(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월12일
(11) 등록번호 10-2693582
(24) 등록일자 2024년08월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23J 3/34 (2006.01) *A23J 1/20* (2006.01)
A23J 3/08 (2006.01) *A23L 33/18* (2016.01)
C07K 1/12 (2006.01) *C12P 21/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23J 3/34 (2013.01)
A23J 1/205 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0119992
(22) 출원일자 2023년09월08일
심사청구일자 2023년09월08일
(56) 선행기술조사문헌
CN107404922 B*
CN113142381 A
WO2022184772 A1
Prev. Nutr. Food Sci. 2020, 25(1), 71-77.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
(주)네오크레마
서울특별시 강남구 도산대로89길 7, 2층 (청담동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
한기수
서울특별시 송파구 중대로 211
김나리
서울특별시 송파구 중대로 211
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
공병옥

전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 하혜경

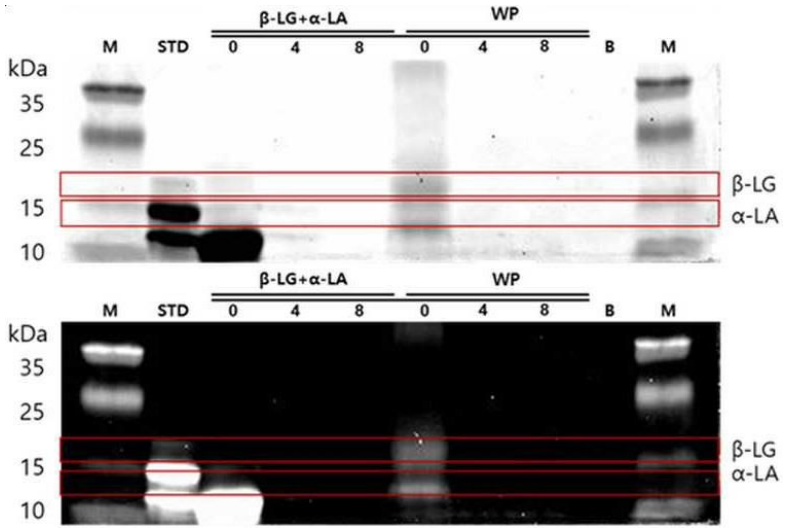
(54) 발명의 명칭 **저알레르기성 유청단백 가수분해물 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 유청단백질을 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease), 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease) 또는 이들의 조합으로 가수분해한 것인, 저알레르기성 유청단백 가수분해물 및 이의 제조방법을 제공한다.

본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물을 이용하는 경우, 영양적 가치가 높은 유청단백질을 우유 알레르기의 위험 없이 섭취할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A23J 3/08 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
C07K 1/12 (2013.01)
C12P 21/06 (2013.01)

(72) 발명자
조민호
서울특별시 송파구 중대로 211
서민근
서울특별시 송파구 중대로 211
서형주
서울특별시 양천구 목동서로 70 목동신시가지아파트2단지 233동 504호
이세경
서울특별시 성동구 독서당로62길 43, 8동 406호 (응봉동, 대림아파트)
장역부
서울특별시 광진구 아차산로 637 워커힐아파트 22동 102호
김현경
서울특별시 종로구 난계로29길 33-4, 202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545026767
과제번호	322011042SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	고부가가치식품기술개발
연구과제명	우유 유래 기능성 펩타이드의 대량생산 기술 확립 및 활용제품 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)네오크레마
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

다음의 단계를 포함하는 저알레르기성 유청단백 가수분해물의 제조방법으로서, 상기 유청단백 가수분해물의 아미노-질소(Amino-nitrogen, A-N) 함량은 40 mg/mL 내지 75 mg/mL인 것인, 제조방법:

(a) 유청단백질과 물을 혼합하여 5%(w/v) 내지 20%(w/v)의 유청단백 현탁액을 준비하는 단계; 및

(b) 상기 유청단백 현탁액에 알칼레이스 및 프로자임의 혼합물을 상기 유청단백 현탁액의 0.5%(w/v) 내지 2%(w/v)로 투입하여 가수분해를 수행하는 단계,

상기 알칼레이스(Alcalase) 및 프로자임(Prozyme)은 1:0.2 내지 1:5의 중량비로 혼합된 것이고,

상기 가수분해는 pH 6.0 내지 pH 9.0의 조건에서 7 시간 내지 15 시간 동안 수행되는 것이며,

상기 가수분해를 통하여 유청단백질 내 α-락트알부민 및 β-락토글로불린이 분해되는 것임.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제8항에 있어서, 상기 (b) 단계의 가수분해는 30℃ 내지 70℃의 온도 조건에서 수행되는 것인, 저알레르기성 유청단백 가수분해물의 제조방법.

청구항 15

제8항 또는 제14항의 제조방법으로 제조되는 저알레르기성 유청단백 가수분해물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 저알레르기성 유청단백 가수분해물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 우유 알레르기는 우유 내 존재하는 알레르기항원(allergen)에 대하여 몸의 면역체계가 비정상적으로 반응하여 나타난다. 우유 알레르기는 특히 영유아에게 비교적 흔하게 발생한다. 우유 알레르기의 증상으로는 복통, 설사, 구토, 복부 팽만감, 두드러기, 습진, 발진, 기침, 코막힘 등이 있으며, 심각한 경우에는 아나필락시스도 나타날 수 있다.

[0004] 우유에 존재하는 가장 대표적인 알레르기항원은 카세인(casein)이다. 카세인은 우유에 존재하는 인단백질로, 치즈 제조과정에 쓰이며, 우유 단백질의 총 80% 정도를 차지한다.

[0005] 한편, 유청단백질(whey protein, WP)에도 우유 알레르기항원이 존재하는 것으로 알려져 있다. 유청(whey)은 우유를 치즈로 가공할 때 형성되는 부산물로, 우유에서 고형분인 지방과 카세인을 제외한 후에 잔류하는 용액을 의미한다. 유청은 단백질, 유당, 미네랄, 비타민 등을 포함하며, 유청에 포함되는 단백질을 총칭하여 유청단백질이라고 한다. 유청단백질 중 β-락토글로불린(beta-lactoglobulin, βLG) 및 α-락트알부민(alpha-lactalbumin, αLA)은 상술한 카세인과 함께 우유 알레르기항원으로 작용하여 우유 알레르기를 일으킨다. 우유 알레르기가 있는 환자의 대부분은 카세인, β-락토글로불린 및 α-락트알부민 중 적어도 2개 이상의 알레르기항원에 특이적인 면역글로불린 E(Immunoglobulin E, IgE) 항체를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 특히, 우유 단백질 중 7% 내지 12%를 차지하는β-락토글로불린은, 우유 단백질 중 80%를 차지하는 카세인에 비하여 함량이 매우 적음에도 불구하고, 위에서 소화되는 동안 강한 저항성을 나타내어 장내로 투과되면서 우유 알레르기를 유도하는 것으로 알려져 있다.

[0006] 유청단백질은 동물성 단백질로서 필수 아미노산의 공급원이 되며, 면역력 강화, 근육의 형성 및 회복 촉진과 같은 우수한 생리적 활성을 가지고 있어 다양한 식품에 활용되고 있다. 따라서, 영양학적 가치가 높은 유청단백질을 알레르기의 위험 없이 안전하게 섭취하기 위하여 유청단백질 내 존재하는 알레르기항원의 항원성을 감소시킬 필요성이 대두되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) JP 4769949 B2

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 우유 알레르기항원인 α-락트알부민 및 β-락토글로불린의 항원성이 감소되고, 소화가 잘 되는 저알레르기성 유청단백 가수분해물(hypoallergic whey protein hydrolysate)을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, α-락트알부민 및 β-락토글로불린을 분해하기 위한 최적의 가수분해 조건을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 유청단백질을 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease), 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease) 또는 이들의 조합으로 가수분해한 것인, 저알레르기성 유청단백 가수분해물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 유청단백질과 물을 혼합하여 5%(w/v) 내지 20%(w/v)의 유청단백 현탁액을 준비하는 단계; 및 상기 유청단백 현탁액에 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease), 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease) 또는 이들의 조합을 상기 유청단백 현탁액의 0.5%(w/v) 내지 2%(w/v)로 투입하여 가수분해를 수행하는 단계를 포함하는 저알레르기성 유청단백 가수분해물 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 유청단백질을 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease), 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease) 또는 이들의 조합으로 가수분해한 것인, 저알레르기성 유청단백 가수분해물을 제공한다.

[0014] 본 발명자들은 우유 알레르기항원인 α-락트알부민 및 β-락토글로불린의 항원성이 감소되고, 소화가 잘 되는 저알레르기성 유청단백 가수분해물(hypoallergic whey protein hydrolysate)을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, α-락트알부민 및 β-락토글로불린을 분해하기 위한 최적의 가수분해 조건을 규명하였고, 상기 조건에 따라 제조된 저알레르기성 유청단백 가수분해물은 우유 알레르기 반응을 감소시키고, 소화율이 높음을 입증하였다.

[0015] 본 명세서에서, 용어 "우유 알레르기"는 우유 내 존재하는 알레르기항원(allergen)에 대하여 몸의 면역체계가 비정상적으로 반응하는 것을 의미한다. 우유 알레르기를 일으키는 가장 대표적인 알레르기항원은 카세인이며, 유청단백질 내 우유 알레르기항원에는 대표적으로 α-락트알부민(alpha-lactalbumin, α-lactalbumin) 및 β-락토글로불린(beta-lactoglobulin, β-lactoglobulin)이 있다.

[0016] α-락트알부민은 유청단백질에 포함되는 단백질로서, 유당 합성 효소(lactoses synthase)에 결합하여 우유의 주요 탄수화물인 유당의 합성을 돕는다. α-락트알부민은 123 개의 아미노산으로 구성되고, 구형을 띄며, 4 개의 이황화 결합이 존재하여 열 변성에 저항성을 나타낸다.

[0017] β-락토글로불린(beta-lactoglobulin, β-lactoglobulin)은 유청단백질에 포함되는 단백질로서, 162 개의 아미노산으로 구성된 구형 단백질이다. β-락토글로불린 역시 이황화 결합에 의해 열 변성에 저항성을 나타낸다. 뿐만 아니라, β-락토글로불린은 1 개의 싸이올(-SH)기를 포함하여 산에도 매우 안정하여, 위에서 소화되는 동안 강한 저항성을 나타내어 장내로 투과되면서 우유 알레르기를 유도한다. β-락토글로불린은 사람의 모유에는 거의 존재하지 않으나, 우유 단백질 중 7% 내지 12%를 차지한다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 유청단백질은 치즈 유청으로부터 유래된 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 유청단백질은 일반유청분말(Normal whey powder), 탈염유청분말(Demineralized whey powder), 유청단백 농축물(Whey protein concentrate) 또는 유청단백 분리물(Whey protein isolate)일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease)는 알칼레이스(Alcalase), 프로타맥스(Protamex), 또는 이들의 혼합효소일 수 있다.

[0021] 보다 구체적으로, 본 발명의 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease)는 알칼레이스(Alcalase)일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease)는 플라보자임(Flavourzyme), 프로자임(Prozyme) 또는 이들의 혼합효소일 수 있다.

[0023] 보다 구체적으로, 본 발명의 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease)는 프로자임(Prozyme)일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease) 및 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease)의 조합은 알칼레이스(Alcalase) 및 프로자임(Prozyme)의 혼합물일 수 있다.

[0025] 후술될 실시예에서 입증한 바와 같이, 본 발명자들은 알칼레이스(Alcalase) 및 프로자임(Prozyme)의 혼합물을 사용하여 유청단백질을 가수분해하는 경우, 우유 알레르기항원인 α-락트알부민 및 β-락토글로불린이 모두 분해되어 유청단백 가수분해물의 알레르기항원성을 성공적으로 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

[0026] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease) 및 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease)의 조합은 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease) 및 아스퍼질러스 오리자에(Aspergillus oryzae) 유래 엑소프로테이스(exoprotease)가 1:0.2 내지 1:5의 중량비로 혼합된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease) 및 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease)는 1:0.2 내지 1:5, 1:0.2 내지 1:4, 1:0.2 내지 1:3, 1:0.2 내지 1:2, 1:0.2 내지 1:1.5, 1:0.2 내지 1:1, 1:0.25 내지 1:5, 1:0.25 내지 1:4, 1:0.25 내지 1:3, 1:0.25 내지 1:2, 1:0.25 내지 1:1.5, 1:0.25 내지 1:1, 1:0.3 내지 1:5, 1:0.3 내지 1:4, 1:0.3 내지 1:3, 1:0.3 내지 1:2, 1:0.3 내지 1:1.5, 1:0.3 내지 1:1, 1:0.5 내지 1:5, 1:0.5 내지 1:4, 1:0.5 내지 1:3, 1:0.5 내지 1:2, 1:0.5 내지 1:1.5, 1:0.5 내지 1:1, 1:0.6 내지 1:5, 1:0.6 내지 1:4, 1:0.6 내지 1:3, 1:0.6 내지 1:2, 1:0.6 내지 1:1.5, 또는 1:0.6 내지 1:1, 더욱 구체적으로는 1:1 또는 1:3의 중량비로 혼합된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 후술될 실시예에서 입증한 바와 같이, 본 발명자들은 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease)인 알칼레이스(Alcalase) 및 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease)가 1:1 또는 1:3의 중량비로 혼합되는 경우에 유청단백 가수분해물의 아미노-질소(Amino-nitrogen, A-N) 함량과 가수분해도(Degree of Hydrolysis, DH)가 다른 중량비로 혼합되는 경우보다 유의적으로 높음을 확인하였다.

[0028] 본 명세서에서, 용어 "아미노-질소(Amino-nitrogen, A-N) 함량"은 유청단백질 또는 유청단백 가수분해물에 존재하는 유리 아미노산의 양을 측정한 수치를 의미한다. 유리 아미노산은 추가 소화가 필요하지 않으므로, 단백질 합성, 조직 복구와 같은 다양한 대사 과정에 빠르게 활용될 수 있다. 따라서, 유청단백질 또는 유청단백 가수분해물 내 아미노-질소 함량이 높을수록 섭취 시 소화 및 흡수가 효율적으로 이루어지고, 유리 아미노산을 이용한 대사가 활발하게 이루어질 수 있음을 의미한다.

[0029] 본 명세서에서, 용어 "가수분해도(Degree of Hydrolysis, DH)"는 가수분해를 통하여 유청단백질이 더 작은 펩타이드 또는 아미노산으로 분해된 정도를 나타낸다. 가수분해도는 가수분해 방법, 시간, 가수분해에 사용되는 효소에 따라 달라질 수 있다. 가수분해도는 유청단백질의 용해도, 소화율, 기능적 특성에 영향을 미친다. 일반적으로 가수분해도가 높을수록 가수분해되지 않은 유청단백질보다 용해도가 높고 소화가 더 빠르다.

