312	PRO 0.312	PM782 0.625	PM782 0.625	PM782 0.625	PM782 0.625	PM782 0.625
Enz 2 (dose)	PA 0.312	FTL 0.312	FTL 0.312	PA 0.312	PA 0.312	FTL 0.625	FTL 0.624	FTL 0.625	FTL 0.625	FTL 0.625
Enz 3(dose)	FZ 0.312	FZ 0.312	FP766 0.312	FZ 0.312	FZ 0.312	FZ 0.625	FP766 0.625	FZ 0.625	FP 766 0.625	FZ 0.625
Visual a inact.	명확	명확	명확	탁함	탁함	겔	겔	명확	탁함	명확
DH-%	31.5					22.6	16.6	34.7	18.8	52.4
쓴맛	8%	4%	4%	8%	8%	N/A	N/A	4%	8%	4%
>2500 Da (5%)	9.6	17.8	21.2	20.7	31.9	36.0	40.5	15.8	27.6	19.2
샘플 ID	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Enz 1(dose)	PM782 0.625	PM782 0.625	Neu 0.219	Neu 0.219	Neu 0.219	Neu 0.219	Neu 0.219	Neu 0.219	Neu 0.219	Neu 0.219
Enz 2(dose)	FTL 0.625	FTL 0.625	PM523 0.625	Alca 6.25	PM950 6.25	PM523 0.625	PM523 0.625	PM523 0.625	PM782 0.625	PM523 0.625
Enz 3(dose)	FZ 0.625	FZ 0.625	PM782 0.625	PM782 0.625	PM782 0.625	MPPSP 6.25	MPCPP 6.25		FZ 0.125	FZ 0.125
Visual a inact.	탁함	흰색	명확	탁함	탁함	명확	겔	명확	탁함	명확
DH-%	55.4	54.5	18.7	24.5	21.7	14.7	16.3	15.3	25.4	25.6
쓴맛	4%	8%	4%	2%	4%	4%	4%	8%	8%	8%
>2500 Da (5%)	16.5	17.7	26.9	5.4	14.6	26.8	20.8	24.6	26.7	15.3
샘플 ID	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Enz 1(dose)	Neu 0.129	Neu 0.219	Neu 0.219	PM523 0.625	PM523 0.625	PM523 0.625	PM523 0.625	PTM 0.625	PTM 0.625	PTM 0.625
Enz 2(dose)	PM523 0.625	MPPSP 6.25	PM523 0.625	PM144 0.625	Alca 6.25	PM950 6.25	PTM 0.625	PM523 0.625	PM782 0.625	MPPSP 6.25
Enz 3(dose)	FTL .0625	PM782 0.625	FP766 0.625	PM782 0.625	FP782 0.625	PM782 0.625	PM782 0.625	Neu 0.219	Neu 0.219	Neu 0.219
Visual a inact.	탁함	명확	명확	명확	흰색	흰색	명확	탁함	탁함	명확
DH-%	18.8	20.5	19.6	15.8	24.4	22.5	18.8	17.9	20.8	14.5
쓴맛	8%	8%	8%	8%	2%	4%	8%	4%	4%	2%
>2500 Da (5%)	14.1	15.8	17.8	20.8	3.5	8.5	24.3	17.3	27.3	48.9
샘플 ID	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50

Enz 1(dose)	PM523 0.625	Neu 0.219	Neu 0.219	Neu 0.219	PTM 0.625	PTM 0.625	PM523 0.625	Neu 0.219	Neu 0.219	Neu 0.219
Enz 2(dose)	Neu 0.219	PM523 0.625	PTM 0.625	MPPSP	Neu 0.219	Neu 0.219	Neu 0.219	PM782 0.625	PTM 0.625	MPPSP 6.25
Enz 3(dose)	FZ .0625	FZ .0625	FZ .0625	FZ .0625	FZ .0625	PM782 0.625	FP766 0.625	FP766 0.625	FP766 0.625	FP766 0.625
Visual a inact.	명확	명확	명확	탁함	탁함	탁함	명확	탁함	명확	명확
DH-%	22.8	22.4	19.9	17.7	17.9	8.1	8.1	8.2	8.1	16.3
쓴맛	N/A	N/A	4%	4%	4%	4%	8%	8%	4%	8%
>2500 Da (5%)	19.3	35.2	28.7	42.6	34.3	28.7	22.1	26.6	33.6	45.3
샘플 ID	51	52	53	54	55					
Enz 1(dose)	PTM 0.625	Neu 0.219	Neu 0.219	Neu 0.219	PTM 0.625					
Enz 2(dose)	Neu 0.219	PM523 0.625	PM782 0.625	MPPSP 6.25	Neu 0.219					
Enz 3(dose)	FP766 0.625	PTM 0.625	PTM 0.625	PTM 0.625	MPPSP 6.25					
Visual a inact.	명확	탁함	탁함	명확	명확					
DH-%	17.3	18.3	23.6	14.9	15.5					
쓴맛	4%	8%	6%	8%	8%					
>2500 Da (5%)	37.0	15.3	26.7	43.4	39.7					

- [0315] 데이터는 각 유청 단백질 가수분해물에 대해 평가되었다. 긍정적인 평가를 위해서는 다음 조건이 충족되어야 한다:
- [0316] - 효소 불활성화 후 외관이 깨끗함
- [0317] - 15% 이상, 바람직하게는 20% 이상의 높은 가수분해도를 가짐
- [0318] - 4% w/w 단백질 용액에서 쓴맛이 없음
- [0319] - 25 중량% 이하의 펩타이드는 2500 Da 이상의 분자량을 가져야 함.
- [0320] 샘플은 UHT 안정성을 나타내므로 99℃에서 90초 후에 투명해야 한다(6초 동안 143℃에서 4% 용액을 처리한 후 안정적이고 투명하다).
- [0321] 따라서, 상기 55가지 효소 조합 중 4가지의 표에서, 즉 샘플 4, 10, 11, 및 30으로 지칭되는 샘플이 조건을 만족했음을 알 수 있다.
- [0322] 샘플 4는 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제, 및 트립신-유사 프로테아제의 효소 조합으로 가수분해하여 수득하였다.
- [0323] 샘플 10은 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제, 바실러스로부터의 메탈로 엔도펩티다제, 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제, 및 아스퍼질러스로부터의 류실 아미노펩티다제의 효소 조합으로 가수분해하여 수득하였다.
- [0324] 샘플 11은 바실러스의 세린 엔도펩티다제, 아스퍼질러스의 세린 엔도펩티다제 및 아스퍼질러스의 류실 아미노펩티다제로 가수분해하여 수득하였다.
- [0325] 샘플 30은 바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의 바실로리신, 브로멜라인 및 아스퍼질러스로부터의 적어도 하나의 류실 아미노펩티다제로 가수분해하여 수득하였다.
- [0326] **실시예 3: 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물의 추가 분석**
- [0327] 투명도, 맛, 가수분해도 및 펩티드 분포의 조건을 충족하는 실시예 2의 4가지 유청 단백질 가수분해물을 추가로 분석하여 하기 표에서 샘플 1-4(S1-S4)로 언급하였다.
- [0328] 샘플 5-12(S5-S12)는 다른 효소 조합으로 가수분해된 유청 단백질 가수분해물이다.

