

발간등록번호

11-1543000-000824-01

**전통발효법을 응용한 3단 발효식초에 대한
공정표준화 및 건강기능성 연구**

(The process standardization and identification of health
functionality about three-stage fermentation vinegar using
traditional fermentation)

대상 주식회사

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “전통발효법을 응용한 3단 발효식초에 대한 공정표준화 및 건강기능성 연구” 과제(1세부과제 “전통발효법을 응용한 3단 발효식초의 과학적 규명 및 표준화”과제, 1협동과제 “3단 발효법으로 제조된 식초의 Cross-sectional *in vivo* 연구)의 보고서로 제출합니다.

2015년 3월 10일

주관연구기관명 : 대상주식회사

주관연구책임자 : 김 성 필

세부연구책임자 : 김 성 필

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 김 영 준

전통발효법을 응용한 3단 발효식초의
과학적 규명 및 표준화

세부연구기관명 : 대상 주식회사
세부연구책임자 : 김성필
연구위원 : 오송찬
연구위원 : 김재창
연구위원 : 김민경

요 약 문

I. 제 목

전통 발효법을 응용한 3단 발효법의 과학적 규명 및 표준화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 식초는 인류 역사상 가장 오랜 역사를 갖고 있는 발효식품으로 중 하나이다. 최근 식초는 조리용도 외에도 기능성이 대한 기대로 국내 식초시장은 2002년 이후 꾸준히 성장 변화하고 있다.

○ 최근 웰빙과 건강에 대한 관심으로 식초에 대한 소비자들의 선호도가 합성식초와 주정 발효식초에서 100% 과일이나 곡물을 원료로 하여 발효하는 발효식초를 선호하고 있음

○ 감식초 등 웰빙 지향의 천연 양조 식초와 이를 원료로 하는 마시는 식초 음료 등의 시장 규모는 빠르게 성장하여 이미 조미식품으로서의 식초 시장규모를 뛰어넘은 상황임.

○ 본 연구를 통해 전통발효법인 정치발효법과 대량생산에 적합한 심부발효법의 장점을 접목하여 고품질의 3단 발효식초(현미, 막걸리식초)의 생산량 증대 및 전통주의 수요 증대를 통해 지역 경제가 활성화 될 수 있을 것으로 판단 됨

III. 연구개발 내용 및 범위

- 3단 발효법 배양 조건 확립
- 3단 발효 공정별 공정표준화
- 발효조건에 따른 관능 및 영양학적 비교
- 막걸리식초의 정치(초산)발효 배양 조건 확립
- 막걸리식초의 심부(초산)발효 배양 조건 확립
- 발효 공정별 품질 인자 분석
- 3단 발효 막걸리 식초 개발
- 3단 발효 막걸리 식초와 시중 시판 막걸리식초의 관능 및 영양학적 비교

IV. 연구개발결과

- 전통발효법을 응용한 3단 발효식초의 과학적 규명 및 표준화

- 원료 부분의 경우 원료 내 유리당 조성이 알코올 발효 수율과 연관이 있음을 확인 한 바, 현미의 경우 액화, 당화 효소분해를 통한 농축액 내 유리당 조성이 단당류인 포도당(glucose)으로 구성되도록 제조하는 것을 중요 관리사항으로 선정

- 알코올 발효 단계에서는 현미농축액 내 유리당 조성 뿐만 아니라, 원료 함량 및 온도가 효모균(*S. cerevisiae*)의 생육 및 알코올 생성 수율에 영향 줌을 확인하였으며, 이에 원료 함량은 Scale-up시 정확한 양 투입 및 온도 조절이 어려움을 고려하여, 원료 함량은 25Brix ~ 30Brix 사이가 되도록 설정하였으며, 온도의 경우 27°C ~ 29°C의 범위로 관리기준으로 선정

- 정치(초산)발효 단계에서는 초기 초산균의 안정적인 생육 조건을 확인한 결과 산도 3%, 알코올 5%의 배지 조성이 중요함을 확인하였고, 35°C 온도조건에서 산 생성 수율이 높음을 확인하였음. 이에 Scale-up 시 정확한 계량 및 온도 조절이 어려움을 감안하여, 산도 2% ~ 3%, 알코올 4% ~ 5%, 온도 34°C ~ 36°C 범위를 설정하였음. 또한 심부(초산)발효 단계로의 최적 전환 시점을 확인하여, 발효 기간 별 초산균 생육 수준 및 유효성분을 확인한 결과 7일 이후 초산균 생육 저하 및 총 아미노산 감소 경향이 나타날 수 있어 본 연구진은 정치(초산)발효 기간을 7일로 선정하였음.

- 심부(초산)발효 단계는 당사의 수십년 간의 연구를 통해 밝혀진 발효조건인 온도 31°C, 통기량 0.15vvm, 교반속도 400rpm의 관리 조건 뿐만 아니라, 잔여알코올 범위가 최종 발효산물인 초산 생성에 있어서 시간당 초산 생성율에 영향을 줌을 확인되어, 이에 심부(초산)발효 진행 시 exponential phase 시기부터 알코올발효액을 투입하되, 그 양을 잔여알코올이 0.5% ~ 2% 범위 사이에 투입되도록 하는 것을 관리기준으로 선정하였음

○ 3단 발효법을 이용한 막걸리 식초 제조 및 유효성 평가

- 정치(초산)발효 단계는 초기 초산균의 안정적인 생육 조건을 확보하기 위한 중요한 단계이다. 배지의 함량별 산생성율과 생육수를 확인해 본 결과, 35°C 온도조건에서 산도 3%, 알코올 3%의 배지 조성에서 산생성율과 생육수가 가장 높았다. 발효기간별 초산균 생육 수준을 확인한 결과, 정치(초산)발효 5일에 생육수가 가장 활발하여 심부(초산)발효에 적합한 정치(초산)발효 기간은 5일로 선정하였음

- 정치(초산)발효 단계에 발효영양원의 함량 질소원으로 yeast extract 0.1%, 무기염류 MgSO₄ 0.05%가 산생성율이 높아 초산 발효가 잘 진행되어 정치(초산)발효시 산도 3%, 알코올 3%에 발효영양원으로 yeast extract 0.1%와 MgSO₄ 0.05%를 첨가하여 배지 조성을 확립

- 3단 발효 막걸리 식초(유통기한 36개월)를 제조하여 안전성 평가 발효식초의 규격에 적합하였음. 식판 막걸리식초와 관능 평가 결과 유의 적으로 차이를 보이지 않음.

- 3단 발효 막걸리 식초와 시판 막걸리식초의 영양학적 지표 분석 결과 발효시간이 오래 걸리는 정치 발효법(약 1~6개월) 대비 3단 발효 식초가 빠른 시간(약 21일)에 제조 가능하며 다른 영양학적 성분(아미노산, 미네랄)에는 차이가 없는 3단 발효 식초 제조가 가능함을 알 수 있었음

V. 연구성과 및 성과활용 계획

○ 연구성과

- 특허 출원 1건, 등록 1건

○ 성과 활용 계획

- 2015년 내 3단 발효법을 이용한 막걸리 식초 특허 출원 1건 예정임

SUMMARY

I. Title

The process standardization and identification of health functionality about three-stage fermentation vinegar using traditional fermentation

II. Objectives and necessities of the research

Vinegar is one of the most common, yet unique and wonderful, substances known to mankind. Recently, interest in wellness and vinegar to focus on health has increased. Is preferred and a 100% fermented vinegar fermentation of fruit or grain as raw material. Persimmon and natural vinegar and vinegar drinks market, such as drinking it as a source of wellness-oriented is growing rapidly. Three-stage fermentation vinegar development can enable increased production and local economies through.

III. The contents and range of the research

- Three-stage fermentation culture conditions established
- Three-stage fermentation process by process standardization
- Sensory and Nutritional Comparison of fermentation conditions
- Static (acetic acid) fermentation culture conditions established in the rice wine vinegar
- Rapid (acetic acid) fermentation culture conditions, the establishment of rice wine vinegar
- Fermentation process by quality factors
- Three-stage fermented Makgeolli vinegar Development
- Sensory and Nutritional Comparison of Three-stage fermented Makgeolli vinegar and Commercial Makgeolli

IV. Results of research development

- The free sugar composition of the raw material associated with the alcoholic fermentation yield. Brown rice concentrate was selected as the administrative matters that consists of glucose production.

- Alcohol fermentation is a key factor brown-rice concentrates content and temperature. Affects the growth of yeast(*S. cerevisiae*) and alcohol generated. So, brown-rice concentrates content to be 25 ~ 30Brix and temperature was set based on the administration to 27 ~ 29 °C.

- Politics (acetic acid) in the fermentation stage acid 3%, alcohol 5% composition of the culture medium was confirmed the importance and at 35 °C temperature conditions to determine the acid yield is high. So we was set up acid 2-3%, alcohol 4-5% and 34 °C ~ 36 °C. Fermentation by an acetobacter growth levels and active Ingredient confirmed. As a result, after seven days acetobacter growth levels and amino acids decreased. So we was set up a politics (acetic acid) fermentation 7 days.

- Rapid (acetic acid) conditions, 31°C, air 0.15vvm, was set up to manage the conditions of agitation speed 400rpm. This is part of our research for many years fermentation conditions. When the Rapid (acetic acid) fermentation was set up to manage the reference input to the range from 0.5 to 2%.

- Looked out the acid production rate and can be grown by the content of the Makgeolli vinegar medium. Politics (acetic acid) growth in the number of the most active 5 days fermentation. Politics (acetic acid) fermentation of Makgeolli vinegar was 5 days.

- Politics (acetic acid) fermentation in fermentation nutrients are yeast extract 0.1%, MgSO₄ 0.05% is high in acid production rate. So acid 3%, alcohol 3%, by the addition of MgSO₄ 0.05% yeast extract 0.1% was set as the medium composition.

- Three fermented Makgeolli vinegar (expiry date 36 months) were prepared to fit the standards of safety assessment fermented vinegar. There were no commercial Makgeolli vinegar with significantly different sensory evaluation.

- Three fermented Makgeolli vinegar and nutritional indicators analysis of commercial Makgeolli vinegar political fermentation (about 1-6 months), compared to a three-stage production was possible in a short time vinegar fermentation (about 21 days). Nutritional components (amino acids, minerals) have been found for three-satage fermentation vinegar produced is possible there is no difference.

V. Research Results and Plans for Utilization

○ Research Results

- 1 Patent Applications and 1 Patent Registrations

○ Plans for Utilization

- 1 patent applications for 'Three-stage fermented Makgeolli vinegar method' are planned for the latter half of 2015.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	10
Chapter 2. Current status on Domestic and Foreign Technology.....	14
Chapter 3. Contents and Result	17
Section 1. Scientific identification and standardization of the application of the traditional three-stage fermentation vinegar fermentation	17
1. Method	17
A. Material ..	17
B. Experimental methods	17
2. Result	20
A. Fermentation culture conditions established	20
B. Three-stage fermentation process by process standardization	20
C. Fermentation process by comparing the sensory and nutritional	34
Section 2. Makgeolli vinegar Preparation and validation.....	40
1. Method	40
A. Material.....	40
B. Experimental methods	40
2. Result.....	42
A Politics (acetic acid) fermentation culture conditions established	42
B. Rapid (acetic acid) fermentation culture conditions established	47
C. Fermentation process by quality factors.....	47
D. Makgeolli vinegar development	53
E. Makgeolli vinegar and Commercial Makgeolli sensory and nutritional comparison	58
3. Review.....	62
Chapter 4. Attainment of Objectives and Contribution	63
Chapter 5. Applications of the Results	65
Chapter 6. Scientific and Technological information from Abroad	66
Chapter 7. References.....	67

목 차

제 1 장 연구 과제의 개요	10
제 2 장 국내외 기술개발 현황	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	17
제 1 절 전통발효법을 응용한 3단 발효식초의 과학적 규명 및 표준화	17
1. 연구방법	17
가. 재료	17
나. 실험 방법	17
2. 연구결과	20
가. 발효법 배양조건 확립	20
나. 3단 발효 공정별 공정표준화	20
다. 3단 발효식초와 표면발효식초 및 심부발효식초와의 관능 및 영양학적 비교..	34
제 2 절 3단 발효법을 이용한 막걸리 식초 제조 및 유효성 평가	40
1. 연구방법	40
가. 재료	40
나. 실험방법	40
2. 연구결과	42
가. 정치(초산)발효 배양조건 확립	47
나. 심부(초산)발효 배양조건 확립	47
다. 발효 공정별 품질 인자 분석	47
라. 3단 발효법을 이용한 막걸리 식초 개발	53
마. 3단 발효 막걸리 식초와 시중에 시판되는 막걸리 식초의 관능 및 영양학적 비교..	58
3. 고찰	62
제 4 장 목표달성 및 관련분야에의 기여도	63
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	65
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	66
제 7 장 참고문헌	67

제 1 장 연구 과제의 개요

제 1 절 연구 개발의 목적

본 연구는 전통발효법을 응용한 3단 발효식초의 그 유효성분 및 풍미의 과학적인 분석과 발효 공정별 물리/이화화학적 Parameter의 수치화를 통해 3단 발효법의 표준화와 그 우수성을 검증하고, 한국 전통주인 막걸리를 이용한 3단 발효 식초를 개발하고자 함.

제 2 절 연구 개발의 필요성

○ 식초는 술과 함께 인류의 식생활에서 가장 오랜 역사를 갖고 있는 대표적 발효식품 중 하나이다. 최근, 식초의 기본 속성인 단순 조미용도의 사용이외에도 기능성에 대한 소비자들의 관심에 따라 소비의 패턴이 변화되고 있는 추세이다. 국내 식초 시장은 2002년 이후 꾸준히 등으로 소비 패턴이 고급화, 다양화 추세로 변화하고 있다. 국내 식초시장은 2002년 이후로 꾸준히 증가하고 있으며 2002년 약 200억원이었던 시장규모가 2013년 1,450억으로 성장하였으며 2015년 시장규모는 2,000억원에 이를 것으로 예상되고 있다.

○ 국내 식품공전상의 정의는 ‘곡류, 과실류, 주류 등을 주원료로 하여 발효시켜 제조하거나 이에 곡물 당화액, 과실착즙액 등을 혼합, 숙성하여 만든 발효식초와 빙초산 또는 초산을 먹는 물로 희석하여 만든 희석 초산을 말한다.’ 라고 정의하고 있으며, 발효식초와 희석초산의 혼합은 제한하고 있으며 일본의 경우, 식초의 규격별 과실이나 곡류의 원물에 대한 함량을 규정하여 고품질의 식초를 제고 하고 있음

○ 국내외 식초 생산기술은 주정을 양조한 양조식초에서 곡물 및 과일 유래의 고품질 천연 양조식초 시장의 형성단계에 있으며, 최근 경제 성장과 건강에 대한 관심이 증가되면서 기존의 주정발효 식초에 대한 부정적인 인식이 확산되고 있음. 천연소재를 이용한 전통방식으로 제조한 식초에 대한 관심과 소비가 증가하고 있음.

○ 식초의 제조방법은 대량생산에 적합한 속성발효 방법과 소규모 생산이 가능한 정치발효 방법으로 나눌 수 있으며, 원료의 특성과 제조방법에 따라 최종 제품의 품질적 영양지표에 차이가 있을 수 있음

○ 산업적 대량 생산에 적합한 심부발효방법은 수율 및 초산생성 효율이 높고 발효 속도가 빠른 장점이 있으며, 전통적인 제조방법인 정치배양은 향미가 풍부하나 발효기간이 길어 발효과정 중 다양한 미생물에 의한 오염 발생 가능성이 높아 균일한 고품질의 식초를 제조하기엔 어려움이 있음

○ 식초의 주요 성분은 초산(Acetic acid)으로, 식초의 초산에 대한 기능성 연구가 이루어지고 있으며 식초는 다른 식품을 조리할 때 사용하면 미량 영양소가 파괴되는 것을 방지할 뿐만 아니라 체내 소화 흡수율을 높이는 효과가 있음

○ 식초의 기능성 연구는 국내에 비해 국외에서 연구가 활발히 이루어져 있으며 골다공증 예방, 피로회복 효과, 스트레스 해소 효과, 다이어트효과, 콜레스테롤수치 저하 효과와 혈압 강하 효과에 대한 연구가 보고 되어 있는 있음

○ 식초의 조미기능 이외에 기능성을 활용한 용도형 제품 개발로 확장되고 있음(음용 식초, 살균제 등)

○ 식초의 다양한 기능성에 대한 과학적 고찰을 통해 식초의 건강 기능성이 부각되어 지고 있음

○ 술이란 알코올 성분이 있는 기호음료로서 주류 또는 알코올음료를 말하며 탄수화물이 미생물의 분해 작용을 받아 알코올을 비롯한 여러 가지 성분이 생긴 일종의 발효 식품임

○ 쌀, 보리, 감자, 옥수수, 당분을 주성분으로 하는 과일, 당밀 등 다양한 전분질 원료를 이용하여 만든 탁주는 우리나라를 비롯해 세계에서 가장 오래된 술 중 하나임

○ 우리나라에 탁주가 전래된 경위나 기원은 확실치 않으나 고삼국사기에 고구려 동명성왕의 건국 신화에 술이 등장하는 사실로 미루어 이미 삼국시대에 탁주를 비롯한 여러 가지 술에 관한 제조법이 있었던 것으로 추측되고 있음

○ 막걸리는 주로 쌀, 보리 등을 이용해 고루 조화 되어 있으며, 발효에 의해 생성되는 CO₂로 인한 청량감을 가짐

○ 탁주의 국내 생산량은 2008년 140,161 kL, 2009년 214,069 kL, 2010년 352,573 kL로 최근 3년간 급격한 생산량 증가를 보이고 있다. 수출량은 2008년 4,538 kL, 2009년 6,084 kL, 2010년 14,236 kL로 3년 사이 약 3배 정도 급격히 증가했으며, 이는 막걸리의 인기 상승에 의한 것으로 보임

○ 막걸리에 각종 풍부한 영양성분이 많이 함유되어 있는데, 특히 인체 내의 신진대사에 관여 하는 필수 아미노산이 많이 함유되어 있고 vitamine B1, B2와 fuseloil 등이 함유되어 있음.

○ 막걸리의 풍미물질인 ethyl acetate, amylacetate, ethylcaproate 등의 ester와 새콤한 맛을 내어 갈증을 해소시켜주는 유기산, acetylcholine이 함유되어 있음

○ 본 연구를 통해 전통발효법인 정치발효법과 대량생산에 적합한 심부발효법의 장점을 접

목하여 고품질의 3단 발효식초(현미, 막걸리식초)의 생산량 증대 및 전통주의 수요 증대를 통해 지역 경제가 활성화 될 수 있을 것으로 판단 됨

○ 또한, 소비자들에게 주정발효식초가 아닌 전통발효법을 이용한 원물발효식초를 제공하고 과학적으로 기능성이 규명된 건강한 미래 먹거리를 제공 할 수 있을 것으로 판단 됨

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

제 1 절 국내외 기술 개발 현황

1. 국내외 관련 분야 시장 현황

가. 국내 시장 현황

○ 우리나라의 가정용 식초시장은 연간 약 300억원 정도 규모이고 오랜 기간 성장이 정체를 보이는 성숙기 시장이었으나, 2000년대 중반 음용 식초류가 출시되면서 소비자로의 접근성 확대, 매스미디어에 의한 식초의 건강기능성이 주목을 받아 음용 식초시장이 일반식초의 판매액을 훨씬 뛰어 넘는 800억원의 시장을 형성, 식초와 음용식초를 합산하면 연간 1,000억이 넘는 시장으로 성장하였음.

○ 조미식초는 전년대비 판매액(17.5%), 판매량 모두(+21.2%) 성장하며, 금년 약 420억원의 시장 규모를 형성하였고, 전년 대비 성장 폭이 확대, 지속적으로 성장세를 나타내고 있음

○ 기존 식초시장은 일반, 2, 3배 식초로 구분되어 있던 조미식초 시장에 M/S 1위 오뚜기가 저산도 식초를 출시, 2011년 배상면주가에서 저산도 식초를 출시하였고, 샘표에서도 요리용 식초를 출시하여 저산도 식초 시장이 확대되고 있으며, 전체 시장은 오뚜기가 시장 성장률을 견인하고 있음

○ 주정을 사용한 제품의 점유율 및 매출액의 감소되고 있으며 과실과 곡물로 만든 발효식초로 제품 소비로 이동되고 있으며, 2010년, 2011년 발효식초(과실, 곡물)의 전년대비 증가율은 발효식초(과실)은 146%, 발효식초(곡물)의 증가율은 무려 238%를 보여줌으로서 소비자의 웰빙의 트렌드, 원료에 대한 안전성 요구를 강하게 반영하고 있음

○ 100% 과실을 원료로 생산되는 감식초를 시작으로 천연발효 식초의 시장이 형성되어 식초 시장의 고급화 추세는 수입식초의 수입과 더불어 신제품개발이 요구 되고 있음

○ 특히, 음용식초는 식품공정상 발효식초가 아닌 음료베이스에 속해있으나, 식초의 기본속성을 베이스로하여 식초의 신맛의 거부감을 감소시키고자 다양한 당류와 flavor를 추가하여 개발한 제품으로 전통식초의 한계성을 음용식초라는 새로운 카테고리를 생성시킴

○ 현재, 업계에서는 조미식초와 음용식초 시장으로 나누어져 있으며 음용식초시장은 2004년 60억 규모에서, 2005년 90억 규모로 신장하였으며 그 규모가 약 700억 규모로 증가하였음

나. 국외 시장 현황

○ 일본 식초 시장은 발효식초가 95%이상을 차지하고 있으며, 특히 음용식초 시장이 크게 성장하였음

○ 일본 식초시장은 미쓰강 회사와 농가형 정치 배양 흑초를 생산하는 가고시마현 식초산업이 대표적이라 할 수 있음

○ 특히, 흑초의 경우 법적으로 규격화하여 관리하고 있으며 차별화 식초의 안전성을 보증하기 위해 일본 농림수산성이 인증하는 E 마크 및 식품산업센터가 인증하는 本場の本物 을 획득할 수 있도록 정책 및 연구지원이 이루어지고 있음

○ 이태리 발사믹 식초는 전세계 식초시장의 약 40%의 점유율과 M/S 1위를 차지하고 있으며, 발사믹식초의 엄격한 품질관리 규정에 따라 전통적인 제조방법과 엄격한 품질관리 제도를 운영 관리하면서 품질을 보존하고 있으며 이를 정부가 보증하는 차별화 정책을 마련 시행하고 있기 때문이라 할 수 있음

○ 전통적인 발사믹식초는 이탈리아 북부 에밀리아 로마냐 주의 모데나(Modena), 레지오 에밀리아(Reggio Emilia) 지방에서 트레비아노(Terebbian) 포도 품종 으로 발효 숙성하여 만든 식초만을 의미함

○ 미국의 대표 식초인 사과 식초(apple cider vinegar)는 산뜻한 풍미를 강점으로 드레싱뿐만 아니라 드링크의 용도로 이용 함

2. 관련기술분야의 연구현황

○ 국내 특허의 경우, 식초를 활용한 식초음료의 제조방법, 오디 발효 식초 음료와 그 제조방법, 유자 식초를 이용한 유자 음료 제조 방법, 복분자 식초음료 조성물 및 이의 제조방법 등이 있음

○ 국외 특허의 경우, 기침과 천식 완화 식초 음료 제조 방법, 혈압을 감소 식초 음료에 대한 제조 방법, 감식초의 지방감소 및 체중감량 효과, 여름 더위에 갈증을 완화하는 감식초, 여성 피부에 좋은 과일 식초 음료, 감 식초 음료 및 제조 방법, 오미자 과일식초 음료, 은행 나무 과일 식초 음료, 숙취 해소 및 dealcoholic 과일 식초 차등이 있음

○ 국내 논문 연구는 2단계 발효에 의한 고산도 사과식초의 품질특성, 시판 발효식초의 원료에 따른 특성 비교, 시판 과일식초의 발효방법에 따른 이화학적 특성 비교, 오미자를 이용한 식초발효 및 품질특성, 감귤 미숙과 식초의 품질 특성과 항산화 활성, 미나리 발효식초의 지방세포 분화억제 및 항염증 효과, 야콘 식초의 품질특성 및 항당뇨 효과, 혈액 지질 감소 및 운동 성능 향상에 기능성 음료로 감 식초에 관한 연구에 대한 연구가 이루어져 있음

○ 배치 및 반연속식 발효 차 식초의 생산, 와인 식초 생산의 품질과 안전, 배 식초의 발효 공정의 최적화, 흑초의 면역 성분의 분리 및 특성, 식후 혈당 상승의 억제에 식초의 효능, 대나무 식초의 항 염증 활동에 관한 연구, 식초 섭취가 제 2 형 당뇨병의 위험에서 건강한 성인에서 공복 혈당 농도 감소 연구, 토마토에 의해 생성된 새로운 식초는 3T3-L1 세포와 비만 쥐 모델에서의 지방 세포 분화 및 지방 축적을 억제 등의 국외 연구논문이 발표되어 있으며, 주로 아시아(일본, 중국)에서 식초의 기능성 연구가 활발히 이루어지고 있음

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 전통발효법을 응용한 3단 발효식초의 과학적 규명 및 표준화

1. 연구방법

가. 재료

(1) 현미 농축액 제조 방법

현미를 40메쉬 그물망에 70% 이상 통과하도록 파쇄한 후, 현미 함량의 약 2배의 정제수와 액화효소를 혼합하여 105℃에서 5분, 98℃에서 2시간 동안 액화시킨다. 얻어진 액화물을 60℃로 냉각한 후 당화효소 및 건맥아를 혼합하여 60℃에서 15시간 동안 당화시킨 다음, 85℃에서 30분 동안 효소실활 후 압착여과 및 농축하여 현미 농축액을 제조하였다.

(2) 알코올 발효

현미 농축액(70Brix) 2,000kg을 정제수 3,000kg에 가하고, 효모 200kg을 접종하여, 28℃에서 알코올 발효를 수행하여, 12.0%대의 알코올 농도를 갖는 발효액을 제조한다. 얻어진 발효액에 황성탄 0.05%를 처리한 후, 벤토나이트를 가한 다음, 필터프레스 여과를 실시하여, 불순물이 제거된 발효액을 제조하였다.

(3) 표면 발효

위에서 얻어진 알코올 발효액에 정제수를 가하여 알코올의 농도를 5.0%대로 희석한 다음, 현미식초를 사용하여 산도를 1.5%대로 조절한다. 얻어진 수용액의 온도가 35~40℃가 되도록 한 후 수용액의 표면에 초산균 막을 띄워서, 발효액의 표면이 초산균 막으로 모두 채워질 때 까지 (약 7 일 동안) 정치하여, 발효를 수행하였다.

(4) 심부 발효

표면발효액을 심부 발효관으로 이송하고, 발효관 내의 온도를 30.5~31℃의 온도 유지하고, 0.15vvm의 통풍량 조건에서, 심부 발효 중에 발효액 중의 알코올농도가 0.5% 이하 내려가지 않도록 알코올 발효액을 공급하면서, 발효를 실시하여 현미식초를 얻었다. 얻어진 현미식초에 벤토나이트 가한 다음, 필터프레스 여과를 실시하여, 불순물이 제거된 현미 식초를 제조하였다.

나. 실험 방법

(1) pH, Brix, 산도, OD 분석

pH 측정은 pH meter(pH Meter, Metrohm, Swiss)를 사용하였다. 총 산도는 시료 2mL에 phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N - NaOH용액으로 중화 적정하여 그 적정치(mL)를 초산함량(%)으로 환산하였다. 당도는 굴절당도계(RX-5000a, ATAGO Refractometer, Japan)를 사용하

여 측정하였다. OD값은 UV spectrophotometer로 660nm에서 측정하였다.

(2) 유리당 분석

현미 농축액은 10배 희석하고 각 공정별 샘플은 원액을 0.45 μm membrane filter로 여과하여 HPLC(high performance liquid chromatograph, Agilent Technologies 1200series, USA)로 분석하였다.

유리당 분석용 column은 Econosphere Amino 5 μm Column(250 \times 4.6 mm, 5 μm , Grace)이었으며 detector는 RI detector를 사용하였다. 이동상은 water와 acetonitrile 7:3(v/v) 비율로 혼합하여 사용하였으면 flow rate는 0.6 mL/min 이었다. 표준물질은 fructose, glucose, sucrose와 maltose(Sigma Co.)를 사용하였다.

(3) 알코올 분석

현미 농축액은 10배 희석하고 각 공정별 샘플은 원액을 0.45 μm membrane filter로 여과해 HPLC(high performance liquid chromatograph, Agilent Technologies 1200series, USA)로 분석하였다.

알코올 분석용 column은 Rezex ROA-Organic Acid H+ Column(300 \times 7.8 mm, 8 μm , phenomenex)을 사용하였으며, detector는 RI detector를 이용하여 검출하였다. 이동상은 water를 사용하였으며 flow rate는 0.7 mL/min, column 온도는 60°C 이었다.

(4) 유기산 분석

현미 농축액은 10배 희석하고 각 공정별 샘플은 원액을 0.45 μm membrane filter로 여과하여 HPLC(high performance liquid chromatograph, Agilent Technologies 1200series, USA)로 분석하였다.

유기산 분석용 column은 Rezex ROA-Organic Acid H+ Column(300 \times 7.8 mm, 8 μm , phenomenex)을 사용하였으며, detector는 VW detector를 이용하여 210 nm에서 검출하였다. 이동상은 0.005N H₂SO₄을 사용하였으며 flow rate는 0.5 mL/min, column 온도는 55°C 이었다. 표준물질은 oxalic acid, citric acid, malic acid, succinic acid, lactic acid, acetic acid(Sigma Co.)를 사용하였다.

(5) 미네랄 분석

미네랄 함량은 습식 분해법에 의해서, 시료 1g에 질산 8mL을 넣고 Microwave digestion system 을 사용하여 시료를 전처리 및 분해하였다. 이 시료 용액으로 하여 inductively coupled plasma(ICP) optical emission spectrometers(Genesis-FEEA, AMETEK)를 이용하여 Plasma power 1400(W), Coolant Flow 12.00 L/min, Auxiliary Flow 1.00 L/min와 Nebulizer Flow 1.00 L/min의 조건으로 분석하였다.

(6) 향기 성분 및 맛테스터 분석

향기 성분 분석을 위하여 Agilent 5973N quadrupole mass spectrometer가 부착된 GC(Agilent GC 6890N)을 사용하였다. 50mL vial에 10mL을 취해 70°C로 유지한 후 75 μm carboxen-PDMS SPEM에 10분 흡착 후 10분 탈착하였다. Column은 HP-5MS(30 m \times 0.25 mm

I.D., 0.25 μm film thickness)을 사용하였으며, carrier gas는 He로 유속 3.1 mL/min으로 하였다. GC oven 온도는 40°C 에서 5분간 유지한 후, 280°C 까지 10°C/min로 상승시킨 후 30분간 유지하였다. 검출 온도는 300°C 이었다. 질량 분석기로부터 확인된 모든 peak들은 iley7Nist0.5 Library로 확인하였다.

맛테스터 분석은 전자혀(Taste Sensing System TS-5000Z, Insent Inc.)를 사용하여 신맛, 쓴맛, 짠맛, 쓴맛의 후미, 짠맛의 후미, 감칠맛, 감칠맛의 후미, 짠맛을 확인하였다.

2. 연구결과

가. 발효법 배양조건 확립

3단 발효법에는 현미 농축액 제조 후, 알코올발효, 정치(초산)발효, 정치(심부)발효가 이용되며, 각 발효법에 대한 기본적인 배양조건 확립이 3단 발효법 공정표준화의 기초가 됨으로 각 발효법에 대한 배양조건 확립과 관련된 실험을 우선 수행하였다.

