

ANIMAL

# Biological properties of fermented milk with fortified whey protein

Ki Hwan Kim<sup>1</sup>, Seok Han Ra<sup>2</sup>, Gereltuya Renchinkhand<sup>1</sup>, Woo Jin Ki<sup>1</sup>, Myoung Soo Nam<sup>1\*</sup>, Woan Sub Kim<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Animal Resources Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

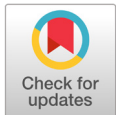
<sup>2</sup>Center for Research and Development, Chungmi-Bio Company, Ansong 17528, Korea

<sup>3</sup>Research Center for Environment Friendly and Quality Livestock Production Technology, Hankyong National University, Ansong 17579, Korea

\*Corresponding authors: [namssoo@cnu.ac.kr](mailto:namssoo@cnu.ac.kr), [kimws@hknu.ac.kr](mailto:kimws@hknu.ac.kr)

## Abstract

As a byproduct obtained from cheese manufacture, whey protein was developed as a functional food that contains multi-functional proteins. In this study, the biochemical activity of fermented milk prepared by fortifying whey protein with excellent physiological activity was investigated. Immunoglobulin (IgG) content was higher in 10% fortified whey protein fermented milk than in the control. The viable cell counts were 20% higher in the fermented milk with 10% fortified whey protein than in the control group. The antibacterial effect of 10% fortified whey protein fermented milk compared to the control group was shown to be effective against four pathogenic microorganisms, *Escherichia coli* (KCTC1039), *Pseudomonas aeruginosa* 530, *Salmonella* Typhimurium (KCTC3216), and *Staphylococcus aureus* (KCTC1621). The antioxidant effect by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities was increased two-fold in 10% fortified whey protein fermented milk compared to the control. The 10% fortified whey protein fermented milk inhibited the expression of the inflammatory cytokines (interleukin [IL]-6, tumor necrosis factor [TNF]- $\alpha$ , and induced nitric oxide synthase [iNOS]) in a concentration-dependent manner. In a piglets feeding test, the weight gain with 10% fortified whey protein fermented milk was increased by 18% compared to the control group, and no diarrhea symptoms appeared. Our results clearly demonstrated that 10% fortified whey protein fermented milk could be a useful functional ingredient for improving health.



## OPEN ACCESS

**Citation:** Kim KH, Ra SH, Renchinkhand G, Ki WJ, Nam MS, Kim WS. Biological properties of fermented milk with fortified whey protein. Korean Journal of Agricultural Science 50:323-336. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20230023>

**Received:** March 28, 2022

**Revised:** May 02, 2023

**Accepted:** May 17, 2023

**Copyright:** © 2023 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Key words:** antimicrobial, anti-inflammatory, diarrhea, piglets, viable cell count

## Introduction

최근에 건강기능성 식품의 지속적인 소비 증가에 힘입어 유청단백질을 강화한 단백질 제 품들이 출시되고 있고 소비도 가파르게 증가하고 있다. 유청단백질은 우유 단백질 중 약 20% 를 차지하고 있다(Fox, 1989). 유청단백질의 주된 성분은 영양성분이 우수한  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, serum albumin과 생리활성 기능이 우수한 lactoferrin, immunoglobulin, lactoperoxidase, 각종 미량 cytokine 등 다양한 생리활성 성분이 함유되어 있어 기능성 식품으

로 인식됨에 따라(Gill et al., 2000; Walzem et al., 2002; Marshall, 2004) 기능성 식품과 음료 제조에 첨가제로의 가치가 있다(Huth et al., 2004). 유청단백질의 생리활성 연구는 많은 학자들에 의해 밝혀졌는데 Marcone 등(2017)은 우유 유래 생리활성 peptides와 건강증진 효과에서 동맥경화증에 대해 언급하였고, Walzem 등(2002)은 유청단백질성분이 포유류 영양을 위한 기능들에 관한 진화를 언급하였다.

유청단백질은 세포재생 촉진(Corkins et al., 1999), 장관세포의 성장(Donnet-Hughes et al., 2000), 병원성미생물의 성장저해(Yamauchi et al., 1993), prebiotic 효과(Petschow et al., 1999), 독성물질 제거(Boes et al., 1998) 등의 기능이 있음을 보고하였다. 또한 유청단백질은 암세포 성장 저해(Ushida et al., 1998; Iigo et al., 1999; Ushida et al., 1999; Tsuda et al., 2000), 항콜레스테롤혈증(Zhang and Beynen, 1993; Beena and Prasad, 1997), 노화방지 기능(Bounous et al., 1989) 등도 보고되었다. 한편 유청단백질을 효소로 가수분해시켜 생성된 peptides의 생리활성기능 보고를 보면  $\beta$ -lactoglobulin을 trypsin으로 처리하여 생성된 peptides의 혈중콜레스테롤 저하 기능(Nagaoka et al., 2001), 유청단백질의 혈중콜레스테롤 저하 기능(Nagaoka et al., 1992), 유청단백질을 고압처리하여 생성된 peptides의 cytokine 발현 억제(Piccolomini et al., 2012; Iskandar et al., 2013), 유청단백질의 가수분해에 의해 생성된 peptides의 아토피피부증상 감소(Shimizu et al., 2006), lactoferrin의 cytokine 생산 억제(Haversen et al., 2002), lactoferrin의 항관절염 기능(Yan et al., 2013a; 2013b) 등이 보고되었다. 유청단백질로부터 유래된 항산화기능 peptide (Bounous and Gold, 1991), morphine과 같은 통증완화 기능이 있는 opioid agonists 역할을 하는 peptides는 lactorphins ( $\alpha$ -lactalbumin f50-53,  $\beta$ -lactoglobulin f102-105)으로 보고되었고, 항균작용이 있는 peptides는 bovine lactoferrin과 human lactoferrin 유래의 lactoferricins (Kitts and Weiler 2003; Wakabayashi et al., 2003)으로 이는 pepsin 분해 효소에 의해 생성된 peptides이다.

이와 같이 유청단백질과 유청단백질 분해물의 다양한 생리활성 기능들을 이용한 건강기능성 식품으로 응용 분야를 확대시키고 가축에 적용하여 장 건강과 면역력을 향상시켜 폐사율을 감소시키는데 크게 기여할 것으로 기대한다. 따라서 본 연구는 유청단백질(whey protein)이 강화된 발효유 개발과 생리활성 기능을 연구하는데 그 목적이 있다.

## Materials and Methods

### 시료 및 Starter

대조구는 탈지분유(Seoul milk Cooperation, Seoul, Korea)를 10% 환원탈지유로 제조하였고 실험구는 대조구에 10% 유청단백질 분말(Samic Milk Cooperation, Seoul, Korea)를 추가하여 85°C에서 10분 동안 열처리 후 37°C로 냉각하고 스타터 3%를 첨가하여 48시간 배양하였다. 스타터는 DVS (direct vat set) type인 YoMix 726® (Dupont Danisco, Sassenage, France)를 구매하여 사용하였다. Starter 유산균 구성은 *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*이다.

