

발간등록번호

11-1543000-000185-01

막걸리 및 막걸리 유래 유산균의 기능활성 탐색 및  
이를 활용한 새로운 기능성 막걸리 제품 개발  
(Evaluation for functionalities of Makgeolli and its lactic  
acid bacteria (LAB) and development of new functional  
Makgeolli)

(주)국순당

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “막걸리 및 막걸리 유래 유산균의 기능활성 탐색 및 이를 활용한 새로운 기능성 막걸리 제품 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 6 월 일

주관연구기관명 : (주)국순당

주관연구책임자 : 신 우 창

세부연구책임자 : 신 우 창

연 구 원 : 박 선 영

연 구 원 : 박 종 욱

연 구 원 : 조 성 원

협동연구기관명 : 경희대학교

협동연구책임자 : 박 천 석

협동연구기관명 : 성균관대학교

협동연구책임자 : 홍 성 렬

# 요 약 문

## I. 제 목

막걸리 및 막걸리 유래 유산균의 기능활성 탐색 및 이를 활용한 새로운 기능성 막걸리 제품 개발에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

막걸리는 우리나라 고유의 술로서 현재 국내에서는 막걸리와 관련하여 많은 관심을 가지고 있으나 기초적이고 과학적인 연구에 있어서는 보다 많은 지식 축적이 필요하다. 특히 곡류 발효식품으로서 발효와 효모 외 생막걸리 발효에 직접적인 영향을 주는 유산균 및 유산균 발효에 관한 연구는 미진한 편이다. 막걸리 제조에 쓰이는 누룩에서 유산균에 관한 연구가 극히 소수 보고 되었지만, 국내에서 생산되는 생막걸리 내의 유산균에 관한 연구는 전무한 실정이다. 이에 본 연구과제는 국내에서 시판 중인 다양한 생막걸리 내에 존재하는 유산균의 분포도와 기능성을 평가하고 이 중 관능적으로 우수하고 기능성이 뛰어난 유산균을 분리하여 이를 활용한 신개념의 probiotics & prebiotics 생막걸리를 제품화하는데 있다. 또한 막걸리 및 개발된 시제품에 대한 기능활성을 규명함으로써 막걸리의 가치와 경쟁력을 보다 강화시키는데 있다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

누룩 및 막걸리에 존재하는 유산균을 분리하고 16s rRNA PCR-RFLP 분석법을 통하여 분리된 유산균을 동정한 다음 분리된 유산균의 항균활성, 내산성, 내담즙성, 장 부착성 등 probiotics로서의 기능활성을 평가하였다. 또한 분리된 유산균 중 GABA 생성능 평가와 유산균 EPS에 대한 기능성을 평가 연구를 수행하였다. 관능적 측면과 기능적인 측면에서 우수한 유산균을 선별하고 유산균 발효 제어 기술을 구축하여 이를 활용한 유산균 및 기능성 강화 유산균 막걸리 2종을 개발하였다. 막걸리 및 개발된 막걸리 시제품에 대한 기능성을 평가 및 확인함으로써 상품화에 필요한 기반 연구를 수행하였으며, 막걸리 시제품의 미백효과와 주름 개선 효과도 확인하였다.

## IV. 연구개발 결과

국내 시판되는 20종의 생막걸리를 대상으로 유산균 균체수와 균총을 확인한 결과, 거의 모든 막걸리에서 mL 당  $10^6$  이상의 유산균을 함유하고 있었으며 막걸리 원료 중 누룩과 사용된 효모 제품 유래로 분석되었다. 16s rRNA PCR-RFLP 분석법을 통하여 분리된 유산균을 동정한 결과 대부분의 제품에서 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei/paracasei* 가 우점종으로 존재하였고 몇몇 제품에서는 *Lactobacillus brevis*가 우점종으로 존재하였다. 막걸리의 유기산을 분석한 결과, 유산균에 의한 대사산물인 lactic acid를 많이 함유하고 있었으며 제품에 따라 다양한 유기산 조성을 나타내고 있었다. 시판 막걸리를 대상으로 생리 기능활성을 평가하였다. 막걸리 동결건조물로 CAM assay를 통하여 농도 의존적으로 angiogenesis가 억제됨

을 확인하였다. 막걸리의 항비만 효과를 전지방세포인 3T3-L1 세포주를 사용하여 평가한 결과, 대조군 대비 막걸리는 전지방세포 분화를 저해하였으며, 특히 100ug/mL 농도에서 40~70% 수준으로 분화를 억제하였다. 중앙 침투성 억제 활성과 암 전이와 밀접하게 관련되어 있는 MMP-2, MMP-9 억제능을 평가하기 위하여 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231을 사용하여 invasion assay와 zymography & western blotting을 수행한 결과 80% 메탄올 추출물에서 농도의존적으로 metastatic & invasive activities가 억제됨을 확인하였으며, 암 전이와 밀접하게 관련되어 있는 MMP-2, MMP-9의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 이런 결과를 종합하면 막걸리는 신생 혈관 생성 억제, 항비만, 암 전이 억제활성을 가지고 있으며, 이는 막걸리의 누룩과 미생물 균총의 2차 대사산물의 효과에 기인된다고 생각된다.

우점종으로 존재하는 막걸리 유래 유산균을 탄소원으로 sucrose 2%, 질소원으로 밀누룩 3%로 한 배지로 고농도 배양을 한 뒤 막걸리 1단 담금 시 투입 유산균 발효 수행하여 유산균에 의한 젖산이 saturation 되도록 한 뒤 2단에서 쌀 원료 및 효모등을 투입하여 알코올 발효를 진행하는 유산균 발효 제어 기술을 개발 및 구축하였다. 구축된 기술을 바탕으로 내산성, 내담즙성이 있고 Prebiotics로 작용할 수 있는 EPS(exopolysaccharide)의 생성능이 탁월한, 막걸리 유래 유산균인 *Weissella cibaria* KSD-914를 이용하여 recipe 및 공정을 개발하고, Large scale pilot plant를 통해 유산균 함량이 높은 알코올 도수 6%의 *W. cibaria* KSD-914 유산균 막걸리를 시생산하였다. 개발된 시제품은 adipocyte differentiation 및 reverse transcription & realtime PCR을 통한 전지방세포 분화 활성 평가에서 다른 시판 생막걸리 대비 현저한 전지방세포 분화 억제력 및 지질 대사에 관련된 유전자 발현 억제력을 확인하였으며, NO assay를 통하여 면역 증가효과가 있는 것으로 평가되었는데 이는 *W. cibaria* KSD-914 가 일반적인 유산균과 비교하여 더 강하게 p38의 phosphorylation을 불러일으켜 AP-1 signaling pathway 자극을 통한 대식세포 활성화 증강에 대해 확인하였다.

막걸리에서 새로이 분리한 내산성, 내담즙성 및 장 부착능이 탁월하고 유산균의 면역증강 효과를 확인된 *Pediococcus pentosaceus* K5, *P. acidilactici* K5를 *W. cibaria* KSD-914 와 함께 복합적으로 사용하고 자연 발효를 통한 감산미를 부여하고자 밀누룩 함량을 높인 알코올 도수 7%인 기능성 강화 유산균 막걸리 시제품을 개발하였다. Large scale pilot plant를 통해 생산된 시제품은 Shelf-Life Test를 통해 10℃ 냉장 시 유통기한 6일(안전 계수 0.7)로 평가된 일반막걸리보다 높은 유통기한 14일(안전계수 0.7)로 평가되어 안정성을 확보하였다. 개발된 시제품은 면역 증강 효과가 기존 생막걸리에 비해 매우 탁월한 것으로 평가되었으며, 미백 및 주름 개선 효과도 확인되었다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구 과제를 통하여 “내산성 및 내담즙성이 있는 와이셀라 시바리아 KSD-914 (10-2012-0061554)”, “프로바이오틱스 유산균의 함량 및 안정성이 높은 유산균 막걸리의 제조방법(10-2013-0022953)”, “풍미와 안정성이 향상된 막걸리의 제조방법(10-2013-0053154)”에 대한 국내 특허를 출원하였다. 국내학회지에 논문 게재와 추가적인 투고를 위한 논문을 작성 중에 있다. 언론 매체를 통한 홍보와 국내학술대회에서 포스터 발표 등으로 본 연구성과를 발표하였다. 또한 2011년도 한국식품과학회 주관 “우리술 막걸리의 우수성”에 관한 심포지엄에서 막걸리의 건강기능성을 발표하였다. 주관연구기관인 (주)국순당에서 직원 및 일반인 대상으로

하는 우리술 교육에서 본 연구성과의 일부를 교육 콘텐츠로 활용하고 있다.

본 연구에서 개발한 막걸리 제품은 실용화·산업화를 위하여 제조방법추가신고를 작성하였으며 국내 막걸리 시장 현황에 따라 제품 출시 여부를 검토 중에 있다.

# SUMMARY

(영문 요약문)

## I. Title

Evaluation for functionalities of Makgeolli and its lactic acid bacteria (LAB) and development of new functional Makgeolli

## II. Background and purpose

Makgeolli is a Korea's unique grain fermented alcoholic beverage with great domestic interest, but there is little scientific data available and more research must be done regarding the beverage. Lactic acid bacteria and the lactic fermentation it carries out, has a direct effect on fermentation, yeast, and production of draft makgeolli; however, research about lactic acid bacteria is significantly lacking. Even though there have been few scientific reports about lactic acid bacteria in nuruk, which is used for the production of draft makgeolli, there is no reports about lactic acid bacteria in domestically produced draft makgeolli. This research is aimed at developing and commercializing a new type of probiotics & prebiotics draft makgeolli using lactic acid bacteria. These lactic acid bacteria were chosen from commercially available makgeolli products and selected for their superior sensory evaluation results and functions. Finally, this research also serves to improve makgeolli's product value and market competition by identifying functional activities of makgeolli and the newly developed product.

## III. Content and scope of research and development

We evaluated lactic acid bacteria's function as probiotics regarding its anti-bacterial activity, acid and bile tolerance, adhesion rate to intestines, and more. Lactic acid bacteria were selected from those in nuruk and makgeolli, then separated using 16s rRNA PCR-RFLP method. Moreover, GABA production and EPS function evaluations were done among the selected lactic acid bacteria. Two new types of lactic acid bacteria fortified makgeolli were developed by choosing lactic acid bacteria with superior sensory evaluation results and functions, then applying lactic acid bacteria fermentation regulation technique during the production process. Fundamental research required for commercialization was carried out by evaluating and confirming the functions of makgeolli and the new product. Additionally, potential application was tested by confirming the effect of the new makgeolli on skin whitening and wrinkle reduction process.

#### IV. Results and discussion

After evaluating 20 commercially available draft makgeolli and the types and number of lactic acid bacteria (LAB) in the makgeolli, most of the makgeolli contained over  $10^6$  cfu/mL of LAB, which were analyzed based on type of nuruk and yeast product used to make the makgeolli. In majority of the makgeolli products, *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* and *L. paracasei* were dominantly present, while some other products had *L. brevis* as the dominant strain. Analysis of organic acid composition of makgeolli revealed that it contained LAB's metabolite lactic acid and organic acid composition varied depending on the product. Functional physiological effects of makgeolli were tested using commercially available makgeolli. Through freeze-dried makgeolli's CAM assay, it was confirmed angiogenesis was suppressed depending on the concentration. After analyzing makgeolli's anti-obesity effect by using fat cells known as 3T3-L1, makgeolli suppressed the growth of fat cells when compared to the controls.

Differentiation of fat cells were suppressed at levels of 40~70% at concentration of 100ug/mL of makgeolli. Makgeolli's effect on tumor was tested out by carrying out tests on MMP-2, which is closely related to cancer metastasis. Invasion assay and zymography & western blotting were used on breast cancer cell, MDA-MB-231, to test the suppression of MMP-9. using 80% methanol extraction, metastatic & invasive activities were suppressed based on concentration; expression of MMP-2 and MMP-9, both of which are closely related to cancer metastasis, were also reduced. In conclusion, makgeolli can inhibit angiogenesis, obesity and cancer. This capability is attributed possibly by second metabolites from nuruk and other microorganism in makgeolli.

During the initial step of creating this new makgeolli, high concentration of LAB and nuruk(wheat bran) are used. LAB are chosen from makgeolli and chosen for their dominant growth. LAB were cultured using 2% sucrose while nuruk powder were cultured using 3%. The initial fermentation is carried out until lactic acid from LAB becomes saturated, then additional rice and yeast are added for secondary fermentation. finally, a technique has been developed to effectively suppress alcoholic fermentation. Based on this technique, recipe has been created using *Weissella cibaria* KSD-914, which is a LAB from makgeolli with high production rate of EPS (exopolysaccharide) for prebiotics and high resistance to acid and bile. Makgeolli was created at large scale pilot plant with level of alcohol at 6% and high level of *W. cibaria* KSD-914. The newly developed product, compared to other commercially available makgeolli, significantly reduced differentiation of fat cells and genetic expression involving lipid cells based on tests involving adipocyte differentiation and reverse transcription & realtime PCR. The product has been, based on NO assay, proven to increase immune system as well. This is due to enhanced activity of macrophage caused by stimulation of AP-1 signaling pathway from stronger phosphorylation at p38 by *W. cibaria* KSD-914 compared to other LAB.

New functional Makgeolli with level of alcohol at 7% was developed. The product involved combining *Pediococcus pentosaceus* K5 and *P. acidilactici* K5, both of which have

been confirmed to have high tolerance to acid and bile with high adhesion rate to the intestine, with *W. cibaria* KSD-914. concentration of nuruk was increased to enhance the taste through natural fermentation. The new functional makgeolli, which was created using large scale pilot plant, was proven to have better stability compared to other commercial products based on shelf-life test expiration days came into 14 days (safety factor 0.7) when stored at 10°C. The new makgeolli also had higher capability to increase immunization, skin whitening, and wrinkle reduction process compared at other draft makgeolli products.



# CONTENTS

## (영 문 목 차)

Description for submission .....	1
Summary .....	2
Summary in English .....	5
Contents in English .....	8
Contents .....	9
Part 1. Introduction .....	10
1. Backgrounds .....	10
2. Purpose .....	12
Part 2. Present status of the techniques .....	13
1. Domestic and foreign trends in research field .....	13
2. Expectation effects of technical development .....	14
Part 3. Methods and Results .....	15
1. Research section 1 .....	15
2. Research section 2 .....	54
3. Research section 3 .....	77
Part 4. Evaluation .....	99
1. Annual evaluation .....	99
2. Achievement .....	103
Part 5. Practical use and application .....	104
1. Plan of practical use and industrialization .....	104
2. Plan of technical proliferation .....	107
3. Plan of intellectual property .....	107
Part 6. Foreign technical information .....	109
Part 7. References .....	112

# 목 차

제출문 .....	1
요약문 .....	2
영문요약문 .....	5
영문목차 .....	8
목차 .....	9
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	10
제 1 절 연구개발의 필요성 .....	10
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용 .....	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	13
제 1 절 연구개발 대상의 국내·외 기술 현황 .....	13
제 2 절 기술개발의 기대 효과 .....	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	15
제 1 절 세부연구과제 .....	15
제 2 절 제1협동연구과제 .....	54
제 3 절 제2협동연구과제 .....	77
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	99
제 1 절 연구개발 목표 및 평가 착안점 .....	99
제 2 절 연구개발 목표 달성도 .....	103
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	104
제 1 절 실용화·산업화 계획 .....	104
제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획 .....	107
제 3 절 특허·논문 등 지적재산권 확보 계획 .....	107
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	109
제 7 장 참고문헌 .....	112

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

- 막걸리에 대한 사회적 환경 변화에 따른 소비자 수요가 꾸준히 증가하고 있다. 2009년 소주와 맥주, 위스키의 소비량은 줄어든 반면 막걸리 소비는 크게 늘었다. 통계청에 따르면 지난해 막걸리 내수량은 20만2천KL로 2008년 13만5천629KL에 비해 49% 증가했다. 막걸리가 통계에 잡히기 시작한 2000년 9만2천52KL에 비하면 2배 이상 늘어난 수치다. 생산량도 크게 늘었다. 2009년 막걸리 생산량은 20만7천925KL로 2008년 14만161KL에 비해 48.3% 증가하였다. 그러나 최근 막걸리 성장세가 다소 둔화됨에 따라 막걸리의 과학적인 규명을 통해 다시 한 번 재도약 할 수 있는 기반 마련이 필요하다.
- 막걸리는 알코올 도수가 낮아 부담 없이 즐길 수 있는 데다 효모 및 유산균이 살아있고 식이섬유, 비타민, 아미노산 등 영양학적 측면에서도 다른 어떤 술보다 웰빙주로 인정받아 소비자들에게 좋은 반응을 얻고 있으며, 막걸리의 기능성이 최근 규명되기 시작하면서 국내뿐만 아니라 일본, 중국 등 해외에서도 크게 인기를 끌어 수출량이 증가하고 있는 추세이다.
- 막걸리는 찹쌀·멥쌀·보리 등에 누룩과 물을 섞고 일정한 온도에서 발효시킨 것을 거르지 않고 마시는 술로, 빗같이 뜨물처럼 희고 탁하며 6~7%로 비교적 알코올 성분이 적은 술이다. 막걸리는 단맛, 신맛, 쓴맛, 떫은맛이 잘 어울리고 감칠맛과 시원한 맛이 나타나는 것이 특징이며 발효할 때에 알코올 발효 이외에도 유산균 발효가 이루어지며, 다양한 유기산 및 식이섬유가 풍부한 것으로 알려져 있다[1-3].
- 유산균은 식품의 보존성 향상, 식품의 풍미 증진, 인간의 건강 증진 등의 목적으로 광범위하게 이용되고 있다. 최근 소비자의 기호가 다양화되면서 우수한 맛과 향뿐만 아니라 기능성 물질을 생산하는 새로운 균주의 개발이 점점 중요시 되고 있다. 이를 위해 다양한 식품에서 보다 우수한 기능성 유산균을 분리하려는 노력이 세계 각국에서 이루어지고 있다. 하지만, 우리나라는 유산균 제품의 종균을 대부분 일본, 미국, 프랑스, 독일, 덴마크 등 외국 선진국으로부터 수입하고 있는 실정이며, 일부 국내 종균을 개발하여 제품화 하였지만, 유산균 제품 시장 규모에 비하여 유산균 개량 기술 수준이 선진국에 비해 크게 뒤떨어 있는 실정이다. 이에 우리나라 고유의 유산균 종균 개발이 시급한 실정이다.
- 막걸리에서 이루어지는 유산균 발효는 다양한 유기산 생성에 관여하여 막걸리의 풍미를 풍부하게 하고, 유해 세균의 성장 억제 등 긍정적인 영향을 주는 반면, 과 발효 시에는 단맛의 소실과 함께 신맛과 쓴맛이 상대적으로 증가하게 되어 제품 품질을 저하시키는 문제점이 있다.

- 막걸리의 영양학적 가치 측면은 꾸준히 진행되어 왔으나, 심층적인 연구와 작용 기전에 대한 연구는 미비한 수준이다.
- 전 세계인에게서 각광받고 있는 포도주의 경우 ‘프렌치 패러독스(French Paradox)’와 ‘라스베라트롤(Resveratrol)’이란 두 단어가 절대적인 기여를 했다. ‘프렌치 패러독스’는 포도주를 즐기는 프랑스인이 같은 서구인인 미국·영국인보다 심장병 사망률이 절반에 불과한 것을 뜻하는데 자연스럽게 포도주에 웰빙·건강 이미지가 심어졌다. ‘라스베라트롤’은 포도주에 든 항산화 성분의 하나로 포도주 외에도 ‘라스베라트롤’이 든 식품은 땅콩 등 오만가지인데 사람들의 뇌 속에 포도주와 ‘라스베라트롤’만이 각인되었다. 이러한 배경에는 포도주 수출국 학자들이 포도주에 든 ‘라스베라트롤’의 웰빙 효과를 증명하는 연구들을 쏟아내 간접 지원한 데에 있다.
- 본 과제 수행을 통해 막걸리의 우수성이 과학적으로 입증되면 막걸리가 와인의 ‘프렌치 패러독스’보다 더욱 설득력 있는 ‘코리안 패러독스’로 세계에 널리 인정받을 수 있는 바탕을 마련할 수 있을 것이다.

## 2. 연구개발의 필요성

- 현재 국내에서는 막걸리 관련하여 많은 관심을 가지고 있으나 그 기초적인 연구에 있어서는 아직 많은 기술의 축적이 필요하다. 특히, 균주 분야에 있어서 막걸리 발효와 관련된 유산균에 대해서는 그 연구가 극히 미진하다. 또한, 막걸리 제조의 원재료인 누룩 및 입국에서의 유산균에 관한 연구가 극히 소수 보고 되었지만, 국내에서 생산되는 생막걸리 내의 유산균 분포에 대한 연구는 전무한 실정이다. 이는 막걸리 발효에서의 유산균 발효에 대한 기초적인 자료도 아직 과학적으로 정립 되지 않았음을 의미한다. 따라서 국내 생막걸리의 세계화 및 품질 혁신을 위해서는 국내에서 생산되는 생막걸리와 관련된 유산균의 분석, 분류, 동정 및 이의 기능성에 대한 연구의 실행은 필수적이다.
- 이에 본 연구는 국내에서 판매중인 다양한 생막걸리 내에 존재하는 유산균 종의 분포에 대한 데이터를 구축하고 이 중 기능성이 뛰어난 유산균을 분리하여 이를 활용한 신개념의 probiotics 및 prebiotics 생막걸리를 제품화하여 막걸리의 경쟁력을 한층 강화하고자 한다.

## 제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 연구개발의 최종목표

- 국내 시판 중인 생막걸리에 존재하는 유산균의 분포 조사 및 동정
- 생막걸리 내 기능성 유산균 발굴 및 기능성 확인
- 기능성이 우수한 유산균 선정 및 막걸리 알코올 발효 시 유산균 발효 제어 기술 확보
- 유산균 및 기능성이 강화된 막걸리 제품 개발 및 상품화(2건 이상)
- 막걸리 유래 유산균의 생리 기능성 규명 및 확립(암 예방/항암, 지질대사 개선, 다이어트)
- 막걸리의 생리 기능성 규명 및 확립(암 예방/항암, 지질대사 개선, 다이어트)

### 2. 연구개발의 목표 및 내용

지속적인 성장과 세계화를 위해서는 막걸리의 가치와 차별화 요소를 발굴 및 부여하여야 한다. 본 연구진은 생막걸리 제품 내에서 효모 및 유산균 발효 제어 기술을 근간으로 한 ‘탁주의 제조방법(등록특허 10-0936994)’ 특허를 출원 및 등록하였으며 이를 바탕으로 유통기한 30일로 연장된 ‘국순당생막걸리’ 제품을 출시하였다. 또한 연구과제의 선행연구를 통하여 전통누룩 유래 미생물의 심혈관계 활성화 (혈전생성 억제·지질대사 개선)과 항암 활성화 (암 세포死 유도·전이 억제), 그리고 항염증 활성을 확인하였다. 선행연구 결과를 바탕으로 막걸리 제품에서 기능성 차별화 요소를 부여할 수 있는 가능성을 엿보았다.

본 연구는 누룩 및 막걸리에 존재하는 유산균을 분리 및 동정하고 분리된 유산균의 probiotics로서의 기능활성과 시판 막걸리를 대상으로 막걸리의 기능활성을 평가할 예정이다. 기능성이 우수한 유산균을 바탕으로 기능성 막걸리를 개발하고 개발된 제품의 암 예방, 항암 작용, 면역증강 활성화 등을 규명하여 막걸리의 가치를 올려줌으로써 막걸리의 지속적인 성장과 세계화에 대한 발판을 마련하고자 한다.

본 연구과제의 각 연차별 목표는 다음과 같다.