- [0329] 샘플 13(S13)은 스위트 유청을 바실러스 리케니포르미스(알칼라제)로부터의 서브틸리신과 바실러스 아밀로리퀘파시엔스(뉴트라제)로부터의 바실로리신의 조합으로 가수분해한 후 한외여과, 활성탄 처리 및 미세여과를 통해 활성탄을 제거하고 얻은 분무 건조된 WPI 가수분해물이다(WO 1993/024020A1에 기술됨). 가수분해도는 약 25%이다.
- [0330] 샘플 14(S14)는 샘플 4(본 발명의 효소 조합)와 동일한 효소 조합을 사용하여 제조되지만 상기 WPC는 가수분해를 위한 기질로 사용된다.
- [0331] 샘플 15 및 16(S15-S16)은 샘플 4의 복제물이다. 샘플 15 및 16은 샘플 4와 동일한 조건을 사용하여 UF 여과 없이 제조된 WPI 기반 가수분해물이다.
- [0332] 다른 효소 조합으로 효소 가수분해하여 만든 유청 단백질 가수분해물을 다시 투명도, 가수분해도 및 2500 Da 이상의 분자량을 갖는 펩타이드의 함량과 375 Da 미만의 분자량을 갖는 펩타이드의 함량을 다시 분석하였다.
- [0333] 샘플의 투명도(탁도)는 실시예 1.2에 따른 측정에 의해 결정되었으며, 샘플이 투명하게 인식되기 위해서는 비탁탁도가 40 NTU 미만이어야 하고 샘플이 투명으로 인식되기 위해서는 100 NTU 미만이어야 한다.
- [0334] 단백질 4% 이하에서 쓴맛이 느껴지면 쓴맛으로 채점하였다.
- [0335] 가수분해 정도는 실시예 1.1에 기재된 방법으로 측정하였고 쓴맛은 다양한 농도(2%, 4%, 8% 단백질 농도)에서 샘플을 시음하여 측정하였다. 펩타이드의 분포는 실시예 1.5에 기재된 바와 같이 측정하였다. 결과는 표 2에 나타난다:

표 2

[0336]	기원	효소 조합	투명도(4% 단백질에 서의 비탁 탁도 40 NTU 미만)	쓴맛 단 백질 %	DH (%)	>2500 Da (%)	<375 Da (%)
S1	WPI	바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제 류실 아미노펩티다제	Yes	8	31.5	11.7	20.4
S2	WPI	바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제 트립신-유사 프로테아제	Yes	>4	31.5	17.6	13.5
S3	WPI	바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제 류실 아미노펩티다제	Yes	8	22.1	9.6	22.2
S4	WPI	바실러스 아밀로리퀘파시엔스로부터의바실로리신 브로멜라인 류실 아미노펩티다제	Yes	8	25.6	15.3	14.4
S5	WPI	아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제 트립신-유사 프로테아제 류실 아미노펩티다제	No	8	18.9	27.6	8.7
S6	WPI	바실러스 아밀로리퀘파시엔스로부터의바실로리신 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제	No	2	24.6	5.4	21

S7	WPI	브로멜라인바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제 바실러스로부터의 메탈로 엔도펩티다제 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제	Yes	8	18.9	24.5	9.9
S8	WPI	바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의바실로리신 바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제	No	4	21.7	14.6	13.8
S9	WPI	바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의바실로리신 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제 류실 아미노펩티다제	No	8	23.4	26.7	13.8
S10	WPI	바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의바실로리신 프롤릴 특이 엔도펩티다제 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제	Yes	8	20.5	28.4	24.3
S11	WPI	브로멜라인바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제	No	2	24.4	1.9	54.5
S12	WPI	브로멜라인바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제 아스퍼질러스로부터의 세린 엔도펩티다제	No	4	22.5	8.5	16.6
S13	WPC	바실러스로부터의 세린 엔도펩티다제바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의바실로리신	No	>2	23.0	7.5	18.9
S14	WPC	바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의바실로리신브로멜라인 류실 아미노펩티다제	No	8	25.4	23.2	15
S15	WPI	바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의바실로리신 브로멜라인 류실 아미노펩티다제	Yes	8	23.0	23.2	12.7
S16	WPI	바실러스 아밀로리케파시엔스로부터의바실로리신 브로멜라인 류실 아미노펩티다제	Yes	8	23.0	17.9	13.5

[0337] 따라서, 표 2로부터, 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물을 생성하는 특정 효소 조합의 사용은 1) 가수분해도가 20% 이상이고, 2) 펩타이드의 25% 미만이 2500 Da 이상의 분자량을 갖고, 및 3) 단백질 4% 이하의 농도에서 쓴맛이 없는 것이다.

[0338] 또한, 표 2는 WPI가 단백질 가수분해에 사용되는 경우, 본 발명의 특정 효소 조합을 사용하면 외관이 투명한 유청 단백질 가수분해물이 생성된다는 것을 보여준다. 표 2는 또한 WPC가 기질로 사용되는 유청 단백질 가수분해물의 제조에서 특정 효소 조합의 사용이 20% 이상의 가수분해도를 갖고, 펩타이드의 25% 미만은 2500 Da 이상의 분자량을 갖고 단백질 4% 이하의 농도에서 쓴맛이 없는 유청 단백질 가수분해물을 생성한다. 그러나, WPC를 기질로 사용하여 제조된 유청 단백질 가수분해물은 외관이 투명하지 않다(WPC에 존재하는 지질 때문).

[0339] 본 발명의 바람직한 실시예에서, WPI는 투명한 가수분해물을 획득하기 위한 단백질 가수분해를 위한 기질로서 사용된다.

[0340] **실시예 4: 탁도 분석**

- [0341] 실시예 3의 샘플 1 내지 16의 상이한 단백질 농도에서의 비탁 탁도를 추가로 분석하였다. 탁도가 100 NTU 미만인 샘플은 투명한 것으로 간주되고 탁도가 40 미만인 샘플은 투명한 것으로 간주된다. 하기 표 3은 상이한 단백질 농도에서 측정된 실시예 3의 샘플 1-12로 언급된 가수분해물의 탁도를 나타낸다. 단백질 농도는 1.8% 단백질, 3.2% 단백질, 4.8% 단백질, 6.4% 단백질 및 8% 단백질이다. 단백질 농도는 중량 백분율이다.
- [0342] 유청 단백질 가수분해물의 분말은 탁도를 측정하기 전에 표시된 농도에서 적어도 30분 동안 수화되었다(n=3).

표 3

- [0343] 1.8, 3.2, 4.8, 6.4 및 8% 단백질에서 시험 샘플의 탁도(NTU)

단백질 함량 (%-wt)	1.8	3.2	4.8	6.4	8
샘플 1	9.26	18.69	29.05	34.14	43.48
샘플 2	14.46	26.86	34.38	42.45	50.15
샘플 3	10.93	21.08	30.48	41.29	48.56
샘플 4	11.58	23.78	33.82	43.73	63.41
샘플 5	129.42	213.08	269.67	292.63	305.15
샘플 6	177.24	366.35	620.99	827.23	921.99
샘플 7	12.4	21.5	31.31	37.11	42.04
샘플 8	86.94	186.66	254.45	336.05	399.52
샘플 9	68.41	121.46	182.88	236.2	263.59
샘플 10	16.5	31.52	46.38	58.8	67.4
샘플 11	154.82	318.38	511.59	740.01	972.62
샘플 12	114.53	228.26	334.15	435.53	575.48

- [0344] 따라서, 본 발명에 따른 특정 효소 조합이 8% 단백질 농도에서 100 NTU 미만의 탁도를 갖는다는 것이 표 3으로부터 나타난다.
- [0345] 도 1a-c에는, 샘플 13, 14 및 16에서 측정된 탁도가 나와 있다. 도 1a는 샘플 13, 14 및 16의 유청 단백질 가수분해물의 탁도를 보여주고 탁도의 차이를 보여준다. 도 1a에서, 한외여과를 거친 유청 단백질 가수분해물(본 발명 외, 샘플 13)은 탁도가 매우 낮고(1 NTU 미만) 가수분해물이 가장 투명함을 알 수 있다. 특정 효소 조합 중 하나를 사용하여 본 발명에 따른 방법에 따라 제조된 가수분해물(샘플 16)은 8% 단백질 농도에서 100 NTU 미만의 탁도를 가지며 따라서 투명하다. 또한, 본 발명의 가수분해물은 4% 단백질 농도에서 40 NTU 미만의 탁도를 가지므로 4% 단백질 농도에서 명확한 것으로 인식된다. 이에 반해, WPC를 기질로 사용하여 본 발명에 따라 제조된 유청 단백질 가수분해물(샘플 14)은 탁도가 1000 NTU 이상으로 불명확한 것으로 인식된다.
- [0346] 도 1b는 샘플 16의 탁도가 5% 이하의 단백질 농도에서 40 NTU 미만임을 보다 명확하게 보여준다.
- [0347] 도 1c는 샘플 14의 탁도를 보여준다. 매우 낮은 농도(약 2%)에서도 탁도가 2000 NTU 이상인 것으로 나타났다. 샘플 14는 매우 불명확하고 투명하지 않은 것으로 인식됩니다.
- [0348] 도 2a-c는 샘플 13, 14 및 16의 사진을 포함하여 명확한 샘플 대 불명확한 샘플을 시각적으로 보여준다. 샘플은 왼쪽에서 오른쪽으로 8%, 6.4%, 4.8%, 3.2% 및 1.8% 단백질로 준비되었다.
- [0349] 도 2a는 샘플 16이 8%, 6.4%, 4.8%, 3.2% 및 1.8% 단백질에서 시각적으로 명확하고 투명함을 나타낸다.
- [0350] 도 2b는 샘플 14를 나타내며, 샘플 14가 1.8%의 가장 낮은 단백질 농도에서도 불명확하고 투명하지 않음을 나타낸다.
- [0351] 도 2c는 샘플 13을 나타내며, 샘플 13이 모든 농도에서 시각적으로 명확하고 투명함을 나타낸다.
- [0352] **실시예 5: 카페인에 대한 쓴맛 평가**
- [0353] 실시예 5에서는 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물의 쓴맛을 본 발명과 다른 효소(바실러스 리케니포르미스(알칼라제)로부터의 서브틸리신과 바실러스 아밀로리퀘파시엔스(뉴트라제)로부터의 바실로리신으로 가수분해)로 WPI를 효소적 가수분해하여 제조한 UF 여과 및 활성탄 처리된 유청 단백질 가수분해물과 비교하여 분석하였다.
- [0354] 관능평가는 실시예 3의 샘플 13, 15 및 16의 맛을 비교하여 수행하였다.