### IgG 함량 측정

Bovine IgG 양은 ELISA Kit (Cygnus Technologies, NC, USA)로 측정하였다. 측정방법은 Kit에 제시된 방법대로 실시하였다.

## 유청단백질 강화 발효유 특성 조사

대조구와 실험구를 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 발효시키면서 산도, pH, 생균수, 유기산, 유당분해를 측정하였다. pH 측정은 pH 측정기(Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)로 측정하였다. 적정 산도는 시료 9 g에 증류수 9 mL와 phenolphthalein 지시약 0.5 mL을 첨가한 후, 0.1 N NaOH로 적정하여 계산하였다. 생균수는 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 동안 배양한 발효액을 10진법에 따라 희석한 후 BCP agar (Eiken Chemical Co., Ltd., Tochigi, Japan)에 분주하여 48시간 배양 후 colony의 수가 30 - 300개 범위로 나타낸 평판을 선별하여 log CFU (colony forming unit)·mL<sup>-1</sup>으로 표시하였다. 유기산과 당은 발효유를 원심분리기(Mega 17R, Hanil Science Industrial, Daejeon, Korea)를 사용하여 6,800 × g에서 20 min 동안 원심분리하여 casein을 제거한 상정액을 회수하였다. 분리된 상정액을 채취하여 0.2 μM membrane filter (Hyundai micro, Seoul, Korea)를 사용하여 여과 후 HPLC system (600E Multisolvant Delivery System, Waters Associates, MA, USA)을 사용하여 분석하였다. 유기산 분석은 UV Detector (2487 UV detector, Waters Associate, MA, USA), 당은 Refractive Index Detector (2410 RI Detector, Waters Associates, MA, USA)를 사용하였다. Column은 유기산과 당 전환 분석은 SUPELCOGEL C-610H (38 cm × 7.8 mm, Sigma-Aldrich Co., MO, USA)을 사용하였고, column의 온도는 Waters Column Heater Module (serial #F98CHM095M)을 사용하여 40°C를 유지하였다. Mobile phase는 phosphoric acid (Samchun chemical, Yeosu, Korea)를 3차 증류수에 0.1% (v·v<sup>-1</sup>)의 농도로 희석하여 사용하였다. 상정액 40 μL를 주입하여 1.0 mL·min<sup>-1</sup> 유속으로 40분 동안 용리하였다. 실험에 사용된 표준물질은 Sigma-Aldrich Co. (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 분석에 사용하였다.

## SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

발효유를 원심분리기(Mega 17R, Hanil Science Industrial, Daejeon, Korea)를 사용하여 3,700 × g에서 10 min 동안 원심분리 하였다. 분리된 상정액은 유청단백질 시료이며 침전된 시료는 casein으로 분리하여 각각 투석막에 넣어 24시간 동안 투석시킨 후 채취해 동결 건조 후 시료로 사용하였다. SDS-PAGE는 12% acrylamide gel, 10% SDS를 함유한 1.5 M Tris (pH8.8)와 0.5 M Tris (pH6.8), 10% ammonium persulfate (APS)를 조제하여 사용하였다. Gel은 0.2% (w·v<sup>-1</sup>) commassie brilliant blue R-250 (Sigma Co, Louis, MO, USA)을 함유한 acetic acid/ methanol/water(1 : 5 : 5, v·v<sup>-1</sup>·v<sup>-1</sup>) 용액으로 염색하였으며, 탈색은 acetic acid/methanol/water (1 : 3 : 6, v·v<sup>-1</sup>·v<sup>-1</sup>) 용액으로 하였다. Standard marker로는 Precision plus protein<sup>TM</sup> standards (Bio-Red, Hercules, California, USA)를 사용하였다.

## 발효유의 생리활성 기능

### 항균 효과

*Escherichia coli* (KCTC1039), *Staphylococcus aureus* (KCTC1621), *Salmonella Typhimurium* KCTC3216 병원성 미생물을 KCTC로부터 분양 받았고, *Pseudomonas* 530은 한경대학교 우유식품생명화학실험실에서 분양 받아 사용하였다. 병원성 미생물을 LB broth (Difco, NJ, USA)에 3% 농도로 접종시킨 후 100 μL를 취하여 96 well microplate에 넣고, 시료(대조구로 탈지유 발효유와 실험구인 10% 유청 강화 발효유를 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 발효)는 well 당 100 μL씩 첨가한 후에 37°C에서 48시간 동안 배양하면서 3시간마다 microplate reader (Thermo Scientific, MA, USA)를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 항산화 효과

항산화 효과는 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma Aldrich, MO, USA) Radical 소거능 활성 검사는 Blois (1958)의 방법을 응용하여 진행했다. 증류수에 희석한 시료를 0.2 mM DPPH와 혼합하여 96 well plate에 분주한 후 25°C 암실에서 10분간 반응한 후 microplate reader (Thermo Scientific, MA, USA)를 이용해 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 95% ethanol과 50 mg·mL<sup>-1</sup>의 농도로 희석한 시료를 사용하였고 0.2 mM DPPH와 95% ethanol을 혼합한 것을 대조구로 사용하였다. 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 동일한 농도로 용해하여 사용하였다.

$$\text{RSA (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{Abs(sample)} - \text{Abs(sample blank)}}{\text{Abs(control)}} \right) \times 100 \quad (1)$$