(1) 현미 농축액 제조 조건 확립

현미 농축액은 위의 제조 방법대로 현미를 과쇄한 후, 정제수와 액화효소를 혼합하여 액화, 당화 후 압착여과 및 농축하여 현미 농축액을 제조하였다. 현미 농축액의 당조성에 따른 알코올 수율 확인 결과, 단당류 함량이 높게 제조한 농축액이 알코올 발효시 수율을 높여 주는 것을 확인 할 수 있었다(Fig 7). 따라서 현미 농축액을 단당류 함량이 높게 제조하는 것이 알코올 발효 수율을 높이는 조건이라 하겠다. 이를 통해 원료의 균일한 제조가 각각의 발효 공정 수율에 중요한 영향을 끼치는 것을 확인 할 수 있었다.

(2) 알코올발효 배양조건 확립

알코올발효는 무산소적(혐기적) 당질 분해대사과정 중 하나로 단당류, 이당류 또는 다당류를 무효소적 분해를 통해 최종적으로 알코올과 이산화탄소를 생성하는 과정이다(Fig. 1).

이러한 발효과정을 가진 미생물로 잘 알려진 것은 효모(yeast)이며, 단당류인 포도당(glucose), 과당(fructose)과 이당류인 설탕(sucrose), 맥아당(maltose)을 알코올로 전환시키는 것으로 잘 알려져 있다. 이러한 알코올발효 과정은 다른 미생물(특히 곰팡이)이나 고등식물에서도 볼 수 있으나, 대부분의 동물조직에서는 알코올발효가 일어나기 쉽지 않다.

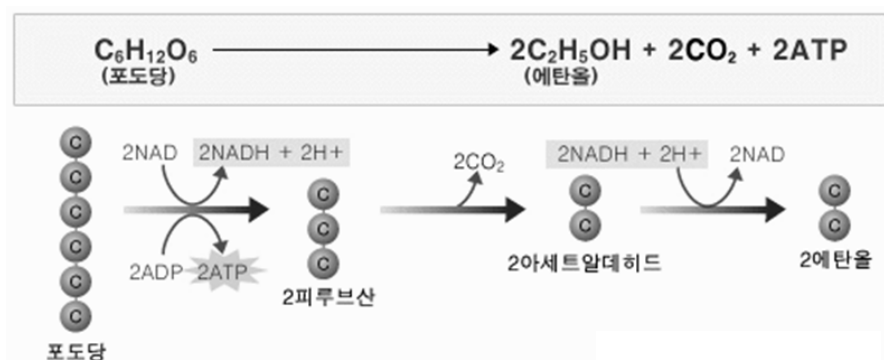
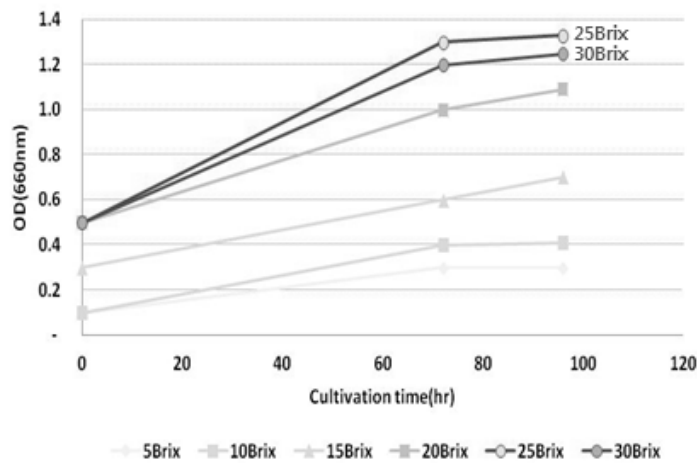


Fig. 1. 포도당에서 알코올로의 전환기작

본 연구진은 당사에서 보유하고 있는 효모균(*Saccharomyces cerevisiae*)을 이용하여 알코올발효가 잘 이루어지는 조건을 확립하고자, 초기 배지 내 적정 곡물 함량 및 배양온도 조건 설정에 대한 실험을 수행하였다.

초기 배지 내 적정 곡물 함량 설정을 위해 효능이 잘 알려진 대표적 곡물인 현미를 상기제조방법을 통해 알코올 전환을 위한 기질인 단당류 및 이당류가 포함된 농축액 상태로 가공하여 실험에 사용하였다. 70Brix인 현미농축액을 물로 희석하여 5 Brix ~ 30 Brix 함량별로 제조한 후 일반적으로 잘 알려진 효모균(*S. cerevisiae*) 생육온도인 28°C 조건에서 혐기적 상태로 배양을 시작하여 균 생육 변화 및 발효시간을 관찰하였다.(Fig. 2)

그 결과, 25 Brix 함량 시 가장 높은 균 생육수(660nm=1.3) 및 빠른 배양시간(72hr)을 확인할 수 있었다. 이는 초기 배지 내 곡물농축액이 25 Brix 함량이 되도록 하는 것이 가장 많은 균 생육수를 확보할 수 있는 유리한 조건이며, 그 이상의 함량 조건에서는 오히려 균 생육 저해 조건이 됨을 알 수 있다.

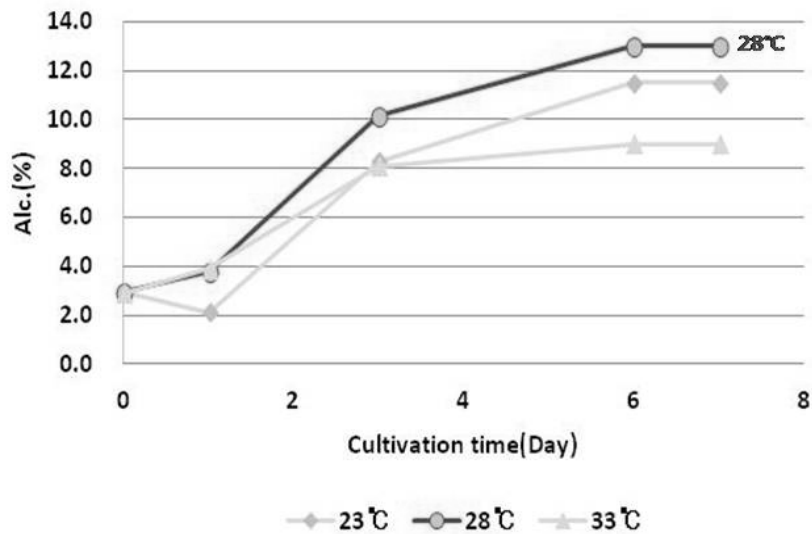


Time (hr)	5Brix	10Brix	15Brix	20Brix	25Brix	30Brix
0	0.100	0.100	0.300	0.500	0.500	0.500
72	0.300	0.400	0.600	1.000	1.300	1.200
96	0.300	0.410	0.700	1.090	1.330	1.250

Fig. 2. 현미농축액 함량별 효모균 생육 변화

다음으로 일반적으로 잘 알려진 효모균(*S. cerevisiae*) 생육온도인 28°C가 최적 온도조건인 지를 확인하고자 배양온도와 알코올 생성수율과의 상관관계를 확인하였다.

배양조건은 가장 많은 균 생육수를 나타내는 조건인 25 Brix 함량의 현미농축액 배지에서 23°C, 28°C, 33°C 온도로 배양을 시작하였으며, 1~3일 간격으로 배양액을 샘플링하여 알코올 분석을 통해 그 결과를 확인하였다.(Fig. 3) 예상대로 28°C 온도조건에서 가장 높은 알코올 함량(Alc. 13%)을 나타내었으며, 28°C 이상의 온도 조건보다 이하의 온도 조건이 알코올 생성에 유리함을 부가적으로 확인 할 수 있었다. 이는 정확한 온도 조절이 어려운 환경 하에서 알코올 발효를 진행해야 하는 업체의 경우 28°C 이하로의 온도관리에 신경을 쓸 경우 최적의 알코올 생성수율은 얻지 못하더라도, 좀 더 유리한 알코올 생성수율을 얻을 수 있다는 것을 시사하고 있다.



Time (Day)	23°C	28°C	33°C
0	2.92	2.93	2.91
1	2.13	3.76	3.90
3	8.30	10.15	8.09
6	11.50	13.00	9.02
7	11.50	13.00	9.02

Fig.3. 배양 온도별 알코올 생성수율

위 두 가지 결과를 바탕으로 현미 농축액 함량이 25Brix가 되도록 물을 투입한 배지에 효모균(*S. cerevisiae*) 접종 후 28°C 온도에서 알코올발효를 수행하여, 추후 공정별 품질 특성 변화 검토 및 품질 지표 설정을 통한 3단 발효법 공정표준화 연구에 사용하였다.

(3) 정치(초산)발효 배양조건 확립

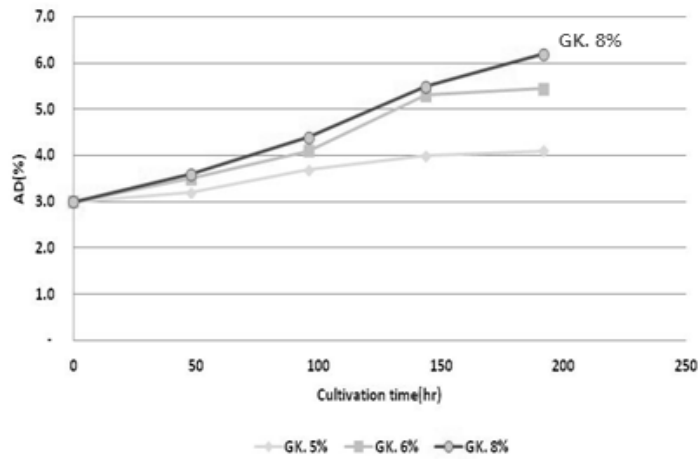
예로부터 사용되어 온 식초 제조법인 정치발효는 초기 투자비가 적고 소규모로 생산이 가능하여 소규모 식초 제조업체에서 많이 사용되는 방법이다. 이 발효법은 산도 5% 미만의 식초 제조에 유리하며, 대량생산 방식인 심부(초산)발효법에 비해 배양액의 교반과 유동이 적어 원료 고유의 향을 유지하면서 제품을 생산하고자 할 경우 적합한 방법이다. 그러나, 발효기간 동안 온도, 습도, 공기량 등을 정밀 기계장치로 일정하게 관리가 되지 않고 개방식으로 발효를 진행함으로써, 장기간 발효 시 야생균에 의한 오염 가능성이 높아 이상 발효로 인한 품질이 저하된 식초제조가 될 가능성이 높은 것이 가장 큰 단점이다. 따라서 안정적인 발효법을 찾기 위해 대부분의 업체에서는 수년간 실패를 거듭하여 경험적으로 자신만의 고유한 발효방식을 가지고 있는 실정이다.

정치(초산)발효에 사용된 초산균은 통상의 아세트박터속 균주를 사용하였다. 초산균이 알코올발효액에 피막을 형성 하는 성질이 있으며, 유용균의 *A. acet*는 식초양조에 이용된다. 한편, *A. xylinum*은 액면에 셀룰로오스의 두꺼운 피막을 형성하며, 식초양조에 있어서는 유해균이다.

본 연구진은 3단 발효법에 적용할 안정적인 정치(초산)발효 조건을 찾고자, 산도와 알코올의 혼합 비율별(GK) 산 생성율을 확인하였으며, 배양온도별 산 생성율을 통해 기본적인 발효조건 확립을 위한 실험을 수행하였다.

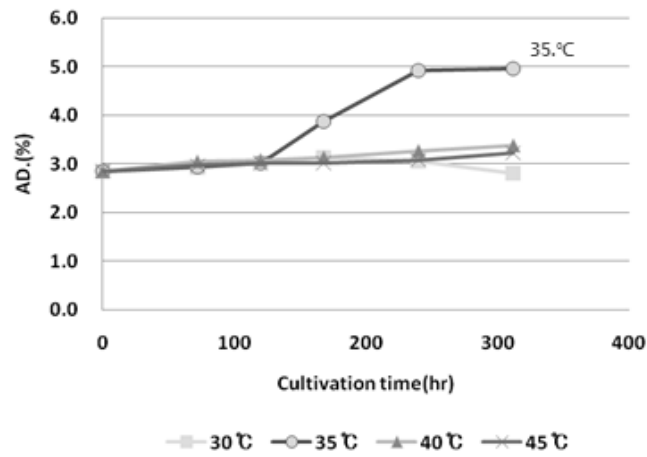
우선 사전연구 결과에 따라 산도 3%를 고정으로 한 조건에서 알코올 농도별 산 생성율을 확인하였다. 산도 조절은 당사에서 보유하고 있는 종초를 이용하였으며, 알코올 조절은 상기 발효법으로 제조된 알코올 발효액을 여과하여 사용하였다. 사용되어진 균주는 당사에서 제조되고 있는 감식초의 초산균막을 이용하였으며, 배양온도는 실온으로 진행되도록 하였다. 알코올 농도는 사전연구를 통해 5% 이상일 경우 초산발효가 진행되지 않음을 감안하여, 2 ~ 5% 사이에서 실험을 수행하였다.(Fig.4) 그 결과 산도 3%, 알코올 5% 배지에서 산 생성 저해 없이 산 생성율이 가장 높음을 확인할 수 있었다.

다음으로 산도 3%, 알코올 5% 배지에서 배양온도별 산 생성 수율을 확인하였다. 배양온도 범위는 감식초 배양온도인 40℃를 기준으로 35℃, 40℃, 45℃를 확인하였으나, 35℃에서 가장 높은 산 생성 수율을 보여 추가적으로 30℃ 배양을 진행하였다.(Fig.5) 그 결과 40℃, 45℃의 경우 거의 산 생성이 이루어지지 않았으며, 30℃의 경우 일정시간 이후 오히려 감소되는 경향을 확인 할 수 있었다. 산 생성 감소는 30℃ 이하 조건에서 생육 될 수 있는 *Acetobacter xylinum*에 의해 생성된 산이 과산화(over-oxidation)되어 감소되는 것으로 추정된다.



Time (hr)	GK. 5% (AD. 3%, Alc. 2%)	GK. 6% (AD. 3%, Alc. 3%)	GK. 8% (AD. 3%, Alc. 5%)
0	3.00	3.00	3.00
48	3.20	3.50	3.60
96	3.70	4.10	4.40
144	4.00	5.30	5.50
192	4.10	5.45	6.20

Fig.4. GK(산도와 알코올 혼합비율)별 산 생성 수율



Time (hr)	30°C	35°C	40°C	45°C
0	2.85	2.85	2.85	2.85
72	2.92	2.94	3.05	2.97
120	3.02	3.02	3.08	3.02
168	3.14	3.87	3.14	3.02
240	3.05	4.92	3.27	3.08
312	2.81	5.00	3.38	3.23

Fig.5. 배양온도별 산 생성 수율

위 결과를 바탕으로 당사의 종초와 상기 방법으로 제조된 알코올 발효액을 산도 3%, 알코올 5%가 되도록 혼합한 배지에 당사가 보유하고 있는 초산균막을 이용하여 35℃ 배양온도 조건에서 발효를 진행하여, 추후 공정별 품질 특성 변화 검토 및 품질 지표 설정을 통한 3단 발효법 공정표준화 연구에 활용하였다.

심부(초산)발효는 식초의 대량생산을 위해 현재 식초업계에서 일반적으로 사용하는 발효법으로 알코올 발효액과 초산균의 혼합물에 공기를 통하게 하고 격렬하게 교반시켜 빠른 시간 내에 초산을 생성 할 수 있는 방법이다. 당사 또한 수십 년간 이 발효법에 대한 연구를 수행하였으며, 그 결과 배양온도 31℃, 공기 주입량 0.15vvm, 교반 속도 400rpm의 조건에서 배양 시 가장 높은 초산 생성율을 확보 할 수 있음을 확인하였으며, 이 조건을 3단 발효법의 마지막 단계인 심부(초산)발효에 적용하여 공정별 품질 특성 변화 검토 및 품질 지표 설정을 통해 3단 발효법에 대한 공정표준화에 사용하였다.

나. 3단 발효 공정별 공정표준화

3단 발효법은 원료 가공에서부터 알코올발효, 정치(초산)발효, 심부(초산)발효가 차례로 진행되는 발효법으로 개개의 공정들이 유기적으로 연계되어 있음이 예상된다. 이에 본 연구진은 일차적 산물(알코올, 산도) 뿐만 아니라 유효성분(유리당, 유기산, 아미노산, 미네랄)의 변화도 동시에 검토하여 일정한 품질의 식초 제조를 위한 공정 표준화를 수행하였다.

(1) 현미농축액 성분 분석

현미는 다량의 식이섬유, 칼슘과 thiamin, riboflavin 등 비타민이 풍부하여 동맥경화, 당뇨병 등 성인병 예방차원에서 건강식으로 널리 이용되고 있다. 이러한 효능 때문에 현미 그 자체뿐만 아니라 현미를 이용한 발효식품 모두 소비가 꾸준히 증가하는 추세이다. 특히 현미의 아미노산 및 무기질은 발효식품인 식초의 영양학적 가치를 높여주는 중요한 성분들로 3단 발효 진행 시 변화패턴 파악도 중요한 부분으로 생각된다.

우선 각 발효단계를 수행할 때 성분변화의 흐름 파악에 있어 기준점이 되는 3단 발효식초 제조의 첫 단계인 현미농축액에 대한 기본항목 및 유효성분에 대한 분석을 수행하였다. 현미농축액은 상기 제조방법으로 만들어 졌으며, 알코올로의 전환에 있어 손쉽게 전환되는 기질인 포도당(glucose)으로의 분해를 유도하는 액화, 당화 효소처리 과정을 통해 제조되었다. 분석결과는 Table.1과 같았다.

Table 1. 현미농축액 분석 결과

항 목		현미 농축액
p H		4.61
산도(%)		0.9
BX		70
유기산(%)	oxalic acid	0.00
	citric acid	0.00
	malic acid	0.44
	succinic acid	1.16
	lactic acid	0.00
	acetic acid	0.00
	합계	1.60
유리당(%)	Fructose	0.00
	Glucose	53.03
	Sucrose	0.00
	Maltose	0.0
	합계	53.03
미네랄 (mg/100g)	Na	14.64
	Fe	0.00
	Ca	5.98
	Zn	0.00
	K	255.62
	Mg	49.43
	합 계	325.67
아미노산(ppm)	Aspartic acid	19.50
	Glutamic acid	48.20
	Asparagine	4.69
	Serine	11.61
	Glutamine	15.00
	Histidine	97.50
	Glycine	18.20
	Threonine	6.29
	Arginine	22.40
	Alanine	45.18
	GABA	17.00
	Tyrosine	8.29
	Cystine	0.00
	Valine	11.60
	Methionine	5.95
	Tryptophan	0.00
	Phenylalanine	23.50
	Isoleucine	21.48
	Leucine	26.00
	Lysine	26.80
합 계	429.19	

(2) 알코올발효 수행 시 성분 분석 변화

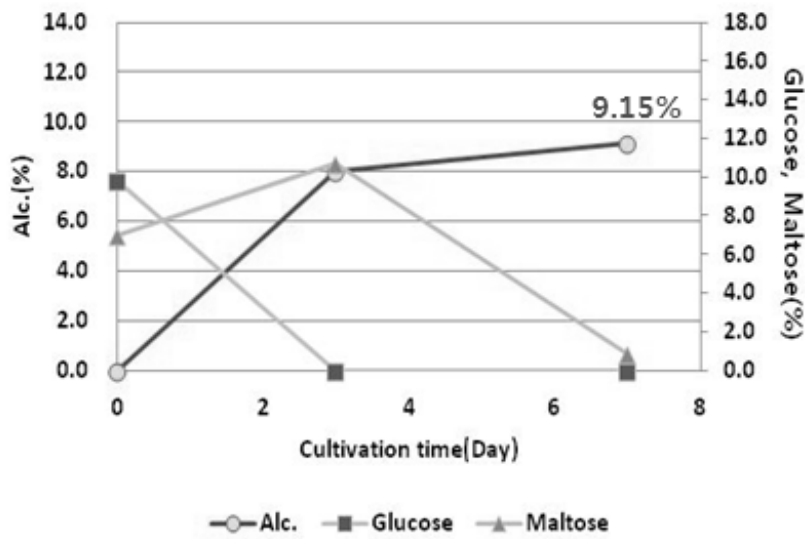
알코올발효는 25 ~ 30Brix가 되도록 현미농축액에 물을 투입한 배지에 28℃로 승온 한 후 효모균(*S. cerevisiae*)을 접종하여 일정간격으로 샘플링 한 후 발효기간별 성분 분석을 진행하였다.(Table.2) 배지조건은 정확한 계량이 어려운 현장상황을 고려하여 상기 알코올 배양조건 확립 시 확인할 수 있었던 현미농축액 함량별 효모균 생육 변화 결과를 근거로 하여 25 ~ 30Brix 범위를 결정하여 발효를 수행하였다.

Table 2. 알코올발효 수행 시 성분 분석 변화

항목		주요발효 (1day)	주요발효 (2day)	주요발효 (3day)	주요발효 (5day)	주요발효 (7day)
p H		3.43	3.51	3.55	3.55	3.61
산도(%)		0.36	0.42	0.42	0.42	0.47
Bx		21.8	18.7	17.4	16.4	16.6
OD(660nm)		1.96	2.24	2.28	2.47	2.50
알코올(%)		7.99	10.95	11.87	12.16	12.51
유기산 (%)	oxalic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	citric acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	malic acid	0.07	0.05	0.07	0.08	0.07
	succinic acid	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06
	lactic acid	0.22	0.24	0.25	0.28	0.28
	acetic acid	0.09	0.09	0.16	0.15	0.13
	합계	0.45	0.44	0.54	0.57	0.54
유리당 (%)	Fructose	0.13	0.12	0.09	0.09	0.08
	Glucose	13.03	10.58	8.17	8.22	8.35
	Sucrose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Maltose	0.00	0.00	0.32	0.32	0.36
	합계	13.17	10.70	8.58	8.63	8.79
미네랄 (mg/100g)	Na	3.54	3.53	3.48	3.74	3.66
	Fe	0.00	0.00	0.00	2.11	0.00
	Ca	3.42	3.49	4.1	4.21	3.95
	Zn	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	K	105.88	106.42	106.64	110.85	109.87
	Mg	11.23	13.68	12.86	12.93	12.31
	합계	124.07	127.12	127.08	133.84	129.79
아미노산 (ppm)	Aspartic acid	7.73	7.71	7.73	8.12	8.59
	Glutamic acid	19.68	20.25	25.38	27.25	29.52
	Asparagine	1.88	1.51	1.64	1.62	1.64
	Serine	4.65	4.31	4.35	4.31	4.35
	Glutamine	6.07	5.42	3.47	3.25	3.47
	Histidine	38.80	34.88	32.83	31.44	29.85
	Glycine	7.60	10.58	12.12	12.25	12.35
	Threonine	2.52	3.11	3.77	4.00	4.19
	Arginine	8.96	8.19	7.96	8.64	8.96
	Alanine	18.07	21.43	24.44	24.58	24.95
	GABA	6.53	4.85	2.75	2.57	2.06
	Tyrosine	3.31	4.02	4.42	5.09	5.52
	Cystine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Valine	5.03	5.15	5.75	6.89	7.18
	Methionine	2.38	2.15	2.38	2.53	2.78
	Tryptophan	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Phenylalanine	9.89	10.85	11.38	13.08	13.85	

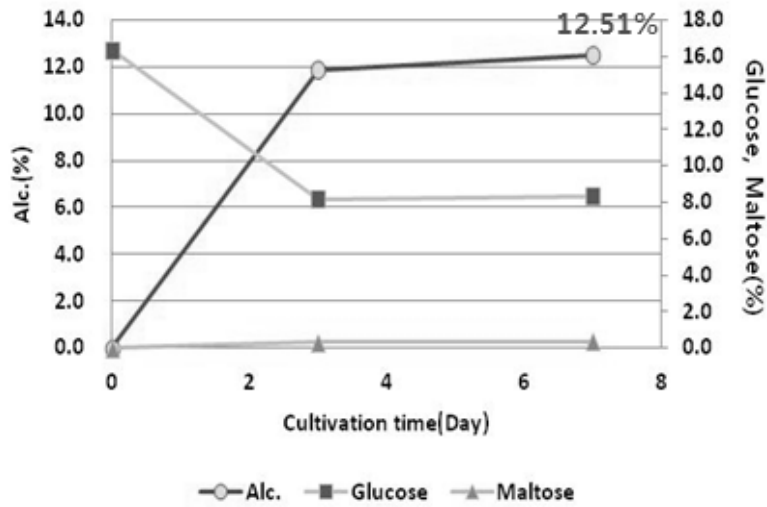
Isoleucine	8.59	9.35	10.09	11.14	11.95
Leucine	10.40	11.24	12.00	15.48	16.00
Lysine	10.84	9.37	8.72	9.58	10.14
합 계	172.93	174.37	181.17	183.70	197.36

Table 2.를 통해 알 수 있듯이 알코올 발효과정 중에는 포도당이 알코올로의 전환에만 이용됨을 확인하였으며, 그 외 성분들(유기산, 아미노산, 미네랄)의 총 함량 변화는 유의적 차이가 없음을 알 수 있었다. 이에 본 연구진은 현미농축액 내 유리당 조성 차이가 알코올 발효 시 어떠한 영향을 주는 지 확인하기 위하여, 임의적으로 포도당(glucose)과 맥아당(maltose)이 약 1 : 1비율이 되도록 제조하여 추가 실험을 수행하였다.(Fig.6, Fig.7)



Time(Day)	Alc.	Glucose	Maltose
0	0.00	9.84	7.02
3	8.00	0	10.72
7	9.15	0	0.89

Fig.6. 현미농축액(포도당, 맥아당)을 이용한 알코올 발효



Time(Day)	Alc.	Glucose	Maltose
0	0.00	16.36	0.0
3	11.87	8.17	0.32
7	12.51	8.35	0.36

Fig.7. 현미농축액(포도당)을 이용한 알코올 발효

그 결과 단당류인 포도당(glucose)만으로 구성되어 있는 농축액보다 포도당(glucose)과 맥아당(maltose)으로 구성된 농축액으로 알코올 발효를 수행하였을 시 약 75% 알코올 생성 수율이 낮아짐을 확인하였다. 이는 알코올 발효에 사용되는 원료의 유리당 조성이 알코올 수율에 영향을 줄을 나타내고 있으며, 원료 내 포도당(glucose) 비중이 높을수록 수율 향상에 영향을 주리라 예상된다.

(3) 정치(초산)발효 수행 시 성분 분석 변화

정치(초산)발효는 당사에서 보유하고 있는 종초와 상기 제조방법에서 얻어진 알코올발효액을 이용하여 산도 3%, 알코올 5%가 되도록 혼합한 후 35°C로 승온 한 후 당사의 초산균막을 접종하여 실험을 수행하였다.

본 연구진은 심부(초산)발효로 전환하기 위한 최적의 정치(초산)발효 기간을 알아보고자 산도가 더 이상 증가하지 않을 때까지 일정한 간격으로 샘플링하여 균생육 수준, 잔여알코올, 유기산, 아미노산, 미네랄을 비교하여 보았다. 그 결과 7일 이후 균생육은 감소되기 시작하였으며, 아미노산은 15일 이후 감소되는 경향을 나타내었다. 반면 미네랄의 변화는 거의 없었다.(Table 3.)

Table 3. 정치(초산)발효 기간별 성분분석 변화

항목		정치발효 (1day)	정치발효 (2day)	정치발효 (3day)	정치발효 (5day)	정치발효 (7day)	정치발효 (15day)	정치발효 (30day)
p H		2.89	2.92	2.91	2.84	2.76	2.83	2.83
Bx		11.10	11.1	11.3	11.7	11.50	12.73	13.50
산도		2.52	2.52	2.58	3.03	3.46	4.35	6.32
OD(660nm)		0.98	1.15	1.23	1.26	1.31	1.14	0.23
알코올(%)		4.79	4.63	4.24	3.59	2.87	1.54	0.00
유기산 (%)	oxalic acid	0.00	0.00	0.00	0.0	0.00	0.00	0.00
	citric acid	0.00	0.00	0.00	0.0	0.00	0.00	0.00
	malic acid	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07
	succinic acid	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06
	lactic acid	0.15	0.15	0.15	0.12	0.11	0.06	0.02
	acetic acid	1.98	2.01	2.04	2.43	2.86	4.31	5.50
	합계	2.24	2.29	2.32	2.68	3.10	4.51	5.65
유리당 (%)	Fructose	0.00	0.00	0.00	0.0	0.00	0.00	0.00
	Glucose	5.45	5.41	5.52	5.50	5.67	6.06	6.37
	Sucrose	0.00	0.00	0.00	0.0	0.00	0.00	0.00
	Maltose	0.23	0.21	0.23	0.20	0.25	0.21	0.23
	합계	5.69	5.61	5.75	5.70	5.91	6.27	6.60
미네랄 (mg/100g)	Na	2.30	2.46	2.63	2.81	2.83	2.67	2.81
	Fe	0.20	0.12	0.25	0.21	0.00	0.00	0.29
	Ca	3.50	3.48	3.58	3.58	4.00	3.74	4.89
	Zn	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	K	58.39	62.57	66.77	69.38	69.36	73.84	74.11
	Mg	10.13	12.12	9.74	12.25	13.89	11.56	20.49
	합계	74.52	80.75	82.97	88.23	90.08	91.81	102.59
아미노산 (ppm)	Aspartic acid	6.44	5.12	5.58	4.71	3.86	3.20	1.90
	Glutamic acid	19.16	18.53	18.13	15.31	13.47	17.09	13.80
	Asparagine	1.64	1.55	1.41	1.25	1.17	0.40	0.20
	Serine	3.77	3.62	3.48	3.25	2.90	1.50	0.80
	Glutamine	2.60	2.48	2.17	1.89	1.30	1.73	1.50
	Histidine	23.88	23.52	23.88	22.55	20.90	14.92	10.20
	Glycine	8.08	8.15	8.31	7.98	7.13	5.23	3.50
	Threonine	3.77	4.01	4.19	3.83	3.35	3.77	2.50
	Arginine	7.47	7.62	7.96	7.96	7.96	5.97	4.20
	Alanine	16.80	16.72	16.80	15.38	13.70	16.29	14.00
	GABA	1.72	1.71	1.72	1.65	1.37	1.20	1.00
	Tyrosine	4.97	4.58	4.42	4.42	4.42	4.80	3.50
	Cystine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Valine	7.54	7.52	7.54	6.99	6.47	7.18	6.90
	Methionine	1.59	1.81	1.98	1.77	1.19	1.40	1.40
	Tryptophan	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Phenylalanine	11.87	12.13	12.37	11.28	10.88	9.40	8.20
	Isoleucine	10.09	10.09	10.09	8.34	7.47	5.23	4.30
	Leucine	14.40	14.40	14.40	13.58	12.40	10.20	8.30
Lysine	8.49	8.51	8.72	8.22	7.78	8.49	5.20	
합계	154.28	152.07	153.15	140.36	127.73	118.01	91.40	

상기 결과를 통해 아미노산 및 미네랄이 유지되면서 균생육 활성이 가장 높은 상태인 7일까지 발효한 정치(초산)발효액을 심부(초산)발효 과정에 사용하기로 하였다.