[0355] 참고로 카페인 용액을 사용하여 쓴맛을 감지하고 정량화하도록 관능 패널을 훈련하였다. 교육에는 패널리스트들에게 카페인 농도 증가로 이루어진 용액을 포함하는 참조 샘플이 먼저 제공되었다는 내용이 포함되었다. 패널리스트들은 15 cm 척도를 기반으로 미지의 용액에 쓴맛 점수를 할당하도록 훈련되었다. 참조 샘플은 각각 0.025%, 0.05% 및 0.1% 카페인을 함유하는 3개의 카페인 용액으로 구성되었다. 참조 샘플을 평가한 후, 패널리스트들은 가수분해물 샘플을 4 중량% 단백질 용액에서 무작위 순서로 3회 맛보고, 참조 용액의 쓴맛을 기준으로 시험 용액의 쓴맛 강도를 순위 지정했다. 0.025% 카페인을 포함하는 참조 용액은 쓴맛이 아닌 것으로 인식되고 0.1% 카페인을 포함하는 참조 용액은 쓴맛으로 인식된다(15 cm 쓴맛 척도에서 13점). 감각 패널은 평가에 참여하는 7명의 패널리스트들로 구성되었다.

[0356] 또한, 패널을 사용함에 있어서 국제 표준 Quantitative Descriptive Profile ISO 13299:2016 2nd ed. 5.5, Annex F1-F6&H3에 따라 관능 프로파일링을 수행하였다. 7명의 숙련된 평가자가 평가에 참여하였다. 평가는 3회 반복하였다. 사용된 응답 척도는 연속선 척도(15 cm)였다. 대략 2 ml의 샘플을 주위 온도에서 제공하였다. 평가 중에는 적색광을 사용하였다.

[0357] 카페인의 쓴맛과 관련하여 관능 패널에 의해 채점된 쓴맛은 시험 샘플의 쓴맛 점수가 카페인 농도에 대해 플롯팅된 도 3에 나와있다. 3가지 다른 농도의 카페인의 쓴맛과 실시예 3의 샘플 13, 15 및 16의 쓴맛 점수가 도 3에 나와있다.

[0358] 도 3은 샘플 13(WPI의 가수분해물이지만 본 발명의 효소 조합은 포함하지 않지만, 가수분해물은 한외여과되고 활성탄으로 처리됨)이 0.095%의 가장 높은 상대적 쓴맛을 가짐을 보여준다. 샘플 15(한외여과 및 활성탄 처리가 없는 본 발명의 효소 조합을 사용한 WPI의 가수분해물)는 0.054%의 상대적 쓴맛을 갖는 3개의 제품 샘플 중에서 가장 낮은 상대적 쓴맛을 갖지만, 카페인에 비해 상대적인 쓴맛이 0.061%인 샘플 16(샘플 15와 유사)의 가수분해물에 매우 가깝다.

[0359] 따라서, 본 발명에 따라 제조된 맛 좋은 유청 단백질 가수분해물(샘플 15 및 샘플 16)의 맛은 0.08% 카페인보다 덜 쓰고 샘플 13보다 덜 쓴 것으로 인식되었다.

[0360] 실시예 6: 맛 프로파일링

[0361] 샘플 13, 15 및 16에서 유청 단백질 가수분해물의 맛 프로파일을 평가하기 위한 실시예가 만들어졌다. 맛 프로파일링은 숙련된 패널에 의해 5가지 속성을 사용하여 냄새, 입에 닿는 느낌 및 맛에 중점을 둔 샘플 간의 차이점을 식별하여 작성되었다.

[0362] 각 속성에 대한 샘플 간의 상당한 차이를 식별하기 위해 데이터를 분석하였다. 데이터의 통계적 평가는 표 4에 나와있다. 또한, 샘플 간의 차이를 식별하기 위하여 다중 범위 테스트가 사용되었다. 표 4에서, 동일한 문자를 가진 샘플은 크게 다르지 않다.

표 4

[0363] 관능 점수

	Cheese_O ***	Broth_O ***	Astringent_MF***	Umami_T ***	Bitter_T ***
샘플 15	5.33 ^A	4.89 ^A	5.79 ^A	7.15 ^A	7.53 ^A
샘플 13	1.4 ^B	1.14 ^B	10.71 ^B	1.54 ^B	12.3 ^B
샘플 16	4.1 ^A	7.58 ^C	5.96 ^A	8.49 ^A	8.11 ^A

[0364] *** p<0.001 던컨 검정: 속성에 대해 문자가 다른 샘플은 95% 수준에서 유의하게 다르다(p<0.05).

[0365] 따라서, 샘플 15 및 16의 쓴맛 점수는 샘플 13의 쓴맛 점수보다 낮다.

[0366] 표 4에 언급된 데이터는 도 4에 보여지듯이 방사형 그래프로 나타낼 수 있다. 방사형 그래프는 냄새(O), 미각(MF) 및 맛(T)의 속성을 보여준다. 플롯 주변에는 각 관능 속성의 '높은' 강도가 표시되고 플롯의 중앙에는 '작은' 강도가 표시된다. 각 제품에는 도면 아래에 표시된 다른 레이블이 있다. 예를 들어, "Bitter_T"에 대한 데이터를 참조함에 있어서 ***는 샘플 13과 샘플 15 및 16에 대한 데이터가 상당히 다르다는 것을 나타낸다(p<0.001).

[0367] 맛 프로파일의 방사형 그래프에서 샘플 13은 맛 프로파일의 샘플 15 및 16과 매우 다르며 샘플 15 및 16의 쓴맛이 낮다는 것이 가장 중요하다.

[0368] 실시예 7: LC-MS/MS 및 펩타이드 절단 패턴에 의한 분석

[0369] 액체 샘플의 펩타이드는 질량 스펙트럼 펩타이드 분석 및 데이터베이스 검색으로 식별할 수 있다. 샘플 1, 2, 3, 13, 15 및 16을 LC-MS/MS로 분석하여 펩타이드 서열과 이들이 유래된 단백질을 확인하였다. Bruker Maxis Impact QTOF 질량 분석기에서 MS/MS 분석을 위해 각 샘플에 존재하는 펩타이드를 물에 용해시키고 Dionex nano-LC 시스템에 주입하였다. 획득한 MS/MS 스펙트럼을 사용한 측정은 소 기원의 단백질 서열을 포함하는 맛추형 데이터베이스에 대해 수행되었다. 분석의 전체 결과는 표 5에 나와있다.

표 5

[0370] LC-MS/MS에 의하여 동정된 단백질

커버리지 (%)	샘플 1	샘플 2	샘플 3	샘플 13	샘플 15	샘플 16
베타-락토글로불린	79.8	80.9	82.6	74.2	82	82.6
베타-카제인	79.9	77.7	79.5	71.4	64.7	62.5
카파-카제인	29.5	38.9	32.6	30.5	36.3	33.2
GDCA 분자 1*	46.4	65.4	34.6	48.4	56.2	40.5
오스테오폰틴	40.6	30.9	36.7	39.9	33.8	29.9
알파-락트알부민	42.3	54.2	58.5	47.2	53.5	62
알파-S1-카제인	49.1	53.7	41.1	36	41.1	36.4
BSA**	18.9	15	21.3	10.2	8.4	10.5
알파-S2-카제인	27	33.3	20.7	23.9	19.4	11.3
총 동정된 펩타이드 수	776	917	709	631	595	615

[0371] *당화-의존성 세포 접합 분자 1

[0372] ** 소 혈청 알부민

[0373] 표 5의 데이터의 분석은 베타-락토글로불린, 알파-락트알부민 및 베타-카제인을 포함하는 샘플에서 가장 널리 퍼진 단백질에 대해 높은 서열 커버리지를 제공함을 보여주었다. 또한, 각 샘플에서 확인된 펩타이드의 수가 표시된다. 데이터세트는 LC-MS/MS 분석에 대해 예상된 품질이었기 때문에 더 자세한 분석에 유효했다(실시예 9).