- 1차년도 (2010년)
  - 막걸리 발효 시 유산균 제어 기술 확보
  - 국내 시판 중인 생막걸리에 존재하는 유산균 균종 확인(분리 및 동정)
  - 막걸리의 생리 기능활성 규명(항암 활성화, 지질대사 개선 등)
- 2차년도 (2011년)
  - 유산균 막걸리 제품 개발(시제품1)
  - 생막걸리 유래 유산균의 기능성 평가
  - 유산균 유래 EPS의 기능활성 규명
  - 시제품1에 대한 기능활성 평가 및 규명(항암 활성화, 지질대사, 면역증강 등)
- 3차년도 (2012년)
  - 기능성이 강화된 막걸리 제품 개발(시제품2)
  - 기능성이 입증된 유산균의 생육 특성과 내산성 및 장 부착능 등 probiotics로서의 능력 확인 및 최종 선정
  - 시제품2에 기능활성 평가 및 규명(항암 활성화, 지질 대사 개선, 면역 증강 등)

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 연구개발 대상의 국내·외 기술 현황

#### 1. 국내 기술 개발 현황

- 막걸리의 영양학적 연구로 유산균의 다량 함유, 풍부한 식이섬유, 비타민 B함유 등 확인
- 막걸리의 기능성 효과는 혈압 및 혈당 저하, 혈중 콜레스테롤 억제 및 항암에 대한 효과가 알려져 있으나 심층적인 연구와 작용 기전에 대한 연구는 미비한 수준임
- 전통약주의 암 세포 성장 및 전이 억제 활성화와 위 보호 효과에 대한 작용 기전 규명
- 전통주 제조에 활용되는 누룩 미생물의 배양물과 이를 이용한 전통주에서 유효 물질을 분리 동정하고 그에 대한 항암 및 심혈관계 활성화 규명
- 전통주의 소재로 사용되는 한약재에 대한 생리 기능활성 연구가 진행되고 있으며 항산화, 혈전 용해, 미백 활성화 등 국한된 기초 연구 수준으로 수행 중임
- 식물성 유산균은 야채나 과일, 콩, 쌀이나 보리 등 식물 소재에서 유래된 유산균이며 발효유에서 기인된 동물성 유산균과는 다르다. 김치에는 다양한 식물성 유산균이 존재하며 생리 활성화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나 상업적 접목은 저조한 실정이며, 막걸리에도 다양한 식물성 유산균이 존재함에도 불구하고 김치 분야에 비해 연구는 미비한 수준임.
- GABA는 자연계에 널리 분포하는 비단백질 구성 아미노산으로 acetylcholine이라 불리는 신경전달 물질을 증가시키고 뇌기능을 촉진시키는 등의 생리작용을 한다. GABA에 관한 연구는 다양한 미생물에 의한 생산이 보고되어지고 있으며, 최근에는 쌀 및 콩 발효 식품, 김치 및 젓갈 등에서 분리한 다양한 유산균들이 GABA를 고농도로 생산하는 것으로 보고되었다.
- Probiotics는 장내 미생물의 균형을 개선함으로써 숙주인 사람에게 유익하게 작용하는 살아있는 미생물로서 대표적으로 유산균이 이에 해당된다. 막걸리는 다양한 유산균이 살아있는 유일한 알코올음료로 생리 기능활성 규명을 통해 가치를 부여하고 probiotics 유산균을 강화한다면 막걸리의 대중화 및 세계화에 대한 기반을 마련할 수 있을 것이다.
- 미생물에 의해 생성되는 exopolysaccharide (EPS)는 물에 녹거나 분산되는 긴 사슬의 고분자 중합체로 미생물의 1차 또는 2차 대사산물인 다당류이다. EPS는 미생물이 다량으로 생성하는 다당류 중 하나이며, 배양액으로부터 회수가 쉽고, 정제비용이 적게 들므로 상업적 잠재력이 상대적으로 높은 다당류이다. 최근 EPS가 과거 단순 물성소재로써가 아니고 생체 중요 정보물질로서의 생리 기능소재로서 주목 받고 있는데, 유산균 중 *Bifidobacteria* 와 *Lactobacillus* sp. 로부터 유래한 EPS의 항암효과, 면역학적 효과와 항궤양 효과 및 cholesterol 저하 활성이 보고되었는데 이는 주로 발효유 제품에 대한 물성소재로서 연구가 진행되어 지고 있지만, 막걸리 내 유산균에 대한 연구는 전무하다.

#### 2. 국외 기술 개발 현황

- 서양의 와인인 90년대 초반, French paradox 라는 현상을 규명하기 위해 생리 기능활성에

대한 연구가 시작되어 현재까지도 심도 깊은 연구가 전 세계적으로 수행되고 있음.

- 적포도주의 다양한 폴리페놀 성분은 심혈관계 질환 개선, 항암 및 암 예방, 퇴행성 뇌질환, 염증, *Helicobacter pylori* 에 의한 소화기 질환 등 다양한 생리 기능활성의 규명으로 적포도주의 우수성 입증과 세계화에 기여함.
- 와인에 대한 생리 기능활성 연구 성과로 인하여 전 세계적으로 매출이 폭발적으로 증대되었고 와인의 원료인 포도에 대한 많은 연구로 국가 정책적으로 포도 및 와인 산업을 육성하여 많은 경제적 이익을 창출하였음
- 일본주(청주), 국균(Koji) 및 술지게미에 대한 생리 기능활성 등 다양한 연구가 진행되고 있음
  - 청주에서 항산화 작용이 높은 ferulic acid를 동정하였으며 이는 와인의 hydroxycinnamic acid와 유사한 작용 기전을 가짐.
  - 일본주 농축액은 방광, 전립선, 자궁암 조직에서 암 조직 괴사 및 응축 활성을 확인
  - 일본주 펩타이드 성분이 혈전 용해 활성, HDL 생성 증가 및 LDL 산화 방지 효과 확인
- 이러한 일본주 연구로 유효 생리 기능활성 물질을 대량으로 생산 가능한 방법이 확립되어 다수의 특허출원 되었으며 일부 펩타이드는 치료제로써의 효과를 검증하고 있음.

## 제 2 절 기술개발의 기대효과

### 1. 기술적 측면

- 생막걸리 유래 유산균 및 생리 기능활성 탐색, 기능성 연구로 다양한 생리 활성 효과를 입증하여 국내·외 연구 저변을 마련할 것으로 기대한다. 또한 국제학술잡지 게재를 통하여 우리나라 막걸리의 우수성을 인정받고 세계적인 명주로 인식될 수 있는 경쟁력 강화를 위한 기반 구축
- 막걸리의 항암 효과 (암 예방 포함) 및 심혈관계 질환 개선 활성에 대한 과학적 체계를 제공하여 우리 전통술의 우수성 입증
- 막걸리의 다양한 기능활성 규명을 통한 다양한 기능성 연구 기술 확립을 통한 제품의 부가가치 제고

### 2. 경제적 · 산업적 측면

- 다양한 생막걸리 유래 유산균의 확보를 통한 생물자원 및 유전체 자원의 축적
- 생막걸리 유래 유산균 및 생리 기능활성 탐색, 막걸리의 기능성 연구를 바탕으로 균주 개발·개량 및 그의 생리 기능활성에 대한 특허 출원 가능
- 막걸리의 기능성 규명 및 우수성을 입증함으로써 우리 땅에서 재배한 쌀의 소비 촉진될 수 있도록 하고 고부가가치 창출을 제공함으로써 농민의 소득 증대와 신사업을 창출하는데 기여
- 막걸리에 대한 사회적 환경 변화에 따른 소비 수요 증대와 세계화를 위한 정부 정책 추진에 부합되도록 막걸리의 과학화 및 현대화를 위한 초석을 마련하고 이를 통하여 막걸리의 세계화에 기여
- 기능성 막걸리의 기능활성 규명을 통한 웰빙 컨셉 부여와 고부가가치 이미지 창출
- 새로운 패러다임의 전통막걸리 제조를 통한 전통 식문화 가치 향상
- 전통주 분야 기술 축적을 통한 전문 인력 확보 및 배출

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1 절

### 세부과제 : 유산균 및 기능성이 강화된 막걸리 제품 개발 -(주)신우창

#### 1. 막걸리 유산균의 근원에 관한 조사

##### 가. 연구 수행 방법

막걸리 발효 시 microflora 패턴 분석에 앞서 막걸리 발효에 관여하는 유산균의 유래에 관한 조사를 수행하였다. 조사 대상은 막걸리의 대표 원료인 쌀과 시판 누룩과 국순당에서 제조한 효소제(밀누룩, 쌀입국), 국내 시판 효모 제품(C사와 J사)과 물로 하였으며, 각 원료의 특성에 맞게 멸균된 0.85% 식염수로 상온에서 1시간 추출하여 분석하였다. 유산균의 정량 및 정성 검사는 항진균제(Cycloheximide, Sigma) 및 염색시약(Bromphenol blue, Merck)이 첨가된 MRS agar medium(Difco)를 이용하여 plate 당 20-200 colony 가 되도록 적당히 희석하여 측정하였으며, 배지 상에서 나온 colony를 형태 및 BPB에 의한 염색 패턴을 통해 간이적인 방법으로 분류하여 측정하였다.

##### 나. 시판 중인 쌀에서의 유산균 분석

먼저, 시중에 판매 중인 쌀에서의 유산균수를 측정하였으며 그 결과는 Table 1과 같다. 분석결과 대부분의 쌀에서 유산균이 검출되었으며, 평균적으로 1g 당 92.4 ( $\pm 83.4$ ) cfu 가 있는 것으로 나타났다.

Table 1. 시중에서 판매중인 쌀에서의 유산균 정량 분석 결과

제품	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
LBA (cfu/g)	53	17	105	302	107	87	62	135	23	33

한편, 일반적으로 막걸리 담금 시 쌀을 세척(세미, 洗米)하고 일정 시간동안 불리는 과정(침미, 沈迷)을 필요로 하는데, 이러한 경우 침미 시 쌀 유래 유산균의 증식 여부를 살펴보기 위하여 침미 시간에 따른 유산균의 변화에 대하여 분석을 진행하였다. 쌀 침미 시 물의 온도는 각각 10°C, 15°C, 20°C로 하였으며 침미 시간은 최대 24시간까지로 하였다. 측정 결과는 Fig. 1로 나타내었다.

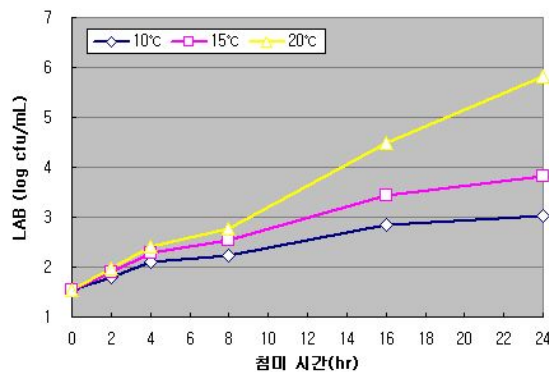


Fig 1. 침미 시 온도 및 시간에 따른 유산균수의 변화



측정 결과 물의 온도 및 시간에 비례하여 유산균의 개체수는 증가하는 경향을 보였다. 침미 온도가 20℃의 경우 16시간 경과 후부터 약간의 원내와 함께 침미수 표면 위로 기포가 발생되기 시작하였으며 24시간 경과 후 최대  $6.3 \times 10^5$  cfu/mL 농도로 유산균이 검출되어 유산균에 의해 변질되었다. 따라서 막걸리 담금 시 쌀은 사용 비율이 높은 원료임으로 만약 침미 후 쌀을 열처리 등 가공하지 않고 생쌀 그대로 사용할 경우 정상적인 알코올 발효를 위해 쌀 침미 시 온도 및 시간에 유의해야 할 것으로 판단된다.

#### 다. 효소제에서의 유산균 분석

막걸리 담금 및 발효 시 사용되는 효소제 내 유산균수를 측정하였다. 밀누룩 중 시판누룩은 S 곡자회사와 C 곡자회사에서 제조한 것을 사용하였으며 K 곡자는 자사에서 만든 누룩으로 하였다. 쌀입국은 H에서 판매되는 *Aspergillus kawachii* 종국을 접종에서 자체 제조한 후 건조한 것으로 하였다. 각 효소제에 대한 유산균수를 측정한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. 알코올 발효 효소제 내 유산균의 개체수

효소제	밀누룩			쌀입국
	S곡자	C곡자	K곡자	
LAB (cfu/g)	$2.6 \times 10^5$	$6.7 \times 10^5$	$3.5 \times 10^4$	$1.2 \times 10^1$

자연적 혹은 인위적인 방법으로 종균을 밀기울 등에 접종하여 만든 밀누룩(=곡자)에서의 유산균 개체수는  $3.5 \times 10^4 \sim 6.7 \times 10^5$  cfu/g 농도로 분석되었으며 colony 형태로 분류 시 유산균의 종류도 2-3종으로 다양한 편이었다. 그와 반면에 쌀을 고두밥 형태로 찐 뒤 종국을 접종하여 만든 쌀입국의 경우에는  $1.2 \times 10^1$  cfu/g 으로 밀누룩에 비해 매우 낮은 농도로 유산균이 검출되었는데, 이는 쌀에 증기를 가하여 고두밥 제조 시 쌀 유래 유산균이 제거되고 종국(*Asp. oryzae*, *Asp. kwachi*)가 생육할 때 생성되는 다량의 산에 의해 유산균 생육이 저해됨에 기인하는 것으로 판단된다.

#### 라. 시판 효모 제품에서의 유산균 분석

안정적인 막걸리 알코올 발효를 위해 담금 시 사용되는 시판 효모 제품 내 유산균을 분석하였다. 국내 대표적으로 판매되고 있는 C사와 J사의 생효모 제품과 C사, S사(외국산) 건조효모를 분석하였으며 그 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. 국내 시판 효모 제품 내에서의 유산균의 개체수

시판효모	생효모		건조효모	
	C	J	C	S
LAB (cfu/g)	$6.5 \times 10^6$	$3.4 \times 10^3$	$3.4 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$

국내 시판 중인 효모 제품 내에서의 유산균을 분석한 결과 최소  $3.4 \times 10^3$ 에서 최대  $6.5 \times 10^6$  cfu/g 의 농도로 유산균이 검출되었다. colony에 의한 간이 동정 결과 대부분 1-2종류의 유산균이 분포되어 있었다. 현재 국내에서 시판 중인 효모는 대부분 밀가루 반죽 시 사용되는 제빵용 제품으로 대부분이 효모( $1.0\text{--}2.0 \times 10^{10}$  cfu/g)이지만 빵의 풍미 향상을 위해 효모 제품

제조 과정 시 어느 정도의 유산균이 검출되는 것은 허용한다고 제조회사(C & J 사)는 밝혔다. 따라서 현재 시판 중인 효모를 사용하여 막걸리 발효를 진행할 경우에는 이를 고려해야 할 것으로 판단된다.

마. 양조용수에서의 유산균 분석

막걸리 담금 시 사용되는 수돗물, 지하수, 정제수 등에서 유산균 분석을 진행하였으나, 대부분 검출되지 않았다.

이상으로 막걸리 발효 시 유산균의 유래에 대해 살펴보았다. 막걸리 원료에 대한 유산균을 분석 결과 쌀, 효소제, 효모 제품에서 각각 유산균이 검출되었으며 물에서는 검출되지 않았다. 원료 사용 비율을 감안하였을 때 막걸리 유래 유산균은 효소제 및 효모 제품에서 기인한 바가 큰 것으로 판단되며, 쌀을 열처리 하지 않는 즉, 생쌀을 원료로 막걸리를 제조할 경우 쌀 유래 유산균도 큰 영향을 미칠 것으로 판단된다.

2. 막걸리 발효 시 시간에 따른 이화학·미생물 분석

가. 연구 수행 방법

막걸리 발효 시 미생물학적 패턴을 분석하기 위하여 막걸리 담금을 진행하였다. 막걸리 담금 시 원료의 처리는 2가지 방법 즉, 막걸리 원료인 쌀을 증기로 찌는 증자 방법과 찌지 않고 생쌀 그대로 사용하는 무증자 방법으로 수행하였다. 먼저 증자 방법에 의한 담금은 쌀 1,000g을 깨끗이 물로 세척한 후 14-15℃의 물에 1시간동안 침지한 후 증미하여 (주)국순당에서 제조한 밀누룩 10g에 물 1,350mL를 넣고 1.0%의 효모(C사)를 넣어 25℃에서 24시간 발효를 하였다. 1단 담금이 지난 후 2단 담금은 1단 담금의 2배에 해당하는 쌀 2,000g을 동일한 방법으로 증미한 뒤 밀누룩 20g에 물 2,700mL를 넣어 25℃, 6일간 발효하였다. 무증자 방법에 의한 담금은 쌀을 증미하지 아니하고 증자 방법과 동일한 방법으로 담금 및 발효를 진행하였다 (Table 4).

Table 4. Composition of ingredients for Makgeolli preparation

	증자 담금법(Steamed Rice Method)			무증자 담금법(Raw Rice Method)		
	1단	2단	Total	1단	2단	Total
쌀	1,000g	2,000g	3,000g	1,000g	2,000g	3,000g
밀누룩	10g	20g	30g	10g	20g	30g
효모	10g	-	10g	10g	-	10g
물	1,350mL	2,700mL	4,050mL	1,350mL	2,700mL	4,050mL

막걸리 발효 중 이화학 분석은 1일 간격으로 실시하였으며, 발효 술덧을 샘플링하여 filter paper(Hyundai Micro No. 20, Korea)로 여과 한 뒤 분석하였다. 산도 측정은 여과액 10mL에 혼합지시약(bromothymol blue 0.2g, neutral red 0.1g, absolute ethanol 300mL)을 2-3방울 가한 뒤 0.1N NaOH(F=1.000±0.005, at 20℃)로 담록색이 나타날 때까지 적정 시키는데 소요되는 mL 수를 산도로 표시하였다. 환원당(RS, reducing sugars)은 여과한 샘플을 적당히 희석한 뒤 Lane-Eynon 법 및 Bertrand 법의 변법을 사용하여 측정하였다. 알코올 농도 분석은 국세청 기술연구소 주류분석 규정[4]에 의거하여 시료 100mL에 동량의 증류수를 첨가하여 희석하여

증류하였으며, 포집된 유액은 DMA4500 밀도 측정기(Anton Parr, Austria)를 이용하여 농도를 측정하였다. 발효 중의 효모수는 항생균제(Chloramphenicol, Sigam)가 첨가된 YPD agar medium(Difco)를 이용하여 Plate 당 20-200개의 colony가 나오도록 적당히 희석하여 측정하였다. 유산균 수는 MRS BPB agar를 이용하여 상기 방법과 동일하게 측정하였다. 모든 실험 결과는 3회 반복 실험 결과이며, 통계적 유의성 검정은 신뢰구간  $p < 0.05$  또는  $p < 0.01$  수준에서 분석하였다.

나. 막걸리 발효 시 시간에 따른 이화학·미생물 분석 결과

쌀 증자 유무에 따른 막걸리 발효 술덧에서 시간에 따른 이화학 및 미생물학적 변화는 각각 Table 5, Table 6과 같다.

Table 5. Changes of alcohol, acidity, RS and microflora during the makgeolli fermentation by steamed rice method

Fermentation Time(Days)	Alcohol (%)	Acidity	RS (mg/mL)	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)	Ref.
0.0	-	1.2	25.3	$4.1 \times 10^7$	$9.5 \times 10^3$	After 1st stage
1.0	5.4	4.8	78.2	$2.1 \times 10^8$	$8.1 \times 10^4$	Before 2nd stage
1.2	2.1	1.7	26.3	$3.2 \times 10^7$	$5.6 \times 10^3$	After 2nd stage
1.9	5.8	3.5	50.3	$1.9 \times 10^8$	$2.0 \times 10^4$	
2.8	11.5	3.8	35.3	$9.8 \times 10^7$	$3.0 \times 10^4$	
3.9	14.6	4.0	25.3	$3.2 \times 10^7$	$5.8 \times 10^4$	
5.0	15.9	4.1	12.6	$2.3 \times 10^7$	$3.5 \times 10^4$	
6.1	17.3	4.0	21.9	$9.0 \times 10^6$	$2.1 \times 10^4$	
7.0	17.9	4.3	35.3	$3.8 \times 10^5$	$8.9 \times 10^3$	

Table 6. Changes of alcohol, acidity, RS and microflora during the makgeolli fermentation by raw rice methods

Fermentation Time(Days)	Alcohol (%)	Acidity	RS (mg/mL)	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)	Ref.
0.0	-	1.5	14.4	$4.2 \times 10^7$	$2.0 \times 10^4$	After 1st stage
1.0	9.1	5.6	2.2	$1.6 \times 10^8$	$2.5 \times 10^5$	Before 2nd stage
1.2	4.6	2.2	6.1	$3.7 \times 10^7$	$1.9 \times 10^4$	After 2nd stage
1.9	6.9	2.5	1.2	$1.4 \times 10^8$	$6.0 \times 10^4$	
2.8	12.3	4.0	2.4	$8.3 \times 10^7$	$1.0 \times 10^5$	
3.9	16.3	5.0	4.0	$9.1 \times 10^7$	$8.5 \times 10^5$	
5.0	17.2	4.9	7.8	$1.1 \times 10^7$	$3.5 \times 10^5$	
6.1	18.1	4.8	15.8	$1.4 \times 10^6$	$1.4 \times 10^5$	
7.0	18.5	5.0	23.4	$5.5 \times 10^5$	$8.1 \times 10^4$	

두 실험군의 경우 큰 차이 없이 유사한 알코올 발효 패턴을 나타냈다. 막걸리 발효에 크게 관여하는 효모와 유산균의 경우 전반적으로 쌀 증자 유무와 상관없이 효모는 발효 초반에 높은 농도로 존재하다가 그 후 점차 감소하는 패턴을 보였으며 유산균의 경우 발효 중반까지 증

가하다가 그 후 감소하는 경향을 보였다. 효모와 유산균의 경우 발효 4일차 이후 감소하는 경향을 보였는데 이 때 산도 또한 증가 속도가 둔화되어 일정하게 유지되는 경향을 나타냈다. 발효 초기 유산균의 균체수는 쌀 원료 처리 방식에 따라 다소 차이가 났으며, 증미한 경우가 생쌀로 했을 때 보다 유산균의 균체수는 약 1/2 정도 적었다. 이는 증미 과정에서 쌀 유래 유산균의 사멸에 의한 것으로 판단된다. 막걸리 발효에서 효모 외 유산균에 의한 발효 또한 중요하게 관여하고 있는 것으로 확인되었다.

### 3. 전국 시판 막걸리 제품에서의 일반 성분 및 유기산 특성 분석

서울 및 경기도에서 유통 중인 13종의 막걸리를 선정하여 일반 성분 및 유기산 조성 분석을 통해 전통 발효 식품인 막걸리의 제조방법에 따른 차이 등에 관한 정보를 알아보려고 하였다. 일반분석 지표로는 알코올, pH, 산도(Acidity), 환원당 및 포도당으로 하였고, 유기산 분석은 막걸리 시료를 여과한 후 0.45 $\mu$ m membrane filter로 여과하여 사용하였다. 포도당 함량은 Biochemistry analyzer(YSI 2700, Yellow Springs, OH, USA)를 이용하여 측정하였다. 유기산 표준물질은 막걸리와 같이 최종 알코올 농도 6%로 보정한 용액에 녹여 사용하였다. 시료 중 유기산 함량은 HPLC(Waters. Co., Milford, MA, USA)로 ODS column(Prevail Organic Acid, 4.6x150mm, 3 $\mu$ m, Alltech Grace Co., Deefield, IL, USA)을 사용하였으며 이동상은 0.25 mM phosphate buffer를 사용하여 0.3mL/min의 유속 조건에서 크로마토그래피를 실시하고, 210nm에서의 흡광도를 측정하여 분석하였다.

#### 가. pH, 산도, 환원당 및 포도당 분석

시판되는 13종의 막걸리를 분석한 결과, pH 및 산도는 table 7과 같았다. 살균막걸리는 pH 3.60-4.17이었고, 살균하지 아니한 비살균막걸리의 경우 pH 3.40-3.77 수준으로서 살균막걸리가 비살균막걸리에 비해 평균적으로 높은 경향을 보였다. 한편, 살균막걸리의 산도는 2.05-3.50이었으며, 비살균막걸리는 2.40-4.75 수준으로서 살균막걸리가 비살균막걸리와 비교하였을 때, 평균적으로 산도가 낮은 것으로 관찰되었다. 살균막걸리와 비살균막걸리 간의 유의적 차이는 없었으나, 이러한 결과는 일부 살균막걸리의 경우 제조 공정 시 유기산 첨가에 의해, 비살균막걸리 경우는 제품 내 효모 및 유산균 등에 의하여 유통 중에도 미세하게 발효가 진행되어 발효산물인 각종 유기산 및 기타 산 물질에 의해 총산 함량이 증가한 것으로 여겨지며 이로 인해 비살균막걸리가 살균막걸리에 비해 상대적으로 낮은 pH와 높은 산도를 나타내는 것으로 사료된다[5].

한편, 환원당(reducing sugar, RS)은 제품 C의 경우 30mg/mL로 농도가 가장 높았으며, 제품 A와 H는 1.5mg/mL, 제품 B의 경우 2.6mg/mL로 농도로 나타났다. 그 외 분석한 막걸리 제품에서는 미량으로 존재하거나 전혀 함유하지 않은 것으로 나타났다. 또한 환원당 중의 하나인 포도당의 경우도 이와 유사한 경향을 보였다. 전반적으로 비살균막걸리가 살균막걸리에 비해 환원당 및 포도당을 거의 함유하고 있지 않은 것으로 분석되었는데, 이는 비살균막걸리 제품 내 살아 있는 효모 및 유산균 등에 의해 발효 기질, 즉 탄소원으로 이용된 것으로 사료된다. 한편 일부 살균 막걸리 제품에서 환원당 및 포도당이 없거나 미량으로 존재하였는데 이는 최종 발효 술덧 자체에서 각 성분의 농도가 낮았던 것으로 판단된다.

Table 7. Analysis of alcohol, pH, acidity reducing sugar and dextrose in marketed Makgeolli.