RSA: radical scavenging activity

### 항염증 효과

항염증 효과는 mouse 기원인 RAW 264.7 macrophage cell line을  $1.0 \times 10^5$  cells·well<sup>-1</sup>로 분주 후 Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco, MA, USA)에 10% (v·v<sup>-1</sup>) fetal bovine serum (Gibco, MA, USA)과 1% (v·v<sup>-1</sup>) Penicillin-Streptomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 세포를 24시간 배양하였다. 음성대조구(LPS-) (lipopolysaccharide)와 양성대조구(LPS+) (*E.coli* 0127:B8, Sigma, MO, USA), 시료(10% 탈지발효유 0, 48시간 발효, 10% 유청단백질 강화발효유 0, 48시간 발효)를 각각 RAW 264.7 세포에 처리하였다. 처리 조건은 6 well plate에 RAW 264.7 세포  $1.5 \times 10^5$  cells·well<sup>-1</sup>에 발효배양액 2 mL 분주하고 24시간 배양 후 세포생존을 실험 결과를 통해 최적화한 추출물 처리 농도인 1 mg·mL<sup>-1</sup> 농도로 추출물을 배양중인 RAW 264.7 세포에 처리하고 24시간 동안 각 추출물을 처리한 후 LPS를 1 µg·mL<sup>-1</sup> 농도로 첨가한 뒤 30분 동안 배양하였다. 각 시료와 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포의 RNA를 eCube Tissue RNA Mini Kit (PhileKorea, Seoul, Korea)를 이용하여 RNA를 추출하였다. Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, MA, USA)를 이용해 RNA를 정량한 뒤 총 RNA 1 µg에 Random Hexamer (100 pmol·µL<sup>-1</sup>) 1 µL, dNTP mix (10 mM) 1 µL를 넣은 후 DEPC-treated water를 이용해 총 부피를 10 µL로 조정하고 65°C에서 5분간 반응시킨 후, 즉시 얼음에 냉각시킨 다음, M-MLV reverse transcriptase (Promega, WI, USA) 1 µL, 5× M-MLV RT reaction buffer (Promega, WI, USA) 4 µL, RNase inhibitor (Termo Fisher, MA, USA) 1 µL, DEPC-treated water 4 µL를 각각 추가적으로 첨가하였다. 10 분간 실온에 둔 뒤에 1시간 동안 50°C에서 반응시켜 cDNA를 합성한 후 cDNA를 증류수로 1/10로 희석시켜 IL (interleukin)-1β, TNF (tumor necrosis factor)-α, iNOS (inducible nitric oxide synthase), IL (interleukin)-6와 β-actin의 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 이용해 비교했다. qRT-PCR은 1/10로 희석시킨 cDNA 5 µL에 nuclease free water 2 µL, 2X Prime Q-mater Mix 10 µL, 10 pmol·µL<sup>-1</sup> forward primer와 10 pmol·µL<sup>-1</sup> reverse primer를 각각 1.5 µL씩 넣고 AriaMx를 이용하여 95°C에서 5분, 95°C에서 20초, 58°C에서 20초, 72°C에서 20초로 40 cycle 실시하여 수행하였다. Internal standard로 β-actin을 사용하여 IL-1β, TNF-α, iNOS, IL-6의 mRNA 발현량을 보정한 뒤 LPS를 처리하지 않은 대조군에 대비한 상대적인 mRNA 발현을 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)로 확인하였다(Table 1).

### 자돈급여 사양시험

대조구와 처리구(실험구)를 각각 자돈 20두로 구성하고 생시 일령, 25일령, 32일령, 39일령에 걸쳐 사양실험을 실시하였다. 발효유 급여는 1일 3회, 매회 50 mL 급여하면서 증체율과 설사 증상을 조사하였다.

**Table 1.** qRT-PCR primer on inflammatory related cytokine.

Gene		Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)
IL-1 $\beta$	F	AGG TCA AAG GTT TGG AAG CA	129
	R	TGA AGC AGC TAT GGC AAC TG	
TNF- $\alpha$	F	AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT	103
	R	CCA CCA CGC TCT TCT GTC TAC	
iNOS	F	CAG CTG GGC TGT ACAAAC CTT	95
	R	CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG	
IL-6	F	GTC CTT CAG AGA GAT ACA GAAACT	113
	R	AGC TTA TCT GTT AGG AGA GCA TTG	

qRT-PCR, real-time reverse transcription-polymerase chain reaction; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; iNOS, inducible nitric oxide synthase.

## 통계처리

모든 실험은 3회반복하여 실시하였고 평균±표준편차로 표시하였다.

## Results and Discussion

### IgG 함량

면역글로블린(IgG) 함량 결과는 Table 2에 나타난 바와 같이 대조구인 10% skim milk (0 h)는  $215.21 \pm 12.10$  ng·mL<sup>-1</sup>에 비해 10% skim milk로 48시간 발효유에서  $192.60 \pm 2.52$  ng·mL<sup>-1</sup>로 약 23 ng·mL<sup>-1</sup>이 감소되었는데 이는 48시간 발효과정 중 IgG가 일부 분해되어 나타난 현상으로 사료된다. 또한 10% 유청단백질 강화발효유(0 h)는  $398.43 \pm 3.48$  ng·mL<sup>-1</sup>이었으나 10% 유청단백질 강화발효유(48 h)에서는  $362.50 \pm 3.67$  ng·mL<sup>-1</sup>이 함유되어 있어서 10% 유청단백질 강화 발효유(48 h)가 36 ng·mL<sup>-1</sup> 낮게 함유되었다. 이 또한 48시간 발효 과정 중 IgG가 일부 분해되어 나타난 현상으로 사료된다. 10% whey protein이 첨가된 발효유가 대조구보다 면역글로블린 함량이 높은 것은 whey protein에 함유된 면역글로블린(IgG) 함량이 높기 때문이다.

**Table 2.** Change of IgG contents in control group (10% skim milk) and 10% fortified whey protein group for 48 h fermentation.

Sample	IgG concentration (ng·mL <sup>-1</sup> )
10% skim milk (0 h)	$215.21 \pm 12.10$
10% skim milk (48 h)	$192.60 \pm 2.52$
Fortified 10% whey protein (0 h)	$398.43 \pm 3.48$
Fortified 10% whey protein (48 h)	$362.50 \pm 3.67$

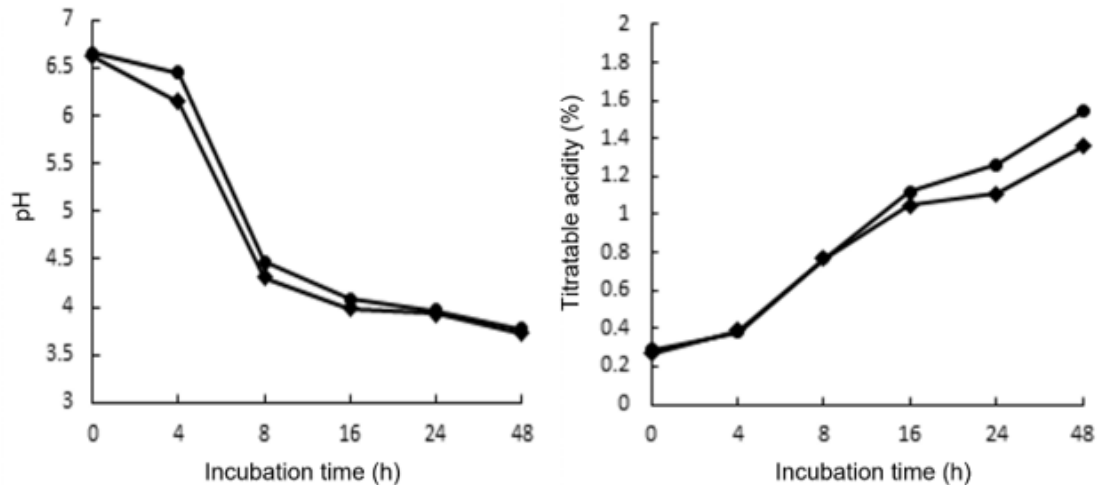
IgG, immunoglobulin G.