[0374] 실시예 8: 쓴맛 펩타이드의 LC-MS/MS 분석

[0375] 먼저 실시예 7의 LC-MS/MS 데이터가 펩타이드 분포 비교에 의하여 SEC 분석(크기 배제 크로마토그래피)으로 수득한 데이터와 일치함을 확인하였다. 상기 SEC 데이터는 백분율 수(주어진 분자량의 펩타이드 수)로 변환되었고 LC-MS/MS를 기반으로 계산된 동일한 데이터와 함께 각 가수분해물에 대해 플롯팅되었다(도 5 참조). 상기 LC-MS/MS 데이터에는 베타-락토글로불린의 펩타이드만 포함된 반면 SEC 분석은 샘플의 모든 단백질을 설명했다.

[0376] 도 5로부터, LC-MS/MS 및 SEC를 사용할 때 7-19개 아미노산에서 베타-락토글로불린 유래 펩타이드의 수에서 7-10개 아미노산 범위 및 11-19개 아미노산 범위에서의 베타-락토글로불린 유래 펩타이드의 백분율은 유사했다.

[0377] 따라서, 도 5에 표시된 데이터는 SEC 데이터와 비교할 수 있고 SEC 방법은 정량적이기 때문에 펩타이드의 상대적 분포에 대한 정량적 정보를 추출하는 데 사용할 수 있는 LC-MS/MS 데이터세트에서 상이한 아미노산 길이 범위의 펩타이드 수를 보여준다. 또한, 도 5는 샘플 13(본 발명 외)이 본 발명에 따른 가수분해물보다 더 작은 펩타이드 크기를 갖는 더 많은 펩타이드를 가짐을 보여준다.

[0378] 페닐알라닌을 포함하는 검출 가능한 펩타이드의 양을 전체 펩타이드 수의 백분율로 확인하고 MS-LC/MS에 의해 샘플 1, 2, 3, 13, 15 및 16에서 분석하였다. 결과는 도 6에 나와 있다.

[0379] 어떠한 이론에도 구속되지 않고, 본 발명의 발명자들은 펩타이드에 존재하는 페닐알라닌이 쓴맛과 상관관계가 있으며, 페닐알라닌의 아미노 말단 또는 카르복시 말단이 다른 아미노산 잔기와의 펩타이드 결합에 의해 차단될 때 페닐알라닌의 쓴맛이 강화될 수 있다고 생각한다. 예를 들어, 쓴맛 유청 단백질 가수분해물에서 확인된 쓴맛 펩타이드 YPFPGIPN의 페닐알라닌 잔기는 주요 쓴맛 결정 요인으로 제안되었다(Liu, X., Jiang, D., and Peterson, DG Identification of Bitter Peptides in whey protein hydrolysate, J. Agric. Food Chem. 2014.

62: 5719-5725).

[0380] 도 6은 베타-락토글로불린, 알파-락트알부민 및 베타-카제인에서 유래하는 펩타이드의 총 수에 대한 백분율로서 펩타이드의 페닐알라닌 함량을 나타낸다. 페닐알라닌을 포함하는 펩타이드의 백분율은 9개 미만의 아미노산 잔기의 펩타이드 크기에서 덜 쓴 가수분해물에 대해 더 낮았다. 따라서, 샘플 1 및 3의 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물의 경우, 페닐알라닌은 더 큰 펩타이드 크기를 갖는 펩타이드에 존재한다. 샘플 2, 15 및 16으로 표시되는 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물은 또한 펩타이드를 포함하는 페닐알라닌의 낮은 백분율을 갖지만, 또한 샘플 2, 15 및 16은 또한 전체 펩타이드에 결합된 페닐알라닌의 낮은 백분율을 나타내었다. 이는 샘플 1, 3 및 13보다 샘플 2, 15 및 16에 유리 아미노산으로 더 많은 페닐알라닌이 존재할 수 있음을 나타낸다. 따라서, 본 발명에 따른 쓴맛이 없는 유청 단백질 가수분해물의 표시는 큰 비율의 페닐알라닌이 더 큰 펩타이드에 존재하거나 유리 아미노산으로 존재한다는 것이다.

[0381] 도 7에서, 베타-락토글로불린, 알파-락트알부민 및 베타-카제인으로부터의 5-19개 아미노산의 펩타이드의 백분율이 도시된다.

[0382] 도 7로부터, 샘플 13(본 발명 외)이 다른 5개의 유청 단백질 가수분해물보다 더 작은 펩타이드(5-9개 아미노산)를 포함함이 도시된다. 어떠한 이론에도 구속되지 않고, 본 발명의 발명자들은 샘플 13의 가수분해물에서 더 작은 펩타이드 크기의 펩타이드를 포함하는 페닐알라닌의 더 높은 함량은 본 발명에 따른 가수분해물인 샘플 1, 2, 3, 15 및 16에서보다 샘플 13에서 더 높은 쓴맛에 대한 이유일 수 있다고 믿는다.

[0383] 실시예 9: SEC 크기 분포 데이터

[0384] 샘플 1, 2, 3, 13, 15 및 16에서 펩타이드의 크기는 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 분석되었다. 그 결과는 하기 표 6에 도시된다:

표 6

[0385] 샘플 1, 2, 3, 13, 15 및 16에서 유청 단백질 가수분해물의 SEC 크기 분포 데이터, DH 및 유리 아미노산(FAA) 함량

	샘플 1	샘플 2	샘플 3	샘플 13	샘플 15	샘플 16
<375 Da (%)	20.4	13.5	22.2	16.1	13	13.5
375-750 Da (%)	20.1	24.5	24.2	35.9	20.4	22.9
750-1250 Da (%)	18.2	15.3	20.6	24.6	17	18.8
1250-2500 Da (%)	29.5	29.1	23.3	21.4	27.3	26.9
>2500 Da (%)	11.7	17.6	9.6	2.1	22.4	17.9
DH (%)	31.5	22.1	31.5	27.7	23.3	25.4
FAA (mg/100 g 단백질 (Nx6.38))	13825	4404	12241	413	7266	5936

[0386] 크기 배제 크로마토그래피 데이터는 주로 펩타이드 결합이 흡수될 것으로 예상되는 214 nm에서 측정하여 얻은 데이터이므로 유리 아미노산을 정확하게 설명하지 않는다.

[0387] 따라서, 유리 아미노산의 함량은 다른 방법으로 측정하였다(실시예 10 참조). 샘플 13의 참조 유청 단백질 가수분해물과 비교하여, 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물은 유리 아미노산 함량이 더 높다. 그러나, 작은 펩타이드의 함량은 본 발명의 유청 단백질 가수분해물보다 참조 유청 단백질 가수분해물(샘플 13)에서 더 높다. 예를 들어, 750 Da 이하인 펩타이드의 함량은 샘플 13에서 50% 이상이다. 이에 반해, 본 발명의 유청 단백질 가수분해물은 750 Da 이하의 펩타이드 함량이 40% 미만이다. 또한, 샘플 13은 본 발명의 유청 단백질 가수분해물보다 2500 Da 이상인 더 적은 펩타이드를 포함한다.

[0388] 이들 데이터를 실시예 8의 데이터와 비교할 때, 샘플 2, 15 및 16의 베타-락토글로불린, 알파-락트알부민 및 베타-카제인 유래 펩타이드에서 낮은 전체 페닐알라닌 함량이 이들 페닐알라닌 잔기가 펩타이드에서 유리 아미노산 분획으로 방출된 결과임이 명백해진다. 따라서, 가수분해물의 쓴맛을 줄이는 방법은 전체 가수분해물의 유리 아미노산 분획에서 페닐알라닌을 특이적으로 농축시키는 효소 조합을 확인하는 것일 수 있다.