	Alcohol (%)	pH	Acidity	R.S.*	Dextrose	Type**
A	6.04±0.04	4.03±0.01	2.05±0.01	1.50±0.12	0.45±0.03	Pasteurized
B	6.02±0.02	3.63±0.01	2.75±0.01	2.62±0.15	1.17±0.03	Pasteurized
C	6.05±0.05	3.60±0.02	3.50±0.08	30.33±1.53	14.73±2.29	Pasteurized
D	7.46±0.10	4.17±0.04	2.49±0.01	0.17±0.29	0.08±0.05	Pasteurized
E	7.01±0.02	3.88±0.02	2.60±0.00	0.00±0.00	0.03±0.04	Pasteurized
F	5.99±0.02	3.74±0.01	2.25±0.03	0.00±0.00	0.02±0.02	Pasteurized
G	6.08±0.17	3.40±0.05	2.89±0.10	0.48±0.33	0.09±0.13	Draft
H	6.09±0.16	3.52±0.04	2.42±0.10	1.47±0.76	0.12±0.10	Draft
I	6.02±0.02	3.77±0.03	2.51±0.01	0.82±0.40	0.10±0.17	Draft
J	6.05±0.09	3.77±0.01	2.50±0.00	0.48±0.28	0.00±0.01	Draft
K	6.01±0.02	3.59±0.05	4.72±0.03	0.17±0.29	0.01±0.01	Draft
L	6.01±0.02	3.68±0.00	2.75±0.03	0.00±0.00	0.04±0.02	Draft
M	6.07±0.07	3.75±0.01	4.20±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	Draft

Unit of R.S. and dextrose: mg/mL

\*R.S., reducing sugars

\*\* Type: Makgeolli was divided two types, unpasteurized (draft) and pasteurized type.

General Analysis in Makgeolli was measured using HPLC. Each data represents the mean±SD of three independent experiments.

#### 나. 유기산 분석

막걸리 제품의 유기산을 HPLC로 분석한 결과는 table 8과 같다. 유기산 표준물질로 사용한 tartaric acid 및 pyruvic acid, malic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid 및 fumaric acid 중에서 lactic acid, acetic acid, citric acid는 모든 살균막걸리 및 비살균막걸리에서 검출되었으나, tartaric acid, pyruvic acid, malic acid, fumaric acid는 제품에 따라 검출 여부가 달랐다. 살균막걸리의 경우 citric acid가 2.49 - 5.03 mg/mL의 농도로 가장 많았으며, 그 다음으로는 lactic acid, acetic acid의 농도가 각각 0.74 - 2.87 mg/mL, 0.21-1.09 mg/mL 순서로 많았다. 비살균막걸리의 경우 lactic acid가 0.96 - 5.70 mg/mL의 농도로서 전반적으로 가장 높았으며, citric acid, acetic acid의 농도가 각각 1.28 - 4.98 mg/mL, 0.41 - 1.52 mg/mL의 순서로 많았다. 살균막걸리와 비살균막걸리 총 유기산의 평균 농도는 각각 7.53 mg/mL, 7.44 mg/mL로 비슷하였지만, 유기산의 구성 비율은 서로 상이하였으며, 특히 lactic acid의 경우 살균막걸리에 비해 비살균막걸리에서 더 높은 농도로 검출되었다. 두 실험군 간 유의적 차이는 없으나, 이는 비살균막걸리 제품 내에서 효모 및 유산균에 의한 발효가 미세하게나마 진행된 것에 기인한 것으로 판단된다. 막걸리 발효에서 malo-lactic fermentation (MLF)은 알코올 발효 후 *Lactobacillus* sp.와 *Leuconostoc* sp. 등과 같은 특정 유산균에 의해 일어나는 발효로써 이로 인하여 대표적인 malic acid가 lactic acid로 전환된다. 막걸리 발효에서의 MLF가 적절히 이루어지면 산도의 감소로 주질의 부드러움과 입에서 느껴지는 촉감을 강화시켜 주며 lactic acid가 높아짐으로써 발효 중 부패균에 대한 안정성을 높여주는 긍정적인 효과를 제공하는 역할을 한다. 이 MLF는 오래 전부터 와인에서 연구 및 산업화가 이루어지고 있다.

Tartaric acid와 pyruvic acid는 일부 제품에서는 검출되지 않았으며 살균막걸리, 비살균막걸리와 관계없이 각각 0.25-0.73 mg/mL, 0.04-0.21 mg/mL의 농도로 분석되었다. Fumaric acid는 미량 검출되거나 전혀 검출되지 않았다. 한편, malic acid는 살균막걸리에서 0.37 - 1.35 mg/mL의 농도로 모든 제품에서 검출되었지만, 비살균막걸리의 경우 G, I, J 제품을 제외한 나머지 제품에서는 검출되지 않았다. 이는 비살균막걸리가 유통되는 동안 제품 내 살아있는 유산

균 중 사과산의 젖산 발효(malo-lactic fermentation)를 일으키는 유산균에 의해 malic acid가 분해되어 lactic acid로 생성되었기 때문에 판단된다. 살균막걸리 내 유기산 중 lactic acid/malic acid의 ratio는  $2.35 \pm 1.18$ 인 반면에 비살균막걸리 중 malic acid가 검출된 제품에서의 lactic acid/malic acid의 ratio는  $3.40 \pm 0.80$ 으로 비살균막걸리에서의 ratio가 다소 높음을 볼 수 있다. 이는 비살균막걸리가 살균막걸리에 비해 평균적으로 lactic acid가 높게 나타나는 것과 부합한다. 또한 일부 비살균막걸리 제품에서 malic acid가 검출되는 경우를 볼 수 있는데, 이는 유통 과정 중 온도에 따른 malo-lactic fermentation 진행 정도의 차이로 판단된다. 즉, 비살균막걸리 특성 상 냉장 유통되는 제품의 경우 낮은 온도로 인해 이와 연관된 유산균의 생육이 억제되어 malo-lactic fermentation 이 다소 지연됨으로써 malic acid가 잔존하게 된 것으로 판단된다. 비살균막걸리 유통 과정 중 제품 내에서 malo-lactic fermentation이 일반적으로 빈번하게 일어날 경우 유통 과정 중 제품 내 malic acid의 정성 및 정량 분석을 통해 비살균막걸리의 유통 기한 지표로 활용할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 malo-lactic fermentation에 관여하는 유산균의 규명과 시간 및 온도에 따른 비살균막걸리 제품 내에서의 malo-lactic fermentation에 대한 연구를 진행할 필요가 있을 것으로 판단된다.

Table 8. Analysis for composition of organic acids in marketed Makgeolli

Makgeolli	Organic acid						
	Tartrate	Pyruvate	Malate	Lactate	Acetate	Citrate	Fumarate
A	0.33±0.02	0.07±0.00	0.72±0.00	0.87±0.00	0.37±0.00	3.55±0.07	ND
B	ND	ND	0.37±0.02	1.55±0.02	0.70±0.00	2.49±0.23	ND
C	0.25±0.00	0.05±0.00	0.89±0.02	2.87±0.02	0.21±0.02	4.64±0.00	0.004±0.00
D	0.67±0.01	0.21±0.00	1.16±0.00	2.75±0.03	1.09±0.01	4.83±0.05	0.006±0.05
E	0.73±0.00	0.12±0.00	1.35±0.00	1.66±0.01	0.94±0.01	5.03±0.02	0.005±0.00
F	0.33±0.01	0.04±0.00	0.40±0.00	0.74±0.01	0.47±0.01	2.70±0.01	ND
G	ND	ND	0.27±0.03	0.96±0.07	0.54±0.14	1.28±0.06	ND
H	0.40±0.00	0.15±0.00	ND	1.08±0.01	0.97±0.01	2.60±0.01	0.003±0.00
I	ND	ND	1.44±0.53	3.66±0.77	1.52±0.02	2.54±0.57	ND
J	ND	ND	1.04±0.02	4.28±0.46	0.73±0.06	2.35±0.14	ND
K	0.61±0.01	0.15±0.00	ND	5.70±0.00	0.41±0.00	2.54±0.04	0.002±0.00
L	0.53±0.03	0.03±0.00	ND	1.77±0.01	0.56±0.01	2.15±0.03	0.002±0.00
M	0.64±0.00	0.07±0.00	ND	5.32±0.02	0.81±0.01	4.98±0.05	0.004±0.00

Unit: mg/mL

ND: not detected

Composition of organic acids in Makgeolli was measured using HPLC. Each data represents the mean±SD of three independent experiments.

#### 4. 막걸리 유래 유산균의 배양조건 최적화

특정 미생물을 활용한 술 제품을 만들 때 배양된 미생물을 세척해서 사용하지 않을 경우 미생물 배지는 대부분 천연 원료 내지는 식품첨가물로 한정되어야 한다. 한편 실험실 규모에서는 배양된 미생물의 세척이 용이하지만 scale-up 단계의 plant 규모에서는 별도 설비가 마련되어 있지 않은 한 배양된 미생물을 분리해서 세척하기가 어려울 때가 많다. 따라서 막걸리 유래 유산균을 이용한 막걸리 제품 개발을 위해 먼저 술 담금 및 발효 시 직접 투입할 수 있는 원료 내지는 식품첨가물로 구성된 유산균 배양 배지 및 조건 설정을 위한 연구를 수행하였다.

#### 가. 연구 수행 방법

유산균 배양 최적화 탐색을 위한 균주로는 1차 협동연구기관(경희대) 결과를 바탕으로 국내

시판 막걸리에서 높은 빈도로 검출되는 *Lactobacillus plantarum* 로 하였다. Seed는 멸균된 MRS broth 50mL를 100mL 삼각 플라스크에 멸균한 뒤 접종하여 37°C 24시간 정치 배양하여 사용하였다. 접종량은 5%(v/v) 로 하였으며 *L. plantarum* 의 보관 및 계대배양 배지로는 MRS agar medium을 사용하였다.

#### 나. 질소원 종류 및 농도 설정

유산균 배양을 위한 질소원을 선정함에 있어 유산균 배양에 일반적으로 사용되는 MRS 배지에 비해 가격이 저렴하고 쉽게 구할 수 있으며 고농도 균체 생산과 동시에 술에 직접 유산균 배양액을 첨가할 수 있는 원료로 선별하고자 하였다. 탐색 대상 원료로는 밀기울, 자사에서 만든 밀누룩, 뽕쌀로 선정하였으며, 농도는 각 원료의 조단백질 함량을 고려하여 동일하게 되도록 하였다. 배양 시 영양 성분들이 보다 용출이 잘 될 수 있도록 밀기울과 밀누룩, 쌀은 분쇄하여 가루 내어 사용하였다(mesh size 60-80). 대조구는 미생물 배양 시 일반적으로 사용되는 yeast extract(Difco)로 하였다. 모든 실험구에서 탄소원으로는 포도당으로 하였으며 농도는 2%(w/v)로 하였다. 배지의 pH는 별도로 조절하지 않았다. 유산균 배양은 각 배지 100mL를 200mL 삼각플라스크에 넣어 멸균한 뒤 사용하였으며, 37°C 배양 조건으로 48시간 배양하였다. 유산균 배양 결과는 table 9와 같다. 질소원으로 밀누룩을 사용하였을 때 yeast extract와 유사한  $2.7 \times 10^9$  cfu/mL 농도로 유산균 균체를 얻을 수 있었다. 밀기울을 사용하였을 때는 가장 낮은 결과를 보였다. 이는 같은 밀기울이라 하더라도 밀누룩은 곰팡이류가 배양되면서 밀기울 내 영양성분이 곰팡이 유래 효소 등에 의해 분해되어 유산균이 보다 쉽게 영양성분을 up-take 할 수 있었기 때문이라고 판단된다. 한편 쌀가루를 사용하였을 때도 밀누룩보다는 낮지만  $8.9 \times 10^8$  cfu/mL 농도로 유산균 균체를 얻을 수 있었으나 pH는 매우 낮았다. 곡류의 외피에 많이 분포되어 있는 phytic acid는 phosphate group 에 의해 미생물 배양 시 buffering effect를 부여하는 경우가 많은데 이러한 phytic acid가 밀기울 및 밀누룩에 많이 들어있지만 도정된 쌀에는 적어 유산균 배양 시 생성되는 젖산에 대한 buffering effect 가 적기 때문인 것으로 파악된다. 한편 밀누룩으로 유산균을 배양했을 때는 유산균 배양액의 풍미가 과실향이 약간 있으면서 좋아 막걸리 담금 및 발효 시 넣더라도 막걸리 풍미에 긍정적으로 작용할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 막걸리 유래 유산균 배양 시 질소원으로 밀누룩을 선정하였다.

Table 9. Comparison of various nitrogen sources on the cell culture with *L. plantarum*

	Total N (%, w/w)	N-Conc. (g/L)	$\mu_{Max}$ (hr <sup>-1</sup> )	pH	Cell Conc. (cfu/mL)
Yeast extract	9.2	5.0	0.43	2.51	$3.2 \times 10^9$
밀기울	15.0	3.1	0.15	4.28	$5.3 \times 10^8$
밀누룩	14.8	3.2	0.34	3.33	$2.7 \times 10^9$
쌀가루	7.2	5.9	0.27	2.21	$8.9 \times 10^8$

밀누룩을 질소원으로 하였을 때 유산균 배양 시 최적 농도를 설정하고자 실험을 실시하였다. 초기 테스트 농도는 0.3% ~ 10%로 진행하였으며 탄소원은 포도당 2% (w/v)로 하였으며 멸균 시 maillard reaction을 방지하고자 각각 멸균한 뒤 무균적으로 혼합하여 사용하였다. 배양 조건은 상기 실험과 동일하게 하였으며 실험결과는 Fig. 2와 같다. 밀누룩 농도가 3%일 때

최대 균체 농도인  $6.1 \times 10^9$  cfu/mL 였으며, 그 보다 높은 농도인 5%로 하였을 때와 큰 차이를 보이지는 않았다. 따라서 유산균 배양 시 질소원으로 밀누룩의 농도는 3%로 설정하였다.

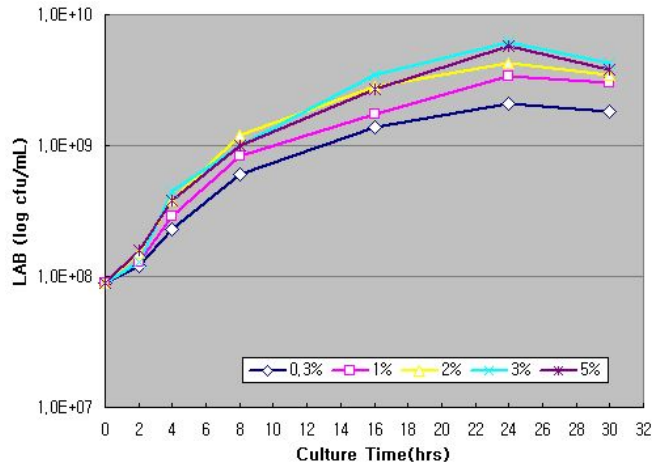


Fig 2. Profile of LAB cell concentration on the various wheat bran nuruk concentration

#### 다. 탄소원 종류 및 농도 설정

유산균 배양 시 탄소원으로 선정함에 있어 미생물 이용성, 막걸리 원료로의 적합성, 취급의 용이성 및 가격적인 측면을 고려하여 포도당과 설탕 2가지 원료를 검토하였다. Modified MRS 배지에 2%의 농도로 포도당과 설탕을 첨가하여 제조한 후 37°C 접종하여 27시간 배양하였으며 2시간 간격으로 growth cycle을 측정하였다. 측정 결과 포도당은 3.1, 설탕은 3.2로 큰 차이 없음을 확인하였다. 따라서 선별될 유산균의 탄소원 이용성을 확인하여 적용하되 1차적으로는 탄소원으로 설탕을 선정하기로 하였다. 한편 적정 농도를 설정하고자 연구를 수행하였다. 질소원은 밀누룩 3%(w/v)로 하였으며 설탕의 테스트 농도는 1-10%(w/v)로 하였다. 실험 결과는 Fig. 3과 같다. 실험 결과 1-2% 농도를 제외한 그 이상의 농도에서는 농도가 증가할수록 유산균의 생육 속도가 다소 느려지는 경향을 보였는데 이는 설탕에 의한 삼투압이 증가되어 유산균 생육에 영향을 미친 것으로 판단된다. 따라서 유산균의 생육 속도가 빠르면서 최대의 균체 농도를 보인 설탕 2%(w/v)를 유산균 배양 농도로 설정하였다.

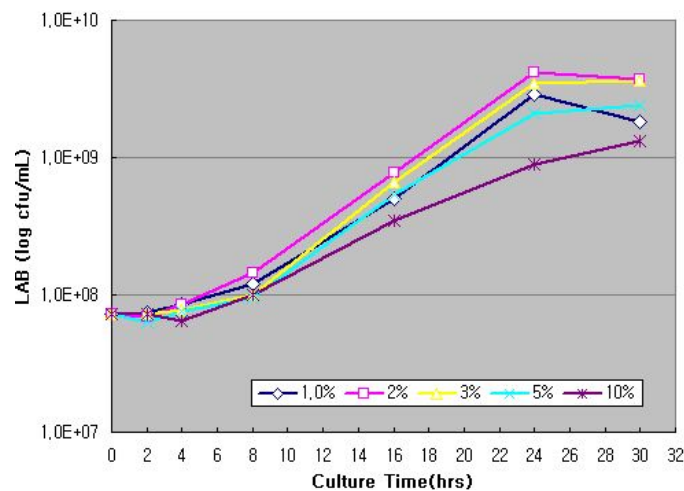


Fig 3. Profile of LAB cell concentration on the various sucrose concentration



## 5. 막걸리 발효 시 유산균 제어 기술 확립

막걸리 유래 유산균은 치즈나 요구르트를 만드는 유산균인 ‘동물성 유산균’과는 달리 야채나 과일, 콩, 쌀이나 보리 등 식물 소재에서 유래된 ‘식물성 유산균’이다. 식물성 유산균은 강력한 내산성 갖는 것이 특징이며, 장관 면역의 활성화작용과 장내 세균총의 균형유지 및 건강한 장 형성하는데 도움을 주는 것으로 알려져 있다. 막걸리에서 이루어지는 유산균 발효는 다양한 유기산 생성에 관여하여 막걸리의 풍미를 풍부하게 하고, 유해 세균의 성장을 억제하는 등 긍정적인 영향을 주는 반면, 지나치게 발효될 경우 막걸리가 산패되어 신맛과 쓴맛이 상대적으로 증가하게 되어 제품 관능 품질을 저하시키는 문제점이 있다. 따라서 막걸리 유래 유산균을 적용함에 있어 막걸리 관능 품질을 향상시키고 유산균이 풍부한 막걸리를 개발될 수 있도록 유산균 발효 제어 기술을 확립하고자 연구를 수행하였다.

### 가. 연구 수행 방법

먼저 막걸리 담금 방법은 무증자 방식으로 1단과 2단으로 나누어 담금 및 발효하였으며, 효소는 자사에서 만든 K누룩과 효모는 C사에서 판매되는 생이스트를 사용하였다. 원료 대비 급수율은 135%로 하였으며 발효는 25℃에서 실시하였다. 유산균은 제1협동연구기관인 경희대에서 제공한 막걸리 유래 유산균 *Lactobacillus plantarum* K3을 우선적으로 선정하였으며, 3% 밀누룩과 2% 설탕을 배양 배지로 하여 37℃에서 24시간 배양하여 사용하였다. 막걸리 담금 시 유산균의 초기 농도는 현미경으로 측정하여 담금 직후 5.0-9.0 x 10<sup>6</sup> cell/mL의 농도가 되도록 접종하였으며, 효모는 2.0 x 10<sup>7</sup> cell/mL 되도록 하였다.

### 나. 유산균 투입 시기 및 방법 선정

막걸리 담금 시 배양된 유산균을 투입하는 시기와 방법에 대해 알아보았다. 이에 대한 막걸리 담금 레시피는 table 10과 같다.

Table 10. 유산균 투입 시기 선정을 위한 막걸리 담금 원료 조성

	#1 (대조구)		#2		#3	
	1단	2단	1단	2단	1단	2단
멤 쌀	1,500g	3,000g	1,500g	3,000g	1,500g	3,000g
밀누룩	45g	90g	45g	90g	45g	90g
효 모	7.4g	-	7.4g	-	-	21.8g
유산균배양액	-	-	120mL	-	120mL	-
물	2,025mL	4,050mL	2,025mL	4,050mL	2,025mL	4,050mL

#1은 대조구, #2는 1단에 효모와 유산균을 동시에 투입하여 알코올 발효와 유산균에 의한 유기산 발효가 동시에 이루어지게끔 유도하는 방식이며, #3은 1단에 유산균을 먼저 투입하여 유기산 발효가 먼저 일어나게 한 뒤 효모를 투입하여 알코올 발효가 진행되는 방식으로 하였다. 선행 연구 결과 알코올 발효가 먼저 일어난 뒤 유산균을 투입할 경우 알코올에 의해 유산균이 사멸되기 때문에 알코올 발효 뒤 유산균 발효가 일어나도록 하는 방법은 제외하였다. 대조구 #1과 시험 #2는 2단 담금 시점을 1단 담금 직후 24시간 경과 후 진행하였고, #3은 분석을 통해 유기산 발효가 더 이상 진행되지 않을 때로 하였다. 발효 종료 시점은 알코올 발효가 더

이상 진행되지 않았을 시점으로 하였다.

담금 및 발효를 진행한 결과는 Fig. 4, 5와 같다. 알코올 분석 결과 최종 발효 알코올은 대조구 18.45%, 유산균을 1단에 효모를 2단에 첨가한 시험구(#3)가 18.56%로 높았으며, 유산균과 효모를 동시에 투입한 시험구(#2)의 경우에는 가장 낮은 16.41%로 나타났다. 또한 대조구에 비해 시험구들은 알코올 발효 속도가 느려 상대적으로 발효 시간이 늘어났는데, 이는 막걸리 술덧 내 효모가 유산균이 생성한 과다한 유기산에 의해 생육의 저해를 받음으로써 나타난 현상으로 판단된다. 한편 1단에 유산균만을 투입한 경우에도 4일 이후부터 알코올이 생성되었는데 이는 밀누룩 내 들어있는 효모에 의한 것으로 판단되었으며 실제 사용한 밀누룩을 분석한 결과  $2.3 \times 10^5$  cfu/g 의 농도로 효모가 있었다.

산도 분석 결과 시험구 #3의 최종 산도 9.1-9.3으로 가장 높았으며 대조구 #1이 산도 4.9-5.0으로 가장 낮았다. #3의 경우 1단 발효에서 유산균에 의한 유기산 발효가 충분히 진행되어 최대 산도가 22.5로 높게 생성되었다. 그 후 높은 산도에 의해 술덧 내 유산균이 사멸된 상태에서 2단 담금 시 원료 및 담금수에 의해 희석되고 그 뒤 효모에 의한 알코올 발효가 일어나 유산균에 의한 유기산 발효가 적게 일어난 것으로 판단된다. 그러나 1단 유기산 발효 시 생성된 산도가 너무 높아 최종 산도 또한 대조구(#1)와 #2에 비해 높았다. 효모와 유산균을 동시에 투입하여 발효한 시험구(#2)의 경우에도 대조구에 비해 산도는 다소 높았지만 최종 산도는 6.7-6.8로 #3에 비해서는 그다지 높지 않았다.

최종적으로 종합한 결과 막걸리 술덧 내에서 알코올 발효와 유기산 발효가 균형 있게 충분히 이루어지도록 하기 위해서는 1단에서는 유산균에 의한 유기산 발효 진행하고, 2단에서는 효모에 의한 알코올 발효를 진행하도록 하는 것이 좋을 것으로 판단된다.

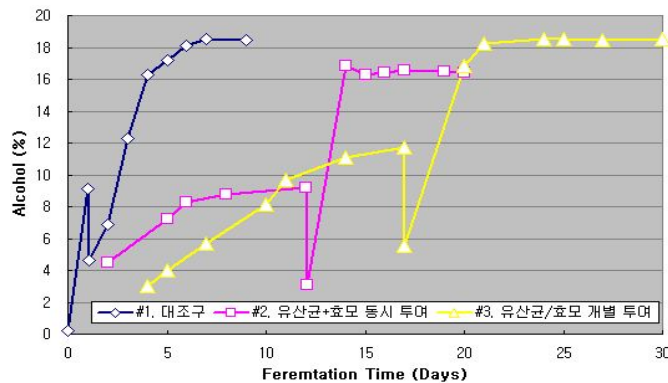


Fig 4. 유산균 투입 시기에 따른 막걸리 발효 시 알코올 패턴

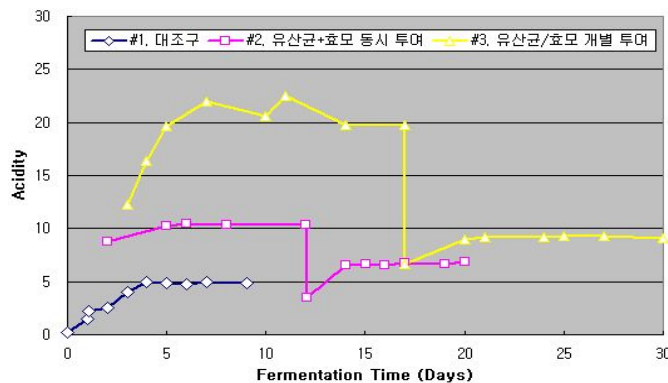


Fig 5. 유산균 투입 시기에 따른 막걸리 발효 시 산도 패턴

## 6. 유산균 막걸리 개발을 위한 유산균 선정

관능적·기능적 측면에서의 유산균 막걸리 제품 개발에 있어 보다 다양한 범위에서 유산균 막걸리에 적용할 수 있는 유산균에 대한 확대 가능성을 알아보기 위하여 제1협동연구기관에서 분리된 막걸리 유래 유산균들에 대한 발효 특성 및 관능 특성에 대한 연구를 수행하였다. 탐색한 유산균으로는 막걸리 내 우점종으로 밝혀진 *Lactobacillus plantarum* K3, *L. brevis* K7, *L. casei* K1와 그 외 유산균으로 *L. reuteri* K1, *L. rhamnosus* K1 을 선정하였다. 또한 막걸리에서의 검출 빈도는 높지 않았지만 기능적 측면을 고려하여 누룩에서 분리된 *Weissella cibaria* KSD-914를 이용하여 유산균 발효 패턴 및 술 발효 시 알코올 발효 패턴을 비교하였으며 마지막으로 제조된 유산균 막걸리에 대한 관능적인 측면에서의 기호도를 평가하였다.

