

보안과제(), 일반과제(○)

1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid 생성능이 우수한 유산균을
활용한 기능성 막걸리 제조용 첨가제 개발

(Development of an additive for manufacturing functional makgeolli
using lactic acid bacteria producing 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid)

(주)제이케이뉴트라

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid 생성능이 우수한 유산균을 활용한 기능성 막걸리 제조용 첨가제 개발” 과제(세부과제: “DHNA 함유 기능성 막걸리 산업적 생산 및 분석”; 협동과제: “DHNA 함유 기능성 막걸리 생산 최적화 조건 확립”)의 보고서로 제출합니다.

2012년 08월 17일

주관연구기관명 : (주)제이케이뉴트라

주관연구책임자 : 이 종 광

세부연구책임자 : 이 종 광

연 구 원 : 고 응 혁

협동연구기관명 : 한국교통대학교

협동연구책임자 : 문 기 성

연 구 원 : 김 태 중

연 구 원 : 강 조 은

요 약 문

I. 제 목

1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid 생성능이 우수한 유산균을 활용한 기능성 막걸리 제조용 첨가제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid(DHNA) 생성능이 우수한 유산균을 활용하여 DHNA 고 함유 기능성 막걸리 제조방법을 확립하고 그 유산균 첨가제를 개발하는 것이 목적이다.

다양한 건강기능성이 과학적으로 입증되에도 불구하고 미량만이 세포 밖으로 유출된다는 점과 분석기술의 어려움 및 화합물의 산화 등으로 인해 DHNA라는 기능성 소재는 일본의 메이지유업만이 독보적인 생산기술을 가지고 있으며 해당 기술개발에 박차를 가하고 있다. 국내의 경우 본 과제의 협동연구책임자만이 DHNA 생산 유산균을 확보하여 기초연구를 수행하고 있으나 기타 관련 연구는 전무한 실정이다. 이 같은 추세가 지속되어 향후 DHNA가 기능성 식품소재로서 각광을 받게 될 경우 100% 수입에 의존해야 하며 그 대가로써 높은 금액을 지불해야 할 것이다. 따라서 DHNA 관련 연구를 활성화시켜 닥칠 수 있는 다양한 문제를 대비하는 것이 무엇보다 중요할 것이다.

현재 일본 메이지유업은 DHNA 생산을 위해 프로피온산균(*Propionibacterium freudenreichii*)을 사용하고 있으며 생산된 DHNA의 산화안정성을 높이기 위한 기술개발을 병행하고 있다.

따라서 본 과제에서는 일본 기업과의 차별화를 위해 선행연구를 통해 확보된 DHNA 생산 유산균 *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480(국내특허출원: 10-2010-0028177) 등을 막걸리 양조에 접목하여 DHNA가 고 함유된 막걸리를 생산함과 동시에 DHNA의 산화안정성을 높일 수 있어 내수시장 뿐만 아니라 역으로 일본으로의 수출도 가능해 막걸리의 고부가가치화 측면에서 해당과제의 지원 타당성은 높다고 판단된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주의 DHNA 생산 특성 분석

W. paramesenteroides CJNU 0480 균주에 대한 에탄올 내성 시험을 수행하고 살균막걸리를 이용하여 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 접종 후 경시적인 DHNA 생산량을 분석한다.

2. *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주를 첨가한 막걸리 제조 및 DHNA 함량 비교 분석

막걸리 제조 단계별로 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주를 첨가하여 막걸리를 생산하고 생산된 막걸리 적정량을 취해 HPLC(high performance liquid chromatography; 고성능액체크

로마토그래피)용 시료 조제 후 DHNA 함량을 분석한다. 즉, 시료에 2배 용량의 메탄올을 첨가하여 추출 후 원심분리(3,500rpm, 10분)하여 상등액을 여과(0.45 μ m 주사필터)한 후 HPLC 분석용 시료로 사용한다. HPLC 분석 방법은 아래의 조건과 같다.

컬럼(Agilent HC-C18): C18; 충전제 입경: 5 μ m; 내경: 4.6mm; 길이: 150mm

이동상: 아세트니트릴: 메탄올: 물: 아세트산 = 15: 25: 225: 0.1(5% 암모니아수로 pH 5.5 조정)

컬럼온도: 45 $^{\circ}$ C

유속: 1mL/min

검출과장: 254nm

3. *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 첨가 막걸리의 품질 분석

DHNA 및 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주가 초산균의 생장에 미치는 영향을 분석하고 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주를 첨가하여 생산된 막걸리와 무첨가 막걸리에 대한 미생물 및 물리화학적 변화(효모 및 유산균수, pH, 산도, 환원당)를 시간 경과에 따라 측정하여 품질을 비교분석한다.

4. DHNA 고 함유 막걸리의 기능성 검증

DHNA 고 함유 막걸리의 비피도박테리아 증식능을 검증하여 일반 막걸리와의 차별성을 규명한다.

5. *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 첨가제 시제품 생산 및 현장 적용 시험

W. paramesenteroides CJNU 0480 균주의 막걸리 적용을 위한 분말 시제품을 생산하고 DHNA 생산 최적단계에 첨가하여 DHNA 고 함유 막걸리를 생산한다.

6. 관능평가

성인 남녀 20-30명을 패널로 선정하여 DHNA 생산 유산균 첨가 막걸리와 무첨가 막걸리를 대상으로 색, 향, 맛, 후미, 전체적 기호도를 5점 척도(5: 최고로 좋다; 1: 가장 싫다)로 평가한다.

IV. 연구개발결과

1. *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주의 DHNA 생산 특성 분석

W. paramesenteroides CJNU 0480 균주의 에탄올에 대한 내성 시험을 수행한 결과 에탄올 함량 9%까지 내성을 가지는 것으로 나타났으며 살균 막걸리에 접종하여 DHNA 생산을 확인한 결과 무첨가균에 비해 DHNA 함량이 2배 정도 증가된 것으로 나타났다.

2. *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주를 첨가한 막걸리 제조 및 DHNA 함량 비교 분석

막걸리 제조 단계별로 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주를 첨가하여 무첨가균에 비하여 DHNA 함량이 증가되는 지를 확인하였다. 막걸리 제조 실험 전에 첨가된 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주의 추이를 분석하기 위해 항생제 에리쓰로마이신(erythromycin)에 대한 내성 유전자를 가지는 재조합 DNA pCW4로 형질전환 시켜 사용하였다. 3곳의 양조장으로부터 막

걸리 제조에 필요한 원료를 얻어 4번 막걸리를 제조하였으며 주모단계, 1단 및 2단 발효 단계에 균주를 첨가하여 무첨가균과 DHNA 함량을 비교하였으나 유의적인 차이가 없었다. 추가적으로 DHNA 생산 두 균주(LP1, LP2)를 선발하였으며 각각 *Lactobacillus casei*와 *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었다. 이 두 균주를 각각 1단과 2단 발효 단계에서 첨가하여 막걸리를 제조한 후 DHNA 함량을 분석한 결과 무첨가균에 비해 다소 높게 검출되었다. 그럼에도 불구하고 2단 발효가 진행되는 동안 에탄올의 함량이 거의 16% 수준까지 올라가는 점을 고려하면 첨가된 균주의 활성을 확보하는 것이 어려울 것으로 판단되어 산업적인 측면에서 최종 막걸리 제조 후(에탄올 함량: 6-7%) 각각의 균주를 첨가하여 DHNA 함량을 무첨가균과 비교해본 결과 첨가균에서 높은 DHNA 함량을 보였다.

3. *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 첨가 막걸리의 품질 분석

DHNA 및 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주를 이용한 한천확산법(agar diffusion method)에서는 사용한 초산균(*Acetobacter aceti* KCTC 1010)에 대한 항균활성을 관찰할 수 없었으나 *L. casei* LP1과 *L. plantarum* LP2 균주를 초산균과 동시배양을 했을 때 다소의 생육 억제 효과가 관찰되었다.

W. paramesenteroides CJNU 0480, *L. casei* LP1 및 *L. plantarum* LP2 균주를 막걸리 제조 과정에 첨가하여 무첨가균과 비교했을 때 전반적으로 균수(유산균 및 효모수)에서는 다소의 차이를 보였으나 pH, 산도 및 환원당의 함량에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

4. DHNA 고 함유 막걸리의 기능성 검증

DHNA 고 함유 막걸리와 일반 막걸리의 기능성을 검증하기 위해 장내 유익균인 비피도박테리아에 대한 증식능을 관찰하였다. 그 결과 DHNA 고 함유 막걸리의 비피도박테리아 증식능이 일반 막걸리에 비해 우수한 것으로 나타났다.

5. *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 첨가제 시제품 생산 및 현장 적용 시험

W. paramesenteroides CJNU 0480 균주를 유산균 가공업체에 위탁하여 분말 시제품으로 생산하였으며 이를 단독 및 *L. casei* LP1, *L. plantarum* LP2 균주와 혼합하여 양조장에서 막걸리 제조 과정에 첨가하였다. 그 결과 *L. casei* LP1과 *L. plantarum* LP2 균주를 동시에 첨가한 막걸리에서 가장 높은 DHNA 함량을 보였다.

6. 관능평가

성인 남녀 30명(1차)과 20명(2차)을 패널로 선정하여 DHNA 생산 균주 첨가 막걸리와 무첨가 막걸리를 대상으로 색, 향, 맛, 후미, 전체적 기호도를 5점 척도(5: 최고로 좋다; 1: 가장 싫다)로 평가하였다. 평가 결과 DHNA 함량이 다소 증가된 첨가균의 경우 무첨가균과 비교했을 때 전반적으로 부정적인 영향이 나타나지 않았다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 논문게재(1건)

저널명: Preventive Nutrition and Food Science(KCI), Vol. 17, pp. 83-86 (2012)

논문명: Detection of 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid from Commercial Makgeolli Products

저자명: JE Eom, SC Kwon, GS Moon

나. 특허출원(1건)

발명의 명칭: 1,4-디히드록시-2-나프토산 생산능을 가지는 락토바실러스 카제이 LP1 균주 및
이의 이용

출원일자: 2012.08.16

출원번호: 10-2012-0089403

출원인: 한국교통대학교 산학협력단, (주)제이케이뉴트라

발명자: 문기성, 이종광

다. 국제학술발표(1건)

학술대회명: Food Science & Communication(한국식품과학회, 대전컨벤션센터)

기간: 2012.6.13-2012.6.15

논문명: Detection of 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid from Commercial Makgeolli Products

저자명: TJ Kim, GS Moon

2. 연구성과 활용 계획

가. DHNA 생산 균주를 이용한 DHNA 고 함유 막걸리 제조 방법에 대한 특허출원 및 논문게재

나. 막걸리의 기능성(DHNA 함유) 홍보

다. 막걸리로부터 신규 기능성소재 발굴

라. 막걸리 발효과정에서의 DHNA 생산 과학적 규명

SUMMARY

I. Title

Development of an additive for manufacturing functional makgeolli using lactic acid bacteria producing 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA)

II. Objective and Significance

This study is aiming at development of an additive for manufacturing DHNA-enriched makgeolli using lactic acid bacteria producing DHNA.

Although DHNA was proven to have functional properties, only a Japanese dairy company is commercially producing DHNA. In Korea, the co-operative principal investigator in this study is solely investigating DHNA from lactic acid bacteria. If DHNA is highlighted as a functional food ingredient in near future, we should import DHNA expensively from the Japanese company. At present the company produces DHNA from a *Propionibacterium freudenreichii* strain and focuses on the study for improved oxidative stability.

In this study, we will apply *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 strain (Kor. pat. pending: 10-2010-0028177) to makgeolli manufacture and would like to produce DHNA-enriched makgeolli products which could be exported to Japan.

III. Contents and Scope

1. Characteristics of *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain for production of DHNA

W. paramesenteroides CJNU 0480 strain is investigated for ethanol resistance and DHNA production when inoculated in sterilized makgeolli product.

2. Preparation of makgeolli products with *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain and analysis of their DHNA contents

Makgeolli products, where *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain is inoculated at different preparation steps, are produced and their DHNA contents are analyzed by HPLC (high performance liquid chromatography). Briefly two volume of methanol is mixed with makgeolli sample and centrifuged (3,500 rpm, 10 min). The supernatant is taken and filtered (0.45 μm , syringe filter) and used for HPLC analysis. HPLC conditions are as follows.

Column (Agilent HC-C18): C18; matrix diameter: 5 μm ; width: 4.6 mm; length: 150 mm

Mobile phase: Acetonitrile: Methanol: Water: Acetic acid = 15: 25: 225: 0.1 (adjust pH 5.5 by 5% ammonium hydroxide)

Column temperature: 45 °C

Flow rate: 1mL/min

Detection wavelength: 254nm

3. Quality analysis of makgeolli product with *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain

Effects of DHNA and *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain on the growth of *Acetobacter aceti* strain are analyzed and microbiological and physio-chemical properties (pH, acidity, reducing sugar content) of makgeolli products with *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain are compared with a negative control where the strain is not added.

4. Verification of functionality of DHNA-enriched makgeolli

Bifidogenic growth stimulator (BGS) activity of DHNA-enriched makgeolli is compared with those of general makgeolli products.

5. Preparation of cell powder product of *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain and application to commercial makgeolli production

Freeze-dried cell powder of *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain is prepared in a commercial company and applied to commercial makgeolli production.

6. Sensory evaluation

Twenty-thirty of adults are selected and perform sensory evaluation (color, taste, etc.; score: 5) for DHNA-enriched makgeolli and the values are compared with those of a negative control where DHNA producing lactic acid bacteria are not added.

IV. Results

1. Characteristics of *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain for production of DHNA

W. paramesenteroides CJNU 0480 strain was resistance to ethanol until 9% and DHNA content of sterilized makgeolli with *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain was increased twice when compared with sterilized makgeolli without addition of *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain.

2. Preparation of makgeolli products with *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain and analysis of their DHNA contents

DHNA contents from makgeolli products where *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain was inoculated at different makgeolli preparation steps were investigated and compared with each other. To tract an added *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain, the strain was transformed with a recombinant DNA pCW4 harboring an erythromycin resistance gene. In

our laboratory, makgeolli was prepared 4 times and *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain was applied to steps for starter preparation, 1st fermentation, and 2nd fermentation. From DHNA analysis, there was no difference between *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain added makgeolli products and no added makgeolli products. To solve the problem, additional two lactic acid bacteria LP1 and LP2 were selected as DHNA producers. They were identified *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*, respectively. Unlike *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain, DHNA contents of makgeolli products where *L. casei* LP1 and *L. plantarum* LP2 strain were applied to 1st and 2nd fermentation steps were higher than that of makgeolli product without addition of the strains. Nevertheless the strains were applied to final makgeolli products where ethanol content reaches 6-7% for survivability and their DHNA contents were increased when compared with no added makgeolli products.

3. Quality analysis of makgeolli product with *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain

DHNA and *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain did not inhibit the growth of *Acetobacter aceti* KCTC1010 by an agar diffusion method. However, *L. casei* LP1 and *L. plantarum* LP2 strain mix slightly inhibited the growth of *A. aceti* KCTC 1010 strain.

Physio-chemical properties of makgeolli products prepared with *W. paramesenteroides* CJNU 0480, *L. casei* LP1, and *L. plantarum* LP2 strain combinations were not significantly different with each other.

4. Verification of functionality of DHNA-enriched makgeolli

To verify the functionality of DHNA-enriched makgeolli product, bifidogenic growth stimulator (BGS) activity was investigated. From the results, the BGS activity of DHNA-enriched makgeolli product was higher than those of general makgeolli products where DHNA contents were low.

5. Preparation of cell powder product of *W. paramesenteroides* CJNU 0480 strain and application to commercial makgeolli production

W. paramesenteroides CJNU 0480 cells were massively freeze-dried in a commercial company for processing of lactic acid bacteria. The freeze-dried powder of *W. paramesenteroides* CJNU 0480 cells was applied to manufacturing commercial makgeolli products alone and with *L. casei* LP1 and *L. plantarum* LP2 strain. From the results, DHNA contents from makgeolli products, where *L. casei* LP1 and *L. plantarum* LP2 strain mix were applied, were increased when compared with negative controls where DHNA producing cells were not added.

6. Sensory evaluation

From the sensory evaluation, the scores of makgeolli products which were added with DHNA-producing lactic acid bacteria were not significantly different from the negative control makgeolli where the bacteria were not added.

V. Outcome and Opinion for Future Use

1. Outcome

1) Publishment

Journal: Preventive Nutrition and Food Science (KCI), Vol. 17, pp. 83-86 (2012)

Title: Detection of 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid from Commercial Makgeolli Products

Authors: JE Eom, SC Kwon, GS Moon

2) Patent pending

Title: *Lactobacillus casei* LP1 Strain Producing 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid and Its Use

Date: 2012.08.16

No: 10-2012-0089403

Applicant: R&DB Foundation at Korea National University of Transportation and JKNutra Co.

Inventors: GS Moon, JK Lee

3) Poster presentation

Symposium: Food Science & Communication (Korean Society of Food Science and Technolgy, Daejeon Convention Center)

Period: 2012.6.13-2012.6.15

Title: Detection of 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid from Commercial Makgeolli Products

Authors: TJ Kim, GS Moon

2. Opinion for Future Use

1) Patent pending and publishment for the method of DHNA-enriched makgeolli products using DHNA-producing lactic acid bacteria

2) Publicity for the functionality of makgeolli products

3) Finding out novel functional materials from makgeolli products

4) Scientific characterization of DHNA production during makgeolli fermentation

CONTENTS

Chapter 1.	Overview of this study	12
Paragraph 1.	Objective of the study	12
Paragraph 2.	Significance of the study	12
Paragraph 3.	Scope of the study	12
Chapter 2.	State of Art	13
Chapter 3.	Contents and Results	19
Paragraph 1.	DHNA production from <i>Weissella paramesenteroides</i> CJNU 0480 strain	19
Paragraph 2.	Makgeolli production using <i>W. paramesenteroides</i> CJNU 0480 strain and comparison of DHNA contents	22
Paragraph 3.	Quality analysis of Makgeolli products by using <i>W. paramesenteroides</i> CJNU 0480 strain	48
Paragraph 4.	Functionality of DHNA-enriched Makgeolli products	53
Paragraph 5.	Preparation of <i>W. paramesenteroides</i> CJNU 0480 cell powder and application to pilot scale Makgeolli production	55
Paragraph 6.	Sensory evaluation	58
Chapter 4.	Achievement and Contribution	61
Chapter 5.	Plan for Use	63
Chapter 6.	Foreign Scientific Information Acquired	65
Chapter 7.	Facility and Equipment	66
Chapter 8.	References	67

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
SUMMARY	6
CONTENTS	10
목 차	11
제 1 장 연구개발과제의 개요	12
제 1 절 연구개발의 목적	12
제 2 절 연구개발의 필요성	12
제 3 절 연구개발의 범위	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황	13
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	19
제 1 절 <i>Weissella paramesenteroides</i> CJNU 0480 균주의 DHNA 생산 특성 분석	19
제 2 절 <i>W. paramesenteroides</i> CJNU 0480 균주를 첨가한 막걸리 제조 및 DHNA 함량 비교 분석	22
제 3 절 <i>W. paramesenteroides</i> CJNU 0480 균주 첨가 막걸리의 품질 분석	48
제 4 절 DHNA 고 함유 막걸리의 기능성 검증	53
제 5 절 <i>W. paramesenteroides</i> CJNU 0480 균주 첨가제 시제품 생산 및 현장 적용 시험	55
제 6 절 관능평가	58
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	61
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	63
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	65
제 7 장 연구시설·장비 현황	66
제 8 장 참고문헌	67

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid(DHNA) 생성능이 우수한 유산균을 활용하여 DHNA 고 함유 기능성 막걸리 제조방법을 확립하고 이를 위한 유산균 첨가제 개발과 사업화가 궁극적인 목적이다.

제 2 절 연구개발의 필요성

건강기능성 입증에도 불구하고 미량만이 세포 밖으로 유출된다는 점과 분석기술의 어려움 및 화합물의 산화작용 등으로 DHNA라는 기능성 소재는 일본의 메이지유업만이 관련기술개발에 박차를 가하고 있으며 현재 독보적인 생산기술을 가지고 있다. 국내의 경우 본 과제 협동연구 책임자를 제외하고는 DHNA 관련 연구를 진행하는 그룹은 전무한 실정이며 이 같은 추세가 지속된다면 향후 DHNA가 기능성 식품소재로서 각광을 받게 될 경우 100% 수입에 의존해야 하며 그 대가로 높은 금액을 지불해야 할 것이다.

일본 메이지유업은 DHNA 생산을 위해 프로피온산균(*Propionibacterium freudenreichii*)을 사용하고 있으며 생산된 DHNA의 산화안정성을 높이기 위한 기술개발을 병행하고 있다.

본 연구과제에서는 선행연구를 통해 DHNA 생산균주로 확인된 *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 균주(국내특허출원 : 10-2010-0028177) 등을 막걸리 양조에 접목하여 DHNA가 고 함유된 막걸리를 생산함과 동시에 DHNA의 산화안정성을 높여 일본 메이지유업과는 차별화된 기술개발이 가능하고 일본으로의 수출증대가 기대되므로 막걸리의 고부가가치화 측면에서 연구개발 및 지원이 시급한 분야라 판단된다.