[0389] 실시예 10: 측정된 유리 아미노산 함량

[0390] 본 발명의 유청 단백질 가수분해물의 유리 아미노산 함량을 측정하고 참조 유청 단백질 가수분해물(본 발명

외)과 비교하였다. 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

[0391]

유리 아미노산 함량(mg/100g 단백질(Nx6.38))

	샘플 1	샘플 2	샘플 3	샘플 13	샘플 15	샘플 16
아스파르트산	113.51	<10	93.24	<10	32.56	17.70
트레오닌	898.44	178.05	850.42	22.72	282.30	249.70
세린	397.09	57.51	374.84	17.34	173.36	117.33
글루타민	222.56	31.86	181.56	<10	194.45	117.21
글루탐산	87.62	<10	101.68	<10	42.29	29.33
프롤린	<10	<10	<10	<10	16.52	24.61
글리신	42.05	26.59	24.48	<10	21.20	21.70
알라닌	663.0	189.76	445.12	32.68	343.21	253.33
시스틴	<10	<10	<10	<10	<10	<10
발린	1171.37	480.26	830.50	<10	730.94	627.88
메티오닌	1055.41	473.23	1024.95	<10	500.18	386.67
이소류신	1311.94	524.77	981.61	44.75	763.73	665.45
류신	3736.68	1229.94	3127.56	152.28	2389.60	1903.03
티로신	317.44	42.76	274.10	30.81	102.85	78.30
페닐알라닌	<10	183.91	<10	<10	329.16	250.91
리신	1862.48	722.74	2237.32	81.76	742.65	723.64
히스티딘	440.44	88.79	358.44	17.45	88.44	115.52
아르기닌	957.01	138.22	715.71	13.47	384.21	266.67
트립토판	339.70	16.52	361.95	<10	128.85	87.64
아스파라긴	208.50	19.91	257.70	<10	121.82	59.15
합계	13825	4404	12241	413.26	7266	5936

[0392]

표 7로부터, 본 발명의 유청 단백질 가수분해물의 유리 아미노산 함량은 총 단백질 함량의 4 중량% 내지 14 중량%임을 나타낸다. 대조적으로, 참조 가수분해물(샘플 13)의 유리 아미노산 함량은 총 단백질 함량의 약 0.4 중량%이다.

[0393]

또한, 표 7은 본 발명의 유청 단백질 가수분해물에서 유리 류신의 함량이 샘플 13에서의 유리 류신보다 훨씬 높다는 것을 보여준다. 본 발명의 유청 단백질 가수분해물에서 유리 류신의 함량은 총 단백질 함량의 1 내지 4 중량%이다. 이에 반해, 샘플 13의 유리 류신 함량은 전체 단백질 함량의 약 0.15 중량%이다.

[0394]

더 중요한 것은, 실시예 8 및 9에서 제안된 유리 페닐알라닌의 농도가 샘플 1, 3 및 13보다 샘플 2, 15 및 16에서 더 높다는 것이다. 표 8에는 총 아미노산 함량을 기준으로 한 유리 아미노산의 백분율이 도시되어 있다.

표 8

[0395]

총 아미노산 중 유리 아미노산(%)

	샘플 1	샘플 2	샘플 3	샘플 13	샘플 15	샘플 16
아스파르트산/아스파라긴	2.00	0.19	2.47	0.00	1.48	0.76
트레오닌	12.53	2.48	11.86	0.30	3.94	3.55
세린	8.57	1.24	8.09	0.36	3.74	2.59
글루타민/글루탐산	1.26	0.18	1.03	0.00	1.34	0.81
프롤린	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27	0.41
글리신	2.88	1.82	1.68	0.00	1.45	1.52
알라닌	12.30	3.52	8.26	0.59	6.37	4.72
시스틴	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
발린	20.18	8.27	14.31	0.00	12.59	10.93
메티오닌	46.79	20.98	45.44	0.00	22.17	15.96
이소류신	20.16	8.06	15.08	0.70	11.73	10.25
류신	35.75	11.77	29.93	1.55	22.86	18.07
티로신	11.84	1.60	10.23	1.31	3.84	2.97

페닐알라닌	0.00	6.61	0.00	1.36	11.83	9.04
리신	19.80	7.68	23.79	0.82	7.90	7.77
히스티딘	29.56	5.96	24.06	1.12	5.94	7.66
아르기닌	47.67	6.89	35.65	0.75	19.14	14.59
트립토판	20.39	0.99	21.73	0.00	7.73	4.76

[0396] 본 발명의 유청 단백질 가수분해물에서 총 류신 함량 중 유리 류신의 백분율이 기준 가수분해물(샘플 13)보다 훨씬 높다는 것이 특히 주목할 만하다.

[0397] 중요하게도, 표 8은 샘플 2, 15 및 16에서 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물에 대해 페닐알라닌의 6 내지 12%가 유리 페닐알라닌 형태임을 나타낸다. 샘플 1 및 3에서 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물의 경우, 페닐알라닌은 유리 형태로 발견되지 않았다.

[0398] **실시예 11: 본 발명의 유청 단백질 가수분해물의 미네랄 함량**

[0399] 샘플 15 및 16의 미네랄 함량을 측정하였다. 그 결과를 하기 표 9에 나타내었다.

표 9

미네랄 함량

샘플	K (%)	Na (%)	Ca (%)	Citrate (%)	Ash (%)	4% 단백질에서의 탁도(NTU)
15	2.13	1.75	0.07	0.66	7.5	31.18
16	2.45	1.6	0.09	0.65	7.2	58.68

[0401] 표 9는 유청 단백질 가수분해물의 무기질 함량의 예로서 샘플 15 및 16의 무기질 함량 및 탁도를 나타낸다. 표 9의 제품은 모두 22℃의 4% 단백질 용액에서 pH 7.8을 갖는다.

[0402] **실시예 12: 가수분해물의 비분해 BSA**

[0403] 본 발명의 유청 단백질 가수분해물(샘플 1, 2, 3, 4, 15 및 16)에서 미분해 소혈청알부민(BSA)의 양을 측정하였다

[0404] BSA의 함량은 SDS-PAGE와 제품 코드가 A2153인 Sigma Aldrich의 BSA 표준을 사용하여 추정되었다(도 9a). 20% 웰에 로딩된 BSA의 양은 10 µg의 순수 BSA에 해당한다. 도 9b에 도시된 SDS-PAGE 겔의 각 웰에 첨가된 단백질의 총량은 50 µg의 단백질에 상응하였다. 단백질 샘플을 10 mg/ml로 Laemmli 샘플 완충액 및 2-메르캅토에탄올과 혼합하여 최종 농도가 3% 단백질이 되도록 한 다음 겔에 로딩하기 전에 95℃에서 5분 동안 인큐베이션하였다.

[0405] 도 9a의 SDS-PAGE 겔은 도 9b의 유청 단백질 총량의 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1.25% 또는 0.63%를 나타내는 경우 BSA의 예상 강도를 나타내는 적정 시리즈이다. 다양한 농도의 표준 SDS-PAGE 겔을 도 9b에 표시된 SDS-PAGE 겔과 유청 단백질 가수분해물의 다른 샘플을 사용하여 왼쪽에서 오른쪽으로 비교하였다: 표준 분자량, 샘플 2, 샘플 1, 샘플 3, 샘플 4, 샘플 15 및 샘플 16.

[0406] 도 9a 및 9b로부터 도 9b의 밴드 강도가 도 9a에서 0.63% 및 1.25%에서의 샘플의 강도에 해당하므로 본 발명의 유청 단백질 가수분해물(도 9b)의 비분해 BSA는 0.5 내지 2중량% 범위에 있다는 결론을 내릴 수 있다. BSA는 본 발명에 따라 사용된 효소에 의한 단백질 분해에 내성이 있었다.

[0407] **실시예 13: 스포츠 영양을 위한 UHT 처리 음료**

[0408] 실시예 13은 스포츠 영양에 사용하기에 적합한 음료의 제조에서 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물의 용도의 예를 보여준다. 이 음료는 운동선수가 사용하거나 기타 스포츠 또는 운동 관련 응용 프로그램에서 사용하기 위한 것이다.

[0409] 샘플 16의 분말을 물에 재구성하고 설탕 및 향료를 첨가하여 음료를 제조하였다. 성분의 함량은 하기 표 10과 같다.