[0030] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 유청단백 가수분해물의 아미노-질소(Amino-nitrogen, A-N) 함량은 40 mg/mL 내지 75 mg/mL인 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 유청단백 가수분해물의 아미노-질소(Amino-nitrogen, A-N) 함량은 40 mg/mL 내지 75 mg/mL, 40 mg/mL 내지 75 mg/mL, 40 mg/mL 내지 65 mg/mL, 40 mg/mL 내지 62.5 mg/mL, 40 mg/mL 내지 60 mg/mL, 40 mg/mL 내지 57.5 mg/mL, 40 mg/mL 내지 55 mg/mL, 40 mg/mL 내지 52.5 mg/mL, 40 mg/mL 내지 50 mg/mL, 45 mg/mL 내지 75 mg/mL, 45 mg/mL 내지 65 mg/mL, 45 mg/mL 내지 62.5 mg/mL, 45 mg/mL 내지 60 mg/mL, 45 mg/mL 내지 57.5 mg/mL, 45 mg/mL 내지 55 mg/mL, 45 mg/mL 내지 52.5 mg/mL, 45 mg/mL 내지 50 mg/mL, 48 mg/mL 내지 75 mg/mL, 48 mg/mL 내지 65 mg/mL, 48 mg/mL 내지 62.5 mg/mL, 48 mg/mL 내지 60 mg/mL, 48 mg/mL 내지 57.5 mg/mL, 48 mg/mL 내지 55 mg/mL, 48 mg/mL 내지 52.5 mg/mL, 48 mg/mL 내지 50 mg/mL, 50 mg/mL 내지 75 mg/mL, 50 mg/mL 내지 65 mg/mL, 50 mg/mL 내지 62.5 mg/mL, 50 mg/mL 내지 60 mg/mL, 50 mg/mL 내지 57.5 mg/mL, 50 mg/mL 내지 55 mg/mL, 50 mg/mL 내지 52.5 mg/mL, 52.5 mg/mL 내지 75 mg/mL, 52.5 mg/mL 내지 65 mg/mL, 52.5 mg/mL 내지 62.5 mg/mL, 52.5 mg/mL 내지 60 mg/mL, 52.5 mg/mL 내지 57.5 mg/mL, 52.5 mg/mL 내지 55 mg/mL, 55 mg/mL 내지 75 mg/mL, 55 mg/mL 내지 65 mg/mL, 55 mg/mL 내지 62.5 mg/mL, 55 mg/mL 내지 60 mg/mL, 55 mg/mL 내지 57.5 mg/mL, 57.5 mg/mL 내지 75 mg/mL, 57.5 mg/mL 내지 65 mg/mL, 57.5 mg/mL 내지 62.5 mg/mL, 57.5 mg/mL 내지 60 mg/mL, 60 mg/mL 내

지 75 mg/mL, 60 mg/mL 내지 65 mg/mL, 60 mg/mL 내지 62.5 mg/mL, 62.5 mg/mL 내지 75 mg/mL, 62.5 mg/mL 내지 65 mg/mL, 또는 65 mg/mL 내지 75 mg/mL일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물 내 유리 아미노산은 총 아미노산 대비 35 mole% 내지 45 mole%로 존재할 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물 내 유리 아미노산은 총 아미노산 대비 35 mole% 내지 45 mole%, 35 mole% 내지 43 mole%, 35 mole% 내지 42 mole%, 35 mole% 내지 41 mole%, 40 mole% 내지 45 mole%, 40 mole% 내지 43 mole%, 40 mole% 내지 42 mole%, 40 mole% 내지 41 mole%, 41 mole% 내지 45 mole%, 41 mole% 내지 43 mole%, 41 mole% 내지 42 mole%, 42 mole% 내지 45 mole%, 또는 42 mole% 내지 43 mole%로 존재할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물 내 유리 류신(leucine)은 총 유리 아미노산 대비 14 mole% 내지 20 mole%로 존재할 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물 내 유리 류신(leucine)은 총 유리 아미노산 대비 14 mole% 내지 20 mole%, 14 mole% 내지 18 mole%, 14 mole% 내지 17 mole%, 16 mole% 내지 20 mole%, 16 mole% 내지 18 mole%, 16 mole% 내지 17 mole%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물 내 유리 분지사슬 아미노산(branched chain amino acid, BCAA)은 총 유리 아미노산 대비 35 mole% 내지 45 mole%로 존재할 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물 내 유리 분지사슬 아미노산(branched chain amino acid, BCAA)은 총 유리 아미노산 대비 35 mole% 내지 45 mole%, 35 mole% 내지 42 mole%, 35 mole% 내지 41 mole%, 35 mole% 내지 40 mole%, 37 mole% 내지 45 mole%, 37 mole% 내지 42 mole%, 37 mole% 내지 41 mole%, 37 mole% 내지 40 mole%, 39 mole% 내지 45 mole%, 39 mole% 내지 42 mole%, 39 mole% 내지 41 mole%, 또는 39 mole% 내지 40 mole%로 존재할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 본 명세서에서, 용어 “분지사슬 아미노산(branched chain amino acid, BCAA)”은 필수 아미노산에 포함되는 3종의 아미노산, 즉 발린(Val, valine), 류신(Leu, leucin), 이소류신(Ile, isoleucine)을 의미한다. 발린, 류신, 이소류신은 분지사슬 구조를 갖는 아미노산으로 인간의 체내에서 합성되지 않는 필수 아미노산이다. 다른 아미노산이 주로 간에서 대사되는 것과는 달리, BCAA는 근육에서 대사되어 근육의 에너지원이 되며, 이에 따라 근육 보충제, 영양 보충제나 음료에의 응용이 활발하게 진행되고 있다.

[0035] 후술될 실시예에서 입증한 바와 같이, 본 발명자들은 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물의 주된 유리 아미노산이 류신임을 확인하였고, 그 외에 발린 및 이소류신의 함량도 풍부함을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물은 근육 성장용, 근육통 완화용, 운동 피로 감소용, 근육 손실 방지용 조성물에도 유용하게 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 유청단백 가수분해물 내 α-락트알부민 및 β-락토글로불린은 상술한 가수분해에 의하여 분해된 것일 수 있다.

[0037] 상술한 바와 같이, 본 발명자들은 본 발명의 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease) 및 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease)의 조합, 특히 알칼레이스(Alcalase) 및 프로자임(Prozyme)의 혼합물을 사용하여 유청단백질을 가수분해하는 경우, 우유 알레르기항원인 α-락트알부민 및 β-락토글로불린이 모두 분해되어 유청단백 가수분해물의 알레르기항원성을 성공적으로 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

[0038] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물은 우유 알레르기 반응을 감소시키는 것이다.

[0039] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물은 면역글로불린 E(Immunoglobulin E, IgE)의 생성을 억제하여 알레르기 반응을 감소시키는 것일 수 있다.

[0040] 면역글로불린(Immunoglobulin E, IgE)는 항체 단백질의 하나로서, 알레르기항원(allergen)에 반응하여 면역 체계에서 생성되는 항체이다. 알레르기항원(allergen)에 노출되는 경우, B 세포가 해당 알레르기항원에 특이적인 IgE 항체를 생성하며, IgE 항체 알레르기 반응에 관여하는 면역 세포인 비만 세포(mast cell)와 호염기구(basophil) 표면의 수용체에 결합하여, 히스타민, 류코트리엔(leukotriene), 사이토카인과 같은 알레르기 매개 물질을 방출시킨다. 이러한 알레르기 매개 물질은 연쇄적으로 영향을 미쳐 알레르기 반응의 특징적인 증상을 유발한다.

[0041] 후술될 실시예에서 입증한 바와 같이, 본 발명자들은 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)을 경구투여하는 경우, 가수분해를 거치지 않은 유청단백질(WP)을 경구투여하는 경우보다 IgE의 생성이 유의하게 감소함을 확인하였고, 이로써 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)은 우유 알레르기 반응을 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0042] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물은 Th1 세포(T helper cell 1)에 의한 면역반응을 유도하고, Th2 세포(T helper cell 2)에 의한 면역반응을 감소시켜 우유 알레르기 반응을 감소시키는 것일 수 있다.

[0043] 도움 T세포(T helper cell, T_H cell) 세포는 T세포 사이토카인을 분비하여 면역 반응에서 중심적인 역할을 한다. 도움 T세포는 Th1, Th2, Th17 및 Tfh(T follicular helper)와 같은 다양한 작동 T 세포(effector T cell)로 분화될 수 있으며, 각 작동 T 세포 마다 고유한 사이토카인 프로파일을 나타낸다. Th1 세포는 전형적으로 세포매개면역과 관련되며, 활성화 시 IFN(interferon)-γ, TNF(tumor necrosis factor)-β, IL(interleukin)-2 등의 사이토카인을 생성하고, IgG2a 항체를 합성하도록 한다. 반면, Th2 세포는 일반적으로 체액성 면역에 관여하며, 활성화 시 IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 및 IL-13 등의 사이토카인을 생성하고, IgG1 및 IgE을 합성하도록 한다. Th1 세포에서 분비되는 IFN-γ 및 IgG2a 항체는 Th2 세포에서 분비되는 IL-4 및 IgG1 항체와 길항 작용을 한다. Th1 세포의 면역 반응 및 Th2 세포의 면역 반응 간 항상성 유지에 이상이 생기면 다양한 면역병리학적 이상이 유발된다. Th2 세포의 면역 반응이 상대적으로 지배적일 때 박테리아 및 바이러스와 같은 미생물 감염, 알레르기 발달 등이 촉진되며, Th1 세포의 면역 반응이 지배적인 경우 대부분의 자가 면역 질환이 촉진될 수 있다.

[0044] 후술될 실시예에서 입증한 바와 같이, IFN-γ/IL-4 값 및 IgG2a/IgG1 값은 유청단백질 (WP) 투여군보다 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)에서 더 높았으며, 이는 Th2 세포의 면역 반응보다 Th1 세포의 면역 반응이 상대적으로 자극되어 Th2 세포의 면역 반응에 의해 유발된 알레르기 반응이 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)에서 감소됨을 나타낸다.

[0045] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물은 가수분해를 거치지 않은 유청단백질에 비하여 소화율 및 장투과율이 우수한 것일 수 있다.

[0046] 후술될 실시예에서 입증한 바와 같이, 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물은Caco-2 세포를 이용한 시험관내(*in vitro*) 실험과 SD 쥐를 이용한 생체내(*in vivo*)실험에서 유청단백질보다 우수한 소화율과 장투과율을 보였다.

[0048] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공한다.

[0049] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물은 우유 알레르기항원성이 저감된 식품 조성물일 수 있다.

[0050] 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물은 우유 알레르기항원인 α-락트알부민 및 β-락토글로불린이 모두 분해되어 알레르기항원성이 감소되었으므로, 이를 포함하는 식품 조성물을 섭취하는 경우 우유알레르기의 발생이 예방 또는 개선되어 영양적 가치가 높은 유청단백질을 우유 알레르기의 위험 없이 안전하게 섭취할 수 있다.

[0051] 본 발명의 식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등의 형태로 제조될 수 있다. 예컨대 캔디류의 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 또는 건강보조 식품류 등이 있다.

[0052] 본 발명의 식품조성물은 식품, 기능성 식품 (functional food), 영양보조제 (nutritional supplement), 건강식품 (health food) 및 식품 첨가제 (food additives) 등의 모든 천연소재의 가공 형태를 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조될 수 있다. 예를 들면, 건강식품으로는 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 식품으로는 음료 (알코올성 음료 포함), 과실 및 그의 가공식품 (예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품 (예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류 (예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품 (예: 요거트, 발효유, 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료 (예: 된장, 간장, 소스 등) 등 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물을 첨가하여 제조될 수 있다. 또한, 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수

있다.

[0053] 본 발명의 식품 조성물은 장기 복용할 수 있다.

[0054] 본 발명의 식품 조성물의 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 유청 가수분해물은, 식품 또는 음료의 제조 시에 식품 또는 음료의 원료 100 중량%에 대하여 0.1 내지 70 중량%, 바람직하게는 2 내지 50 중량%로 첨가될 수 있다. 상기 본 발명의 펩타이드의 유효용량은 약제학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0055] 본 발명의 식품 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수있다. 예컨대 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명의 식품 조성물의 경우, 상술한 본 발명의 일 양태인 저알레르기성 유청단백 가수분해물을 유효성분으로 포함한다. 따라서 양 발명 간에 중복되는 내용에 대해서는 공통적으로 적용되며, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0058] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 저알레르기성 유청단백 가수분해물의 제조방법을 제공한다:

[0059] (a) 유청단백질과 물을 혼합하여 5%(w/v) 내지 20%(w/v)의 유청단백 현탁액을 준비하는 단계; 및

[0060] (b) 상기 유청단백 현탁액에 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease), 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae* 유래 엑소프로테이스(exoprotease) 또는 이들의 조합을 상기 유청단백 현탁액의 0.5%(w/v) 내지 2%(w/v)로 투입하여 가수분해를 수행하는 단계.

[0061] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 (a) 단계의 유청단백 현탁액의 농도는 5%(w/v) 내지 20%(w/v)일 수 있고, 더욱 구체적으로는 5%(w/v) 내지 20%(w/v), 5%(w/v) 내지 15%(w/v), 5%(w/v) 내지 12%(w/v), 5%(w/v) 내지 10%(w/v), 7%(w/v) 내지 20%(w/v), 7%(w/v) 내지 15%(w/v), 7%(w/v) 내지 12%(w/v), 7%(w/v) 내지 10%(w/v), 10%(w/v) 내지 20%(w/v), 10%(w/v) 내지 15%(w/v) 또는 10%(w/v) 내지 12%(w/v)일 수 있으며, 가장 구체적으로는 10%(w/v)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0062] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 (b) 단계의 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease)는 알칼레이스(Alcalase), 프로타맥스(Protamex), 또는 이들의 혼합효소일 수 있다.

[0063] 보다 구체적으로, 본 발명의 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease)는 알칼레이스(Alcalase)일 수 있다.

[0064] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 (b) 단계의 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease)는 플라보자임(Flavourzyme), 프로자임(Prozyme) 또는 이들의 혼합효소일 수 있다.

[0065] 보다 구체적으로, 본 발명의 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease)는 프로자임(Prozyme)일 수 있다.

[0066] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 (b) 단계의 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease) 및 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease)의 조합은 알칼레이스(Alcalase) 및 프로자임(Prozyme)의 혼합물일 수 있다.

[0067] 후술될 실시예에서 입증한 바와 같이, 본 발명자들은 알칼레이스(Alcalase) 및 프로자임(Prozyme)의 혼합물을 사용하여 유청단백질을 가수분해하는 경우, 우유 알레르기항원인 α-락트알부민 및 β-락토글로불린이 모두 분해되어 유청단백 가수분해물의 알레르기항원성을 성공적으로 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

[0068] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 (b) 단계의 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease), 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease) 또는 이들의 조합은 상기 유청단백 현탁액의 0.5%(w/v) 내지 2%(w/v)로 투입되는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상술한 (b) 단계의 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease), 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease) 또는 이들의 조합은 상기 유청단백 현탁액의 0.5%(w/v) 내지 2%(w/v), 0.5%(w/v) 내지 1.5%(w/v), 0.5%(w/v) 내지 1.2%(w/v), 0.5%(w/v) 내지 1%(w/v), 0.7%(w/v) 내지 2%(w/v), 0.7%(w/v) 내지 1.5%(w/v), 0.7%(w/v) 내지 1.2%(w/v), 0.7%(w/v) 내지 1%(w/v), 0.9%(w/v) 내지 2%(w/v), 0.9%(w/v) 내지 1.5%(w/v), 0.9%(w/v) 내지 1.2%(w/v), 또는 0.9%(w/v) 내지 1%(w/v), 더욱 구체적으로는 1%(w/v)로 투입될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0069] 후술될 실시예에서 입증한 바와 같이, 본 발명자들은 반응표면분석법(RSM)을 사용하여

[0070] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 (b) 단계의 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease) 및 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease)의 조합은 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease) 및 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease)가 1:0.2 내지 1:5의 중량비로 혼합된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease) 및 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease)는 1:0.2 내지 1:5, 1:0.2 내지 1:4, 1:0.2 내지 1:3, 1:0.2 내지 1:2, 1:0.2 내지 1:1.5, 1:0.2 내지 1:1, 1:0.25 내지 1:5, 1:0.25 내지 1:4, 1:0.25 내지 1:3, 1:0.25 내지 1:2, 1:0.25 내지 1:1.5, 1:0.25 내지 1:1, 1:0.3 내지 1:5, 1:0.3 내지 1:4, 1:0.3 내지 1:3, 1:0.3 내지 1:2, 1:0.3 내지 1:1.5, 1:0.3 내지 1:1, 1:0.5 내지 1:5, 1:0.5 내지 1:4, 1:0.5 내지 1:3, 1:0.5 내지 1:2, 1:0.5 내지 1:1.5, 1:0.5 내지 1:1, 1:0.6 내지 1:5, 1:0.6 내지 1:4, 1:0.6 내지 1:3, 1:0.6 내지 1:2, 1:0.6 내지 1:1.5, 또는 1:0.6 내지 1:1의 중량비로 혼합된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0071] 후술될 실시예에서 입증한 바와 같이, 본 발명자들은 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease)인 알칼레이스(Alcalase) 및 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease)가 1:1 또는 1:3의 중량비로 혼합되는 경우에 유청단백 가수분해물의 아미노-질소(Amino-nitrogen, A-N) 함량과 가수분해도(Degree of Hydrolysis, DH)가 다른 중량비로 혼합되는 경우보다 유의적으로 높음을 확인하였다.