제 3 절 연구개발의 범위

1. *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주의 DHNA 생산 특성 분석
2. *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주를 첨가한 막걸리 제조 및 DHNA 함량 비교 분석
3. *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 첨가 막걸리의 품질 분석
4. DHNA 고 함유 막걸리의 기능성 검증
5. *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 첨가제 시제품 생산 및 현장 적용 시험
6. 관능평가

제 2 장 국내외 기술개발 현황

■ 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid(DHNA)

- DHNA(Fig. 1)는 박테리아 호흡사슬의 전자전달자(electron transfer agent)로서 중요한 역할을 수행하는 메나퀴논(menaquinone; 비타민 K₂)의 전구체이다(Suvarna et al., 1998; Furuichi et al., 2006).
- DHNA는 중간대사산물로서 비타민 K₂의 전구체로 대부분 사용되지만 일부는 세포 밖으로 유출되는 것으로 알려져 있다(Fig. 2).
- 메나퀴논은 박테리아의 전자전달자일 뿐만 아니라 동물의 혈액 및 뼈에 존재하는 특이단백질을 구성하는 γ -carboxyglutamic acid의 합성에 관여하는 보조인자(cofactor)로 작용하기 때문에 뼈 대사에 중요한 역할을 수행한다(Furie, B and Furie, BC, 1988; Hauschka et al., 1989; Vermeer, 1990).
- 최근의 한 연구결과에 의하면 메나퀴논 뿐만 아니라 DHNA도 골량감소 억제를 통해 골다공증을 예방할 수 있는 것으로 나타났다(Matsubara et al., 2010).
- 또한 프로피온산균(*Propionibacterium freudenreichii* ET-3)이 생산하는 특정물질이 장내 유익균인 비피도박테리아에 대한 선택적인 증식효과가 있는 것으로 나타나 물질 동정을 수행한 결과 DHNA로 판명되었다(Isawa et al., 2002).
- 현재 세계적으로 기능성 식품소재로서 미생물 발효를 통한 DHNA 생산 및 응용에 관한 연구는 일본 메이지유업(<http://www.meiji.co.jp/>)이 주도적으로 이끌어 가고 있으며 그 외 국가에서는 관련 연구 및 개발이 전무한 실정이다.
- 메이지유업에서 DHNA 생산을 위해 사용하고 있는 균주는 Swiss-type 치즈에서 분리한 *P. freudenreichii* ET-3 균주이다(Furuichi et al., 2006, 2007).
- 메이지유업은 *P. freudenreichii* ET-3균주의 발효를 통해 생산된 DHNA를 기능성 원료로서 유제품에 첨가하고 있으며 관련 특허를 주요국가에 출원 중에 있다.
- 따라서 DHNA가 가지는 잠재적 기능성(1. 대사성 골 질환에 대한 예방효과, 2. 장내 비피도박테리아에 대한 선택적 증식효과)을 고려하면 향후 식·의약 소재로서의 응용도가 매우 높을 것으로 판단된다.

■ 막걸리(Makgeolli)

- 막걸리는 우리나라의 대표적 전통 발효주로 알코올 도수(6-8%)가 높지 않고 다양한 영양성분(단백질, 당질, 각종 비타민 등)이 함유되어 있어 성인이면 누구나 쉽게 접근이 가능한 주류이다(Bae et al., 2008; Jeon, MH and Lee, WJ, 2011).
- 또한 막걸리에는 알코올 발효에 관여하는 효모 외에도 다양한 종류의 유산균을 포함하고 있어 막걸리가 건강기능 발효주로 자리매김하는데 일조하고 있다.
- 최근 술 문화의 변화와 웰빙 분위기 덕분에 사양 산업이었던 막걸리 양조업이 부활하고 있으며 대기업을 중심으로 막걸리의 품질 및 보존기술 향상을 위해 노력하고 있다.
- 이러한 분위기는 지표상에서 확인할 수 있듯이 타 주류(맥주, 소주 및 위스키)의 소비가 현상 유지 혹은 감소되는 반면 막걸리의 소비는 급성장하고 있으며 해외수출의 경우 2009년도 42% 성장에 이어 2010년도에는 200% 이상의 고성장을 보였다.

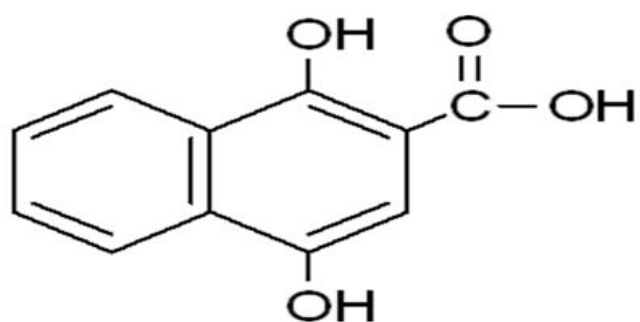


Fig. 1. The chemical structure of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA).

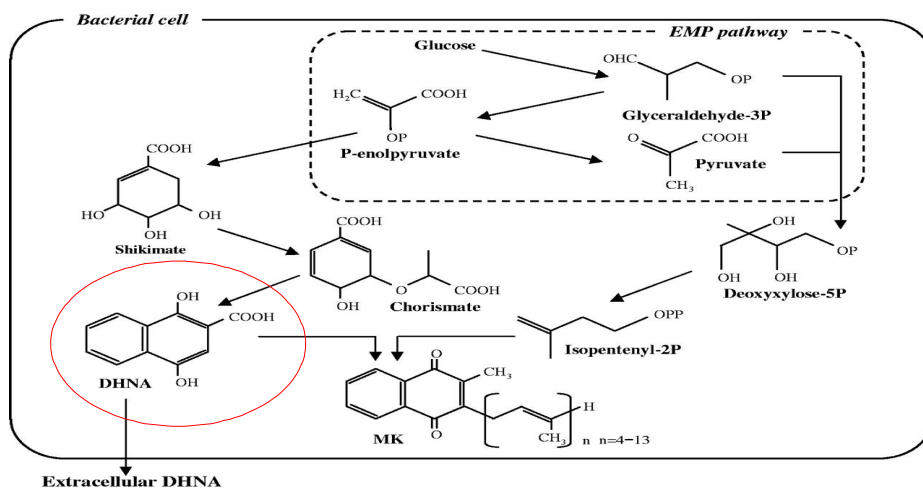


Fig. 2. Pathway for biosynthesis of MK (menaquinone). MK is synthesized by combining DHNA and an isoprenoid unit (Furuichi et al., 2007).

- 이는 앞으로도 막걸리 열풍이 지속될 수 있음을 시사하며 보다 고품질 및 고기능성의 막걸리를 생산해 차별화된 전략으로 시장에 진출할 경우 경쟁력을 갖춘 막걸리 제품으로 자리매김 할 수 있을 것이다.
- 특히 해외수출국 중에서 일본이 차지하는 비중이 크기 때문에 일본 소비자들의 기호에 맞춰 제품을 개발할 경우 수출증대에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

Table 1. 향후 막걸리 시장규모 예측

(단위 : 억 원)

연도	2008	2009	2010	2011	2012
시장규모	3,000	4,400	7,100	8,500	10,000

(출처: Foodbank.co.kr)

Table 2. 막걸리 수출현황

(단위 : t, 천 달러, %)

국가 명	2009년		2010년		증감률	
	중량	금액	중량	금액	중량	금액
계	7405	627만7	1만9415	1909만5	162.2	204.2
일본	6157	540만	1만5556	1558만5	152.7	188.6
미국	653	46만3	2004	175만7	206.7	279.6
중국	273	13만9	1021	91만2	273.9	556.8
베트남	107	10만9	247	27만5	131.3	152.1
호주	62	3만7	161	13만5	160.7	266.8
기타	153.2	12만9	425	43만1	177.1	262.3

(출처: Foodbank.co.kr)

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 균주의 DHNA 생산 특성 분석

1. *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주에 대한 에탄올 내성 시험

W. paramesenteroides CJNU 04800 균주의 막걸리 첨가 시 에탄올에 대한 내성이 중요하게 작용할 수 있어 이를 시험하였다. 우선 MRS broth를 에탄올 함량이 0-21%가 되게 조절한 다음 고압멸균하고 하룻밤 배양한 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주를 1%(v/v) 접종하여 경시적으로 흡광도(OD₆₀₀)를 측정하여 균의 증식유무를 판단하였다.

그 결과 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주는 에탄올 함량 6%에서는 저해되는 경향이 나타나지 않았으며 9%에서는 다소의 저해 경향이 보였으나 낮은 속도의 증식을 보여 내성이 있는 것으로 판단되었으며 12% 이상에서는 균의 증식이 관찰되지 않았다(Fig. 3). 그럼에도 불구하고 생균수에 대한 실험결과가 부재하여 에탄올 고 함량에 따른 생육저해 및 내성 유무를 판단하기 어려웠다. 일반적으로 막걸리 발효과정에서 최고 16% 정도의 에탄올 함량을 보이며 시중에 유통되는 막걸리의 에탄올 함량이 6-7% 정도 되는 점을 고려한다면 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주를 막걸리에 첨가하여 기능성 막걸리를 제조하는데 큰 문제가 없을 것으로 판단되었다.

2. 살균막걸리를 이용하여 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 접종 후 경시적으로 DHNA 생산량 분석

A양조장으로부터 시중 유통 전 막걸리 제품을 얻어 유리병 2개에 500 mL씩 분주하여 저온 살균(60°C, 30분)한 후, MRS 액체배지에서 배양한 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 배양액 5 mL(1%)을 취해 펩톤수(0.1%, w/v)로 세척한 다음 상기 막걸리를 포함한 유리병 2개 중 1개에 접종하였다. *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주를 접종하지 않은 막걸리는 대조군으로 사용하였다. *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 첨가군과 무첨가군은 10°C에서 보존하면서 시간대별로 유산균수와 DHNA 함량을 측정하여 상호 비교하였다. 유산균의 수는 MRS 고체배지를 이용하여 개수하였고 Log cfu(colony forming unit)/mL로 표시하였다. 막걸리 시료의 DHNA 함량은 표준시료 DHNA(Sigma-Aldrich Co.)로 표준곡선(Fig. 4)을 작성하여 HPLC 법으로 분석하였다. 즉, 시료와 메탄올을 1 : 1의 비율로 혼합하여 상온에서 추출한 후 동결 건조하여 메탄올에 녹인 후 원심분리(10,000rpm, 10분)하여 그 상등액을 주사필터(0.45µm, Sartorius Co.)로 여과한 후 그 여액을 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. HPLC용 컬럼은 Agilent HC-C18(4.6×150mm, 5µm)을 사용하였고 이동상은 아세트니트릴 : 메탄올 : 물 : 아세트산 = 15 : 25 : 225 : 0.1로 혼합하였으며 암모니아수(ammonium hydroxide)를 이용하여 pH 5.5로 조정하였다. 컬럼의 온도는 45°C로 유지시켰으며 유속은 1mL/min으로 하였고 시료 주입량과 검출과장은 각각 20µL와 254nm였다. 또한 HPLC법으로 확인된 DHNA 피크의 추가 검정을 위해 LC-MS(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)를 수행하였다. HPLC상의 DHNA 분획을 모은 다음 농축하여 LC-MS 분석을 하였는데 LC는 Prominence 20A apparatus

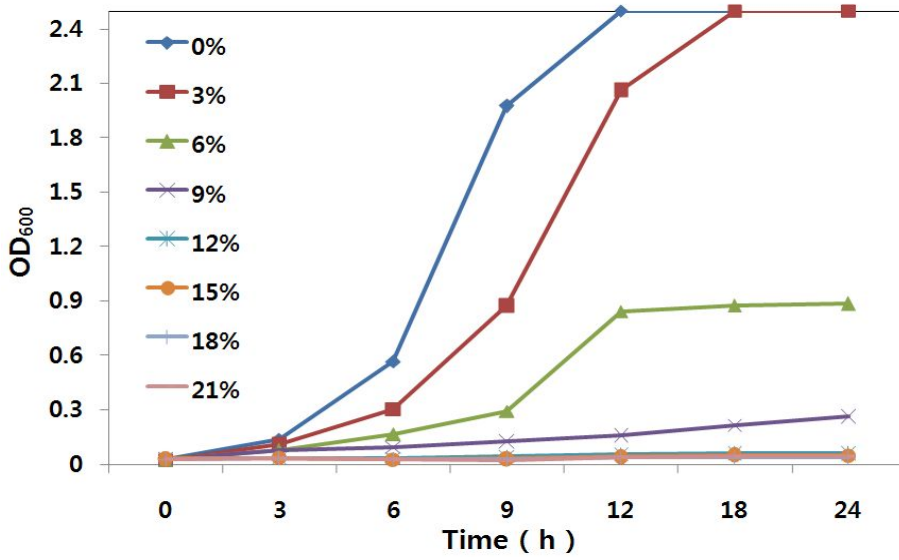


Fig. 3. Ethanol resistance of *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 strain.

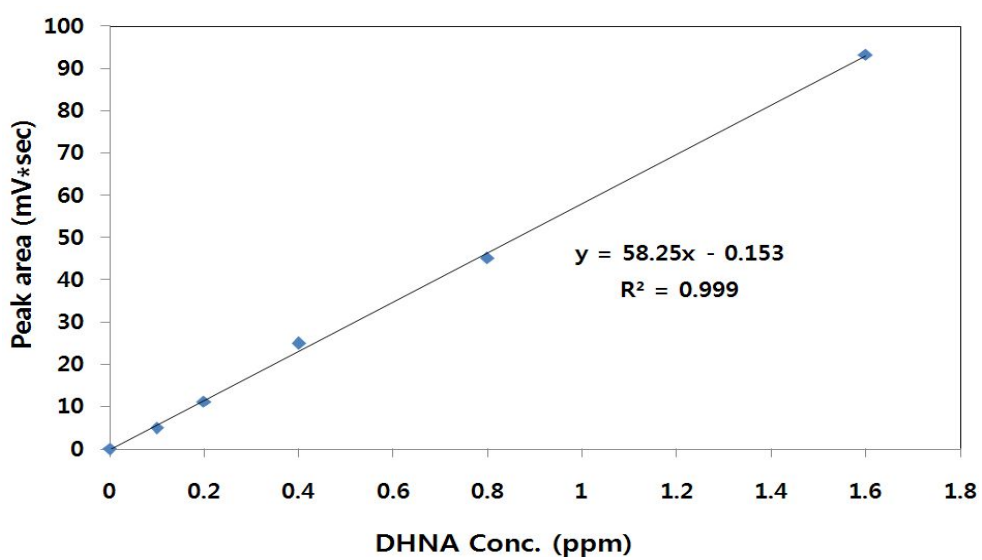


Fig. 4. DHNA (1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid) standard curve.

(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 수행하였고 MS는 LCMS-IT-TOF 시스템(Shimadzu)을 이용하였다. XR-ODS LC 컬럼(3x75mm, Shimadzu)을 사용하였고 컬럼의 온도는 45°C로 유지하였으며 시료주입량과 유속은 각각 20 μ l와 0.2mL/min였다. LC-MS 이동상은 앞의 HPLC와 동일한 조성으로 하였다.

W. paramesenteroides CJNU 0480 균주를 인위적으로 막걸리에 첨가했을 때 전체적인 유산균의 수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 10°C에서 6일 정도 배양했을 때 무첨가균의 경우 약 6.7 Log cfu/mL에 도달한 반면 CJNU 0480 균주 첨가균의 경우 약 7.4 Log cfu/mL에 도달하였다(Fig. 5A). 또한 DHNA 함량 분석에서도 무첨가균의 경우 6일째 함량이 약 0.4 ppm 정도의 함량을 보인 반면, *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 첨가균의 경우 4일 이후부터 약 0.9 ppm의 함량을 보여 무첨가균에 비해 2배 이상의 높은 수치를 보였다(Fig. 5B). 추가적으로 HPLC 상에 나타난 DHNA 피크에 대한 검증을 위해 표준시료 DHNA(Sigma-Aldrich Co.)와 LC-MS 결과를 비교했을 때 일치하는 분자량을 보였다(Fig. 6).

제 2 절 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주를 첨가한 막걸리 제조 및 DHNA 함량 비교 분석

W. paramesenteroides CJNU 0480 균주를 막걸리에 적용하기 전에 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주의 경시적인 추이를 분석하기 위해 재조합 DNA pCW4(항생제 erythromycin에 대한 내성 유전자 포함)를 이용하여 형질전환 시켰다. 형질전환 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주의 생리적인 변화 유무를 관찰하기 위해 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주와 함께 유청배지(10%, w/v)에 각각 접종하여 경시적으로 pH와 생균수를 측정하였다. 그 결과 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주와 재조합 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주 사이에 큰 차이가 없었다(Fig. 7).

또한 B양조장에서 생산된 막걸리를 얻어 유리병 3개에 200mL씩 분주한 다음 저온살균(60°C, 30분)한 후 2개의 병에 하룻밤 배양한 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 및 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 각각 1% 첨가하였다. 첨가균과 무첨가균을 37°C에서 배양하면서 경시적으로 생균수, pH 및 DHNA 함량을 분석하였다. 유산균의 생균수 측정은 MRS 고체배지에서 수행하였고 HPLC를 이용한 DHNA 함량 측정은 앞서 설명한 방법으로 수행하였다.

무첨가균($\sim 10^4$ cfu/mL)에 비해서 첨가균($\sim 10^7$ cfu/mL)에서 전체적인 유산균의 수가 높게 나타났으며 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 첨가균과 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주 첨가균 사이에는 큰 차이가 없었다(Fig. 8A). pH의 경우 첨가균과 무첨가균 사이에 큰 차이가 없었으며 pH 4.0 부근으로 나타났었다(Fig. 8B). DHNA 함량은 첨가균이 무첨가균(48시간: 0.24ppm)에 비해 높게 나타났으며 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주 첨가균(48시간: 0.62ppm)이 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 첨가균(48시간: 0.50ppm)에 비해 더 높게 나타났었다(Fig. 8C). DHNA 함량에서의 차이가 무엇으로 인해 기인하는지는 정확히 판단하기 어려우나 정확한 분석을 위해서는 추가적인 실험들이 진행되어야 할 것으로 사료된다. 그럼에도 불구하고 재조합 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주가 막걸리에서의 DHNA 생산에서 긍정적인 영향을 미치는 것은 분명해 보이며 이 재조합 균주를 이용하여 다음의 실험을 진행하는 것은 문제가 없을 것으로 판단되었다.

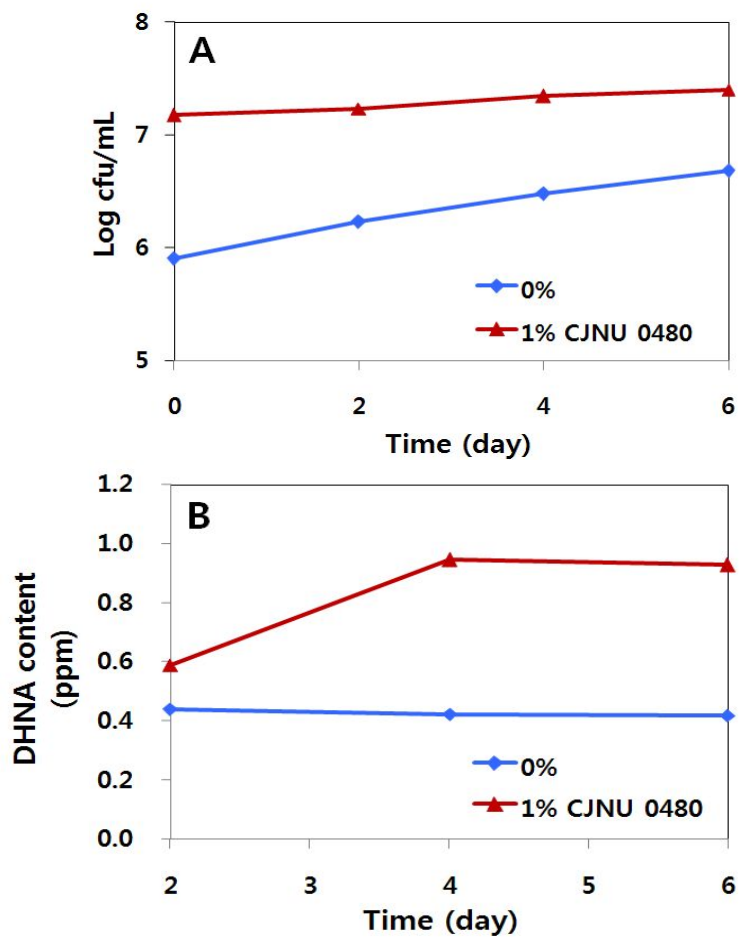


Fig. 5. Viable cell counts of lactic acid bacteria (A) and DHNA (1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid) content of sterilized makgeolli inoculated with *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 strain.

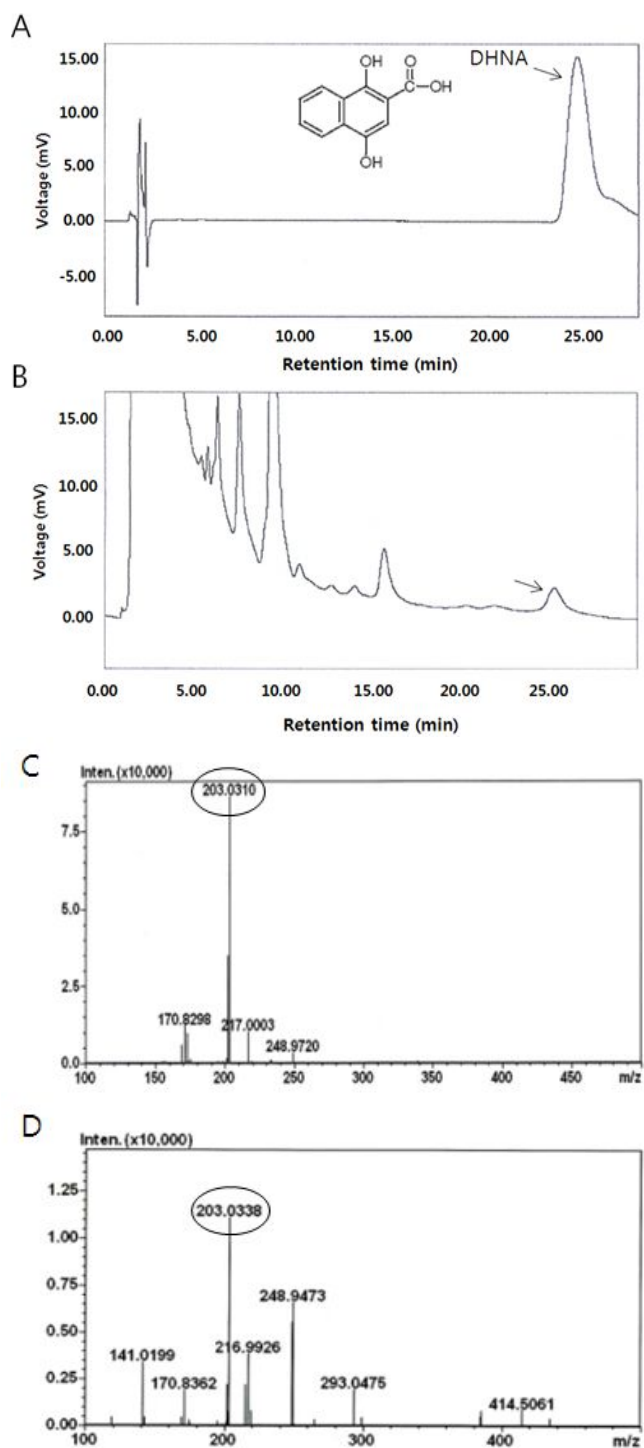


Fig. 6. HPLC chromatograms (A, B) and LC-MS spectra (C, D) for DHNA standard and makgeolli product. The arrows indicate peaks for DHNA and the circles indicate spectra of molecular masses (m/z) for a de-protonated DHNA ion $[M-H]^-$.