## 발효 특성

### pH와 산도

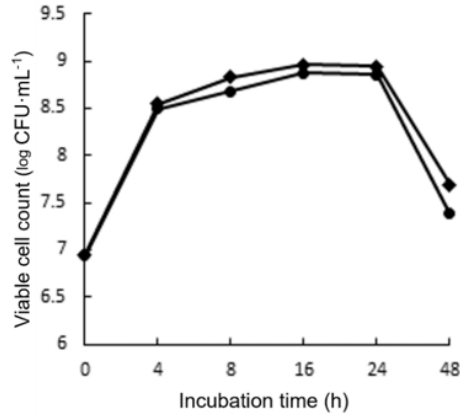
0, 4, 8, 16, 24, 48시간 동안 발효가 진행되면서 변화하는 pH와 산도는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 0시간째 6.7로 시작하여 4시간 경과 때 대조구는 6.5, 실험구는 6.2로 나타났고, 8시간 경과 때는 급격히 떨어져서 대조구는 4.6, 처리구는 4.4로 나타났으며, 16시간 경과 때는 각각 pH 4.3, pH 4.2였으나 24시간, 48시간 경과 때는 두 처리구 모두 각각 같은 값인 pH 4.2와 pH 4.0으로 나타났다. 따라서 발효 16시간 이전에는 실험구가 대조구에 비해 pH가 더 낮았고, 16시간 이후부터 동일하였다. 또한 산도는 0시간째 0.27%로 시작하여 4시간 경과 때 대조구와 실험구는 0.4%로 같았고, 8시간 경과 때 0.8%로 같았으나, 16시간 이후부터는 대조구는 1.2%, 실험구는 1.0%로 나타났고, 24시간 경과 때는 각각 1.3%와 1.1%로 나타났고, 48시간 경과 때는 각각 1.6%와 1.4%로 나타나 발효 후반에 대조구가 산 생성이 약간 높았다. 따라서 대조구와 실험구 모두 유산균이 활발하게 성장하여 유산 생성이 정상적으로 잘 이루어졌다.



**Fig. 1.** Changes of pH and acidity of general fermented milk (control) and fermented milk with 10% fortified whey protein for 0, 4, 8, 16, 24 and 48 h fermentation. ●, general fermented milk (control); ■, fermented milk with 10% fortified whey protein.

### 생균수

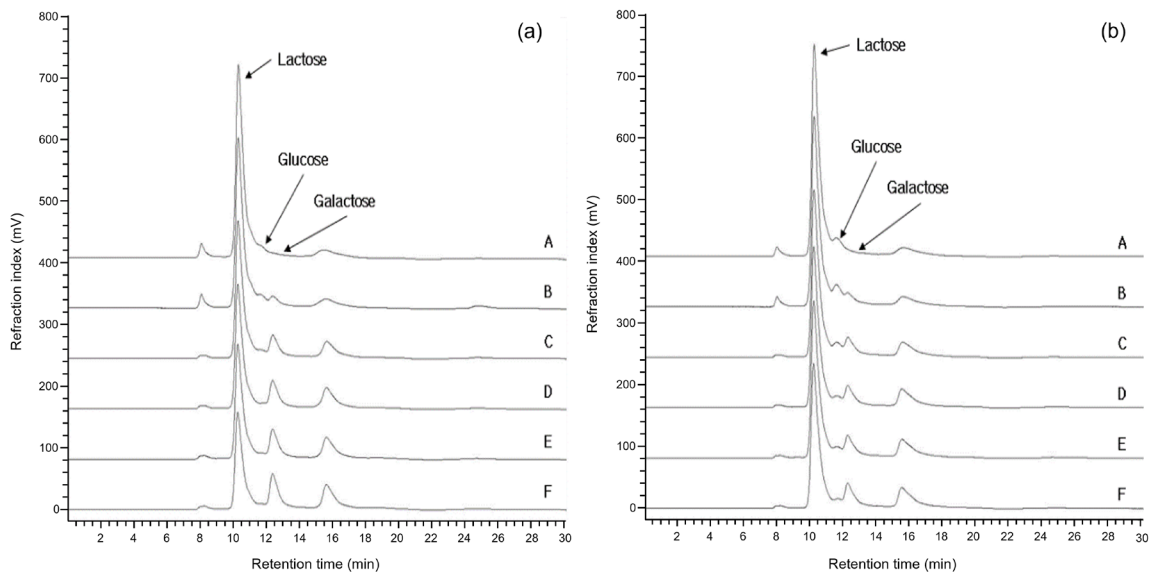
생균수 변화는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 동안 발효가 진행되면서 16시간까지 증가하고 16 - 24시간까지 정지상태로 있다가 그 이후부터는 감소하였다. 0시간째  $8.8 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>으로 시작하여 4시간 경과 때 대조구는  $3.08 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>, 10% 처리구는  $3.51 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>, 8시간 경과 때는 대조구는  $4.8 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>, 실험구는  $6.7 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>으로 나타났고, 16시간 경과 때는 각각  $7.35 \times 10^8$ ,  $9.15 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>로 최고 세포밀도에 도달하였고, 24시간 경과 때는 각각  $7.25 \times 10^8$ ,  $8.8 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>, 48시간 경과 때는 각각  $2.4 \times 10^7$ ,  $4.9 \times 10^7$  CFU·mL<sup>-1</sup>로 감소하기 시작했다. 따라서 두 처리구 중 실험구가 발효 4시간 이후부터 유산균의 생균수가 더 높게 나타났다. 이는 유청단백질이 발효 과정 중 분해되면서 유산균 생육에 필요한 성분으로 작용하기 때문으로 사료된다.



**Fig. 2.** Changes of viable cell count of general fermented milk (control) and fermented milk with 10% fortified whey protein for 48 h fermentation. ●, control group 10% skim milk; ■, experiment group 10% fortified whey protein.