[0072] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 (b) 단계의 가수분해는 5 시간 내지 20 시간 동안 수행되는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상술한 (b) 단계의 가수분해는 5 시간 내지 20 시간, 5 시간 내지 15 시간, 5 시간 내지 12 시간, 5 시간 내지 10 시간, 7 시간 내지 20 시간, 7 시간 내지 15 시간, 7 시간 내지 12 시간, 7 시간 내지 10 시간, 9 시간 내지 20 시간, 9 시간 내지 15 시간, 9 시간 내지 12 시간, 또는 9 시간 내지 10 시간, 가장 구체적으로는 10 시간 동안 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0073] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 (b) 단계의 가수분해는 30℃ 내지 70℃의 온도 조건에서 수행되는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상술한 (b) 단계의 가수분해는 30℃ 내지 70℃, 30℃ 내지 60℃, 30℃ 내지 55℃, 30℃ 내지 52℃, 40℃ 내지 70℃, 40℃ 내지 60℃, 40℃ 내지 55℃, 40℃ 내지 52℃, 48℃ 내지 70℃, 48℃ 내지 60℃, 48℃ 내지 55℃, 또는 48℃ 내지 52℃, 가장 구체적으로는 50℃의 온도 조건에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0074] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 (b) 단계의 가수분해는 pH 6.0 내지 pH 9.0의 조건에서 수행되는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상술한 (b) 단계의 가수분해는 pH 6.0 내지 pH 9.0, pH 6.0 내지 pH 8.0, pH 7.0 내지 pH 9.0, pH 7.0 내지 pH 8.0, pH 7.5 내지 pH 9.0, 또는 pH 7.5 내지 pH 8.0, 가장 구체적으로는 pH 7.8의 조건에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0075] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 (b) 단계의 가수분해는 30℃ 내지 70℃의 온도 조건에서 5 시간 내지 20 시간 동안 수행되는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상술한 (b) 단계의 가수분해는 30℃ 내지 70℃의 온도 조건에서 5 시간 내지 20 시간 동안, 30℃ 내지 70℃의 온도 조건에서 7 시간 내지 20 시간 동안, 30℃ 내지 70℃의 온도 조건에서 5 시간 내지 15 시간 동안, 40℃ 내지 70℃의 온도 조건에서 5 시간 내지 20 시간 동안, 40℃ 내지 70℃의 온도 조건에서 7 시간 내지 20 시간 동안, 40℃ 내지 70℃의 온도 조건에서 5 시간 내지 15 시간 동안, 48℃ 내지 55℃의 온도 조건에서 5 시간 내지 20 시간 동안, 48℃ 내지 55℃의 온도 조건에서 7 시간 내

지 20 시간 동안, 또는 48℃ 내지 55℃의 온도 조건에서 5 시간 내지 15 시간 동안 수행될 수 있고, 가장 구체적으로는 50℃의 온도 조건에서 10 시간 동안 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0076] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 (b) 단계의 가수분해는 pH 6.0 내지 pH 9.0의 조건에서 5 시간 내지 20 시간 동안 수행되는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상술한 (b) 단계의 가수분해는 pH 6.0 내지 pH 9.0의 조건에서 5 시간 내지 20 시간 동안, pH 6.0 내지 pH 9.0의 조건에서 7 시간 내지 20 시간 동안, pH 6.0 내지 pH 9.0의 조건에서 5 시간 내지 15 시간 동안, pH 7.0 내지 pH 9.0의 조건에서 5 시간 내지 20 시간 동안, pH 7.0 내지 pH 9.0의 조건에서 7 시간 내지 20 시간 동안, pH 7.0 내지 pH 9.0의 조건에서 5 시간 내지 15 시간 동안, pH 7.5 내지 pH 8.0의 조건에서 5 시간 내지 20 시간 동안, pH 7.5 내지 pH 8.0의 조건에서 7 시간 내지 20 시간 동안, 또는 pH 7.5 내지 pH 8.0의 조건에서 5 시간 내지 15 시간 동안 수행될 수 있고, 가장 구체적으로는 pH 7.8의 조건에서 10 시간 동안 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0077] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 30℃ 내지 70℃의 온도 조건 및 pH 6.0 내지 pH 9.0의 조건에서, 30℃ 내지 70℃의 온도 조건 및 pH 7.0 내지 pH 9.0의 조건에서, 30℃ 내지 70℃의 온도 조건 및 pH 7.5 내지 pH 8.0의 조건에서, 40℃ 내지 70℃의 온도 조건 및 pH 6.0 내지 pH 9.0의 조건에서, 40℃ 내지 70℃의 온도 조건 및 pH 7.0 내지 pH 9.0의 조건에서, 40℃ 내지 70℃의 온도 조건 및 pH 7.5 내지 pH 8.0의 조건에서, 48℃ 내지 55℃의 온도 조건 및 pH 6.0 내지 pH 9.0의 조건에서, 48℃ 내지 55℃의 온도 조건 및 pH 7.0 내지 pH 9.0의 조건에서, 또는 48℃ 내지 55℃의 온도 조건 및 pH 7.5 내지 pH 8.0의 조건에서 수행될 수 있고, 가장 구체적으로는 50℃의 온도 조건 및 pH 7.8의 조건에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0078] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 (b) 단계를 통하여 유청단백질 내 α-락트알부민 및 β-락토글로불린이 분해되는 것일 수 있다.

[0079] 상기 본 발명의 제조방법을 통하여 상술한 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물이 제조되는 것이므로, 양 발명 간에 중복되는 부분은 모두 동일하게 적용되며, 본 명세서의 복잡성을 방지하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0081] 본 발명은 유청단백질을 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 유래 엔도프로테이스(endoprotease), 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래 엑소프로테이스(exoprotease) 또는 이들의 조합으로 가수분해한 것인, 저알레르기성 유청단백 가수분해물 및 이의 제조방법을 제공한다.

[0082] 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물을 이용하는 경우, 영양적 가치가 높은 유청단백질을 우유 알레르기의 위험 없이 안전하게 섭취할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0084] 도 1은 유청단백질(WP)을 효소 혼합물로 처리한 후 얻은 가수분해물의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다. 단백질은 각각 50 μg, 60 μg 및 70 μg의 농도로 겔에 로딩되었다.

Lane 1은 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 혼합물을 사용하여 제조한 가수분해물의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이고, Lane 2는 콜루풀린(Collupulin)과 프로자임의 혼합물을 사용하여 제조한 가수분해물의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이며, Lane 3은 프로타맥스(Protamex)와 프로자임의 혼합물을 사용하여 제조한 가수분해물의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이고, Lane 4는 프로자임과 플라보자임(Flavourzyme)의 혼합물을 사용하여 제조한 가수분해물의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.

도 2a는 효소 혼합물로 처리한 후 얻은 가수분해물의 아미노-질소(A-N) 함량을 나타낸 것이다.

도 2b는 효소 혼합물로 처리한 후 얻은 가수분해물의 가수분해도(DH)를 나타낸 것이다.

도 3a는 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 혼합 비율 별 A-N 함량을 나타낸 것이다.

도 3b는 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 혼합 비율 별 가수분해도(DH)를 나타낸 것이다.

도 3c는 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 첨가량 및 반응시간에 따른 A-N 함량을 나타낸 것이다.

도 3d는 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 첨가량 및 반응시간에 따른 가수분해도(DH)를 나타낸 것이다.

상기 도 2a 내지 도 3d에서, 모든 수치는 각 그룹의 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, n = 3이다. 상이한 알파벳은 Tukey's 다중 검정에 따라 $p<0.05$에서 유의미한 차이를 나타낸다.

도 4a 반응표면분석법(RSM)을 사용하여 최적화된 유청단백 가수분해물의 A-N 함량을 나타낸 것이다.

도 4b 반응표면분석법(RSM)을 사용하여 최적화된 유청단백 가수분해물의 가수분해도(DH)를 나타낸 것이다.

도 5는 최적 반응 조건에서, 유청단백질(WP)을 가수분해할 때 알레르기항원인 α-락트알부민(α-LA)과 β-락토글로불린(β-LG)의 분해를 겔 전기영동을 통해 확인한 것이다.

도 6a는 유청단백질(WP)과 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)을 인공소화효소인 펩신과 판크레아틴으로 처리하였을 때 A-N 함량을 나타낸 것이다.

도 6b는 유청단백질(WP)과 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)을 인공소화효소인 펩신과 판크레아틴으로 처리하였을 때 소화율을 나타낸 것이다.

도 6c는 인공소화효소인 펩신과 판크레아틴으로 제조한 유청단백질(WP)과 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH) 샘플을 Caco-2 세포에 처리하고, 20 분 후의 장투과율을 나타낸 것이다.

도 6d는 인공소화효소인 펩신과 판크레아틴으로 제조한 유청단백질(WP)과 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH) 샘플을 Caco-2 세포에 처리하고, 40 분 후의 장투과율을 나타낸 것이다.

도 6e는 인공소화효소인 펩신과 판크레아틴으로 제조한 유청단백질(WP) 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH) 샘플을 Caco-2 세포에 처리하고, 60 분 후의 장투과율을 나타낸 것이다.

도 6f는 인공소화효소인 펩신과 판크레아틴으로 제조한 유청단백질(WP)과 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH) 샘플을 Caco-2 세포에 처리하고, 120 분 후의 장투과율을 나타낸 것이다.

상기 도 6a 내지 6d에서, 모든 수치는 각 그룹의 평균 ± 표준편차로 나타냈으며, n=3이다. 상이한 알파벳은 Tukey's 다중 검정에 따라 $p<0.05$에서 유의미한 차이를 나타내며, ***$p<0.001$는 유청단백질(WP)과 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)의 유의미한 차이를 나타내고, ns는 유의한 차이가 없음을 나타낸다.

도 7은 SD 쥐에 유청단백질(WP)과 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)을 경구 투여한 후 혈청 A-N 함량 변화를 나타낸 것이다. 모든 수치는 각 그룹의 평균 ± 표준편차로 나타냈으며, n=4이다. 상이한 알파벳은 Tukey's 다중 검정에 따라 $p<0.05$에서 유의미한 차이를 나타내며, ***$p<0.001$는 유청단백질(WP)과 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)의 유의미한 차이를 나타내고, ns는 유의한 차이가 없음을 나타낸다.

도 8a 내지 도 8f는 HLPC로 분석한 유청단백질(WP) 및 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)의 분자량 분포를 나타낸 것이다.

도 8a는 유청단백질(WP), 도 8b는 펩신 처리한 유청단백질(WP-pepsin), 도 8c는 펩신 처리 이후 판크레아틴을 처리한 유청단백질(WP-pancreatin)의 분자량 분포를 나타내며, 도 8d는 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH), 도 8e는 펩신 처리한 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH-pepsin), 도 8f는 펩신 처리 이후 판크레아틴을 처리한 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH-pancreatin)의 분자량 분포를 나타낸다.

도 9a 내지 도 9c는 각각 혈액, 비장세포, 소장에서의 IgE 농도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0085] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0087] **실시예**

[0089] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[0091] **실험재료 및 실험방법**

[0092] **1. 실험재료(Materials)**

[0093] 유청단백질은 건조 기준 단백질 함량이 80%(건조 기준)인 농축유청단백(WPC; Agri-mark, FL, USA)을 사용하였다. α-락트알부민과 β-락토글로불린은 우유(삼영이노베이션, 대한민국 평택)에서 추출한 75% α-락트알부민과 β-락토글로불린을 사용하였다. 엔도프로테이스(Endoprotease)로 알칼레이스(Alcalase)(Novozymes, Copenhagen, Denmark), 프로타맥스(Protamex)(Novozymes), 플라보자임(Flavourzyme)(Novozymes) 및 콜루풀린(Collupulin)(DSM, Heerlen, Netherlands)을 사용하였다. 엑소프로테이스(Exoprotease)로는 프로자임(Prozyme)(DuPont, Delaware, USA)을 사용하였다. 인공소화효소로는 펩신(pepsin) 및 판크레아틴(pancreatin)(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 사용하였다. L-류신(L-leucine)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

[0095] **2. 유청단백 가수분해물의 제조**

[0096] 유청단백질과 물을 혼합하여 기질 용액인 10%(w/v) 유청단백 현탁액을 제조하였다. 유청단백 가수분해물을 제조하기 위해 엔도프로테이스 및 엑소프로테이스의 혼합물을 기질 용액의 1.0%(w/v)의 농도로 첨가하였다. 이후 이를 100 rpm에서 진탕하면서 pH 7.8, 50℃에서 8 시간 동안 가수분해하였다. 각 반응액을 90℃에서 10 분간 처리하여 프로테이스를 불활성화시킨 후 8,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 프로테이스 처리를 하지 않은 유청단백질 용액을 대조군으로 사용하였다. 유청단백질 가수분해에 사용되는 반응 조건 및 효소 특성은 하기 표 1에 나타냈다.

표 1

[0097]

효소	주요 활성	유래	최적 조건	
			온도(℃)	pH
알칼레이스(Alcalase) 2.4 L FG	엔도프로테이스	*Bacillus licheniformis*	50	7.8
콜루풀린(Collupulin) MG	엔도프로테이스	*Carica papaya*	50-70	5.0-7.5
프로타맥스(Protamex)	광범위 엔도프로테이스	*Bacillus licheniformis*	35-60	5.5-7.5
플라보자임(Flavourzyme) 500 MG	프로테이스 (엔도- & 엑소-)	*Aspergillus oryzae*	50	5.0-7.0
프로자임(Prozyme) 2000P	엑소프로테이스	*Aspergillus oryzae*	50-60	6.0-9.0

[0099] **3. 겔 전기영동을 이용한 유청단백 가수분해물 내 α-락트알부민 및 β-락토글로불린 분해 여부 확인**

[0100] 유청단백 가수분해물(10 mg)를 1 mL의 시료 완충액[0.5 M 삼염산(HCl), 글리세롤, 10% SDS, 0.1% 브로모페놀블루, pH 6.8]에 용해시키고, 100℃에서 5 분 동안 열처리하고, 원심분리하고 상등액을 회수하였다. 상등액 20 μL를 약 90 분 동안 135 V에서 12% 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동을 실행하였다. α-락트알부민 및 β-락토글로불린의 존재를 확인하기 위해 젤을 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 6 시간 동안 염색한 다음, 단백질 밴드가 명확하게 보일 때까지 10% 메탄올 및 10% 아세트산을 포함하는 용액을 사용하여 탈염색하였다.