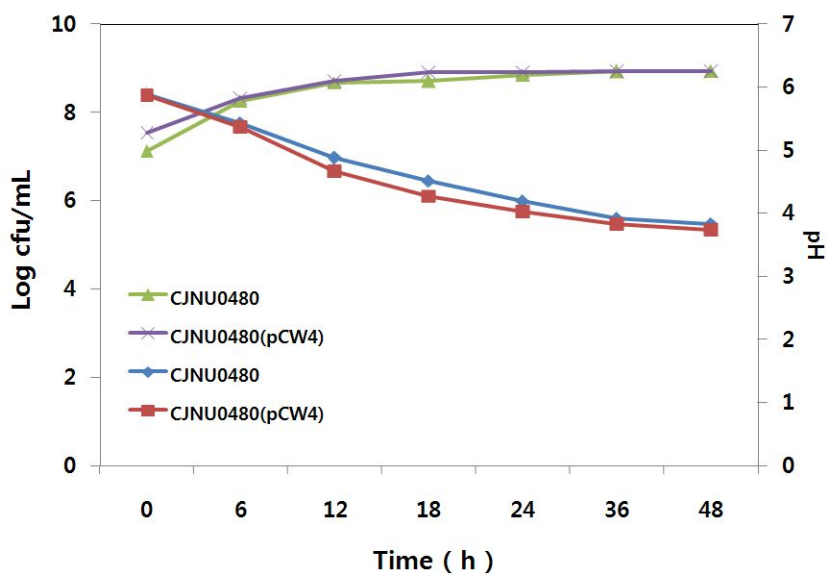


Fig. 7. Viable cell counts and pH values during fermentation in whey broth using *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 and CJNU 0480 (pCW4) strain.

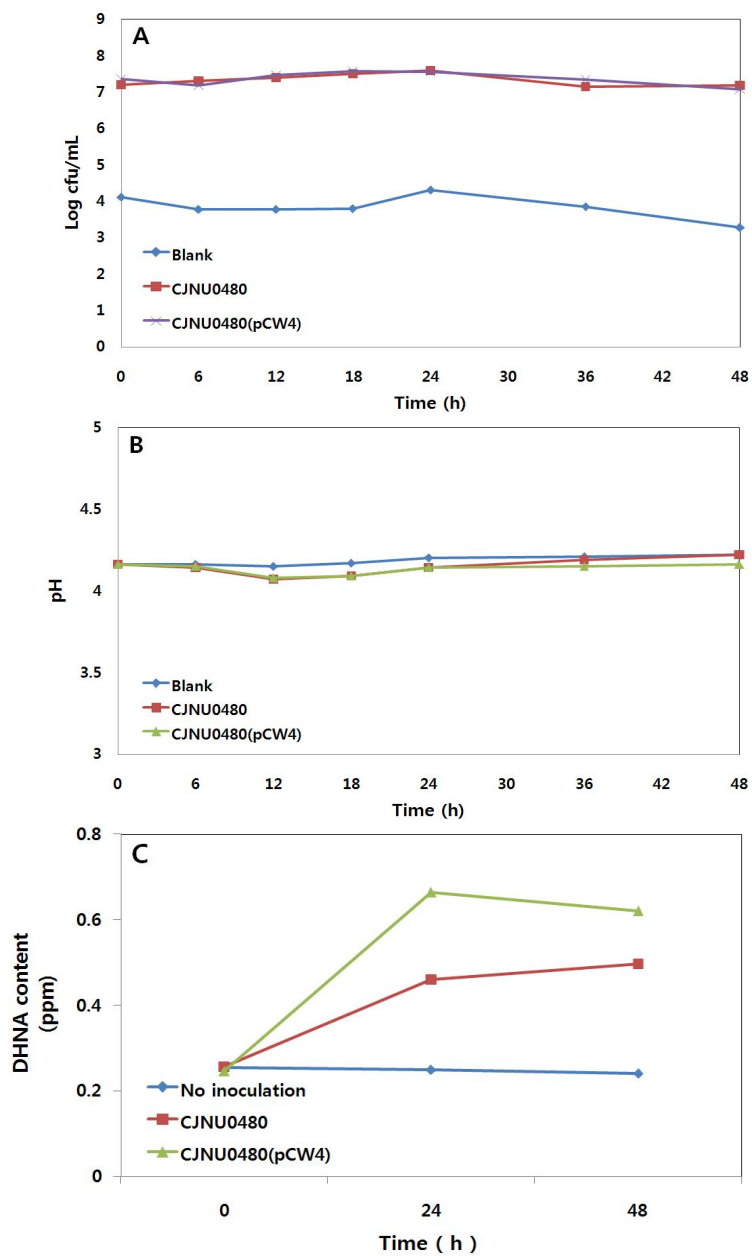


Fig. 8. Viable cell counts of lactic acid bacteria (A), pH values (B), and DHNA (1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid) content (C) of sterilized makgeolli inoculated with *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 or CJNU 0480 (pCW4) strain.

추가 실험으로 B양조장에서 생산된 생 막걸리를 얻어 멸균된 시약병 4개에 200mL씩 분주한 다음 2개의 병에 하룻밤 배양한 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 각각 1% 첨가하였다. 첨가균과 무첨가균 각각 10°C와 25°C에서 보관하면서 경시적으로 pH, *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 포함한 항생제 erythromycin 내성 균수, DHNA 함량을 분석하였다. 항생제 erythromycin 내성 생균수는 MRS 고체배지에 항생제 erythromycin을 15µg/mL의 농도로 첨가하여 제조 후 10진 희석법으로 조제된 시료를 도말하여 형성된 콜로니 수(Log cfu/mL)로 확인하였으며 pH는 pH 측정기(Mi160, MARTINI)를 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다. DHNA 함량은 앞서 설명한 HPLC 분석법으로 수행하였다. pH의 경우 10°C에 보관된 시료의 경우 pH 3.8 부근에서 pH 4.0 부근으로 완만한 증가를 보인 반면 25°C에서 보관된 시료의 경우 pH 4.5 부근으로 증가하는 양상을 보였다(Fig. 9A). 항생제 내성 균수의 경우 무첨가균이 10⁴ cfu/mL 이하의 균수를 보인 반면 첨가균의 경우 10⁷과 10⁸ cfu/mL의 균수를 나타내었다(Fig. 9B). DHNA 함량은 무첨가균과 첨가균 중 10°C에서 보존한 시료의 경우 DHNA 함량의 큰 변화가 없었던 반면 첨가균 중 25°C에서 보존한 시료의 경우 0.27ppm에서 0.36ppm으로 증가하였다(Fig. 9C). 이로써 살균 막걸리 뿐만 아니라 생 막걸리에서도 CJNU 0480 균주가 첨가될 때 DHNA 함량을 높일 수 있을 것으로 확인되었다.

다음은 동일한 막걸리를 이용하여 균주의 첨가량에 따른 DHNA 함량의 영향을 분석하였다. B양조장에서 얻은 생 막걸리를 멸균된 3개의 유리병에 각각 200mL씩 분주하고 MRS 액체 배지(Difco)에서 하룻밤 배양한 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 2개의 병에 각각 1%와 5% 첨가하였다. 첨가균과 무첨가균을 25°C에서 배양하면서 경시적으로(0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10일) 유산균수, 효모수 및 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 포함한 항생제 내성 균수, DHNA 함량을 분석하였다. 유산균수와 효모수의 측정은 시료를 무균적으로 취해 펩톤수(0.1%, w/v)와 1:9의 비율로 혼합하여 10진 희석법으로 희석하였으며 이를 MRS 고체배지와 YPD 고체배지에 도말하여 37°C, 24시간 배양 후 유산균수와 효모수를 측정하였으며 cfu(colony forming unit)/mL로 나타내었다. 또한 동일한 희석액을 15µg/mL의 erythromycin이 포함된 MRS 고체배지에 도말하여 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 포함한 항생제 내성균의 수를 측정하였다. HPLC를 이용한 DHNA 함량 측정은 앞서 설명한 방법으로 수행하였다.

전체적인 유산균의 수는 무첨가균에 비해 첨가균에서 다소 높게 나타났으며(Fig. 10A), 효모수는 둘 사이에 큰 차이가 없었다(Fig. 10B). 항생제 내성 균수는 첨가균(10⁷ cfu/mL 이상)이 무첨가균(10⁴ cfu/mL 이하)에 비해 높게 나타났다(Fig. 10C). DHNA 함량은 균 첨가량에 따라 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 10D).

앞서 진행된 실험결과를 토대로 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 막걸리에 적용했을 때 DHNA 함량이 증가된 막걸리의 생산이 가능할 것으로 판단하여 막걸리 제조 단계별(주모, 1단 담금, 2단 담금)로 첨가하여 DHNA 함량을 비교분석하였다. 극저온냉동고(-75°C)에 글리세롤 스톱으로 보관된 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 항생제 erythromycin 5µg/mL 이 첨가된 MRS 5mL에 1% 접종하여 37°C, 24시간 배양하여 활성화한 후에 MRS 100mL에 동일한 조건으로 계대배양 하였다. 배양액을 원심분리(5,000rpm, 4°C, 10분) 후 멸균된 0.1% 펩톤수로 세척한 후 차갑게 유지하면서 C양조장으로 이동하였다. 균주는 주모, 1단 담금 및 2단 담금 과정에서 각각 1%씩 첨가하여 무첨가균과 pH 및 DHNA 함량을 비

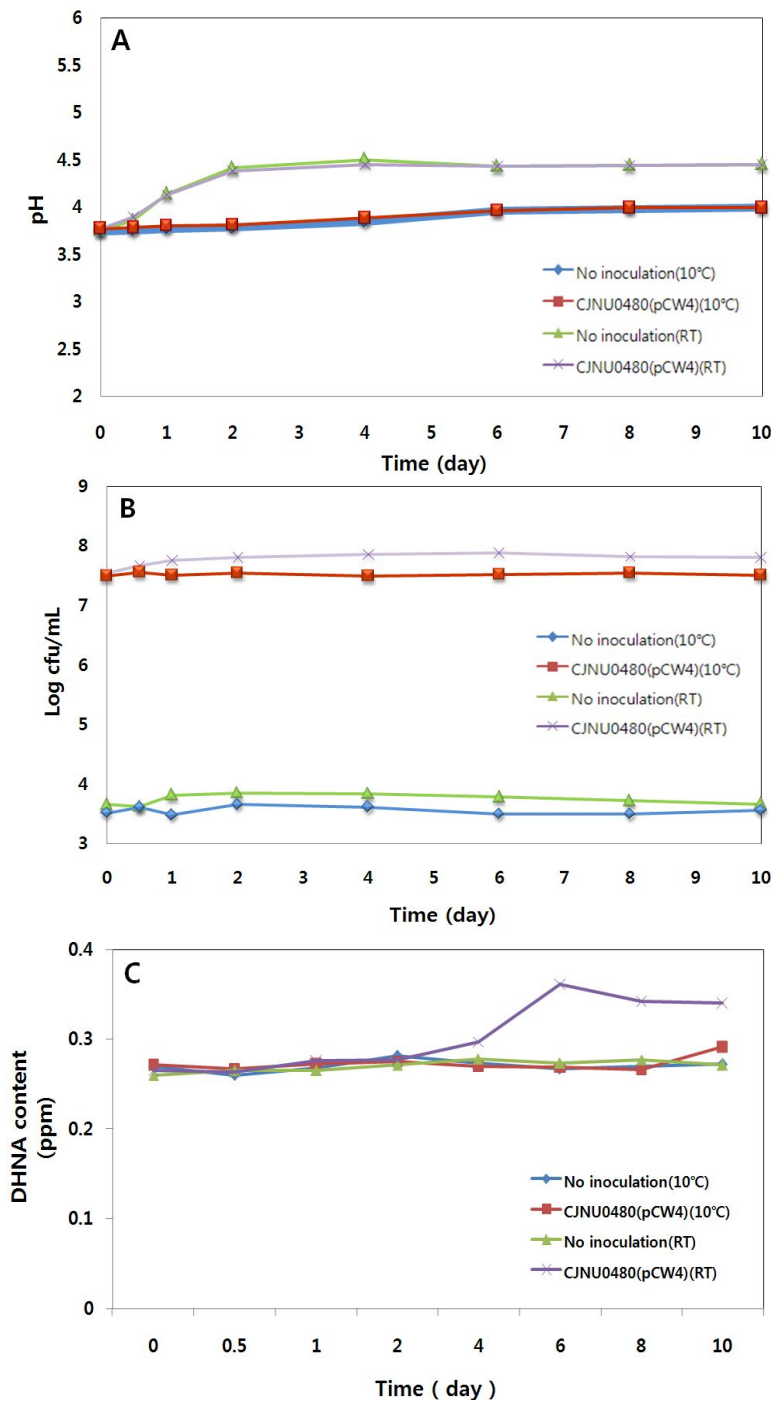


Fig. 9. pH values (A), viable cell counts of erythromycin resistant bacteria (B), and DHNA (1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid) content (C) of non-sterilized makgeolli inoculated with *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 or CJNU 0480 (pCW4) strain stored at 10°C and 25°C.

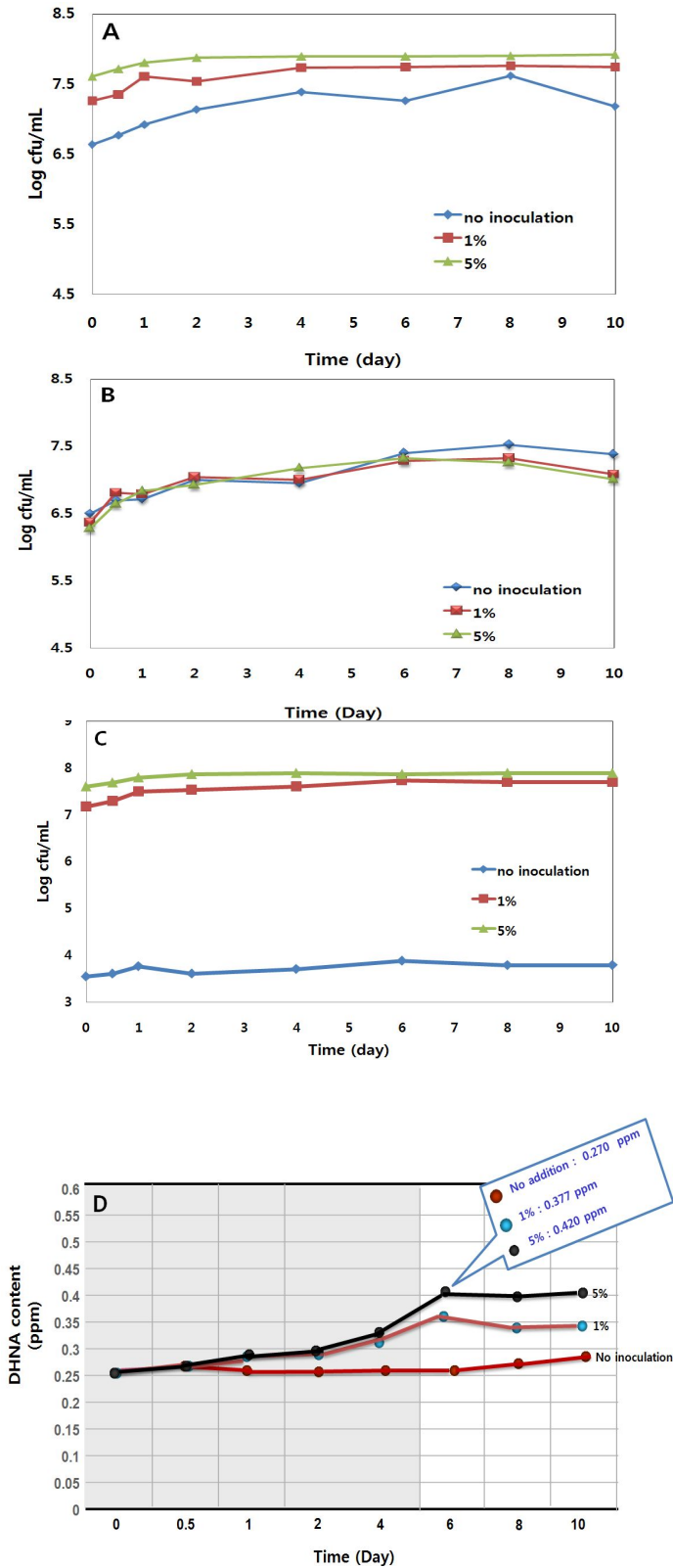


Fig. 10. Viable cell counts of lactic acid bacteria (A), yeast (B), erythromycin resistant bacteria (C), and DHNA (1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid) content (D) of non-sterilized makgeolli inoculated with *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 (pCW4) strain stored at 25°C.

교분석하였다. 막걸리의 제조는 주모단계에서는 물 500mL, 쌀입국 400g, 효모 5g을 혼합하여 실온에서 7일간 배양하였고 1단 담금은 주모에 쌀입국 2kg, 물 2L를 혼합하여 실온에서 5일간 배양하였으며 2단 담금에서는 1단 담금액에 팽화 쌀분 5kg, 정제효소 10g, 물 6L를 혼합하여 실온에서 5일간 배양하였으며 마지막으로 배양액을 체(seive)로 거른 다음 물을 2배 용량으로 첨가하여 막걸리 시제품을 제조하였다. 경시적인 분석을 위해 각각의 시료 50mL을 실험실로 옮겨와 분석에 사용하였다. pH의 경우 경시적으로 측정하였고 마지막 단계의 시료를 이용하여 DHNA 함량을 분석하였다. pH는 pH 측정기(Mi160, MARTINI)를 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다. DHNA 정량 분석은 시료 적정량(5mL)을 취해 2배의 메탄올을 첨가하여 혼합한 후 원심분리(36,00rpm, 10분)하여 상등액을 0.45 μ m 주사필터(Sartorius Co.)로 여과하고 그 여액을 HPLC용 시료로 사용하였다. HPLC(YL9100 GPC, 영린기기) 조건은 앞서 수행한 방법과 동일하다. 분석결과 pH의 경우 1단 담금과 2단 담금 단계에 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 첨가했을 때 무첨가군에 비해 다소 낮게 유지되는 경향(Fig. 11A)이 있었으나 DHNA 함량에서는 첨가군과 무첨가군 사이에 유의적인 차이가 없었다(Fig. 11B).

실험의 정확도를 높이기 위하여 C양조장으로부터 막걸리 제조에 사용되었던 재료들을 실험실로 가져와 막걸리를 다시 제조하였다(Fig. 12). CJNU 0480(pCW4) 균주는 주모단계를 제외한 1단 담금과 2단 담금 단계에서 각각 1%씩 첨가하였으며 무첨가군과 비교평가 하였다. 1단 담금은 C양조장에서 7일간 발효시킨 주모 50mL에 쌀입국 100g과 물 100mL을 혼합한 후 25 $^{\circ}$ C, 48시간 배양했으며 2단 담금은 1단 담금액에 쌀입국 350g, 누룩 2.18g, 물 560mL을 혼합한 후 25 $^{\circ}$ C, 60시간 배양하였다. 그 후 소량의 시료를 이용하여 pH, 산도, 환원당, DHNA 함량을 분석하였다. pH는 pH 측정기(Mi160, MARTINI)를 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다. 산도는 시료를 정제수로 희석(1 : 9)하여 알칼리 표준용액(NaOH)으로 적정하여 유기산을 분석하였다. 산도를 구하는 공식은 다음과 같다. Acidity(%) = (V x F x A x D x 100) / S (V: 0.1N-NaOH 용액의 적정치 소비량(mL); F: 0.1N-NaOH 용액의 역가; A: 0.1N-NaOH 용액 1mL에 상당하는 유기산의 양(0.009); D: 희석배수; S : 시료 채취량). 환원당은 DNS(3,5-Dinitrosalicylic acid)와 Rochelle 염으로 발색하여 575nm에서 흡광도를 측정하였다. HPLC를 이용한 DHNA 함량 분석은 앞서 설명한 조건과 동일하게 수행하였다. 이 결과에서도 앞의 결과와 마찬가지로 첨가군의 DHNA 함량이 무첨가군에 비해 증가되는 경향을 보이지 않았다. pH, 산도, 환원당 결과는 Fig. 13에 나타내었고 DHNA 함량 분석의 결과는 Fig. 14에 나타내었다.