[0410] 표 10은 직접 및 간접 UHT 처리와 저온살균으로 더 이상의 탁도를 발생시키지 않고 열처리할 수 있는 불쾌한 쓴 맛이 없는 중성 맛 음료를 나타낸다.

표 10

스포츠 음료

성분	g/100 g
샘플 16의 분말	4.9
설탕	2
수크랄로스	0.006
파인애플 향	0.08
라임 향	0.17
물	92.9

[0412] 표 10의 스포츠 음료는 1) 직접 UHT, 2) 간접 UHT, 3) 저온살균을 실시하였다. 직접 UHT 처리는 6초 동안 143℃에서 주입하여 수행되었다. 간접 UHT 처리는 6초 동안 143℃에서 관형 열교환기에서 수행되었다. 저온살균은 6.5분 동안 90℃에서 수행되었다. 음료는 5℃에서 플라스크에 넣었다. 모든 용액의 pH는 22℃에서 약 7.7이었다. 본 발명의 유청 단백질 가수분해물의 4.9 g/100 g의 함량은 단백질 4.0중량%에 해당한다.

[0413] 도 8은 왼쪽에서 오른쪽으로 무처리 음료, 직접 UHT 처리 음료, 간접 UHT 처리 음료 및 저온 살균 음료를 나타낸 사진이다. 음료는 실온 상태이다. 도 8은 모든 샘플이 명확하고 투명했으며 병 뒤의 배경을 볼 수 있음을 보여준다.

[0414] 4가지 음료의 비탁 탁도를 측정하여 그 결과를 표 11에 나타내었다.

표 11

NTU로 측정한 음료의 탁도

	무처리	직접 UHT	간접 UHT	저온살균
1. 샘플	58.60	52.22	73.79	39.93
2. 샘플	59.22	54.41	71.76	39.88

[0416] 따라서, 표 11로부터 열처리된 샘플의 탁도는 모두 100 NTU 미만임을 알 수 있다. 따라서 열처리는 외관이 여전히 명확하거나 투명한 음료의 탁도에 영향을 미치지 않았다.

[0417] 이 음료는 쓴 것으로 인식되지 않았다.

[0418] 실시예 14: 임상/의료용 음료

[0419] 실시예 14는 의료 또는 임상 영양에 사용하기에 적합한 음료의 제조에 있어서 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물의 용도의 예이다. 임상 음료는 본 발명의 유청 단백질 가수분해물 외에 다량의 탄수화물을 포함한다.

[0420] 샘플 16의 분말을 물에 재구성하고 탄수화물 및 향료를 첨가하여 음료를 제조하였다. 성분의 함량은 하기 표 12와 같다.

[0421] 표 12는 불쾌한 쓴맛이 없는 의료용 중성 맛 음료를 나타낸다.

표 12

의료용 음료

성분	g/100 g
샘플 16의 분말	4.9
탄수화물	33.0
지방	5.0
설탕	2
수크랄로스	0.006
파인애플 향	0.08
라임 향	0.17
물	54.8

[0423] 실시예 15: 탄산 음료

[0424] 실시예 15는 탄산 음료의 제조에 있어서 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물의 용도의 예를 보여준다.

[0425] 샘플 16의 분말을 물에 재구성하고 설탕 및 향료를 첨가하여 음료를 제조하였다. 성분의 함량은 하기 표 13과 같다. 음료가 음료의 부피당 2.5 부피의 양으로 이산화탄소를 포함할 때까지 음료에 이산화탄소를 첨가함으로써 음료를 탄산화시켰다.

표 13

탄산 음료

성분	g/100 g
샘플 16의 분말	4.9
설탕	2
수크랄로스	0.006
파인애플 향	0.08
라임 향	0.17
물	92.9
이산화탄소 (부피/음료 부피)	2.5

[0427] 실시예 16: 탄산화 - 탄산화 양이 pH에 미치는 영향

[0428] 샘플 16을 물에 재현탁하여 8% 단백질 용액을 제조하였다. 용액을 5℃에서 강제 탄산화시켰다.

[0429] 더 많은 CO₂가 도입됨에 따라 시간이 지남에 따라 용액의 질량 증가 및 pH 값이 측정되었다. 용기의 평형 압력이 약 1 bar에 도달하면 더 이상 CO₂를 흡수할 수 없다(강제 탄산화 하에서 사용된 압력은 5℃에서 3 bar였다).

[0430] 도 10은 탄산 용액에 첨가된 CO₂의 양에 따라 표시되는 측정된 pH이다. 도 10은 샘플 16의 유청 단백질 가수분해물을 포함하는 용액이 용액의 부피당 0~4 부피의 CO₂ 함량으로 탄산화될 때 pH가 5.5 및 8.25 사이가 된다는 것을 보여준다. 무탄산 용액의 pH는 8.25로 탄산의 양이 증가할수록 pH가 감소하였다.

[0431] 도 10은 CO₂를 용액당 약 2.5부피(4.9 g/L)로 추가하면 5℃에서 pH가 8.25에서 약 6.0으로 떨어짐을 보여준다.

[0432] 도 10은 또한 pH가 약 5.5 내지 6.0의 최소값에 도달함을 보여준다. 따라서, 용액 부피당 2.5 부피를 초과하는 양으로 CO₂를 추가하면 pH가 약 5.5에서 6.0 미만으로 감소하지 않을 것이라고 결론지을 수 있다.

[0433] 용액 또는 음료의 pH 값에 대한 탄산화의 영향은 또한 용액/음료 부피당 2.5 부피 CO₂의 양으로 탄산화된 다음 용액/음료의 pH를 측정하여 분석하였다:

[0434] - 샘플 16을 물에 재현탁하여 제조한 4% 단백질 용액

[0435] - 샘플 16을 물에 재현탁하여 제조한 8% 단백질 용액

[0436] - 샘플 16을 8%를 포함하는 음료

[0437] 결과는 도 11에 도시된다.

표 14

8% 샘플 16을 포함하는 음료는 다음 성분을 포함한다

성분	g/100 g
샘플 16의 분말	9.8
설탕	2
수크랄로스	0.006
파인애플 향	0.08
라임 향	0.17

물	88
이산화탄소 (부피/음료 부피)	2.5

[0439] 도 11은 샘플 16의 4% 및 8% 용액과 샘플 16에서 제조된 음료가 용액 부피당 2.5 부피 CO₂의 CO₂ 함량으로 탄산 화될 때 약 6.0의 pH를 가짐을 보여준다.

[0440] **실시예 17: 탄산 용액의 열처리 분석**

[0441] 샘플 16의 8% 단백질 용액을 실시예 16에 개시된 바와 같이 부피 용액당 2.5 부피 CO₂로 탄산화시켰다.

[0442] 용액은 데이터 로깅 기능이 있는 밀폐된 용기에서 95℃의 온도로 가열되었다. 온도, pH 및 탁도는 가열 시간에 따라 측정되었으며 그 결과는 도 12에 도시되어 있다.

[0443] 도 12에 도시된 바와 같이, 탄산 생성물은 측정된 탁도 및 육안 검사에 의해 지시된 바와 같이 가열 및 95℃에서 5분 후에도 투명하게 유지되었다. 가열을 통해 pH는 6.2로 유지되었다. 이러한 데이터는 탄산 제품이 저온살균 및 고압멸균과 같은 처리에 적합할 수 있음을 나타내며, 본질적으로 최대 120℃의 온도에서 장기간, 예를 들어 20분 동안 처리한다.

[0444] **실시예 18: 단백질 바**

[0445] 실시예 17은 단백질 바의 제조에 있어서 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물의 용도의 예를 보여준다.

[0446] 표 14는 본 발명의 유청 단백질 가수분해물(분말)의 함량이 5 g/100 g인 단백질 바의 예이다.

표 15

단백질 바

	g/100 g
가수분해물	5
우유 단백질	37
글리세롤	4.9
설탕	39.5
지방	6
향료	1.75

[0448] 표 16에는 단백질 바의 다른 예가 나와 있지만 이 예는 유청 단백질 가수분해물(분말) 함량이 13 g/100 g이다.

표 16

단백질 바

	g/100 g
가수분해물	13
우유 단백질	24
글리세롤	4.9
설탕	39.5
지방	6
향료	1.75

[0450] **실시예 19: DPPH 분석을 이용한 항산화 활성 분석**

[0451] 본 발명의 유청 단백질 가수분해물의 항산화 효과는 라디칼 소거법인 DPPH 분석을 이용하여 분석하였다. 이 분석법은 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-hydrate)를 사용하여 항산화 효과를 측정하는데, 이는 DPPH의 색상이 항산화 펩타이드와 반응하면 보라색에서 노란색으로 변하기 때문이다.