[0102] **4. 아미노-질소(Amino-nitrogen, A-N) 함량 및 가수분해도(Degree of Hydrolysis, DH) 계산**

[0103] 2,4,6-trinitrobenzensulfonic acid(TNBS) 방법을 사용하여 저알레르기성 유청단백 가수분해물의 A-N(아미노-질소) 함량을 측정하였다. 간략하게, 125 μL의 샘플, 400 μL의 0.212 M 인산염 완충액(pH 8.2) 및 0.4 mL의 0.1% TNBS를 혼합하고 암실에서 50℃에서 60 분 동안 반응시켰다. 다음으로, 0.8 mL의 100 mM HCl을 첨가하고 20 분 동안 방치하였다. 다시 10 분 후, 증류수 0.8 mL를 넣고 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. A-N의 함량은 L-류신을 표준물질로 사용하여 계산하였다.

[0104] 효소 처리 후 단백질의 가수분해도(DH)는 유장 단백질 가수분해물의 A-N 함량을 추정하여 다음 방정식을 사용하여 계산하였다. 총 A-N 함량은 유청단백질을 6 N HCl을 사용하여 100℃에서 24 시간 동안 가수분해한 후 수산화나트륨(NaOH)으로 중화하여 측정하였다.

[0105] $DH = (L_t - L_0)/(L_{max} - L_0) \times 100$,

[0106] 여기서 L_t는 시간 t에서의 가수분해 후 A-N 함량이고, L_0는 가수분해 전 A-N 함량이며, L_{max}는 6 N HCl로 산 가수분해 후 A-N 함량이다.

[0108] **5. RSM(response surface methodology)을 이용한 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 최적 혼합 비율**

및 최적 반응 조건 설정

[0109] RSM(response surface methodology, 반응표면분석법)을 이용하여 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 최적 혼합 비율을 선정하였다. 10%(w/v) 기질, 50℃, pH 7.8에서 실험의 3회 반복으로 총 15개의 조합을 구성하였다. 두 효소 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 혼합 비율을 독립 변수로 사용하였으며, 하기 표 2에 나타냈다.

표 2

[0110]

효소 혼합 비율			
Run	기질 (w/v%)	알칼레이스 (Alcalase) (w/v%)	프로자임 (Prozyme) (w/v%)
1	10	0.5	0.5
2		1	0
3		0.5	0.5
4		0.75	0.25
5		0.75	0.25
6		1	0
7		0.5	0.5
8		0	1
9		0.25	0.75
10		0	1
11		1	0
12		0.25	0.75
13		0.25	0.75
14		0	1
15		0.75	0.25

[0112] 두 효소의 최적 혼합 비율은 실험 조합에 해당하는 가수분해물의 A-N을 측정하여 선택하였다. 실험 결과를 분석하기 위해 RSM을 사용하였으며 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 최적 혼합 비율을 나타내는 회귀식은 다음과 같다.

[0113] $aX + bY + cXY = 32.29\ X + 68.87\ Y + 96.58\ XY$,

[0114] 여기서 X는 알칼레이스(Alcalase)(w/v%)이고 Y는 프로자임(Prozyme)(w/v%)이다.

[0116] 이후, RSM을 이용하여 최적 반응 조건(효소 첨가량 및 가수분해 시간)을 선정하였다.

[0117] 10% 기질, 50℃, pH 7.8에서 실험의 3회 반복으로 총 39개의 조합을 구성하였다. 첨가된 효소의 양과 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 혼합 효소에 의한 가수분해 시간을 독립 변수로 사용하였으며, 하기 표 3에 나타냈다.

표 3

[0118]

혼합 효소의 반응 조건			
RUN	기질 (w/v%)	효소 (w/v%)	시간 (h)

1	10	2	6
2		2	6
3		1	6
4		1.5	4
5		1	2
6		1	10
7		1.5	8
8		1	2
9		1.5	8
10		0.5	6
11		2	6
12		1	6
13		1	6
14		1	6
15		1	6
16		1.5	4
17		0.5	6
18		1	6
19		0.75	8
20		0.75	4
21		0.5	6
22		1	6
23		1	10
24		1	6
25		0.75	8
26		1	6
27		0.75	4
28		1	2
29		1.5	4
30		0.75	4
31		1	6
32		1	6
33		1	6
34		1	6
35		1.5	8
36		1	6
37		1	10
38		1	6
39		0.75	8

[0120] 실험 조합에 해당하는 가수분해물의 A-N 함량을 측정하여 최적의 효소 첨가량과 가수분해 시간을 선정하였다. 효소 첨가량과 가수분해 시간에 대한 최적 조건을 나타내는 회귀식은 다음과 같다.

[0121] $A + aX + bY + cX^2 + dY^2 + eXY = 29.6286 - 0.9220\ X + 4.5520\ Y + 0.4706\ X^2 + 8.3643\ Y^2 - 2.0389\ XY$,

[0122] 여기서 X는 가수분해 시간이고, Y는 효소 첨가량이다.

[0124] **6. HPLC(High performance liquid chromatography) 분석에 의한 유청단백 가수분해물의 아미노산 조성 확인**

[0125] 제조업체의 메뉴얼에 따라 AccQ-Tag 시약(Waters, Milford, MA, USA)을 사용하여 아미노산을 유도체화한 다음 HPLC(High performance liquid chromatography, 고성능 액체 크로마토그래피) 시스템(Waters)을 사용하여 분석하였다. AccQ-Tag 컬럼(3.9 mm × 150 mm, Waters)을 사용하여 다음 분석 조건으로 분석을 진행하였다: 온도 37℃; 이동상 [Water AccQ-Tag Eluent A(acetate-phosphate buffer), acetonitrile, Milli-Q Water] 유속 1.0 mL/min, 형광검출기(excitation 250 nm, emission 395 nm).

[0126] 총 아미노산 분석은 산 가수분해 후 수행하였다. 시료 0.5 g에 6 N HCl 용액 10 mL를 넣고 질소 치환한 후 110℃에서 24 시간 동안 가수분해하였다. 얻어진 여액을 원심분리하고 상등액을 50℃에서 농축하여 산과 물을 완전히 증발시킨 후 20 mM HCl(pH 2.2)을 이용하여 5 mL로 희석하였다. 용해된 용액을 0.45 ㎛ membrane으로 여과

하고 여액을 HPLC 분석용 시료로 사용하였다.

[0128] **7. 체외 소화율 및 장투과율 분석**

[0129] **7-1. 체외 소화율 분석**

[0130] 시험관내(*in vitro*) 소화율은 Garrett et al. (Garrett et al., 1999) 방법에 따라 펩신과 판크레아틴을 사용하여 수행하였다. 시료 1,000 mg을 증류수에 녹인 후 pH를 2.0으로 조절하였다. 펩신을 기질의 2.5% 만큼 첨가하고 37℃에서 1 시간 동안 반응시킨 후, $NaHCO_3$(중탄산나트륨)으로 pH를 5.3으로 조정하고 5 N NaOH로 pH를 7.5로 조정하였다. 판크레아틴을 기질의 4% 만큼 첨가하고 37℃에서 2 시간 동안 반응시킨 후 90℃에서 10 분간 가열하여 소화효소를 불활성화시켰다. 원심분리(12,000 rpm, 10 분)하여 얻은 상등액에서 A-N(mg)을 측정하고, 소화율(%)을 다음 식으로 계산하였다.

[0131] 소화율(%) = [소화 후 시료의 A-N 함량 (mg) - 소화 전 시료의 A-N 함량 (mg)] / [소화 전 시료의 총 A-N 함량 (mg) - 소화 전 시료의 A-N 함량 (mg)] × 100. (총 A-N 분해 전 시료 내: 산 가수분해 후 A-N 함량).

[0132]

[0133] **7-2. 장투과율 분석**

[0134] 유청단백질과 유청단백 가수분해물의 장투과율 분석에는 Caco-2 Ready 24-well plate(Komabiotech, Seoul, Korea)를 사용하였다. 플레이트를 5% CO_2 인큐베이터(37℃)에서 4 시간 동안 인큐베이션하고 해동한 다음 1 g/L 글루코스, 10% 태아 소 혈청 및 1% 글루타민을 함유하는 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's)로 대체하였다. 분석은 배지 교체 후 48시간 후에 수행하였다. 장투과율 분석을 위해 소화효소(펩신 및 판크레아틴)를 사용하여 제조한 유청단백질과 유청단백 가수분해물을 HBSS(Hanks' Balanced Salt Solution) 완충액으로 10배 희석하였다. HBSS 완충액을 사용하여 완전한 단층 필름으로 Caco-2 플레이트를 3 회 세척한 후, 희석된 샘플 250 μL 및 750 μL와 HBSS 완충액을 인서트 플레이트와 리시버 플레이트에 각각 분배하였다. 리시버 플레이트의 완충액은 시간 경과에 따라(20 분, 40 분, 60 분 및 120분) 회수하였다. 인서트 플레이트에 초기에 분포된 시료와 시간 경과에 따라 수집된 시료의 단백질 함량을 BCA assay(bicinchoninic acid assay)를 이용하여 분석한 후, 다음 식을 사용하여 시료의 장투과율을 분석하였다:

[0135] 투과도(%) = [리시버 플레이트의 총 단백질(mg)]/[인서트 플레이트에 추가된 초기 단백질(mg)] × 100.

[0137] **8. 고용량 단회 경구투여에 의한 흡수율 평가**

[0138] SD(Sprague-Dawley) 쥐(6주령, 수컷)는 오리엔탈바이오(대한민국 성남)에서 구입하였다. 동물은 21±1℃, 상대습도 50% 내지 55%, 명암주기 12 시간의 사육실에 사육하였다. 식수와 사료는 자유롭게 제공되었다. 1 주일 동안 적응시킨 후, 4 마리의 SD 쥐를 실험군당 무작위로 배정하였다. 유청단백질과 유청단백 가수분해물은 500 mg/kg을 경구투여하고 검체 투여시간(20 분, 40 분, 60 분 및 120분)에 따라 희생하여 채혈하였다. 0 분에 해당되는 실험군(대조군)으로부터 혈액 샘플을 수집하였다. 원심분리(3,000 rpm, 15 분, 4℃) 후, 총 A-N 함량을 측정하기 위해 혈청을 분리하였다. 모든 동물 실험은 고려대학교 동물실험윤리위원회(KUIACUC-2022-0095)의 승인을 받았다.

[0140] **9. 유청단백질 및 유청단백 가수분해물의 분자량 분포**

[0141] HPLC를 사용하여 유청단백질 및 유청단백 가수분해물의 분자량 분포를 측정하기 위하여, 시료를 여과(microfilter, 0.45 μm)하고 20 μL를 Superdex G-75 컬럼(10 × 300 mm, GE Healthcare, Anaheim, CA, USA)에 주입하였다. 220 nm에서 흡광도를 측정하고, 컬럼을 50 mM 포름산암모늄(ammonium formate) 완충액(pH 5.5)(0.5 mL/min)으로 용출하였다. 유청단백질 및 유청단백 가수분해물의 분자량 분포는 글루타티온(glutathione)(MW 307), 아프로티닌(aprotinin)(MW 6,512), 사이토크롬 C(cytochrome C)(MW 12,384), 에놀레이스(enolase)(MW 67,000), 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase)(MW 142,000)를 사용하여 작성한 분자량 분포 곡선에 따라 측정하였다.

[0143] **10. 유청단백 및 유청단백 가수분해물의 면역학적 반응 평가**

[0144] 8주령의 특정 병원균이 없는 수컷 BALB/c 마우스를 대한바이오링크㈜(대한민국 충북)에서 구입하여 무균관리하였다(사육실은 25℃; 습도 55%; 멸균 증류수 공급). 마우스를 각각 250 mg/kg 및 500 mg/kg의 유청단백질 및 유청단백 가수분해물을 투여한 그룹과 식염수(saline)를 투여한 대조군으로 나누었다. 각 그룹에는 8 마리의 마우

스를 배정하였다. 시료는 위 삽관을 통해 4 주 동안 주 5회 경구투여하였다. 체중은 3 일 간격으로 주 2 회 측정하였다. 투여 후 혈액을 채취하여 2,800×g에서 10 분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 마우스 희생 후, 세포 배양을 위해 무균적으로 절제된 비장세포를 24 개의 웰-플레이트에 분주하고 CO_2 인큐베이터에서 48 시간 동안 배양하였다. 이후, 생체외 활성화를 위한 다클론 자극제(a polyclonal stimulator)로서 파이토헤마글루티닌(phytohemagglutinin)(Sigma, 5 ㎍/L × 10^6 세포)을 첨가하였다. 세포 배양 배지 내 사이토카인(INF-γ 및 IL4), 항체(IgG2a 및 IgG1) 및 IgE의 농도는 BD Bioscience(San Diego, CA, USA)에서 구입한 ELISA 키트를 사용하여 측정하였다. 소장 사이토카인의 경우, 희생 후 무균 추출된 십이지장 0.5 g에 PBS 2 mL를 첨가하여 교반한 후, 4℃에서 2 일 동안 방치하였다. 이후 원심분리하여 얻은 상등액을 ELISA 키트를 이용하여 사이토카인과 IgE를 분석하였다.

[0146] **11. 통계 분석**

[0147] 데이터는 SPSS(ver. 12.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 통계적으로 분석하였으며, 모든 측정값에 대하여 평균과 표준편차를 산출하였다. 실험군 간의 유의성은 ANOVA에 이어 Tukey's 다중 범위 검정으로 $p<0.05$ 수준에서 검정하였다. Minitab 17 소프트웨어(Minitab Inc., State College, PA, USA)를 사용하여 RSM 분석을 수행하여 독립 변수와 종속 변수 간의 관계를 이해하는 모델의 적합성을 확인했다.

[0149] **실시예 1: 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH, Hypoallergic whey protein hydrolysate) 제조를 위한 효소 조합의 선택**

[0150] α-락트알부민과 β-락토글로불린을 분해할 수 있는 효소를 선별하기 위하여 엔도프로테이스 (알칼레이스(Alcalase), 콜루풀린(Collupulin), 프로타맥스(Protamex))와 엑소프로테이스(프로자임(Prozyme))를 혼합하여 가수분해를 8시간 동안 진행하였다. α-락트알부민과 β-락토글로불린이 분해된 효소의 조합을 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분석하여 선택하였다. 그 결과, 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 혼합물을 사용하여 제조한 가수분해물에서 α-락트알부민과 β-락토글로불린 밴드가 보이지 않아 두 알레르기항원이 모두 분해되었음을 알 수 있었다(도 1).

[0151] 효소 혼합물로 처리한 후 얻은 가수분해물의 아미노-질소(A-N) 및 가수분해도(DH)를 분석한 결과를 도 2a 및 도 2b에 나타냈다. 도 2a 및 도 2b에 나타난 바와 같이, 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)을 혼합하여 얻은 유청단백 가수분해물에서 A-N과 DH의 수준은 다른 가수분해물보다 유의하게 높았다. 따라서, 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 조합이 α-락트알부민 및 β-락토글로불린의 가수분해에 가장 적합한 효소 조합임을 알 수 있었다.

[0153] **실시예 2: 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HPWH) 제조를 위한 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 최적 혼합 비율 및 최적 반응 조건 설정**

[0154] **실시예 2-1: RSM을 이용한 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 최적 혼합 비율 설정**

[0155] 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HPWH) 생산을 위한 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 적절한 혼합 비율을 선택하기 위해 RSM에 의한 15가지 조합(표 2)에 따라 가수분해를 수행하였다.