C양조장의 원료를 이용하여 두 번에 걸친 막걸리 제조실험 결과 DHNA 함량에 있어 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주 첨가군과 무첨가군 사이에 큰 차이가 없어 D양조장의 원료를 얻어 막걸리 제조실험을 수행하였다. 또한 주모단계, 1단 담금 단계, 2단 담금 단계에 균을 첨가하는 것이 큰 효과가 없을 것으로 판단하여 2단 담금 후 에탄올 도수를 6-7도가 되게 물을 첨가하여 체로 거른 후 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 접종하여 배양하면서 경시적으로 pH, 산도, 환원당, DHNA 함량을 분석하였다. 1단 담금은 주모 50mL, 쌀입국 100g, 물 100mL를 혼합하여 25 $^{\circ}$ C, 48시간 배양하였으며 2단 담금은 1단 담금액에 쌀입국 350g, 누룩 2.18g, 물 560mL를 혼합하여 25 $^{\circ}$ C, 72시간 배양하였다. 2단 담금액을 체로 거른 다음 에탄올 도수를 6-7도로 물을 섞어 조정된 후 멸균된 유리병 4개에 각각 500mL씩 넣고 두 개에 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 1% 첨가하였다. 첨가군과 무첨가군 각각 1개씩을 10 $^{\circ}$ C와 25 $^{\circ}$ C에서 배양하면서 3일 간격으로 15일간 pH, 산도, 환원당, DHNA 함량을

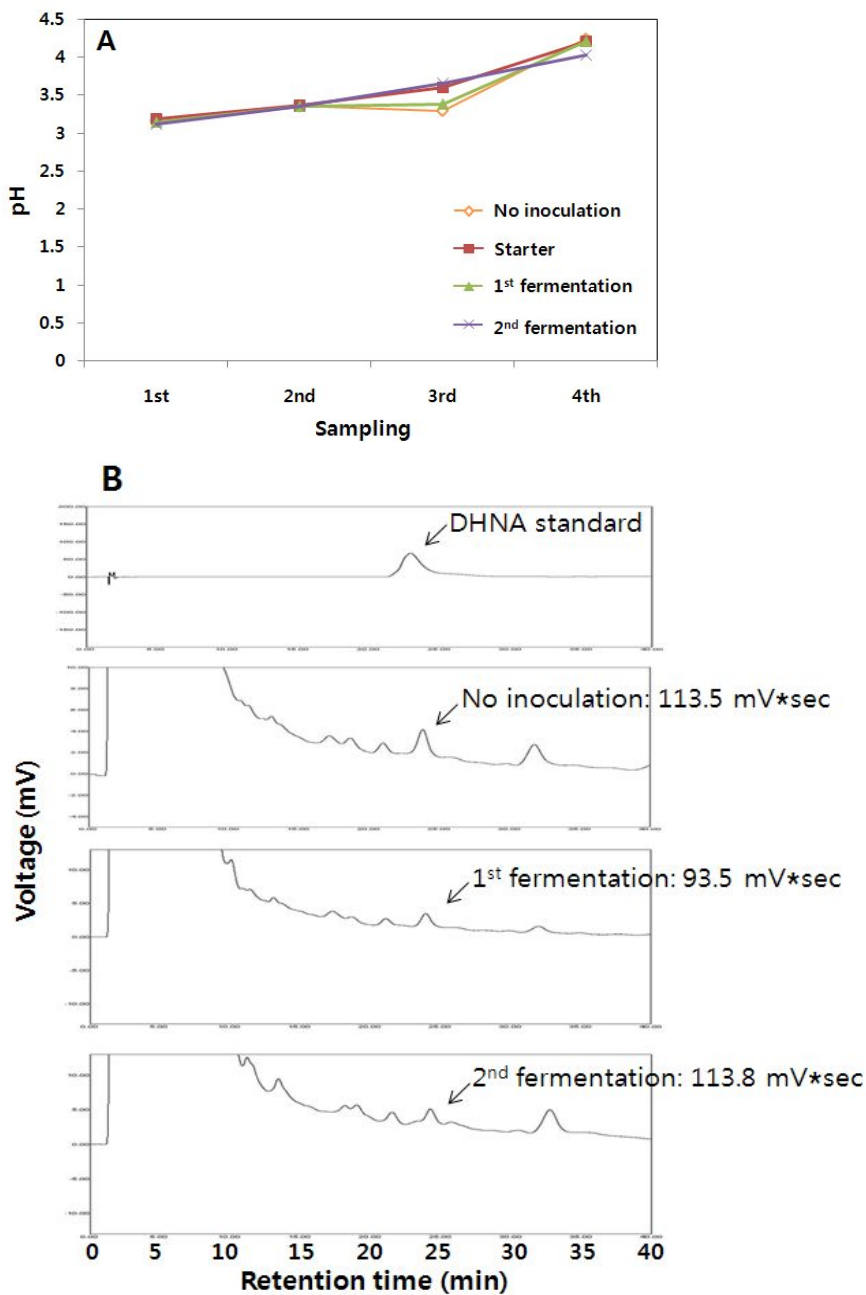


Fig. 11. pH values (A) and DHNA (1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid) contents (B) during makgeolli fermentation with *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 (pCW4) strain. Sampling was performed 4 times. 1st: Starter preparation step; 2nd: 1st fermentation step; 3rd: 2nd fermentation step; 4th: Makgeolli final product.

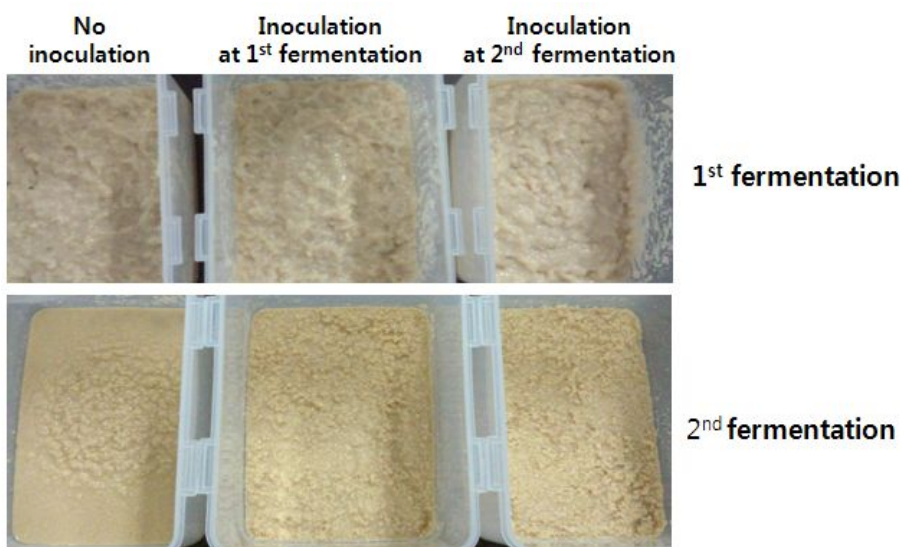


Fig. 12. Makgeolli preparation process.

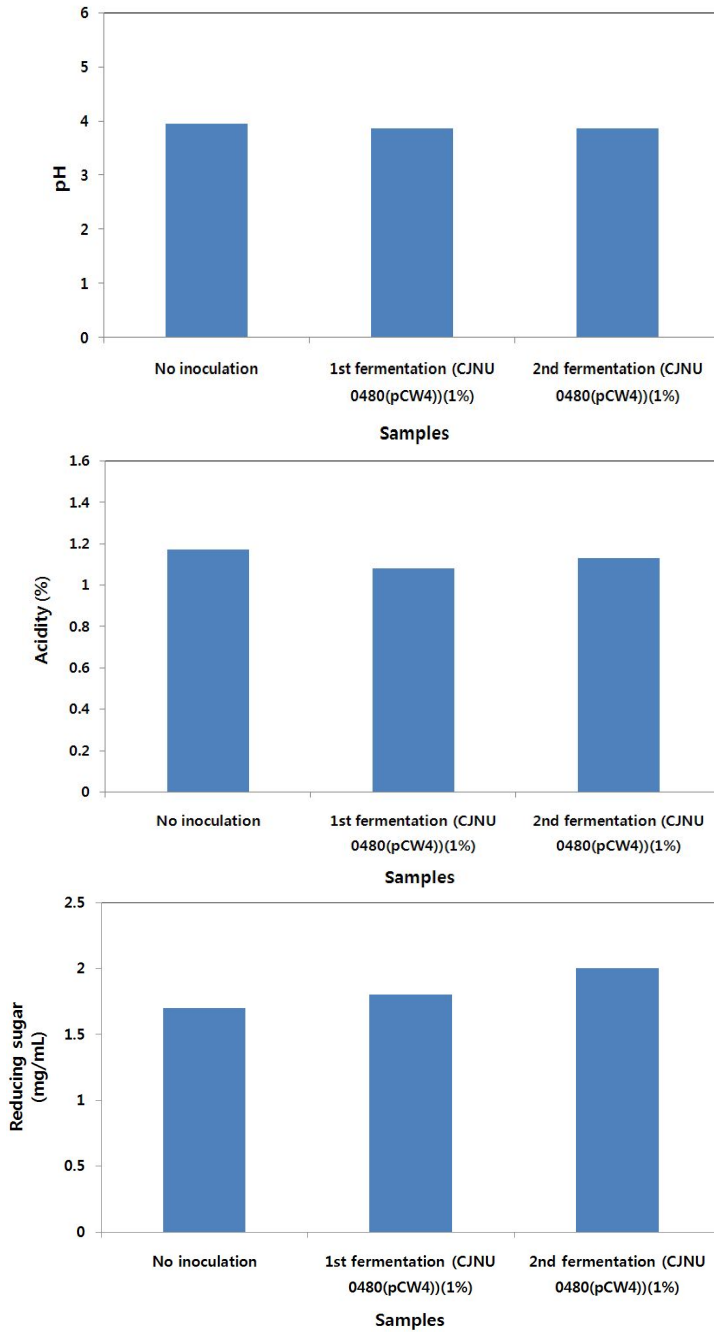


Fig. 13. pH values, acidity, and reducing sugar contents after makgeolli fermentation with *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 (pCW4) strain.

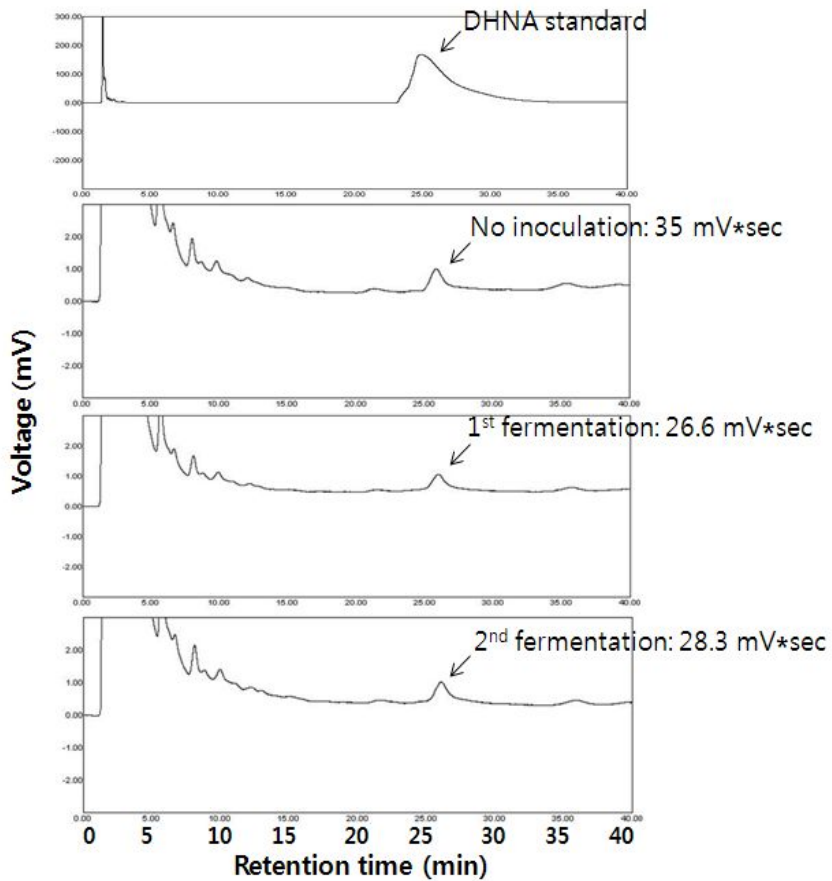


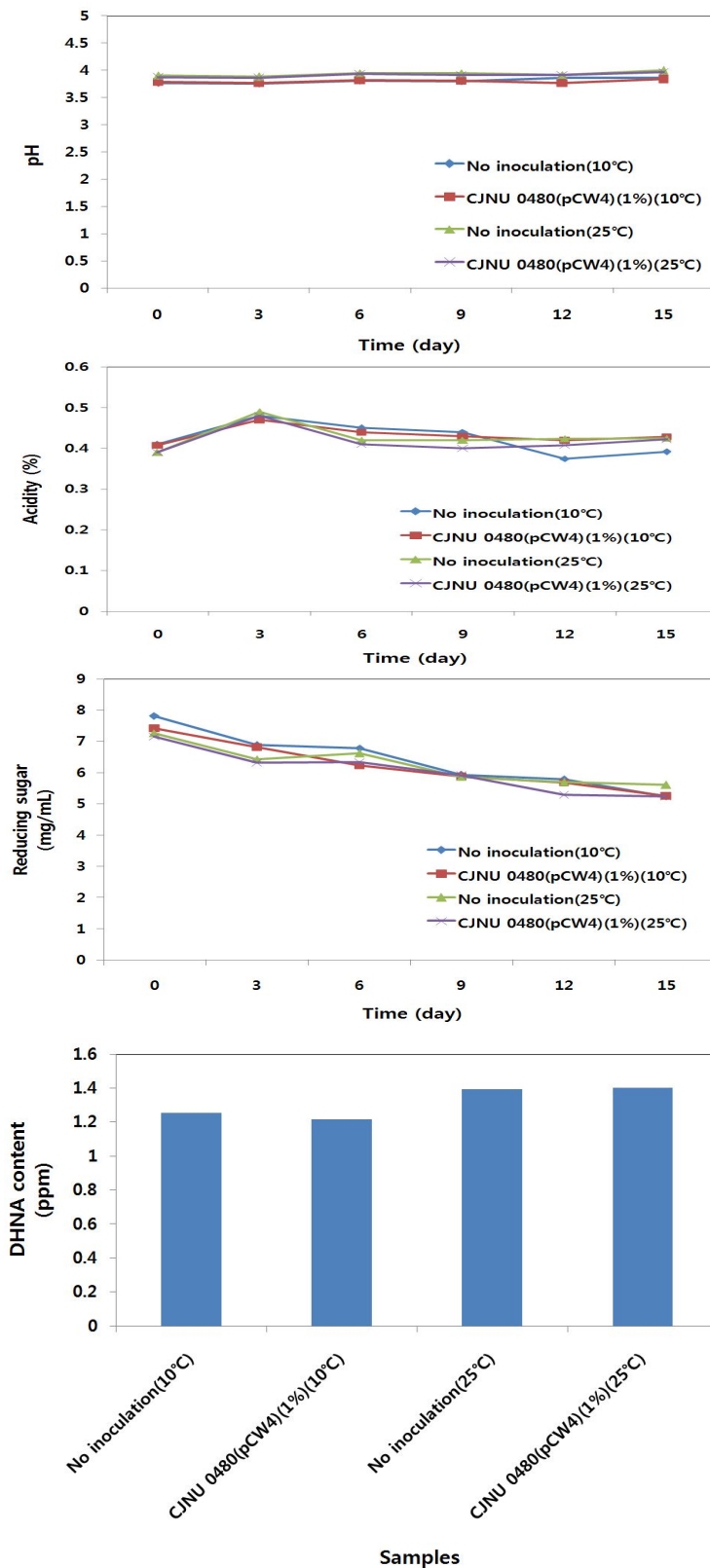
Fig. 14. DHNA (1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid) contents after makgeolli fermentation with *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 (pCW4) strain.

분석하였다.

pH는 pH 측정기(Mi160, MARTINI)를 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다. 산도는 시료를 정제수로 희석(1 : 9)하여 알칼리 표준용액(NaOH)으로 적정하여 유기산을 분석하였다. 환원당은 DNS(3,5-Dinitrosalicylic acid)와 Rochelle 염으로 발색하여 575nm에서 흡광도를 측정하였다. HPLC를 이용한 DHNA 함량 분석은 앞서 설명한 조건과 동일하게 수행하였다. 실험결과 pH, 산도 및 환원당은 시료 간에 큰 차이가 없었으며 DHNA 함량의 경우에도 10°C에서 보다는 25°C에서 DHNA 함량이 다소 증가하는 경향을 보였으나 첨가균과 무첨가균 사이에 유의적인 차이는 보이지 않았다(Fig. 15).

두 양조장(C, D)으로부터의 원료를 얻어 막걸리 제조과정 및 제조 후에 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 첨가하여 무첨가균과 DHNA 함량을 비교분석한 결과 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되어 현장적용 실험을 수행할 A양조장으로부터 유통직전의 막걸리를 구하여 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 첨가한 후 무첨가균과 비교실험을 수행하였다. 막걸리를 2개의 멸균된 유리병에 각각 500mL씩 첨가한 후 1개의 병에 하룻밤 배양한 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 펩톤수(0.1%, w/v)에 세척한 후 최종농도 1%로 첨가하였다. 균주 첨가균 및 무첨가균을 막걸리 유통온도인 10°C에 보존하면서 0, 3, 6일째 시료를 취하여 pH, 산도, 환원당, 유산균 및 효모수, DHNA 함량을 비교분석하였다. pH는 pH 측정기(Mi160, MARTINI)를 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다. 산도는 시료를 정제수로 희석(1 : 9)하여 알칼리 표준용액(NaOH)으로 적정하여 유기산을 분석하였다. 환원당은 DNS(3,5-Dinitrosalicylic acid)와 Rochelle 염으로 발색하여 575nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 유산균수와 효모수의 측정은 시료를 무균적으로 취해 펩톤수(0.1%, w/v)와 1:9의 비율로 혼합하여 10진 희석법으로 희석하였으며 이를 MRS 고체배지와 YPD 고체배지에 도말하여 37°C, 24시간 배양 후 유산균수와 효모수를 측정하였으며 cfu(colony forming unit)/mL로 나타내었다. 또한 동일한 희석액을 5µg/mL의 erythromycin이 포함된 MRS 고체배지에 도말하여 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 포함한 erythromycin 내성 균수 측정하였다. HPLC를 이용한 DHNA 함량 측정은 앞서 설명한 방법으로 수행하였다. 실험결과 pH, 산도, 환원당 및 효모수의 경우 첨가균과 무첨가균 사이에 큰 차이가 없었으며 유산균 수 및 erythromycin 내성 균수의 경우 첨가균에서 높게 나타났다(Fig. 16, 17). DHNA 함량의 경우 첨가균과 무첨가균 사이에 유의적인 차이가 없었다(Fig. 18). 이는 동일 양조장의 막걸리를 이용한 실험에서 10°C 보존의 경우 DHNA 함량이 증가하지 않는 결과와 일치하였다.

A양조장으로부터 추가적으로 막걸리를 구입하여 위와 동일한 조건에서 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 첨가한 후 25°C에서 배양하면서 경시적으로(0, 2, 4, 6일) pH, 산도, 환원당, 유산균 및 효모수, DHNA 함량을 분석하였다. 구입한 막걸리를 2개의 멸균된 유리병에 각각 500mL씩 첨가한 후 1개의 병에 하룻밤 배양한 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 펩톤수(0.1%, w/v)에 세척한 후 최종농도 1% 농도로 첨가하였다. 균주 첨가 및 무첨가균을 25°C에서 배양하면서 경시적으로 시료를 취해 분석에 사용하였다. pH는 pH 측정기(Mi160, MARTINI)를 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다. 산도는 시료를 정제수로 희석(1:9)하여 알칼리 표준용액(NaOH)으로 적정하여 유기산을 분석하였다. 환원당은 DNS(3,5-Dinitrosalicylic acid)와 Rochelle 염으로 발색하여 575nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 유산균수와 효모수의 측정은 시료를 무균적으로 취해 펩톤수(0.1%, w/v)와 1:9의 비율로 혼합하여 10진 희석법으로 희석하였으며 이를 MRS 고체배지와 YPD 고체배지에 도말



Samples	DHNA Content (ppm)
No inoculation (10°C)	1.253±0.003 ^b
CJNU 0480 (pCW4) (1%) (10°C)	1.216±0.003 ^a
No inoculation (25°C)	1.392±0.006 ^c
CJNU 0480 (pCW4) (1%) (25°C)	1.400±0.009 ^c

Fig. 15. pH values, acidity, reducing sugar contents, and DHNA contents after makgeolli fermentation with *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 (pCW4) strain during storage at 10°C and 25°C. In table, values are mean±SD (n=3). Means having different letters are significantly different by Duncan's multiple range tests (p<0.05).

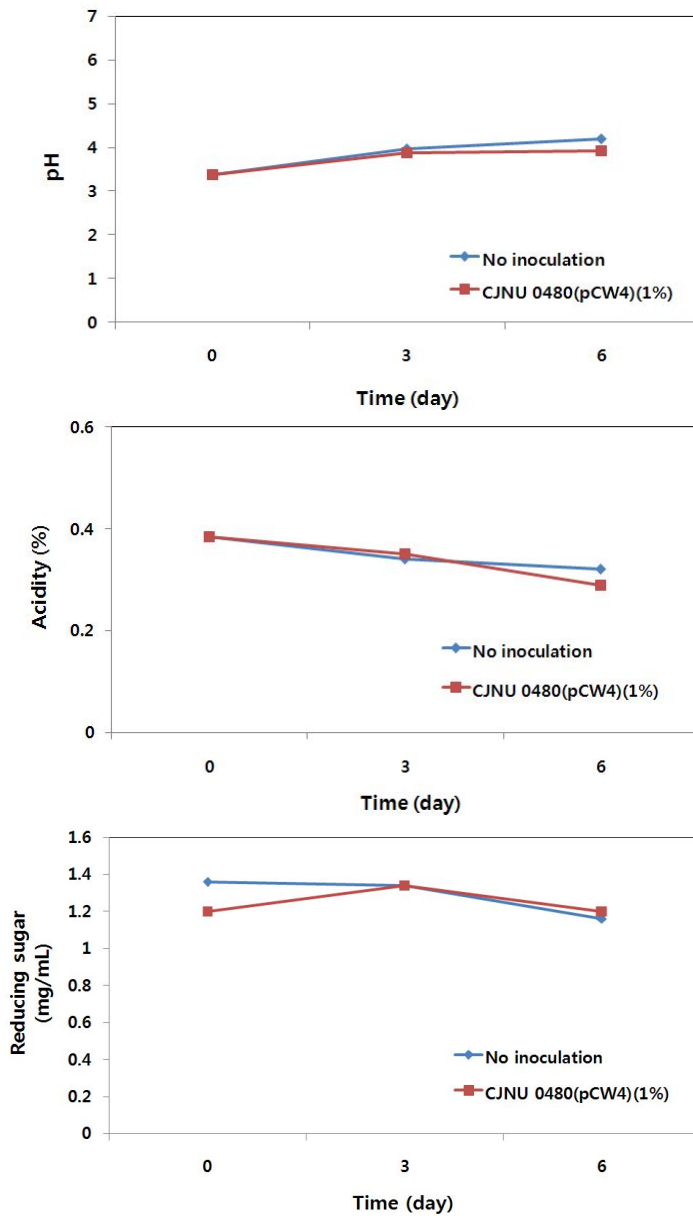


Fig. 16. pH values, acidity, and reducing sugar contents of makgeolli products with *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 (pCW4) strain during storage at 10°C.