[0452] DPPH를 0.2 mM 농도로 메탄올에 용해시켰다. 본 발명의 유청 단백질 가수분해물(샘플 16)을 MilliQ 물에 다양한 단백질 함량(0, 0.8, 1.5, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0 및 6.0% 단백질)으로 분산시키고 동일한 부피(비율 1:1)로 DPPH

와 혼합하였다. 혼합물을 22℃에서 2시간 동안 인큐베이션하여 항산화 활성의 결과로 황색이 발현되도록 하였다. 525 nm에서 흡광도를 측정하고 소거율을 $100 \times (A_0 - A_s) / A_0$ 로 계산하였다. 여기서 A_0 는 샘플이 없을 때의 흡광도이고 A_s 는 샘플이 있을 때의 흡광도이다.

[0453] 표 17은 본 발명의 유청 단백질 가수분해물의 다양한 농도에 대한 소거율을 나타낸다(샘플 16).

표 17

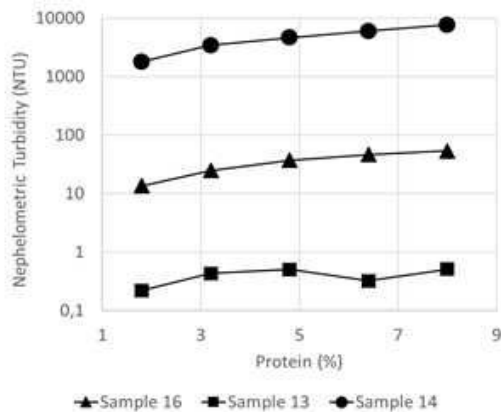
[0454]

샘플 16 (% 단백질)	소거율 (%)
0	0
0.8	48 ± 2
1.5	57 ± 3
2.5	67 ± 1
3	72 ± 1
4	75 ± 2
5	77 ± 2
6	78 ± 0

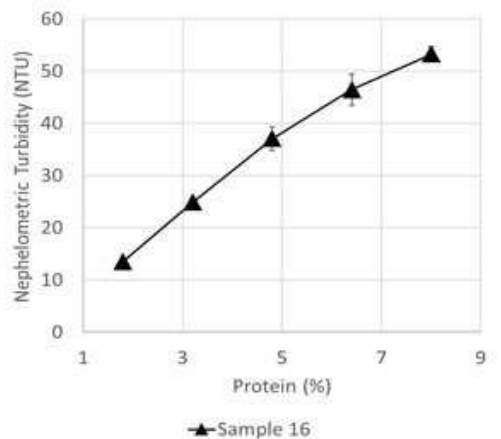
[0455] 표 17로부터, 샘플 16의 유청 단백질 가수분해물은 0.8 내지 6% 단백질 농도에서 DPPH 분석에 포함될 때 항산화 활성이 있음을 나타낸다. 표 16에 나타난 바와 같이 단백질의 농도가 증가할수록 항산화 활성이 증가하였다.