[0156] 가수분해물의 A-N 함량 및 이를 토대로 계산한 DH 값을 각각 도 3a 및 도 3b에 나타냈다. 도 3a 및 도 3b에 나타낸 바와 같이, 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)을 각각 1:1과 1:3으로 혼합한 가수분해물의 A-N 함량과 DH 값은 다른 혼합비로 얻은 가수분해물보다 유의하게 높았다($p<0.05$).

[0157] RSM을 이용하여 효소 혼합물의 최적 비율을 예측한 결과 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)을 1:1로 혼합하였을 때 A-N 함량이 50.42 mg/mL로 가장 높을 것으로 예상되었다. 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)을 1:1 비율로 혼합하여 생산한 가수분해물의 A-N 함량은 RSM에서 예측한 바와 같이 51.52 mg/mL이었으며 실제 측정값은 50.42 mg/mL으로 예측하였던 값과 유사한 측정값을 확인하였다.

[0158] 따라서, 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)의 제조를 위한 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 혼합 비율은 1:1 또는 1:3이 가장 적절함을 알 수 있었다.

[0159] 이후 최적 반응 조건을 설정하기 위하여, 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 1:1 혼합물을 사용하였다.

[0161] **실시예 2-2: RSM을 이용한 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)의 최적 반응 조건 설정**

[0162] 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH) 생산을 위한 최적의 효소 농도와 가수분해 시간을 선택하기 위하여, 10%(w/v) 기질, 50℃, pH 7.8 조건에서 RSM에서 제시한 39가지 조합(표 3)에 따라 가수분해를 수행한 뒤 각 유청단백 가수분해물의 A-N 함량을 측정하고, 도 4에 나타냈다. 도 4에 나타난 바와 같이, 효소 첨가량과 가수분해 시간이 증가함에 따라 A-N 함량도 증가하였으며, 효소를 1.0%(w/v) 첨가하여 가수분해를 10시간 동안 진행했을 때 A-N 함량이 가장 높게 나타났다. RSM에서 예측한 최적 효소농도와 가수분해 시간에서 기대한 A-N 함량은 60.00 mg/mL이었으며, 실제 측정값은 59.58 mg/mL로 R^2 값이 0.968로 이에 근접하였다.

[0163] 알칼레이스(Alcalase)-프로자임(Prozyme) 혼합물에 의해 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)를 생성하기 위해서는 효소를 1.0 % 첨가하여 10 시간 안 가수분해를 수행하는 것이 최적의 조건인 것으로 나타났다. 다중회귀분석을 통해 얻은 A-N 함량에 대한 회귀식은 다음과 같다.

[0164] $A + aX + bY + cX^2 + dY^2 + eXY = 29.6286 - 0.9220\ X + 4.5520\ Y + 0.4706\ X^2 + 8.3643\ Y^2 - 2.0389\ XY$,

[0165] 여기서 X는 가수분해 시간(h)이고, Y는 효소 첨가량(%)이며, R^2=96.80%이다.

[0167] **실시예 2-3: 최적 반응 조건에서의 알레르기항원 분해 분석**

[0168] 상술한 최적 반응 조건에서, 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)을 가수분해할 때 알레르기항원인 α-락트알부민과 β-락토글로불린의 분해를 겔 전기영동을 통해 확인하였다(도 5). 도 5에 나타난 바와 같이, 알레르기항원인 α-락트알부민과 β-락토글로불린의 밴드는 가수분해 전(0시간)에 관찰되었으나, 가수분해 4 시간 후에는 희미해지고, 가수분해 8 시간 후에는 거의 보이지 않았다. 이와 같이, α-락트알부민과 β-락토글로불린이 혼합효소 처리에 의해 분해되었음을 확인할 수 있었다.

[0170] **실시예 3: 유청단백질 및 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)의 아미노산 조성 확인**

[0171] 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)을 처리한 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)의 아미노산 조성을 하기 표 4에 나타냈다. 표 4에 나타난 바와 같이, 유리 아미노산 조성은 2,089.72 ± 76.18 μmole/g, 총 아미노산 조성은 4,987.21 ± 93.44 μmole/g였다. 총 17종의 유리 아미노산이 검출되었으며, 류신(Leu, leucine)(16.8%, 351.73 ± 4.62 μmole/g)이 가장 많이 검출되었고, 이후 발린(Val, valine)(13.8%), 라이신(Lys, lysine)(11.2%), 이소류신(Ile, isoleucine)(8.7%) 순으로 검출되었다. 상기 아미노산은 높은 수준 존재하는 경우 쓴맛을 유발하며, 샘플의 쓴맛과 일관됨을 알 수 있었다.

표 4

[0172]

함량	유리 아미노산 (μmole/g)	총 아미노산 (μmole/g)
Asp	46.96 ± 0.33	516.35 ± 4.63
Ser	151.70 ± 0.86	308.41 ± 2.31
Glu	169.00 ± 2.30	720.73 ± 9.91
Gly	25.27 ± 0.90	182.34 ± 3.57
His	61.55 ± 4.06	95.91 ± 3.63
Arg	79.38 ± 0.91	394.24 ± 21.16
Thr	57.53 ± 28.23	72.17 ± 13.46
Ala	48.65 ± 35.25	288.05 ± 5.65
Pro	100.55 ± 2.67	388.43 ± 6.84
Cys	10.91 ± 1.14	282.89 ± 8.71
Tyr	73.76 ± 0.93	93.46 ± 2.77
Val	288.57 ± 6.28	396.82 ± 4.46
Met	66.35 ± 0.28	78.32 ± 2.07
Lys	234.71 ± 1.66	308.88 ± 5.78
Ile	182.55 ± 3.47	249.27 ± 5.98
Leu	351.73 ± 4.62	469.35 ± 4.30
Phe	140.56 ± 3.47	141.59 ± 0.99
총합	2089.72 ± 76.18	4987.21± 93.44
수치는 각 그룹당 평균 ± 표준편차로 나타냈으며, n=3이다.		

[0174] **실시예 4: Caco-2 세포에 의한 체외 소화율 및 장투과율 분석**

[0175] **실시예 4-1: 체외 소화율 분석**

[0176] 유청단백질(WP)과 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)을 인공소화효소인 펩신과 판크레아틴을 순차적으로 처리하였을 때 A-N 함량과 소화율의 변화를 측정하였다(도 6a 및 도 6b). 도 6a 및 도 6b에 나타난 바와 같이, 펩신과 판크레아틴에 의한 소화가 진행됨에 따라 A-N 함량과 소화율이 증가하는 경향을 보였다. 펩신만 처리한 경우보다, 펩신 이후 판크레아틴을 처리한 경우에 유청단백질(WP)과 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)이 더 효율적으로 가수분해되었고, A-N 함량과 소화율도 유의하게 높았다. 소화효소 처리의 각 단계에서 A-N 함량은 유청단백질(WP)보다 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)에서 유의하게 높았다. 소화율의 경우, 가수분해 전 A-N 함량이 높았던 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)이 펩신 처리 단계에서는 유청단백질(WP)보다 낮은 소화율을 보였으나, 판크레아틴 처리 단계에서는 유청단백질(WP)보다 높은 수준의 소화율 증가를 보였다.

[0178] **실시예 4-2: 장투과율 분석**

[0179] Caco-2 세포의 장투과율을 측정하여 도 6c 내지 도 6f에 나타냈다. 지시된 처리 시점 20, 40, 60, 및 120분 펩신과 판크레아틴 처리의 각 단계에서 Caco-2 세포의 장투과율도 유청단백질(WP)보다 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)에서 유의하게 높았다. 따라서 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)으로 측정한 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)의 소화율과 장투과율이 유청단백질(WP)보다 높은 것을 확인하였다.

[0181] **실시예 5: 동물 모델에서 고용량 단회 경구투여에 의한 흡수율 평가**

[0182] SD 쥐에 유청단백질(WP)과 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)을 경구 투여한 후 혈청 A-N 함량의 변화를 측정하였다(도 7). 경구 투여 20분 후 혈청 A-N 함량이 가장 높았고, 이후 점차 감소하였다. 20 분과 40 분 후, 유청단백질(WP)을 투여한 경우와 비교하여 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)을 투여한 경우에 혈청 A-N 양이 유의하게 더 높았다($p<0.001$). 알칼레이스(Alcalase)-프로자임(Prozyme)에 의해 생산되는 저자극성 유청단백 가수분해물은 유청단백질(WP)보다 작은 펩타이드로 구성되어 쉽게 소화 흡수되므로, 혈청 A-N 함량이 경구 투여 초기에 높은 것으로 보인다.

[0184] **실시예 6: 유청단백 가수분해물의 분자량 분포**

[0185] 유청단백질 및 유청단백 가수분해물의 분자량 분포를 분석한 결과를 도 8a 내지 도 8f에 나타냈다. 유청단백질(WP)은 분자량이 16 kDa 및 5 kDa인 여러 펩타이드를 포함하는 것으로 나타났다. 반면 알칼레이스(Alcalase)와 프로자임(Prozyme)에 의해 생성된 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)은 주로 5 kDa 이하의 펩타이드로 구성되어 있으며 주요 피크는 각각 약 384 Da와 214 Da이었다. 유청단백질(WP)은 펩신으로 처리했을 때 2.6 kDa, 1.3 kDa, 491 Da의 작은 펩타이드로 분해되었고, 판크레아틴 처리 후에는 펩신으로 처리했을 때보다 더 작은 분자량을 가진 펩타이드로 가수분해되었다(도 8b 및 도 8c). 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)의 분자량 분포는 펩신 및 판크레아틴 처리 전후가 유사하였다. 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)은 이미 효소에 의해 가수분해되었기 때문에(도 8e 및 도 8f), 분자량 분포에 대한 펩신 및 판크레아틴 처리의 효과는 미미한 것으로 보인다.

[0187] **실시예 7: 유청단백 및 유청단백 가수분해물의 면역학적 반응 평가**

[0188] **실시예 7-1: 동물의 혈청, 비장세포, 소장 내 사이토카인 및 항체 분석**

[0189] BALB/c 마우스에 250 mg/kg 및 500 mg/kg의 유청단백질(WP) 및 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)을 투여한 군과 식염수(saline)를 투여한 대조군의 혈청 내 사이토카인(INF-γ 및 IL4)의 농도와 항체(IgG2a 및 IgG1)의 농도를 표 5에 나타냈다. 수치는 각 그룹에 대한 평균 ± 표준 오차(SEM)로 표시하였으며, n = 8이다. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ 및 $^{***}p<0.001$은 Tukey's 다중 검정에 따른 대조군과의 유의미한 차이를 나타내며, $^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p<0.01$ 및 $^{\#\#\#}p<0.001$은 Student's t-검정에 의한 동일한 농도 그룹 간의 유의한 차이를 나타낸다. ns는 유의한 차이가 없음을 의미한다.

표 5

[0190] 혈청 내 사이토카인(INF-γ 및 IL4)의 농도 및 항체(IgG2a 및 IgG1)의 농도

-	대조군	유청단백질 250 mg/kg	유청단백질 500 mg/kg	유청단백 가수분해물 250 mg/kg	유청단백 가수분해물 500 mg/kg
INF-γ (pg/ml)	8.87 ± 1.50^{ns}	8.82 ± 2.07	9.95 ± 1.71	10.70 ± 1.89	11.66 ± 0.81
IL-4(pg/ml)	5.30 ± 0.21^{ns}	7.73 ± 0.72	10.53 ± 2.90	7.64 ± 1.16	8.94 ± 2.61
INF-γ/IL-4	1.65 ± 0.24^{ns}	1.12 ± 0.32	1.16 ± 0.35	1.55 ± 0.47	1.63 ± 0.33
IgG2a (ng/ml)	52.62 ± 2.18	136.70 ± 1.76***	103.27 ± 2.98**	155.63 ± 5.22$^{***,\#}$	339.82 ± 13.33$^{***,\#\#\#}$
IgG1(ng/ml)	26.32 ± 0.65	69.29 ± 1.57	500.69 ± 36.01***	64.15 ± 3.33	63.96 ± 3.20$^{\#\#\#}$
IgG2a/IgG1	2.01 ± 0.13	1.97 ± 0.02	0.21 ± 0.01***	2.43 ± 0.12$^{\#}$	5.35 ± 0.44$^{***,\#\#\#}$

[0191] 유청단백질(WP) 및 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)을 투여한 마우스의 혈중 INF-γ 및 IL-4는 대조군 마우스에 비해 미미하게 증가하는 경향을 보였으나 이 차이는 유의하지 않았다. 또한, Th1/Th2에 해당하는 INF-γ/IL-4는 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH) 처리 시 유청단백질(WP) 처리에 비하여 증가하는 것으로 나타났지만, 통계적으로 유의하지는 않았다. IgG2a/IgG1의 경우, 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH) 처리 시 250 mg/kg 투여군 및 500 mg/kg 투여군 모두에서 유청단백질(WP) 처리에 비하여 유의하게 증가하였다.

[0193] 각 마우스 군의 비장세포 사이토카인(INF-γ 및 IL4) 농도 및 항체(IgG2a 및 IgG1) 농도를 하기 표 6에 나타냈다. 통계 처리 및 표시 방법은 표 5에서와 같다.

표 6

[0194] 비장세포 내 사이토카인(INF-γ 및 IL4)및 항체(IgG2a 및 IgG1)의 농도

-	대조군	유청단백질 250 mg/kg	유청단백질 500 mg/kg	유청단백 가수분해물 250 mg/kg	유청단백 가수분해물 500 mg/kg
INF-γ (μg/g)	45.37 ± 0.89	44.30 ± 0.85	45.13 ± 0.63	44.30 ± 0.62	52.19 ± 0.92$^{***,\#\#\#}$
IL-4(μg/g)	2.85 ± 0.28	3.68 ± 0.28	4.57 ± 0.51*	3.51 ± 0.98	3.85 ± 0.16
INF-γ/IL-4	16.74 ± 1.72	12.37 ± 0.87	10.50 ± 1.15	13.28 ± 1.21*	13.67 ± 1.71
IgG2a (μg/g)	0.36 ± 0.08	0.40 ± 0.05	0.48 ± 0.05	0.70 ± 0.08$^{*,\#}$	0.77 ± 0.08$^{**,\#\#}$
IgG1(μg/g)	0.32 ± 0.04	0.82 ± 0.04***	1.89 ± 0.08***	0.53 ± 0.02$^{*,\#\#\#}$	0.72 ± 0.01$^{***,\#\#\#}$
IgG2a/IgG1	1.18 ± 0.30	0.50 ± 0.08	0.26 ± 0.03	1.35 ± 0.16$^{*,\#\#}$	1.08 ± 0.12$^{\#\#\#}$

[0195] INF-γ/IL-4는 대조군에 비하여 유청단백질(WP) 500 mg/kg 투여군에서 유의하게 감소하였다($p<0.01$). IgG2a/IgG1(Th1:Th2)은 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH) 투여군에서 대조군에 비해 유사하거나 높게 나타났고, 유청단백질(WP) 투여군에서는 대조군에 비해 낮은 비율을 나타내었으나 큰 차이는 없었다. 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH) 투여군과 유청단백질(WP) 투여군 사이의 IgG2a/IgG1에는 상당한 차이가 있었다.

[0197] 각 마우스 군 소장에서의 사이토카인(INF-γ 및 IL4) 농도 및 항체(IgG2a 및 IgG1) 농도를 하기 표 7에 나타냈다.