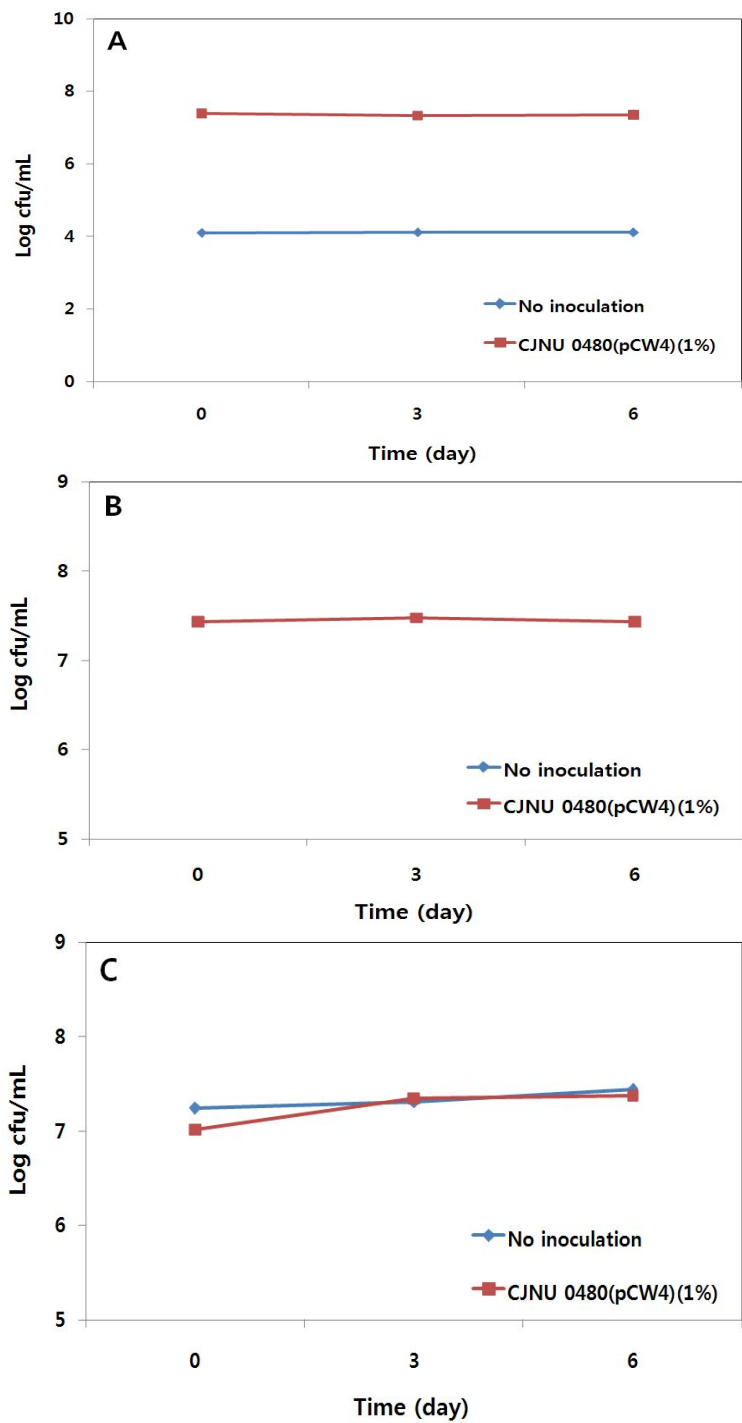


Fig. 17. Viable cell counts of lactic acid bacteria (A), erythromycin resistant cells (B), and yeast (C) of makgeolli products with *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 (pCW4) strain during storage at 10 °C.

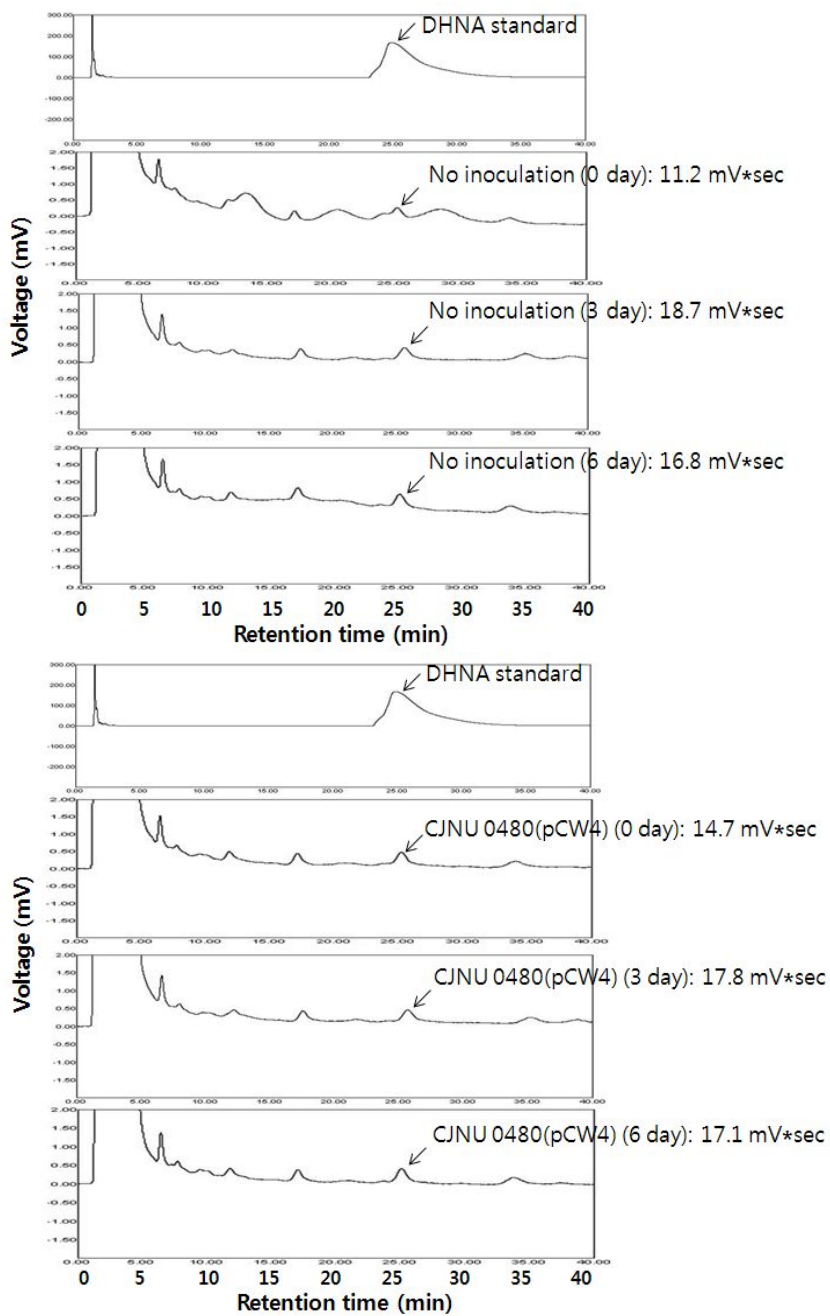


Fig. 18. DHNA contents of makgeolli products with *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 (pCW4) strain during storage at 10°C.

하여 37°C, 24시간 배양 후 유산균수와 효모수를 측정하였으며 cfu(colony forming unit)/mL로 나타내었다. HPLC를 이용한 DHNA 함량 측정은 앞서 설명한 방법으로 수행하였다. 실험 결과 pH 및 산도는 첨가균과 무첨가균 사이에 큰 차이가 없었으며 유산균의 경우 첨가한 군에서 다소 높게 나타났으며 효모수의 반대 경향을 보였다. DHNA 함량의 경우 2일째에는 첨가균에서 높게 나타났으나 이후 무첨가균과 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 19). 이는 이전의 실험 결과와는 다소 다른 양상을 보였다.

A양조장의 막걸리 적용실험에서 25°C, 2일째 시료에서만 무첨가균에 비해 DHNA 함량이 높게 나타났다. 그럼에도 불구하고 추가적인 연구수행을 위해 A양조장으로부터 막걸리 원료를 구입하여 실험실에서 막걸리를 제조하였으며 제조단계 별로 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 첨가 하여 막걸리 제조 완료 후 무첨가균과 함께 비교 분석을 수행하였다. 1단 담금은 주모 50mL, 쌀입국 450g, 물 900mL를 혼합한 후 25°C, 48시간 배양하였으며 2단 담금은 1단 담금액에 쌀입국 1.66kg, 정제효소 2g, 물 3L를 첨가하여 혼합한 후 25°C, 72시간 배양하였다. *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주는 1단 및 2단 담금 시 각각 1% 접종하였다. 2단 발효 완료 후 물을 이용하여 에탄올 함량을 6-7도 되도록 조정한 후 3개의 멸균 유리병에 500mL씩 취한 후 25°C에서 추가배양 하면서 pH, 산도, 유산균 및 효모수, DHNA 함량을 분석하였다. pH는 pH 측정기(Mi160, MARTINI)를 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다. 산도는 시료를 정제수로 희석(1:9)하여 알칼리 표준용액(NaOH)으로 적정하여 유기산을 분석하였다. 시료의 유산균수와 효모수의 측정은 시료를 무균적으로 취해 펩톤수(0.1%, w/v)와 1:9의 비율로 혼합하여 10진 희석법으로 희석하였으며 이를 MRS 고체배지와 YPD 고체배지에 도말하여 37°C, 24시간 배양 후 유산균수와 효모수를 측정하였으며 cfu(colony forming unit)/mL로 나타내었다. 또한 동일한 희석액을 5µg/mL의 erythromycin이 포함된 MRS 고체배지에 도말하여 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 포함한 erythromycin 내성 균수 측정하였다. HPLC를 이용한 DHNA 함량 측정은 앞서 설명한 방법으로 수행하였다. 실험 결과 pH의 경우 첨가균과 무첨가균 사이에 큰 차이가 없었으며 산도의 경우는 첨가균에서 다소 높게 나타났다. 유산균과 효모수에서도 큰 차이를 보이지 않았다. *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4)를 포함하는 erythromycin 내성균은 첨가균에서만 사용한 희석배수에서 검출되었다. DHNA 함량의 경우 첨가균과 무첨가균에서 경시적으로 증가하는 경향을 보였으며 분석 마지막 날인 6일째 결과만 보면 1단 담금 단계에서 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 첨가한 군에서 DHNA 함량이 가장 높게 나타났으며 2단 담금 단계 첨가균과 무첨가균 사이에는 차이를 보이지 않았다(Fig. 20).

W. paramesenteroides CJNU 0480 및 *W. paramesenteroides* CJNU 0480(pCW4) 균주를 이용하여 막걸리 제조과정 및 제조 후에 첨가하여 DHNA 함량을 증가시키기 위한 일련의 실험들을 진행하였으나 재현성 확보에 어려움이 있어 추가적인 DHNA 생산 유산균 선발을 위한 실험을 진행하였다. 실험실에 보관 중인 유산균들을 대상으로 유청배지(10%, w/v)에서 배양시킨 후 DHNA 생산 유무를 확인하였다. 즉, 극저온냉동고(-76°C)에 보관 중인 균주들을 MRS broth에서 활성화한 후, 121°C, 7분간 멸균한 유청배지(10%, w/v)에 1% 접종한 뒤 혐기 jar에서 37°C, 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 유청발효물에 sodium L-ascorbate(Sigma Co.)를 최종농도 0.2% 첨가한 후 배양액의 두 배에 해당하는 메탄올을 첨가하여 혼합하였다. 혼합액을 원심분리(6,000rpm, 10분)한 후 상등액을 취해 감압증발회전농축기(rotary evaporator; 40°C)를 이용하여 농축하였다. 농축액에 두 배 용량의 메탄올을 더 첨가한 후 주사필터(0.45µm, Sartorius)로

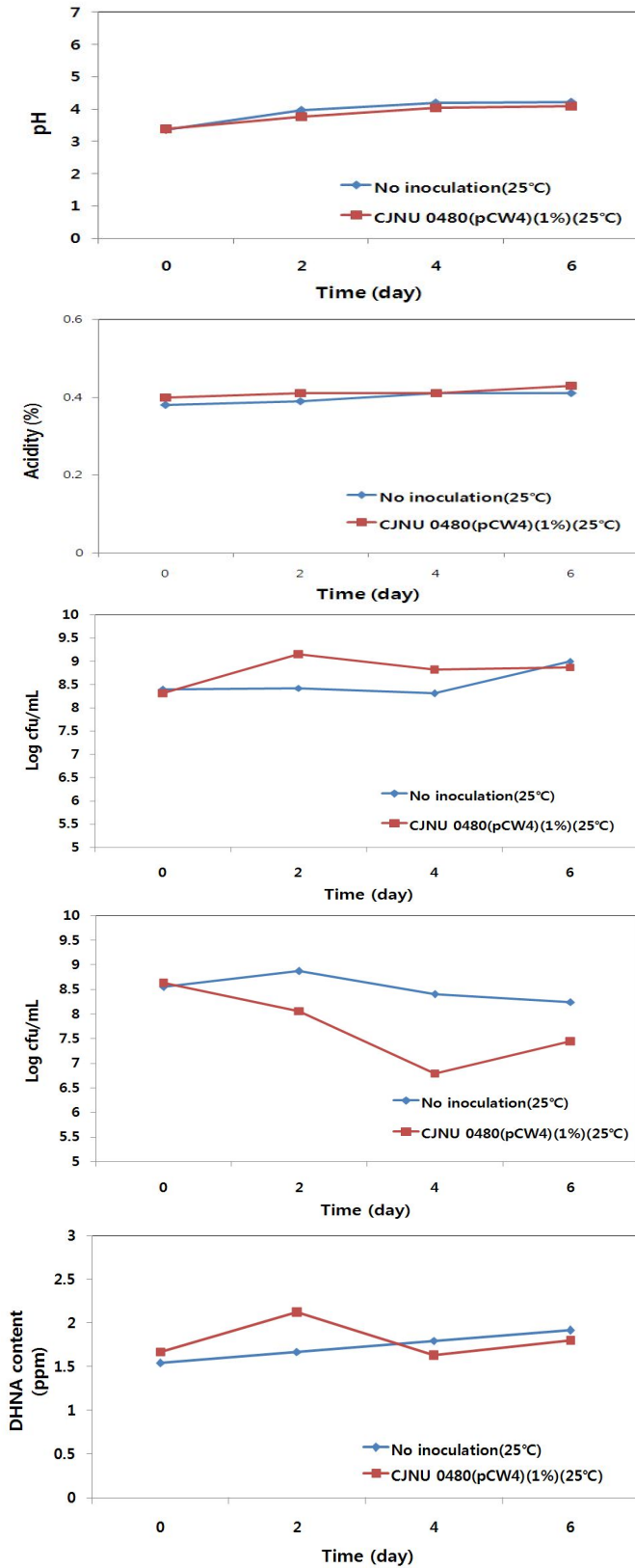


Fig. 19. pH values, acidity, viable cell counts of lactic acid bacteria and yeast, and DHNA contents of makgeolli products with *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 (pCW4) strain during storage at 25°C.

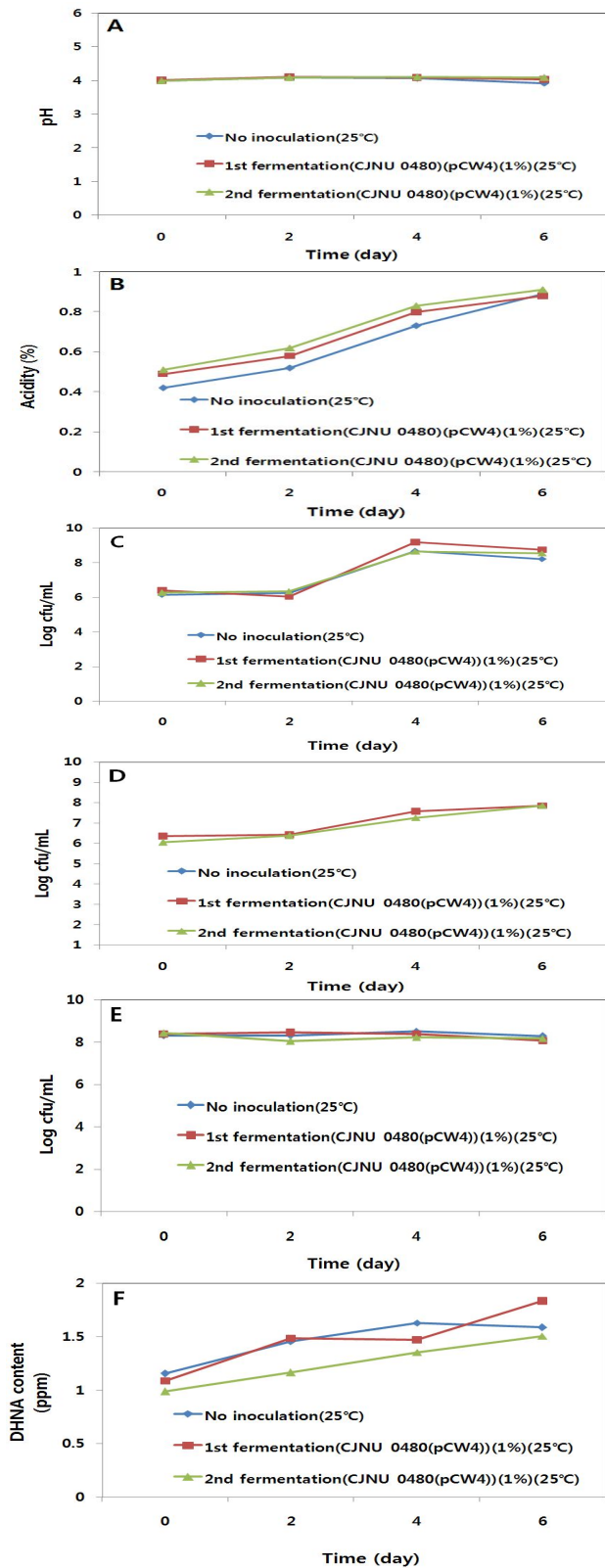
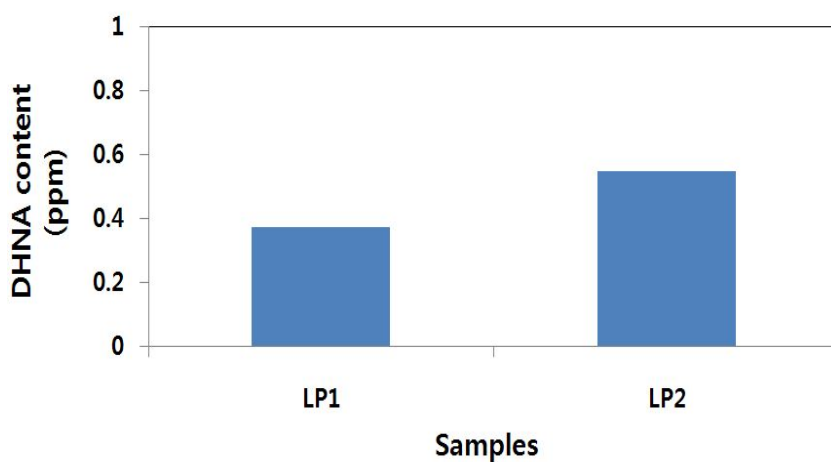


Fig. 20. pH values, acidity, viable cell counts of lactic acid bacteria, erythromycin resistant bacteria and yeast, and DHNA contents of makgeolli samples where *Weissella paramesenteroides* CJNU 0480 (pCW4) strain was added to 1st and 2nd fermentation steps, respectively. The makgeolli samples were stored at 25°C.

여과하고 그 여액을 HPLC 분석시료로 사용하였다. DHNA 정량 분석을 위한 HPLC법은 이전과 동일한 조건으로 진행하였다. DHNA 생산 유산균의 선발결과 두 개의 균주(LP1, LP2)가 DHNA를 생산하는 것으로 확인되었으며 16S rRNA 유전자 염기서열을 이용한 균주 동정 결과 LP1 균주는 *Lactobacillus casei*로 LP2 균주는 *Lactobacillus plantarum* 으로 확인되었다 (Fig. 21).

DHNA 생산이 확인된 *L. casei* LP1 및 *L. plantarum* LP2 균주의 막걸리 적용성을 확인하기 위하여 시중에 유통 중인 2종류의 생 막걸리를 구입하여 멸균된 유리병에 500mL씩 분주 한 후 *L. casei* LP1 및 *L. plantarum* LP2 균주를 각각 1%씩 접종한 후 25°C에서 배양하면서 경시적으로(0, 2, 4, 6, 8, 10일) pH, 산도, 유산균 및 효모수를 측정하였고 2일과 8일째는 DHNA 함량도 분석하였다. pH는 pH 측정기(Mi160, MARTINI)를 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다. 산도는 시료를 정제수로 희석(1:9)하여 알칼리 표준용액(NaOH)으로 적정하여 유기산을 분석하였다. 시료의 유산균수와 효모수의 측정은 시료를 무균적으로 취해 펩톤수(0.1%, w/v)와 1:9의 비율로 혼합하여 10진 희석법으로 희석하였으며 이를 MRS 고체배지와 YPD 고체배지에 도말하여 37°C, 24시간 배양 후 유산균수와 효모수를 측정하였으며 cfu(colony forming unit)/mL로 나타내었다. HPLC를 이용한 DHNA 함량 측정은 앞서 설명한 방법으로 수행하였다. 실험 결과 한 막걸리의 경우 첨가균과 무첨가균 사이에 전반적으로 유의적인 차이점이 발견되지 않았으나 산도의 경우 무첨가균에서 다소 높은 값을 보였으며 유산균수의 경우 *L. plantarum* LP2 첨가균에서 8일째 높게 나타났으며 효모수의 경우 무첨가균이 첨가균에 비해 다소 높게 나타났다. DHNA 함량의 경우 2일째는 첨가균과 무첨가균 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 8일째 시료에서는 오히려 무첨가균에서 높게 나타났다.(Fig. 22). 또 다른 한 막걸리의 경우 pH에서는 시료간에 큰 차이가 없었고 산도의 경우 *L. casei* LP1 첨가균에서 다소 높게 나타났으며 유산균수의 경우 첨가균이 무첨가균에 비해 초반부에는 높게 나타났으나 후반부에는 큰 차이가 없었다. 효모수의 경우 유의적인 차이가 보이지 않았다. DHNA 함량에서는 앞의 결과와는 달리 2일째 시료에서만 첨가균이 무첨가균에 비해 높게 나타났다(Fig. 23).