(4) 심부(초산)발효 수행 시 성분 분석 변화

심부(초산)발효는 상기의 방법으로 7일간 발효한 정치(초산)발효액을 교반, 온도, 공기 주입량이 조절되는 발효탱크에 투입하였다. 이 때 교반 조건은 400rpm, 온도 조건은 31℃, 공기 주입량은 0.15vvm으로 고정하여 심부(초산)발효를 진행하였다.

본 연구진은 심부(초산)발효 시 잔여 알코올이 시간당 산 생성율에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자 하였다. 이를 수행하기 위해 발효탱크에 투입된 정치(초산)발효액에 초산으로 전환하기 위한 기질인 알코올을 발효 초기부터 추가 투입하지 않고, 잔여 알코올이 0.5% 수준 일까 지 위 조건으로 발효를 수행하였다. 잔여 알코올이 0.5% 수준에 도달 시 상기 방법에 의해 제조된 알코올 발효액을 산 생성폭에 맞춰 지속적으로 투입한 후 잔여 알코올이 4% 수준이 될 때 투입 양을 점차적으로 줄인 후 투입을 중지하였다. 이 최저, 최고점은 당사 연구 자료에 따른 것으로 심부(초산)발효 시 잔여 알코올의 안정적 범위가 0.5% ~ 4%로 확인된 바 있어 이를 참고하였다. 이 결과는 Fig. 8과 같았다.

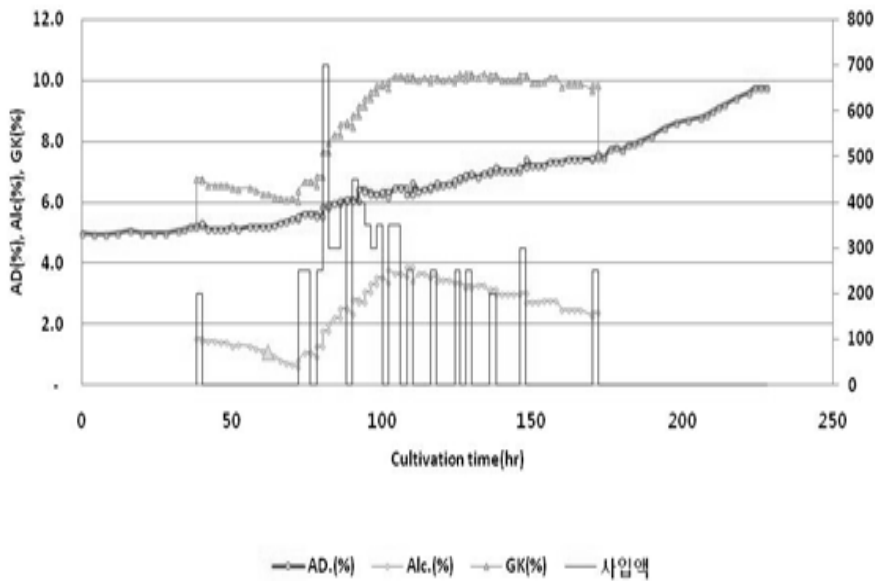


Fig. 8. 잔여알코올 0.5% ~ 4% 범위로 조절 시 심부(초산)발효 결과

위 결과 중 최저 잔여 알코올농도가 0.5% 지점인 78시간부터 잔여 알코올농도가 4% 지점인 102시간까지의 기간 동안 잔여 알코올농도가 시간당 산 생성율에 어떠한 영향을 미치는지 확인해 보았다.(Fig. 9) 확인해 본 결과 잔여 알코올이 0.5%에서 약 2.0%까지 증가 시에는 시간당 산 생성율이 급격하게 증가하지만 그 이상의 경우 약 50% 수준으로 급격히 감소한 후 적은 폭이지만 점차 감소하고 있음을 알 수 있다. 이는 잔여 알코올이 일정 수준 이상 발효액 내에 존재 할 경우 초산균의 (초산) 전환 능력에 저해가 생김을 나타낸다.

따라서 본 연구진은 이에 대한 타당성을 검토하고자 심부(초산)발효 시 발효액 내의 잔여 알코올 농도를 0.5% ~ 2% 사이가 되도록 알코올 발효액을 투입하여 발효를 진행해 보았다.(Fig. 11) 그 결과 잔여 알코올을 0.5% ~ 4%로 관리 하였을 경우 약 230시간의 발효기간과 산도 9.79%의 수율을 보인 반면, 잔여 알코올을 0.5% ~ 2%로 관리 하였을 때는 발효 기간이 30% 감소한 160시간을 보였으며, 산도의 경우 9.29%를 나타내었다. 이는 잔여 알코올 관리 기준이 발효 기간 단축에 중요한 사항임을 보여주고 있다.



Fig. 10. 잔여알코올 0.5% ~ 4% 구간 내의 시간당 산 생성율

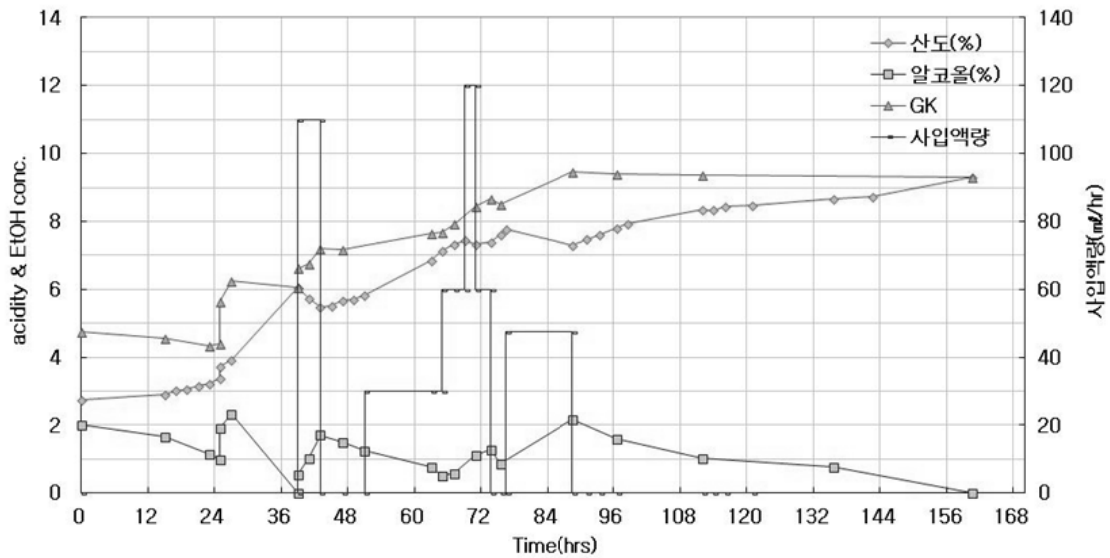


Fig.11. 잔여알코올 0.5% ~ 2% 범위로 조절 시 심부(초산)발효 결과

(5) 3단 발효 공정별 공정표준화

이상의 연구 결과를 통해 본 연구진은 공정표준화를 위한 3단 발효 시 각 공정별 주요 관리 사항을 선정하였다.

첫째로, 원료 부분의 경우 원료 내 유리당 조성이 알코올 발효 수율과 연관이 있음을 확인한 바, 현미의 경우 액화, 당화 효소분해를 통한 농축액 내 유리당 조성이 단당류인 포도당(glucose)으로 구성되도록 제조하는 것을 중요 관리사항으로 선정하였다. 이는 여러 가지 곡물을 3단 발효법으로 제조할 경우 농축액 제조 시 유리당 조성이 단당류 함량이 높을수록 알코올 발효 수율 향상에 영향을 줄 수 있음을 시사하고 있다.

둘째로, 알코올 발효 단계에서는 현미농축액 내 유리당 조성 뿐만 아니라, 원료 함량 및 온도가 효모균(*S. cerevisiae*)의 생육 및 알코올 생성 수율에 영향 줌을 확인하였으며, 이에 원료 함량은 Scale-up시 정확한 양 투입 및 온도 조절이 어려움을 고려하여, 원료 함량은 25Brix ~ 30Brix 사이가 되도록 설정하였으며, 온도의 경우 27°C ~ 29°C의 범위로 관리기준으로 선정하였다.

셋째로, 정치(초산)발효 단계에서는 초기 초산균의 안정적인 생육 조건을 확인한 결과 산도 3%, 알코올 5%의 배지 조성이 중요함을 확인하였고, 35°C 온도조건에서 산 생성 수율이 높음을 확인하였다. 이에 Scale-up 시 정확한 계량 및 온도 조절이 어려움을 감안하여, 산도 2% ~ 3%, 알코올 4% ~ 5%, 온도 34°C ~ 36°C 범위를 설정하였다. 초기 초산균의 생육 저해 현상을 최소화 하고자 산도와 알코올의 경우 범위를 최적기준점 대비 낮은 범위로 설정하였다. 또한,

심부(초산)발효 단계로의 최적 전환 시점을 확인하였으며, 발효 기간 별 초산균 생육 수준 및 유효성분을 확인한 결과 7일 이후 초산균 생육 저하 및 총 아미노산 감소 경향이 나타날 수 있어 본 연구진은 정치(초산)발효 기간을 7일로 선정하였다.

넷째로, 심부(초산)발효 단계는 당사의 수십년 간의 연구를 통해 밝혀진 발효조건인 온도 31℃, 통기량 0.15vvm, 교반속도 400rpm의 관리 조건 뿐만 아니라, 잔여알코올 범위가 최종 발효산물인 초산 생성에 있어서 시간당 초산 생성율에 영향을 줌을 확인되어, 이에 심부(초산)발효 진행 시 exponential phase 시기부터 알코올발효액을 투입하되, 그 양을 잔여알코올이 0.5% ~ 2% 범위 사이에 투입되도록 하는 것을 관리기준으로 선정하였다.

다. 3단 발효식초와 표면발효식초 및 심부발효식초와의 관능 및 영양학적 비교

본 연구진은 3단 발효식초의 일정한 품질의 제품 생산을 위한 공정표준화 뿐만 아니라 전통 발효법과 유사한 정치발효법을 이용한 식초 및 일반적으로 시판되고 있는 심부발효식초와의 관능 및 성분비교를 통해 3단 발효식초의 장점을 밝혀보고자 하였다. 비교샘플은 표면발효법 및 3단 발효법을 이용한 현미식초와 시중에 판매되고 있는 주정식초를 대상으로 하였다.

(1) 발효법에 따른 식초별 관능 비교

위 세가지 제품의 관능을 비교하기 위해 10명의 소비자 패널에게 맛, 풍미, 신맛의 정도, 단맛의 정도를 7점 척도로 평가를 진행하였다. 또한 섭취의 용이성을 위해 산도가 0.5%가 되도록 물과 희석 한 후 시식하였다. 그 결과는 Table. 3과 같다.

Table. 3의 결과에서 볼 수 있듯이 모든 부분에서 3단 발효식초에 대한 긍정적 평가를 확인할 수 있었으며, 그 다음으로 심부발효 식초, 정치발효 식초 순이었으나, 심부발효 식초의 경우 주정으로 제조된 식초로 일반 시중에 시판 시 맛에 따른 곡물농축액 및 과일농축액을 소량 첨가 한 후 맛의 풍미를 높이기 위해 합성착향료가 첨가되어 있어 그 비교 대상으로는 적합하지 않은 것으로 사료된다.

Table 3. 3가지 발효법으로 제조된 식초에 대한 관능비교 결과

제품	선호도	향	맛(향미)	신맛	뒷맛
3단 발효 식초	70% ^a	5.6 ^a	5.5 ^a	5.8 ^a	5.5 ^a
	(7명)				
심부 발효 식초	20% ^b	4.6 ^{ab}	4.7 ^a	4.6 ^b	4.4 ^b
	(2명)				
정치 발효 식초	10% ^b	3.7 ^b	3.4 ^b	4.4 ^b	3.5 ^b
	(1명)				
	0.007	0.009	0.001	0.01	0.003
	차이있음	차이있음	차이있음	차이있음	차이있음

또한, 본 연구진은 향을 인지하는 사람의 코처럼 복잡한 맛을 감지 할 수 있는 보다 객관적이고 자동화된 맛 테스터기를 이용하여 소비자들이 긍정적으로 생각하는 속성을 알아보고자 하였다. 맛 테스터기는 혀에서 느껴지는 맛을 수치화 할 수 있는 장치로 총 8가지 속성, 즉 신맛, 쓴맛, 떫은맛, 쓴맛의 후미, 떫은맛의 후미, 감칠맛, 감칠맛으로부터 오는 후미, 짠맛에 대한 것을 수치로 보여준다. 3단 발효식초, 정치발효식초, 심부발효식초에 대한 결과는 Fig. 12와 같았다.

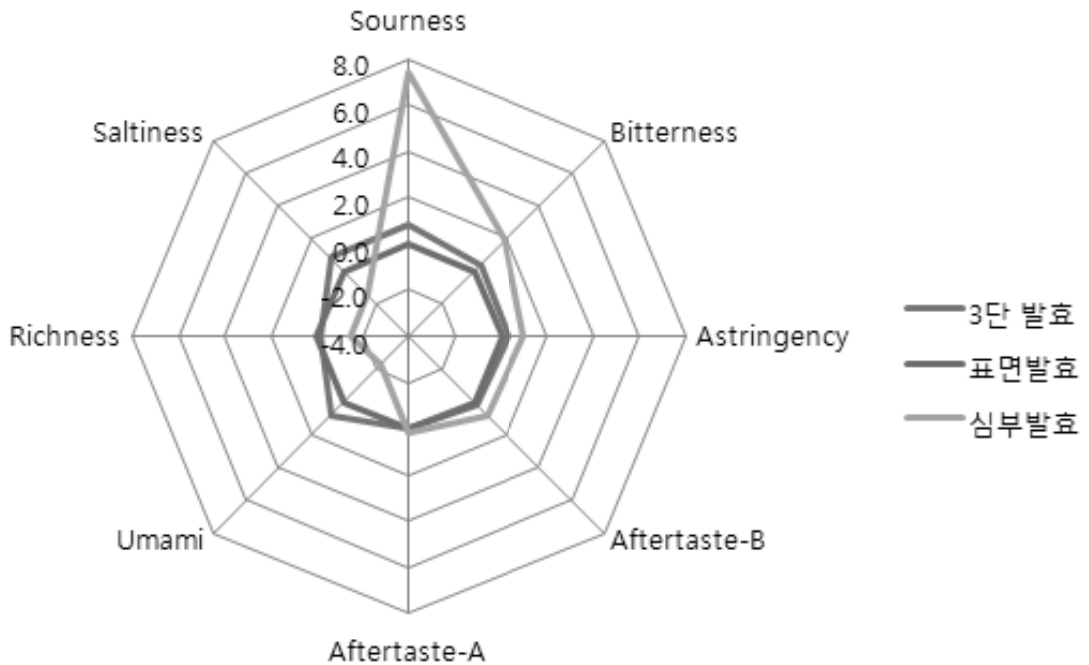


Fig. 12. 3단 발효식초, 표면발효식초에 대한 맛테스터기 비교 결과

* Sourness 신맛, Bitterness 쓴맛, Astringency 떫은맛, ,Aftertaste-B 쓴맛의 후미, Aftertaste-A 떫은맛의 후미, Umami 감칠맛, Richness 감칠맛으로부터 오는 후미, Saltiness 짠맛

위 결과에 따르면 심부발효식초의 경우 신맛이 강한 반면, 감칠맛과 관련된 속성이 현저하게 낮으면서 쓴맛이 강하여, 그 자체로의 관능 품질이 좋지 않아 이를 마스킹하기 위해 각종 농축액 및 합성착향료를 쓸 수밖에 없음을 알 수 있다. 이에 반면 3단 발효식초와 정치발효 식초와의 비교 시 큰 유의차는 없으나 신맛과 감칠맛 부분에서 다소 우위를 보여주고 있음을 확인하였다.

그러나 관능 품질은 단순히 혀에서 느껴지는 속성만으로 얘기 될 수 없으며, 코에서 느껴지는 냄새 또한 그 품질 결정에 중요한 요소이다. 또한 식초는 주성분이 초산 이외에 각종 맛 성분과 향기성분이 원료로부터 이행되어 고유한 향미 특성을 가지며 같은 원료라 하더라도 발효와 숙성방법에 따라 향기 성분에 차이가 있다. 따라서, 3단 발효식초 공정 단계별 향기성분 변화를 분석하였다. 그 결과는 Table. 4와 같았다.

Table. 4의 결과에서 볼 수 있듯이 표면발효 식초는 26종, 3단 발효 식초가 51종의 향기 성분이 검출 되었다. 주요 향기 성분은 표면 발효 식초는 acetic acid가 가장 높았으며 1-butanol, 2-butanone, benzaldehyde, ethanol 순으로 나타났다. 3단발효 식초의 주요 성분도 acetic acid가 가장 많은 부분을 차지하고 있었고 그다음 ethyl acetate, benzene ethanol,

2-phenylethyl acetate, iso-valeric acid로 나타났다. 표면발효 식초와 3단발효 식초의 주된 향기 성분으로 나타난 acetic acid는 초산균에 의해 생성되는 산화생성물이며, 표면발효 식초는 주로 alcohol류와 aldehyde류가 높게 나타났다. 3단발효 식초에서 검출된 ethyl acetate와 2-phenylethyl acetates는 꽃향과 과일향을 생성하는 물질로 3단 발효 식초의 향에 긍정적인 역할을 할 것으로 판단된다.

위와 같은 다양한 객관적이고 수치화된 분석 방법으로 맛의 성분과 속성이 관능에 영향을 미치는 요소를 확인하고 공정별 맛의 연계성을 확인 할 수 있었다. 식초는 발효 과정을 통해 생성되는 풍부한 향미를 가지는 제품으로 관능의 표준화를 통한 고품질의 식초 생산을 위해서는 보다 많은 data 확보를 통한 연구가 필요할 것으로 보인다.

Table 4. 3단 발효식초 공정별 향기성분 변화

No.	성분명	정치발효식초	3단 발효식초
1	acetic acid	85.95	74.74
2	1-butanol	4.63	0.56
3	2-butanone	1.15	0.93
4	benzaldehyde	1.03	0.32
5	ethanol	0.72	0.79
6	formamide	0.62	-
7	octasiloxane	0.54	0.47
8	butanedioic acid	0.43	0.27
9	N-ethyl-1,3-dithioisindoline	0.38	-
10	silicone grease	0.35	0.38
11	phenylethyl alcohol	0.34	0.16
12	cyclotrisiloxane	0.29	-
13	cycloheptasiloxane	0.23	0.20
14	2,3-butanedione	0.22	0.11
15	3-(4-N,N-dimethylaminophenyl)propenoic acid	0.18	-
16	6-Aza-5,7,12,14-tetrathiapentacene	0.14	-
17	tetracosamethyl cyclododecasiloxane	0.14	0.65
18	cyclotetrasiloxane	0.10	0.04
19	phenol	0.09	0.05
20	decanoic acid	0.06	0.40
21	6-methyl-2-pentylindole	0.05	-
22	cyclononasiloxane	0.05	0.38
23	butanoic acid	0.04	0.22
24	eicosamethyl cyclodecasiloxane	0.03	-
25	benzoic acid	0.02	-
26	2-ethylacridine	0.01	-
27	Ethyl acetate	-	7.61
28	benzene ethanol	-	1.71
29	2-phenylethyl acetate	-	1.62
30	iso-valeric acid	-	1.01
31	3-(difluoromethyl) pyridine	-	0.99
32	isoamyl acetate	-	0.94
33	2-propanol	-	0.91
34	iron	-	0.78
35	1-heptanol	-	0.54
36	heptasiloxane	-	0.50
37	2-methyl-butyl acetate	-	0.33
38	toluene	-	0.23
39	2-methylpropyl ester	-	0.19
40	hexasiloxane	-	0.14
41	acetaldehyde	-	0.13
42	dodecanoic acid	-	0.11
43	eicosamethyl cyclodecasiloxane	-	0.10
44	cyclohexasiloxane	-	0.08
45	decanoic acid	-	0.07
46	cyclodecasiloxane	-	0.06
47	hexadecanoic acid	-	0.05
48	benzene	-	0.04
49	silicic acid	-	0.01
50	propiophenone	-	0.01
51	silane	-	0.01

(2) 발효법에 따른 식초별 영양학적 비교

본 비교는 3단 발효법으로 식초 제조 시 정치발효법에 비해 영양학적 차이가 있는지를 확인하고자 하였다. 심부발효 식초의 경우 주정식초에 곡물 또는 과일농축액을 첨가하는 타입이 대부분임으로 첨가량에 따라 그 편차가 심할 것으로 판단되어 비교 대상에서 제외하였다. 영양학적 차이를 확인해 보고자 Table. 5에서 나타난 것처럼 발효기간 단계별 유기산, 아미노산, 미네랄 분석을 수행하였다.

첫째로, 유기산 분석 결과, 표면발효 식초의 총 유기산 함량은 5.65%, 3단 발효 식초의 총 유기산 함량은 7.74% 이었으며 유기산 성분 중 초산이 가장 높았다. 초산(acetic acid)의 효능은 일본에서 지속적으로 연구가 되고 있다. 또한 식초의 유기산은 체내대사에 관여하여 TCA cycle을 도와준다고 보고된 바와 같이 초산 함량이 높은 3단 발효식초가 체액을 산성으로 하는 젖산 등의 생성을 방지 및 분해시키는데 도움을 줌으로써 인체대사에 촉진적 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

둘째로, 아미노산은 단백질 분자의 가장 기본적인 조성물질로, 체내에서 근육의 원료물질로 에너지를 발생시키고 활력을 도우며, 신진대사의 촉매역할을 하고, 인체 조직의 재생과 회복을 돕는 역할을 한다. 표면발효 식초와 3단발효식초의 아미노산 분석결과, 모든 시료에서 threonine, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine, histidine, arginine 등 총 9종의 필수 아미노산이 검출되었다. 생리활성물질로 알려진 GABA도 정치 발효를 통해 제조한 식초와 3단 발효 공정을 통해 제조한 식초에서 유사한 함량이 나타났다. 총 아미노산의 함량은 발효 방법과 상관없이 감소하였는데 이는 발효 과정 중 초산균 생성을 위해 중간생성물로 사용된 것으로 보인다.

셋째로, 미네랄은 인체를 비롯한 생명체에 없어서는 안되는 물질로 단백질, 지방, 탄수화물, 비타민과 더불어 5대 영양소 가운데 하나이다. 인체 내에서 여러 가지 생리 활동에 참여하는 미네랄 중 인체를 구성하는 원소인 칼슘(Ca), 인(P), 칼륨(K), 나트륨(Na), 염소(Cl), 마그네슘(Mg), 철(Fe), 구리(Cu), 아연(Zn), 코발트(Co) 등의 원소는 미량으로도 충분하지만 없어서는 안되는 것들이다. 이들 미네랄의 섭취가 부족하면 각종 결핍증을 유발한다.

표면발효 식초와 3단 발효 식초의 미네랄 분석 결과 현미농축액에서 유래되는 것으로 보이는 K의 함량이 높게 나타났다. 또한 총 미네랄 함량은 발효 기간과 발효 방법과는 무관하게 유사한 결과를 보였다.

위 영양학적 분석 결과를 통해 발효 시간이 오래 걸리는 정치 발효법(37일) 대비 3단 식초가 빠른 시간 내에(21일) 몸에 좋은 초산을 많이 생성하며 다른 영양학적 성분(아미노산, 미네랄)에는 차이가 없는 3단 발효 식초 제조가 가능하다는 걸 알 수 있었다.

Table 5. 정치발효법과 3단 발효법 공정별 영양학적 성분 비교

항 목		정치 발효 식초			3단 발효 식초		
		초기	중기	말기	알코올 발효	표면 발효	심부 발효
유기산(%)	oxalic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	citric acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	malic acid	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.00
	succinic acid	0.07	0.07	0.06	0.06	0.07	0.10
	lactic acid	0.06	0.06	0.02	0.28	0.11	0.07
	acetic acid	2.16	4.31	5.50	0.13	2.86	7.57
	합계	2.36	4.51	5.65	0.54	3.10	7.74
미네랄 (mg/100g)	Na	2.76	2.67	2.81	3.66	2.83	3.79
	Fe	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	0.13
	Ca	3.24	3.74	4.89	3.95	4.00	4.11
	Zn	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	K	75.42	73.84	74.11	109.87	69.36	100.52
	Mg	10.66	11.56	20.49	12.31	13.89	11.42
	합계	92.07	91.81	102.59	129.79	90.09	119.96
아미노산 (ppm)	Aspartic acid	5.5	3.2	1.9	8.6	3.9	1.5
	Glutamic acid	18.5	17.1	13.8	29.5	13.5	9.1
	Asparagine	0.5	0.4	0.2	1.6	1.2	0.5
	Serine	1.7	1.5	0.8	4.4	2.9	2.0
	Glutamine	1.9	1.7	1.5	3.5	1.3	1.3
	Histidine	22.5	14.9	10.2	29.8	20.9	14.7
	Glycine	7.5	5.2	3.5	12.4	7.1	6.0
	Threonine	3.2	3.8	2.5	4.2	3.4	2.0
	Arginine	5.5	6.0	4.2	9.0	8.0	6.2
	Alanine	17.2	16.3	14.0	24.9	13.7	9.9
	GABA	1.7	1.2	1.0	2.1	1.4	1.0
	Tyrosine	5.0	4.8	3.5	5.5	4.4	3.2
	Cystine	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Valine	7.5	7.2	6.9	7.2	6.5	4.2
	Methionine	1.5	1.4	1.4	2.8	1.2	1.1
	Tryptophan	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Phenylalanine	10.5	9.4	8.2	13.8	10.9	7.5
	Isoleucine	9.9	5.2	4.3	12.0	7.5	4.0
	Leucine	15.4	10.2	8.3	16.0	12.4	8.0
	Lysine	9.1	8.5	5.2	10.1	7.8	4.0
합 계	144.6	118.0	91.4	197.4	127.7	86.2	

제 2 절 3단 발효법을 이용한 막걸리 식초 제조 및 유효성 평가

1. 연구방법

가. 재료

(1) 막걸리

본 실험에 사용한 막걸리 원주는 대산주조에서 생산한 막걸리를 구매하여 시료로 이용하였다. 막걸리 원주의 사용원료는 알코올 농도는 10%이다.

나. 실험방법

(1) pH, Brix, 산도, OD 분석

pH 측정은 pH meter(pH Meter, Metrohm, Swiss)를 사용하였다. 총 산도는 시료 2mL에 phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N - NaOH용액으로 중화 적정하여 그 적정치(mL)를 초산함량(%)으로 환산하였다. 당도는 굴절당도계(RX-5000a, ATAGO Refractometer, Japan)를 사용하여 측정하였다. OD값은 UV spectrophotometer로 660nm에서 측정하였다.

(2) 유리당 분석

현미 농축액은 10배 희석하고 각 공정별 샘플은 원액을 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 HPLC(high performance liquid chromatograph, Agilent Technologies 1200series, USA)로 분석하였다.

유리당 분석용 column은 Econosphere Amino 5 μ Column(250 \times 4.6 mm, 5 μ m, Grace)이었고 detector는 RI detector를 사용하였다. 이동상은 water와 acetonitrile 7:3(v/v) 비율로 혼합하여 사용하였으면 flow rate는 0.6 mL/min 이었다. 표준물질은 fructose, glucose, sucrose와 maltose(Sigma Co.)를 사용하였다.

(3) 알코올 분석

현미 농축액은 10배 희석하고 각 공정별 샘플은 원액을 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 HPLC(high performance liquid chromatograph, Agilent Technologies 1200series, USA)로 분석하였다.

알코올 분석용 column은 Rezex ROA-Organic Acid H+ Column(300 \times 7.8 mm, 8 μ m, phenomenex)을 사용하였으며, detector는 RI detector를 이용하여 검출하였다. 이동상은 water를 사용하였으며 flow rate는 0.7 mL/min, column 온도는 60°C 이었다.

(4) 유기산 분석

현미 농축액은 10배 희석하고 각 공정별 샘플은 원액을 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 HPLC(high performance liquid chromatograph, Agilent Technologies 1200series, USA)로 분석하였다.

유기산 분석용 column은 Rezex ROA-Organic Acid H+ Column(300 × 7.8 mm, 8 μm, phenomenex)을 사용하였으며, detector는 VW detector를 이용하여 210 nm에서 검출하였다. 이동상은 0.005N H₂SO₄을 사용하였으며 flow rate는 0.5 mL/min, column 온도는 55℃ 이었다. 표준물질은 oxalic acid, citric acid, malic acid, succinic acid, lactic acid, acetic acid(Sigma Co.)를 사용하였다.

(5) 미네랄 분석

미네랄 함량은 습식 분해법에 의해서, 시료 1g에 질산 8mL을 넣고 Microwave digestion system 을 사용하여 시료를 전처리 및 분해하였다. 이 시료 용액으로 하여 inductively coupled plasma(ICP) optical emission spectrometers(Gennessis-FEEA, AMETEK)를 이용하여 Plasma power 1400(W), Coolant Flow 12.00 L/min, Auxiliary Flow 1.00 L/min와 Nebulizer Flow 1.00 L/min의 조건으로 분석하였다.

(6) 맛테스터 분석

맛테스터 분석은 전자혀(Taste Sensing System TS-5000Z, Insent Inc.)를 사용하여 신맛, 쓴맛, 떫은맛, 쓴맛의 후미, 떫은맛의 후미, 감칠맛, 감칠맛의 후미, 짠맛을 확인하였다.

2. 연구결과

우리나라에 막걸리가 전래된 경위나 기원은 확실치 않으나 고삼국사기에 고구려 동명성왕의 건국 신화에 술이 등장하는 사실로 미루어 이미 삼국시대에 탁주를 비롯한 여러 가지 술에 관한 제조법이 있었던 것으로 추측되고 있다.

막걸리는 탄수화물 성분인 전분질이 누룩과 같은 미생물에 의해서 분해되어 알코올 및 당 성분 등 여러 가지 생성된 성분들에 의해 발효과정을 거쳐 만들어지는 술로서, 감미, 산미, 고미, 신미, 삼미의 다섯 가지 맛과 알코올이 어우러져 특유의 맛을 낸다. 이는 미생물에 의해 발효 과정 중 생성되는 알코올 함량, 당도, 유기산 함량이 맛을 결정하게 된다. 영양학적 측면에서 막걸리는 단백질, 비타민 B 복합체, inositol 그리고 cholone 등의 영양성분이 있으며 산미를 주는 유기산은 갈증을 멎게 하고 신진대사를 원활히 하며, 발효 과정 중 발생하는 탄산가스는 청량감을 준다. 또한 다른 주류에 비해 인체에 유용한 효모, 유산균 등 다양한 생균이 포함되어 있다.

막걸리는 암세포 성장을 억제하는 효과를 보이는데 Shin 등(2010)은 막걸리 농축물이 간암세포, 피부암세포, 대장암세포, 유방암세포에 처리하여 암세포 성장억제 및 Quinone reductase 활성 증가 효과 연구를 수행 결과, 각 암세포에서 성장 억제 효과를 보였으며, 암세포 성장을 저지하는 물질도 존재하는 것을 보고하였다.

식초는 가장 대표적인 발효식품으로 일반적으로 식품의 조미용으로 이용되었으나 최근 식초의 건강에 대한 효능 및 효과가 과학적으로 규명됨에 따라서, 식초의 사용과 판매가 늘고 있으며 소비자의 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라서 식초 생산량과 판매량도 늘고 있다.

식초의 효능 효과로는 피로회복, 당뇨병, 비만 방지, 혈압상승방지, 노화방지, 혈중 알코올 농도 상승 지연, 항종양효과 등이 있다. 이러한 소비패턴에 따라 식초 고유의 조미 기능의 음료, 소스류, 스낵류에도 시장이 확대되고 있다.