표 7

[0198] 소장 내 사이토카인(INF-γ 및 IL4)의 농도 및 항체(IgG2a 및 IgG1)의 농도

-	대조군	유청단백질 250 mg/kg	유청단백질 500 mg/kg	유청단백 가수분해물 250 mg/kg	유청단백 가수분해물 500 mg/kg
INF-γ (μg/g)	1.92±0.34	1.91±0.79	3.77±0.17	4.54±1.04	6.85±0.62*
IL-4 (μg/g)	3.17±0.003	3.97±0.01***	5.37±0.02***	3.54±0.02$^{***,\#\#\#}$	4.58±0.01$^{***,\#\#\#}$
INF-γ/IL-4	0.61±0.11	0.48±0.20	0.70±0.03	1.281±0.30	1.49±0.14$^{*,\#\#}$
IgG2a (μg/g)	0.28±0.01	0.39±0.01***	0.73±0.03***	0.94±0.04$^{***,\#\#\#}$	1.68±0.03$^{***,\#\#\#}$
IgG1 (μg/g)	6.08±0.25	11.18±0.18***	14.83±0.13***	7.19±0.06$^{*,\#\#\#}$	6.81±0.22$^{\#\#\#}$
IgG2a/IgG1	0.05±0.002	0.04±0.001	0.05±0.002	0.13±0.01$^{\#\#\#}$	0.25±0.01$^{\#\#\#}$

[0199] IL-4 함량은 유청단백질(WP)과 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH) 투여군이 대조군에 비해 유의하게 높았다($p<0.05$). Th1/Th2에 해당하는 INF-γ/IL-4은 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)의 용량이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 500 mg/kg 투여군이 대조군보다 유의하게 높은 수치를 보였다($p<0.05$). 두 그룹의 소장에서 IgG2a 수준은 대조군보다 상당히 높았다. IgG2a/IgG1와 Th1 대 Th2 세포의 비율은 대조군에 비해 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH) 투여군에서 유의하게 높았다($p<0.001$). 유청단백질(WP)군과 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)투여군 간 IgG2a/IgG1은 투여량 측면에서 유의한 차이가 있었다($p<0.001$).

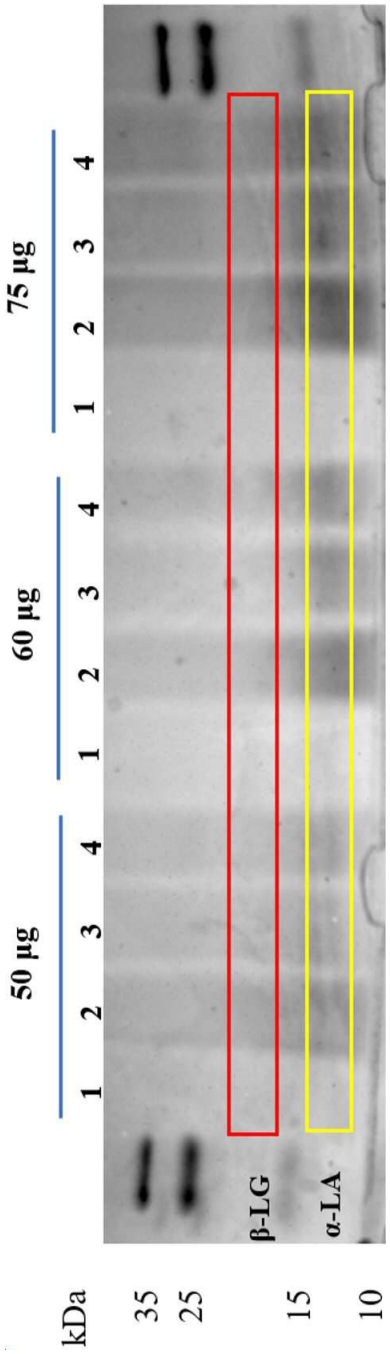
[0201] 종합하면, 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)을 경구투여한 경우, 혈액, 비장세포 및 소장에서 Th1 사이토카인 및 항체 수준이 증가된 반면, Th2 사이토카인 및 항체 수준은 유청단백질(WP) 군보다 낮았다. 이와 같이, 본 발명의 저알레르기성 유청단백 가수분해물은 Th1 세포(T helper cell 1)에 의한 면역반응을 유도하고, Th2 세포(T helper cell 2)에 의한 면역반응을 감소시켜 우유 알레르기 반응을 감소시킴을 확인할 수 있었다.

[0203] **실시예 7-2: 동물의 혈청, 비장세포, 소장 내 IgE 함량 분석**

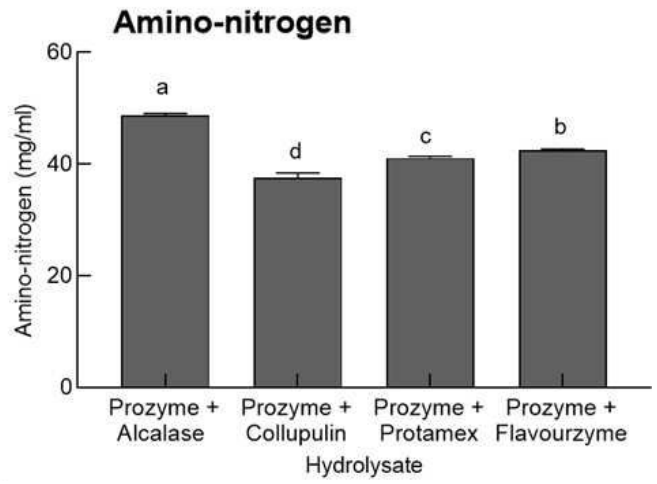
[0204] 또한, 혈액, 비장세포 및 소장의 IgE 함량 변화을 측정하고, 도 9a 내지 도 9c에 나타냈다. IgE 함량은 유청단백질(WP) 투여군 및 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH) 투여군 간에 유의미한 차이가 있었다. 저알레르기성 유청단백 가수분해물(HWPH)에서는 α-락트알부민과 β-락토글로불린이 분해되었으므로, 유청단백질(WP)에 비해 알레르기항원 관련 세포 내 면역반응 수준이 낮아 알레르기항원성이 낮음을 확인할 수 있었다.

도면

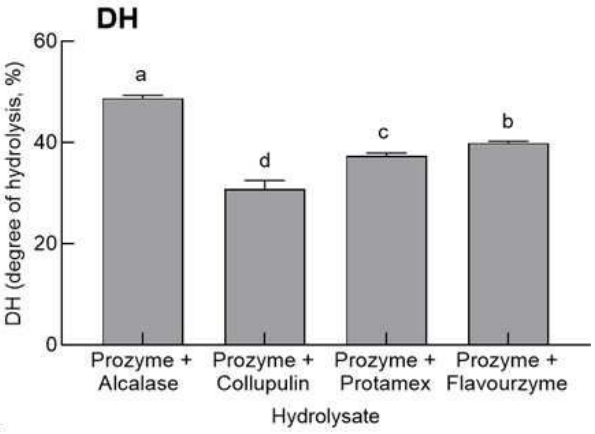
도면1



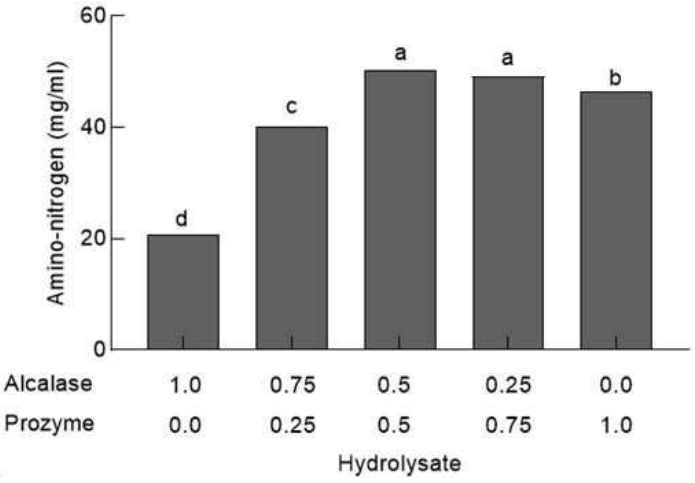
도면2a



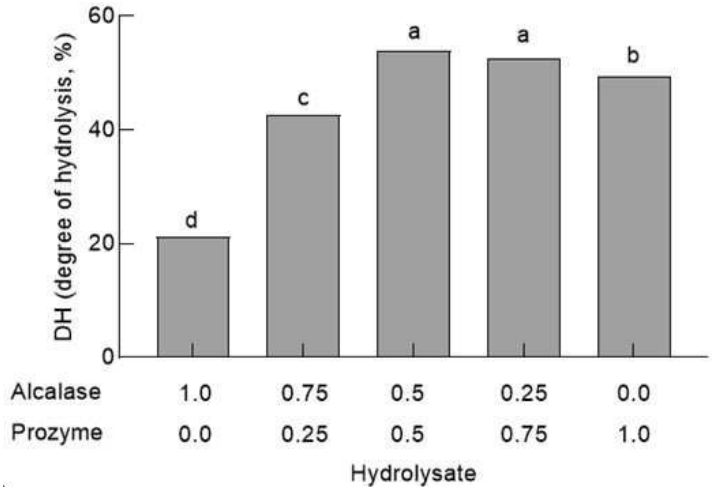
도면2b



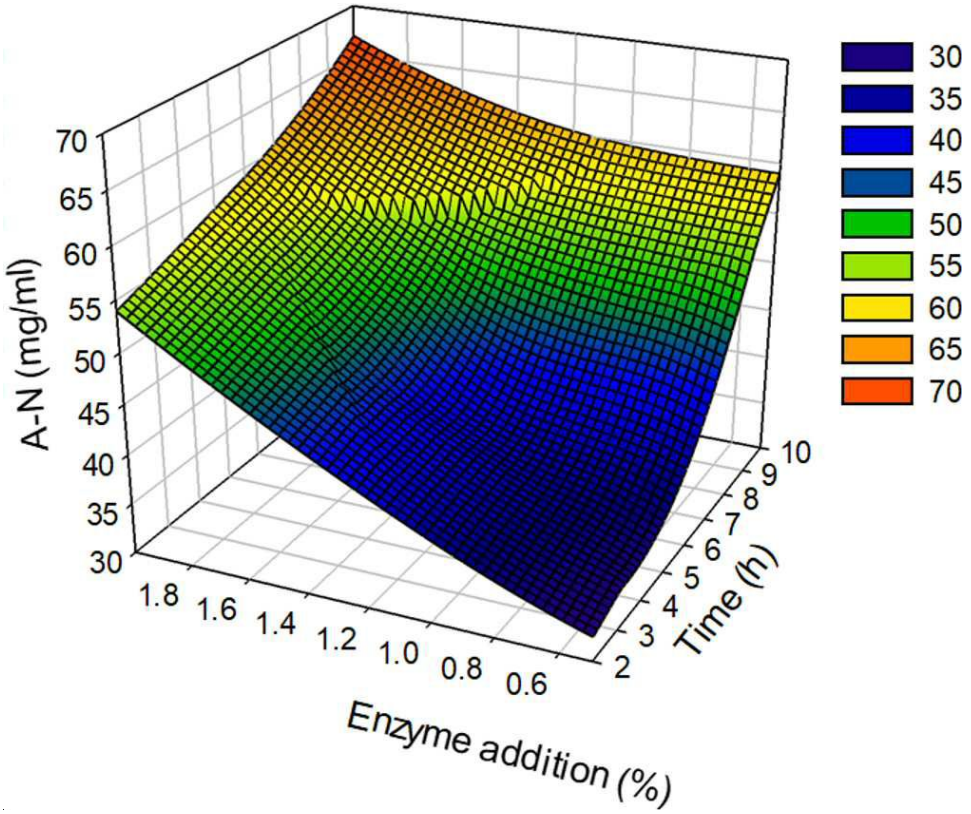
도면3a



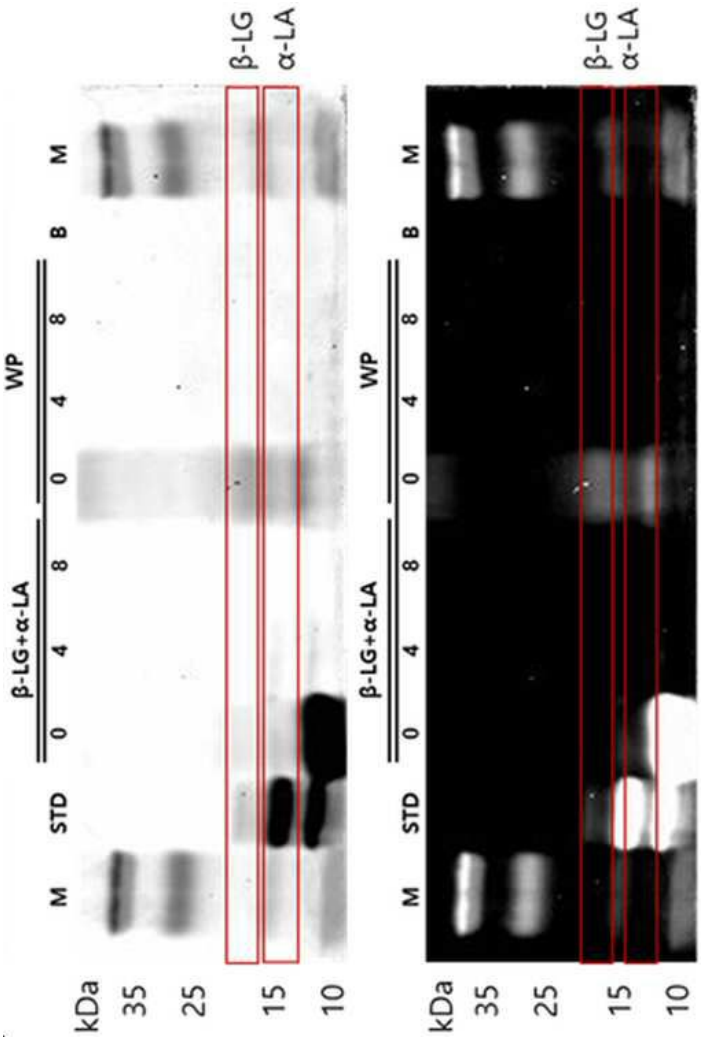
도면3b


DH (degree of hydrolysis, %)
60
40
20
0
a
a
b
c
d
Alcalase 1.0 0.75 0.5 0.25 0.0
Prozyme 0.0 0.25 0.5 0.75 1.0
Hydrolysate

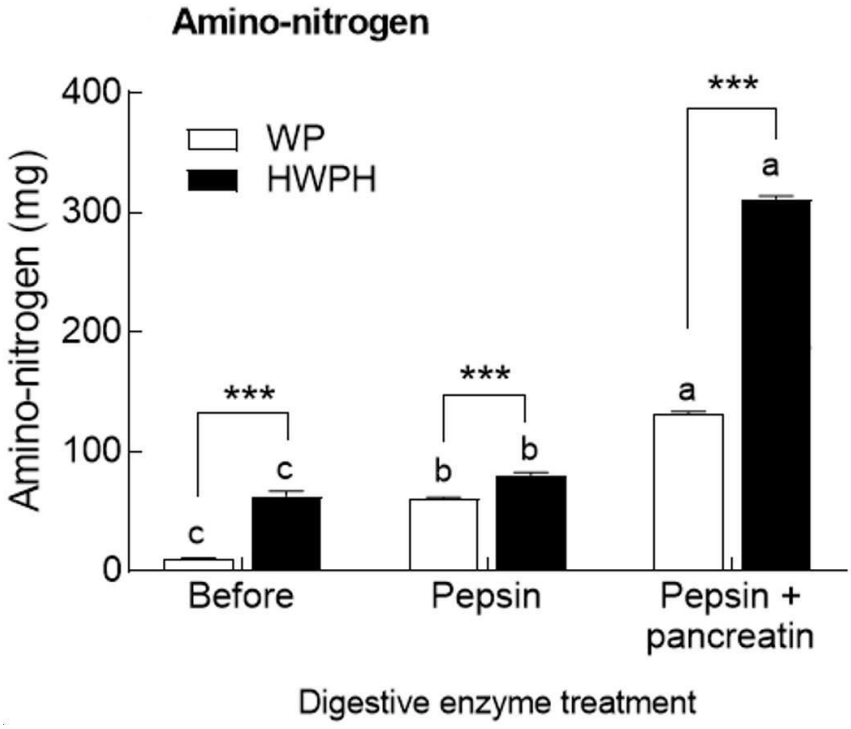
도면4


A-N (mg/ml)
70
65
60
55
50
45
40
35
30
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
Enzyme addition (%)
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Time (h)
30
35
40
45
50
55
60
65
70