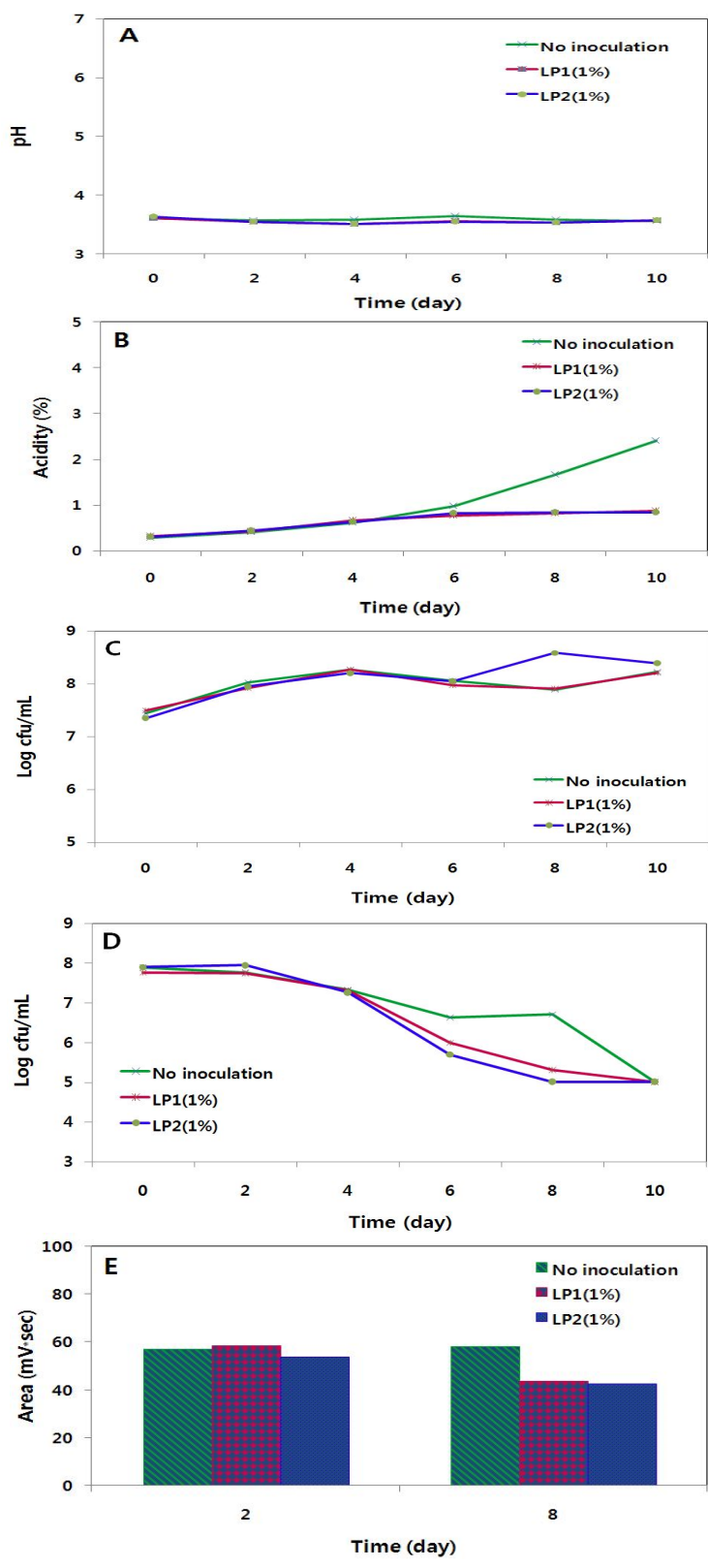
A양조장으로부터 얻은 원료를 이용하여 실험실에서 막걸리를 제조하였으며(Fig. 24) 1단 담금과 2단 담금 과정에서 *L. casei* LP1 및 *L. plantarum* LP2 균주를 첨가하여 발효를 진행하였고 발효 완료 후 체로 거르고 물을 이용하여 에탄올 도수를 6-7도로 조정한 후 막걸리 시제품을 제조한 후 25°C에서 배양하면서 경시적으로(0, 3, 6, 9일) pH, 산도, 환원당, 유산균 및 효모수, DHNA 함량을 분석하였다. 1단 담금은 주모 50mL, 쌀입국 450g, 물 900mL을 잘 혼합한 후 25°C, 5일간 배양하였다. 2단 담금은 1단 발효가 끝난 담금액에 쌀입국 2kg, 정제효소 2g, 물 3.6L를 혼합한 후 25°C, 4일간 배양하였다. *L. casei* LP1 및 *L. plantarum* LP2 균주는 1단 및 2단 담금 단계에서 각각 최종농도 1%되게 접종하였다. pH는 pH 측정기(Mi160, MARTINI)를 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다. 산도는 시료를 정제수로 희석(1:9)하여 알칼리 표준용액(NaOH)으로 적정하여 유기산을 분석하였다. 환원당은 DNS(3,5-Dinitrosalicylic acid)와 Rochelle 염으로 발색하여 575nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 유산균수와 효모수의 측정은 시료를 무균적으로 취해 펩톤수(0.1%, w/v)와 1:9의 비율로 혼합하여 10진 희석법으로 희석하였으며 이를 MRS 고체배지와 YPD 고체배지에 도말하여 37°C, 24시간 배양 후 유산균수와 효모수를 측정하였으며 cfu(colony forming unit)/mL로 나타내었다. HPLC를 이용한 DHNA 함량 측정은 앞서 설명한 방법과 동일하게 수행하였다. 실험 결과 유산균수를 제외하



Samples	DHNA Content (ppm)
LP1	0.372±0.012
LP2	0.548±0.023

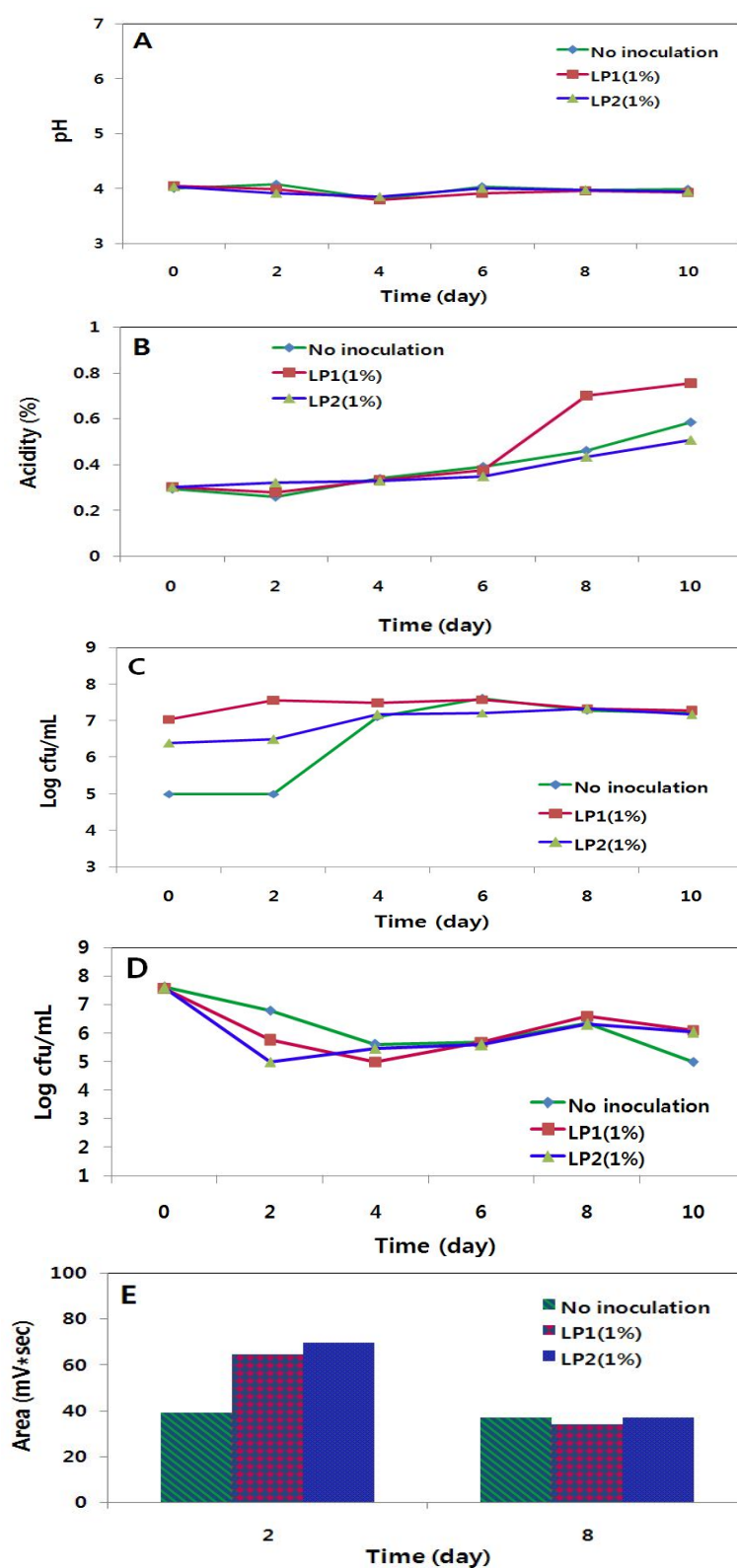
Strain	Identification
LP1	<i>Lactobacillus casei</i>
LP2	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Fig. 21. DHNA production of *Lactobacillus casei* LP1 and *Lactobacillus plantarum* LP2 strain and their identification using 16S rRNA gene sequencing. In table, values are mean±SD (n=3).



Samples	DHNA peak area (mV*sec)	
	2 day	8 day
No inoculation	57.3393±0.016 ^b	58.3978±0.029 ^c
LP1(1%)	58.7014±0.007 ^c	43.7767±0.016 ^b
LP2(1%)	54.0384±0.009 ^a	42.7539±0.006 ^a

Fig. 22. pH values (A), acidity (B), viable cell counts of lactic acid bacteria (C) and yeast (D), and DHNA contents (E) of commercial makgeolli samples where *Lactobacillus casei* LP1 or *Lactobacillus plantarum* LP2 strain was added during storage at 25°C. In table, values are mean±SD (n=3). Means having different letters are significantly different by Duncan's multiple range tests (p<0.05).



Samples	DHNA peak area (mV*sec)	
	2 day	8 day
No inoculation	39.2794±0.006 ^a	37.1610±0.005 ^b
LP1(1%)	64.5396±0.022 ^b	33.8459±0.012 ^a
LP2(1%)	69.5696±0.010 ^c	37.1610±0.007 ^b

Fig. 23. pH values (A), acidity (B), viable cell counts of lactic acid bacteria (C) and yeast (D), and DHNA contents (E) of commercial makgeolli samples where *Lactobacillus casei* LP1 or *Lactobacillus plantarum* LP2 strain was added during storage at 25°C. In table, values are mean±SD (n=3). Means having different letters are significantly different by Duncan's multiple range tests (p<0.05).

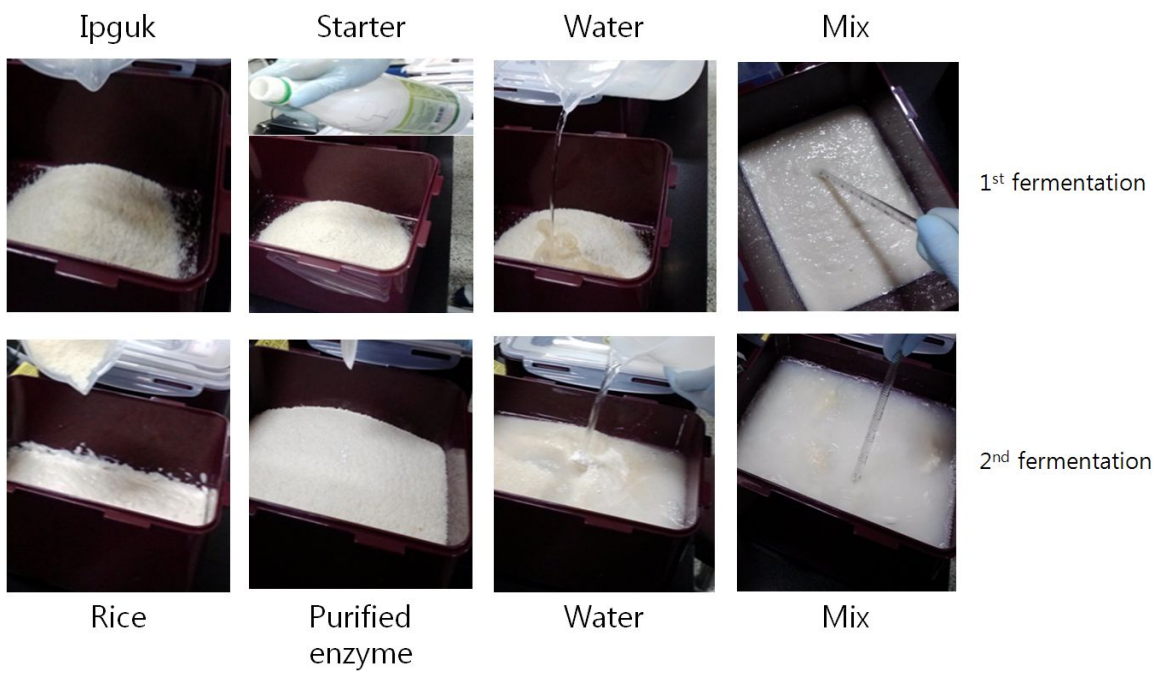


Fig. 24. Makgeolli preparation process.

고는 pH, 산도, 환원당 및 효모수에서 첨가균과 무첨가균 사이에 큰 차이가 없었다(Fig. 25). DHNA 함량의 경우 전반적으로 첨가균과 무첨가균에서 낮은 함량을 보였으나 *L. casei* LP1 및 *L. plantarum* LP2 균주 시료에서 첨가균이 무첨가균에 비해 DHNA 함량이 높게 나타났다(Fig. 26).

현장적용 실험에 앞서 A양조장으로부터 제조된 막걸리를 구입하여 *L. casei* LP1 및 *L. plantarum* LP2 두 균주를 0.5%씩 혼합 첨가하여 25°C에서 24시간 배양한 후 10°C에서 48시간 보관하면서 경시적으로 pH, 산도, 유산균 및 효모수, DHNA 함량을 분석하였다. 즉, 극저온냉동고(-76°C)에 보관 중인 균주들을 꺼내어 MRS 10mL에 1% 접종하여 37°C, 24시간 배양하여 활성화한 후에 펩톤수(0.1%, w/v)로 세척하여 막걸리에 각각의 농도로 첨가하였다. pH는 pH 측정기(Mi160, MARTINI)를 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다. 산도는 시료를 정제수로 희석(1 : 9)하여 알칼리 표준용액(NaOH)으로 적정하여 유기산을 분석하였다. 시료의 유산균수와 효모수의 측정은 시료를 무균적으로 취해 펩톤수(0.1%, w/v)와 1:9의 비율로 혼합하여 10진 희석법으로 희석하였으며 이를 MRS 고체배지와 YPD 고체배지에 도말하여 37°C, 24시간 배양 후 유산균수와 효모수를 측정하였으며 cfu(colony forming unit)/mL로 나타내었다. HPLC를 이용한 DHNA 함량 측정은 앞서 설명한 방법으로 수행하였다. 실험결과 pH, 산도, 유산균 수 및 효모수에 있어 첨가균과 무첨가균 사이에 큰 차이가 없었다. DHNA 함량의 경우 25°C, 24시간 후에 첨가균에서 무첨가균에 비해 높은 함량의 DHNA가 검출되었으며 10°C, 48시간 후에는 그 차이가 다소 줄어드는 것으로 확인되었다(Fig. 27).

제 3 절 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 첨가 막걸리의 품질 분석

DHNA 및 DHNA 생산균주(*W. paramesenteroides* CJNU 0480, *L. casei* LP1, *L. plantarum* LP2)를 이용한 한천확산법(agar diffusion method)에서는 사용한 초산균(*Acetobacter aceti* KCTC 1010)에 대한 항균활성이 나타나지 않았으나 동시배양의 경우 *L. casei* LP1 및 *L. plantarum* LP2 균주를 혼합 사용했을 때 초산균에 대한 생육 저해가 다소 나타나는 것으로 확인되었다(Fig. 28). 즉, *L. casei* LP1, *L. plantarum* LP2 및 *Acetobacter aceti* 균주를 각각 MRS 5mL과 YPM 5mL에 1% 접종한 후 37°C와 26°C에서 활성화 한 후 A양조장의 생 막걸리를 121°C 7분간 멸균한 후 *L. casei* LP1(0.5%), *L. plantarum* LP2(0.5%), *Acetobacter aceti*(1%)를 첨가하였다. 막걸리를 25°C에서 배양하면서 경시적으로(0, 1, 2, 3일) pH, 산도, 유산균 및 초산균 수를 측정하였다. pH는 pH 측정기(Mi160, MARTINI)를 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다. 산도는 시료를 정제수로 희석(1:9)하여 알칼리 표준용액(NaOH)으로 적정하여 유기산을 분석하였다. 시료의 유산균수는 시료를 무균적으로 취해 펩톤수(0.1%, w/v)와 1:9의 비율로 혼합하여 10진 희석법으로 희석하였으며 이를 MRS 고체배지 도말 한 후 37°C 48시간 배양하였고, 초산균은 YPM 고체배지에 도말 한 후 26°C 48시간 배양하였다.

또한 *W. paramesenteroides* CJNU 0480, *L. casei* LP1 및 *L. plantarum* LP2 균주를 막걸리 제조 과정에 첨가했을 때 균수에서는 다소의 차이를 보였으나 pH, 산도 및 환원당의 함량에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 이 결과로 DHNA 생산 균주를 막걸리에 첨가했을 때 막걸리의 품질에 크게 영향을 미치지 않을 것으로 판단되었다.

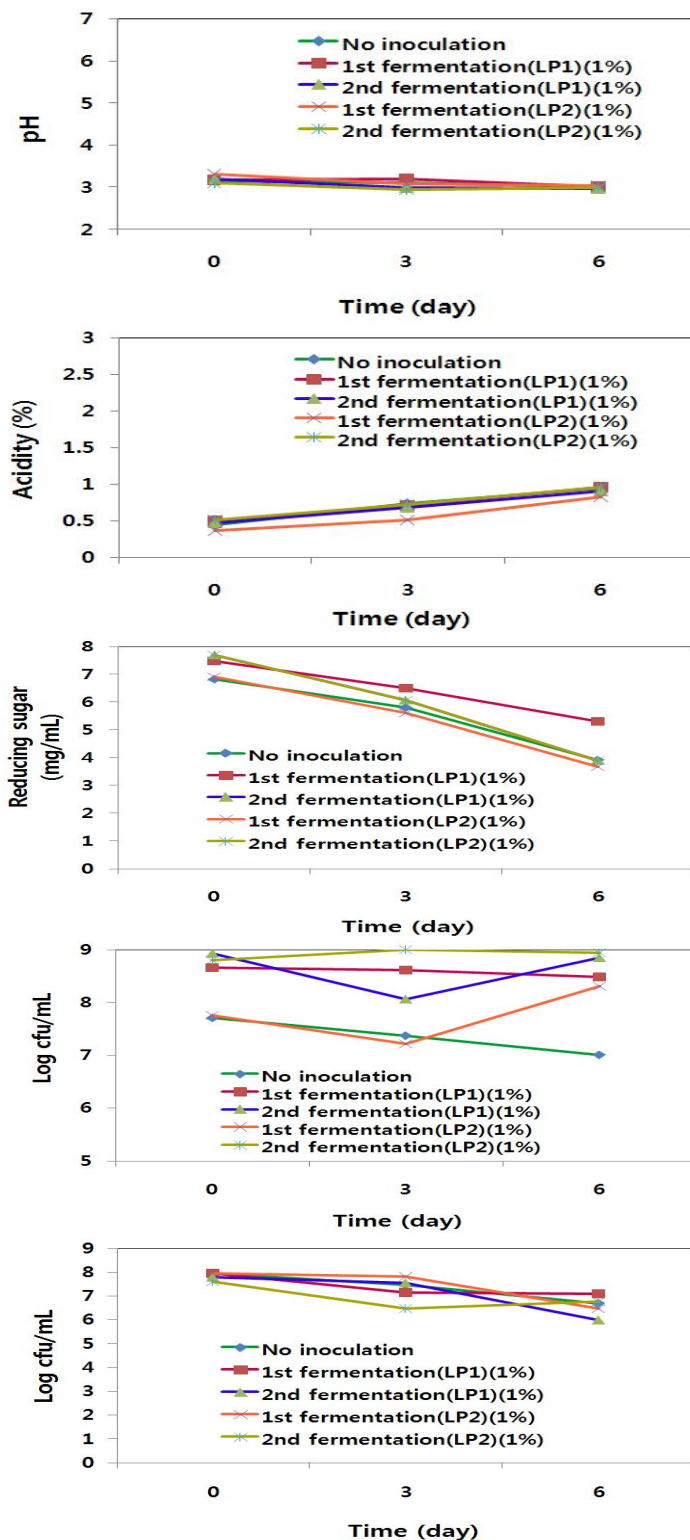


Fig. 25. pH values, acidity, reducing sugar contents, and viable cell counts of lactic acid bacteria and yeast of prepared makgeolli samples where *L. casei* LP1 or *L. plantarum* LP2 strain was added at 1st and 2nd fermentation steps during storage at 25°C.