### 가. 연구 수행 방법

탐색 유산균 seed 배양은 MRS(Difco. co) broth 50mL을 100mL 삼각플라스크에 넣어 멸균한 뒤 접종하여 37°C incubator에서 24시간 정치 배양하여 사용하였다. 접종량은 5%(v/v)로 하였으며, 각 균주에 대한 보관 및 계대배양 배지로는 MRS agar medium을 사용하였다. 유산균 발효에 접종할 유산균 확대 배양은 질소원으로 밀누룩 3%(w/v)로 하였으며, 탄소원으로는 설탕 2%(w/v)하였다. 멸균 시 maillard reaction을 방지하고자 삼각플라스크에 각각 넣어 멸균한 뒤 무균적으로 혼합하여 접종 및 배양하였다. 멸균 및 무균적으로 혼합된 확대 배양 배지에 유산균 seed 배양액을 접종량 5%(v/v)로 하여 seed 배양과 마찬가지로 37°C incubator에서 24시간 정치 배양하여 사용하였다.

유산균 발효를 위한 담금 레시피는 1차년도에서 정립한 방법으로 수행하였다. 즉, 쌀 1,000g을 깨끗이 물로 세척하고 14-15°C의 물에 1시간 동안 침지한 후 물을 뺀 뒤 담금수 1,350mL와 함께 믹서기로 갈아 5L 플라스틱 발효조에 넣은 뒤 (주)국순당에서 제조한 밀누룩 30g과 유산균 확대 배양액 100mL를 넣어 담금 직후 유산균의 농도가 현미경으로 hemocytometer로 측정 시  $2.0 \sim 4.0 \times 10^6$  cell/mL 가 되도록 하였다. 발효는 37°C incubator에서 진행하였으며, 시간에 따른 이화학 및 미생물 분석을 수행하였다.

### 나. 유산균 발효 적용 시 특성 분석 및 평가

생쌀을 이용하여 37°C 조건에서 24시간 유산균 발효한 후 각 유산균에 대한 이화학 및 유산균 결과는 table 11과 같다.

Table 11. Results of Lactic acid bacteria fermentation by the raw rice methods at 37°C

LAB 종류	Acidity	Dextrose (g/L)	Lactate (g/L)	LAB (cfu/mL)
<i>L. plantarum</i> K3	19.5	15.3	5.88	1.8E+ 09
<i>L. brevis</i> K7	20.2	10.5	6.01	3.1E+ 09
<i>L. casei</i> K1	15.3	25.3	3.27	9.8E+ 08
<i>L. reuteri</i> K1	8.5	40.2	2.23	5.8E+ 08
<i>L. rhamnosus</i> K1	7.8	45.5	2.11	3.4E+ 08
<i>W. cibaria</i> KSD-914	18.5	10.3	5.55	2.1E+ 09

모든 유산균 발효에서 시간에 따라 산도가 증가하는 경향을 보였으나 산 생성 정도와 이에 따른 유산균 수의 증가폭은 유산균 별로 크게 상이하였다. 즉, *L. brevis* K7의 경우가 산도가 20.2로 가장 높았으며, *L. rhamnosus* K1에서 산도가 7.8로 가장 낮았다. 산도와 같이 증식된 유산균도 이와 유사한 경향으로 증가함을 알 수 있었다. 한편, 유산균 발효 후 관능적으로 향을 평가 해보았을 때, *L. plantarum* K3, *L. casei* K1, *L. brevis* K7 발효에서는 선내가 나는 반면, 산도가 다소 낮은 *L. reuteri* K1과 *L. rhamnosus* K1의 경우에는 이취는 없지만 특징 있는 향도 없었다. *W. cibaria* KSD-914에서는 약하지만 은은한 과일향이 있어 관능적으로 우수한 편이었다.

#### 다. 막걸리 발효 적용 시 특성 분석

각 유산균에 대한 유산균 발효 후 효모를 첨가하여 알코올 발효를 하였을 때 막걸리 발효 패턴을 알아보려고 실험을 수행하였다. 효모를 첨가한 알코올 발효, 즉 유산균 막걸리 담금 레시피는 1차년도에서 진행한 동일한 방법으로 하였으며 그 레시피는 Table 12와 같다.

Table 12. Composition of ingredients for Lactic acid bacteria Makgeolli by raw rice methods.

	일반 막걸리		유산균 막걸리	
	1단 (알코올)	2단 (알코올 발효)	1단 (유산균 발효)	2단 (알코올 발효)
멥쌀	1,000 g	2,000 g	1,000 g	2,000 g
밀누룩	30 g	60 g	30 g	60 g
효모	12 g	-	-	36 g
유산균 배양액	-	-	100 mL	-
물	1,350 mL	2,700 mL	1,350 mL	2,700 mL
발효 온도	37℃	25℃	37℃	25℃
발효 기간	1일	6일	1일	6일

알코올 발효를 위한 효모 투입 농도는 2단 담금 직후 효모의 균체수가  $5.0 \times 10^7$  cell/mL이 되도록 하였으며, 이 때 사용된 효모는 C사의 생이스트로 하였다. 유산균 막걸리의 대조구 1단에 유산균 대신 효모를 투입하여 알코올 발효가 진행하도록 하고 2단에는 쌀, 밀누룩, 물만 넣어 2단 알코올 발효를 지속토록 하였다.

막걸리 발효 최종 7일차 이화학 및 미생물 분석 결과는 table 13과 같다. 유산균 발효를 24시간 정도 진행한 뒤 2단 담금 원료를 투입하고 효모에 의한 알코올 발효를 수행한 결과 *L. reuteri* K1과 *L. rhamnosus* K1의 경우에는 알코올 발효가 충분하게 일어나지 않고 발효 5일부터 알코올 생성속도는 크게 감소하고 포도당이 축적되기 시작되었다. 유산균 균체수도 크게 증가하지 않고 점차 사멸되어 최종적으로는 발효 술덧 mL 당  $10^5$  cfu 수준으로 크게 감소되었다. *L. plantarum* K3, *L. brevis* K7과 *W. cibaria* KSD-914의 경우 대조구에 비해서 알코올은 1.0~1.3%(v/v) 정도 낮지만 다른 유산균에 비해 높고, 최종 발효 산도와 유산균의 균체수는 높았다. 대조구에 비하여 알코올이 다소 낮은 것은 1단 유산균 발효 시 젖산에 의한 효모 생육에 저해로 기인한 것으로 판단되나 그 저해도는 크지 않는 것으로 보인다.

Table 13. Final results of makgeolli fermentation by various Lactic acid bacteria

LAB 종류	Alcohol (%, v/v)	Acidity	Dextrose (g/L)	YEAST (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)
Control	18.5	5.5	20.2	1.3 X 10 <sup>6</sup>	2.9 X 10 <sup>4</sup>
<i>L. plantarum</i> K3	17.8	10.7	32.6	3.9 X 10 <sup>5</sup>	8.3 X 10 <sup>7</sup>
<i>L. brevis</i> K7	17.2	10.2	26.3	1.2 X 10 <sup>6</sup>	7.9 X 10 <sup>7</sup>
<i>L. casei</i> K1	16.8	9.5	38.2	8.8 X 10 <sup>5</sup>	7.4 X 10 <sup>7</sup>
<i>L. reuteri</i> K1	14.5	6.2	55.0	5.8 X 10 <sup>6</sup>	4.2 X 10 <sup>5</sup>
<i>L. rhamnosus</i> K1	15.7	7.5	45.5	3.3 X 10 <sup>6</sup>	3.7 X 10 <sup>5</sup>
<i>W. cibaria</i> KSD-914	17.5	7.3	15.0	4.5 X 10 <sup>7</sup>	5.3 X 10 <sup>7</sup>

라. 유산균 종류별 막걸리 관능 특성 평가

막걸리 발효 후 술덧을 믹서기로 분쇄한 뒤 80mesh sieve로 체별한 후 알코올 6%로 희석하여 각 막걸리에 대한 향과 맛에 대한 관능을 평가하였다(대조구 제외). 관능에 참여한 응답자는 20대에서 50대까지의 남녀를 대상으로 하였으며, 응답자의 성별은 남성과 여성이 각각 47%와 53%이었으며, 연령은 20대가 13%, 30대가 60%, 40대가 20%, 50대가 7% 이었다. 관능 평가에 대한 결과는 Fig. 6, Fig. 7과 같다.

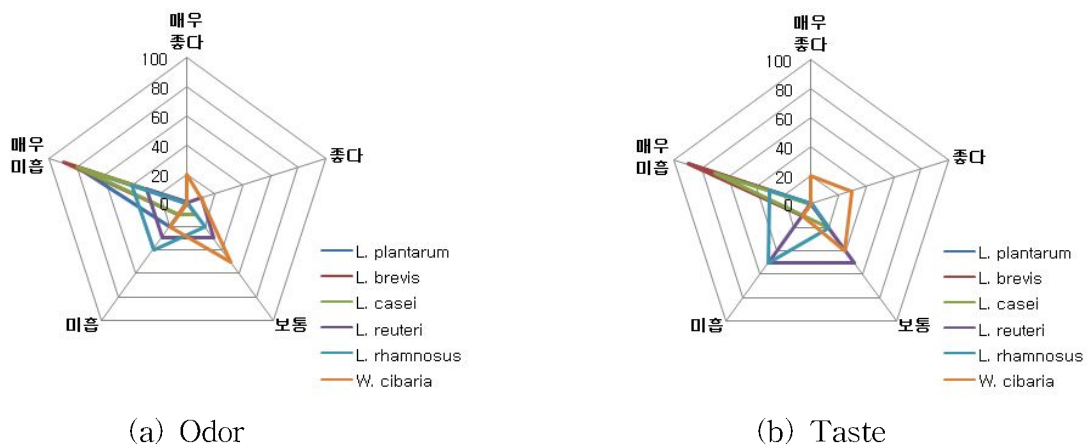


Fig. 6. The symbolic characteristic of various Lactic acid bacteria Makgeolli

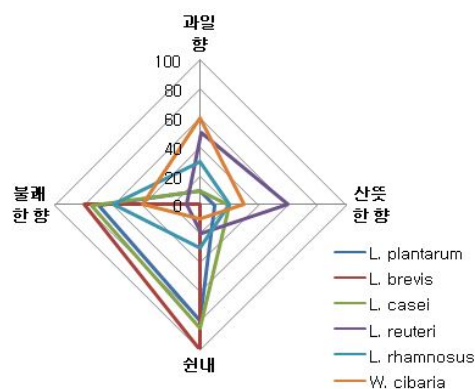


Fig. 7 Good & Bad items of the symbolic characteristic of various Lactic acid bacteria Makgeolli.

*W. cibaria* KSD-914를 이용한 유산균 막걸리에서 전체적으로 맛과 향에서 긍정적인 응답을 보였다. 그 외 유산균 막걸리에서 대부분 부정적으로 평가하는 부분은 선내와 지나친 신맛

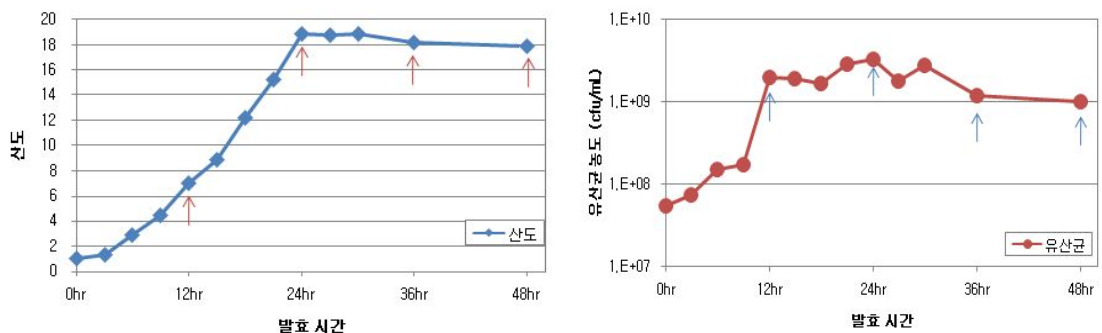
이 지적되고 있다. 따라서 유산균 막걸리 개발 시 관능적인 측면으로 부정적인 요소를 줄이는 것이 가장 중요할 것으로 판단된다. 한편, *W. cibaria* KSD-914는 1차협동연구기관의 연구 결과에 의하면 배양 배지에 설탕을 첨가할 경우 EPS 생성능이 탁월함이 밝혀졌다. 최근 EPS가 유산균 중 *Bifidobacteria* 유래 EPS와 *Lb. delbrueckii subsp. bulgalicus*, *Lac. helverticus var. jugurti*로부터 유래한 EPS에 함양 효과가 있다고 보고되었다. 따라서 기능적 및 관능적 측면에서의 유리함을 바탕으로 *W. cibaria* KSD-914 균주를 이용하여 유산균 막걸리 제품 개발을 진행하도록 결정하였다.

## 7. *W. cibaria* KSD-914를 이용한 유산균 막걸리 레시피 개발

특정 유산균을 이용한 유산균 막걸리 개발에 있어 중요한 부분으로 유산균 발효 시 발효 산도를 적절히 제어하면서 효모 알코올 발효 수율과 생산성이 높은 것이 관건이다. 이를 위하여 다양한 막걸리 유래 유산균을 선별한 결과 *W. cibaria* KSD-914를 선정하였다. 이 때 *W. cibaria* KSD-914를 유산균 막걸리에 적용하기 위해서는 관능 품질을 최적화하면서 유통 중 변화를 최소화 할 수 있는 레시피와 공정 설계 등이 필요할 것으로 판단되었다. 또한 이와 더불어 생산 공정 편이성도 뒷받침 되어야 할 것으로 판단된다. 이를 위하여 선정된 *W. cibaria* KSD-914 유산균에 대한 유산균 발효 시간과 유산균 발효와 효모 알코올 발효와의 적정 비율, 마지막으로 제품화 되었을 때 유통 안정성 평가 등을 진행하였다. 레시피를 개발함에 있어 1단 유산균 발효 시 *W. cibaria* KSD-914에 의한 EPS 생성을 유도하기 위하여 1단 쌀 중량 대비 5% (w/w)의 sucrose를 첨가하였으며 2단에는 넣지 않는 것을 기본으로 하였다.

### 가. 유산균 발효 시간에 따른 막걸리 발효 패턴 분석

유산균 발효 시간에 따른 막걸리 발효 패턴을 비교 분석하였다. 유산균 발효 담금 후 37°C에서 48시간까지 발효하였으며 시간별로 이화학 및 미생물 분석을 수행하였다. 유산균 발효 12시간부터 12시간 간격으로 2단 담금을 한 후 25°C에서 알코올 발효를 하였다. 먼저 유산균 발효 시간에 따른 산도 및 유산균의 변화는 Fig. 8과 같다.



(a) Acidity (b) Lactic acid bacteria(LAB) Conc.  
 Fig 8. Change the acidity and LAB concentration during the LAB fermentation

발효 시간에 따라 산도는 일정하게 증가하였으며 발효 30시간에 18.9로 가장 높았다가 그 후 미세하게 감소하는 경향을 나타냈다. 유산균의 농도는 완만하게 증가하다가 9시간에 급격하게 증가하여 12시간 이후부터는  $1.0 \times 10^9$  cfu/mL 이상의 농도로 일정하게 유지되다가 점차

감소하여 발효 48시간에는  $9.0 \times 10^8$  cfu/mL로 되었다.

알코올 발효를 위한 2단 담금은 Fig. 8에서 화살표로 표기한 시점에서 발효 술덧을 균일하게 한 뒤 2L를 취하여 별도 발효 용기에 넣은 뒤 2단 담금을 진행하여 25°C에서 알코올 발효를 수행하였다. 알코올 발효 시간은 2단 담금 시점으로부터 6일간 동일하게 진행하였다. 이화학 및 미생물 분석은 발효 일수별로 진행하였으며, 막걸리 발효 7일차 최종 결과는 Table 14와 같다. 유산균 발효를 12시간하고 2단 담금을 한 막걸리의 경우 발효 알코올이 14.9%로 제일 낮았으며, 2단 담금 직후 산도는 4.7로 가장 낮았으나 최종 발효 산도는 14.7로 제일 높았다. 이는 알코올 발효 초기 유산균의 vitality가 가장 높아 효모와 유산균 간의 경쟁으로 인하여 효모의 생육이 다소 억제되고 그로 인하여 유산균의 증식이 활발하게 진행되어 이로 인한 결과로 판단된다. 그 외 유산균 발효 시간에서는 알코올 농도가 17.5~18.2%로 수율이 높았으며 전반적으로 유산균 발효 시간에 따라 알코올 생성량은 증가하고 최종 발효 산도는 다소 감소하는 경향을 보였다.

Table 14. Final results of LAB Makgeolli by the time of LAB fermentation

유산균 발효 시간 (hr)	Alcohol (% v/v)	Acidity	Dextrose (g/L)	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)
12hr	14.9	14.7	17.0	$6.0 \times 10^6$	$6.6 \times 10^7$
24hr	17.5	7.3	18.7	$4.2 \times 10^7$	$1.8 \times 10^8$
36hr	17.9	7.2	19.8	$5.6 \times 10^7$	$9.1 \times 10^7$
48hr	18.2	6.5	12.3	$1.3 \times 10^6$	$4.3 \times 10^7$

유산균 발효 시간에 따른 막걸리 발효 후 술덧을 믹서기로 분쇄한 후 80mesh sieve로 체별한 후 알코올 6%로 희석하여 각 시험구에 대한 관능 풍미 대한 선호도를 평가하였다(Fig. 9).

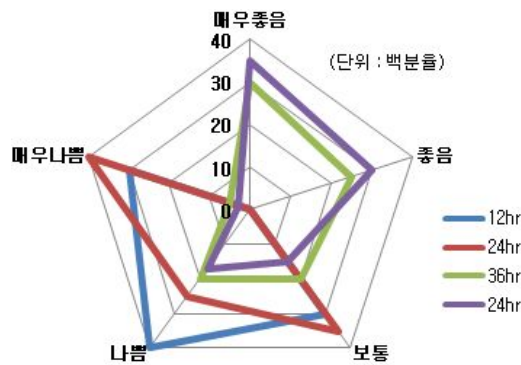


Fig. 9. 유산균 발효 시간에 따른 막걸리 발효 제품에 대한 관능 풍미 선호도 평가

평가 결과 유산균 발효가 길어질수록 관능 풍미에 대한 선호도가 증가하는 것을 알 수 있었다. 따라서 유산균 막걸리의 발효 산도를 제어하면서 제품 관능 품질 향상을 위해서는 유산균 발효를 36시간(1.5일) 이상으로 진행하는 것으로 결정하였다.

나. 유산균 발효 적용 비율 설정을 위한 발효 및 관능 평가

유산균 막걸리 제품 레시피 및 공정 개발함에 있어 유산균 함량, 제품 안정성 및 대량 생산 시 공정 편이성을 고려하기 위하여 1단(유산균 발효)과 2단(알코올 발효) 최적 비율을 설정하고자 담금 및 발효를 진행하였다. 실험실 단계의 레시피는 유산균 발효와 알코올 발효가 30 : 70의 비율로 되어 있는 바, 대량 생산 적용 시에는 유산균 배양액이 많이 필요로 하기 때문에 공정 편이성이 다소 낮아질 우려가 있을 것으로 판단되었다. 담금은 부피에 대한 차이를 없애고자 최종 발효 술덧량을 동일하게 하였다. 담금 시 (주)국순당에서 제조한 밀누룩(역가 1,800sp) 사용량은 쌀 원료 무게 대비 3%(w/w)로 하였으며 담금수는 쌀 원료 대비 135% (v/w)로 하였다. 2단 담금 시 효모는 담금 직후 농도가  $5.0 \times 10^7$  cell/mL가 되도록 하였다. 1단 유산균 발효는 37°C에서 36시간 발효한 것으로 발효 산도는 18.0, 유산균 농도는  $1.2 \times 10^9$  cfu/mL 로서 2단 담금 시 균일하게 교반한 뒤 2단 담금 시 사용하였다. 2단 담금 직후 25°C에서 6일간 발효를 진행하였으며 1일 간격으로 이화학 및 미생물 분석을 진행하였다. 1단과 2단의 비율은 실험 담금에 대한 레시피는 Table 15와 같다.

Table 15. Composition of ingredients for Lactic acid bacteria Makgeolli by raw rice methods.

원 료		Ratio				
		30 : 70	20 : 80	10 : 90	5 : 95	1 : 99
1단 유산균 발효 술덧량		3,525mL	2,350mL	1,175mL	588mL	118mL
2단 담금 원료	멤 쌀	3,500g	4,000g	4,500g	4,750g	4,950g
	밀누룩	105g	120g	135g	143g	149g
	효 모	59g	59g	59g	59g	59g
	물	4,725mL	5,400mL	10,575mL	6,412mL	6,682mL
총 발효 술덧량		11,750mL	11,750mL	11,750mL	11,750mL	11,750mL

유산균 발효와 효모 알코올 발효 담금 비율에 따른 막걸리 발효에서 알코올의 변화는 Fig. 10과 같다. 알코올 농도는 발효 1일부터 급격히 증가한 후 완만하게 유지하며, 1 : 99 ratio 경우 발효 7일차에서 18.6%로 제일 높았다. 유산균 발효 비율이 낮을수록 최종 발효 알코올은 높은 것을 확인할 수 있었다.

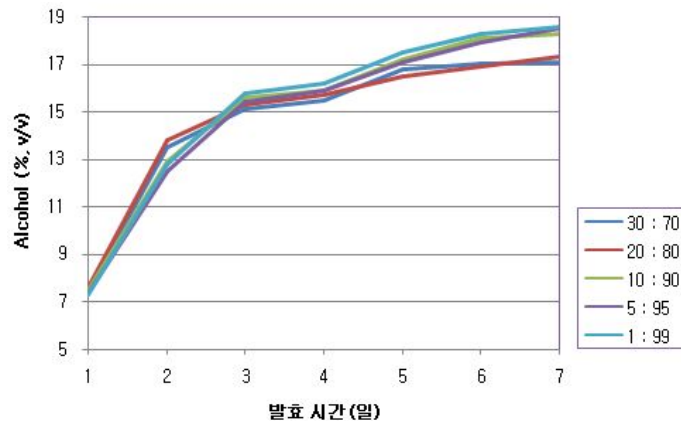


Fig. 10. Changes of alcohol concentration during the LAB Makgeolli Fermentation



막걸리 발효 산도의 변화는 Fig. 11과 같다. 유산균 발효 적용 비율이 높을수록 2단 담금 직후 발효 산도는 높고 발효 7일 후 최종 산도 또한 높으나, 2단 알코올 발효 중에 생성된 산도는 유산균 발효 적용 비율이 낮아질수록 점차 높아짐을 확인하였다.

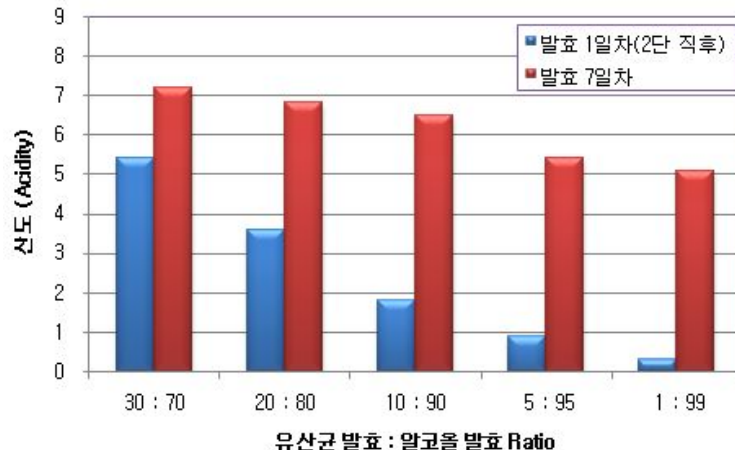


Fig. 11. 막걸리 담금 비율에 따른 발효 산도 비교

막걸리 발효 중 유산균의 변화는 Fig. 12와 같다. 2단 담금 후 발효 1일까지는 유산균이 급격히 증식하다가 그 후 완만하게 유지한 후 점차 감소하는 경향을 보였다. 발효 7일 경과 후 초기 유산균 균체수가 높은 30:70 ratio 에서 가장 높은 농도로  $6.2 \times 10^7$  cfu/mL 의 유산균이 남아 있는 반면에 유산균 발효 적용 비율이 가장 낮은 1:99 ratio에서 가장 낮은 농도인  $5.3 \times 10^5$  cfu/mL로 유산균이 존재하였다. 이는 초기 유산균 비율이 낮아 효모 알코올 발효에 영향을 미치지 못하였고 효모에 의해 생성된 알코올에 의하여 유산균이 급속한 속도로 사멸했기 때문인 것으로 확인하였다. 유산균 막걸리는 목적으로 하는 유산균이 높은 농도로 존재하여야 상품으로서의 가치가 높을 것인 바, 유산균 발효 비율이 10% 미만으로 적용할 경우에는 발효 술덧 내 목적 유산균의 농도가  $10^7$  cfu/mL 미만으로 존재하기 때문에 유산균 막걸리라 하기에는 적합하지 않는 것으로 결론을 내렸다.