건강 기능성이 우수한 전통주인 막걸리를 이용해 전통적인 발효법인 정치(초산)발효법과 대량생산에 적합한 심부(초산) 발효법을 접목한 3단 발효 막걸리식초 공정 표준화 확립과 개발을 통해 막걸리(전통주)에 대한 소비증대 및 시장 확대뿐만 아니라, 소비자들에게 주정 발효식초가 아닌 원물 발효 식초를 제공할 수 있으며 고품질의 식초를 제공할 수 있을 것이다.

가. 정치(초산)발효 배양조건 확립

본 연구진은 1 차년도 수행과제의 3단 발효식초의 과학적 규명 및 표준화를 바탕으로 우리나라 전통주인 막걸리를 사용하여 막걸리 식초를 제조 개발함에 있어서 필요한 배양 조건 표준화 연구를 수행하였다.

(1) GK 함량별에 따른 배양 조건 확립

전통주인 막걸리를 사용하여 막걸리 식초를 제조 개발함에 있어서 필요한 배양 조건 표준화를 위해 연구를 수행하였다.

산도 조절은 당사에서 보유하고 있는 중초를 사용하였으며 알코올 조절은 여과된 막걸리 원주를 사용하였다. 사용한 균주는 당사에서 제조되고 있는 감식초의 초산균막을 이용하였으며, 배양온도는 3단 발효 공정별 표준화에 따라 35℃에서 수행하였다. 알코올 농도는 3% ~ 7% 사이에서 실험을 수행하였다.

막걸리식초 제조를 위한 정치(초산)발효의 최적 조건을 알아본 결과, 산도 3%, 알코올 3%에서 산생성이 효과적이었다.(Fig. 13.) 알코올 함량이 7%인 경우, 정치(초산)발효가 진행되지 않음을 확인할 수 있었다.

GK별 균 생육수 분석 결과, 산성성물과 같이 산도 3%, 알코올 3%에서 가장 높은 생육수를 보였으며, 120시간(5일차)에서 가장 높은 생육수를 나타냈다.(Table. 6) 이결과를 토대로 정치(초산)발효 배양 조건은 산도 3%, 알코올 3%의 배지에 당사가 보유하고 있는 초산균막을 이용하여 35℃ 배양온도 조건에서 5일간 정치(초산) 발효를 진행하여, 막걸리식초의 제조 및 영양학적 유효성분 분석에 활용하고자 한다.

GK별 균 생육수와 산 생성률을 확인해 본 결과, 1차년도의 산도 3%, 알코올 5% 배지에서 산 생성율이 가장 높았던 결과와는 다른 결과가 나타났다. 이는 원료의 차이로, 효소 분해를 통한 단당류 함량이 높은 현미농축액 제조하여 정치(초산)발효에 사용한 알코올발효액과 막걸리 원주의 영양학적 차이에서 오는 결과인 것으로 사료된다.

Jeong 등(1996)의 보고에 의하면 식초 제조 시 초기산도가 증가할수록 초산발효의 유도기가 길어지므로 초기산도를 3% 이하로 조절하는 것이 적당하다고 하였으며, 초기산도 0.5 ~ 1%에서는 산막유해균의 오염으로 초산발효가 잘 진행되지 않았다고 보고된바 있다.

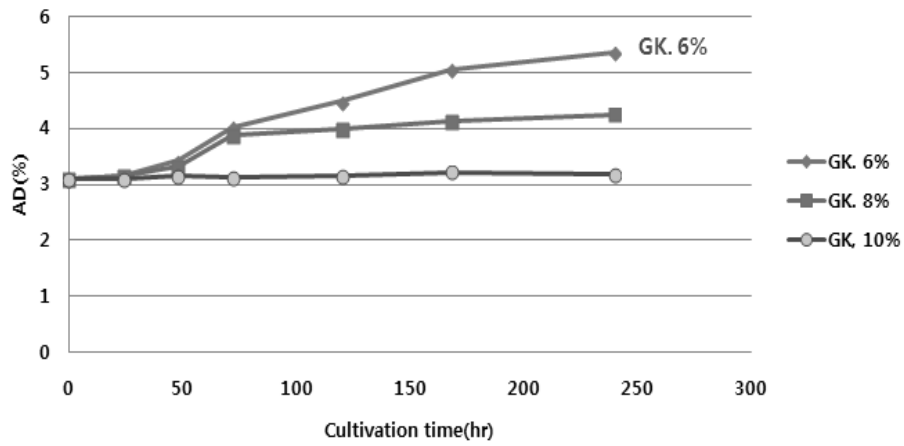
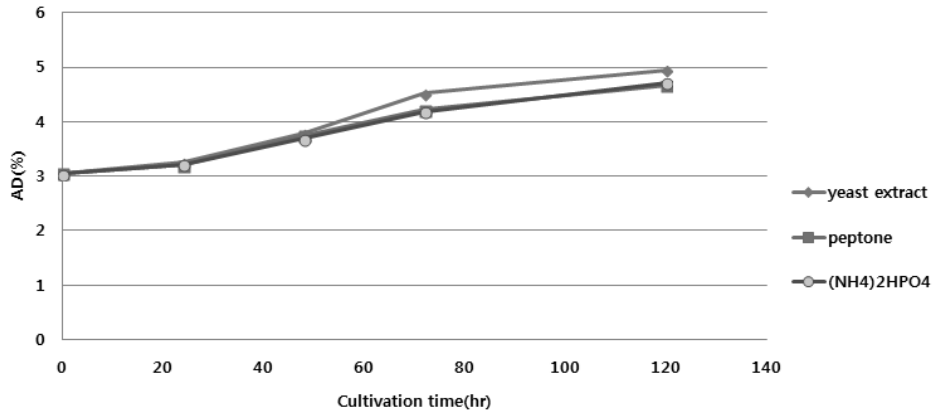


Fig. 13. GK(산도와 알코올 혼합비율)별 막걸리식초의 산 생성 수율

(2) 발효 영양원에 따른 배양 조건 확립

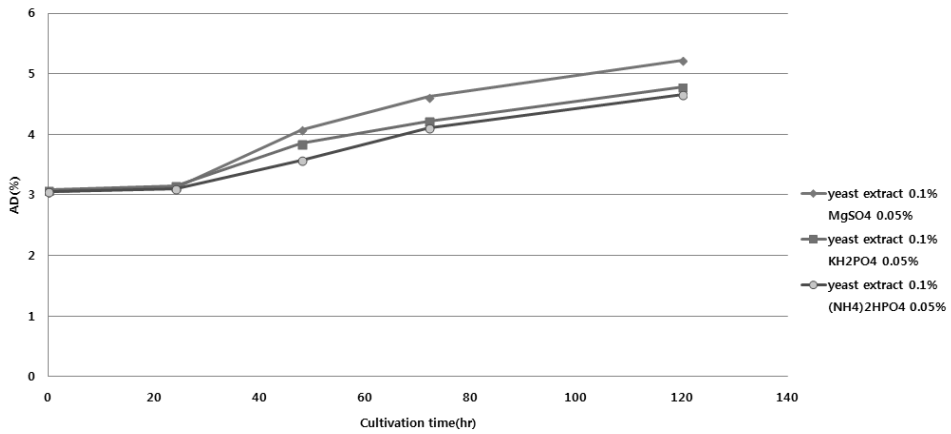
식초 발효에 사용되는 배지는 초산균 증식 즉, 세포물질의 합성과 대사산물 생성에 필요한 영양성분을 함유하여야 한다. 기 확립된 발효 배양액의 조건에 있어서 발효 영양원의 변화가 산생성에 미치는 효과를 검토하였다.

질소원의 경우 yeast extract, peptone, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 을 각각 0.1%씩 첨가하여 산생성 효과를 확인한 결과, yeast extract가 산생성이 가장 높게 나타났다. Yeast extract를 각각 0.05%, 0.1%와 0.15%를 첨가하여 산생성율을 분석해 본 결과, 0.1% 농도에서 가장 높게 나타났다. 또 무기염류로서 KH_2PO_4 , MgSO_4 와 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 0.05%씩 첨가하여 산생성율을 분석해 본 결과 MgSO_4 0.05%에서 산생성이 가장 높게 나타났다.(Fig. 14~15)



Time (hr)	yeast extract	peptone	(NH4)2HPO4
0	3.05	3.05	3.05
24	3.25	3.2	3.22
48	3.78	3.75	3.70
72	4.52	4.22	4.19
120	4.95	4.66	4.72

Fig. 14 발효영양원 질소원별 막걸리식초의 산 생성 수율



Time (hr)	yeast extract 0.1% MgSO4 0.05%	yeast extract 0.1% KH2PO4 0.05%	yeast extract 0.1% (NH4)2HPO4 0.05%
0	3.05	3.08	3.05
24	3.11	3.15	3.10
48	4.08	3.85	3.58
72	4.62	4.22	4.10
120	5.22	4.78	4.65

Fig. 15 발효영양원 함량별 막걸리식초의 산 생성 수율

나. 심부(초산)발효 배양조건 확립

1차년도 배양 조건과 동일하며, 발효탑을 사용하는 방법보다도 더욱 산화효율을 높이기 위하여, 원료액(알코올 발효액)과 초산균의 혼합물에 공기를 송압하여 강하게 교반하면서 액내전면에서 급속히 초산으로 산화시키는 방법으로서 당사에서 다년간 연구하여 적용하고 있는 배양 조건을 적용하여 막걸리 식초를 제조하였다.

다. 발효 공정별 품질 인자 분석

(1) 막걸리 성분 분석

막걸리는 찹쌀, 멥쌀, 보리쌀, 현미, 옥수수, 고구마, 밀등의 전분질을 원료로 하고 발효제로서 누룩을 첨가하여 병행 복발효시켜 술덧을 혼탁하게 제성한 우리나라 고유의 전통주이다. 이러한 막걸리는 단백질, 당질, 식이섬유, 비타민, 유기산 외에도 많은 양의 젖산균이 함유되어 있어 영양적 가치가 높고 생 효모가 함유되어 있기 때문에 일반 주류와는 차별화된 독특한 풍미를 가진다.

막걸리의 영양학적 유효성분 분석을 통해 3단 발효 공정 중 건강기능적 유효성분의 변화를 확인하고자 하였으며, 기본 이화학 및 유리아미노산과 미네랄을 분석하였다. 분석 결과는 Table 6과 같다. 유기산은 lactic acid만 존재하였고, 미네랄은 K의 함량이 가장 높았다. 유리아미노산 proline, arginine과 alanine순으로 나타났다.

Park 등(2011)은 8종의 시판막걸리의 적정 산도를 0.28~0.57%라 보고하였는데 본 실험에서도 유사한 결과를 보였다. 적정산도는 막걸리의 풍미와 보존성에 영향을 주는 중요한 성분으로 (Lee and Lee, 2000) 본 실험에서 사용된 막걸리 원주는 식품공전 상 탁주의 적정 산도 0.5% 이하로 나타나 적정한 수준을 보였다.

Kim 등(1968)은 아미노산은 막걸리에 담백한 맛을 부여하는 성분으로 지나치게 많이 생성될 경우 술의 술덧이 노주화된 것처럼 느끼한 맛을 부여해 주질을 하락시킨다고 보고하였다.

Table 6. 막걸리 원주의 이화학 분석 결과

항 목		막걸리 원주
p H		3.71
산도(%)		0.3
BX		6.4
유기산(%)	oxalic acid	-
	citric acid	-
	malic acid	-
	succinic acid	-
	lactic acid	0.16
	acetic acid	-
	합계	0.16
미네랄 (mg/100g)	Mg	2.93
	Na	2.08
	Fe	0.16
	Ca	3.25
	K	5.29
	Zn	0.04
	합 계	13.75
유리아미노산 (mg/100g)	Threonine	2.63
	Cystine	1.06
	Tyrosine	5.72
	Arginine	19.88
	Alanine	18.18
	Proline	65.94
	Lysine	7.04
	Histidine	7.54
	Isoleucine	2.76
	Leucine	12.16
	Methionine	2.74
	Phenylalanine	7.37
	Tryptophan	1.52
	Valine	3.99
	Glutamic acid	14.62
	Asparaginic acid	5.05
	Serine	3.92
	Glycine	3.4
	합 계	185.52

(2) 정치(초산) 발효 과정 중 성분 변화

정치(초산) 발효는 당사에서 보유하고 있는 종초와 막걸리 원주를 이용하여 산도 3%에 막걸리 3%, 5%, 7%가 되도록 혼합, 35℃에서 당사의 감식초 초산균막을 접종하여 실험을 수행하였다.

막걸리 식초의 표준화를 위해, GK별 일정간격으로 시료를 채취하여 균생육 수준, 잔여 알코올, 산도, pH, Brix, 유기산, 유리당을 분석하였다.(Table 7) 분석 결과 GK6%에서 5일간 발효 시 산생성 수율, 균 생육수와 유기산이 다른 배양 조건과 비교해 가장 높게 나타났다. 정치(초산) 발효의 초산균의 cell mass 확보는 식초에서 가장 중요한 산생성 수율에 큰 영향을 미치므로 산생성율과 균생육수가 가장 높은 GK 6%를 막걸리 식초 제조 정치(초산)발효의 최적 배양 조건이라 할 수 있다.

유리당, 미네랄과 유리아미노산은 발효가 진행될수록 증가한 후에 감소는 추세를 보였으며, 산도 3%, 알코올 3%의 배양조건에서 산도 3%, 알코올 5%의 배양 조건에 비해 감소율이 낮은 결과를 보였다. 이는 발효 중 영양분의 손실이 더 낮다고 판단할 수 있다.

Table 7. 정치(초산)발효 기간별 성분 분석 변화

항목	GK 6%			GK 8%			GK 10%		
	정치 발효 (1day)	정치 발효 (3day)	정치 발효 (5day)	정치 발효 (1day)	정치 발효 (3day)	정치 발효 (5day)	정치 발효 (1day)	정치 발효 (3day)	정치 발효 (5day)
p H	2.86	2.86	2.78	2.95	3.04	2.88	3.09	3.17	3.10
Bx	4.2	4.15	4.0	5.5	5.4	5.3	9.7	8.7	7.6
산도	3.11	4.72	5.20	3.14	4.12	4.73	3.10	3.12	3.15
OD(660nm)	0.031	0.128	0.169	0.028	0.095	0.115	0.038	0.012	0.011
알코올(%)	3.39	1.25	1.09	5.34	4.05	2.18	8.32	8.13	8.00
유기산 (%)	oxalic acid	-	-	-	-	-	-	-	-
	citric acid	-	-	-	-	-	-	-	-
	malic acid	-	-	-	-	-	-	-	-
	succinic acid	-	-	-	-	-	-	-	-
	lactic acid	0.24	0.30	0.38	0.34	0.50	0.38	0.65	0.63
	acetic acid	3.10	4.63	4.95	3.12	3.83	4.28	3.08	3.21
	합계	3.34	4.93	5.33	3.46	4.33	4.66	3.73	3.84
유리당 (%)	Fructose	-	-	-	-	-	-	-	-
	Glucose	0.59	0.91	0.59	0.84	1.35	0.74	1.26	1.11
	Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-
	Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-
	합계	0.59	0.91	0.59	0.84	1.35	0.74	1.26	1.11
미네랄 (mg/100g)	Mg	6.72	7.12	7.14	7.84	8.5	7.75	8.25	9.65
	Na	3.10	3.95	3.58	3.36	3.61	3.58	5.28	5.53
	Fe	0.22	0.22	0.23	0.23	0.21	0.21	0.24	0.23
	Ca	3.06	3.43	3.2	3.53	4.51	4.34	3.97	5.14
	K	15.10	17.09	16.67	20.73	27.61	19.07	20.64	30.04
	Zn	0.10	0.36	0.15	0.13	0.2	0.15	0.21	0.29
	합계	28.30	32.17	30.97	35.82	44.64	35.1	38.59	50.88
아미노산 (mg/100g)	Threonine	2.78	3.18	3.24	3.76	5.2	4.28	3.82	6.74
	Cystine	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tyrosine	5.56	7.4	6.43	8.21	12.82	8.13	8.18	15.38
	Arginine	13.76	18.41	15.92	21.02	32.05	22.46	21.81	39.44
	Alanine	10.25	10.98	10.43	14.5	19.38	13.49	14.49	24.1
	Proline	7.25	11.46	7.09	11.22	19.29	16.03	22.9	18.29
	Lysine	8.54	12.68	10.36	12.4	21.19	13.06	11.84	24.13
	Histidine	4.59	6.18	5.62	6.88	10.38	6.62	6.67	12.66
	Isoleucine	3.43	3.9	3.72	4.55	6.32	4.72	4.22	7.27
	Leucine	8.39	10.73	9.08	11.79	18.77	12.24	11.52	21.9
	Methionine	2.1	2.71	2.19	3.09	4.9	3.11	3.08	5.75
	Phenylalanine	5.95	7.48	6.4	8.36	12.89	8.77	8.13	15.06
	Tryptophan	1.15	-	-	1.7	0.49	0.46	1.74	2.16
	Valine	4.6	5.38	5.33	6.31	8.81	7	6.02	10.26
	Glutamic acid	11.47	13.52	11.23	17.1	25.08	16.17	17.45	32.26
	Asparaginic acid	4.22	4.98	4.58	5.73	8.58	5.69	5.74	9.97
	Serine	3.45	3.88	3.63	4.70	6.47	4.90	4.55	7.75
Glycine	3.91	4.38	4.3	5.70	7.78	6.07	5.82	9.67	
합계	101.4	127.25	109.55	147.02	220.4	153.2	157.98	262.79	

(3) 심부(초산)발효 과정 중 성분변화

5일간 발효한 정치(초산)발효액을 이용해 심부(초산)발효를 진행하여 막걸리 식초를 제조 하였다. 정치(초산)발효액의 초기 초산균 활성이 이루어질 때까지 약 72시간이 필요했으며, 총 발효 시간은 약 240시간이었다. 결과는 Fig. 16과 같다.

유기산과 유리아미노산의 경우 발효가 진행될수록 증가하였으며, 유기산 중 acetic acid의 함량이 주를 이루었으며 막걸리에서 유래한 것으로 보이는 lactic acid도 분석되었다.

미네랄은 Mg이 가장 높게 분석되었으며, 정치 발효와 비교해 미네랄 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 아미노산은 영양학적 가치뿐 아니라, 식초의 향, 맛에 기여하는 중요한 요소로, glutamic acid, arginine와 proline이 가장 많이 검출되었다. glutamic acid 두뇌의 기능을 억제하는 불필요한 암모니아와 결합해서 몸에 유익한 아미노산인 글루타민으로 변환하는 역할을 하며 아르기닌은 일산화질소 생성을 늘려 운동 중인 근육으로 혈류량을 늘리고 근육에 영양분과 호르몬, 산소를 더 많이 공급함으로써 근육회복을 돕는 효능이 있다고 연구결과가 있다.

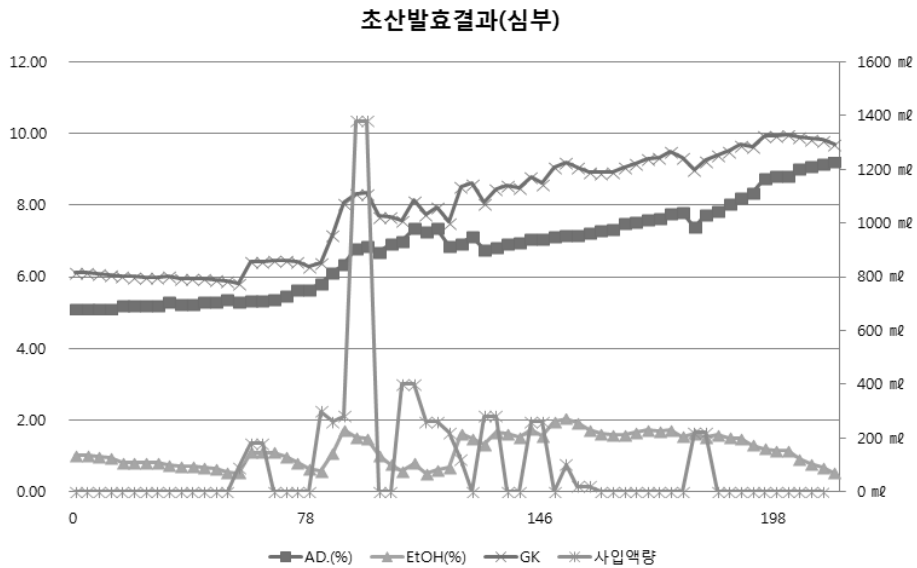


Fig. 16. 막걸리 식초의 심부(초산)발효 결과

Table 8. 심부(초산)발효 막걸리 식초 이화학 분석 결과

항 목		심부(초산)발효
p H		2.71
산도(%)		9.20
BX		6.20
유기산(%)	oxalic acid	-
	citric acid	-
	malic acid	-
	succinic acid	-
	lactic acid	0.36
	acetic acid	9.23
	합계	9.59
미네랄 (mg/100g)	Mg	3.66
	Na	2.52
	Fe	0.21
	Ca	3.6
	K	3.15
	Zn	0.06
	합 계	13.2
유리아미노산 (mg/100g)	Threonine	3.14
	Cystine	1.86
	Tyrosine	6.09
	Arginine	15.80
	Alanine	12.18
	Proline	14.11
	Lysine	7.57
	Histidine	8.67
	Isoleucine	3.14
	Leucine	11.51
	Methionine	2.44
	Phenylalanine	7.96
	Tryptophan	-
	Valine	4.76
	Glutamic acid	17.46
	Asparaginic acid	4.7
	Serine	4.54
	Glycine	3.12
합 계	129.05	

(4) 막걸리 식초 공정 표준화

이상의 연구 결과를 바탕으로 막걸리 식초의 3단 발효시 공정별 주요 관리사항을 선정하였다.

첫째로, 정치(초산)발효 단계는 초기 초산균의 안정적인 생육 조건을 확보하기 위한 중요한 단계이다. 배지의 함량별 산생성율과 생육수를 확인해 본 결과, 35℃ 온도조건에서 산도 3%, 알코올 3%의 배지 조성에서 산생성율과 생육수가 가장 높았다. 정치(초산)발효는 심부(초산)발효를 위한 초기 단계로 산 생성에 필요한 cell mass 확보는 고품질의 식초 생산에 있어서 전체적으로 중요한 역할을 한다. 발효기간별 초산균 생육 수준을 확인한 결과, 정치(초산)발효 5일에 생육수가 가장 활발하여 심부(초산)발효에 적합한 정치(초산)발효 기간은 5일로 선정하였다.

둘째로, 정치(초산)발효 단계에 발효영양원의 함량은 식초의 생산에 있어서 중요한 요소인 산생성 수율에 긍정적인 효과를 나타냄을 확인하였다. 그결과, 질소원으로 yeast extract 0.1%, 무기염류 $MgSO_4$ 0.05%가 산생성율이 높아 초산 발효가 잘 진행되어 정치(초산)발효시 산도 3%, 알코올 3%에 발효영양원으로 yeast extract 0.1%와 $MgSO_4$ 0.05%를 첨가하여 배지를 조성하였다.

셋째로, 심부(초산)발효 단계는 다년간 발효식초를 제조해온 당사의 발효 기술력이 확보되어 있어, 온도 31℃, 통기량 0.15vvm, 교반속도 400rpm의 관리 조건 뿐만 아니라 잔존알코올이 0.5% ~ 2% 범위 사이에 막걸리 원주를 투입하도록 하는 것을 CCP(critical control point)로 설정하였다.

라. 3단 발효법을 이용한 막걸리 식초 개발

(1) 막걸리 식초 제작

위의 표준화된 공정을 토대로 시중에 유통되고 있는 막걸리 식초의 산도를 기준으로 막걸리 식초 시제품을 제조하였다. 막걸리 식초의 시제품 사진은 Fig. 17과 같다.



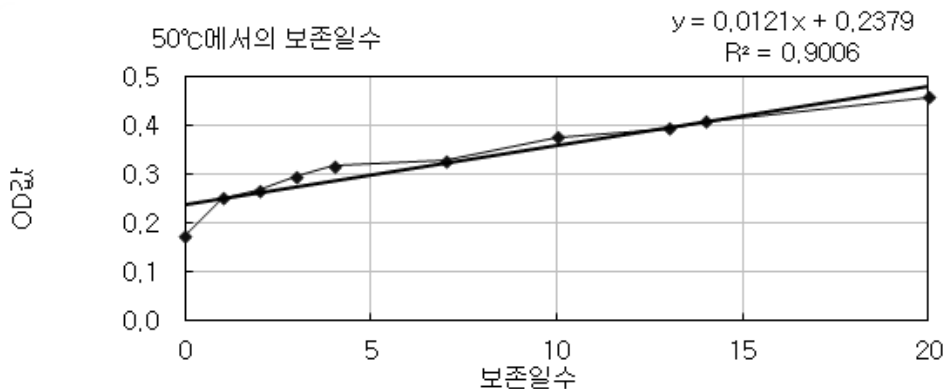
Fig. 17. 3단 발효 막걸리 식초 시제품

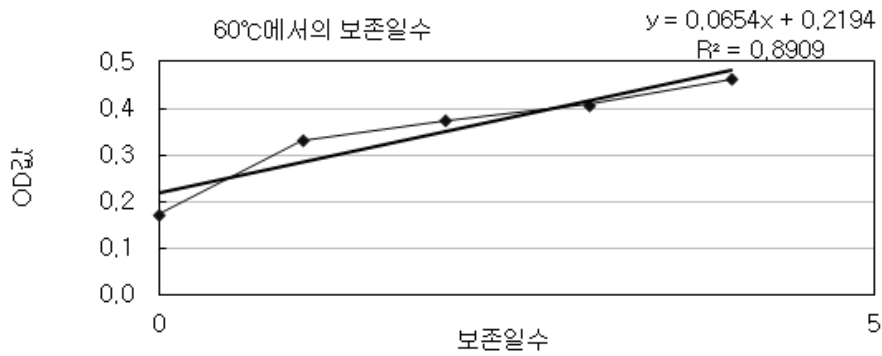
(2) 유통기한 설정 실험

3단 발효 막걸리 식초를 제조한 직후 50℃와 60℃ 항온기에서 제품을 25일간 보관하여 실험을 진행하였다. 시간의 변화에 따른 관능 특성은 패널 10명을 대상으로 관능검사를 진행하여 상품적 가치를 가진 관능 수준을 확인하였으며, 이화학적 특성인 제품의 생산은 UV Spectrophotometer 420nm에서 측정하였다. 품질의 한계는 제품 고유의 관능이 유지되며 색도 변화 등 품질에 영향이 없는 것을 한계로 하였다. 가속테스트 중 모든 실험군에서 50℃ 20일부터, 60℃ 4일부터 색도 변화가 나타났다. 이 같은 결과를 바탕으로 막걸리 식초의 시제품의 유통기한을 36개월로 설정하였다. 3단 발효 막걸리식초 시제품의 유통기한 설정 기준은 Table 9.와 같다. 기존 당사의 정통현미식초의 유통기한은 36개월이며, 3단 발효 막걸리식초의 시제품의 유통기한도 기존의 당사의 정통 발효식초의 유통기한과 비슷한 경향으로 측정되었다.

Table 9. 막걸리식초 유통기한 설정 분석 결과

항 목		UV값	관능	항 목		UV값	관능	비 고
보존 온도	보존 일수			보존 온도	보존 일수			
STD	0	0.174	○	STD	0	0.174	○	채취한 검체를 420nm에서 측정
50℃	1	0.252	○	60℃	1	0.332	○	
	2	0.268	○		2	0.374	○	
	3	0.297	○		3	0.408	○	
	4	0.317	○		4	0.493	X	
	7	0.328	○					
	10	0.376	○					
	13	0.395	○					
	14	0.408	○					
	20	0.458	○					





위의 결과로 품질과 보존기간과는 어느 정도 비례관계를 가지므로 비효소적 갈변반응을 주로 하는 0차 반응이라고 할 수 있으며 약간의 1차 반응적 성질을 띤다고 할 수 있다.

(가) 0차 반응 계산 시

- ① 저장기간과 품질관계는 비례관계이므로 보존일수로 계산
 50°C 에서 보존일수 : 20일
 60°C 에서 보존일수 : 4일
- ② $Q_{10} \text{Value} = 50^\circ\text{C}$ 에서 보존일수 / 60°C 에서 보존일수
 $Q_{10} = 5$
- ③ 상온(25°C)에서의 보존일수
 $= 60^\circ\text{C}$ 에서 보존일수 $\times Q_{10}^{[r=(60-25)/10]}$
 $= 1118.033989$ (약 37.27개월)

(나) 1차 반응으로 간주 시

- ① D-Value : $\log(N_0/N_m) = (T_m - T_0)/D_T$
 $D_{50} = -47.58$
 $D_{60} = -9.41$
- ② Z-Value : $\log(D_{50}/D_{60}) = (60-50)/Z$
 $Z = 14.21$
- ③ $Q_{10} \text{Value} = 10^{10/Z} = 5.0561$
- ④ 음용 UV 한계치는 = 0.493
- ⑤ 50°C 보존 실험 상에서 상온(25°C) 보존일수
 $= 50^\circ\text{C}$ 보존일수 $\times Q_{10}^{[r=\Delta T/10 = (50-25)/10]}$
 $= 1149.656294$ (약 38.32개월)
- ⑥ 60°C 보존 실험 상에서 상온(25°C) 보존일수
 $= 60^\circ\text{C}$ 보존일수 $\times Q_{10}^{[r=(60-25)/10]}$
 $= 1162.554248$ (약 38.75개월)

(다) 위의 결과에 따라 유통기한을 36개월로 설정할 수 있음.

(3) 3안전성 실험

안전성에 대한 실험은 식품유형 중 발효식초의 규격을 기준으로 3단 발효 막걸리 식초 시제품의 안전성을 확인하였다. 발효식초의 경우, 안전성에 관한 이화학규격으로는 타르색소, 초산균, 보존료, 클로스트리디움퍼프리젠스에 대한 규격이 있다. 유통기한 설정 실험 중 샘플링을 하여 타르색소, 보존료, 클로스트리디움 퍼프리젠스를 분석한 결과, 모든 규격에서 적한 한 것으로 나타났다. 분석 결과는 Table 10과 같으며, 3단 막걸리 발효식초의 완제품 규격서는 표 10과 같다.