### 유당 분해

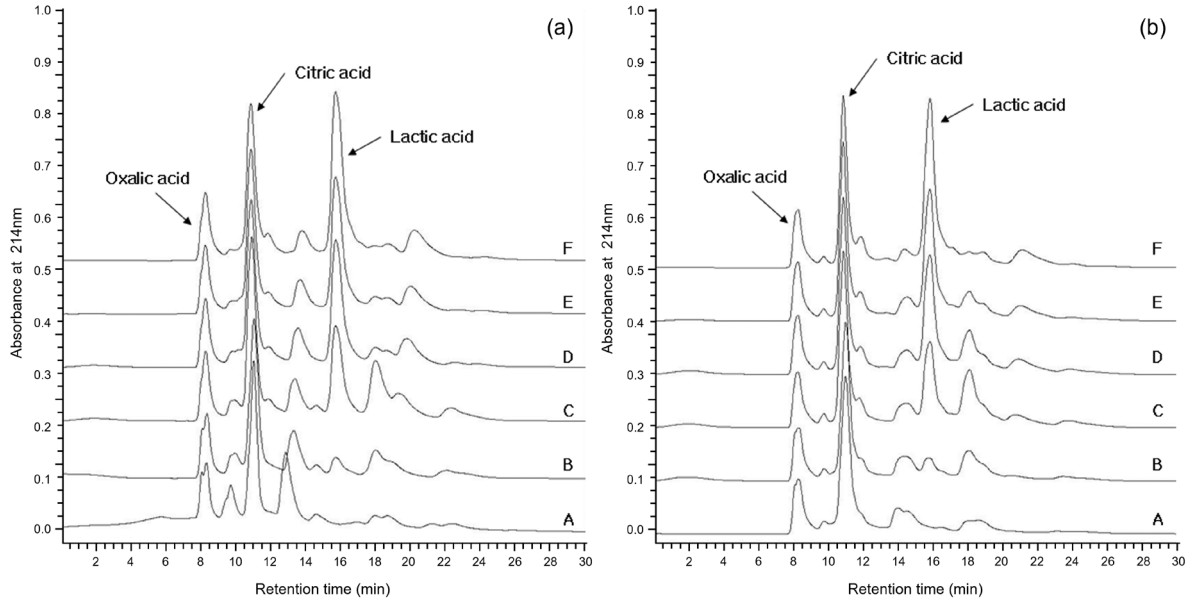
유당 분해 변화는 Fig. 3a, b에 나타난 바와 같다. 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 동안 발효가 진행되는 동안 유당은 감소되어 glucose와 galactose로 분해되고 분해된 glucose는 유산균이 이용하여 점차 고갈되었다. 반면 galactose는 발효시간이 경과함에 따라 점차 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 유당 분해 양상은 두 처리구 모두 거의 동일한 양상을 보였다.



**Fig. 3.** Changes of lactose hydrolysis in general fermented milk (control) (a) and fermented milk with 10% fortified whey protein (b) for 48 h fermentation. A, 0 h; B, 4 h; C, 8 h; D, 16 h; E, 24 h; F, 48 h.

### 유기산 생성

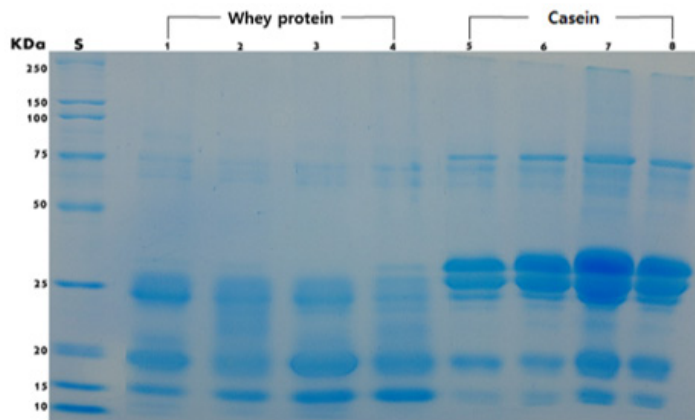
유기산 변화는 Fig. 4a, b에 나타난 바와 같다. 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 발효 전 과정 동안에 oxalic acid와 citric acid는 일정 양이 생성되어 변화가 없었다. 그러나 발효 4시간 이후부터 lactic acid가 생성되어 발효시간이 경과함에 따라 급격히 증가하였다. 이는 유산균의 왕성한 성장으로 유산을 많이 생성했기 때문이다. 따라서 발효시간이 경과하면서 pH는 산성으로 떨어지고 산도는 증가한 이유이다. 유기산 생성 양상은 두 처리구 모두 거의 동일한 양상을 보였다.



**Fig. 4.** Change of organic acid in general fermented milk (control) (a) and fermented milk with 10% fortified whey protein (b) for 48 h fermentation. A, 0 h; B, 4 h; C, 8 h; D, 16 h; E, 24 h; F, 48 h.

#### Casein과 유청단백질의 변화

유청단백질과 casein의 변화는 Fig. 5에 나타난 바와 같다. 대조구인 0시간과 발효 최종 상태인 48시간 경과 후의 단백질 변화를 나타낸 것이다. Lane 1은 대조구(0 h, 유청단백질), lane 2는 대조구(48 h, 유청단백질), lane 3은 실험구(0 h, 유청단백질), lane 4는 실험구(48 h, 유청단백질) 이다. 대조구(0 h, 유청단백질)과 실험구(0 h, casein)에 비해 대조구(48 h, 유청단백질)와 실험구(48 h, 유청단백질)는 유청단백질이 발효 과정 중 분해되었고, 특히 실험구 48 h 발효구는 유청단백질 분해가 많이 진행되었음을 알 수 있었다. 또한 lane 5는 대조구 (0 h, casein), lane 6은 대조구 (48 h, casein), lane 7은 실험구 (0 h, casein), lane 8은 실험구 (48 h, casein) 이다. Lane 5와 7에 비해 Lane 6과 8은 casein 일부가 발효 과정 중 분해되었음을 알 수 있었다. 따라서 발효 과정 중 우유 단백질인 유청단백질과 casein은 유산균이 분비하는 단백분해효소에 의해 분해됨을 알 수 있었다.



**Fig. 5.** Electrophoresis analysis of general fermented milk (control) and fermented milk with 10% fortified whey protein for 0 and 48 h fermentation. S, standard; 1, C (0 h, whey protein); 2, C (48 h, whey protein); 3, E (0 h, whey protein); 4, E (48 h, whey protein); 5, C (0 h, casein); 6, C (48 h, casein); 7, E (0 h, casein); 8, E (48 h, casein); C, control group; E, 10% fortified whey protein group.



## 발효유의 생리적 기능

### 항균효과

병원성 미생물에 대한 항균 효과는 Fig. 6에 나타난 바와 같다. 대조구인 탈지발효유의 *Escherichia coli* (KCTC1039)에 대한 항균효과는 16, 24, 48시간 배양한 발효유에서 나타났고, 시험구에서는 4, 8, 16, 24, 48시간 배양한 발효유에서 나타났고, *Pseudomonas*도 대조구, 시험구 모두 16, 24, 48시간 배양한 발효유가 항균 활성을 나타내었다. *Salmonella*는 대조구, 시험구 모두 4, 8, 16, 24, 48시간 배양한 발효유에서 나타났고, *Staphylococcus aureus* (KCTC1621) 또한 16, 24, 48시간 배양한 발효유에서 대조구, 시험구 모두 항균활성을 나타내었다. 따라서 대조구와 시험구 모두 비슷한 양상으로 항균활성을 나타내었다.