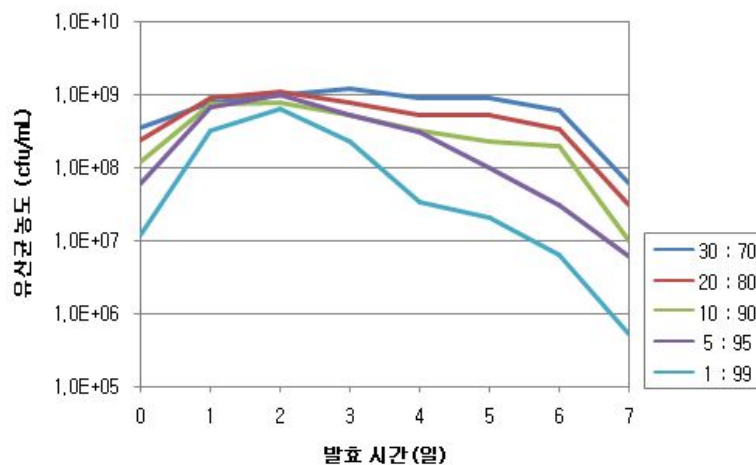


Fig. 12. Changes of Lactic acid bacteria concentration during the LAB Makgeolli Fermentation

다. 상온 보관 시 안정성 평가

유산균 발효와 효모 알코올 발효 적용 비율에 대한 막걸리 발효 후 술덧을 믹서기로 분쇄한 뒤 80mesh sieve로 체별한 후 알코올 6%로 희석하여 맛과 향에 대한 관능 평가를 수행하였다. 평가한 결과 유산균 발효 적용 비율이 낮을수록 *W. cibaria* KSD-914 풍미가 다소 약해지는 것을 확인할 수 있었다.

서두에서 언급한 바와 같이 유산균 막걸리는 목적으로 하는 유산균이 제품에 높은 농도로 존재하는 것으로 목적으로 하는 바, 10℃ 이하 냉장 유통이 철저한 감독 하에 유지된다면 큰 문제가 될 수 없을 것으로 판단되나 냉장 유통 과정에서 간혹 10℃ 이상의 외기 조건에 노출될 경우 온도 변화에 따른 제품 품질 열화(예, 알코올 및 산도 증가)가 기존 생막걸리에 비해 높다면 상품으로서의 가치는 급격히 떨어질 것이다. 따라서 기 실험된 발효 술덧을 가지고 각각 시제품으로 제조하여 25℃에서의 안정성을 평가하였다. 시제품 제조는 체별한 발효 술덧을 알코올 농도 6%로 희석한 뒤 기타 첨가물료를 첨가하지 않고 깨끗한 750mL PET에 넣어 밀폐 CAP으로 밀봉하였다. 시험군 별로 각각 10 PET 씩 만들어 25℃ 항온기(incubator)에 넣고 일정한 간격으로 10일까지 이화학, 미생물 및 관능 평가를 진행하였다. 이 때 최종 유산균 농도가 가장 낮았던 1 : 99 비율의 담금 발효 술덧은 제품으로서의 가능성이 낮아 제외하였다.

시제품에 대한 상온 안정성 평가를 진행한 결과는 table 16과 같다. 평가 결과 30:70 비율로 발효한 시제품의 경우에는 알코올이 6%에서 8.2%로 급격히 상승하였고 알코올 발효에 의한 탄산으로 인하여 음용 시 탄산이 강하게 느껴졌다. 막걸리 제품에 대한 초기 알코올 농도 대비 1% 이상의 증가는 주세법 상 규격에 위배됨으로 알코올 규격 측면에서의 안정성은 떨어지는 것으로 평가되었다. 그 외 비율에서는 알코올에 대한 안정성은 확보되었다. 10:90 비율과 5:95 비율에서는 관능적으로 미세 쉰내와 쉰내가 심하게 나는 바, 이화학적 측면에서의 제품 규격은 보장되나 관능적인 측면에서의 안정성은 떨어지는 것으로 나타났다. 평가 결과 20:80 비율로 적용하여 만든 시제품의 경우에는 이화학적인 측면과 관능적인 측면에서 안정성이 확보됨을 확인하였다. 5:95 시제품을 제외한 나머지 시제품의 경우 상온에서 보관할 때 제품 내 미생물 생육에 필요한 포도당과 같은 탄소원이 0.5~1.0%(w/v) 정도 있는데도 불구하고 그다지 생육하지 않음을 볼 수 있는데, 유산균 발효에 의해 생성된 젖산 외에도 어떠한 물질 등에 의하여 제품 내 미생물이 저해를 받은 것으로 판단되지만 이에 대한 깊이 있는 연구가 필요하다.

Table 16. 조건별 제조된 유산균 막걸리 시제품에 대한 상온 유통 안정성 비교 평가 결과

Ratio	30 : 70		20 : 80		10 : 90		5 : 95	
	0일	7일	0일	7일	0일	7일	0일	7일
Alcohol(%)	6.0	8.2	6.0	6.7	6.0	6.4	6.0	6.4
Acidity	2.5	2.7	2.5	2.6	2.1	3.4	1.8	4.2
Yeast	6.0x10 <sup>7</sup>	9.8x10 <sup>7</sup>	7.0x10 <sup>7</sup>	6.5x10 <sup>7</sup>	3.5x10 <sup>7</sup>	9.0x10 <sup>6</sup>	2.1x10 <sup>7</sup>	2.5x10 <sup>7</sup>
LAB	2.0x10 <sup>7</sup>	5.0x10 <sup>7</sup>	1.0x10 <sup>7</sup>	3.2x10 <sup>7</sup>	3.0x10 <sup>6</sup>	7.8x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>6</sup>	1.2x10 <sup>8</sup>
관능점수	2.2±0.2		3.0±0.3		2.5±0.1		1.3±0.3	
관능묘사	탄산이 다소 강하며 알코올 맛이 강함		신향, 누룩취 약간 남		미약하게 쉰내가 있으나 무난한 수준임		쉰내가 다소 심함	

※ Yeast & Lactic acid bacteria(LAB) 단위 : cfu/mL

※ 관능검사는 25℃ 상온 보관 7일 후, 5℃ 냉장실에서 7시간 보관 후에 실시하였다.

※ 관능점수(5점 척도법) : 1점(매우 나쁨) - 2점(나쁨) - 3점(보통) - 4점(좋음) - 5점(아주 좋음)

이상의 실험 결과 등을 종합하여 볼 때, 발효 술덧 내 최종 잔존 유산균 농도와 관능 품질 최적화를 위한 관능 평가를 바탕으로 유산균 발효 적용 비율을 20%로 결정하였다.

라. Large scale 에서의 *W. cibaria* KSD-914 유산균 막걸리 시제품 생산

(1) 연구 수행 방법

실험실에서 구축된 제품 레시피 및 생산 공정을 바탕으로 Large-scale 에서의 *W. cibaria* KSD-914 유산균 막걸리 제품 시험 생산에 대한 연구를 수행하였다. 이에 대한 연구는 (주)국순당 횡성공장 내 있는 pilot plant 에서 진행하였다. 시험 생산 공정에 대한 전반적인 모식도는 Fig. 13과 같다.

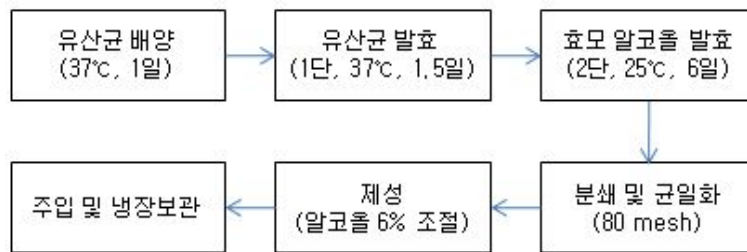


Fig. 13. *W. cibaria* KSD-914 유산균 막걸리 제품 생산 모식도

유산균 막걸리에 적용할 *W. cibaria* KSD-914 유산균 배양은 mechanically stirred 100-liter fermenter를 이용하였다. 유산균 배양을 위한 working volume으로 70L로 하였으며 배양 배지로는 밀누룩 3%(w/v), 설탕 2%(w/v)로 하였으며, 멸균 시 maillard reaction을 방지하고자 각각 멸균한 뒤 무균적으로 혼합하였다. Seed는 실험실에서 배양하여 접종 농도를 5%(v/v)하여 접종한 뒤 37℃ 온도에서 24시간 배양하였다. 유산균이 통성혐기성(Facultative anaerobe)임을 감안하여 별도의 air는 공급하지는 않고 균일화를 위해 50rpm 저속으로 교반만 하였다.

(2) *W. cibaria* KSD-914 유산균 대량 배양 결과

100L fermenter를 이용한 *W. cibaria* KSD-914 배양 결과는 Fig. 14와 같다. 실험실 규모에서 배양한 결과와 발효 산도는 17.8로 약간 낮지만  $2.0 \times 10^9$  cfu/mL 의 고농도의 유산균 균체수와 발효 산도는 얻을 수 있었다.

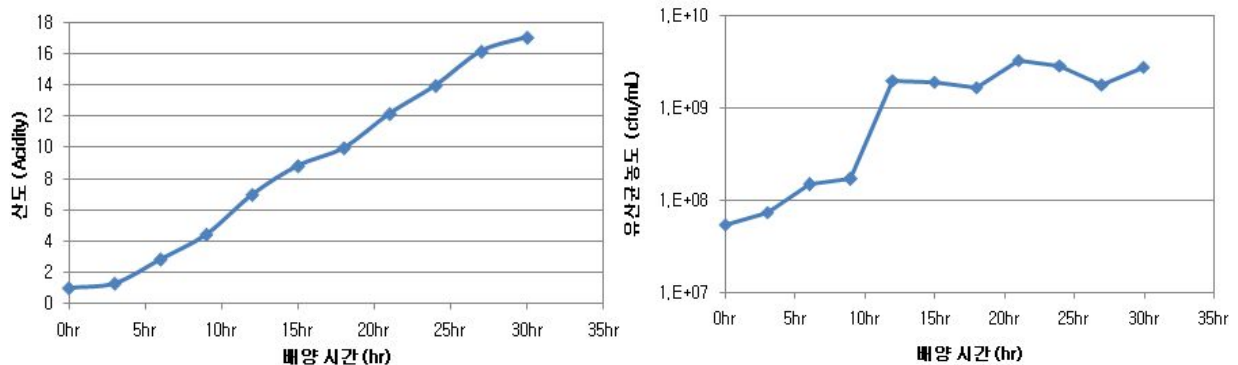


Fig. 14. 100L fermenter를 이용한 *W. cibaria* KSD-914 배양 시 배양 시간별 산도 및 균체수의 변화

(3) *W. cibaria* KSD-914 유산균 막걸리 담금 및 시험 생산

배양된 유산균을 Seed로 하여 유산균 발효 담금(1단) 및 발효를 진행하였고 익일 효모 알코올 발효를 위한 2단 담금을 진행하였다. 이 때 적용된 담금 레시피는 Table 17과 같다. 1단 담금 시 유산균의 농도는 현미경을 통한 hemocytometer로 측정 시  $2.0 \times 10^6$  cell/mL이 되도록 넣었으며, 2단 담금 시 효모는  $5.0 \times 10^7$  cell/mL 되도록 계산하여 투입하였다. 막걸리 원료로 사용되는 쌀은 1단과 2단의 비율이 2:8 이 되도록 하였으며 (주)국순당에서 제조한 밀누룩을 가지고 쌀 원료 대비 3%(w/w)로 하여 생쌀 발효법으로 하였다. 유산균 막걸리는 온도 조절이 가능한 Jacket type의 200L pilot tank를 이용하여 working volume은 총 volume 대비 80% 수준으로 하였다. 담금수의 온도는 각 발효 온도와 같은 조건으로 준비하여 사용하였다. 1단 발효 온도 조절은 37°C 대형 circulator를 이용하였으나, 2단 발효 온도에서는 발효 시 발효 온도가 어느 정도 상승되기 때문에 별도의 온수를 사용하지 않고 5~6°C 냉각수만 가동하여  $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지되도록 하였다.

Table 17. 200L Pilot Tank에서 *W. cibaria* KSD-914 유산균 막걸리 담금을 위한 레시피

원료	단 구분	1단 (유산균 발효)	2단 (알코올 발효)
멥 쌀		14.0kg	56.0kg
설 탕		0.7kg	-
밀누룩		0.42kg	1.68kg
효 모		-	0.82kg
유산균 배양액		0.07L	-
물		18.9L	75.6L
담금 직후 용량		32.9L	164.5L

Pilot scale에서의 발효 시간에 따른 *W. cibaria* KSD-914 유산균 막걸리 발효 결과는 Table 18과 같다. 발효 결과 실험실에서 진행한 발효 경과와 거의 유사한 패턴으로 진행되었다. 알코올은 2단 담금 직후 급격하게 증가하다가 발효 5일부터는 서서히 일어나 7일차에 17.5%로 생성되었다. 발효 산도는 발효 1.5일차에 18.3으로 최고로 높았다가 2단 담금 직후 희석되고 그 뒤 완만하게 증가하다가 마찬가지로 발효 5일부터 더 이상 증가하지 않고 발효 7일차에 7.0이 되었다. 발효 중 미생물로 효모의 경우에는 유산균 발효 초기  $1.3 \times 10^4$  cfu/mL 농도로 검출되었는데 이는 밀누룩 유래의 효모인 것으로 분석되었다. 효모를 첨가한 2단 담금 직후  $6.5 \times 10^7$  cfu/mL에서 그 다음날인 발효 2일차에  $2.3 \times 10^8$  cfu/mL 로 최고로 높았다가 그 뒤 점차 감소하여 발효 7일차에는  $3.2 \times 10^7$  cfu/mL로 되었다. 유산균은 유산균 발효 시  $2.3 \times 10^9$  cfu/mL로 최고로 높았다가 막걸리 발효 동안  $10^8$  cfu/mL 수준으로 일정하게 유지되어 발효 7일차에  $6.7 \times 10^8$  cfu/mL 가 되었다.

Table 18. Change of temp., alcohol, acidity, RS and microflora during the 200L *W. cibaria* KSD-914 makgeolli fermentation

Time (Day)	Temp. (°C)	Alcohol (% v/v)	Acidity	Dextrose (g/L)	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)
0	36.5	0.0	0.3	1.2	1.3 x 10 <sup>4</sup>	3.3 x 10 <sup>6</sup>
1.5 (2단 직전)	37.2	0.1	18.3	21.1	4.7 x 10 <sup>5</sup>	2.3 x 10 <sup>9</sup>
1.5 (2단 직후)	24.6	0.0	3.8	5.8	6.5 x 10 <sup>7</sup>	4.6 x 10 <sup>8</sup>
2	25.3	8.9	5.3	2.4	2.3 x 10 <sup>8</sup>	9.2 x 10 <sup>8</sup>
3	25.2	13.5	5.7	4.5	2.1 x 10 <sup>8</sup>	7.5 x 10 <sup>8</sup>
4	25.1	15.2	6.5	7.3	8.6 x 10 <sup>7</sup>	5.2 x 10 <sup>8</sup>
5	25.0	17.1	7.0	10.1	6.6 x 10 <sup>7</sup>	6.2 x 10 <sup>8</sup>
6	24.9	17.3	6.9	10.4	4.3 x 10 <sup>7</sup>	5.4 x 10 <sup>8</sup>
7	24.5	17.5	7.0	15.8	3.2 x 10 <sup>7</sup>	6.7 x 10 <sup>8</sup>

Pilot plant scale 에서 발효를 수행할 때 큰 어려움은 없었으나, 유산균 발효 시 발효 온도를 37°C로 유지하는 것은 담금 용량이 커질수록 다소 어려운 부분이 될 것으로 판단된다. 알코올 발효 시에는 발효 시 발생하는 발열 반응에 의해 냉각수만으로도 충분히 25°C를 유지할 수 있었는데, 유산균 발효에서는 비록 유산균의 증식 및 유기산 발효에 의한 발열 반응이 일어난다 할지라도 37°C 온도로 일정하게 유지하는 것은 온수를 일정하게 순환시킬 수 있는 별도의 장비(Utility) 없이는 어려울 것으로 판단되는 바, 향후에는 보다 낮은 온도에서 유산균 발효를 할 수 있도록 조건을 탐색해야 할 것으로 사료된다.

#### (4) 소비자 기호도 검사

*W. cibaria* KSD-914 유산균 막걸리 발효를 완료한 후 분쇄기를 이용하여 분쇄한 후 Twist screen(일동아이엠씨, 한국)을 이용하여 80 mesh 크기로 균질화 하였다. 그 후 알코올 6%로 희석한 뒤 750mL PET에 담아 시제품을 제조하였으며, 최종 시제품은 알코올 6%, 산도 2.4, RS 1 g/L 이하였으며 제품 내 효모와 유산균은 mL 당 각 1 x 10<sup>7</sup> cfu와 2 x 10<sup>8</sup> cfu 이었다 (Fig. 15). 생산된 시제품을 이용하여 맛과 향에 대한 관능을 평가하였다. 관능에 참여한 응답자는 20대에서 50대까지의 남녀를 대상으로 하였으며, 응답자의 성별은 남성과 여성이 각각 47%와 53%였으며 연령은 20대가 13%, 30대가 60%, 40대가 20%, 50대가 7%였다. 관능 평가에 대한 결과는 Fig. 16와 같다. 전반적으로 맛과 향에서 긍정적인 응답을 얻었다. 향에서는 과일향(58%)과 시큼한 향(55%)을 특징으로 높게 평가되었다. 맛에서는 신맛(65%)과 가벼운 맛(48%), 느끼한 맛(43%)이 높게 평가되었으며, 단맛(27%)은 다소 낮게 나왔다. 본 시제품은 발효 본연의 맛과 향을 느낄 수 있도록 가급적 아스파탐과 같은 인공감미료 등을 첨가하지 않았다. 전반적으로 향 보다는 맛에 있어서 단맛이 다소 부족한 부분이 부정적인 측면으로 언급되는 바, 향후 필요할 경우 단맛이 어느 정도 보완될 수 있도록 별도의 방안을 마련해야 할 것으로 판단된다.



Fig. 15 시생산 제품(시제품1)

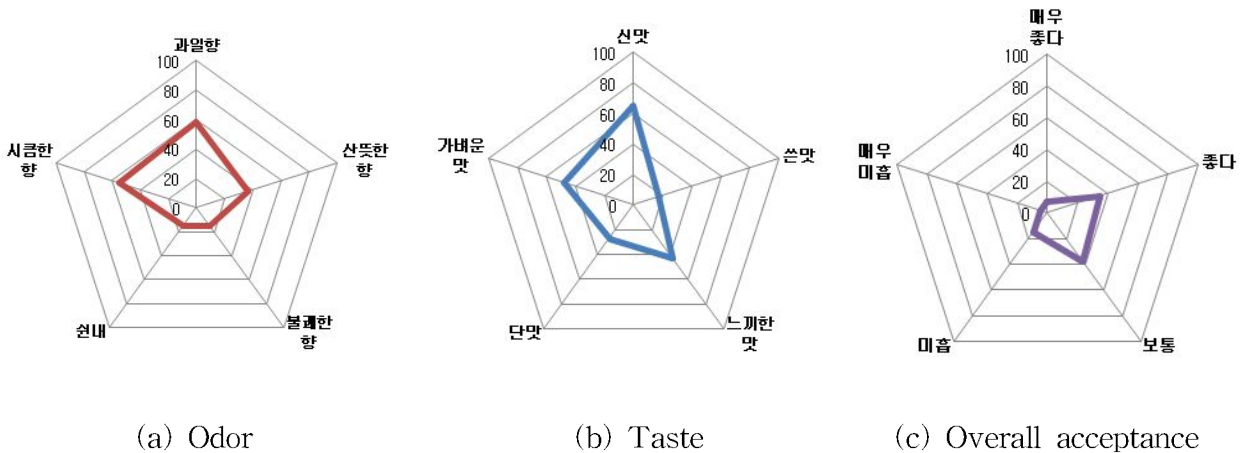


Fig. 16. The symbolic characteristics of trial manufactured *W. cibaria* KSD-914 Makgeolli product

### 8. 기능성 강화 유산균 막걸리 개발

2차년도에는 EPS 생성능을 지니고 관능적으로 우수한 밀누룩 유래 *W. cibaria* KSD-914 유산균을 단독으로 적용하여 막걸리 레시피 및 공정을 구축, 시제품을 개발하였다. 3차년도에는 더 나아가 기능성을 지닌 다양한 유산균을 복합적으로 활용하여 기능성이 강화되고 막걸리의 풍미가 좀 더 풍부하고 보다 향상된 유산균 막걸리를 개발하고자 연구를 수행하였다. 이에 먼저 제1협동연구기관(경희대학교)에서 분리한 막걸리 유래 유산균 중에서 기능성과 관능 측면에서 우수한 유산균을 선별하고자 평가를 진행하였다.

#### 가. 복합 유산균 선별

2차년도에서 막걸리 유래 유산균 중 우점종으로 존재하되 관능적 측면으로 저 평가된 유산균(*L. plantarum* K3, *L. casei* K1, *L. brevis* K7, *L. reuteri* K1, *L. rhamnosus* K1)을 제외한 다른 유산균에 대하여 제1협동연구기관에서 제공한 자료로 각 유산균에 대한 기능성을 확인하고 관능적 측면에서 평가를 실시하였다. 관능적 평가는 2차년도에서 정립한 유산균 발효 및 유산균 막걸리 담금 레시피로 수행하였다. 관능 평가는 20대에서 50대까지의 사내 직원 57명을 대상으로 후각을 이용하여 5점 척도법(5-매우 좋다, 4-좋다, 3-보통이다, 2-나쁘다, 1-매우 나쁘다)으로 평가하였다. 유산균 발효 시 각 유산균에 대한 분석 결과는 Table 19와 같다.

Table 19. Results of Lactic acid bacteria fermentation by the raw rice methods at 37°C, 1 days

LAB 종류	Acidity	Dextrose (g/L)	Lactate (g/L)	LAB (cfu/mL)	Odor (5점 척도법)
<i>Lb. fermentum</i> K2	8.5	45.3	2.34	8.5E+08	2.9±0.3
<i>Lb. crustorum</i> K4	10.2	32.7	3.01	1.7E+09	2.1±0.6
<i>Lb. cuvatus</i> K1	9.3	33.5	2.85	9.4E+08	2.5±0.4
<i>Lb. rossiae</i> K1	11.7	30.6	3.53	1.1E+09	2.3±0.1
<i>Pediococcus pentosaceus</i> K5	13.2	26.8	3.98	2.1E+09	3.3±0.5
<i>Pediococcus acidilactici</i> K5	14.1	19.5	4.21	2.5E+09	3.5±0.2

모든 유산균 발효에서 시간에 따라 산도 및 젖산의 농도가 증가하는 경향을 보였으나 산 생성 정도와 이에 따른 유산균수의 증가폭은 유산균의 종류에 따라 상이하였다. 즉, *Pediococcus* sp. 계열이 가장 높은 산도를 보였으며, 균체수 또한 높았다. 가장 낮은 산도를 보이는 것은 *Lb. fermentum* K2로 산도는 8.5였으며 균체수 또한 가장 낮은 결과를 보였다. 관능적으로 풍미를 비교 평가한 결과 *Lb. crustorum* K4과 *Lb. rossiae* K1, *Lb. cuvatus* K1은 미세한 쓴내와 다소 자극적인 시큼한 향이 나서 평가가 낮은 편이었다. *Lb. fermentum* K2의 경우 쓴내 등 부정적인 이취는 나지 않았지만 좋은 향도 나지 않아 특징이 없었다. *Pediococcus* sp.는 부드러운 신향에 강도는 강하지 않지만 은은한 과일향이 났다.

37°C, 1일간 유산균 발효를 진행 및 평가한 후, 2단 담금 원료를 투입하고 효모에 의한 알코올 발효를 진행하였다. 막걸리 발효 최종 7일차에 대한 이화학 및 미생물 분석, 관능 평가 결과는 Table 20과 같다. *Pediococcus* sp.의 경우 평가 대상인 *Lactobacillus* sp.에 비하여 알코올 발효 속도가 다소 느리고 발효 5일차부터 포도당이 축적되기 시작하였다. 이는 1단 유산균 발효 시 발효 산도가 높아 효모의 생육이 저해로 인한 것으로 판단되나 그 저해도는 그다지 크지 않는 것으로 보인다. 유산균의 균체수도 유산균 발효 시에 비하여 크게 증가하지 않고 점차 사멸되는 경향을 보였으나 *Pediococcus* sp.의 경우에는 다른 유산균에 비하여 발효 술덧 mL 당 10~100배 정도 높은  $10^7$  cfu 수준으로 남아 있었다. 이는 다른 유산균에 비하여 높은 내산성에 의해 기인한 것으로 판단된다.