Table 10. 3단 발효 막걸리 식초의 안전성 실험 결과

항목	규격	0일	3일	7일	13일	20일
타르색소	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
초산균	음성	음성	음성	음성	음성	음성
보존료	0.1이하(g/kg) (파라옥시안식향산으로서)	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
클로스트리디움 퍼프리젠스	1g당 100이하(CFU/mL)	10이하	10이하	10이하	10이하	10이하

Table 11. 3단 발효 막걸리 식초의 완제품 규격서

대 상 주식회사	완제품검사규격				
	막걸리식초(가칭)				
<p>1. 적용범위 이 규격은 당사의 제품인 정통 양조식초에 대하여 규정한다</p> <p>2. 제품설명 막걸리 식초라 함은 막걸리로 초산발효한 액을 말한다. [식품유형 : 발효식초]</p> <p>3. 제품규격기준</p>					
항 목	규 격	검사 방식	조건	시험 및 검사방법	검사주기
성상	고유의 색택과 향미를 가지고 이미, 이취가 없 어야 한다	체크 검사	N=1	식품공전 시험방법에 따른다	1회/일
총산(%)	5.0 ~ 5.5				
Brix	3.5 ~ 4.5				
타르색소	불검출				1회/월
초산균	음성이어야 한다.				
보존료(g / l)	0.1이하 (파라옥시안식향산으로 서)				
클로스트리디움 퍼프린젠스	1g당 100이하				
<p>※ 상기 규격항목 외 식품일반에 대한 공통기준 및 규격항목의 경우 필요시 검사 실시</p> <p>5. 포장 및 포장단위 품목제조보고사항 포장단위에 적합하도록 제품의 충전온도(50~55℃)를 조절하여 포장한다. - 식품위생법 표시사항(제품명, 내용량, 업소명 및 소재지, 유통기한, 영업허가번호, 원 료명, 포장재질 등)이 올바르게 표시되어져 있어야 한다.</p> <p>6. 보관 및 보존기간 - 사용 후 캡을 닫아 건조하고 서늘한 곳에 보관 시 36개월</p>					

마. 3단 발효 막걸리 식초와 시중에 시판되는 막걸리 식초와의 관능 및 영양학적 비교

소비자들에게 일정한 품질의 제품을 제공하고자 3단 발효 막걸리 식초의 공정 표준화뿐만 아니라, 시중에 유통되고 있는 막걸리식초와의 영양학적 품질 지표 및 관능 분석을 진행하였다. 시중에 유통되고 있는 막걸리식초는 1개사 제품뿐이며, 전통발효법을 이용하여 제조하는 것으로 판단된다. 전통발효법인 정치(초산)발효 향미가 풍부하고 다양한 유기산, 아미노산 등을 함유하고 있다는 장점이 있는 반면, 병행복발효 방식으로 진행되기 때문에 발효과정 중 장시간에 걸쳐 다양한 미생물이 관여하게 되는데 이들에 대한 미생물학적으로 특성이 파악되지 않은 상태에서 진행되기 때문에 생산량 확대가 쉽지 않다. 또한 발효를 자연환경과 경험에 의지하기 때문에 환경변화와 오염에 따른 위험 및 품질의 균일성 유지에 애로가 있으며 전통발효식초의 발효원으로 누룩을 사용하는 경우 여러 종류의 미생물의 생육하므로 불필요한 미생물의 증식에 의해 제품의 균일성을 유지하기 어렵다는 문제가 있다. 이렇듯 시중에 유통되고 있는 막걸리 식초와 3단 발효 막걸리 식초의 영양학적 비교를 통해 유효성분을 확인하고자 하였다.

(1) 관능 비교 분석

관능검사와 기기적인 방법을 통해 맛을 비교했다. 관능검사는 34명의 훈련된 소비자 패널이 평가를 진행하였다. 그 결과는 Table 12와 같다.

관능 결과에서 볼 수 있듯이 시판막걸리식초와 3단 발효 막걸리식초의 관능에는 유의적으로 차이가 없는 것으로 나타났다.

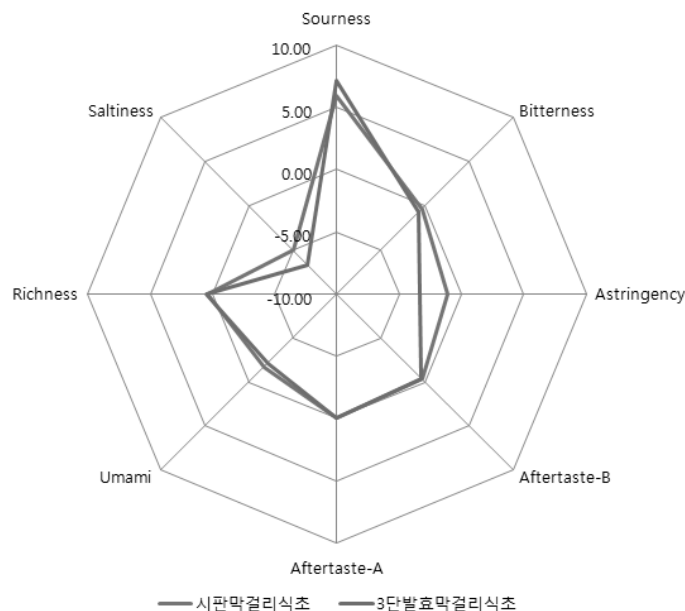
Table 12. 식초의 관능 검사 결과

제품	전체적 기호도	선호도	기호도 (점수가 높을수록 좋음)			적당도 ²⁾ (4점에 가까울수록 좋음)		
			외관	향	맛	색상	신맛	단맛
			3단 발효 막걸리 식초	4.2 (60점)	53% (18명)	4.5	-	4.2
시판 막걸리 식초	3.8 (54점)	32% (11명)	4.4	-	3.8	4.1 [4=적당]	4.6 [4<강함]	4.0 [4=적당]
유의수준 $\alpha = 0.05$ 기준	0.127 차이없음	0.199 차이없음	0.883 차이없음		0.116 차이없음	0.097 차이없음	0.054 차이없음	0.728 차이없음

- ▶ 선호도1) : 선호하는 시료가 없다고 응답한 비율은 7%
- ▶ 적당도2) : 각 속성이 적당한 정도에 해당되면 [4=적당]으로 표시, 그러나 평균이 4.0보다 유의적($\alpha = 0.05$)으로 크면 [4<강함], 작으면 [4>약함]으로 표시함.
- ▶ 유의수준 0.05에서 유의한 차이가 있음을 나타내는 표시: *

맛에 대한 좀 더 객관적인 결과를 위해 향을 인지하는 사람의 코처럼 복잡한 맛을 감지 할 수 있는 맛테스터기를 이용하여 맛의 속성에 대한 비교를 하고자 하였다. 맛테스터기는 혀에서 느껴지는 맛을 수치화 할 수 있는 장치로 총 8가지 속성, 신맛, 쓴맛, 떫은맛, 쓴맛의 후미, 떫은맛의 후미, 감칠맛, 감칠맛으로부터 오는 후미, 짠맛에 대한 것을 수치로 보여준다. 분석 결과는 Fig. 17과 같았다.

맛테스터기 측정결과 값의 차이가 1이상이 나면 관능적으로 유의적으로 차이가 있다고 할 수 있는데, 분석결과 신맛, 떫은맛, 짠맛에서 1이상의 값의 차이를 보였다. 이는 떫은 맛은 뒷맛에서 오는 전체 적인 바디감에 영향을 줄 것으로 보이며, 신맛과 떫은맛은 전체 향, 맛(향미)에 영향을 줄 것으로 생각된다. 짠맛의 차이는 시중에 판매되고 있는 막걸리 식초의 경우 토판염의 첨가에 따른 결과라고 할 수 있을 것이다.



* Sourness 신맛, Bitterness 쓴맛, Astringency 떫은맛, ,Aftertaste-B 쓴맛의 후미, Aftertaste-A 떫은맛의 후미, Umami 감칠맛, Richness 감칠맛으로부터 오는 후미, Saltiness 짠맛

Fig. 17 시판막걸리식초와 3단발효 막걸리식초의 맛테스터 분석 결과

(2) 영양학적 비교 분석

시중에 시판되는 막걸리식초와 3단 발효법으로 제조한 막걸리식초의 영양학적 차이가 있는지 확인하고자 하였다. 유기산, 미네랄, 유리아미노산을 분석하였으며, 결과는 Table 13과 같았다.

유기산 분석결과, 3단 발효 막걸리 식초는 5.56%, 시판막걸리식초는 5.86%로 유사한 결과를 보였다. 유기산의 성분 중 초산의 함량이 가장 높았다.

미네랄 분석 결과, 시판 막걸리 식초의 총 미네랄 함량이 높았으며 3단 발효 막걸리식초에서는 K, Ca, Na 순으로 검출되었으며, 시판막걸리식초는 Na, K, Mg 순으로 검출되었다. 시판 막걸리 식초의 경우, 3단 발효 막걸리식초와 달리 쌀발효당화액과 토판염을 첨가하여 K과 Na가

검출된 것으로 보인다. 이렇듯 식초에 추가되는 원료에 따라 미네랄이 달라 질 수 있음을 알 수 있었다. 또한 이들의 원료는 발효식초에서 오는 발효취를 마스킹하기 위해 관능 개선을 목적으로 쌀발효당화액과 토포늄을 첨가한 것으로 보인다.

아미노산은 3단 발효 막걸리식초의 경우, proline, glutamic acid과 arginine순으로 확인되었으며 시판막걸리식초는 alanine, leucine, glutamic acid순으로 확인되었다. 아미노산은 막걸리 원주에 따른 함량의 차이인 것으로 판단된다. 식초의 원료와 발효방법에 따라 그 영양학적 유효성분의 차이가 있을 수 있어 막걸리 원주의 차이에 따른 영양학적 차이가 있을 것으로 판단되며, 추후, 막걸리 원료에 대한 연구 뿐 아니라, 다양한 원물에 대한 연구를 통해 영양학적으로 우수한 원료를 탐색 발굴하여 식초 개발 연구가 필요할 것으로 보인다.

위의 영양학적 분석 결과 발효시간이 오래 걸리는 정치 발효법(약 1~6개월) 대비 3단 발효식초가 빠른 시간(약 21일)에 제조 가능하며 다른 영양학적 성분(아미노산, 미네랄)에는 차이가 없는 3단 발효 식초 제조가 가능함을 알 수 있다.

Table 9. 막걸리 식초의 영양학적 성분 비교

항 목		3단발효 막걸리 식초	시판 막걸리식초
p H		2.76	2.82
산도(%)		5.35	5.48
BX		4.1	3.7
유기산(%)	oxalic acid	-	-
	citric acid	-	-
	malic acid	-	-
	succinic acid	-	-
	lactic acid	0.19	0.23
	acetic acid	5.37	5.62
	합계	5.56	5.85
미네랄 (mg/100g)	Mg	2.54	5.52
	Na	2.68	59.86
	Fe	0.19	0.51
	Ca	3.14	5.07
	K	3.63	36.49
	Zn	0.06	0.21
	합 계	12.24	107.66
유리아미노산 (mg/100g)	Threonine	2.41	5.90
	Cystine	1.46	0.55
	Tyrosine	4.63	5.57
	Arginine	11.91	8.95
	Alanine	9.15	18.11
	Proline	20.97	2.64
	Lysine	5.61	9.47
	Histidine	6.3	2.52
	Isoleucine	2.39	6.35
	Leucine	8.63	12.98
	Methionine	1.97	3.16
	Phenylalanine	6.1	8.60
	Tryptophan	-	-
	Valine	3.68	5.76
	Glutamic acid	13.50	12.49
	Asparaginic acid	3.84	3.88
	Serine	3.39	6.70
Glycine	2.30	5.97	
합 계	108.24	119.6	

3. 고찰

식초는 동·서양을 막론하고 오랜 식용역사를 지니고 전해 내려온 발효식품으로서, 식품의 조리시의 산미료로서 뿐만 아니라, 식품방부제 또는 의약품 등으로 다양하게 이용되어 왔다고 전해지고 있다.

일반적으로 식초의 제조방법은 전통적인 정치배양법과 교반배양법의 속성방법으로 분류될 수 있으며 대부분의 상업적인 생산은 속성제조방법으로 생산되고 있다. 정치발효법은 식초 제조 방법 중 예로부터 사용되어 온 방법으로서 발효기간 동안의 온도, 습도, 공기량 등을 관리 하지 않아 장기간(1~6개월)의 발효기간이 필요하다. 또한, 발효기간 중 자연환경과 경험에 의해 발효가 진행 되므로 제품의 균일한 품질 유지에 어려움이 따른다.

산업적 대량 생산방법인 심부발효법은 빠른 발효 시간, 대량 생산과 일정한 품질을 유지할 수 있는 장점이 있는 반면 원료의 영양소가 파괴 되는 발효 방법으로 알려져 있다. 하여 본 연구를 수행하여 전통발효법인 정치발효를 통해 원료의 영양학적 성분과 풍부한 향을 유지하고 상업적인 생산법인 심부 발효를 통해 일정한 품질을 생산하므로 소비자에게 우수한 품질과 효능을 가진 식초를 제공하고자 하였다.

위의 연구 결과를 토대로 정치 발효법으로 제조한 식초와 비교해 전통발효법인 정치 발효법과 심부 속성발효법을 접목하여 제조한 3단 발효식초가 빠른 시간에 식초가 제조(약 20일)되었으며 영양학적 유효성분 및 풍미에 차이가 없음을 확인하였다. 또한 영양학적으로 우수한 전통주인 막걸리를 이용하여 3단 발효 막걸리를 식초의 공정 표준화를 확립하였고 영양학적 유효성분을 분석하였다.

3단 발효법을 이용한 공정표준화를 통해 소비자들에게 정치(표면)발효의 장점인 영양학적 유효성분을 유지하면서 품질이 균일한 천연발효식초를 대량 제조 할 수 있는 기술을 확보하였으며, 소비자들에게 영양학적, 산업적으로 우수한 건강한 먹거리를 제공할 뿐아니라 국내 식초 시장 확대에 기여할 것으로 보인다.

또한, 최근 일본에서 조미 용도에서 벗어난 식초의 향암, 향돌연변이, 향노화, 면역 등의 기능성 연구가 이루어지고 있다. 기능성 연구를 통한 고부가가치 제품 개발을 통해 한식의 세계화, 글로벌화를 위해 우리나라 전통식품에 대한 적극적인 연구가 진행되어야 한다.

따라서, 금번 과제를 통해 확립한 전통 발효법을 응용한 3단 발효법의 과학적 규명 및 표준화 결과를 토대로 다양한 원물에 대한 제품 개발 및 기능성 연구가 진행되어야 한다.

제 4 장 목표달성 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

구분	연도	세부연구개발 목표	달성도	평가의 착안점
1차 년도	2013	식초 원료 품질인자 분석	100	○식초에 영양학적 관능적 성분에 영향을 미치는 원료인 현미 농축액 분석 ○기본 이화학분석 및 유효성분 분석(유리당, 유기산, 미네랄, 아미노산)
		전통발효법을 응용한 3단 발효법 확립	100	○현미농축액과 3단 발효 공정별 수율 향상을 위한 배양 조건 확립 ○3단 발효 공정별 공정표준화 - 제조 공정별 주요 품질지표를 확인하여 표준화를 설정 함
		발효공정(알코올 발효, 1,2차 초산발효)별 품질인자 분석	100	○3단발효공정(알코올/정치/심부발효)별 유효성분 분석을 통한 영양학적 성분 변화 확인 및 정치발효 식초와의 영양학적 성분 비교
		식초 관능성분 분석 최적화	100	○향기와 맛의 수치화된 패턴 확인을 위해 GC-MS와 맛테스터기를 통한 분석과 소비자 관능 평가를 통한 맛 연계성 확인
2차 년도	2014	막걸리 식초 개발	100	○ 3단 발효법을 이용한 막걸리 식초 개발
		발효공정(원료, 1,2차 초산 발효)별 품질인자 분석	100	○ 유효성분 분석(산도, Brix, pH, 균수, 유기산, 아미노산,미네랄) ○ 관능 분석(맛테스트) 및 관능적 특성 조사(관능패널 대상)
		3단 발효법을 이용한 막걸리 식초의 영양학적 특성 확인	100	○ 3단 발효법을 이용한 “막걸리 식초” 와 시판 중인 “막걸리 식초” 유효성분(산도, Brix, pH, 유기산, 아미노산, 미네랄) 비교분석
		막걸리 식초 시생산	100	○ “막걸리 식초” 연구 개발 완료 및 시생산 - 제품 안전/안정성 확인 - 소비자 패널 대상 관능검사

제 2 절 관련 분야의 기술발전예의 기여도

- 우리나라 전통발효식초의 유효성을 검증하고 관련 우수성을 증명하여 고부가가치 제품의 글로벌화 및 기업 수출 전력에 활용 가능 함
- 전통발효식초의 건강기능성에 대한 국내 소비자들의 정보를 제공하며, 수출 상품화를 통한 우리나라의 전통발효식초의 우수성에 대한 기초 자료를 제공할 수 있음
- 전통발효식초에 대한 국내 연구가 미비한 점에서 식초발효 공정별 표준화 및 과학적 검증을 통해 관련 제품군들의 기술 개발의 향상이 예측 됨
- 식초발효 공정별 풍미 및 관능에 객관적인 분석을 통해 고부가가치 제품 개발을 위한 공정 개선 효과가 기대됨
- 대표적인 발효식품인 전통주(막걸리)를 이용한 발효식초 개발 및 마케팅을 통한 막걸리 소비 증대 및 원주 생산 기업의 경제적 이윤 확대
- 3단 발효식초 연구는 전통발효법의 단점을 극복할 수 있는 대안을 제시 할 수 있으며, 일반 소비자들에게 다양한 제품을 제공할 수 있으며 식초 소비 증가를 유도하리라 예상됨
- 우수한 음용식초 제품 개발의 초석을 마련 할 수 있어, 이를 통해 전체 식초시장의 활성화가 기대됨
- 다양한 원료의 탐색을 통해 원물 발효 식초 개발 활용 가능

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 특허

출원 또는 등록일자	구분	제목	특허/실용제안	국가명
2014.08.06	등록	전통발효법을 응용한 3단발효식초의 제조방법	특허 10-1429587	한국

제 2 절 성과활용 계획

○ 2015년 하반기 내 ‘3단 발효법을 응용한 막걸리 식초 개발’ 특허 출원 예정

○ 제품화 출시 방안

- 원물 탐색 진행 中

과제명	정통 **식초	예상매출	0.5억/년 (GP 70%)	출시일정	2015. 하반기
제품컨셉	당사 프리미엄식초인 "100% 국내산 순발효" "정통식초" Category의 Line Extension				
<p>*제품 특징 (USP)</p> <p>1. 100% 국내산 순발효</p> <ul style="list-style-type: none"> - 합성첨가물이 전혀 없는, 100% 국내산 과일 or 곡물 발효식초 - 화이트식초 base의 블렌딩 식초가 아닌, 과일/곡물을 통째로 농축하여 발효한 "whole food" 식초 <p>2. 3번에 걸친 발효와 장기간 자연숙성으로 만든 정통식초</p> <p>=> 정통의 느낌을 살릴 수 있는 과일 or 곡물 선택(ex. 모과, 감귤, 귀리, 보리 등)</p> <p>* SPEC- **농축액, 정제수</p> <p>* 용량 & 가격: 560 ml(3,000원~3,200원), 800ml(4,000원~4,200원)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기존 양조/현미/사과/매실 2,000원~3,500원/560ml, 2,700원~4,500원/800ml) - 제1 경쟁사: 백설- 100% 자연발효 석류/백포도식초(3,700원/800ml, '14년 3월) => 100% 과일로 직접 발효한 => 제조공법 유사 ※ 오투기- 저산도 4.5식초(사과/유자, 쌀막걸리)(2,000원/500ml) => 오투기 프리미엄식초 Line 					
목표(경쟁) 시장 현황	<p>1. 시장규모(억원): 약 12억원(당사 정통식초 매출)</p> <p>2. 목표(경쟁) 현황</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시장 현황: 약 10%의 연평균 성장률(5년)을 보이며 시장 확대 - 경쟁자 현황: 지속적으로 '고착화된 일반식초 시장'을 탈피하려는 제품 출시 				
필요 핵심 역량	<p>1. R&D: 다양한 과일/곡물 농축액을 발효하여, 조미용도에 적합한 식초 원료 Search</p> <p>2. MKT: 고객인지도 확대</p>				
Target(E)	Main Target	3040대 주부 - 자녀有			
	Sub Target	40대~ 50대 후반			
투자계획	0원	광고 판촉비	20백만		

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 해외 논문

- The Efficacy of Vinegar on the Suppression of Postprandial Glucose Elevation (2011, Journal of the Japan Diabetic Society)
- Directional isolation of ethanol-tolerant acetic acid bacteria from industrial fermented vinegar(2013, European food research and technology)
- Vinegar ingestion at mealtime reduced fasting blood glucose concentrations in healthy adults at risk for type 2 diabetes(2013, Journal of functional foods)
- Intake of Vinegar Beverage Is Associated with Restoration of Ovulatory Function in Women with Polycystic Ovary Syndrome(2013, The Tohoku journal of experimental medicine)
- Physicochemical Components and Antioxidant Activities of Daebong Persimmon (Diospyros kaki cv. Hachiya) Peel Vinegars(2013, Current research on agriculture and life sciences)

제 2 절 해외 특허

- 양조식초 함유 드레싱(AJINOMOTO CO INC, 2011)
- A has the effect of lowering blood pressure, vinegar beverage and its production method(吴婉玲, 2011)
- Fruit vinegar tea drink and preparation method thereof(MIAOYU BEVERAGE LIMITED LIABILITY COMPANY, 2011)
- 가열 농축한 식초를 함유하는 액체 조미료(AJINOMOTO CO INC, 2011)
- Fermentation type fruit juice vinegar beverage(Yantai Gisbelle Wine Co., Ltd. 2012)

제 7 장 참고문헌

농업 및 농식품 캐나다, 강원발전연구원 정책메모 247호, 서울경제 신문. 2014

국내식초시장의 현황 및 전망: 정용진. 식품과학과 산업 6월호. 2009

Park, C. S., Lee, T. S. (2002) Quality characteristics of takju prepared by wheat flour nuruks. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 296-302

Lee, S. R. (1986) Korean Fermentated Foods. Ewha Womans University Press, Seoul, Korea. p. 9

Kim, C. J., Kim, K. C., Kim, D. Y., Oh, M. J., Lee, S. K., Lee, S. O., Chung, S. T., Chung, J. H. (1990) Fermentation Engineering. Sun Jin Moon Wha Sa, Seoul, Korea. pp. 79-103

Quantities of production, shipment(Domestic, Export). (2011) Available from: <http://kosis.kr>. Accessed Mar. 3,

Jeong, J. W., Park. K. J., Kim, M. H., Kim, D. S. (2006) Quality characteristics of takju fermentation by addition of chestnut peel powder. Korean J.Food Preserv. 13: 329-336

정용진, (2009) 국내 식초 시장의 현황 및 전망, 식품과학과 산업 6월호

김충재, 김인중, (2013) 발효식초시장의 급성장 그리고 강원도. 강원도 발전연구원. 정책메모 2013-30호

Jeong, S. T., Kim, J. G., Chang, H. S., Kim, Y. B. and Choi, J. U. (1996) Optimum condition of acetic acid fermentation for persimmon vinegar preparation and quality evaluation of persimmon vinegar. Korean J. Post-harvest Sci. Technol. Agri. Products, 3, 171-178

Kim, J. Y., Sung, K. W., Bae, H. W. and Yi, Y. H. (2007) pH, acidity, color, reducing, sugar, total sugar, alcohol and organoleptic characteristics of puffed rice powder added Takju during fermentation. Kor. J. Food Sci. Technol., 39, 266-271

Park, C. S., Lee, T. S. (2002) Quality characteristic of takju prepared by wheat flour nuruk. Korean J Food Sci Technol 34, 296-302

Shin. M. O., Kim, M. H. and Baw, S. J. (2010) The effect of Makgelli on blood flow, serum

lipid improvement and inhibition of ACE *in vitro*. J. Life Science, 20, 710-716

Kim, C. J., Park, Y. J., Lee, S. K and Oh, M. J. (1980) Studies on the induction of available mutant of acetic acid bacteria by UV light irradiation and NTF treatment. Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng., 9. 139-143.

Kim, C. J., Park, Y. J., Lee, S. K and Oh, M. J. (1980) Studies on the induction of available mutant of acetic acid bacteria by UV light irradiation and NTG treatment. Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng., 9. 139-143

Kwon, Y. H., Lee, A. R., Kim, J. H., Kim, H. R and Ahn, B. H (2012) Changes of Physicochemical Properties and Microbial during Storage of Commercial Makgeolli. Korean J. Mycol., 40(4) 2010-214.

Park, C. W., Jang, S. Y., Park, E. J., Yeo, S. H., Kim, O. M. and Jeong, Y. J. (2011) Comparison of the quality characteristics of commercial Makgeolli type in South Korea. Korean J. Food Preserv. 18:884-890.

Lee, S. M. and Lee, T. S. (2000) Effect of roasted rice and defatted soybean on the quality characteristics of Takju during fermentation. J. Natural Sci. 12:71-79.

Kim CJ. (1968) Microbiological and enzymological studies on takju brewing. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 10: 69-100

Akira, O.T. 2000. Charcoal power. Nihigasisouen. Tokyo.

3단 발효법으로 제조된 식초의 Cross-sectional
in vivo 연구

세부연구기관명 : 고려대학교 산학협력단
세부연구책임자 : 김영준
연구위원 : 김준호
연구위원 : 허완민
연구위원 : 김박형건

요 약 문

I. 제 목

3단 발효법으로 제조된 식초의 Cross-sectional *in vivo* 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

삶의 질과 여성의 사회적 지위가 높아졌으며, 나아가 과거에 비해 운동을 위한 여건이 크게 개선되어 누구나 운동을 할 수 있는 환경조건이 갖춰짐에 따라 대중의 ‘운동보조식품’에 대한 관심도 크게 증가하였다. 운동 뿐 만 아니라 직장생활에서 오는 피로축적에 따른 피로회복제 및 체력증진 보조식품도 대중의 관심을 받고 있다. 그러나 이와 관련된 시장, 특히 운동보조제(식품) 시장의 경우 오랜 기간 수입제품이 독점하여 국내 제품의 입지가 매우 낮은 실정이다. 수년 전까지는 운동 및 운동보조식품에 대한 대중의 관심이 비교적 적었기 때문에 관련제품 시장규모 또한 크지 않았으나, 이에 대한 관심이 지속적으로 증가함에 따라 국내 제품의 입지도 증가시켜야 할 시점이다. 때문에 본 연구개발을 통하여 3단 발효식초의 항비만 및 운동수행능력 향상에 대한 효과를 평가하고, 운동보조식품 시장에서 국내 제품의 입지 확보를 위한 교두보를 마련하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 식초가 지방세포 분화에 미치는 영향 및 그에 따른 유전자 발현 변화 확인

- 가. 식초 농도에 따른 세포배양 배지의 pH 변화
- 나. 식초 농도에 따른 지방전구세포에 대한 독성평가
- 다. 식초의 pH에 따른 세포독성
- 라. 식초가 3T3-L1 지방전구세포의 분화에 미치는 영향평가
- 마. 3T3-L1 지방전구세포 분화 시 식초에 의한 지방합성 관련 유전자 발현 억제 효능 평가

2. 식초 내 주요 유기산 성분들에 의한 비만 및 고강도 운동수행능력 개선 효능 평가

- 가. 동물실험의 설계
- 나. 고강도 조건에서의 지구력 평가
- 다. 혈중 지질함량 및 운동수행능력 관련 성분 평가
- 라. 근육 속성전환 관련 유전자 발현 평가

3. 3단발효 식초와 그 주요 유기산인 초산이 지방세포 분화에 미치는 영향 확인

- 가. 3단발효 식초와 주요 유기산인 초산의 3T3-L1 지방전구세포 분화 억제효능 평가

4. 3단발효 식초와 그 주요 유기산인 초산의 지구력 개선 효능 평가 및 작용 기전 확인

- 가. 동물실험의 설계

나. 지구력 평가

다. 혈중 지질함량 및 지구력 관련 성분 평가

라. 근육 속성전환 관련 단백질 발현 평가

마. 면역조직염색법을 통한 근육 속성전환 평가 및 작용 기전 규명

IV. 연구개발결과

1. 식초 및 식초 내 주요 유기산 성분들에 의한 비만 및 고강도 운동수행능력 개선 효능 평가

본 연구를 통하여 3T3-L1 지방전구세포의 분화 시 식초에 의한 지방축적 억제 효능을 확인하였으며, 지방합성에 관여하는 mRNA의 발현이 유의적으로 억제됨을 확인할 수 있었다. 또한 고지방 식이를 섭취하며 고강도 훈련을 수행한 쥐에게 식초의 주요 유기산 성분 중 초산 및 피루브산의 섭취시킨 경우, 지구력과 관련된 혈청 지표인 Creatine kinase, Urea nitrogen이 유의적으로 감소하였다. 지구력 훈련이 아닌 고강도 훈련을 수행 하였음에도 불구하고 slow muscle인 MHC I의 발현이 유의적으로 증가하였다. 따라서 계속된 연구에서는 지구력 증진과 fast-to-slow 근육 속성전환에 중점을 두어 연구를 수행하였다.

2. 3단발효 식초와 그 주요 유기산인 초산의 지구력 개선 효능평가 및 작용기전 확인

선행연구에서와 마찬가지로 3단 발효식초와 초산에 의하여 3T3-L1 지방전구세포의 분화 시, 지방축적 억제효능을 확인하였다. 그리고 3단 발효식초와 초산에 의한 지구력의 유의적 증가를 확인 하였고, 복부지방의 유의적 감소를 확인하여 지구력의 증가가 지방산 산화와 연관이 있음을 확인 할 수 있었다. 초산의 경구투여 시, 1차년도와 유사하게 지구력 관련 혈청 지표인 NEFA, Creatine kinase, Urea nitrogen이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. Slow muscle인 soleus muscle에서 지방 산화와 관련된 *CPT1 β* , *UCP2*, *UCP3*, *HSL*의 발현이 유의적으로 증가하였으며, 지방 산화관련 단백질들의 발현도 초산에 의하여 증가하였다. 특히, 초산에 의하여 slow muscle fiber인 MHC I의 발현이 크게 증가하였다. 3단 발효식초에 의한 지구력은 증가하였으나, 그 외의 지표들의 유의적 증가는 확인되지 않았다. 근육에서 지방 산화관련 단백질이 증가한 초산군의 근육을 조직면역염색하여 MHC I의 비율을 확인한 결과, 초산의 섭취 시, MHC I fiber의 비율이 대조군 보다 높게 나타난 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 본 연구결과에서 초산의 투여가 운동에 따른 근육 AMPK, PPAR δ , PGC-1 α 등의 mRNA 및 단백질 발현 조절을 통하여 MHC isoform의 변화를 자극하고 지구력을 증가 시키며, CPT1, UCP, HSL 등의 지방산화관련 gene의 발현의 자극을 통하여 지구력 증가에 필요한 에너지를 보충한 것으로 사료된다. 동시에 기존에 보고된 바와 같이 ACC, SREBP-1c, FAS 등의 지방합성관련 gene의 발현을 억제하여 체지방감소에도 영향을 미친 것으로 분석된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

(1) 본 연구결과를 이용하여 2014년 ‘한국식품영양과학회’에 발표하였으며, 우수 포스터상을 수상하였다. 또한 위의 내용을 이용하여 ‘Acetic acid enhances endurance capacity of exercise-trained mice by increasing muscle oxidative properties’의 주제로 SCI급 국제저널인 ‘Food & Function’에 투고하였음.

2. 성과활용 계획

(1) 본 연구결과를 이용하여 ‘3단 발효식초의 제조 및 공정표준화’의 주제로(제목 미정) SCI급 국제저널인 ‘Journal of Food Science’에 2015년에 투고예정임.

SUMMARY

I . Title

Standardization of 3 stages vinegar fermentation which uses traditional fermentation methods and its functionality study

II. Objectives and necessities of the research

The quality of life and the position of the women is getting higher, and the conditions for exercise have been greatly improved than before. Thus, the interests in ‘exercise supplements’ have been greater. In addition to exercise, the accumulation of fatigue from social life resulted in the increase of the interest in restorative drinks. However, the related market, especially the exercise (food) supplement, has been depended on imported products for decades; therefore, the position of domestic exercise supplement in the market is seemed to be very low. Until few years ago, the scale of the market was not big due to low interests by people, but it is right time to expand the position of the domestic products in the market in accordance with the lasting interests in exercise supplements. Therefore, here we studied the anti-obese effect and the enhancement of endurance capacity by 3 stages fermented vinegar and we tried to establish a bridgehead to secure the position of domestic exercise supplements in the market through this research and development.