### 항산화 효과

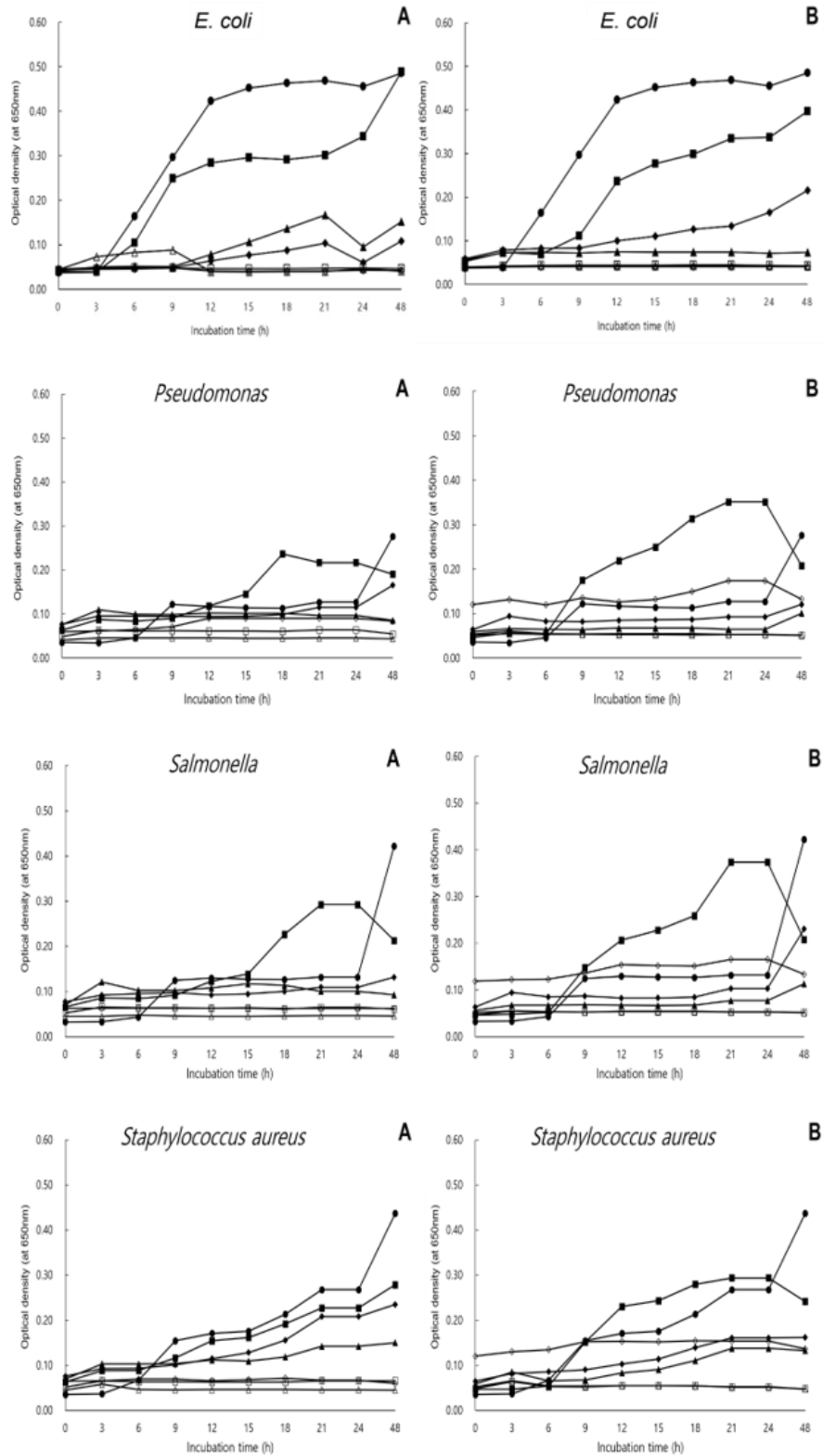
항산화 효과는 Table 3에 나타난 바와 같다. 대조구(0 h), 대조구(48 h), 시험구(0 h)는 각각  $22.07 \pm 0.18$ ,  $25.28 \pm 0.24$ ,  $29.22 \pm 0.48\%$ 이었으나 시험구(48 h)는  $68.70 \pm 4.61\%$ 로 탁월하게 높았다. 이는 48시간 배양한 시험구인 유청단백질 강화 발효유가 다양한 대사산물과 유청단백질 분해산물의 다양성에 기인하는 것으로 사료된다.

### 항염증 효과

마우스 대식세포 유래인 RAW263.7 동물세포로 염증반응 유도 작용을 측정하였다(Fig. 7). 염증반응을 유도하는 대표적인 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS, 4 종류의 발현을 조사하였다. 그래프의 Y축에 표시된 mRNA 발현을 표시는 음성대조구를 1로 기준하여 이에 비해 얼마나 많이 발현이 되었는지 배수(fold)로 나타낸 것이다. 양성대조구는 LPS (lipopolysaccharide)를 처리 후 염증반응을 유도하여 cytokine을 발현하였다. TNF- $\alpha$ 의 발현은 양성대조구인 LPS 처리구는 3.83인데 비해 시험구인 B48 (LPS + B48)은 3.53으로 약 8% 정도 억제되었고, IL-6의 발현은 양성대조구인 LPS 처리구는 494인데 비해 시험구인 B48 (LPS + B48)은 455로 약 8% 정도 억제되었다. iNOS의 발현은 양성대조구인 LPS 처리구는 2.23인데 비해 시험구인 B48 (LPS + B48)은 1.96로 약 12% 정도 억제되었다. 이와 같이 염증반응 억제효과가 어느 정도 있는 것으로 나타났다. 한편 유일하게 IL-1 $\beta$ 는 양성대조구인 LPS 처리구 10.27 보다 시험구인 B48 (LPS + B48)에서 15.8% 높게 나타났는데 이는 cytokine의 종류에 따라 억제 효과가 다른 것으로 사료된다. Yu 등(2020)은 유청단백질의 주성분인  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, serum albumin을 alcalase 효소로 가수분해 후 생성된 peptides를 분자량 10 kD 이상과 이하로 구분하여 Raw 264.7 세포주에 처리하여 항염증 관련 cytokines을 분석하였다. 분자량 10 kD 이상의 peptides는 TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS의 cytokine의 발현과 생성량을 현저하게 억제시켰다고 보고하였다. 이는 유청단백질 강화 발효유의 항염증 효과와 일치하였다.