막걸리를 발효 후 발효 술덧에 대한 관능 평가를 실시한 결과 유산균 발효 후 평가와 그 결과가 유사하였다. 즉, *Pediococcus* sp. 계열의 막걸리가 다른 유산균 막걸리에 비해 부드러운 신향과 은은한 과일향이 있는 반면에 *Lb. crustorum* K1과 *Lb. rossiae* K1, *Lb. cuvatus* K1에서는 강도는 다소 약해졌으나 미세한 쓴내와 약간 자극적인 신향에 의해 대부분 평가되었다.

Table 20. Final results of makgeolli fermentation by various Lactic acid bacteria

LAB 종류	Alcohol	Acidity	Dextrose (g/L)	Lactate (g/L)	LAB (cfu/mL)	Odor (5점 척도법)
<i>Lb. fermentum</i> K2	17.57	7.7	33.5	4.31	$3.6 \times 10^5$	2.8±0.2
<i>Lb. crustorum</i> K4	17.89	8.4	35.2	2.99	$4.7 \times 10^6$	2.3±0.1
<i>Lb. cuvatus</i> K1	17.66	8.4	33.5	3.12	$8.4 \times 10^6$	2.6±0.2
<i>Lb. rossiae</i> K1	17.13	8.7	35.7	3.35	$9.3 \times 10^6$	2.4±0.2
<i>Pediococcus pentosaceus</i> K5	16.38	10.3	38.2	5.34	$2.3 \times 10^7$	3.1±0.3
<i>Pediococcus acidilactici</i> K5	16.53	10.5	44.0	5.21	$2.6 \times 10^7$	3.3±0.1

2차년도에 적용된 *W. cibaria* KSD-914와 비교하면 새로이 막걸리에서 분리된 *Pediococcus* sp.는 1차협동연구기관의 기능성 연구를 바탕으로 내산성, 내담즙성 및 장 부착성이 좋고 면역 증강 효과의 기능성을 가지고 있는 것으로 확인되었으며, 은은한 과일향과 부드러운 신향을 지니고 있어 관능적으로 더 우수하였다. 다만, 발효 시 *W. cibaria* KSD-914에 비하여 산도가 다소 높아서 제품화 시 감·산미 균형을 위하여 발효 산도를 다소 낮추던지 아니면 최종 당 농도를 높이는 등 이에 맞는 레시피 개발 및 2차년도에서 적용된 유산균 발효 제어 기술을 보완해야 할 필요성이 있는 것으로 판단되었다.

#### 나. 선별된 유산균에 대한 배양 방식 설정

기능성 강화 막걸리의 복합 유산균으로 선별된 *W. cibaria* KSD-914, *P. pentosaceus* K5, *P. acidilactici* K5 3가지 유산균을 유산균 발효 starter로 사용하기 위하여 최적의 배양조건을 설정하고자 연구를 수행하였다. 이 때, 유산균 발효 starter로써 각각의 유산균을 단독으로 배양하여 사용할 경우 utility 비용 및 시간이 많이 필요로 하기 때문에 scale-up 시 생산성 저하를 가져올 수 있다. 이에 각각의 유산균을 초기에 혼합하여 배양할 수 있는 방안을 모색하고자 하였다. 유산균 혼합 배양은 단독 배양을 하는 경우보다 균주간의 상호보완적인 상승작용이 있어 배양시간을 단축하고 유용한 대사산물 생성에도 유리하게 작용할 수 있기 때문에 사용량이 증가하는 추세이다.

*W. cibaria* KSD-914는 sucrose를 탄소원으로 사용할 때 dextran으로 밝혀진 EPS를 생성하고 생성된 EPS가 유산균의 prebiotics로 작용할 수 있기 때문에 다른 유산균에 대한 증식을 활성화 시킬 수 있다. 따라서 *W. cibaria* KSD-914와 *P. pentosaceus* K5, *P. acidilactici* K5를 혼합 배양 할 때 탄소원으로 2차년도와 동일하게 sucrose 2%(w/v)를 사용하였고 질소원으로 분쇄된 밀누룩 3%(w/v)을 사용하였다. 유산균 배양은 *W. cibaria* KSD-914, *Pediococcus* sp. 단독 배양과 유산균 혼합 배양 3가지로 하였다. 유산균 배양 배지 100mL를 200mL 삼각플라스크에 넣어 멸균한 뒤 사용하였으며, 37°C 배양 조건으로 36시간 정지 배양하였다. 초기 접종량은 모든 실험구에서 3%(v/v)가 되도록 하였다. 배양 결과는 Table 21과 같다.

Table 21. Comparison of LAB culture type, single or mixed culture

LAB	12hr		24hr		36hr	
	pH	LAB (cfu/mL)	pH	LAB (cfu/mL)	pH	LAB (cfu/mL)
<i>W. cibaria</i> KSD-914	3.8	3.5 x 10 <sup>8</sup>	3.7	1.5 x 10 <sup>9</sup>	3.7	2.7 x 10 <sup>9</sup>
<i>P. pentosaceus</i> K5 + <i>P. acidilactici</i> K5	3.6	1.5 x 10 <sup>8</sup>	3.5	9.8 x 10 <sup>8</sup>	3.3	2.1 x 10 <sup>9</sup>
Mixed Culture	3.7	5.8 x 10 <sup>8</sup>	3.6	2.1 x 10 <sup>9</sup>	3.5	3.0 x 10 <sup>9</sup>

유산균을 배양한 결과 36시간까지 지속적으로 유산균은 증가하였으며, pH는 낮아지는 경향을 보였다. 이 때 *W. cibaria* KSD-914와 *P. pentosaceus* K5, *P. acidilactici* K5를 혼합하여 배양한 경우 배양 36시간 때 3.0 x 10<sup>9</sup> cfu/mL 로 가장 높은 균체 농도를 보였으며 그 다음으로 *W. cibaria* KSD-914를 단독으로 배양했을 때였다. *Pediococcus* sp.의 경우에는 2.1 x 10<sup>9</sup>



cfu/mL 다른 실험구에 비해 약간 낮은 편이었고, pH는 가장 낮았다. *P. pentosaceus* K5, *P. acidilactici* K5만을 배양하였을 경우보다 *W. cibaria* KSD-914와 같이 배양했을 경우 가장 높은 수치를 보였는데, 이는 예측한 바와 같이 *W. cibaria* KSD-914로부터 생성된 EPS에 의해 *Pediococcus* sp.의 생육이 다소 촉진되기 때문인 것으로 사료된다. 한편 혼합하여 배양하였을 경우 배양액에서 유산균 분포도를 MRS-BPB agar plate 상에서 colony 형태를 바탕으로 간이 분류한 바, *Weissella* sp.는 약 43%, *Pediococcus* sp.는 약 57%로 나타났다(Fig. 17).

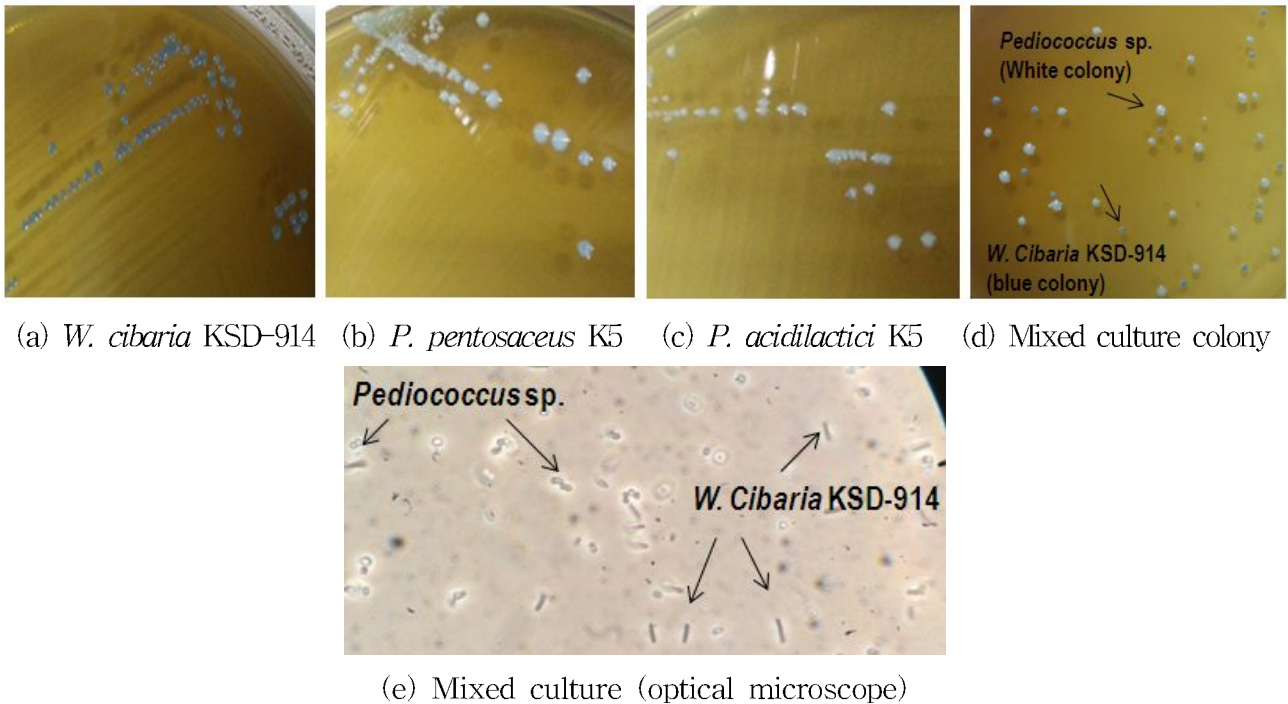


Fig. 17 선별된 유산균의 colony 상과 혼합 배양 후 colony 상 및 현미경 상

*W. cibaria* KSD-914 유산균 발효 시 sucrose 첨가(원료 중량 대비 5%) 유무에 따른 EPS 생성 유무를 막걸리 발효 술덧(2일차)에서 확인하기 위하여 High performance anion exchange chromatography로 분석한 결과 sucrose를 첨가하였을 때 발효 술덧 내에서 disaccharide와 Oligosaccharide가 검출됨을 확인하였다(Fig. 18). 막걸리 발효가 진행될수록 EPS가 점차 감소되는 것을 확인할 수 있었는데 이는 밀누룩 내 여러 당화효소에 의한 분해 때문인 것으로 판단된다(data not shown).

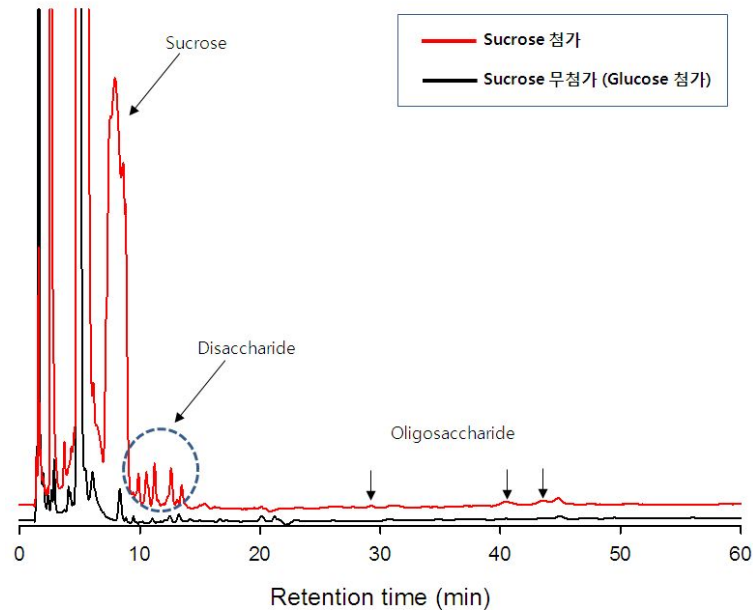


Fig. 18 *W. cibaria* KSD-914를 이용한 발효 시 sucrose 유무에 따른 EPS 생성 유무

#### 다. 기능성 강화 유산균 막걸리 최적 레시피 개발

기능성 강화 막걸리에 적용할 유산균으로 막걸리 유래 유산균 중 기능적인 측면과 관능적인 측면에서 양호한 유산균으로 *W. cibaria* KSD-914와 *P. pentosaceus* K5, *P. acidilactici* K5를 선정하였고, 이를 위한 유산균 배양조건을 설정하였다. 선정된 유산균이 막걸리에 풍부하게 존재하고 관능적으로도 좋아야 할 뿐만 아니라, 제품화 되었을 때 상온 보관 시 미생물학적 제품 안정성이 높아야 제품으로서의 가치가 높아질 것이다. 한편, 국내 시판 생막걸리 대부분이 냉장 보관이 제대로 이루어 지지 않을 경우 제품 내 미생물(특히 유산균)의 증식으로 인하여 신맛이 증가하기 때문에 이를 보완하기 위하여 아스파탐과 같은 인공감미료를 첨가하고 있다. 웰빙이 하나의 트렌드를 넘어 삶의 기준으로 자리잡고 있는 시대의 흐름에 맞추어 인공감미료로 감미를 부여하기보다는 순수 발효로서 감미를 부여할 수 있는 방법을 모색하였다. 기능성 강화 막걸리 개발을 위하여 선정된 복합 유산균에 대한 유산균 발효 시간 설정, 적정 감산미를 부여하기 위한 밀누룩 비율 설정과 함께 제조공정과 표준화된 발효 패턴을 확립하고 상온에서의 유통 안정성 평가를 진행하였다.

##### (1) 복합 유산균 발효 시간 설정

복합 유산균 발효 시간 설정을 위한 담금 레시피는 Table 22와 같다. 기능성 강화 막걸리 레시피 개발에서는 사전 시험 담금 및 평가를 바탕으로 보다 깊고 풍부한 풍미를 부여하고자 생쌀 발효법이 아닌 고두밥 형태의 증자 발효법으로 진행하였다. 또한 2차년도와 마찬가지로 1단 유산균 발효 시 *W. cibaria* KSD-914에 의한 EPS 생성을 유도하기 위하여 1단 쌀 중량 대비 5% (w/w)의 sucrose를 첨가하였으며 2단에는 넣지 않았다. 복합 유산균 배양액의 농도는 mL 당  $2.0 \times 10^9$  cfu였으며 이를 유산균 발효 seed로 사용하였다. 효소제로 밀누룩을 사용하였으며 사용량은 쌀 중량 대비 10%(w/w)로 사용하였다. 급수비율은 원료 대비 110%로 하였으며, 발효는 25°C에서 실시하였다.

Table 22. Composition of ingredients for new functional Makgeolli by steamed rice methods

원료명	1단 담금 (유산균 발효)	2단 담금 (효모 알코올 발효)	비고
멥쌀(고두밥)	600 g	2,400 g	
설탕	30 g	-	
밀누룩	60 g	240 g	
효모	-	39 g	초기 농도 $5.0 \times 10^7$ cell/mL
유산균 배양액	1 mL	-	초기 농도 $2.0 \times 10^6$ cell/mL
물	660 mL	2,640 mL	
담금 직후 용량	1,494 mL	7,791 mL	

1단 유산균 발효에서 시간에 따른 알코올 발효는 Fig. 19와 같다. 1단 유산균 발효를 2일 한 경우에는 2단 담금 이후에도 알코올 생성 속도가 지속적으로 증가하여 발효 10일에 16.05%의 알코올이 생성되었다. 2단 담금 이후 발효 3일차까지는 알코올 생성 속도가 빠르지만, 이후로는 점차 감소되어 발효 8일차부터서는 일정하게 유지되는 경향을 보였다. 1단 유산균 발효를 3일 한 경우에는 알코올 지속적으로 생성되고 발효 10일차에는 16.92%의 알코올이 생성되어 실험군 중에서 가장 높았다. 1단 유산균 발효를 4일 한 경우에는 발효 10일차에 16.10%, 유산균 발효 7일을 한 경우에는 알코올 16.56%로 생성되었다. 1단 유산균 발효에서는 인위적으로 유산균만 투입하였으나 발효가 진행될수록 알코올이 생성되었는바, 이는 누룩에 존재하는 야생 효모에 기인한 것으로 판단된다. 유산균 발효가 가장 길게 한 7일 유산균 발효의 경우에는 다른 실험군과는 달리 아세트산향과 에테르 향이 감지되어 부정적이었다.

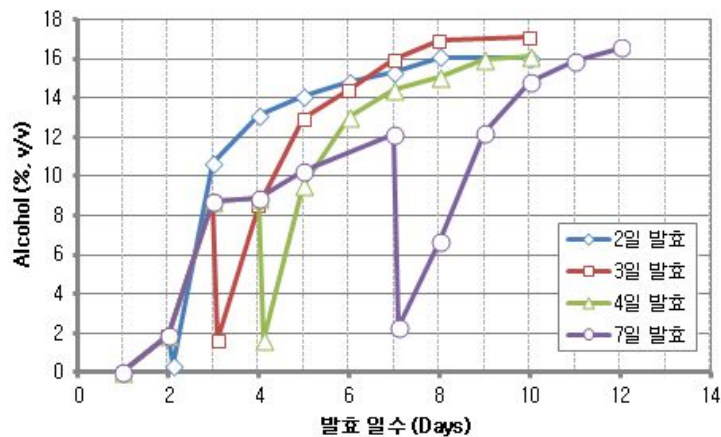


Fig. 19 막걸리 발효 시 복합 유산균 발효 시간에 따른 알코올 변화

1단 유산균 발효 시간에 따른 산도 변화는 Fig 20과 같다. 유산균 발효 시간이 증가할수록 최종 발효 산도는 낮아지는 경향을 보였다. 즉, 유산균 발효를 7일 동안 할 경우 발효 최종 산도는 8.3으로 가장 낮았으며, 유산균 발효를 2일 동안 할 경우에는 발효 최종 산도가 11.1로 가장 높았다. 이는 유산균 발효 시 젖산 등에 의한 저해를 받지 않아 2단 담금 이후에도 지속적으로 증식할 수 있어 지속적으로 산이 생성되기 때문인 것으로 판단된다. 유산균 발효를 7일 동안 할 경우 산도는 지속적으로 증가하여 발효 3일차까지는 급격하게 증가하다가 그 후 완만하게 유지되는 경향을 보였다. 이는 유산균에 의해 생성된 젖산에 의한 저해로 인하여 유산균 증식이 억제됨에 의한 것으로 판단된다.

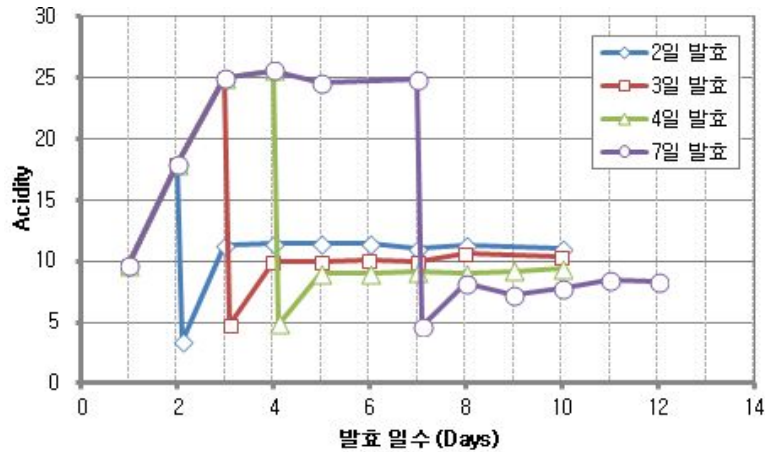


Fig. 20 막걸리 발효 시 복합 유산균 발효 시간에 따른 산도 변화

최종적으로 발효가 끝난 막걸리의 이화학 분석 결과와 발효 술덧에 대한 관능 평가(향)를 수행한 결과는 Table 23과 같다.

Table 23. 복합 유산균 발효 시간에 따른 막걸리의 이화학 분석 및 관능 평가 결과

유산균 발효 시간	총 발효 시간	Alcohol (% v/v)	Acidity	RS (g/L)	Lactate (g/L)	관능평가 (5점 척도법)
2일	10일	16.05%	11.10	92	6.4	2.7±0.3
3일	10일	16.92%	10.40	71	5.9	3.3±0.2
4일	10일	16.10%	9.35	91	4.5	3.2±0.1
7일	12일	16.56%	8.30	82	4.0	2.0±0.1

2일 동안 유산균 발효를 진행한 막걸리는 다소 자극적인 신향이 부정적으로 평가되었으며, 7일 동안 유산균 발효한 막걸리는 미세한 아세톤향과 에테르향이 감지되어 평가가 제일 낮았다. 유산균 발효 3일과 4일은 부드러운 신향과 함께 약간의 과일향이 특징이었으며 전반적으로 조화로웠다. 선호도 조사 시 서로 비슷한 결과로 나타났다. 유산균 발효 시간에 따른 발효 패턴과 관능 평가를 수행한 결과 유산균 발효 3일과 4일이 적합한 것으로 판단되었다. 다만 유산균 발효 시 3일 이후부터서는 유산균에 의한 충분한 산이 생성되고(Acid saturation), 이 때 발효 알코올도 가장 높은 농도로 얻을 수 있기 때문에 유산균 발효 시간은 3일로 결정하였다.

## (2) 밀누룩 비율 설정

본 연구 과제에서는 발효제로 입국 대신 밀누룩을 사용하였는데, 입국은 인위적인 균을 접종하여 제조하므로 맛이 단조롭고 밋밋한 반면, 밀누룩은 당화효소 외 다양한 효소와 미생물로 인해 보다 풍부한 맛과 향을 가질 수 있다. 기능성 강화 유산균 막걸리를 개발함에 있어 보다 깊고 풍부한 맛을 지니고 인공감미료를 넣지 않아도 발효 산물 자체로서 적절한 감미와 산미를 지닐 수 있도록 최적의 밀누룩 사용 비율을 설정하고자 연구를 수행하였다.

담금 레시피는 Table 22를 기본 레시피로 하되 밀누룩 사용 비율을 쌀 중량 대비 5%, 10%, 20%, 30%(w/w)로 달리하였다. 1단 유산균 발효는 앞서 설정한 바와 같이 3일로 하였으

며 전체 발효 기간은 8일로 하였다. 발효는 25°C에서 실시하였다. 발효 결과는 Fig 21과 같다.

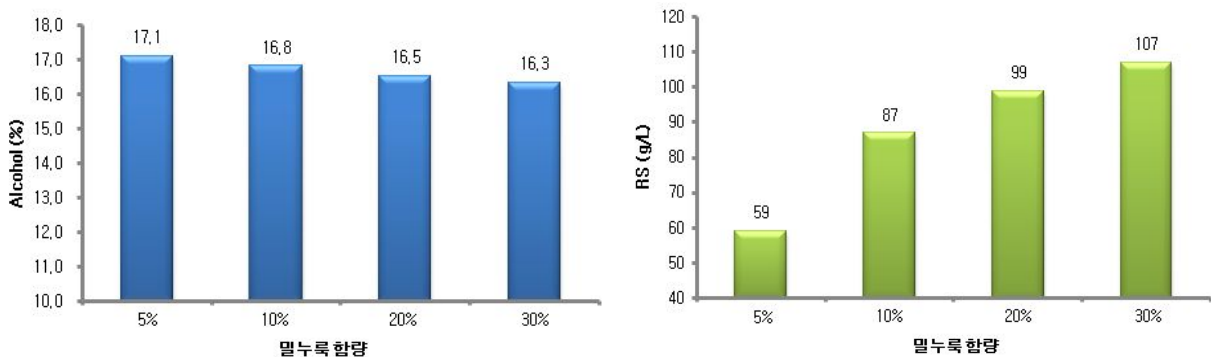


Fig. 21 밀누룩 함량에 따른 막걸리 최종 알코올 및 RS 농도

담금 시 쌀 중량 대비 밀누룩 함량별로 막걸리 발효를 진행한 결과 밀누룩 함량이 증가할수록 생성된 알코올 농도는 크지는 않지만 약간 감소하는 경향을 보이며, 환원당(RS)은 밀누룩 함량에 비례하여 증가하는 경향으로 나타났다. 밀누룩에는 효소 외에도 효모 생육에 영향을 주는 질소원, 인(P)과 같은 영양분 및 growth factors 등을 함유하고 있기 때문에 밀누룩 함량이 높아질수록 알코올 농도는 점차 증가되는 경향을 보인다. 다만 여기에서는 약간씩 알코올 농도가 밀누룩 함량에 비례하여 감소하는 경향을 보이는데, 이는 밀누룩 내 존재하는 당화효소의 작용으로 인하여 생성된 환원당의 농도가 효모에 의해 알코올 발효로 사용되는 비율보다 높아 환원당이 축적됨으로써 당에 의한 삼투압에 의해 효모 생육이 저해되어 생성되는 알코올 농도에 영향을 준 것으로 판단된다. 그 외 발효 술덧에서의 산도는 밀누룩에 비례하여 증가하는 경향으로 나타났는데, 밀누룩 5%로 사용했을 때가 가장 낮은 8.2였으며, 밀누룩 30%로 사용했을 때는 산도가 11.5였다. 이는 담금 초기에 인위적으로 넣은 3종류의 기능성 유산균 외 밀누룩 유래 다른 유산균 수가 많아져서 이로 인하여 유산균 발효가 더욱 왕성하게 일어남으로써 산도가 증가된 것으로 판단된다.