III. The contents and range of the research

- 1. The effect of vinegar on the differentiation of 3T3-L1 preadipocyte and gene expression level during the differentiation**
 - A. Changes in pH of culture media the concentration dependent of vinegar
 - B. Cell viability test to 3T3-L1 the concentration dependent of vinegar
 - C. Cell viability test to 3T3-L1 the pH dependent of vinegar
 - D. The effect of vinegar on the differentiation of 3T3-L1 preadipocyte
 - ⌘. The effect of vinegar on gene expression level during the differentiation of 3T3-L1

- 2. The effect of vinegar and its organic acids on obesity and high-intense exercise ability**
 - A. Animal study
 - B. Estimation of endurance capacity in high-intense condition
 - C. Serum lipid contents and parameters involved in exercise ability
 - D. The expression level of mRNA involved in muscle type transformation

- 3. The effect of 3 stages fermented vinegar and acetic acid on the differentiation of 3T3-L1 preadipocyte**

4. The effect of 3 stages fermented vinegar and acetic acid on endurance capacity and its mechanistic study

- A. Animal study
- B. Estimation of endurance capacity
- C. Serum lipid contents and parameters involved in endurance capacity
- D. The expression level of proteins involved in muscle type transformation
- E. Estimation of muscle fiber type transformation by immunohistochemistry method and investigation of its mechanism

IV. Results of research development

1. The effect of vinegar and its organic acids on obesity and exercise ability

In the present study, we found that the vinegar inhibits the accumulation of lipid droplet during the differentiation of 3T3-L1 preadipocyte through down-regulation of mRNA expression involved in lipogenesis. Moreover, creatine kinase and urea nitrogen, indicators of increase in endurance capacity were significantly reduced in serum of high-intensity trained rats fed high-fat diet with acetic acid and pyruvic acid. Although the rats were high-intense trained, the mRNA expression of MHC I, indicator of slow muscle fiber, was significantly up-regulated. Thus, we performed the consecutive study more focused on the endurance capacity and fast-to-slow muscle fiber type transformation.

2. Estimation of muscle fiber type transformation by immunohistochemistry method and investigation of its mechanism

As the previous study, we found the inhibitory effect of 3 stages fermented vinegar and acetic acid on the accumulation of lipid droplet during the differentiation of 3T3-L1 preadipocyte. Additionally, acetic acid induced a significant increase in endurance capacity with a reduction of visceral adipose depots compared to a control group. Serum levels of non-esterified fatty acid (NEFA), and urea nitrogen were significantly lower in acetic acid-fed mice than in control mice. Importantly, in exercised mice, acetic acid significantly increased the muscle expressions of key enzymes involved in fatty acid oxidation and glycolytic-to-oxidative fiber type transformation at both gene and protein levels. These findings suggest that acetic acid improves endurance exercise capacity by promoting muscle oxidative properties, potentially mediated via AMPK dependent mechanisms and these observations provide an important basis for the application of acetic acid as a major component of novel ergogenic aids and warrant further clinical evaluation.

V. Achievement and its application plan

1. Achievement of the research

- A. A poster presentation was given at annual meeting of ‘The Korean Society of Food Science and Nutrition’ using this research, and it was awarded an excellence award.

Moreover, An article titled ‘Acetic acid enhances endurance capacity of exercise-trained mice by increasing muscle oxidative properties’ was submitted to ‘Food & Function’ , an international SCI journal.

2. Application plan of the research

A. An article will be submitted to ‘Journal of Food Science’ , an international SCI journal, on the topic of ‘Production and standardization of 3 stages vinegar fermentation process’ .

CONTENTS

Chapter 1. Synopsis of the project of research and development.....	78
Section 1. Objective of the research and development.....	78
Section 2. Necessity of the research and development.....	78
Chapter 2. Status of technical development in Korea and overseas	79
Section 1. Domestic status	79
Section 2. Foreign status	80
Chapter 3. The contents and range of the research	81
Section 1. The performance of research and development	81
Section 2. The method of research and development	81
Section 3. The results of research and development.....	84
Chapter 4. The attainment of the goal and the contribution to related field	100
Chapter 5. Achievement and its application plan.....	101
Chapter 6. References.....	102

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	78
제 1 절 연구개발의 목적.....	78
제 2 절 연구개발의 필요성	78
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	79
제 1 절 국내 현황	79
제 2 절 국외 현황	80
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	81
제 1 절 연구개발수행 내용	81
제 2 절 연구개발수행 방법	81
제 3 절 연구개발수행 결과	84
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	100
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	101
제 6 장 참고문헌.....	102

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목표

3단 발효식초의 항비만 및 운동수행능력 향상에 대한 효과를 평가하고자 한다.

1. *In vitro* 수준에서 식초의 지방축적 억제효능 평가
2. 식초의 주요 유기산 성분인 초산, 피루브산, 젖산에 의한 항비만 및 운동수행능력 비교평가
3. *In vitro* 수준에서 3단 발효식초의 지방축적 억제효능 평가
4. 3단 발효식초 및 그 주요 유기산 성분인 초산에 의한 지구력 평가
5. 골격근 내 지방산 산화 및 근육 속성전환관련 RNA 및 단백질 발현을 realtime PCR 및 western blot으로 확인하고 작용기전 규명

제 2 절 연구개발의 필요성

삶의 질과 여성의 사회적 지위가 높아졌으며, 나아가 과거에 비해 운동을 위한 여건이 크게 개선되어 누구나 운동을 할 수 있는 환경조건이 갖춰짐에 따라 대중의 ‘운동보조식품’에 대한 관심도 크게 증가하였다. 운동 뿐 만 아니라 직장생활에서 오는 피로축적에 따른 피로회복제 및 체력증진 보조식품도 대중의 관심을 받고 있다. 그러나 이와 관련된 시장, 특히 운동보조제(식품) 시장의 경우 오랜 기간 수입제품이 독점하여 국내 제품의 입지가 매우 낮은 실정이다. 수년 전까지는 운동 및 운동보조식품에 대한 대중의 관심이 비교적 적었기 때문에 관련제품 시장규모 또한 크지 않았으나, 이에 대한 관심이 지속적으로 증가함에 따라 국내 제품의 입지도 증가시켜야 할 시점이다. 때문에 본 연구개발을 통하여 운동보조식품 시장에서 국내 제품의 입지 확보를 위한 교두보를 마련하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 현황

○ 국내에서 식초의 기능성에 대한 연구는 총 10편 내외로 거의 없었으며, 보고된 기능성으로는 면역력강화, 운동능력개선, 지질대사개선, 피부색개선, 항산화 활성 등이 있었으나, 이러한 기능성에 대한 식초의 정확한 기작을 보고한 사례는 없었다.

○정 등은 (2007) 감식초와 옥타코사놀의 혼합섭취시 최대산소섭취량($VO_2 \max$)와 무산소성 역치의 증가, 호흡상($RQ \max$)의 감소를 확인하여 운동수행능력에 긍정적인 효과가 있다고 보고하였고, 혈중 피로물질인 암모니아와 무기인산을 감소를 통한 운동 시 피로도 개선 효능이 보고되었다.

○ 감식초에서 분리한 다당류가 쥐에서 분리한 비장세포의 대식세포활성과 유사분열활성 수준을 증가시켰으며, 정맥투여 시 림프종 종양세포인 YAC-1세포에 대한 NK 세포의 독성 증가가 보고되었다 (황 등, 2008).

○ 이 등은 (2009) 국내 시판되는 19종의 식초의 항산화 활성을 비교하였다. 총 폴리페놀함량 및 플라보노이드함량은 발사믹 식초가 가장 높았으며, 두 가지 모두 음료용 식초가 조리용 식초보다 높은 것으로 보고하였다. 또한 식초의 항산화 활성은 폴리페놀에 의한 것으로 보고하였고, 유기산 함량은 빙초산이 가장 높은 것으로 보고하였으며 식초의 유기산 함량과 항산화 활성은 상관관계가 없음을 보고하였다.

○ 문 등은 (2010) 쥐를 이용한 in vivo 연구에서 감식초 급여 시 지방조직 감소와 혈중 및 간내 중성지방, 콜레스테롤 감소를 통한 지질대사 개선 효능을 보고하였다.

○ 강과 백은 (2010, 2011) 콜라겐과 식초의 복합식이 갱년기 여성의 혈청 성분과 여성의 피부색개선에 미치는 영향에 대하여 보고하였다. 콜라겐과 식초의 복합섭취 시 혈청 콜라겐 농도에 대한 유의적인 상승효과가 있었으며, 식초 섭취시 testosterone의 농도가 크게 감소되었다.

또한, 콜라겐과 식초의 공동 섭취가 IGF-I과 ferritin 농도를 높이는 데에 콜라겐의 단독 섭취보다 도움이 된다는 것을 보고하였으며 콜라겐과 식초의 공동 섭취에 의한 여성 피부색을 더욱 밝게 하는 효과를 보고하였다.

제 2 절 국외 현황

○ 국외에서 식초의 기능성연구는 국내에 비해 상당히 많은 연구가 되어있다. 보고된 바에 의하면 칼슘흡수증진에 의한 골다공증예방, 항비만, 항산화, 항당뇨, 동맥경화개선, 알러지반응 감소 등의 연구가 이루어져 있다. 또한 초산에 의한 비만개선 작용 기전이 보고되었고, 운동수행능력개선을 위한 몇 가지 근거들이 보고되었으나, 운동수행능력에 대한 정확한 작용 기전에 대한 연구는 보고된바 없다.

○ Davalos 등 (2005), Xu 등 (2007)과 Sakanaka 등 (2008)은 식초의 in vitro 항산화 효능을 보고하였다. Xu 등은 식초 제조과정의 maillard 반응에서 형성되는 melanoidin의 항산화능을 보고하였으며, Sakanaka 등이 보고한 감식초, 백미식초, 현미식초, 사과식초의 항산화능 연구에서는 감식초와 현미식초에서 사과식초 보다 10배가량 높은 항산화능을 보고하였음.

○ Ostman 등은 (2005) 임상연구에서 식초의 섭취가 혈중 글루코스과 인슐린 반응을 낮추고 포만감 증가를 보고하였고, 이는 식초의 당뇨개선 효능을 나타내며 포만감을 증가시켜 식욕억제를 통한 비만예방 가능성을 제시하였다.

○ Fushimi 등은 (2001) 식초의 주성분인 초산의 운동능력개선 효능에 대한 보고에서 초산의 급여 시간, soleus muscle, gastrocnemius muscle의 glycogen 함량이 대조군에 비하여 높게 나타났다고 보고하였다. 이를 초산 섭취에 따른 glycogen 충전효과 때문이라고 보고하였으며, 따라서 초산이 풍부한 식초의 운동능력개선효과도 기대할 수 있다.

○ 그 외에도 Kishi 등 (1999), Johnston 등 (2006), Setorki 등(2010)과 Armentia 등 (2010)은 각각 골다공증예방, 항암, 혈행 개선에 따른 동맥경화예방, 알러지반응 감소에 대한 보고를 하는 등 많은 보고가 이루어져 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발수행 내용

1. 식초가 지방세포 분화에 미치는 영향 및 그에 따른 유전자 발현 변화 확인
2. 식초 내 주요 유기산 성분들에 의한 비만 및 운동수행능력 개선 효능 평가
3. 3단 발효식초와 그 주요 유기산인 초산이 지방세포 분화에 미치는 영향 확인
4. 3단 발효식초와 그 주요 유기산인 초산의 운동수행능력 개선 효능 평가 및 작용 기전 확인

제 2 절 연구개발수행 방법

1. 식초가 지방세포 분화에 미치는 영향 및 그에 따른 유전자 발현 변화 확인

가. 식초 농도에 따른 세포배양 배지의 pH 변화

- 세포배양에 영향을 미치지 않는 식초의 산도를 찾기 위해 세포 배양배지에 식초를 농도별 첨가하여 pH paper로 대략적 pH를 확인하였다.

나. 식초 농도에 따른 지방전구세포에 대한 독성평가

- 지방전구세포인 3T3-L1의 분화를 위해서 100%의 세포 생존률을 나타내는 시료 농도 처리가 중요하다. 때문에 MTT assay를 수행하여 세포 생존에 영향을 미치지 않는 식초농도를 결정하였다.

다. 식초의 pH에 따른 세포독성

- 앞서 세포 배양배지를 이용하여 식초에 의한 pH 변화를 확인하였으나, 정확하게 세포 생존률에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자 식초 pH를 조절한 후, MTT assay를 수행하였다.

라. 식초가 3T3-L1 지방전구세포의 분화에 미치는 영향평가

- 지방세포로의 분화과정에서 식초의 지방축적 억제효능을 평가하기 위하여 3T3-L1을 6-well plate에 full confluency가 될 때까지 약 10일간 배양한 후, 분화 유도제 처리와 함께 5%의 표준물질 및 식초를 처리하여 8일간 분화유도를 진행하였다. 분화가 종료 되면 배지를 제거하고 10% formalin을 통하여 고정, Oil Red O 염색 후 현미경으로 관찰하였다. 염색된 세포(지방)를 iso-propanol에 녹여서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

마. 3T3-L1 지방전구세포 분화 시 식초에 의한 지방합성 관련 유전자 발현 억제 효능 평가

- ‘라’의 과정에서 10% formalin 처리 직전까지 수행 후, RNA extraction buffer를 첨

가하여 total RNA를 추출하고, cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA와 지방합성 관련 target primer를 이용하여 mRNA 발현을 정량하였다. 실험은 realtime PCR 기기를 이용하여 수행하였으며, internal control로서 β -actin을 사용하여 상대정량 하였다.

2. 식초 내 주요 유기산 성분들에 의한 비만 및 고강도 운동수행능력 개선 효능 평가

가. 동물실험의 설계

- 동물실험은 6주령 수컷 SD 랫을 이용하여 수행하였으며, 대조군 및 0.4% 초산, 피루브산, 젖산을 고지방식이에 혼합하여 자율 급여하도록 하였다. 처음 8주 동안은 식이와 시료급여만 진행하였고 9주차부터 고강도 트레드밀 훈련을 수행하였다.

나. 고강도 조건에서 지구력 평가

- 일주일에 5회 15분씩 고강도 treadmill 운동을 시켰다 (5분; 속도=10 m/min, 경사=10°, 전기충격=ON, 10분; 매분 속도 2 m/min 씩 증가). 총 8주간 실험을 진행하였으며, 매주 체중 측정을 하였다. 실험의 마지막에 30분간 treadmill 운동 직후, 채혈 및 해부하여 지방 및 골격근을 적출하여 sampling 하였다.
- 총 4주의 실험기간 동안 매주 고강도 조건에서 지구력을 측정하였으며, 측정 조건은 다음과 같다. 속도;10 m/min, 경사도;10°, 전기충격;ON의 조건에서 5분 후, 총 운동시간 20분에 도달 할 때까지 분당 속도 2 m/min 씩 증가시키고 30 m/min의 속도에서 지칠 때까지 실험을 진행하였다. 지구력은 기존에 보고된 연구방법들을 기반으로 하여 측정하였으며, 지구력측정 기준은 다음과 같다. 1) 2초 이상의 시간동안 전기충격 grid에 머무는 횟수가 5번인 경우, 2) 전기충격 grid에 연속으로 머물지는 않으나 lane의 앞쪽으로 나아가지 못 하고 반복적으로 전기충격grid에 닿는 경우.

다. 혈중 지질함량 및 운동수행능력 관련 성분 평가

- 혈중 지표들은 각각 지표에 상응하는 ELISA kit를 이용하였으며, 실험방법은 kit 매뉴얼에 따랐다.

라. 근육 속성전환 관련 유전자 발현 평가

- 종아리의 soleus muscle을 분리하여 total RNA을 추출하고 cDNA을 합성하여 근육 속성전환과 관련된 유전자의 발현정도를 realtime PCR을 이용하여 정량하였다.

3. 3단 발효식초와 그 주요 유기산인 초산이 지방세포 분화에 미치는 영향 확인

가. 3단 발효식초와 주요 유기산인 초산의 3T3-L1 지방전구세포 분화 억제효능 평가

- 지방세포로의 분화과정에서 3단 발효식초의 지방축적 억제효능을 평가하기 위하여 3T3-L1을 6-well plate에 full confluency가 될 때까지 약 10일간 배양한 후, 분화 유도제 처리와 함께 5%의 초산 및 3단 발효식초를 처리하여 8일간 분화유도를 진행하였다. 분화가 종료되면 배지를 제거하고 10% formalin을 통하여 고정, Oil Red O 염색 후 현미경으로 관찰하였다. 염색된 세포(지방)을 iso-propanol에 녹여서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

4. 3단 발효식초와 그 주요 유기산인 초산의 지구력 개선 효능 평가 및 작용 기전 확인

가. 동물실험의 설계

- 동물실험은 5주령 암컷 C57BL/6 생쥐를 이용하여 수행하였으며, 일반 식이를 자율 급여하도록 하였다. 실험군은 ‘비운동-대조군, 비운동-초산, 운동-대조군, 운동-초산, 운동-3단 발효식초’로 구성되었으며, 시료는 1.5% 초산을 10 mL/체중(kg)로 경구투여하였고, 3단 발효식초는 초산균과 초산농도를 맞추어 경구투여 하였다. 경구투여는 실험기간동안 매일 운동 직전에 실시하였다.

나. 지구력 평가

- 적응기간 동안 Treadmill test를 통하여 40마리의 생쥐 (C57BL/6) 중 18마리를 선별하였고, Control과 초산, 3단 발효식초의 3가지 실험군으로 나누어 시료투여와 함께 일주일에 3회 15분씩 treadmill 운동을 시켰다 (15분; 속도=10 m/min, 경사=10°, 전기충격=ON, 10분; 매분 속도 1 m/min 씩 증가). 총 8주간 실험을 진행하였으며, 매주 체중 측정을 하였다. 실험의 마지막에 30분간 treadmill 운동 직후, 채혈 및 해부하여 지방 및 골격근을 적출하여 sampling 하였다.
- 총 8주의 실험기간 동안 2주마다 지구력을 측정하였으며, 측정 조건은 다음과 같다. 속도;10 m/min, 경사도;10°, 전기충격;ON의 조건에서 5분 후, 총 운동시간 20분에 도달 할 때까지 분당 속도 1 m/min 씩 증가시키고 20 m/min의 속도에서 지칠 때까지 실험을 진행하였다. 지구력은 기존에 보고된 연구방법들을 기반으로 하여 측정하였으며, 지구력측정 기준은 다음과 같다. 1) 2초 이상의 시간동안 전기충격 grid에 머무는 횟수가 5번인 경우, 2) 전기충격 grid에 연속으로 머물지는 않으나 lane의 앞쪽으로 나아가지 못 하고 반복적으로 전기충격grid에 닿는 경우.

다. 혈중 지질함량 및 지구력 관련 성분 평가

- 혈중 지표들은 각각 지표에 상응하는 ELISA kit를 이용하였으며, 실험방법은 kit 매뉴얼에 따랐다.
- Slow muscle인 soleus muscle에서 total RNA를 추출하고 역전사 시켜 cDNA를 합성하였으며, 이를 이용하여 지방산화와 관련된 mRNA의 발현량을 quantitative PCR을 통해 확인하였다.

라. 근육 속성전환 관련 단백질 발현 평가

- Soleus muscle에서 단백질을 추출, 정량하여 SDS-PAGE로 단백질을 분리하였다. 이를 PVDF 멤브레인에 transfer하고 원하는 항체를 반응시켜 ImageQuant LAS 4000에서 결과를 검출하였으며 ImageJ software를 이용하여 정량하였다.

마. 면역조직염색법을 통한 근육 속성전환 평가 및 작용 기전 규명

- 해부직후 Soleus muscle을 종아리근육에서 분리하여 4% paraformalin에 고정하고 paraffin block을 제작하여 paraffin section을 수행하였다. Section slide는 deparaffinize 후 hydrogen peroxide blocking을 수행하고 MHCI antibody에 반응시켰다. 이후 실험단계는 SAVIEW (mouse/rabbit-HRP, DAB) IHC kit의 protocol에 따라 진행하였다.

제 3 절 연구개발수행 결과

<제1차년도>

1. 식초가 지방세포 분화에 미치는 영향 및 그에 따른 유전자 발현 변화 확인
(가) 식초 농도에 따른 세포배양 배지의 pH 변화

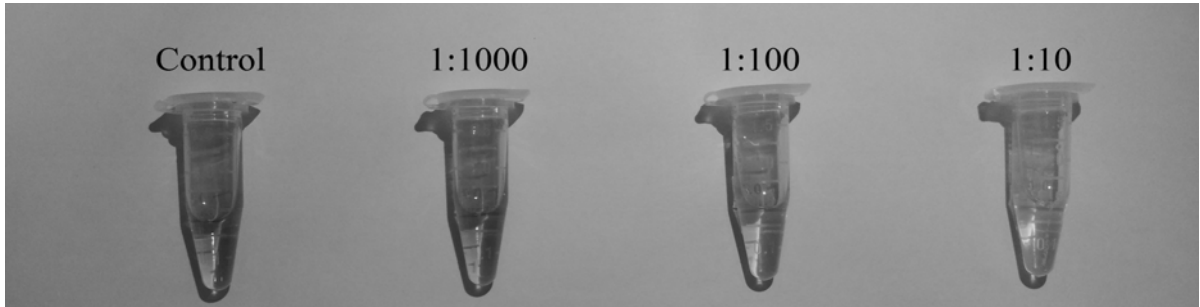


Fig. 1. 식초 농도에 따른 세포배양 배지 pH 변화

- 지방세포의 분화 시 지방축적억제 연구를 위하여 세포에 처리하기 위한 식초의 적정 농도를 확인하기 위하여 cell viability test 실시 이전에 세포배양 배지색변화를 통한 pH를 확인하였다. 세포는 중성 (pH 7.0)의 조건에서 가장 잘 생육하기 때문에 배양 시 배지의 색변화를 통해 대략적인 pH를 알아볼 수 있으므로 본 실험을 진행 하였다.
- pH가 낮을수록 배양배지의 색이 노란색으로 변함. 식초를 배양배지에 농도별 처리 시, 식초 농도가 증가할수록 색이 점차 노란색으로 변하는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig.1). 본 연구를 통하여 고농도 1:100, 저농도 1:1000을 설정하여 cell viability test를 진행하기로 하였다.

(나) 식초 농도에 따른 지방전구세포에 대한 독성평가

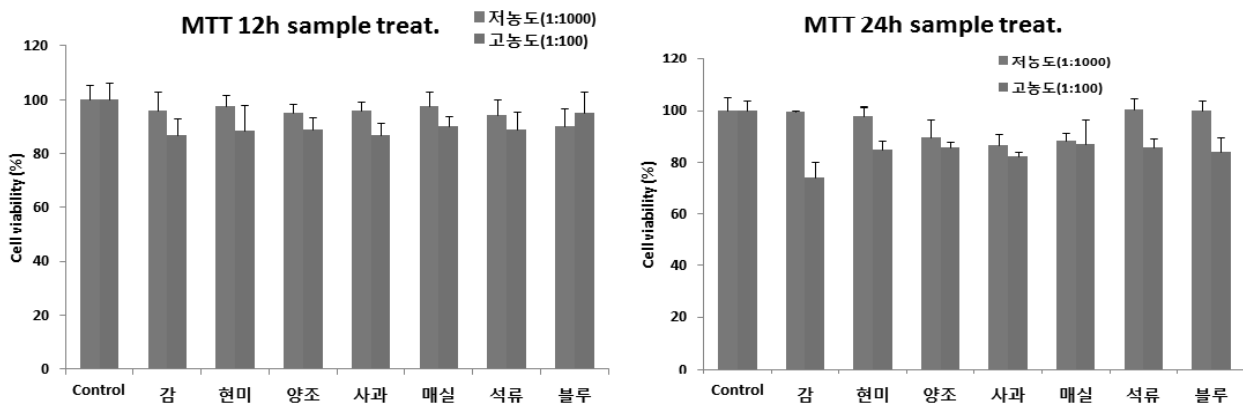


Fig.2. MTT test를 통한 식초 종류에 따른 세포독성 차이

- 식초를 12시간 처리한 경우, 저농도와 고농도의 차이가 크지 않았으나 24시간 처리한 경우, 고농도에서 세포 생존률이 크게 감소하였다 (Fig.2). 따라서 12시간의 시료 처리시간이 적당 할 것으로 사료되어 본 실험에서는 식초 처리시간을 12시간으로 진행하였다.

(다) 식초의 pH에 따른 세포독성

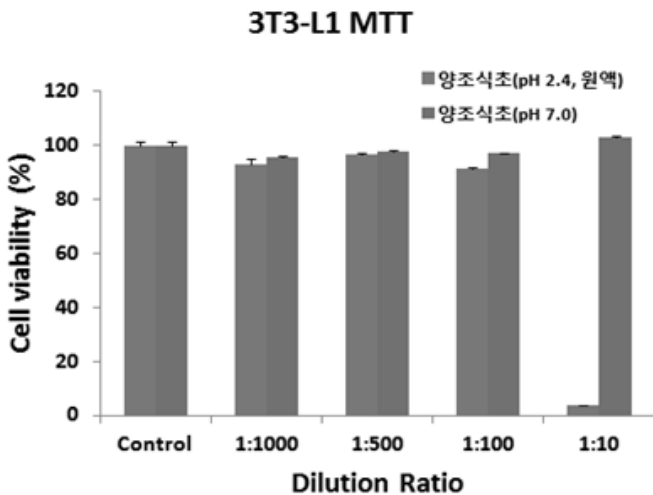


Fig.3. 식초의 pH변화에 따른 세포독성 변화

- 식초의 세포독성이 pH에 기인하는 것으로 사료되어 pH가 가장 낮은 양조식초의 pH를 7.0으로 조절하여 양조식초 원액과 cell viability test를 실시하였다. 선행 연구결과와는 상이하게 농도에 따른 생존률의 큰 감소는 없었으나 1:10의 비율에서는 거의 모든 세포가 사멸하였다 (그림 3). 그러나 pH 7.0에서 원액보다 생존률이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 1:10의 희석률에서도 생존률 감소를 전혀 나타내지 않았다.
- 식초 pH를 조절하여 분화 및 다른 실험에 적용 할 수 있을 것으로 사료되어 지방세포분화 및 근육세포를 이용한 연구를 진행하였다.

(라) 식초가 3T3-L1 지방전구세포의 분화에 미치는 영향평가

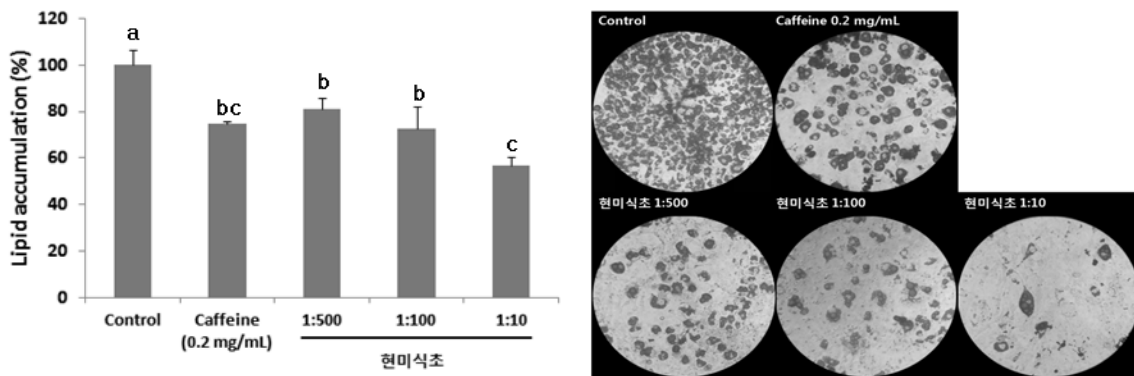


Fig. 4. 식초의 지방전구세포 분화억제 효능(좌) 및 염색된 세포의 현미경 사진(우)

- 앞선 cell viability test결과를 바탕으로 pH를 중성으로 조절한 현미식초를 이용하여 3T3-L1 지방전구세포의 분화억제 실험을 진행하였다.
- 분화억제 정도는 Oil Red O 염색을 통하여 확인하였으며 결과 식초 농도가 증가 할수록 지방으로의 분화가 저해되는 것을 확인 할 수 있었다. (Fig. 4).
- 저농도부터 고농도까지 비교적 높은 효능범위를 보였으며, 특히 식초 원액인 1:10에서는

positive control인 caffeine보다 높은 지방축적 저해율을 보였다. 본 실험을 통하여 in vivo연구에서 식초의 항비만 효능을 기대 할 수 있었다.

(마) 3T3-L1 지방전구세포 분화 시 식초에 의한 지방합성 관련 유전자 발현 억제 효능 평가

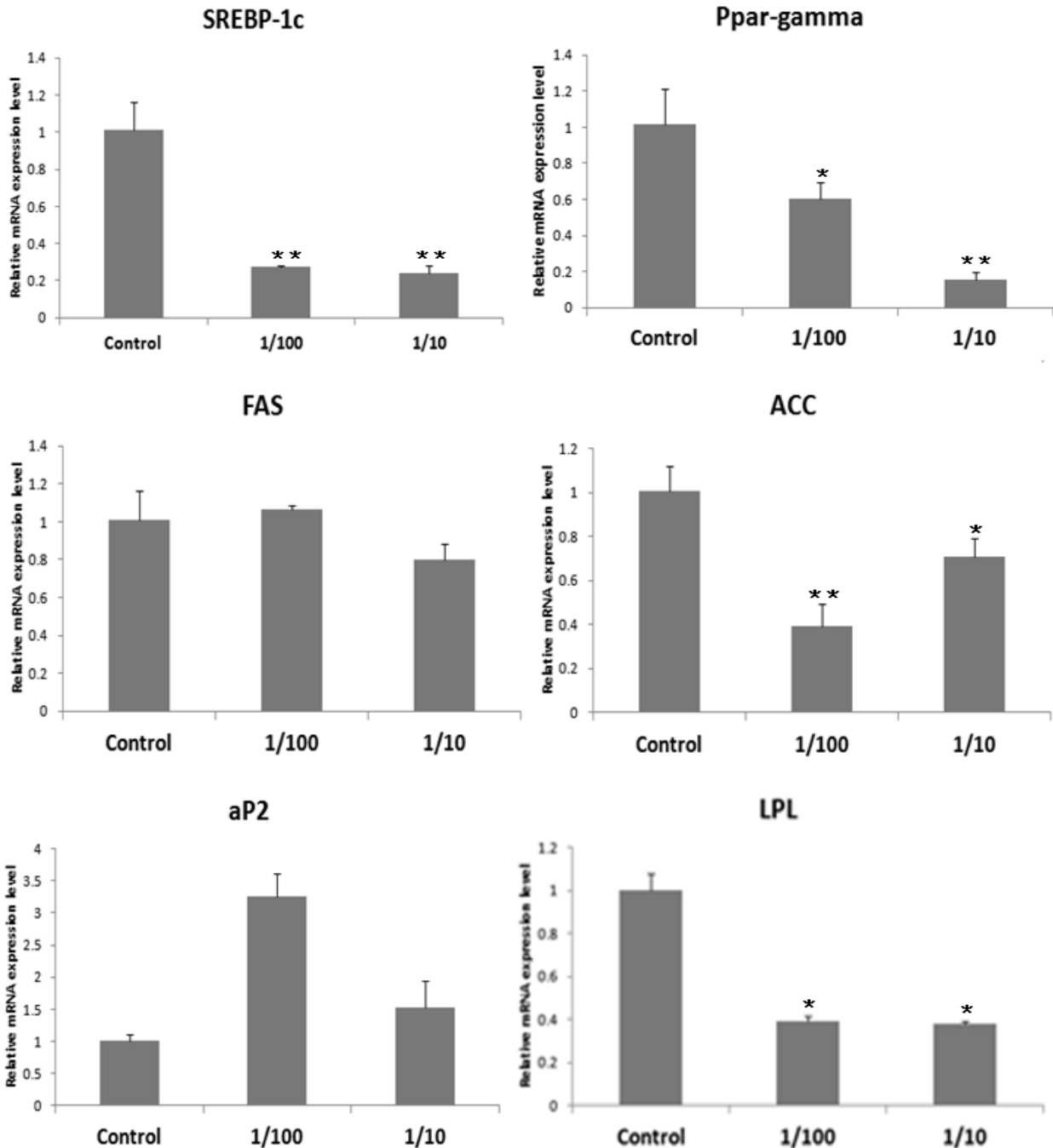


Fig. 5. 지방전구세포 분화시 lipogenic gene의 발현 변화

- 분화가 유도된 3T3-L1 지방세포에서 추출한 RNA로부터 cDNA를 합성하여 realtime PCR법으로 지질대사와 관련된 몇 가지 mRNA의 발현을 확인한 결과 SREBP-1c (Sterol regulatory element-binding protein-1c)와 PPAR- γ (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma)

의 발현이 식초농도에 따라 크게 감소하였다. SREBP-1c는 지방조직 내 lipogenesis (지방합성)의 주요 조절인자로, FAS (Fatty acid synthase)나 ACC (Acetyl CoA carboxylase)와 같이 지방산 생합성에 관여하는 gene의 발현을 조절하며, PPAR- γ 는 지방조직의 생성 및 발달에 있어서 주요 조절인자이다. 이들에 의해 영향을 받는 FAS와 ACC의 발현 역시 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 또한 지방의 uptake와 관련된 LPL (Lipoprotein lipase) 식초 처리에 의해 발현이 크게 감소하였다. 그러나 지방산 운반 단백질인 aP2 (Adipocyte protein 2 or Fatty acid binding protein 4) 의 발현은 Control에 비해 발현이 증가하였다(Fig. 5).