### 시제품의 자돈 급여 사양시험

발효유의 자돈사양시험은 Table 4에 나타난 바와 같다. 대조구(0 h)는 25일째 몸무게가  $6.3 \pm 0.94$  kg이었으나 시험구(48 h)는  $7.3 \pm 1.05$  kg으로 1 kg이 증가했고 32일째와 39일째도 2 kg이 증가하였다. 즉 대조구에 비해 시험구인 유청단백질 10% 강화발효유 급여구에서 증체율 18%가 증가한 것으로 나타나 증체율 상승에 큰 효과가 있는 것으로 나타났다 또한 자돈의 설사 증세는 대조구는 20 마리 중 5마리가 나타나 25%의 설사 증세를 보였고 연변 증상이 다소 있었다. 그러나 시험구인 10% 유청단백질 강화 발효유(48시간 배양) 섭취구는 설사 증세는 나타나지 않았고 연변 증상이 간혹 나타나 설사 예방에 탁월한 효과가 있는 것으로 확인되었다. Ra 등(2022)은 *Bacillus coagulans* NRR1207로 발효시킨 대두박과 Kefir을 이유 직후의 한우 송아지에게 급여 후 설사 증상은 대조구에 비해 매우 낮은 1 마리 이하로 나타났다고 보고하였다. 이는 유청단백질 강화 발효유의 설사 증상 억제 효과와 일치하였다.



**Fig. 6.** Antimicrobial activity against *E. coli* (KCTC1039), *Pseudomonas aeruginosa* 530, *Salmonella Typhimurium* (KCTC3216) and *Staphylococcus aureus* (KCTC1621). A: general fermented milk, B: fermented milk with 10% fortified whey protein. ●, Control (culture media); ■, 0 h; ▲, 4 h; ◆, 8h; □, 16 h; △, 24 h; ◇, 48 h.

**Table 3.** Antioxidant activity of control group (10% skim milk) and 10% fortified whey protein group for 48 h fermentation.

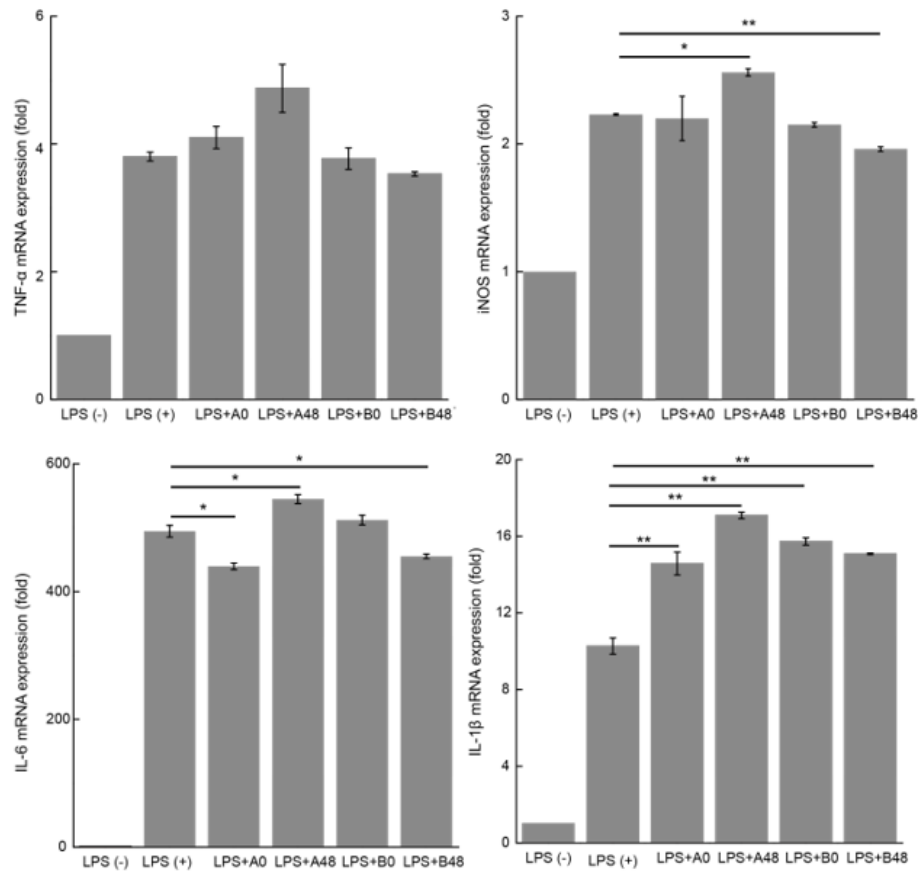
Sample	ABTS radical scavenging activity (%)
10% skim milk (0 h)	22.07 ± 0.18
10% skim milk (48 h)	25.28 ± 0.24
Fortified 10% whey protein (0 h)	29.22 ± 0.48
Fortified 10% whey protein (48 h)	68.70 ± 4.61

ABTS, 2,2-aznibis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid.

**Table 4.** Feeding activity for piglets of control group (10% skim milk) and 10% fortified whey protein group for 48 h fermentation (n = 20).

Treatment	0 day	25 days	32 days	39 days	Diarrhea
Control weight (kg)	1.3 ± 0.32	6.3 ± 0.94	6.6 ± 0.63	9.4 ± 1.02	5
FWP 48 h weight (kg)	1.2 ± 0.29	7.3 ± 1.05	8.6 ± 0.72	11.4 ± 0.98	-
Difference (kg)	-0.1 ± 0.02	1.0 ± 0.06	2.0 ± 0.08	2.0 ± 0.07	-

FWP, fermented whey protein.



**Fig. 7.** Cytokine expression (TNF-α, IL-1β, IL-6, iNOS) on inflammatory effect of general fermented milk (A0 and A48) and fermented milk with 10% fortified whey protein (B0 and B48) for 0 and 48 h fermentation. A0, 0 h; A48, 48 h; B0, 0 h; B48, 48 h; LPS, lipopolysaccharide; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 vs. the LPS only treated group.

## Conclusion

10% 유청단백질 강화 발효유가 대조구에 비해 IgG 함량은  $170 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 생균수는 20% 높았다. 병원성 미생물에 관한 항균효과는 대조구에 비해 10% 유청단백질 강화 발효유가 높았고 항산화활성은 대조구에 비해 10% 강화 발효유에서 2배 이상 높았다.

항염증 억제 기능 효과도 대조구보다 10% 유청단백질 강화 발효유에서 약 10% 전후로 높았다. 자돈급여 사양시험에서 증체율은 대조구에 비해 18% 증가하였고 설사증상은 전혀 나타나지 않았다. 따라서 10% 유청단백질 강화 발효유는 자돈의 건강과 증체율 모두 목표 달성할 수 있었다. 가축의 건강 증진과 증체율 향상을 동시에 해결할 수 있는 가축용 발효유 시장은 앞으로 축산농가의 생산성에 큰 기여를 할 수 있을 것으로 전망된다.