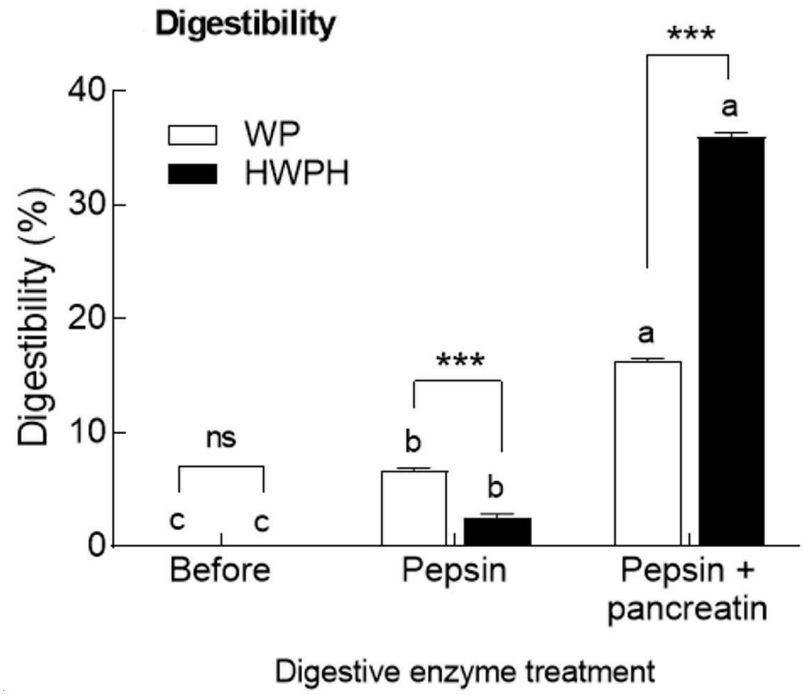
도면5



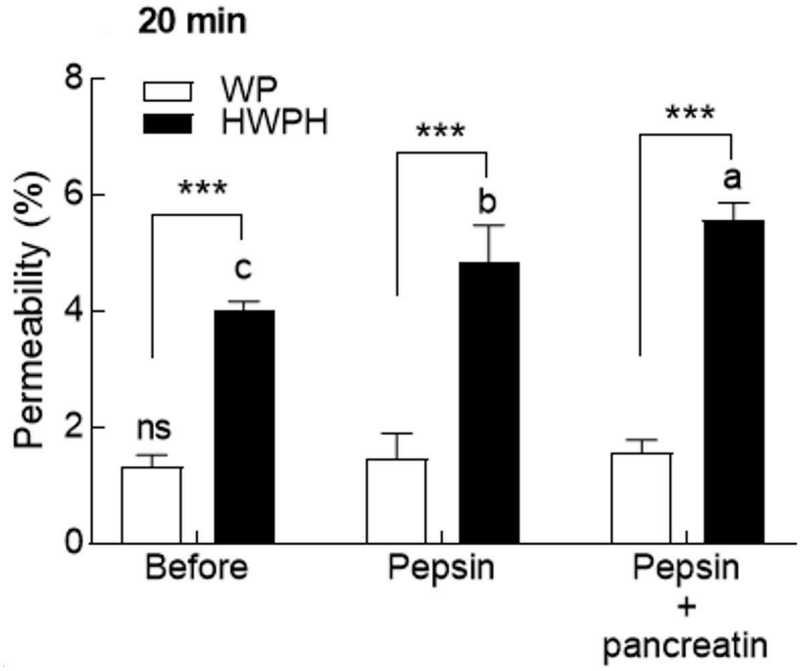
도면6a


Amino-nitrogen
Amino-nitrogen (mg)
400
300
200
100
0
WP
HWPH
***
***
***
a
a
b
b
c
c
Before
Pepsin
Pepsin +
pancreatin
Digestive enzyme treatment

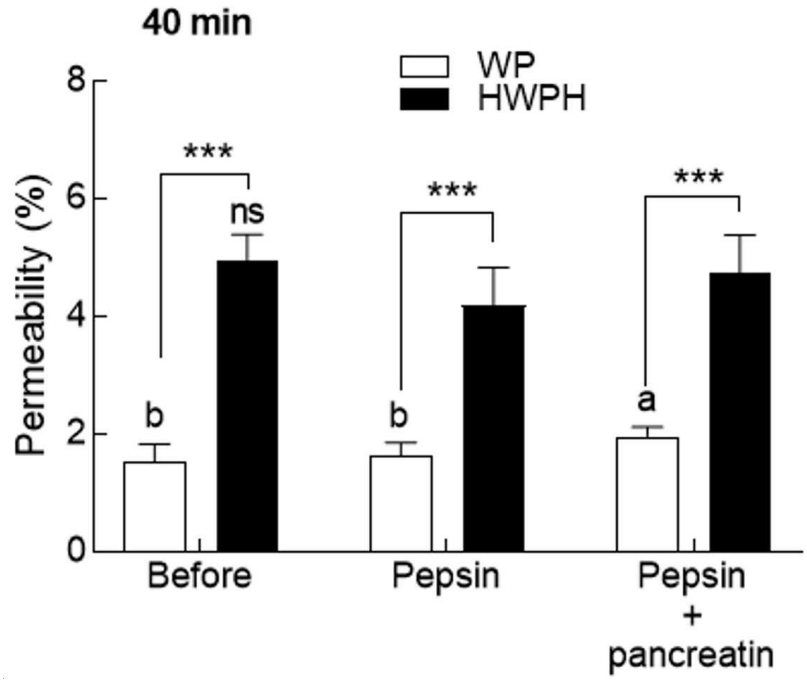
도면6b


Digestibility
Digestibility (%)
40
30
20
10
0
WP
HWPH
***
***
ns
a
a
b
b
c
c
Before
Pepsin
Pepsin +
pancreatin
Digestive enzyme treatment

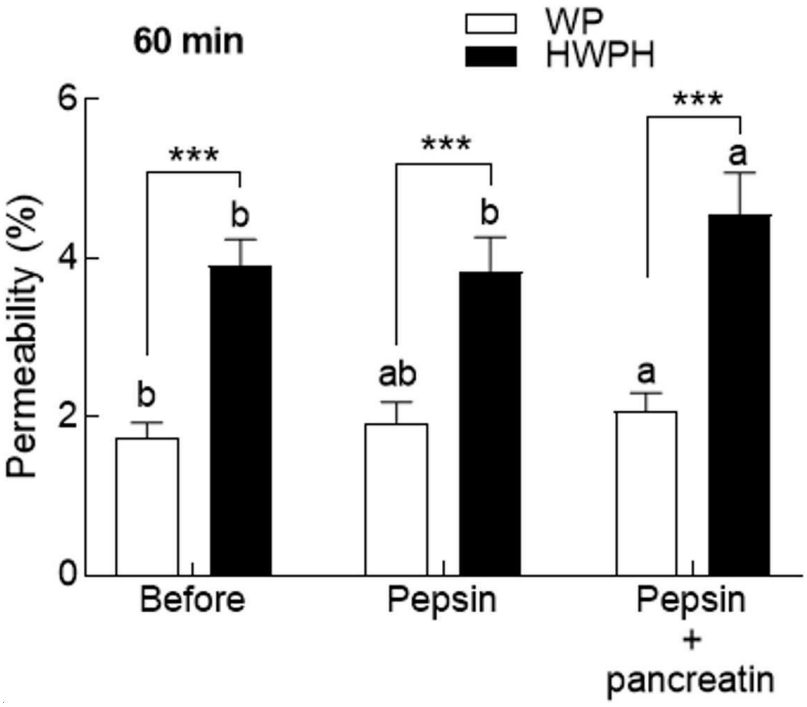
도면6c


20 min
WP
HWPH
Permeability (%)
0
2
4
6
8
ns
c
b
a
***
***
***
Before
Pepsin
Pepsin
+
pancreatin

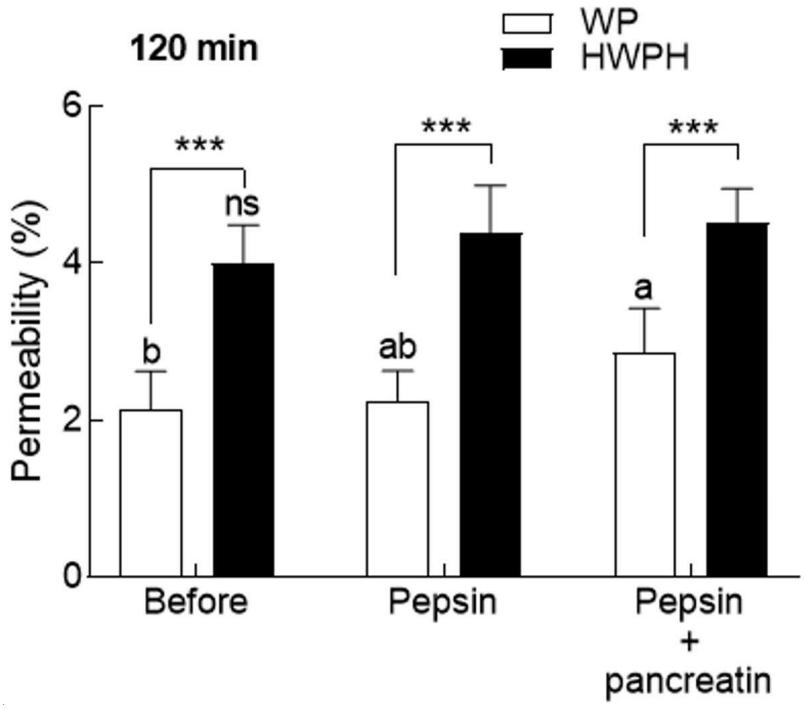
도면6d


40 min
WP
HWPH
Permeability (%)
0
2
4
6
8
b
ns
b
a
***
***
***
Before
Pepsin
Pepsin
+
pancreatin

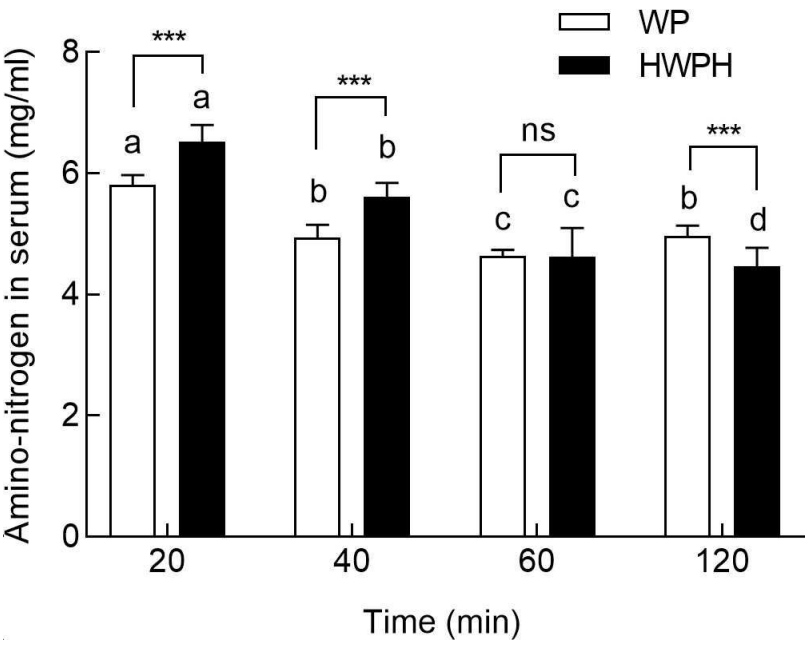
도면6e


60 min
WP
HWPH
Permeability (%)
0
2
4
6
***
***
***
b
b
ab
b
a
a
Before
Pepsin
Pepsin
+
pancreatin

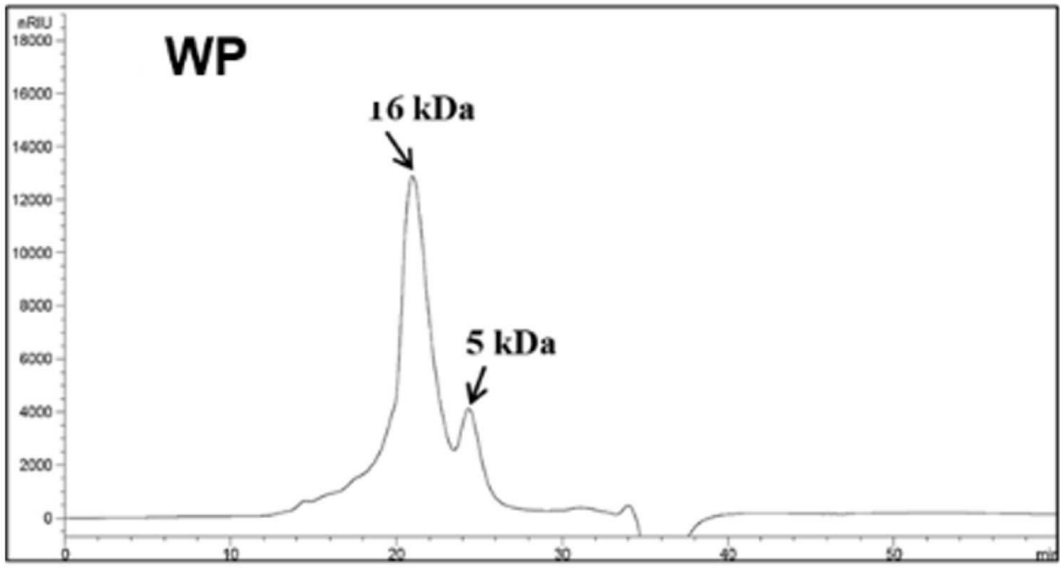
도면6f


120 min
WP
HWPH
Permeability (%)
0
2
4
6
***
***
***
ns
b
ab
a
Before
Pepsin
Pepsin
+
pancreatin

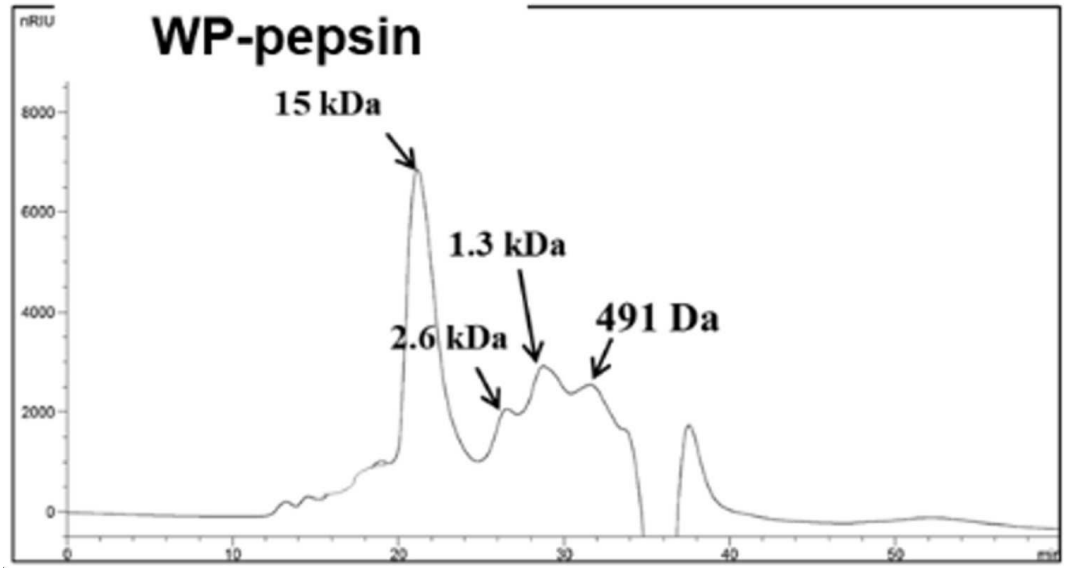
도면7


WP
HWPH
Amino-nitrogen in serum (mg/ml)
Time (min)
20
40
60
120
***
***
ns
***
a
a
b
b
c
c
b
d