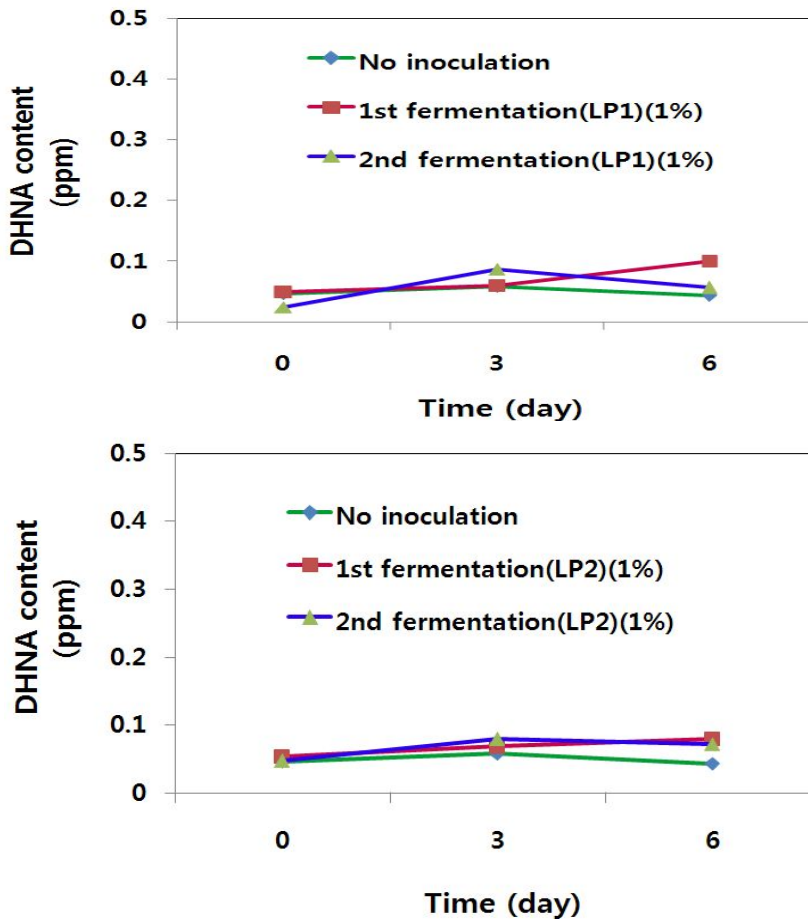
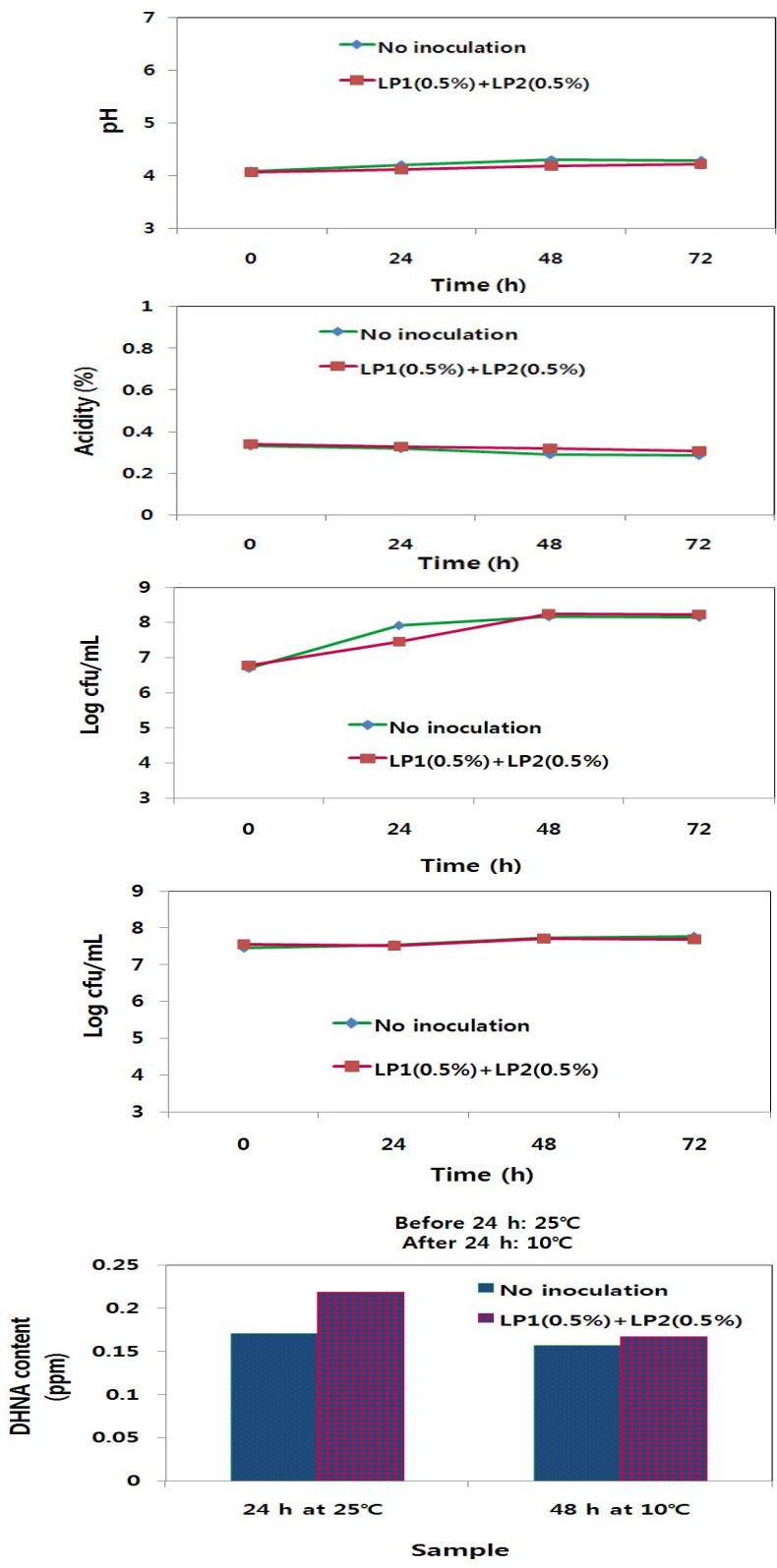


Fig. 26. DHNA contents of prepared makgeolli samples where *Lactobacillus casei* LP1 or *Lactobacillus plantarum* LP2 strain was added at 1st and 2nd fermentation steps during storage at 25°C.



Samples	DHNA Content (ppm)	
	24 h at 25°C	48 h at 10°C
No inoculation	0.1710±0.035 ^a	0.1574±0.004 ^a
LP1(0.5%) + LP2(0.5%)	0.2193±0.003 ^b	0.1672±0.006 ^a

Fig. 27. pH values, acidity, viable cell counts of lactic acid bacteria and yeast, and DHNA contents of makgeolli product samples where *Lactobacillus casei* LP1 and *Lactobacillus plantarum* LP2 strain mix was added during storage at 10 and 25°C. In table, values are mean±SD (n=3). Means having different letters are significantly different by Duncan's multiple range tests (p<0.05).

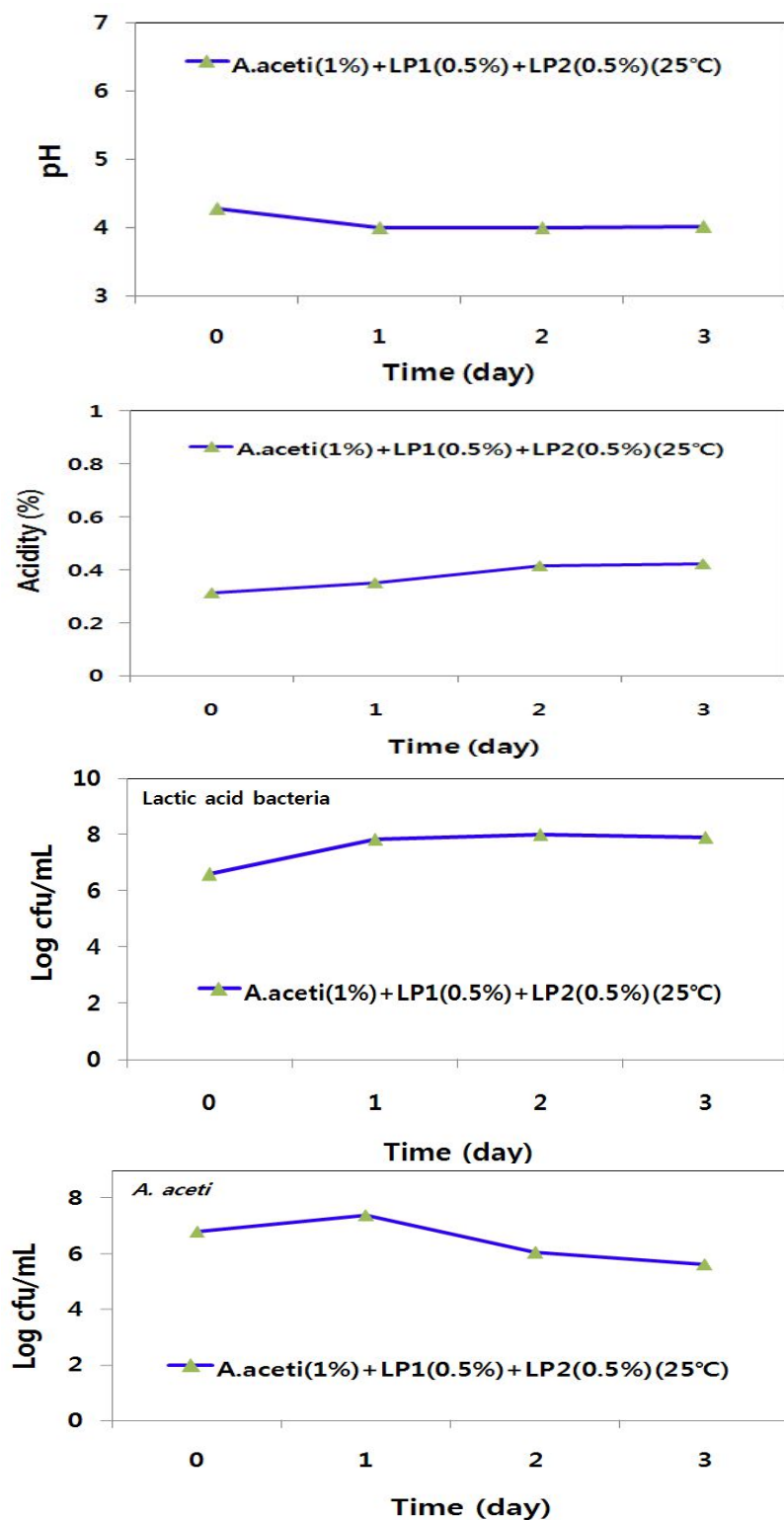


Fig. 28. pH values, acidity, viable cell counts of lactic acid bacteria and *Acetobacter aceti* during co-culture of *A. aceti*, *Lactobacillus casei* LP1, and *Lactobacillus plantarum* LP2 strain.

제 4 절 DHNA 고 함유 막걸리의 기능성 검증

DHNA 고 함유 막걸리와 그렇지 않은 막걸리의 생리활성을 검증하기 위해 DHNA의 기능성인 비피도박테리아 증식능(bifidogenic growth stimulator activity; BGS activity)을 검증하였다. 즉, 막걸리 시료를 6,000xg에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취해 주사필터(0.45um, Sartorius)로 여과하여 BGS 활성 검증을 위한 시료로 사용하였다. 시료 100uL를 비피도박테리아 균주(2%)가 접종된 RCM 액체배지에 첨가한 후 혐기적으로 37℃에서 12시간 배양 후 600nm에서 흡광도를 측정하여 균의 증식유무를 판단하였다. 그 결과 DHNA 함량이 낮은 시료의 경우 균의 증식속도가 대조군(비피도박테리아만 접종)과 비슷한 반면 DHNA 함량이 높은 시료의 경우 대조군과 비교하여 그 증식속도가 빨랐다(Fig. 29). 이는 막걸리 속에 함유된 DHNA가 비피도박테리아의 증식능에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다.

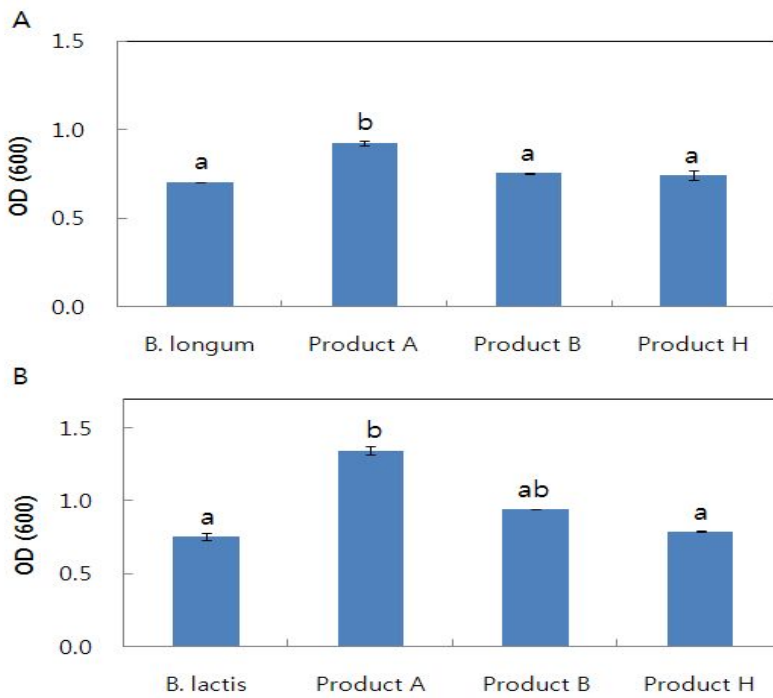


Fig. 29. BGS activity of commercial makgeolli samples for *Bifidobacterium longum* (A) and *Bifidobacterium lactis* (B). *B. longum* or *B. lactis*: *B. longum* FI10564 or *B. lactis* BL750 strain was inoculated alone; Product A, B, or H: *B. longum* FI10564 or *B. lactis* BL750 strain was inoculated with commercial makgeolli product A, B, or H sample. Values are mean±SD (n=3). Means having different letters are significantly different by Duncan's multiple range tests (p<0.05).

제 5 절 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 첨가제 시제품 생산 및 현장 적용 시험

L. casei LP1 및 *L. plantarum* LP2 두 균주를 이용하여 규모를 키워 실험을 진행하였다. 즉, A 양조장에서 최종단계의 막걸리(10L)에 *L. casei* LP1 및 *L. plantarum* LP2 균주를 각각 0.5%씩 접종한 후 25°C에서 48시간 배양 후 병입하여 10°C에서 6일간 보존하면서 경시적으로 pH, 산도, 유산균 및 효모수, DHNA 함량을 분석하였다. pH는 pH 측정기(Mi160, MARTINI)를 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다. 산도는 시료를 정제수로 희석(1:9)하여 알칼리 표준용액(NaOH)으로 적정하여 유기산을 분석하였다. 시료의 유산균수와 효모수의 측정은 시료를 무균적으로 취해 펩톤수(0.1%, w/v)와 1:9의 비율로 혼합하여 10진 희석법으로 희석하였으며 이를 MRS 고체배지와 YPD 고체배지에 도말하여 37°C, 24시간 배양 후 유산균수와 효모수를 측정하였으며 cfu(colony forming unit)/mL로 나타내었다. HPLC를 이용한 DHNA 함량 측정은 앞서 설명한 방법으로 수행하였다. 실험결과 첨가균과 무첨가균 사이에 pH, 산도 및 균수에서 다소의 차이를 보였다. pH의 경우 첨가균에서 다소 낮게 나타났고 산도의 경우 반대로 첨가균에서 다소 높게 나왔다. 유산균 수의 경우 초기에는 첨가균에서 높게 나왔다가 후반부에는 무첨가균과 비슷했고 효모수의 경우 첨가균에서 다소 억제되는 경향을 보였다. DHNA 함량의 경우 10°C에서 6일간 보존 후에 측정한 결과 무첨가균에 비해 높은 함량을 보였다(Fig. 30). 이는 *L. casei* LP1과 *L. plantarum* LP2 균주의 혼합 배양이 막걸리의 DHNA 함량에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

두 번째 현장적용 실험으로 유산균 가공업체에 위탁하여 분말 시제품으로 생산한 *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주를 단독 및 *L. casei* LP1, *L. plantarum* LP2 균주와 혼합하여 양조장에서 막걸리 제조 과정에 첨가하였다. 즉, *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 분말 (10^7 cfu/mL) 단독 첨가, *L. casei* LP1, *L. plantarum* LP2, *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 분말 (10^7 cfu/mL) 혼합 첨가, 그리고 *L. casei* LP1, *L. plantarum* LP2 균주 혼합 첨가 후 25°C, 24시간 배양 후 병입하여 10°C에서 48시간 보존하면서 경시적으로 pH, 산도, 유산균 및 효모수, DHNA 함량을 분석하였다. pH는 pH 측정기(Mi160, MARTINI)를 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다. 산도는 시료를 정제수로 희석(1 : 9)하여 알칼리 표준용액(NaOH)으로 적정하여 유기산을 분석하였다. 시료의 유산균수와 효모수의 측정은 시료를 무균적으로 취해 펩톤수(0.1%, w/v)와 1:9의 비율로 혼합하여 10진 희석법으로 희석하였으며 이를 MRS 고체배지와 YPD 고체배지에 도말하여 37°C, 24시간 배양 후 유산균수와 효모수를 측정하였으며 cfu(colony forming unit)/mL로 나타내었다. HPLC를 이용한 DHNA 함량 측정은 앞서 설명한 방법으로 수행하였다. 실험 결과 pH, 산도, 유산균 수의 경우 1차 현장적용실험과 비슷한 양상을 보였으며 효모수의 경우 무첨가균과 큰 차이를 보이지 않았다. DHNA 함량에서는 25°C, 1일 배양 직후는 첨가균과 무첨가균 사이에 큰 차이가 없었으나 10°C, 3일 보존 후에는 첨가균의 DHNA 함량이 증가되는 경향을 보였으며 특히, *L. casei* LP1과 *L. plantarum* LP2 균주 혼합 첨가에서 가장 높은 함량을 나타내었다(Fig. 31). 이상의 결과들을 종합해 보면 막걸리 자체에 이미 효모나 다양한 유산균들이 포함되어 있기 때문에 외부에서 공급된 균주들에 의해 물리화학적, 생물학적 성상이 크게 바뀔 가능성이 낮음은 쉽게 예견할 수 있으며 그러한 이유로 결과의 재현성이 떨어지는 것도 사실이다. 그럼에도 불구하고 인위적으로 첨가된 DHNA 생산균주

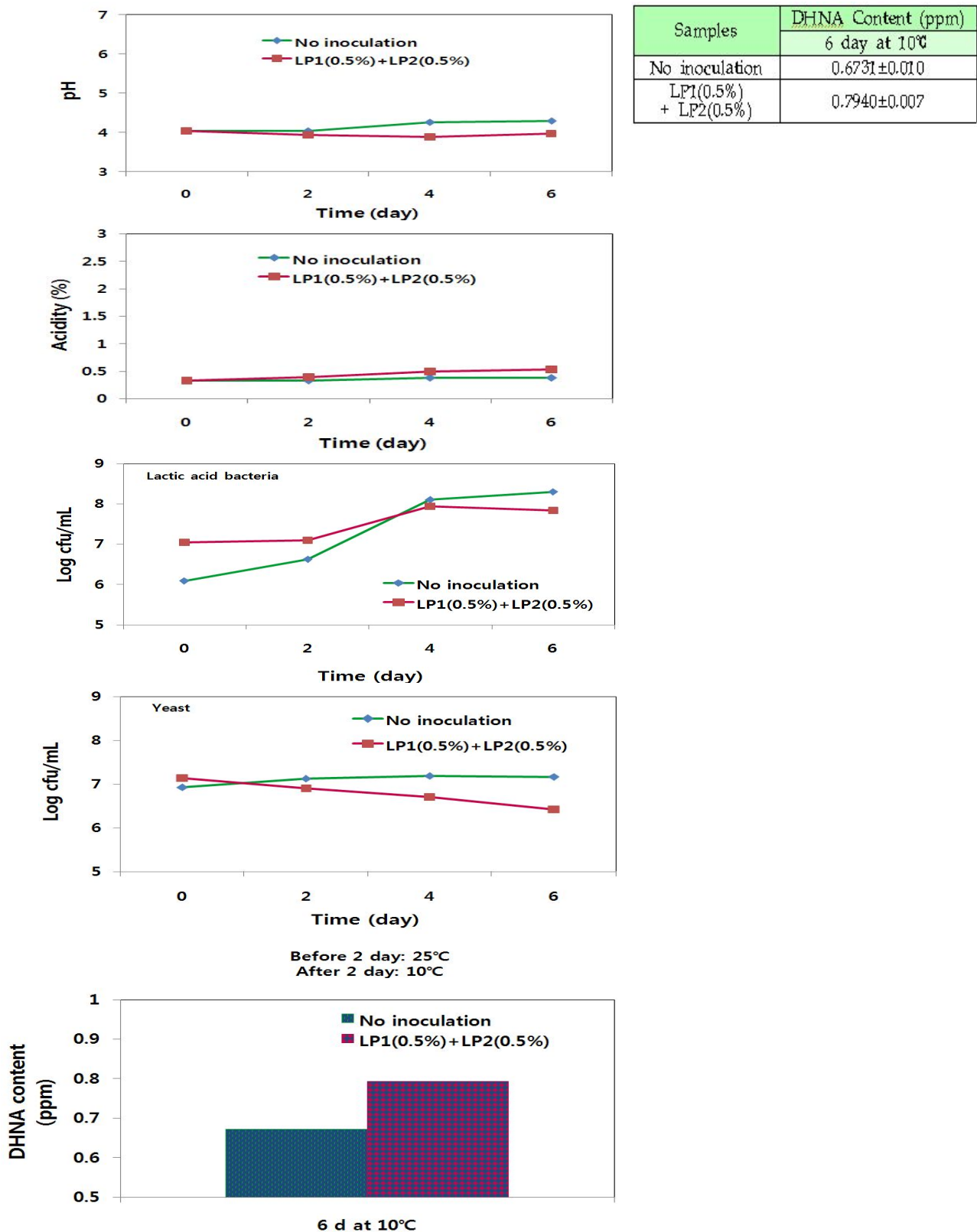
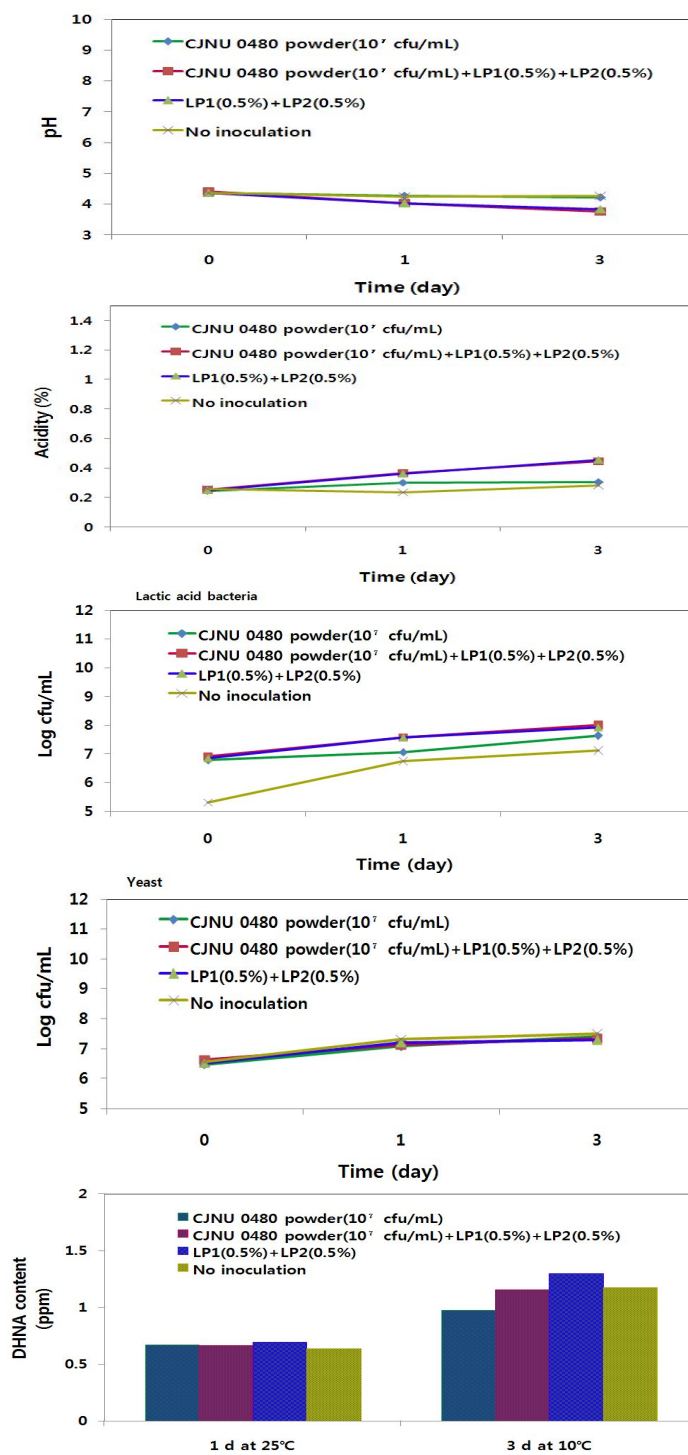


Fig. 30. pH values, acidity, viable cell counts of lactic acid bacteria and yeast, and DHNA contents of makgeolli product samples where *L. casei* LP1 and *L. plantarum* LP2 mix was added during fermentation at 25°C followed by storage at 10°C. In table, values are mean±SD (n=3).