도면

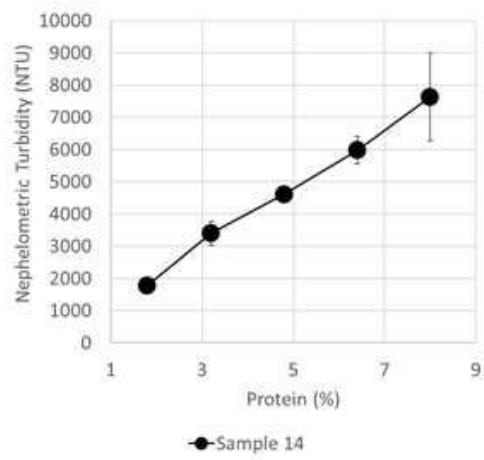
도면1a



도면1b



도면1c



도면2a



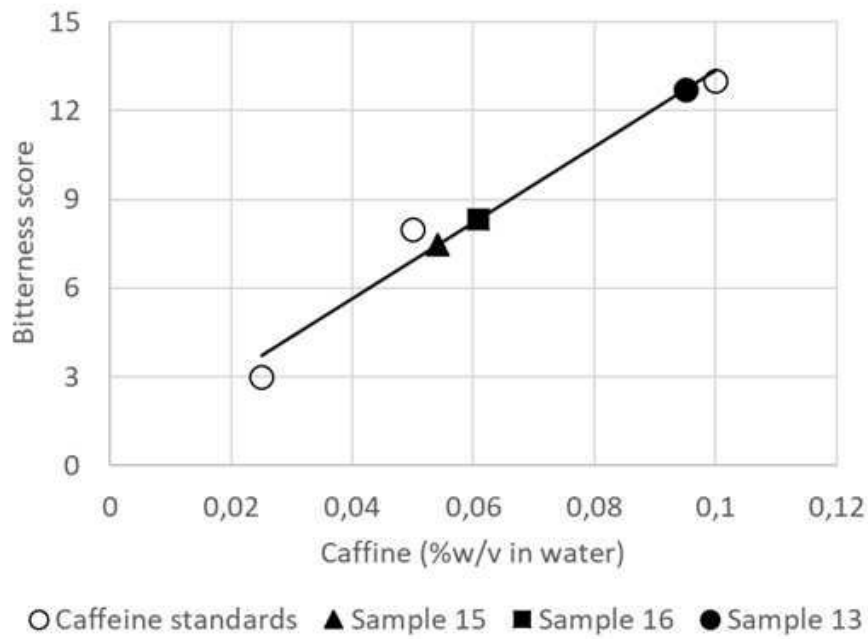
도면2b



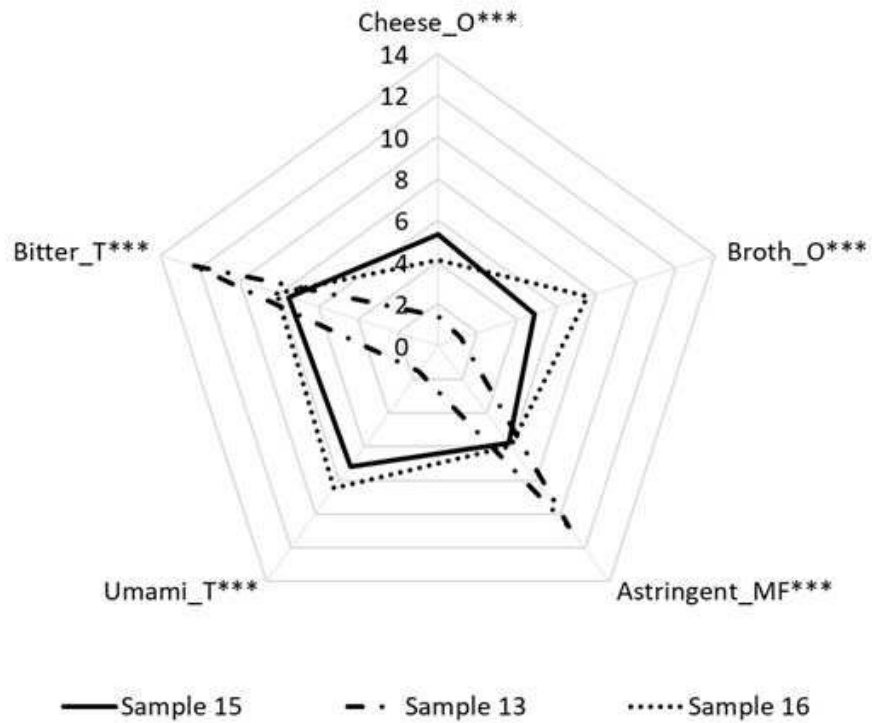
도면2c



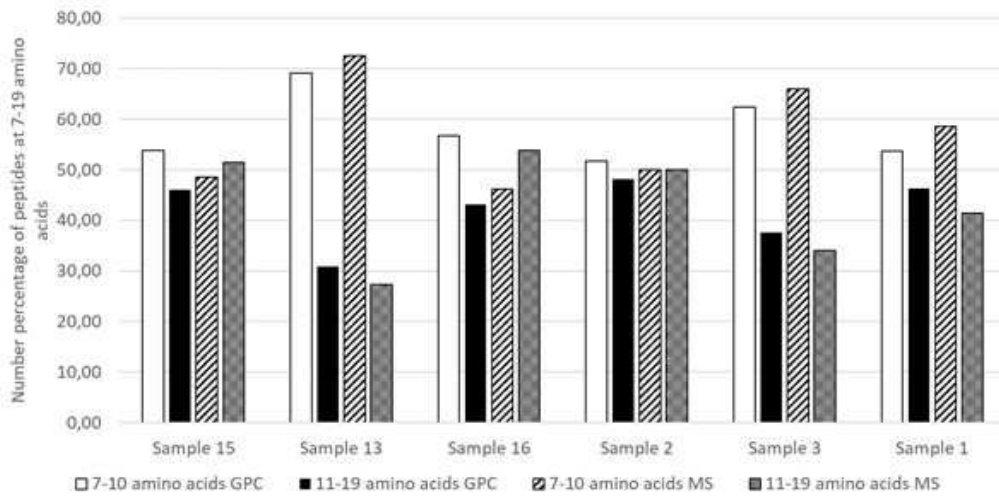
도면3



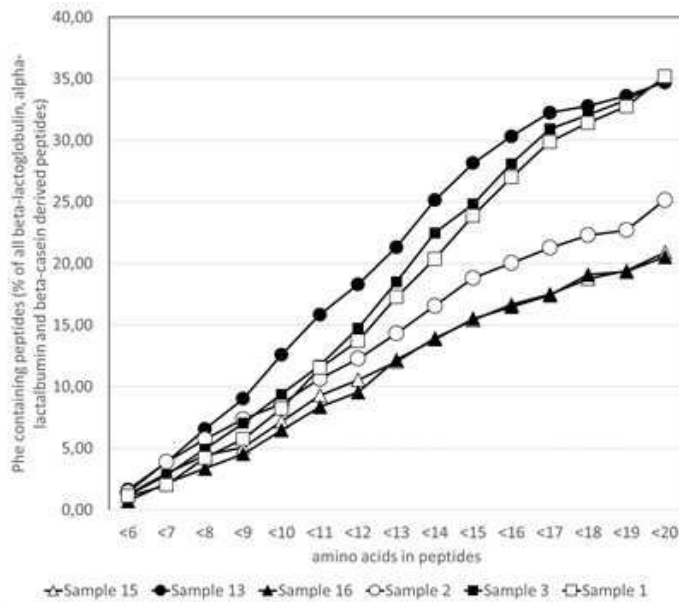
도면4



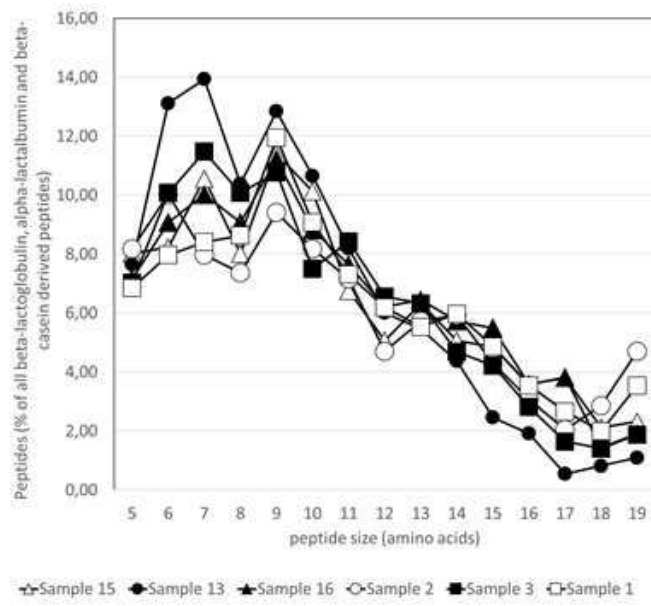
도면5



도면6



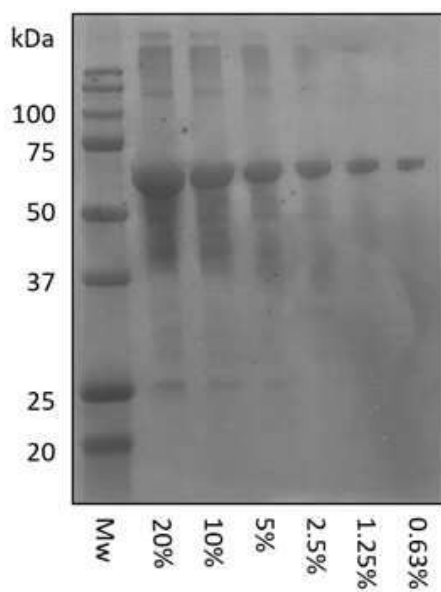
도면7



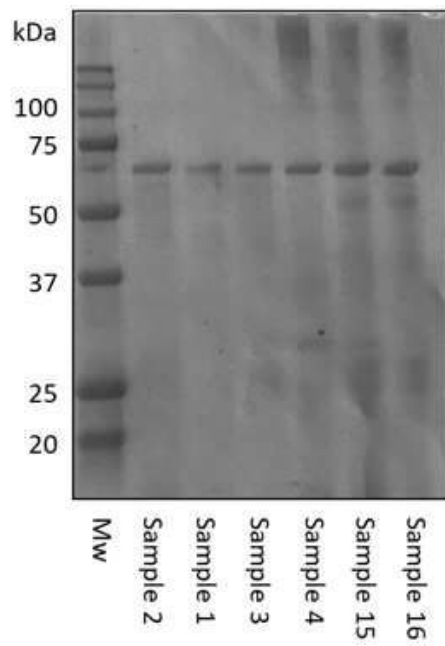
도면8



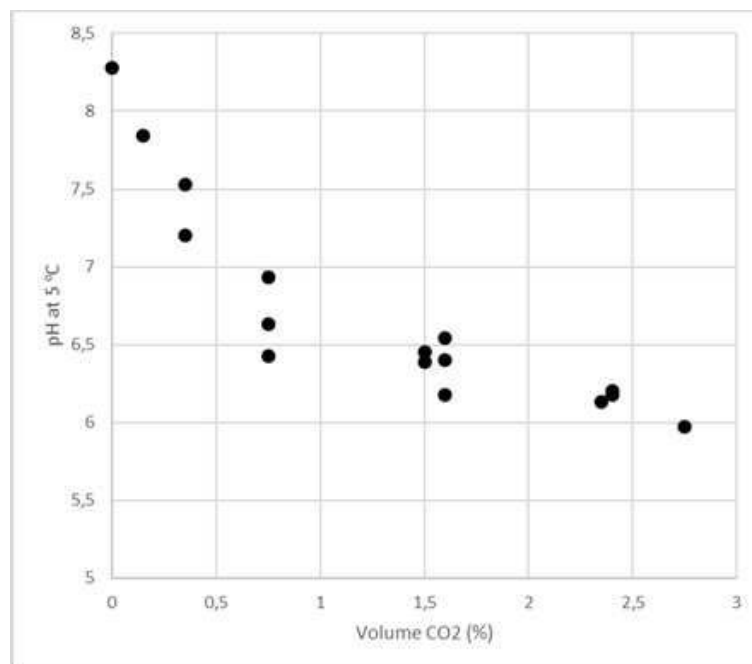
도면9a



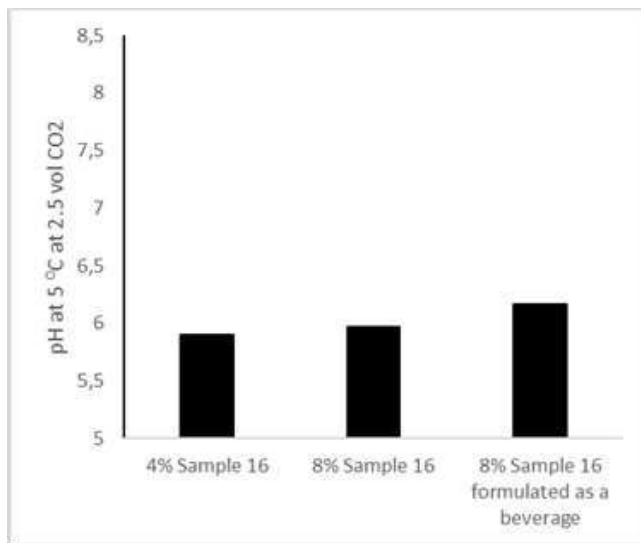
도면9b



도면10



도면11



도면12