발효가 끝난 막걸리를 믹서기로 분쇄한 뒤 80mesh 체로 균질화 한 후 7%로 희석하여 국순당 직원 35명을 대상으로 관능 평가 및 선호도 조사를 수행하였다. 각각에 대한 선호도 및 관능에 대한 서술적 묘사는 Table 24와 같다.

Table 24. 밀누룩 함량을 달리하여 발효한 막걸리 제품의 관능 선호도 조사 결과

밀누룩 함량 (% w/w)	선호도 (5점 척도법)	관능 묘사
5%	2.85±0.07	깨끗하지만 약간 밋밋하면서 허전한 느낌이 든다. 감·산미가 부족한 느낌이 든다.
10%	3.33±0.29	전반적으로 과일향, 부드러우면서 뒷맛이 깔끔하다. 산미는 적당하나 감미가 약간 부족한 느낌이 든다.
20%	3.50±0.14	적당한 바디감과 감·산미의 밸런스가 좋다. 은은한 과일취와 누룩향이 좋다.
30%	3.14±0.07	감·산미가 약간 강하고 뒷맛이 오래 남는다. 구수하지만 누룩향이 다소 강한 것 같다.

밀누룩 함량이 증가할수록 산도와 환원당(RS)이 높아져서 감·산미에 대한 만족도는 증가하는 경향을 보이나 밀누룩을 30% 사용한 시료의 경우에는 누룩취가 다소 강하여 50대 이상은 선호하나 그 이하에서는 부정적으로 평가하였다. 반면에 밀누룩 함량이 낮아질수록 깨끗하고 깔끔해지는 것이 특징이었으나 부정적으로 밋밋하거나 감·산미가 부족하다는 평이 많았다. 발효 및 선호도 조사를 바탕으로 밀누룩 함량은 20%로 결정하였다.

### (3) 상온 보관 시 안정성 평가

유산균 발효 시간 및 밀누룩 함량 결정을 통하여 구축된 개발 레시피를 바탕으로 실험실 scale로 담금 및 발효를 진행한 후 이를 제품화하여 상온 보관 시 제품 안정성에 대한 평가를 진행하였다. 이에 대한 대조구로는 일반 막걸리 레시피를 적용하되 쌀 처리 방법 및 밀누룩 함량은 동일하게 하였으며 평가에 사용된 담금 레시피는 Table 25와 같고, 발효는 25°C에서 8일간 실시하였다.

Table 25. 상온 보관 안정성 평가 막걸리 레시피

	일반 막걸리		기능성 강화 유산균 막걸리		비고
	1단 (알코올 발효)	2단 (알코올 발효)	1단 (유산균 발효)	2단 (알코올 발효)	
멥쌀(고두밥)	600 g	2,000 g	600 g	2,000 g	5.0 x 10 <sup>7</sup> cell/mL 2.0 x 10 <sup>6</sup> cell/mL
설탕	-	-	30 g	-	
밀누룩	120 g	400 g	120 g	400 g	
효모	12 g	-	-	36 g	
유산균 배양액	-	-	1 mL	-	
물	1,350 mL	2,700 mL	1,494 mL	2,700 mL	
발효 기간	1일	7일	3일	5일	

발효가 끝난 막걸리를 분석한 결과 일반 막걸리는 alcohol 17.95%, acidity 4.5, RS 72 g/L 였으며 유산균의 균체수는 3.4 x 10<sup>5</sup> cfu/mL 이었다. 한편 기능성 강화 유산균 막걸리의 경우에는 alcohol 16.78%, acidity 10.5, RS 102 g/L 였으며 유산균의 균체수는 1.5 x 10<sup>8</sup> cfu/mL 이었다.

발효가 끝난 술덧을 믹서기로 분쇄한 후 80mesh 체로 균질화 한 뒤 알코올 농도가 7%가 되게끔 희석한 뒤 750mL Pet에 주입하여 각각 15 Pet 씩 만들었다. 시험 제품 간 품질 변화 속도를 속성으로 비교 평가하기 위하여 상온 25°C로 설정된 incubator에서 1일 간격으로 샘플링하여 이화학(산도) 및 미생물(유산균)을 분석하고 관능 평가(5점 척도법)를 실시하였다. 이에 관한 평가 결과는 Table 26과 같다.

Table 26. 25°C 보관 시 시간에 따른 막걸리 변화 비교

보관 기간 (Days)	일반 막걸리			기능성 강화 유산균 막걸리		
	Acidity	LAB (cfu/mL)	관능 (5점 척도법)	Acidity	LAB (cfu/mL)	관능 (5점 척도법)
0	1.8	1.3 x 10 <sup>5</sup>	4.8	4.4	6.3 x 10 <sup>7</sup>	4.8
1	1.8	3.3 x 10 <sup>5</sup>	3.9	4.4	7.1 x 10 <sup>7</sup>	4.5
2	2.0	7.8 x 10 <sup>6</sup>	3.1	4.5	8.1 x 10 <sup>7</sup>	4.3
3	2.3	5.7 x 10 <sup>7</sup>	2.5	4.5	9.1 x 10 <sup>7</sup>	3.8
4	2.4	2.6 x 10 <sup>8</sup>	2.0	4.6	9.8 x 10 <sup>7</sup>	3.1
5	2.7	2.5 x 10 <sup>8</sup>	-	4.7	1.3 x 10 <sup>8</sup>	2.7
6	2.9	3.1 x 10 <sup>8</sup>	-	4.8	2.1 x 10 <sup>8</sup>	2.5
7	3.3	2.2 x 10 <sup>8</sup>	-	5.0	4.3 x 10 <sup>8</sup>	2.0

(관능 항목 란에서 '-' 는 음용 난해함을 표시한 것임)

일반막걸리는 시간이 경과할수록 산도 및 유산균 숫자 지속적으로 증가하였다. 25°C에서 7일간 보관 시 산도는 1.5 증가하였으며 유산균은 약 1700배 정도 증가하였다. 관능적으로는 보관 4일차부터 미세하게 쉰내가 감지되었으며 보관 5일부터서는 쉰내도 강하고 자극적인 신맛이 강하여 대부분의 관능 평가자들로부터 음용하기 어려운 수준으로 평가되었다. 반면에 기능성 강화 유산균 막걸리의 경우 일반막걸리와 같이 산도와 유산균 균체수가 증가하기는 하나 증가 속도는 매우 느렸다. 즉 산도는 25°C 7일간 보관 시 0.6 증가하였으며 유산균은 6배 정도 증가하였다. 관능적인 측면에서 보관 6일차부터 약간의 쉰내와 함께 버터향과 같은 느끼한 향이 감지되었으며, 보관 7일차에는 음용 불가 수준은 아니지만 쉰내의 강도가 다소 강하였다. 기능성 강화 유산균 막걸리의 경우에는 발효 시 유산균에 의해 생성된 다량의 젖산에 의한 항균 활성 및 생육 저해 작용으로 인하여 그렇지 않은 막걸리에 비해 미생물학적 안정성이 증가가 된 것으로 판단된다. 상온 안정성 평가를 통하여 기능성 강화 유산균 막걸리는 일반 막걸리에 비해 안정성이 약 1.5배 정도 높은 것으로 확인하였다.

라. Large scale에서의 시제품 생산

실험실에서 구축된 기능성 강화 유산균 막걸리 제품 레시피 및 공정을 바탕으로 Large-scale에서 시제품 담금 및 생산을 수행하였다. 시험 생산은 강원도 횡성군 둔내면에 소재한 (주)국순당 횡성공장 내 있는 pilot plant에서 진행하였다. 시험 생산에 대한 모식도는 Fig. 22과 같다.

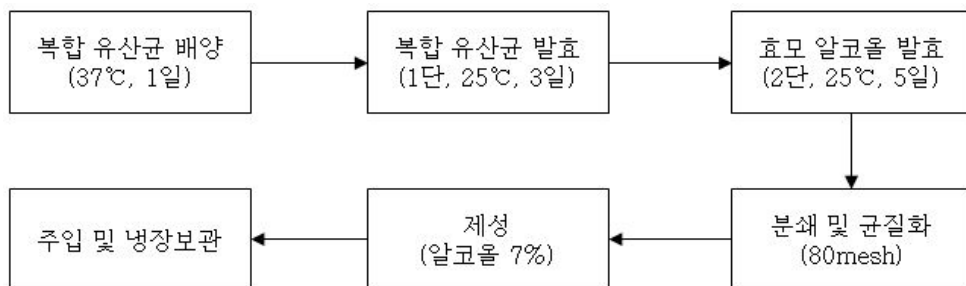


Fig. 22 기능성 강화 유산균 막걸리 제조 공정도

복합 유산균 배양은 mechanically stirred 100-Liter fermenter를 이용하였으며 배지조성 및 배양 조건은 2차년도와 동일한 방법으로 실시하였다. 유산균 3종에 대한 Seed는 실험실에서 배양하였으며 각각의 접종 농도를 3%(v/v)씩 하여 총 9%(v/v)가 되게끔 하였다.

막걸리 원료로 사용되는 쌀은 15°C 물로 2번 세척하고 2시간 동안 침지한 후 1시간 동안 탈수 한 후에 증자기를 사용하여 60분 동안 증자하고 40분 동안 뜸을 들인 후에 25°C 정도로 냉각하여 사용하였다. 발효제는 레시피 개발 시 사용했던 것과 동일한 자사에서 만든 개량된 밀누룩(1,800sp)을 사용하였다. 200L pilot tank 담금에서의 기능성 강화 유산균 막걸리 레시피는 table 27과 같으며 25°C 조건으로 총 8일간 발효를 진행하였다.

Table 27. Composition of ingredients for Lactic acid bacteria Makgeolli by steamed rice methods.

원료명	1단 (유산균 발효)	2단 (효모 알코올 발효)	비고
멥쌀(고두밥)	14.0 kg	56.0 kg	
설탕	0.7 kg	-	
밀누룩	2.8 kg	11.2 kg	발효제 당화력 : 1,800 sp
효모	-	0.54 kg	$5.0 \times 10^7$ cell/mL, Paste
복합 유산균 배양액	0.025 L	-	$2.0 \times 10^6$ cell/mL
물	15.4 L	61.6 L	
담금 직후 용량	36.5 L	180.6 L	
발효 기간	3일	5일	

#### (1) 시험 담금 및 시생산

100L fermenter를 이용한 복합 유산균 배양 결과 lab scale 보다 다소 높은  $3.0 \times 10^9$  cfu/mL 농도의 유산균을 얻을 수 있었으며 pH 3.2, 산도는 23이었다. pilot tank에서의 발효 시간에 따른 기능성 강화 유산균 막걸리 발효 분석 결과는 Table 28과 같다. 발효 결과 실험실에서 진행한 발효 패턴과 거의 유사하게 진행되었다. 발효 알코올은 효모를 직접 투입한 발효 3일차 2단 담금 직후 급격히 상승하다가 발효 5일부터 서서히 일어나 발효 8일차에 16.78%로 생성되었다. 효모를 직접적으로 투입하지 않은 유산균 발효 시 2일차까지는 1% 미만으로 알코올이 생성되었지만, 2단 담금 직전에 5.17%의 알코올이 생성되었다. 이는 밀누룩에 존재하는 야생효모에 의한 것으로 판단된다. 작은 규모의 생산에서는 발효제 등 원료에 대한 품질 관리가 원활하기 때문에 발효 이상 등 큰 문제를 야기하지는 않겠지만, 1만 리터 이상 대량으로 담금 및 생산할 경우에는 이에 대한 세심한 관리가 필요할 것으로 판단된다. 발효 산도는 유산균 발효가 끝난 시점인 발효 3일차에 23.3으로 가장 높았다가 2단 담금 직후 희석되고 그 뒤 완만하게 증가하다가 발효 6일차부터 더 이상 증가하지 않고 최종적으로 10.8이 되었다. 발효 술덧 내 환원당(RS)은 발효기간 동안 높은 농도로 유지되었으며 최종적으로 108 g/L로 되었다. 효모의 경우 발효 4일차에  $1.7 \times 10^8$  cfu/mL의 농도로 최고 높았다가 그 뒤 점차 감소하여 발효 8일차에는  $7.8 \times 10^7$  cfu/mL로 되었다. 유산균은 유산균 발효 단계인 발효 3일차에  $3.6 \times 10^9$  cfu/mL 농도로 최고 높았다가 효모와 마찬가지로 점차 감소하여 최종적으로는  $6.2 \times 10^7$  cfu/mL가 되었다.



Table 28. Change of temp., alcohol, acidity, RS and microflora during the 200L new functional makgeolli fermentation

Time (Days)	Temp. (°C)	Alcohol (% v/v)	Acidity	RS (g/L)	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)
0	24.8	-	-	-	$5.7 \times 10^3$	$2.9 \times 10^6$
1	24.8	0.12	9.8	188	$2.2 \times 10^7$	$2.1 \times 10^9$
2	24.8	0.66	18.2	177	$7.6 \times 10^7$	$3.4 \times 10^9$
3 (2단 직전)	24.8	5.17	23.3	96	$1.2 \times 10^8$	$3.6 \times 10^9$
3 (2단 직후)	23.7	1.04	4.7	23	$9.3 \times 10^7$	$1.1 \times 10^9$
4	24.9	9.31	9.1	142	$1.7 \times 10^8$	$8.3 \times 10^8$
5	24.9	13.07	9.7	117	$1.6 \times 10^8$	$1.9 \times 10^8$
6	24.9	14.91	10.6	102	$1.4 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$
7	24.8	16.01	10.8	105	$1.0 \times 10^8$	$9.8 \times 10^7$
8	24.8	16.78	10.8	102	$7.8 \times 10^7$	$1.1 \times 10^8$

발효가 끝난 술덧을 분쇄기를 이용하여 분쇄한 후 Twist screen을 이용하여 80mesh의 크기로 균질화한 뒤 5°C로 1일 냉장하였다. 저장된 막걸리 나주를 알코올 7%로 제성한 뒤 750mL PET에 시험 주입한 뒤 밀폐 CAP으로 밀봉하였으며, 최종 시제품은 알코올 7%, 산도 4.5, RS 42 g/L 였으며 제품 내 효모와 유산균은 mL 당 각  $3 \times 10^7$  cfu와  $6 \times 10^7$  cfu 이었다 (Fig. 23). 시험 생산된 시제품으로 Self life test 및 소비자 평가를 수행하였다.



Fig. 23 시 생산된 시제품2

## (2) Self Life Test 결과

시험 생산한 시제품을 대상으로 유통기한을 평가하였다. 개발하고자 하는 제품은 생막걸리 제품으로 10°C 냉장 유통 제품이므로 유통기한을 평가할 때 테스트 온도를 10°C를 포함하여 5°C, 25°C(상온)로 설정하여 실시하였다. 평가항목은 이화학적 지표로 알코올과 산도로 하였으며, 미생물학적 지표로는 mL 당 효모와 유산균 수, 마지막으로 관능적 지표로 하였다. 주세법상 탁주의 규격은 알코올은 '-0.5% ~ 표기 알코올~ +1.0%'으로 제시되어 있고, 총산은 산도를 구연산으로 환산하여 0.5%(w/v)이하, 메탄올 '불검출'등으로 제시로 제시되어 있다. 총산은 측정된 산도 값에 구연산 계수(0.0064g)로 곱하여 산출된 값으로 '총산 0.5% 이하'를 산도로 나타내면 '8.3 이하'이다. 여기에서는 산도로 나타내었다. 미생물학적규격은 별도로 제시되어 있지 않으나 참고 값으로 진행하였다. 관능적 지표는 연구소 내에서 잘 훈련된 전문 패널 7인을 고정하여 평가 시 블라인드로 진행하였으며 식품공정 정상시험법 5점 척도 중 3점 이상이 적합임을 고려하여 점수를 내었다. 각 보관 온도별 품질 지표 변화는 Table 29, 30, 31과 같으며, 10°C에서의 평가는 유산균 발효를 적용하지 않는 일반막걸리와 비교하여 평가하였다. 5°C에서 제품을 보관 시에는 보관 21일 동안 이화학적으로 이탈된 항목은 없었으며, 관능 품질이 적합 이상으로 평가되었다. 10°C에서는 관능 평가 시 보관 17일차에 미세하게 쉰내가 감지되고 신맛

이 약간 상승되었으며 적합에서 다소 벗어난 2.9로 평가되었다. 마찬가지로 이화학적으로 이탈된 항목은 없었다. 대조구로 사용된 일반막걸리의 경우에도 10℃ 보관 시 이탈된 지표는 없었으나 관능 품질의 변화가 시제품에 비해 다소 빠르고 보관 7일 이후부터 미세하게 쓴내가 감지되기 시작하였다. 25℃ 보관 시에는 관능적으로는 보관 7일차에 쓴내, 강한 신맛으로 인하여 2.1로 평가되었으며, 보관 21일까지에는 산도는 이탈되지 않았으나 알코올 항목에서는 보관 12일차에 8.01%로 1.01% 상승되어 규격 이탈되었다. 각 보관 온도별 분석값을 바탕으로 반응 속도 K값을 엑셀로 산출하였으며, 0차 반응식으로 유통기한을 평가한 바, 10℃ 냉장 보관 시 20일로 평가되었다. 이를 안전 계수 0.7을 적용하여 시 생산 제품에 대한 냉장 유통기한을 14일로 설정하였다. 이에 반해 일반막걸리는 10℃에서의 분석값만을 바탕으로 유통기한을 평가한 바, 8일로 평가되었으며 동일하게 안전 계수 0.7을 적용하면 6일이 된다.

Table 29. 시제품 5℃ 보관 시 품질 지표 변화

저장기간 (Days)	Alcohol (% v/v)	Acidity	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)	관능 (5점 척도법)
0	7.01	4.5	3.3 x 10 <sup>7</sup>	5.8 x 10 <sup>7</sup>	4.8
2	7.03	4.5	2.7 x 10 <sup>7</sup>	5.5 x 10 <sup>7</sup>	4.7
4	7.02	4.6	3.8 x 10 <sup>7</sup>	7.2 x 10 <sup>7</sup>	4.7
7	7.05	4.5	1.6 x 10 <sup>7</sup>	6.3 x 10 <sup>7</sup>	4.8
10	7.08	4.6	2.5 x 10 <sup>7</sup>	7.2 x 10 <sup>7</sup>	4.7
12	7.05	4.5	3.4 x 10 <sup>7</sup>	9.0 x 10 <sup>7</sup>	4.6
14	7.12	4.6	2.7 x 10 <sup>7</sup>	8.0 x 10 <sup>7</sup>	4.5
17	7.13	4.7	2.4 x 10 <sup>7</sup>	9.0 x 10 <sup>7</sup>	4.6
21	7.15	4.8	1.3 x 10 <sup>7</sup>	9.6 x 10 <sup>7</sup>	3.8

Table 30-1. 시제품 10℃ 보관 시 품질 지표 변화

저장기간 (Days)	Alcohol (% v/v)	Acidity	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)	관능 (5점 척도법)
0	7.01	4.5	3.3 x 10 <sup>7</sup>	5.8 x 10 <sup>7</sup>	4.8
2	7.03	4.6	4.2 x 10 <sup>7</sup>	6.4 x 10 <sup>7</sup>	4.9
4	7.02	4.6	5.3 x 10 <sup>7</sup>	7.0 x 10 <sup>7</sup>	4.5
7	7.09	4.7	3.5 x 10 <sup>7</sup>	7.8 x 10 <sup>7</sup>	3.8
10	7.15	4.8	2.6 x 10 <sup>7</sup>	8.6 x 10 <sup>7</sup>	3.5
12	7.19	4.8	2.1 x 10 <sup>7</sup>	9.4 x 10 <sup>7</sup>	3.3
14	7.23	4.9	1.3 x 10 <sup>7</sup>	9.8 x 10 <sup>7</sup>	3.2
17	7.21	5.1	7.8 x 10 <sup>6</sup>	1.1 x 10 <sup>8</sup>	2.9
21	7.25	5.2	5.9 x 10 <sup>6</sup>	1.3 x 10 <sup>8</sup>	2.8

Table 30-2. 일반막걸리 10℃ 보관 시 품질 지표 변화

저장기간 (Days)	Alcohol (% v/v)	Acidity	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)	관능 (5점 척도법)
0	7.03	1.9	5.6 x 10 <sup>7</sup>	3.5 x 10 <sup>5</sup>	4.8
2	7.01	1.9	4.2 x 10 <sup>7</sup>	7.5 x 10 <sup>5</sup>	4.3
4	7.05	2.1	5.3 x 10 <sup>7</sup>	1.4 x 10 <sup>6</sup>	3.9
7	7.12	2.1	3.5 x 10 <sup>7</sup>	6.5 x 10 <sup>6</sup>	3.2
10	7.15	2.5	2.6 x 10 <sup>7</sup>	2.3 x 10 <sup>7</sup>	2.7
12	7.13	2.7	2.1 x 10 <sup>7</sup>	5.2 x 10 <sup>7</sup>	2.6
14	7.17	2.9	1.3 x 10 <sup>7</sup>	8.7 x 10 <sup>7</sup>	2.5
17	7.33	3.2	7.8 x 10 <sup>6</sup>	9.1 x 10 <sup>7</sup>	2.4
21	7.42	3.4	1.5 x 10 <sup>6</sup>	2.3 x 10 <sup>8</sup>	1.9

Table 31. 시제품 25°C 보관 시 품질 지표 변화

저장기간 (Days)	Alcohol (% v/v)	Acidity	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)	관능 (5점 척도법)
0	7.01	4.5	3.3 x 10 <sup>7</sup>	5.8 x 10 <sup>7</sup>	4.8
2	7.05	4.6	6.3 x 10 <sup>7</sup>	2.7 x 10 <sup>7</sup>	4.5
4	7.08	4.8	7.7 x 10 <sup>7</sup>	3.3 x 10 <sup>7</sup>	3.2
7	7.53	5.3	8.6 x 10 <sup>7</sup>	2.1 x 10 <sup>8</sup>	2.1
10	7.72	5.5	9.8 x 10 <sup>7</sup>	5.3 x 10 <sup>8</sup>	0.0
12	8.01	6.1	1.1 x 10 <sup>8</sup>	7.7 x 10 <sup>8</sup>	0.0
14	8.43	6.2	7.9 x 10 <sup>7</sup>	6.1 x 10 <sup>8</sup>	0.0
17	8.52	6.5	1.2 x 10 <sup>7</sup>	4.5 x 10 <sup>8</sup>	0.0
21	8.66	7.0	5.9 x 10 <sup>6</sup>	4.3 x 10 <sup>8</sup>	0.0

(3) 소비자 기호도 조사

생산된 시제품을 이용하여 맛과 향, 그리고 종합적 기호도에 대한 관능 평가를 진행하였다. 관능 평가에 참여한 평가자는 57명으로 20대에서 50대까지의 남녀를 대상으로 하였으며, 응답자의 성별은 남성과 여성이 각각 63%, 37%였으며 연령은 20대가 18%, 30대가 45%, 40대가 25%, 50대가 12%였다. 관능 평가에 대한 결과는 Fig. 24와 같다. 향에 대한 평가에서 긍정적인 묘사로는 약간 새콤하면서 산뜻한 향과 과일향을 특징적이라고 표현하였으며, 부정적이지는 않지만 다소 시큼하다는 응답도 많은 편이었다. 누룩취에 관해서는 연령별로 크게 나뉘지는데 20, 30대의 경우에는 누룩취가 특징적이고 다소 거부감이 느껴진다고 응답한 반면에 40-50대는 누룩향이 구수하여 좋다는 응답이 많았다. 누룩향에 관해서는 다소 상반되었다. 맛에서는 단맛과 신맛, 다소 짭짤한 바디감이 특징적이라는 응답이 많았으며, 일부 뒤에서 다소 느끼한 맛이 끌린다고 하였다. 전반적인 기호도는 57명 중 34명(59%)이 ‘좋다’, ‘매우 좋다’라고 응답하였고, 17명(29%)가 음용하기에 무난하다는 평가를 하였다. 다양한 기능성 유산균을 활용하여 개발된 제품으로 막걸리에 대한 가치를 높일 수 있는 기회를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

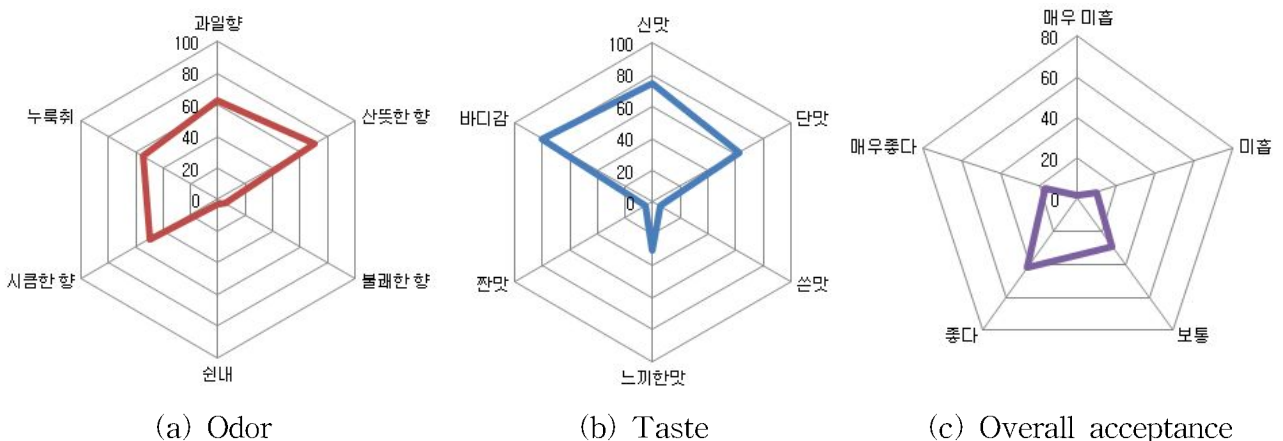


Fig. 24. The symbolic characteristics of trial manufactured new functional Makgeolli product.