- 이와 같은 세포분화 및 유전자 발현결과를 통하여 식초의 섭취가 지방합성 및 축적을 줄임으로써 비만개선 효과를 나타낼 수 있다는 가설을 세울 수 있었다.

2. 식초 내 주요 유기산 성분들에 의한 비만 및 운동수행능력 개선 효능 평가

(가) 체중, 조직무게 및 지구력 평가

Table 1. 유기산 혹은 젖산 섭취 후, 비만유도 쥐의 체중변화

Body weight gain, g	
Con	340.9 ± 13.7
HFD Acetic acid	302.4 ± 4.4 *
Pyruvic acid	301.3 ± 8.3 *
Lactic acid	325.3 ± 11.8

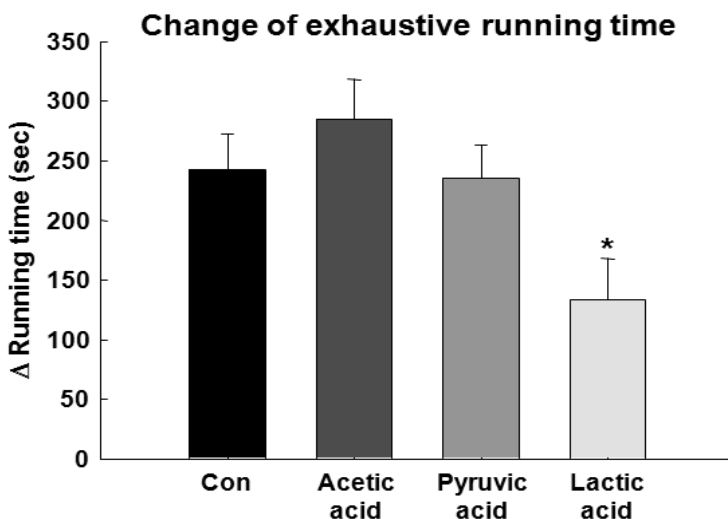


Fig. 6. 유기산 혹은 젖산 섭취 후, exhaustive running time의 변화

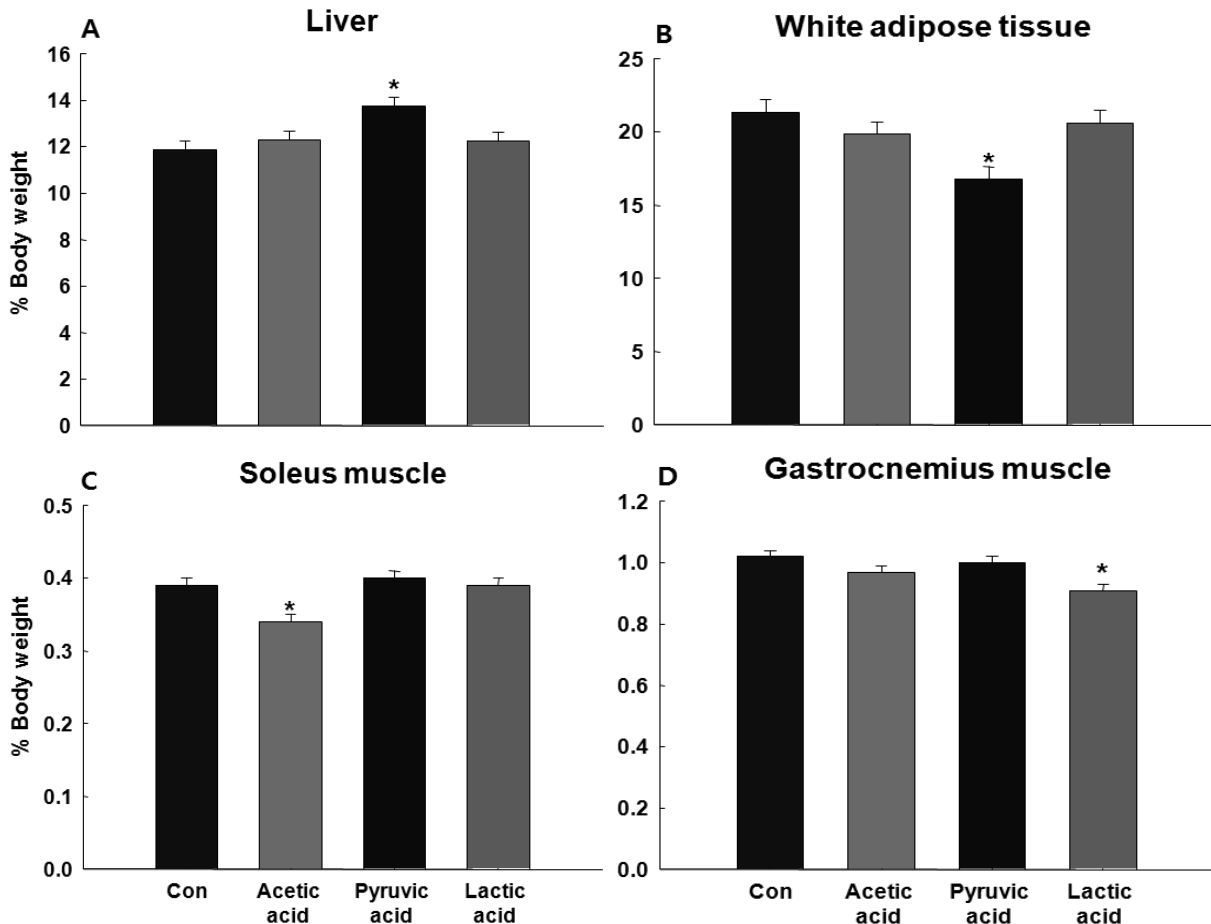


Fig. 7. 유기산 혹은 젖산을 섭취하며 트레드밀 운동을 실시한 쥐의 조직 무게변화

- 12주 동안의 체중변화량을 확인한 결과 식초에 함유된 주요 유기산인 acetic acid (초산)와 pyruvic acid (피루브산) 섭취군에서 유의적으로 낮았다(Table 1).
- 해부직전 운동시간에서 초기운동시간을 뺀 운동시간 변화 측정에서 통계적 유의성은 없었으나 초산 섭취군에서 가장 큰 증가율을 보였으며 lactic acid (젖산) 섭취군에서는 오히려 대조군보다 감소되는 결과를 보였다(Fig. 6). 조직무게의 변화에서 피루브산 섭취 시 백색지방이 유의적으로 감소한 것으로 나타났다(Fig. 7). 이는 Kalman 등이 (1998) 보고한 임상연구결과와 부합하는 결과이며, Kalman 등은 피루브산염의 섭취에 의한 백색지방조직의 감소를 통하여 피루브산염의 항비만 효능을 보고한 바 있다.
- 지구력 운동 시, 초산의 섭취가 지방산의 β -oxidation에 관여하여 지구력을 증가시킨다는 보고가 있다. 기존 연구들은 초산의 지구력에 관한 연구만 이루어져 있으며, 고강도운동에 대한 효과는 보고된 바 없었으므로, 본 연구에서는 고강도 운동 시 초산의 영향에 대하여 실험을 진행 하였다. 연구에서는 지구력 운동이 아닌 고강도 운동을 실시하였음에도 불구하고 운동시간이 증가하는 경향을 보였고, 지근[soleus (slow) muscle]이 유의적으로 감소한 것으로 미루어 볼 때, 고강도 운동 시 초산의 섭취가 slow-to-fast로 근육 속성전환에의 관여에 대한 가설을 제기 할 수 있었다.

(나) 혈중 지질함량 및 운동수행능력 관련 성분 평가

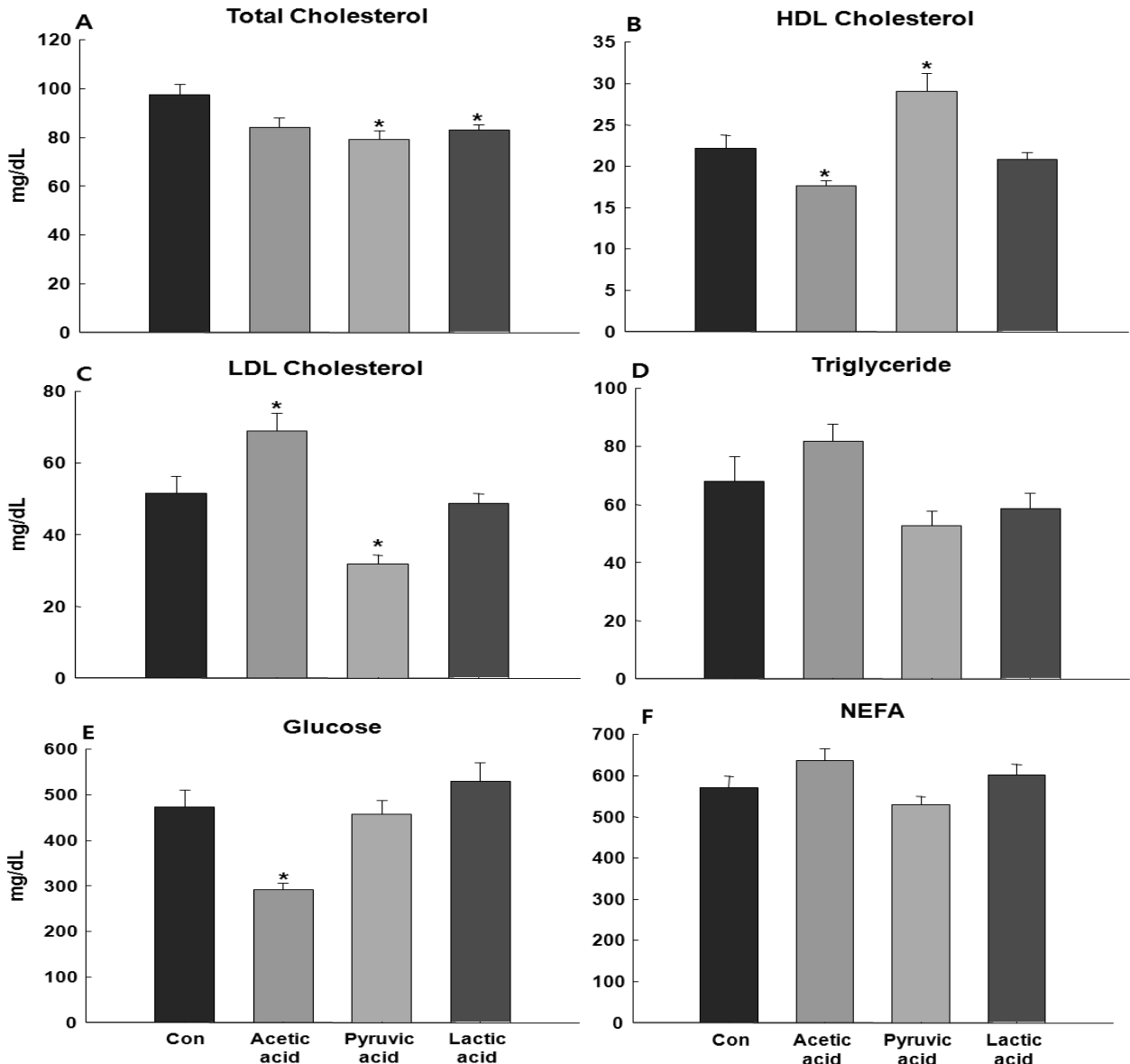


Fig. 8. 유기산 혹은 젖산 섭취 후, 트레드밀 운동을 실시한 쥐의 혈중 지질함량

- 혈중 지질함량을 확인한 결과, 피루브산의 섭취가 혈중 콜레스테롤의 조절에 매우 긍정적으로 작용하는 것으로 사료되나 초산의 경우 혈중 지질에는 긍정적인 영향이 없는 것으로 나타났다 (Fig.8).
- 그러나 초산 섭취군의 혈당 (glucose) 함량이 크게 감소한 것으로 미루어 보아, 초산 섭취가 근육 혹은 간 조직으로의 glucose uptake를 도와 glucose 손실을 막아주어 운동능력의 증진에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 일본의 Fushimi와 Sato는 (2005) 지구력 운동 시 acetic acid의 섭취가 골격근으로의 glucose uptake를 증가시켜 혈중 glucose를 감소시키고 근육조직 내 glycogen 함량을 높임으로써 운동능력이 증가되었다고 보고하였다.

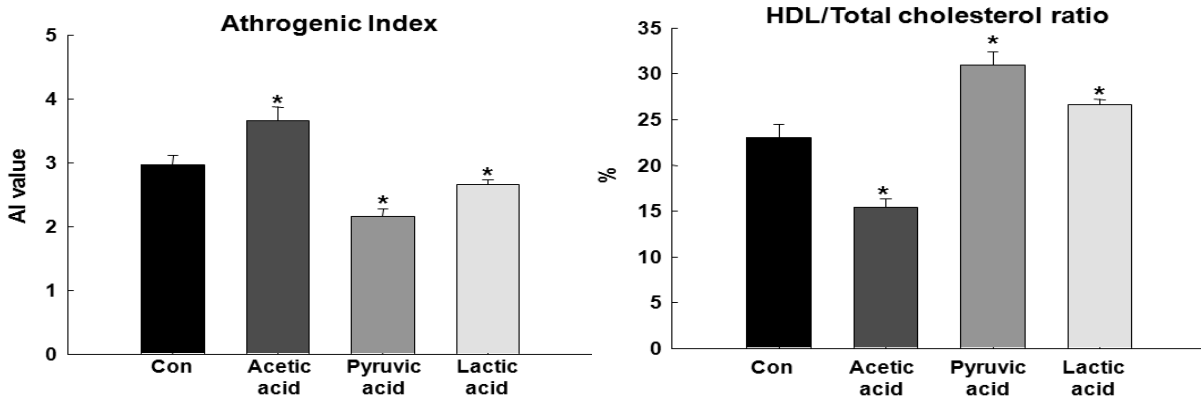


Fig. 9. 유기산 혹은 젖산 섭취 후, 트레드밀 운동을 실시한 쥐의 혈행지표

- Athrogenic index (AI) 와 HDL/Total cholesterol ratio (HTR)은 동맥경화 및 혈행관련 질환에서 주로 확인되는 지표로써 Total cholesterol과 HDL cholesterol을 이용하여 다음과 같이 계산되었다.

$$AI = (\text{Total cholesterol} - \text{HDL cholesterol}) / \text{HDL cholesterol}$$

$$HTR = (\text{HDL cholesterol} / \text{Total cholesterol}) \times 100$$

- Fig. 9에서는 운동 시 유기산과 젖산의 섭취가 AI와 HTR에 미치는 영향에 대하여 나타내었다. 피루브산과 젖산 섭취군에서는 Control 군에 비해 AI 수치가 유의적으로 감소하였으나 초산 섭취군에서는 증가하였다. 또한 HTR은 AI와 정 반대의 결과를 보였다.
- Fig. 8과 Fig. 9를 종합해 보면 초산의 섭취는 혈중 지질함량 및 혈행에 부정적인 효과를 보이는 것으로 사료되며 피루브산의 섭취 시 혈중 지질개선 및 혈행 개선에 가장 효과적인 결과를 나타냈다.

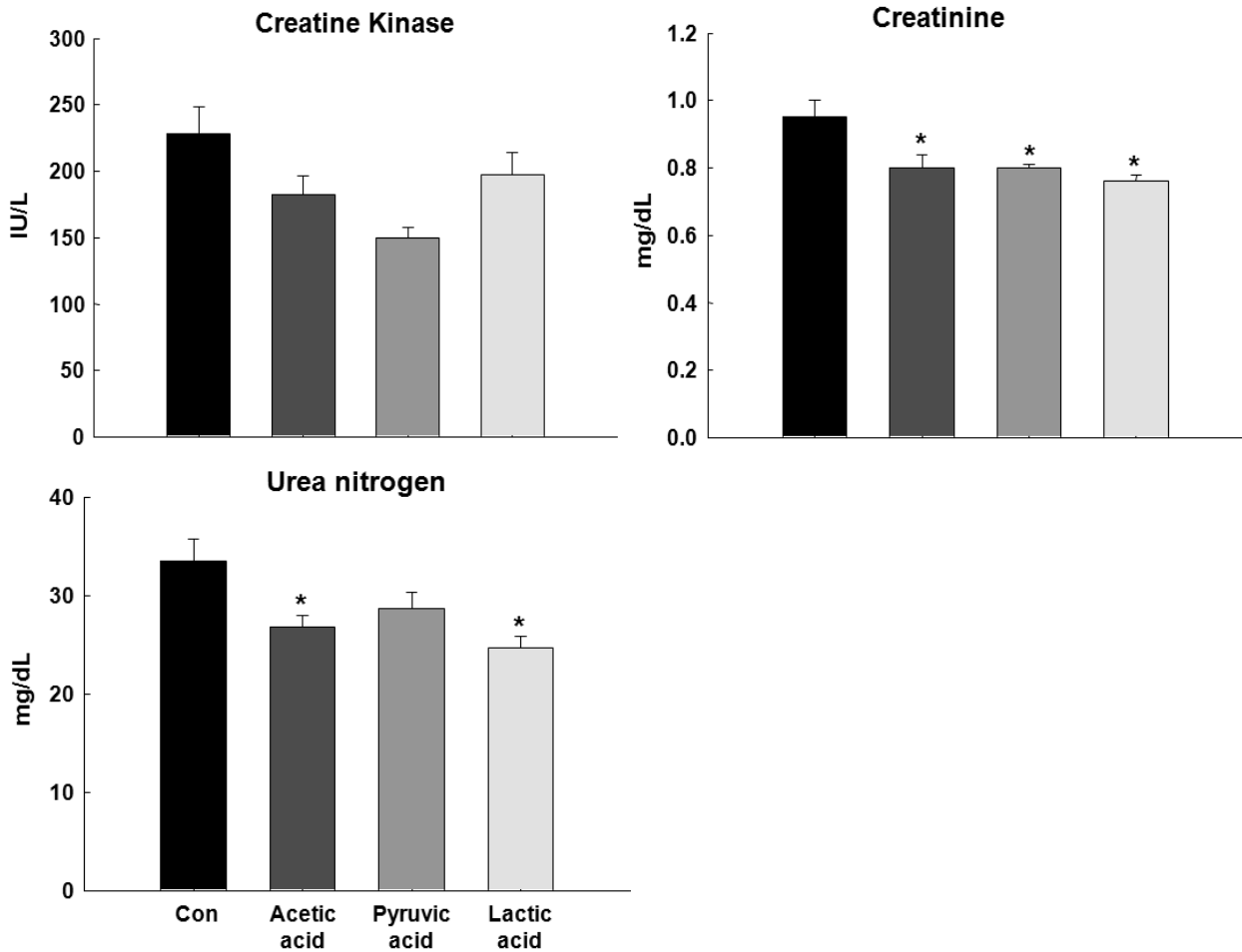


Fig.10. 유기산 혹은 젖산 섭취 후, 트레드밀 운동을 실시한 쥐의 혈중 운동능력 관련 지표

- Creatinine은 근수축 에너지로 근육 내에서 creatine phosphate로부터 생성된 creatine이 탈수되어 생긴 최종 대사산물로, 근육 내 creatinine의 농도는 근육량에 비례하지만, 혈중 creatinine의 수치가 높아지는 경우는 근 손상 또는 근력저하를 의미한다. 또한 Urea nitrogen은 단백질 대사의 end product로, 운동능력이 증진된 경우 아미노산 혹은 단백질 외에 지방산 등의 대체 energy source를 이용하기 때문에 혈액이나 소변에서 그 농도가 감소하는 것이 일반적이다. 본 연구에서 혈중 creatinine의 수치는 대조군에 비해 유의적으로 낮았으며, urea nitrogen의 경우 초산 섭취 군에서 유의적으로 낮았다 (Fig. 10). 이 결과로부터 운동 시 초산 섭취가 단백질 외에 다른 성분을 energy source로 이용함으로써 운동능력을 증가시켰다는 것을 예상 할 수 있다.

(다) 근육 속성전환 관련 유전자 발현 평가

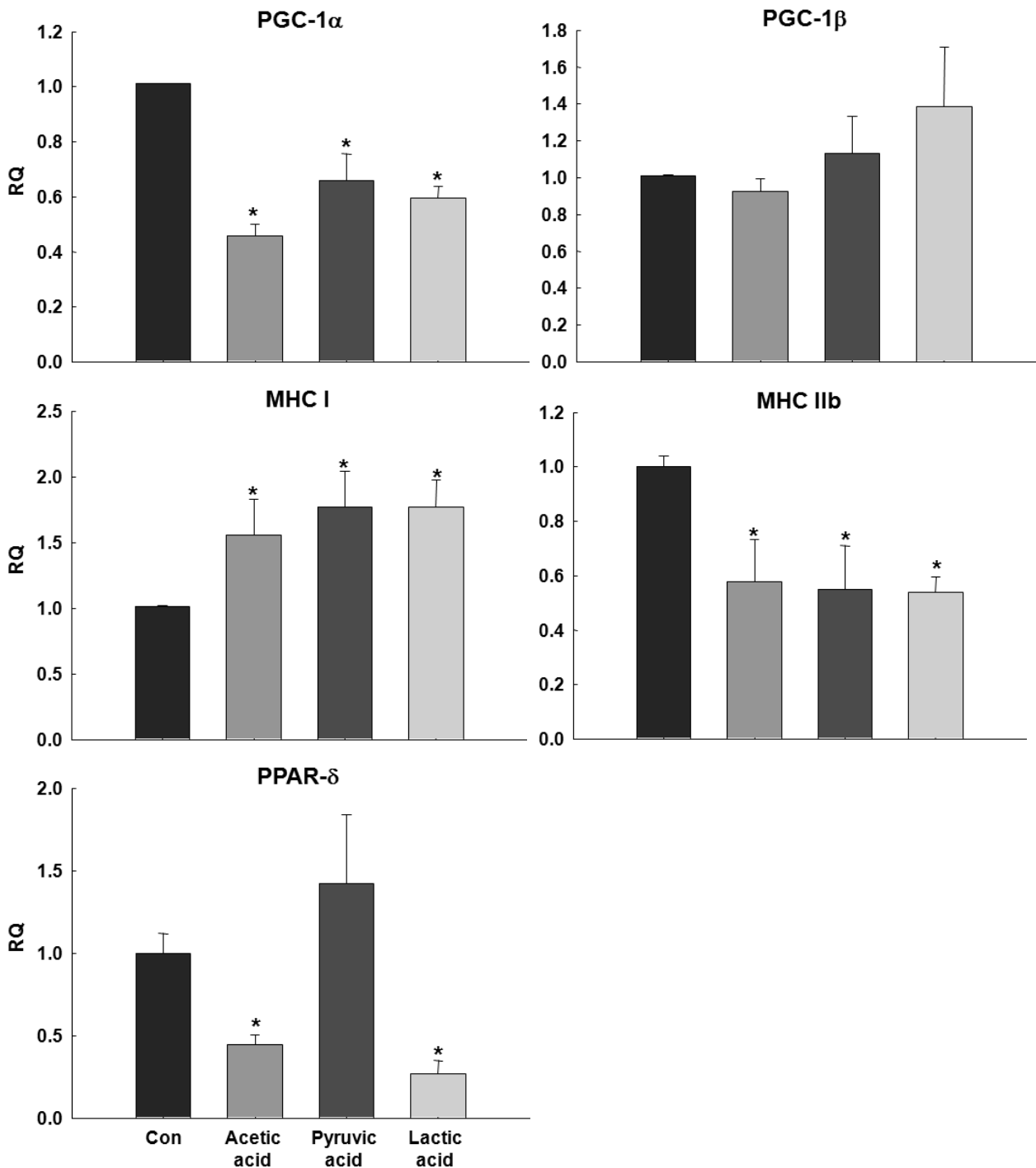


Fig. 11. 유기산 혹은 젖산 섭취 후, 트레드밀 운동을 실시한 쥐의 근육 내 muscle type transformation 관련 gene의 발현

- 문헌들에 따르면 (Baar 등, 2002; Russel 등, 2003) PGC-1 α 는 fast보다 slow muscle에서 더 높은 발현을 보이며 인간과 설치류에서 운동에 의해 즉시 발현된다고 보고된다. Fast muscle에서 PGC-1 α 의 과 발현은 mitochondrial biogenesis와 산화효소들의 합성을 자극하고 type I 근섬유 비율을 높여 피로에 대한 근육의 저항성을 높여준다고 알려져 있다 (Lin 등, 2002).
- PPAR- δ 또한 slow muscle에서 상대적으로 높은 발현을 보이는 것으로 보고되며 (Vianna 등, 2006) 쥐의 지구력 운동 시 (Luquet 등, 2003) 혹은 인간의 급성 운동 시 (Mahoney 등,

2005) 유도된다고 알려져 있다. 이들은 PPAR- δ 의 과 발현 시 slow muscle 수축성 단백질 발현을 증가시켜 피로에 대한 저항성을 증가시키는 것으로 보고하였다.

- PPAR- δ knockout 모델에서는 slow-to-fast muscle-type switching과 함께 Myosin Heavy Chain (MHC) I의 감소와 MHC IIb의 증가가 보고되었다. 이에 따라 PGC-1 α 의 발현감소와 함께 낮은 산화적 근섬유로의 전환이 일어난다고 보고되었다 (Schuler 등, 2006).
- 골격근에서 PGC1 α/β , PPAR- δ , MHC I, MHC IIb 5가지 발현을 확인한 결과, 기대와는 다르게 slow muscle과 fast muscle에서 같은 양상의 결과를 보였으며 처리군 간의 차이는 거의 없었다 (Fig. 11).
- 가설에 부합하는 결과로는 지구력 운동 시 slow 및 fast muscle에서 증가하는 것으로 보고된 PGC-1 α 와 PPAR- δ 의 발현이 유의적으로 감소한 점이다.
- MHC I과 MHC IIb는 PPAR- β/δ knock-out mouse의 fast muscle에서 MHC I의 발현은 감소하고 MHC IIb는 감소하는 것으로 보고된 바 있으나, 본 연구에서 PPAR- δ 의 발현이 크게 감소하였음에도 불구하고 기존 보고와는 반대의 결과를 보였다.
- 본 연구에서 고강도 훈련 시 유기산 급여에 의해 골격근 내 PGC-1 α 및 PPAR- δ 의 감소를 보여 muscle type transformation에 가능성을 나타내었으나, 이에 관여하는 그 밖의 다른 gene의 발현은 가설과 상이하게 나타났으며, 전체적 연구결과의 양상이 고강도 운동보다는 지구력 운동 시, 운동수행능력 개선이 있을 것으로 평가되며, slow-to-fast의 근육 속성전환보다 fast-to-slow로의 전환에 효과가 있을 것으로 예상되어 2차년도에는 지구력 증진과 fast-to-slow 근육 속성전환에 중점을 두어 연구를 설계하였다.

<제2차년도>

3. 3단 발효식초와 그 주요 유기산인 초산이 지방세포 분화에 미치는 영향 확인

(가) 3단 발효식초와 그 주요 유기산인 초산이 3T3-L1 지방전구세포 분화 억제효능 평가

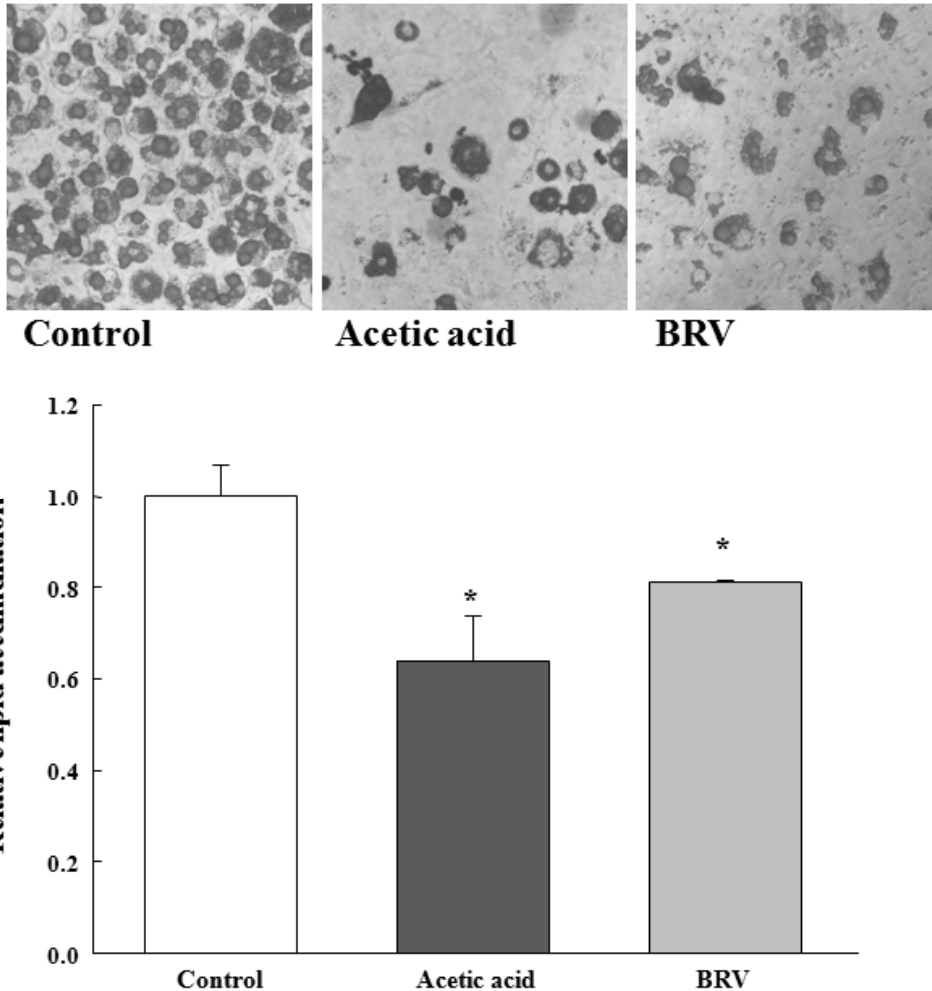


Fig. 12. 초산 및 3단 발효식초에 의한 3T3-L1 지방분화 억제 효능

- Final 초산 농도 0.5%로 지방세포 분화에 처리한 결과 초산과 3단 발효식초 모두에서 지방 축적억제 효능을 나타냈다 (Fig.12). 3단 발효식초보다 단일 성분인 초산의 효능이 더 높게 나타났으나 두 실험군 간의 유의적 차이는 확인되지 않았다.