## Conflict of Interests

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## Acknowledgement

본 연구는 충남대학교사회맞춤형산학협력선도대학육성사업단지원(2019BG038010110) 으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## Authors Information

Ki Whan Kim, SFC Bio., Director., Research Institution

Seok Han Ra, CM Bio Com., Director., Research Institution

Gereltuya Renchinkhand, <https://orcid.org/0000-0003-2107-0430>

Woo Jin Ki, <https://orcid.org/0000-0001-8241-874X>

Myoung Soo Nam, <https://orcid.org/0000-0003-0866-1041>

Wan Sub Kim, <https://orcid.org/0000-0002-5612-3515>

## References

- Beena A, Prasad V. 1997. Effect of yogurt and bifidus yogurt fortified with skim milk powder, condensed whey and lactose-hydrolysed condensed whey on serum cholesterol and triacylglycerol levels in rats. *Journal of Dairy Research* 64:453-457.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200.
- Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC, Chen J. 1998. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *The Journal of Experimental Medicine* 188:2381-2386.
- Bounous G, Gervais F, Amer V, Batist G, Gold P. 1989. The influence of dietary whey protein on tissue glutathione and the diseases of aging. *Clinical and Investigative Medicine* 12:343-349.
- Bounous G, Gold P. 1991. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: Role of glutathione. *Clinical and Investigative Medicine* 14:296-309.
- Corkins MR, Park JH, Davis DV, Slentz DH, MacDonald RG. 1999. Regulation of the insulin-like growth factor axis by increasing cell number in intestinal epithelial (IEC-6) cells. *Growth Hormone & IGF Research* 9:414-424.

- Donnet-Hughes A, Duc N, Serrant P, Vidal K, Schiffrin EJ. 2000. Bioactive molecules in milk and their role in health and disease: The role of transforming growth factor-beta. *Immunology and Cell Biology* 78:74-79.
- Fox PF. 1989. The milk protein system. pp. 1-53. In *Developments in Dairy Chemistry*. Vol. 4 edited by Fox PF. Elsevier Applied Science, London, UK.
- Gill HS, Coull FR, Rutherford KJ, Cross ML. 2000. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *The British Journal of Nutrition* 84:S111-S117.
- Haversen L, Ohlsson BG, Hahn-Zoric M, Hanson LA, MattsbyBaltzer I. 2002. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cell Immunology* 220:83-95.
- Huth PJ, DiRienzo DB, Miller GD. 2004. Major scientific advances with dairy foods in nutrition and health. *Journal of Dairy Science* 89:1207-1221.
- Iigo M, Kuhara T, Ushida Y, Sekine K, Moore MA, Tsuda H. 1999. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice. *Clinical & Experimental Metastasis* 17:35-40.
- Iskandar MM, Daultbaev N, Kubow S, Mawji N, Lands LC. 2013. Whey protein hydrolysates decrease IL-8 secretion in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated respiratory epithelial cells by affecting LPS binding to Toll-like receptor 4. *The British Journal of Nutrition* 110:58-68.
- Kitts DD, Weiler K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design* 9:1309-1323.
- Marcone S, Belton O, Fitzgerald DJ. 2017. Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: A potential role in atherosclerosis. *British Journal of Clinical Pharmacology* 83:152-162.
- Marshall K. 2004. Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review* 9:136-156.
- Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, Tagashi K, Kuwata T. 2001. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281:11-17.
- Nagaoka S, Kanamaru Y, Kuzuya Y, Kojima T, Kuwata T. 1992. Comparative studies on the serum cholesterol lowering action of whey protein and soybean protein in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 56:1484-1485.
- Petschow BW, Talbott RD, Batema RP. 1999. Ability of lactoferrin to promote the growth of *Bifidobacterium* spp. *in vitro* is independent of receptor binding capacity and iron saturation level. *Journal of Medical Microbiology* 48:541-549.
- Piccolomini AF, Iskandar MM, Lands LC, Kubow S. 2012. High hydrostatic pressure pre-treatment of whey proteins enhances whey protein hydrolysate inhibition of oxidative stress and IL-8 secretion in intestinal epithelial cells. *Food & Nutrition Research* 56:17549. DOI:10.3402/fnr.v56i0.17549.
- Ra SH, Bae HC, Nam MS. 2022. Effects of soybean meal fermented by *Bacillus coagulans* NRR1207 and kefir on the feeding characteristics of weaned HANWOO calves and Holstein cows. *Korean Journal of Agricultural Science* 49:93-102. [in Korean]
- Shimizu N, Dairiki K, Ogawa S, Kaneko T. 2006. Dietary whey protein hydrolysate suppresses development of atopic dermatitis-like skin lesions induced by mite antigen in NC/Nga mice. *Allergology International* 55:185-189.
- Tsuda H, Sekine K, Ushida Y, Kuhara T, Takasuka N, Iigo M, Han BS, Moor MA. 2000. Milk and dairy products in cancer prevention: Focus on bovine lactoferrin. *Mutation Research* 462:227-233.
- Ushida Y, Sekine K, Kuhara T, Takasuka N, Iigo M, Maeda M, Tsuda H. 1999. Possible chemopreventive effects of bovine lactoferrin on esophagus and lung carcinogenesis in the rat. *Japanese Journal Cancer Research* 90:262-267.
- Ushida Y, Sekine K, Kuhara T, Takasuka N, Iigo M, Tsuda H. 1998. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on intestinal polyposis in the Apc (Min) mouse. *Cancer Letters* 134:141-145.
- Wakabayashi H, Takase M, Tomita M. 2003. Lactoferrin derived from milk protein lactoferrin. *Current Pharmaceutical Design* 9:1277-1287.
- Walzem RL, Dillard CJ, German JB. 2002. Whey components: Millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: What we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42:353-375.
- Yamauchi K, Tomita M, Giehl TJ, Ellison RT. 1993. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infection and Immunity* 61:719-728.



- Yan D, Chen D, Shen J, Xiao G, van Wijnen AJ, Im HJ. 2013b. Bovine lactoferricin is anti-inflammatory and anti-catabolic in human articular cartilage and synovium. *Journal of Cellular Physiology* 228:447-456.
- Yan D, Kc R, Chen D, Xiao G, Im HJ. 2013a. Bovine lactoferricin-induced anti-inflammation is, in part, via up-regulation of interleukin-11 by secondary activation of STAT3 in human articular cartilage. *The Journal of Biological Chemistry* 288:31655-31669.
- Yu JM, Son JY, Renchinkhand G, Kim KY, Sim JY, Nam MS. 2020. Properties of hydrolyzed  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin and bovine serum albumin by the alcalase and its immune-modulation activity in Raw 264.7 cell. *Korean Journal of Agricultural Science* 47:459-470. [in Korean]
- Zhang X, Beynen AC. 1993. Lowering effect of dietary milk-whey protein v. casein on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. *The British Journal of Nutrition* 70:139-146.