Samples	DHNA Content (ppm)	
	1 day at 25°C	3 day at 10°C
CJNU 0480 powder	0.6721±0.010 ^b	0.9766±0.003 ^d
CJNU 0480 powder + LP1(0.5%) + LP2(0.5%)	0.6685±0.003 ^b	1.1597±0.003 ^e
LP1(0.5%) + LP2(0.5%)	0.6976±0.004 ^c	1.3029±0.005 ^k
No inoculation	0.6471±0.003 ^a	1.1777±0.008 ^f

Fig. 31. pH values, acidity, viable cell counts of lactic acid bacteria and yeast, and DHNA contents of makgeolli product samples where *W. paramesenteroides* CJNU 0480, *L. casei* LP1 and *L. plantarum* LP2 strain alone or mix was added during fermentation at 25°C followed by storage at 10°C. In table, values are mean±SD (n=3). Means having different letters are significantly different by Duncan's multiple range tests (p<0.05).

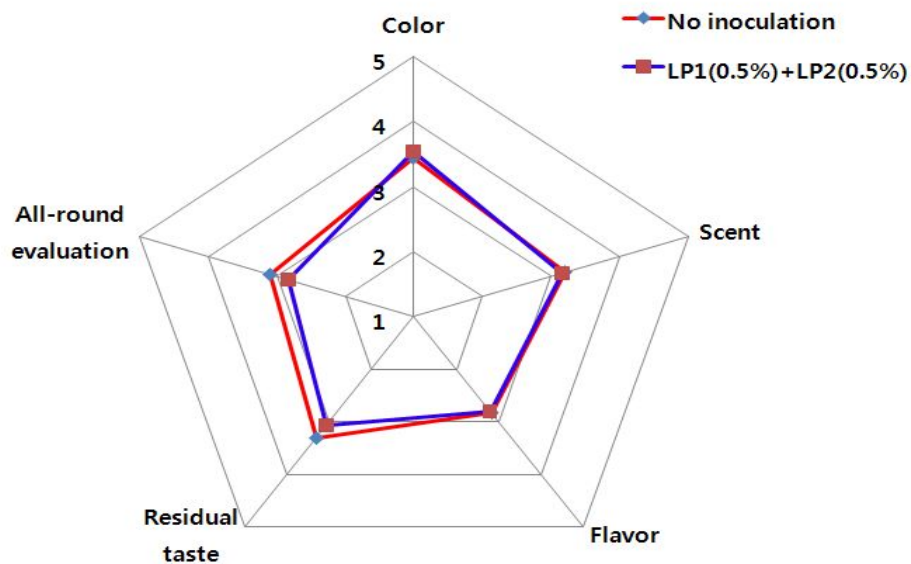
특히, 새롭게 선발된 *L. casei* LP1, *L. plantarum* LP2 균주의 첨가는 분명 막걸리의 DHNA 함량을 증가시키는데 기여하는 것으로 사료된다. 더불어서 막걸리 자체에서도 DHNA가 상당량 검출되는 만큼 막걸리의 발효와 DHNA 생산과의 상관관계를 규명하는 것도 좋은 연구주제가 될 것으로 사료된다.

제 6 절 관능평가

성인 남녀 30명을 패널로 선정하여 DHNA 생산 균주 첨가 막걸리와 무첨가 막걸리를 대상으로 색, 향, 맛, 후미, 전체적 기호도를 5점 척도(5: 최고로 좋다; 1: 가장 싫다)로 평가하였다. 우선 *L. casei* LP1과 *L. plantarum* LP2 균주 첨가군과 무첨가군에 대한 관능평가를 실시한 결과 색에 대한 기호도는 첨가군이 3.53으로 무첨가군 3.43보다 높게 나왔고, 향에 대한 기호도는 첨가군이 3.16, 무첨가군이 3.2로 큰 차이가 나질 않았다. 맛에 대한 기호도 또한 첨가군이 2.83, 무첨가군이 2.80으로 큰 차이가 나질 않았고, 후미에 대한 기호도는 첨가군이 3.07으로 무첨가군 3.30보다 낮게 나왔다. 전반적인 기호도는 첨가군이 2.83으로 무첨가군 3.10에 비해 다소 낮게 나왔다(Fig. 32).

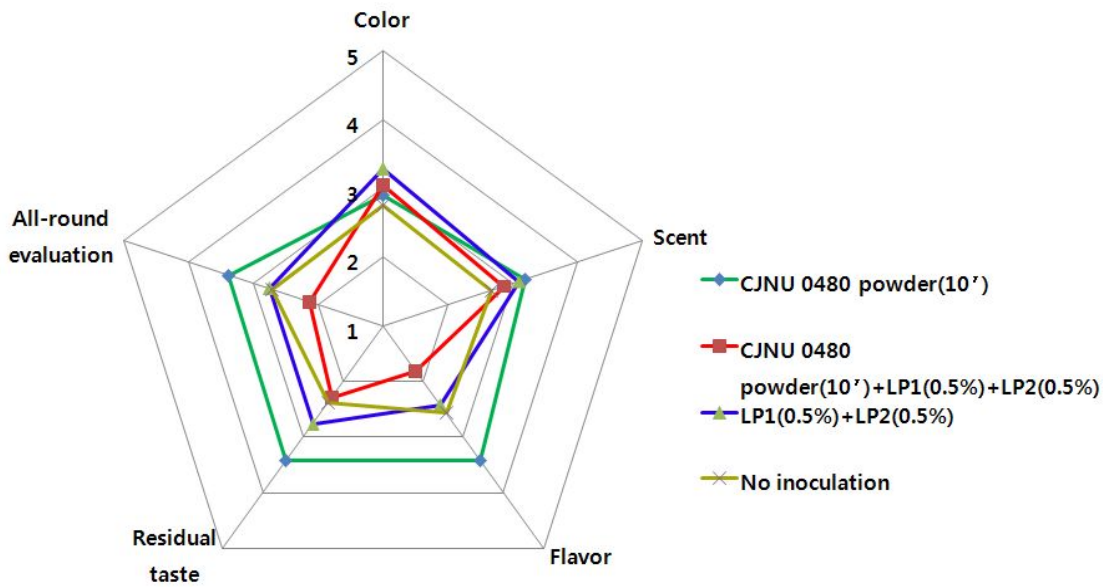
두 번째 관능평가는 성인 남녀 20명을 패널로 선정하여 다음의 각 조건으로 제조된 막걸리에 대하여 실시하였다. 즉, *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 분말(10^7 cfu/mL)을 첨가한 군(A), *W. paramesenteroides* CJNU 0480 균주 분말(10^7 cfu/mL)과 *L. casei* LP1, *L. plantarum* LP2 균주를 첨가한 군(B), *L. casei* LP1과 *L. plantarum* LP2 균주를 첨가한 군(C), 그리고 무첨가군(D)을 색, 향, 맛, 후미, 전체적 기호도에 대해 5점 척도(5: 최고로 좋다; 1: 가장 싫다)로 평가하였다. 색에 대한 기호도는 C가 3.28로 제일 높게 나타났고, 그 다음으로 B가 3.04, A가 2.90으로 나타났으며, D가 2.76으로 제일 낮게 나타났다. 향에 대한 기호도는 A가 3.19로 제일 높게 나타났고, 그 다음으로 C가 3.09, B가 2.85로 나타났으며, D가 2.66으로 제일 낮게 나타났다. 맛에 대한 기호도는 A가 3.42로 제일 높게 나타났고, 그 다음으로 D가 2.57, C가 2.42로 나타났으며, B가 1.80으로 제일 낮게 나타났다. 후미에 대한 기호도는 A가 3.42로 제일 높게 나타났고, 그 다음으로 C가 2.76, D가 2.38으로 나타났으며, B가 2.28로 제일 낮게 나타났다. 전반적인 기호도는 A가 3.38로 제일 높게 나타났고, 그 다음으로 C가 2.76, D가 2.71로 나타났으며, B가 2.14로 제일 낮게 나타났다. 궁극적으로 무첨가군 보다 DHNA 함량이 높은 *L. casei* LP1과 *L. plantarum* LP2 혼합균주 첨가군이 맛을 제외한 색, 향, 후미, 그리고 전반적인 기호도에서 무첨가군 보다 높게 나타났으나 색도를 제외하고는 유의적인 차이는 보이지 않았다(Fig. 33).

이상의 결과에서 DHNA 함량을 증가시키기 위한 목적으로 *L. casei* LP1과 *L. plantarum* LP2 혼합균주를 첨가하여 막걸리 생산하더라도 관능적인 측면에서 문제가 없을 것으로 판단되었다.



	Color	Scent	Flavor	Residual taste	All-round evaluation
No inoculation	3.43±0.7	3.20±0.8	2.83±0.9	3.30±0.8	3.10±0.7
LP1(0.5%)+LP2(0.5%)	3.53±0.7	3.17±0.9	2.80±0.9	3.07±0.9	2.90±1.0

Fig. 32. Sensory evaluation of makgeolli product where *L. casei* LP1 and *L. plantarum* LP2 strain mix was added for the fermentation. In table, values are mean±SD (n=30).



	Color	Scent	Flavor	Residual taste	All-round evaluation
CJNU 0480 cell powder (10 ⁷ cells/mL)	2.90±0.8 ^{ab}	3.19±0.9 ^a	3.42±1.1 ^c	3.42±0.7 ^b	3.38±0.9 ^c
CJNU 0480 cell powder (10 ⁷ cfu/mL) + LP1 (0.5%) + LP2 (0.5%)	3.04±0.4 ^{ab}	2.85±0.6 ^a	1.80±0.6 ^a	2.28±0.7 ^a	2.14±0.5 ^a
LP1 (0.5%) + LP2 (0.5%)	3.28±0.5 ^b	3.09±0.7 ^a	2.42±0.8 ^b	2.76±0.7 ^a	2.76±0.6 ^b
No inoculation	2.76±0.8 ^a	2.66±0.9 ^a	2.57±1.1 ^b	2.38±0.9 ^a	2.71±1.0 ^b

Fig. 33. Sensory evaluation of makgeolli product where *W. paramesenteroides* CJNU 0480 cell powder, *L. casei* LP1, and *L. plantarum* LP2 alone or mix was added for the fermentation. In table, values are mean±SD (n=20). Means having different letters are significantly different by Duncan's multiple range tests (p<0.05).

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

당초목표(내용)	당초연구목표 대비 연구결과	달성도(%)
① <i>Weissella paramesenteroides</i> CJNU 0480 균주의 DHNA 생산 특성 분석	<i>W. paramesenteroides</i> CJNU 0480 균주의 경우 0-9% 에탄올 농도에서 내성을 보였으며 살균 및 생 막걸리에 <i>W. paramesenteroides</i> CJNU 0480 균주를 첨가하여 DHNA 함량이 무첨가균에 비해 증가하는 것을 확인함.	100
② <i>W. paramesenteroides</i> CJNU 0480 균주를 첨가한 막걸리 제조 및 DHNA 함량 비교 분석	여러 곳의 양조장으로부터 원료를 구입하여 다양한 조건으로 막걸리를 직접 제조하였으며 제조 단계별로 <i>W. paramesenteroides</i> CJNU 0480 균주를 첨가하여 DHNA 함량을 분석한 결과 무첨가균과 유의적인 차이가 없었음. DHNA를 생산하는 <i>Lactobacillus casei</i> LP1, <i>Lactobacillus plantarum</i> LP2 두 균주를 추가적으로 선발하여 막걸리 제조과정에 첨가한 결과 무첨가균에 비해 DHNA 함량이 증가하였으며 여러 조건 중 후발효 과정에 균주를 첨가하는 것이 최적의 방법으로 확인됨.	85
③ <i>W. paramesenteroides</i> CJNU 0480 균주 첨가 막걸리의 품질 분석	<i>L. casei</i> LP1 및 <i>L. plantarum</i> LP2 두 균주를 동시에 초산균(<i>Acetobacter aceti</i> KCTC 1010)과 막걸리 시료에서 동시배양 하였을 때 초산균의 생육이 다소 억제됨을 확인함. 또한 DHNA 생산 유산균을 막걸리에 첨가한 후 경시적으로 pH, 산도, 환원당, 유산균 및 효모수를 동시에 분석하여 무첨가균과 비교함으로써 막걸리 품질에 큰 영향이 없음을 확인함.	100
④ DHNA 고 함유 막걸리의 기능성 검증	DHNA 고 함유 막걸리와 일반 막걸리의 비피도박테리아 증식능을 비교하였으며 그 결과 DHNA 고 함유 막걸리의 비피도박테리아 증식능이 더 우수한 것으로 나타남.	100
⑤ <i>W. paramesenteroides</i> CJNU 0480 균주 첨가제 시제품 생산 및 현장 적용 시험	<i>W. paramesenteroides</i> CJNU 0480 균주 분말 시제품을 유산균 전문 가공업체에 위탁해 생산하였으며 <i>L. casei</i> LP1 및 <i>L. plantarum</i> LP2 균주와 함께 현장 적용 시험을 실시한 결과 <i>L. casei</i> LP1 및 <i>L. plantarum</i> LP2 두 균주를 혼합 첨가한 막걸리에서 가장 높은 DHNA 함량을 보였음.	90
⑥ 관능평가	현장 적용 시험을 통해 생산된 막걸리 제품에 대해 두 차례 관능평가를 실시한 결과 DHNA 함량이 상대적으로 높게 나타난 <i>L. casei</i> LP1 및 <i>L. plantarum</i> LP2 혼합균주 첨가균과 무첨가균 사이에 전반적으로 유의적인 차이가 나타나지 않았음.	100

제 2 절 관련 분야의 기술발전예의 기여도

1. 막걸리에 DHNA가 풍부하게 포함되어 있다는 사실을 처음으로 규명함.
2. 막걸리에 기능성 유산균을 접목하는 연구의 활성화에 기여함.
3. 막걸리의 고부가가치화 기술 향상에 기여함.
4. 막걸리의 기능성 향상에 기여함.
5. 궁극적으로 막걸리 산업 발전에 기여함.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화·산업화 계획

1. 추가적인 연구수행 후 개발된 기술을 관련 산업체에 기술이전 함.
2. DHNA 생산 유산균 첨가제는 자체 사업화함.
3. 관련 대기업과 연계하여 기술의 파급효과를 확대함.

제 2 절 기술 확산 계획

1. 추가적인 과제 수행을 통해 기술의 완성도를 향상시킴.
2. 영세 양조장 사업자들에게 기술을 보급하여 매출 증대에 기여함.
3. 학회 발표 및 언론 홍보를 통해 기술의 확산을 촉진함.

제 3 절 지식재산권 확보계획

1. 연구 성과

가. 지식재산권(특허출원 1건, 완료)

- (1) 발명의 명칭: 1,4-디히드록시-2-나프토산 생산능을 가지는 락토바실러스 카제이 LP1 균주 및 이의 이용
- (2) 출원일자: 2012.08.16
- (3) 출원번호: 10-2012-0089403
- (4) 출원인: 한국교통대학교 산학협력단, (주)제이케이뉴트라
- (5) 발명자: 문기성, 이종광

나. 논문게재(1건, 완료)

- (1) 저널명: Preventive Nutrition and Food Science(KCI), Vol. 17, pp. 83-86 (2012)
- (2) 논문명: Detection of 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid from Commercial Makgeolli Products
- (3) 저자명: JE Eom, SC Kwon, GS Moon

다. 국제학술발표(1건)

- (1) 학술대회명: Food Science & Communication(한국식품과학회, 대전컨벤션센터)

(2) 기간: 2012.6.13-2012.6.15

(3) 논문명: Detection of 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid from Commercial Makgeolli Products

(4) 저자명: TJ Kim, GS Moon

추가적으로 특허출원(1-2건) 및 논문게재(1-2편)가 가능함.

제 4 절 추가연구 및 타 연구에 활용 계획

1. 막걸리 발효과정에서의 DHNA 생산 특성 분석에 관한 연구
2. 인위적으로 첨가된 균주의 추이를 분석할 수 있는 기술 개발
3. 추가적으로 확보된 DHNA 생산 균주(*L. casei* LP1, *L. plantarum* LP2)를 이용하여 다양한 발효식품에 적용하는 연구
4. 막걸리로부터 신규 기능성 소재 발굴 연구

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

현재까지 막걸리에 DHNA(1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic acid) 생산 균주를 접목한 연구는 전무하며 특히, 막걸리에 DHNA가 함유되어 있다는 사실을 규명한 것은 본 연구팀이 처음이다.

DHNA는 서론에서도 언급한 바와 같이 일본의 메이지 유업만이 기능성 규명과 더불어 산업화 연구를 진행하고 있을 뿐 그 외는 세계적으로 연구가 활발하게 진행되지 못하고 있는 실정이다. 그럼에도 불구하고 일부 연구자들이 DHNA 기능성에 관한 연구논문들을 간간히 발표하고 있다.

그 중에서 DHNA가 위염 및 위암을 일으키는 것으로 알려진 *Helicobacter pylori*의 생육을 억제한다는 논문이 주목을 받고 있다(Nagata et al., 2010). 이는 DHNA가 장내 유익균인 비피도박테리아 증식인자라는 사실을 감안한다면 선택적으로 미생물의 증식에 관여하여 장내 유익균에만 작용할 수 있어 그 가치가 더 상승할 수 있다. 더불어 DHNA가 고 함유된 유제품이나 막걸리와 같은 발효식품을 개발한다면 장내환경을 개선할 뿐만 아니라 위 건강에도 좋은 영향을 미칠 수 있어 산업적 파급효과가 클 것으로 기대된다.

또한 DHNA 생산 균주로 잘 알려진 *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 균주의 안전성에 대한 연구도 최근 논문으로 발표되었는데(Uchida et al., 2011) 건강한 성인을 대상으로 고용량의 ET-3 균주를 투여시킨 결과 검사한 모든 항목의 수치가 정상범위 내에 있었고 어떠한 임상적 문제도 야기되지 않은 것으로 나타났다.

아직 DHNA에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있지는 않지만 가까운 미래에 기능성 소재로서 각광을 받을 수 있을 것으로 기대하며 특히 막걸리에 DHNA가 풍부하게 함유되어 있다는 사실은 고무적이다. 앞으로 본 연구팀을 중심으로 추가적인 연구들이 더 진행되어 많은 성과들이 도출되기를 기대해 본다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

- 해당사항 없음 -

제 8 장 참고문헌

- Bae et al., 2008. Effects of traditional Nuruk ratio and yeast on the fermentation and quality of Yakju. J. East Asian Soc. Diet. Life 18: 41-48
- Furie, B and Furie, BC, 1988. The molecular basis of blood coagulation. Cell 53: 505-518
- Furuichi et al., 2006. Aerobic culture of *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 can increase production ratio of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid to menaquinone. J. Biosci. Bioeng. 101: 464-470
- Furuichi et al., 2007. Enhancement of DHNA production by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 fed-batch culture. Appl. Environ. Microbiol. 73: 3137-3143
- Hauschka et al., 1989. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K dependent proteins in bone. Phys. Rev. 69: 990-1047
- Isawa et al., 2002. Isolation and identification of a new bifidogenic growth stimulator produced by *P. freudenreichii* ET-3. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66: 679-681
- Jeon, MH and Lee, WJ, 2011. Characteristics of blueberry added Makgeolli. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 40: 444-449
- Matsubara et al., 2010. Suppressive effects of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid administration on bone resorption. Japanese J. Oral Surgery 56: 304
- Nagata et al., 2010. The bifidogenic growth stimulator inhibits the growth and respiration of *Helicobacter pylori*. Helicobacter. 15: 422-429
- Suvarna et al., 1998. Menaquinone (vitamin K₂) biosynthesis: Localization and characterization of the *menA* gene from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 180: 2782-2787
- Uchida et al., 2011. Safety of high doses of *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 culture in healthy adult subjects. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60: 262-267
- Vermeer, C, 1990. Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and vitamin K-dependent carboxylase. Biochem. J. 266: 625-636.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.