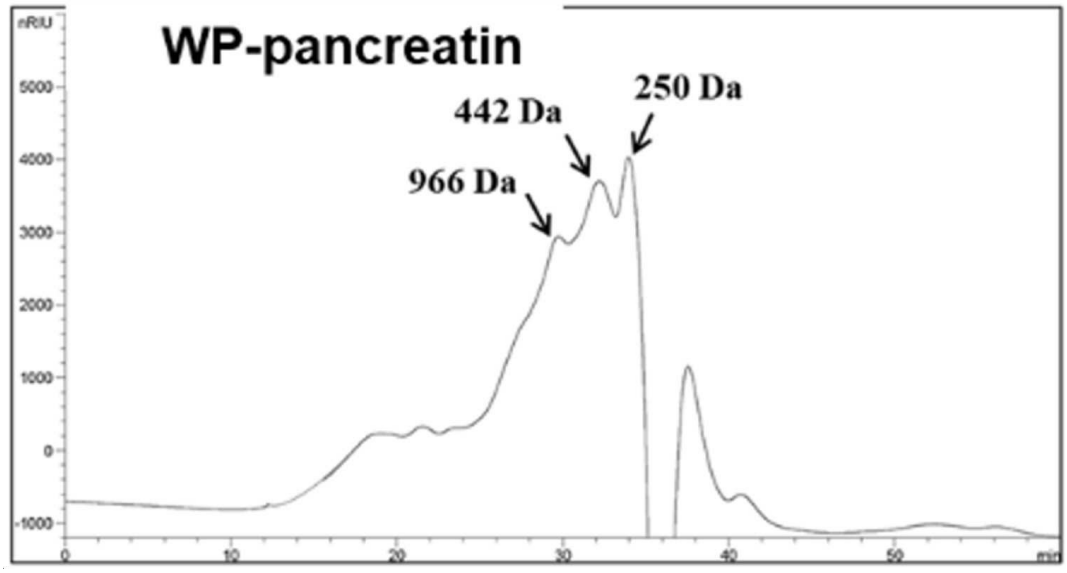
도면8a


WP
16 kDa
5 kDa

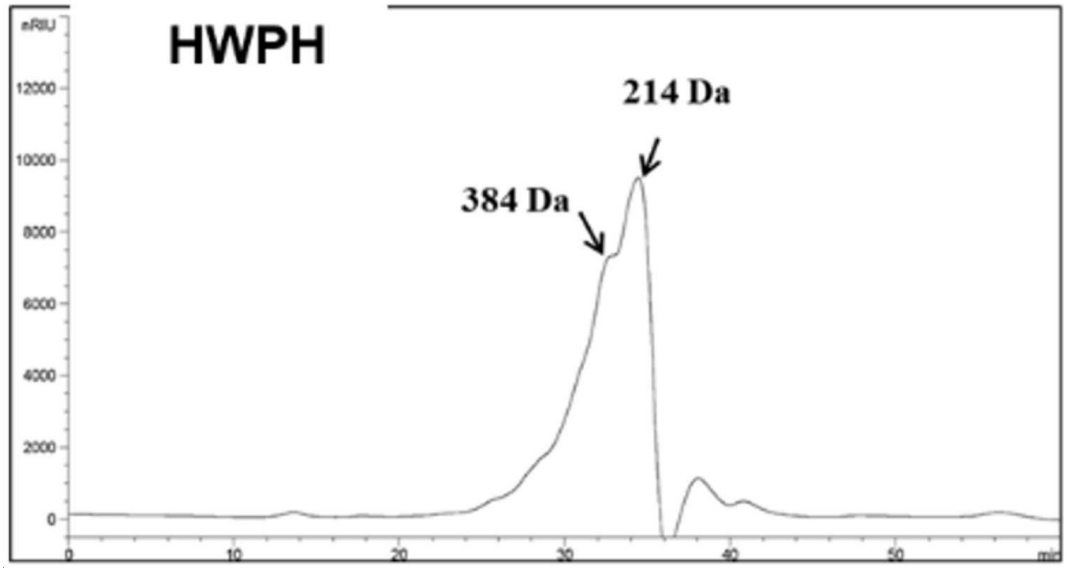
도면8b


WP-pepsin
nRIU
15 kDa
1.3 kDa
2.6 kDa
491 Da
8000
6000
4000
2000
0
0
10
20
30
40
50
min

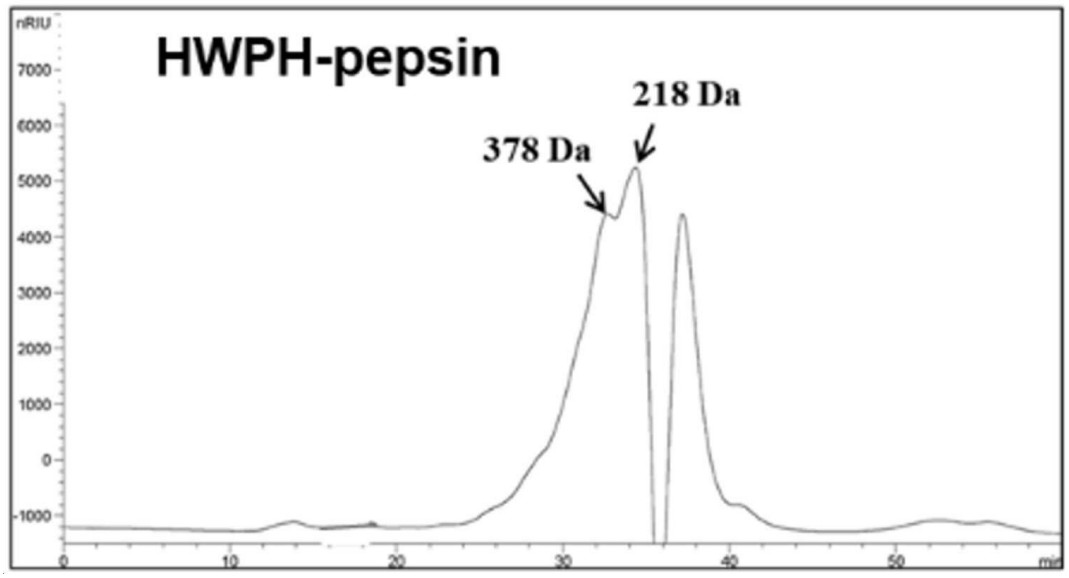
도면8c


WP-pancreatin
nRIU
250 Da
442 Da
966 Da
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
0
10
20
30
40
50
min

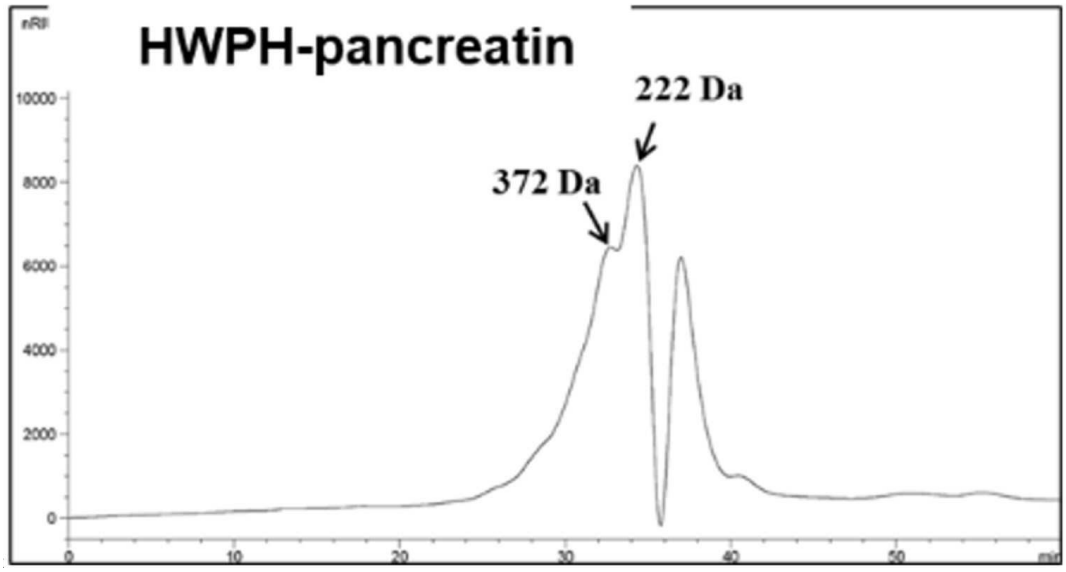
도면8d


HWPH
214 Da
384 Da
nRIU
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
10
20
30
40
50
min

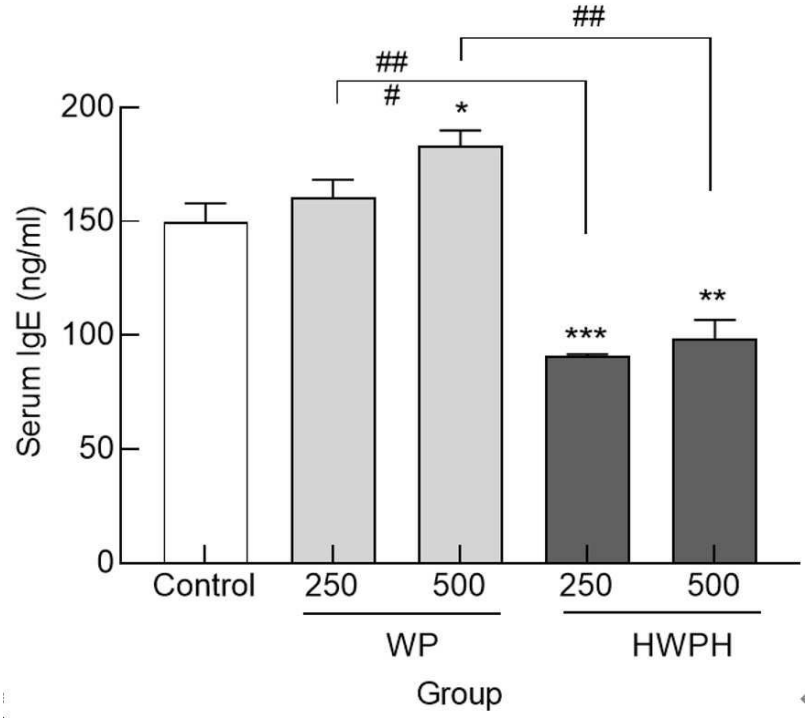
도면8e


HWPH-pepsin
218 Da
378 Da
nRIU
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
0
10
20
30
40
50
min

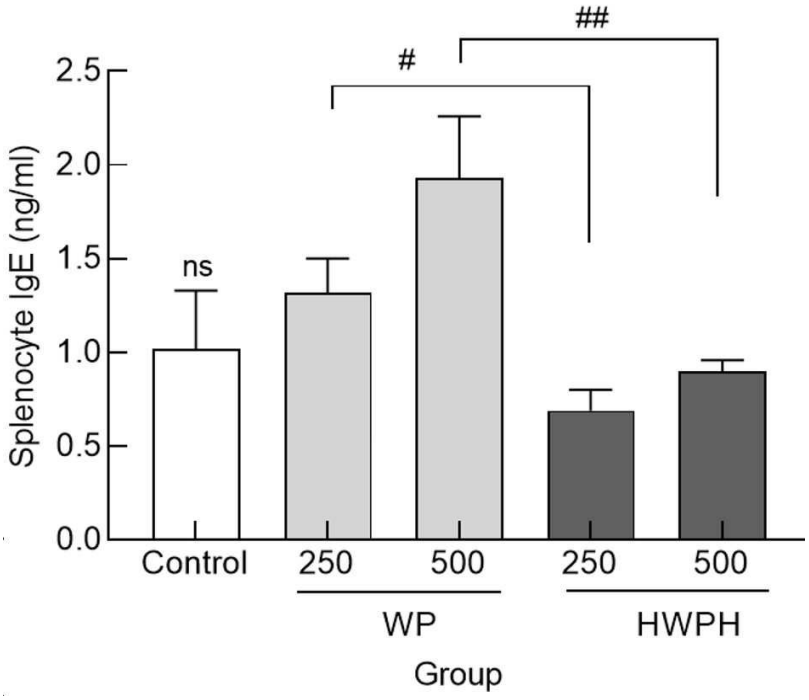
도면8f


HWPH-pancreatin
222 Da
372 Da
nRIU
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
10
20
30
40
50
min

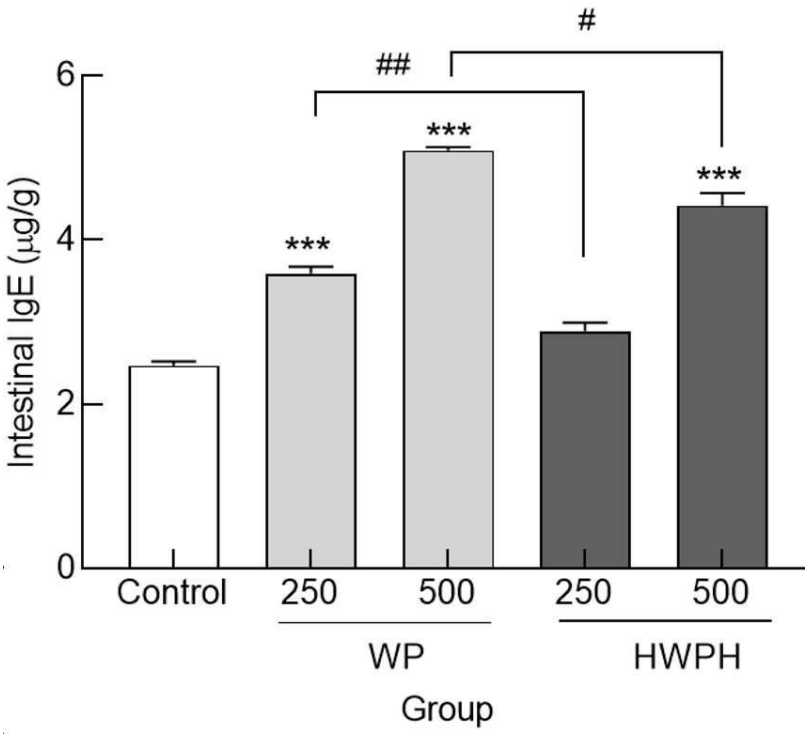
도면9a


##
##
#
*
***
**
Serum IgE (ng/ml)
200
150
100
50
0
Control
250
500
250
500
WP
HWPH
Group

도면9b


##
#
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Splenocyte IgE (ng/ml)
ns
Control
250
500
250
500
WP
HWPH
Group

도면9c


#
##
6
4
2
0
Intestinal IgE (μg/g)
***
***
***
Control
250
500
250
500
WP
HWPH
Group