4. 3단 발효식초와 그 주요 유기산인 초산의 지구력 개선 효능 평가 및 작용 기전 확인

(가) 체중, 조직무게

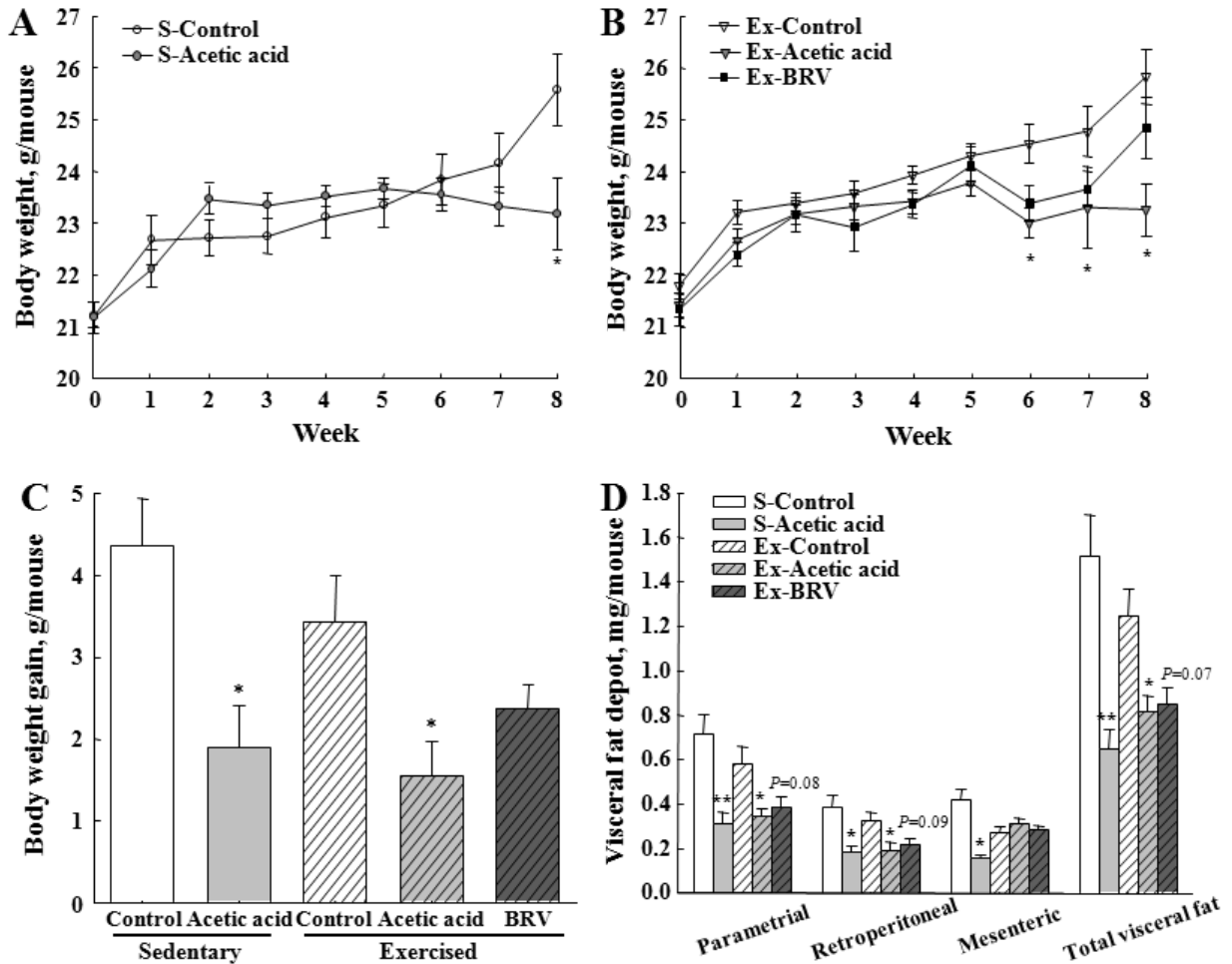


Fig. 13. 비운동 (Sedentary, S) 및 운동 (Exercised, Ex) 시 초산 및 3단 발효식초 투여가 생쥐의 체중 (A, B, C) 및 지방조직 무게에 (D) 미치는 영향

Body weight gain (체중증가량) = 최종체중 - 초기체중.

Parametrial fat, 자궁주변 지방; Retroperitoneal fat, 복막후 지방; Mesenteric fat, 장간막 지방

* Significantly different from control (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

- 3단 발효식초 투여 시 체중, 복부지방이 감소되는 경향을 보였지만, 대조군과의 유의적인 차이는 확인되지 않았다. 반면에 초산 투여 시 체중 및 복부지방이 유의적으로 감소되었다 (Fig. 13). Body weight gain (체중증가량) 및 복부지방무게는 대조군에 비해 크게 감소한 것으로 보였으나 통계적 유의성 평가를 위한 기준인 $P < 0.05$ 에 다소 못 미치는 $P = 0.07 \sim 0.09$ 로 나타났다. 이는 매우 근소한 차이이므로, 장기적인 관점에서 3단 발효식초가 지방축적억제에 효과가 있을 것으로 기대된다.

(나) 지구력, 혈중 지질, 지구력 관련 성분 평가 및 RNA 발현

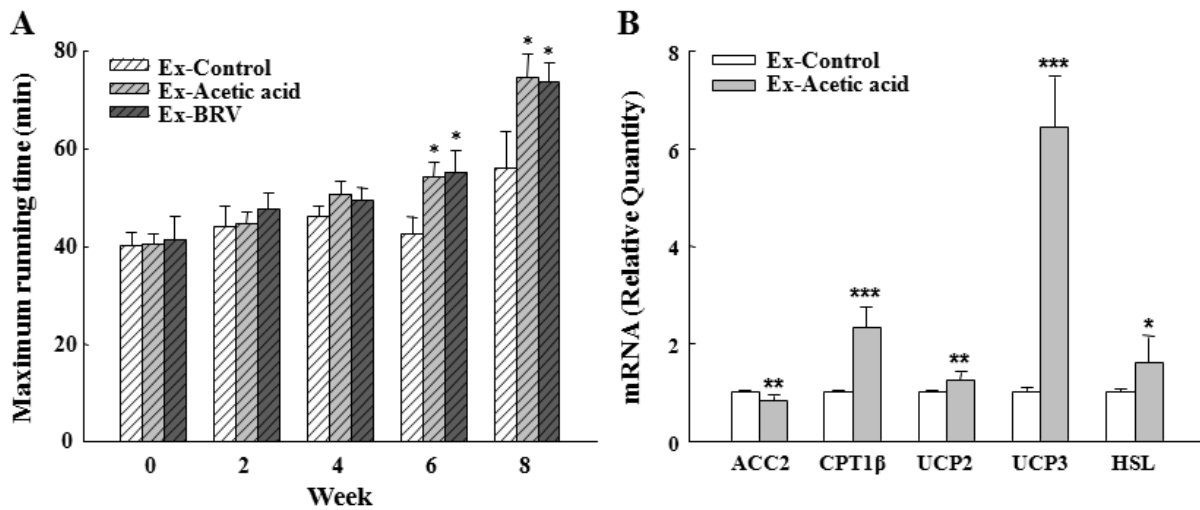


Fig. 14. 초산 및 3단 발효식초 투여에 의한 생쥐의 지구력 증진 효능
ACC, Acetyl CoA carboxylase; CPT1, Carnitine palmitoyl transferase; UCP, Uncoupling protein; HSL, Hormone sensitive lipase. *Significantly different from control (* $P < 0.05$).

Table 2. 비운동 및 운동 시 초산 및 3단 발효식초 투여가 생쥐의 혈청 생화학지표에 미치는 영향

	S-Control	S-Acetic acid	Ex-Control	Ex-Acetic acid	Ex-BRV
Glucose, mg/dL	38.6 ± 1.54	40.2 ± 0.99	40.0 ± 0.78	35.17 ± 1.47 *	40.83 ± 0.95
Total cholesterol, mg/dL	14.8 ± 0.44	15.0 ± 1.16	13.5 ± 0.39	9.63 ± 1.43	12.83 ± 0.37
TG, IU/L	4.6 ± 0.83	3.8 ± 0.52	2.17 ± 0.28	3.00 ± 0.36	3.6 ± 0.46
NEFA, μEq/L	107.4 ± 12.89	89.4 ± 3.34	110.8 ± 3.06	87.25 ± 8.71 *	110.17 ± 9.49
Urea nitrogen, mg/dL	6.5 ± 0.27	6.0 ± 0.04	6.15 ± 0.22	4.18 ± 0.84 *	6.37 ± 0.36
Creatine kinase, IU/L	36.5 ± 5.55	36.6 ± 1.31	50.67 ± 13.68	62.0 ± 3.02	22.67 ± 1.57 *
Lactate, mM	1.00 ± 0.10	1.21 ± 0.12	1.17 ± 0.15	0.94 ± 0.08	1.28 ± 0.15

At the end of study, the animals ran for 30 min according to the training protocol and were sacrificed by Avertin (2, 2, 2-Tribromoethanol) asphyxiation. Values represent means ± SE (n =6). *Significantly different from control ($P < 0.05$).

- Treadmill에서 생쥐의 Maximum running time (MRT)의 측정을 통해 지구력을 평가하였다. 초산 및 3단 발효식초를 8주간 투여하며 2주마다 MRT를 측정한 결과, 6주차부터 MRT가 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다 (Fig. 14A). Baseline인 0주차의 MRT와 비교하였을 때, 8주간의 treadmill 훈련에 의해 MRT가 평균 1.4배 증가하였다. 반면, 초산 및 3단 발효식초군의 경우 각각 평균 1.8배, 1.7배 증가하였다. Treadmill 운동 직후 혈중 주요 대사산물의 분석한 결과 초산의 투여 시, 혈중 NEFA와 urea nitrogen이 유의적으로 감소하였으며, 이는 운동 시 지방산화의 증가에 따른 단백질분해의 감소를 나타낸다 (Table 2). 반면에 3단 발효식초 투여군에서 이들 지표의 감소가 확인되지 않았다. 3단 발효식초 투여군에서는 운동 시 근육의 손상의 간접적 지표인 creatine kinase만 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였다 (김 등, 2010; 왕 등 2008).
- 혈중 주요 지표에서 유의적 차이를 나타낸 초산 운동군의 근육조직에서 지방산화와 관련된 mRNA의 발현을 분석하였다. 비운동군의 혈청지표에서 초산에 의한 효과를 확인 되지 않았으므로, 운동군에서만 더욱 초점을 맞추어 선택적으로 분석하였다. 초산의 투여 시, 지방

산화의 주요 지표인 CPT1 β , UCP2, UCP3, HSL mRNA의 발현이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 지방합성의 주요 mRNA인 ACC2의 발현이 유의적으로 감소하였다 (Fig. 14B). 위 결과들로 미루어 보아 운동 시 초산 투여가 지방산화를 증가시키고 에너지 이용 조절에 영향을 미치는 것으로 기대된다.

(다) 근육 속성전환 관련 단백질 발현 평가

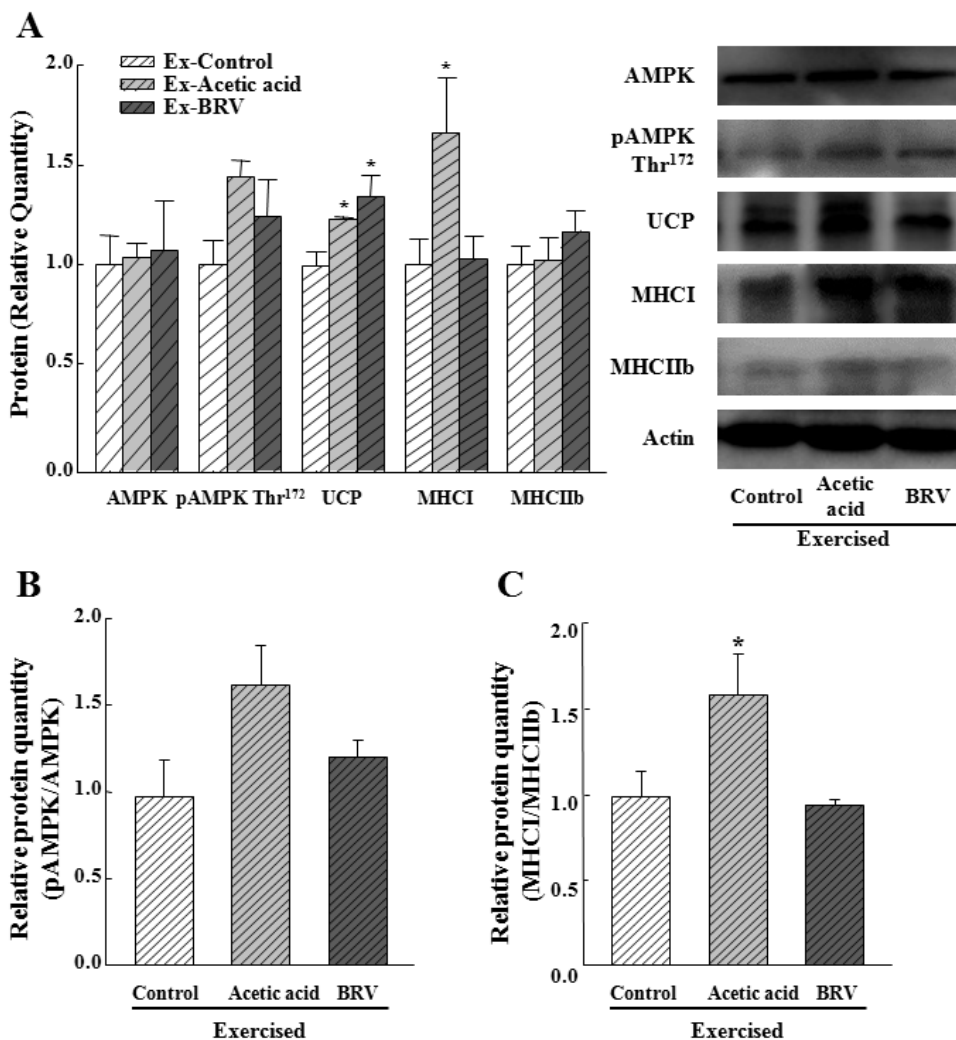


Fig. 15. 비운동 및 운동 시 초산 및 3단 발효식초 투여가 생쥐의 근육내 AMPK activation 및 근육속성 관련 단백질의 발현에 미치는 영향
 AMPK, AMP-activated kinase; pAMPK, phosphorylated AMPK; UCP, Uncoupling protein; MHC, Myosin heavy chain. *Significantly different from control (* $P < 0.05$).

- 지방산화관련 mRNA 발현에서는 혈청분석결과에 따라 3단 발효식초를 제외하고 분석하였으나, AMPK activation 및 근육속성관련 단백질발현의 변화를 확인하기 위하여 3단 발효식초군을 추가하였다. 초산 및 3단 발효식초 투여 시, AMPK activation (phosphorylation)이 증가하였으나, 대조군과 유의적차이를 보이지 않았다 (그림 15A). 특히 초산의 경우 이미 간 조직에서 AMPK activation을 증가시키는 것으로 알려졌다 (Kondo 등, 2009; Sakakibara 등, 2006) 근육에서도 증가시키는 경향을 나타내었다. AMPK activation의 정확히 확인 하기 위하여 total AMPK와 AMPK의 activation형인 pAMPK를 ratio로 나타낸 결과에서도 초산에 의해 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig.15B). AMPK의 downstream target으로 thermogenesis에 의한 지방산화의 지표중 하나인 UCP의 발현도 초산과 3단 발효식초에 의하여 유의적으로 증

가하였다 (Fig. 15A). 또한 근육 속성 identification을 위한 MHC I (Slow muscle fiber)와 MHC IIb (Fast muscle fiber)의 발현을 확인 한 결과, 초산에 의하여 slow/fast muscle의 비율이 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다 (Fig. 15A, C). AMPK와 PPAR δ 는 골격근에서 운동에 따른 근육 속성전환 조절에 관여하는 주요인자로 보고되어왔다 (Narkar 등, 2008). 실제로 본 연구에서 초산에 의한 골격근 내 PPAR δ mRNA의 발현이 증가한 것을 확인 할 수 있었으며 (data not shown), 이에 따라 MHC I mRNA 또한 증가한 것을 확인하였다.

(라) 면역조직염색법을 통한 근육 속성전환 평가 및 작용 기전 규명

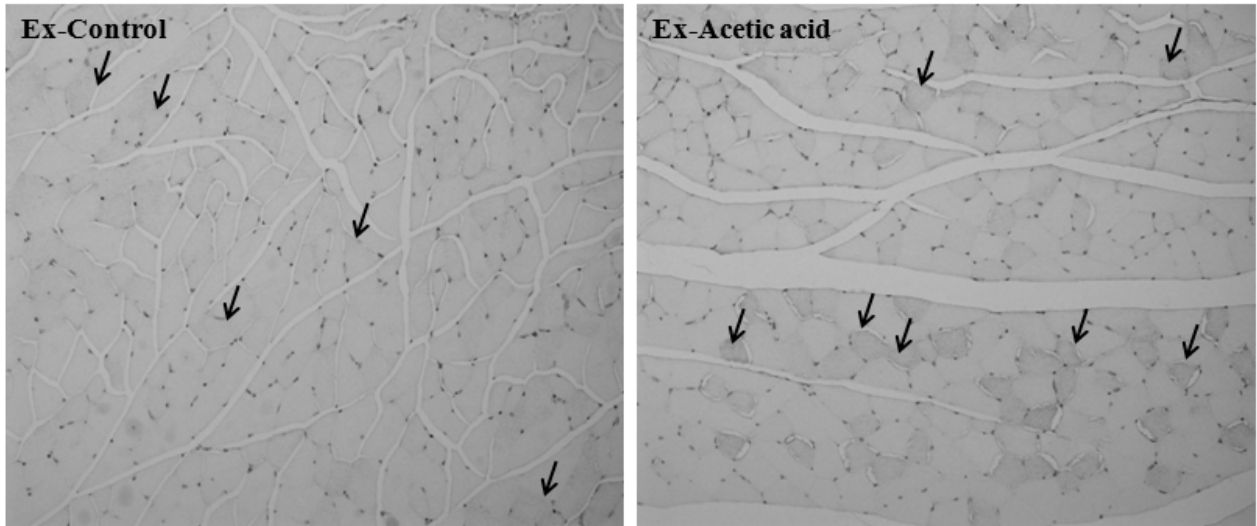


Fig 16. 운동 시 초산 투여가 생쥐의 근육 속성 전환에 미치는 영향

- 단백질발현결과에서 slow muscle의 비율이 유의적으로 증가한 초산 투여군의 골격근에서 면역염색을 통한 muscle typing을 실시하였다 (Fig. 16). 면역염색에 사용된 항체는 단백질발현 실험에서 사용된 항체와 동일하며 발색은 DAB staining을 통하여 확인하였다. 염색결과 초산 투여군의 근육조직에서 비교적 대조군보다 많은 slow muscle fiber가 확인되었다.

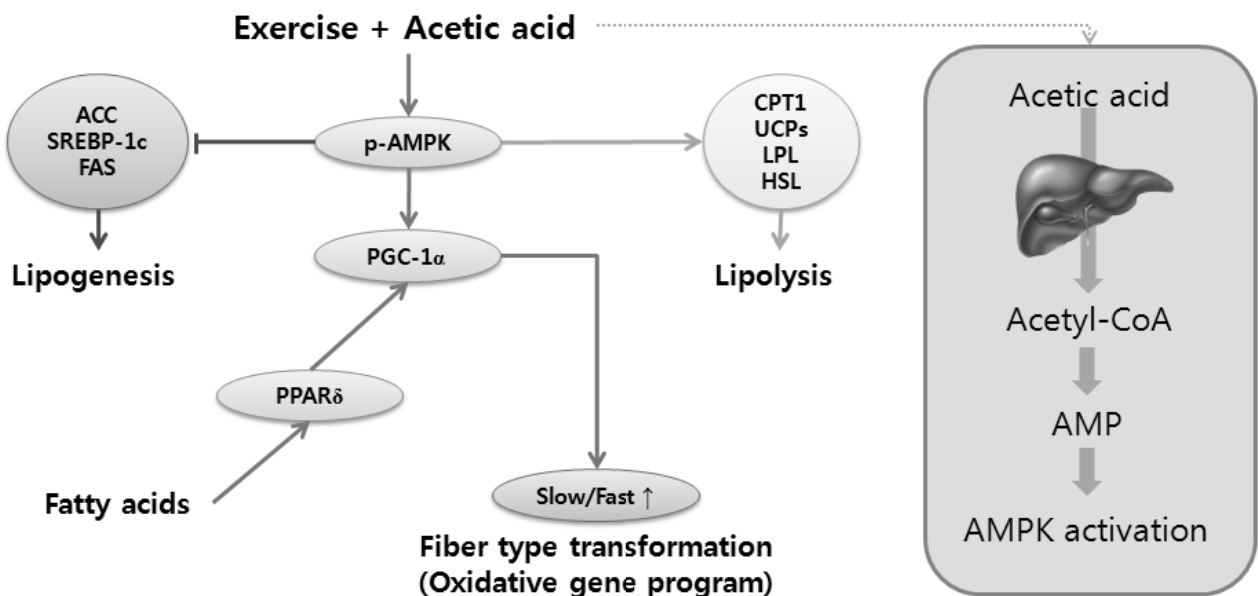


Fig. 17. 운동 시 초산 투여가 지방산 대사의 작용기작에 미치는 영향

- 초산 투여 시 간조직에서의 지방산화 및 에너지소비 증가에 의한 체지방감소에 대한 많은 보고가 이루어져 왔다. 이는 초산에 투여에 의한 AMP-to-ATP 비율의 증가에 따른 AMPK activation에 의한 것이며, 본 연구에서도 마찬가지로 식이섭취변화 없이 복부지방의 축적이 억제되었다. 본 연구팀은 초산에 의한 AMPK activation이 간에서 뿐만아니라 운동능력 및 에너지대사에 직접적으로 연관된 골격근에도 동일하게 발생할 것으로 예상하여 AMPK에 의하여 매개되는 signalling pathway를 규명하기 위하여 본 연구를 진행하였다. 또한 운동에 대한 근육의 적응은 지방산화 및 근육 속성전환 관련인자들과 밀접한 연관을 가지며 이는 지구력의 증가에 기여하므로 초산 투여 시 지방산화 및 근육 속성전환 관련인자들을 분석하였다. 가설대로 초산에 의하여 AMPK activation의 증가를 확인 할 수 있었다. AMPK는 PGC-1 α 의 발현을 조절하는 주요 인자로서, 약물에 의해 유도된 AMPK activation에 따라 PGC-1 α 의 발현이 증가하였으며 Terada 등 (2002)은 지구력 운동 직후에 PGC-1 α mRNA의 발현이 증가했다고 보고하였다. 증가된 PGC-1 α 의 발현은 fast-to-slow 근육 속성전환에 영향을 미치는 것으로 보고되었다. Calcineurin-Mef2 pathway는 근육 속성전환에 영향을 주는 pathway로 알려져 있으며 PGC-1 α 는 이 Calcineurin-Mef2 pathway의 downstream protein으로 보고되었다 (Lin 등, 2002). 아직까지 PGC-1 α 와 근육 속성전환의 명확한 작용기전 규명은 완전히 이루어지지 않았으나, PGC-1 α 가 근육 속성전환에 영향을 미치는 하나의 인자라는 것은 분명하다. 따라서 본 연구결과에서 초산의 투여가 운동에 따른 근육 AMPK, PPAR δ , PGC-1 α 등의 mRNA 및 단백질 발현 조절을 통하여 MHC isoform의 변화를 자극하고 지구력을 증가 시키며, CPT1, UCP, HSL 등의 지방산화관련 gene의 발현의 자극을 통하여 지구력 증가에 필요한 에너지를 보충한 것으로 사료된다 (Fig. 17). 동시에 기존에 보고된 바와 같이 ACC, SREBP-1c, FAS 등의 지방합성관련 gene의 발현은 억제하여 체지방감소에도 영향을 미친 것으로 분석된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

년차	항목	세부내용	12월	1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월
1 년 차	체중조절 및 비만상태효능 검증 (<i>Ex vivo</i>)	식초가 지방 세포 분화에 미치는 영향 확인	■	■	■									
		식초 처리에 의한 지방 세포의 유전자 변화 확인			■	■	■							
	체중조절 및 비만상태효능 검증 (<i>In vivo</i>)	동물실험 설계 및 농도설정					■	■						
		동물실험							■	■				
		혈행관련 생화학적 지표측정									■	■	■	
	조직으로부터 지방산 산화관련 유전자 발현 측정										■	■	■	
2 년 차	트레드밀 이용, 3단 발효식초 의 운동능력 개선 효능검증	3단 발효식초의 지방세포 분화억제 효능평가	■	■										
		3단 발효식초 섭취동물의 트레드밀 운동			■	■	■	■						
		3단 발효식초 섭취 후 운동한 쥐의 혈중 생화학지표 비교								■				
		3단 발효식초와 섭취 후 운동한 쥐의 조직내 지방산 산화 및 근육 속성변화관련 유전자 및 단백질 발현 확인								■	■	■		
		3단 발효식초와 일반식초 섭취 후 운동시 지방대사와 근육 속성 변화간의 상관관계 연구										■	■	■

1. 관련분야에의 기여도

초산의 간 내 지질개선 효능 및 운동능력과 직결되는 glycogen 보충효능은 보고되어 지구력증진에 대한 가능성 제고가 필요한 시점이나 이에 대한보고는 미비하다. 특히, 초산에 의한 근육 내 지방산화 및 근육 속성전환과 관련된 signalling pathway에 대한 명확한 규명이 부족한 실정에서 본 연구를 통하여 해당분야의 ‘gap filling’을 일부 이루어 낸 것은 큰 의미가 있다. 또한 수입일변도의 ergogenic aid 시장에 국산 제품의 입지 개선에 이바지 할 수 있을 것으로 사료된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

- 가. 2013년 11월 13일~15일, 한국식품영양과학회, 포스터발표 (우수 포스터상 수상)
- 나. 2014년 12월 31일, 논문 게재, Food Science and Biotechnology
- 다. 2015년 1월 논문 투고, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry(SCI급)

제 2 절 성과활용 계획

- 가. 2015년 상반기 논문 투고 예정

제 6장 참고문헌

- 소인철 & 최성근, 감식초와 옥타코사놀 혼합섭취가 운동수행능력과 혈중 피로요인에 미치는 영향, 한국체육과학회지, 2007, 16, 791-802.
- 황용철 & 신광순, 감식초에서 분리한 면역활성다당의 특성, 한국식품과학회지, 2008, 40, 220-227.
- 정은정 등, Volatile flavor compounds in commercial vinegar beverages derived from fruits, J. Life Sci., 2011, 21, 292-299.
- 문연정 등, Effect of persimmon-vinegar on lipid and carnitine profiles in mice, Food Sci. Biotechnol., 2010, 19, 343-348.
- 백하나 & 강상모, 콜라겐과 식초의 복합식이 여성의 혈액 및 피부 거칠기 개선에 미치는 효과, 한국미용학회지, 2010, 16, 1075-1087
- 백하나 & 강상모, 콜라겐과 식초의 복합식이 여성의 피부색 개선에 미치는 효과, 한국미용학회지, 17, 2010, 116-126.
- A. Davalos, et al., Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars, Food Chem., 2005, 93, 325-330.
- Q. Xu, et al., Antioxidant activity of vinegar melanoidins, Food Chem., 2007, 102, 841-849.
- S. Sakanaka & Y. Ishihara, Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates, Food Chem., 2008, 107, 739-744.
- E. Ostman, et al., Vinegar supplementation lowers glucose and insulin responses and increases satiety after a bread meal in healthy subjects, Eur. J. Clin. Nutr., 2005, 59, 983-988.
- T. Fushimi, et al., The efficacy of acetic acid for glycogen repletion in rat skeletal muscle after exercise, Int. J. Sports Med., 2002, 23, 218-222.
- M. Kishi, et al., Enhancing effect of dietary vinegar on the intestinal absorption of calcium in ovariectomized rats, Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63, 905-910.

- C. S. Johnston, et al., A Preliminary evaluation of the safety and tolerance of medicinally ingested vinegar in individuals with type 2 diabetes, *J. Med. Food*, 2008, 11, 179-183.
- M. Setorki, et al., Acute effects of vinegar intake on some biochemical risk factors of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits, *Lipids Health Dis.*, 2010, 9, 1-8.
- A. Armentia, et al., Vinegar decreases allergenic response in lentil and egg food allergy, *Allergol. Immunopathol.*, 2010, 38, 74-77.
- D. Kalman, et al., Effect of pyruvate supplementation on body composition and mood, *Curr. Therapeutic Res.*, 1998, 59, 793-802.
- T. Fushimi & Y. Sato, Effect of acetic acid feeding on the circadian changes in glycogen and metabolites of glucose and lipid in liver and skeletal muscle of rats, *Brit. J. Nutr.*, 2005, 94, 714-719.
- K. Baar, et al., Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1, *FASEB J.*, 2002, 16, 1879-1886.
- A. P. Russell, et al., Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor- α in skeletal muscle, *Diabetes*, 2003, 52, 2874-2881.
- J. Lin, et al., Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres, *Nature*, 2002, 418, 797-801
- S. Liquet, et al., Peroxisome proliferator-activated receptor δ controls muscle development and oxidative capability, *FASEB J.*, 2003, 17, 2299-2301.
- D. J. Mahoney, et al., Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise, *FASEB J.*, 2005, 19, 1498-1500.
- M. Schuler, et al., PGC1 α expression is controlled in skeletal muscles by PPAR β , whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes, *Cell Metab.* 2006, 4, 407-414.
- J. H. Kim, et al., Dietary Conjugated Linoleic Acid Increases Endurance Capacity of Mice During Treadmill Exercise, *J. Med. Food*, 2010, 13, 1057-1060.
- L. Wang, et al., The decapeptide CMS001 enhances swimming endurance in mice, *Peptides*,

2008, 29, 1176-1182.

S. Sakakibara, et al., Acetic acid activates hepatic AMPK and reduces hyperglycemia in diabetic KK-A(y) mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, 344, 597-604.

T. Kondo, et al., Acetic Acid Upregulates the Expression of Genes for Fatty Acid Oxidation Enzymes in Liver To Suppress Body Fat Accumulation, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 5982-5986.

V. A. Narkar, et al., AMPK and PPAR delta Agonists are exercise mimetics, *Cell*, 2008, 134, 405-415.

S. Terada, et al., Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 296, 350-354.

주 의

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