마. 기능성 강화 유산균 막걸리 시제품에 대한 미백 및 주름개선 효과

협동연구기관에서 수행하는 막걸리 및 개발된 막걸리 시제품에 대한 생리 기능성 활성 평

가 외 막걸리의 가치를 높이기 위하여 미백 및 주름개선 효과를 살펴보았다. 본 연구에서는 기능성 강화 유산균 막걸리 시제품을 동결 건조하여 에탄올과 물을 제거하고 분말화한 뒤 DMSO에 녹여서 이를 시험 소재로 하여 미백효과시험(Tyrosinase inhibition assay, Melanogenesis inhibition assay)와 주름개선효과시험을 실시하여 응용가능성을 평가하였다.

(1) 미백효과 평가

Tyrosine에 대한 tyrosinase inhibition assay는 다음과 같이 측정하였다[6]. 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.8) 770 $\mu$ l, 농축물 70 $\mu$ l, mushroom 유래 tyrosinase(1500~2000 U/mL) 70 $\mu$ l, 1.5 mM L-tyrosine 140 $\mu$ l를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 15 min간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase inhibition ratio는 식(1)로부터 계산되었으며 이에 대한 대조구는 tyrosinase inhibitor인 Kojic acid를 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition ratio(\%)} = [1 - (\text{Exp.} - \text{Blank}) / \text{Control}] \times 100 \quad (1)$$

Tyrosinase는  $\text{Cu}^{2+}$ 와 결합한 효소 동·식물, 미생물 및 사람 등에 널리 분포되어 있는 polyphenol oxidase로 멜라닌 합성과정에서 속도를 제한하는 등 멜라닌 합성의 주요한 조절적 단계를 나타내는 효소이다[7]. 이러한 활성을 검증하기 위하여 막걸리 시제품 농축물의 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과 Fig. 25와 같이 나타났다. 막걸리 농축물의 tyrosine에 대한 tyrosinase 효소 억제 효과는 표준물질로 사용한 kojic acid와 같이 농도 의존적으로 유의적 억제를 나타내었다. 고농도로 사용할 경우 세포독성을 나타내는 kojic acid보다는 동일 농도에서 낮은 저해 활성을 보였다.

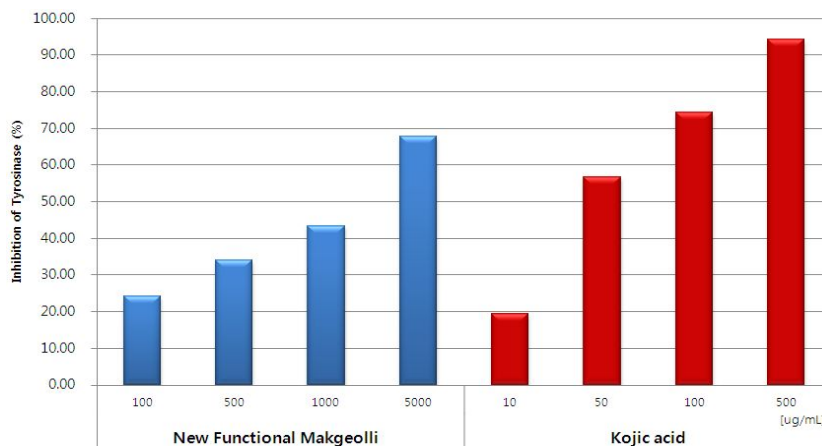


Fig. 25 In vitro Tyrosinase inhibition assay of new functional Makgeolli concentrate.

B16F10 melanoma cell에 대한 melanogenesis inhibition assay는 다음과 같이 측정하였다[6]. melanoma cell을 10% FBS가 함유된 DMEM 배지로 3-well plate에 well 당  $1 \times 10^5$ 개로 접종한 후 5%  $\text{CO}_2$ , 37 $^{\circ}$ C에서 세포가 well 바닥에 약 80% 이상 부착될 때까지 배양하였다. 배양 후 배지를 제거한 뒤 PBS buffer로 세척하고, 원심분리한 다음 상등액을 제거하여 pellet을 얻었다. 이 세포 pellet은 60 $^{\circ}$ C에서 건조한 후 10% DMSO가 함유된 1N NaOH 용액에 녹여서 ELISA reader로 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 막걸리 시제품의 농축물의 melanoma cell에 대한 melanin 억제효과는 Fig. 26에 나타나 있다.

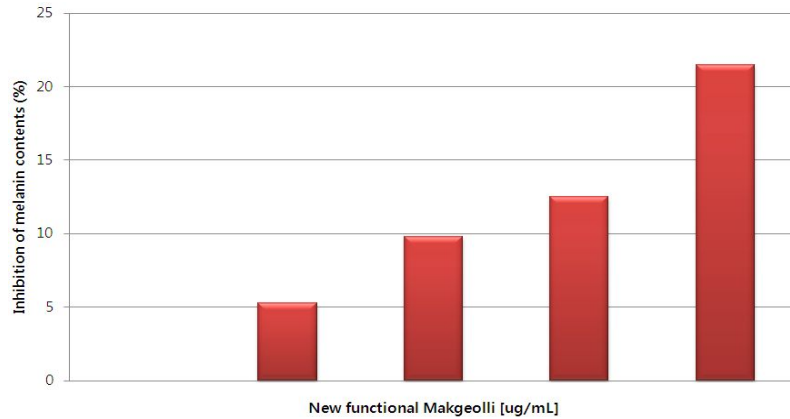


Fig. 26 Inhibitory effect of new functional Makgeolli on melanin accumulation in cultured B16F10 melanoma cells.

농축물은 농도 의존적으로 유의적인 억제 효과를 나타내었으며, 200 $\mu$ g/mL의 농도에서 melanin 생성을 21% 저해하였다. 두 미백효과 시험의 결과를 종합하면 막걸리 시제품 농축물의 미백효과를 확인할 수 있었다.

## (2) 주름개선 효과 평가

피부 노화는 나이가 들어감에 따라 자연히 발생하는 자연노화(intrinsic aging, 내인성 노화)와 주위 환경, 특히 자외선에 의한 광노화(photoaging)로 나눌 수 있다. 피부가 노화됨에 따라 여러 가지 대사 활성이 저하되며 세포 활성도 떨어진다. 또한 콜라겐 합성과 콜라겐의 전사 이후에 일어나는 과정도 자연 노화로 감소된다[8]. 또한 반복적인 자외선 노출로 콜라겐 분해효소인 MMP (Matrix metalloproteinase)의 과다한 발현 증가 등의 생리적 변화들이 나타나 피부가 건조해지며 표피, 진피층의 구조적인 차이로 인해 탄력성을 잃어버리고 점차적으로 주름이 깊어지게 된다[9]. 따라서 여러 인자 중 MMP 효소 생성 억제 효과를 zymography로 주름개선 효능을 평가하였다. HaCaT cells을 60mm cell culture dish에  $1 \times 10^6$  cells/mL로 분주하여 24시간 배양한 뒤, 배지를 제거하고 시험 소재를 처리하였다. 48시간이 지난 다음 배지를 수거하여 원심분리를 수행하였다. Bradford법을 이용하여 단백질의 양을 정량하여 10% SDS-PAGE(1 mg/mL gelatin 함유)에서 전기영동 수행 후, 0.1% triton-X로 30분씩 2번 세척한 다음 developing buffer를 넣어 30 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 반응시키고 coomassie blue로 염색하여 관찰하여 MMP-2 및 MMP-9 기질 활성을 측정하였다. 미리 준비한 시험 물질(1-1: 시제품; Alcohol 7%, 1-2: 제성 전 막걸리 원주; Alcohol 16.7%)은 대조구로는 시판 막걸리 2종(A, B)으로 선택하여 평가하였으며 그 결과는 Fig. 27과 같다.

평가 결과 기능성 막걸리 시험 소재는 양성 대조구(UV+)에 비하여 MMP-2와 MMP-9의 효소적 활성을 저해하는 것으로 나타나 주름 개선에 긍정적인 효과를 주는 것으로 판단되었다.

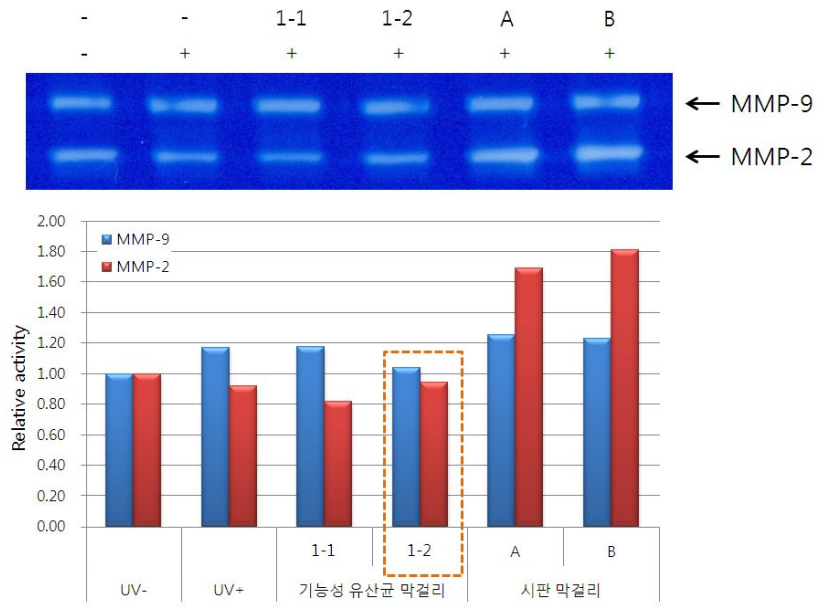


Fig. 27 Inhibitory effect of new functional Makgeolli on MMP-2 and MMP-9 activity

## 제 2 절 제1협동연구과제

### 제1협동과제 : 생막걸리 내 유산균 분리 및 기능활성 규명 - 경희대학교 박천석

#### 1. 국내 유통 생막걸리의 유산균 분포

##### 가. 국내 시판 중인 생막걸리에서의 유산균과 효모균의 분포

국내 대형 마트 및 시장에 유통되는 생막걸리 20종을 구입하였다(Table 1). 사용된 모든 생막걸리는 제조일로부터 5일 이내에 실험에 필요한 샘플을 회수하였다.

Table 1. 국내 대형 마트 및 시장에서 구매한 생막걸리

순번	제품명	Sample ID	제조회사	지역	제조일자
1	국순당 생쌀 막걸리	A	국순당	강원	2010.07.05
2	덕산 세왕 생쌀 막걸리	B	영농조합법인 세왕	충북	2010.07.12
3	참살이 탁주	C	남한산성 소주	경기	2010.07.10
4	생이동 쌀 막걸리	D	이동주조 주식회사	경기	2010.07.07
5	장수 생 막걸리	E	서울탁주	경기	2010.07.13
6	우리쌀 생 막걸리	F	배상면 주가	경기	2010.07.04
7	부자생술	G	배혜정 누룩도가	경기	2010.07.09
8	우리술 찹쌀 동동주	H	(주) 우리술	경기	2010.07.06
9	가평жат 생 막걸리	I	(주) 우리술	경기	2010.07.06
10	우리술 생쌀 막걸리	J	(주) 우리술	경기	2010.07.05
11	부산 금정산 막걸리	K	(유) 금정산성 토산주	부산	2010.10.18
12	전주 생 막걸리	L	(주) 전주주조	전북	2010.09.03
13	대강 소백산 생 막걸리	M	용두산 조은술 영농조합	충북	2010.09.01
14	탁사마	N	농업회사법인 우포의 아침(주)	경남	2010.09.03
15	청풍명월 생쌀 막걸리	O	청주양조합작회사	충북	2010.09.20
16	생탁	P	부산합동양조	부산	2010.09.17
17	동곡 막걸리	Q	동곡양조	경북	2010.09.20
18	당진 먼천샘물생쌀막걸리	R	당진면천주조	충남	2010.09.20

19	정선명주 생막걸리 만드레	S	농업회사법인 국순당 정선	강원	2010.10.08
20	생덕산 쌀 막걸리	T	영농조합법인 세왕	충북	2010.10.12

국내 시판 중인 생막걸리의 유산균 수와 효모 수를 측정하기 위해서, 각 샘플을 생리식염수인 0.8% NaCl 수용액을 이용하여 단계적으로 희석한 희석액을 MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) 고체 배지와 YM (Yeast Malt Broth) 고체 배지에 도말하여 30°C에서 24~48 시간을 배양하였다. MRS 고체 배지는 유산균을 선별하기 위한, YM 고체배지는 효모를 선별하기 위한 배지이다. 이때 MRS 고체 배지에 0.01% nystatin을 첨가하여 진균류의 오염을 방지하였다.

각 희석 배수에서 형성된 고체 배지의 colony 수를 이용하여 CFU (Colony-Forming Unit)를 계산하고 생막걸리의 유산균과 효모균의 수를 확인하였다(Fig. 1).

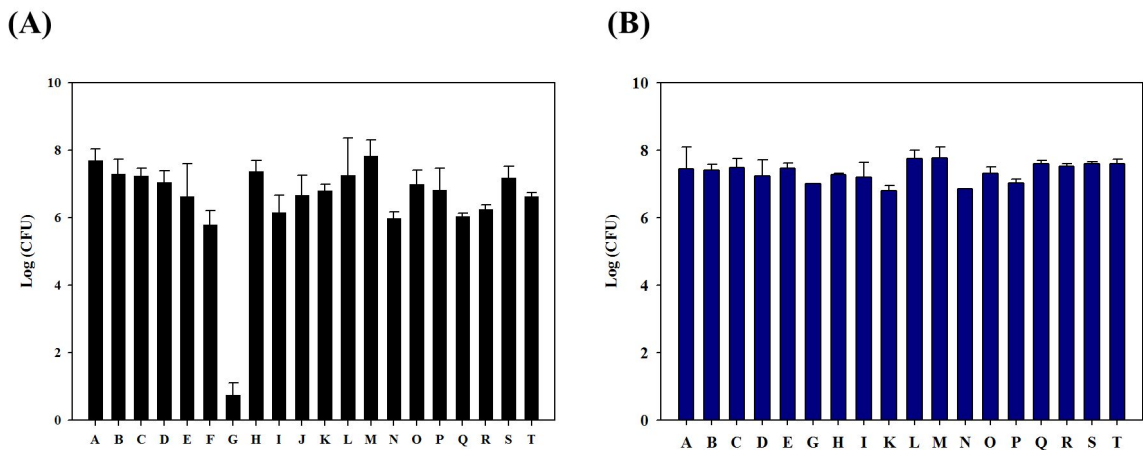


Fig. 1 국내 생막걸리 제품별 유산균 (A)와 효모균 (B) 수

국내 유통되는 생막걸리 20종에서 유산균의 경우 G제품을 제외한 모든 제품이  $10^6$  cfu/mL 이상의 미생물 수를 나타냈다. 이는 국내 생막걸리에 풍부한 유산균이 함유되었다는 것을 의미한다. 국내 생막걸리에 존재하는 효모균의 수는 약  $10^7$ 에서  $10^8$  cfu/mL로 각 제품마다 유사한 효모균의 수가 관찰되었다[10].

G제품의 경우 제조 일자가 다른 제품을 가지고 확인 실험을 수행하였을 때도 다른 생막걸리보다 적은 유산균수가 나타났다. G제품 제조회사에 문의를 해보니, G사 제품은 무증자방식으로 생막걸리를 제조하는 것으로 확인되었다.

나. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)을 이용한 생막걸리의 유산균 분류

생막걸리에 존재하는 유산균의 종류를 분류는 PCR-RFLP방법을 사용하였다. 이때 사용한 유전자는 미생물 분류에 가장 많이 사용되는 16S rRNA 유전자(gene)를 이용하였다[11]. 16S rRNA 유전자는 세균종의 수직적인 유전적 특징을 갖는 계통 유전학적 관계를 결정할 수 있는 좋은 방법이다[12].

각각의 생막걸리를 0.01% nystatin이 함유된 MRS 배지에 도말하여 형성된 colony 100개를 임의로 선정하였다. 선정된 colony를 colony PCR 방법을 이용하여 16S rRNA 유전자 부분을



증폭하여 분리하였다(Fig. 2)[13].

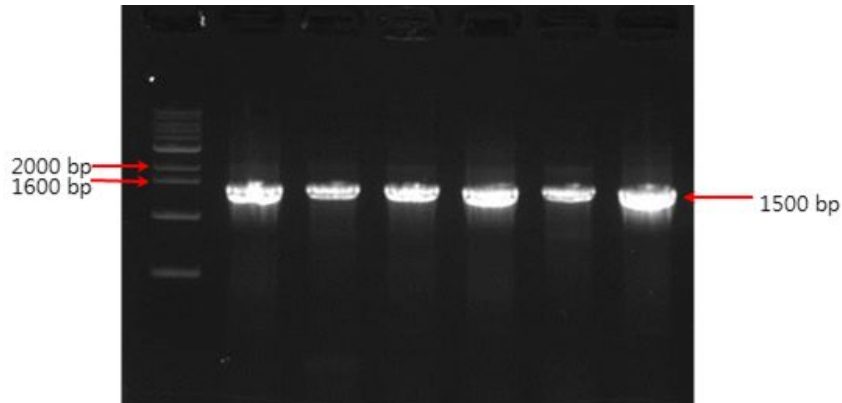


Fig. 2 생막걸리 유래 유산균의 16S rRNA 유전자 PCR 증폭 결과

Colony PCR 결과, 각각의 colony에서 성공적으로 약 1.5 kb인 16S rRNA 유전만을 증폭할 수 있었다. 성공적으로 증폭된 16S rRNA 유전자를 *AluI*, *HhaI*, *Sau3AI* 3가지 제한효소(restriction endonuclease)를 이용하여 처리하였다[14]. 다른 미생물 군의 경우 각각의 제한효소가 자르는 부분이 다르기 때문에, 다른 크기의 DNA 단편이 나올 것이다. 제한효소가 처리된 DNA 조각 패턴을 agarose gel 전기영동법을 이용하여 분류하였다(Fig. 3).

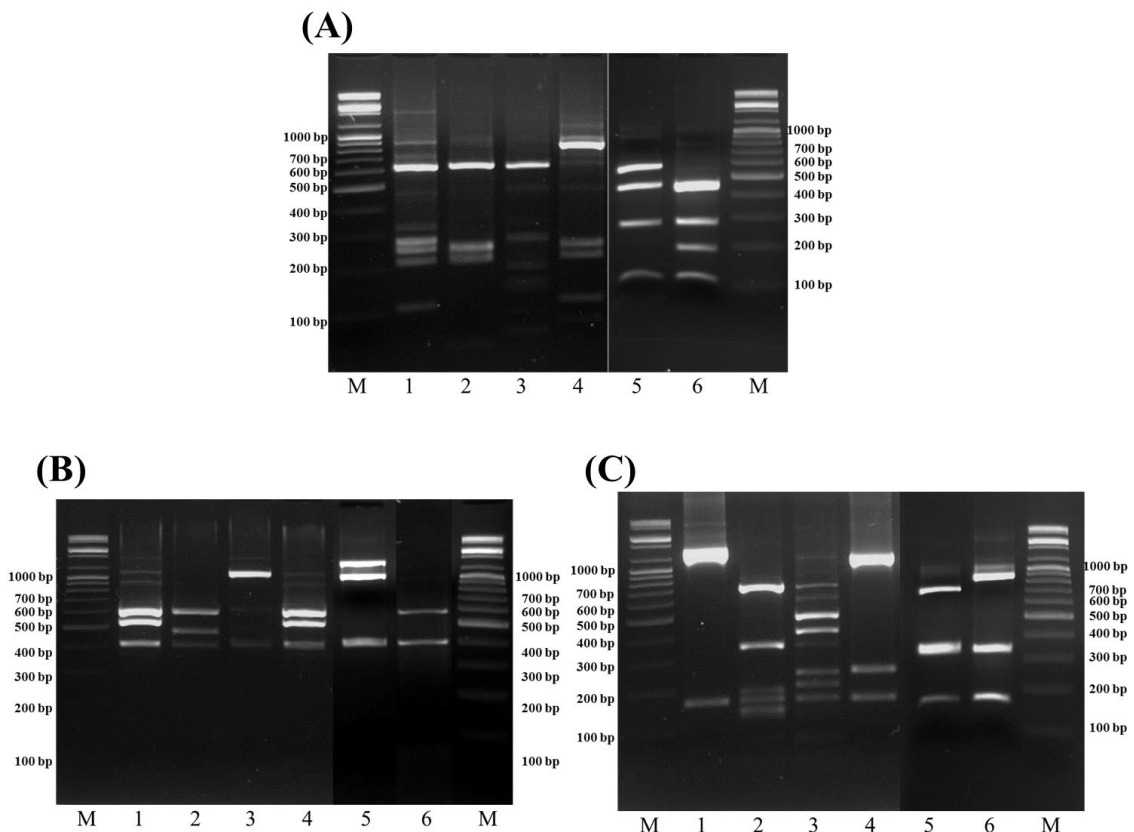


Fig. 3 16S rRNA PCR-RFLP 6가지 패턴 : *AluI* (A), *HhaI* (B), *Sau3AI* (C)

20종의 생막걸리에서 분리된 총 1,249 여개의 균주에서 나온 16S rRNA 유전자를 *AluI*.

*HhaI*, *Sau3AI* 3가지 제한효소로 처리하였을 때, Fig. 3와 같이 각각의 제한 효소들 마다 총 6가지의 패턴으로 분류가 되었다[15].

패턴분류별 미생물의 수를 확인하여 각각의 생막걸리에 존재하는 유산균의 분포의 차이를 확인하였다(Table 2).

Table 2. PCR-RFLP 패턴 분류를 통한 국내 생막걸리의 유산균 분포

PCR-RFLP Pattern	Rice wine samples																				No. of the isolates	Frequency of occurrence (%)
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T		
1	17	44	27	52	87	4	30			8	44	72	24	13	1	8	17	2	33		471	37.71
2	3	40	21	37	3		4	2	6	33	33	8	62	38	9	33	32	35	12	72	483	38.67
3									43	88	4					48	1				184	14.81
4	40					61								4		1			1		107	8.49
5											1										1	0.08
6																	1	2			3	0.24

생막걸리 종류에 따른 분류된 패턴의 차이가 있었으나, 전체 생막걸리에서 1번과 2번 패턴이 76.38%로 가장 많은 관찰되었다. 이러한 결과는 1번과 2번의 패턴을 가지는 유산균이 시중에 판매되고 있는 생막걸리에 가장 널리 분포한다는 것을 알 수 있었다.

H, I, O인 3 제품에서는 3번 패턴이 가장 많이 관찰이 되어 있으며, A와 F에서는 4번 패턴의 유산균이 우점종으로 나타났다. H와 I는 경기도에서 생산된 제품이고, O는 충청북도에서 생산된 제품이다. 또한 A는 강원도, F는 경기도에서 생산된 제품이다. 이것으로 보아 생막걸리의 유산균의 분포는 생산 지역에 의한 연관성은 적은 것으로 나타났다.

같은 회사의 제품인 H, I, J의 경우 H와 I은 3번 패턴이 J는 2번 패턴이 가장 우점종으로 나타났다. B와 T의 경우도 같은 회사에서 나온 제품이지만 B에서 관찰되는 1번 패턴의 유산균이 T에서는 관찰되지 않았다. 이는 비록 제조회사가 같더라도, 막걸리 제조에 이용되는 재료의 차이 및 발효 조건 등에 의한 차이라고 사료된다.

A, F, N, S에서 4번 패턴이 발견이 되었는데, 이는 4개의 막걸리를 생산할 때 입국이 아닌 같은 방식으로 제조된 누룩에 의해서 발효를 진행한다. 입국을 사용한 다른 제품들은 4번 패턴이 발견되지 않은 것으로 보아 누룩을 이용하여 제조된 생막걸리에서는 특이적인 유산균이 발견됨을 확인할 수 있었다.

#### 다. 16S rRNA 유전자 분석을 통한 생막걸리 유산균의 동정

PCR-RFLP를 이용하여 분류된 균집들 미생물의 16S rRNA 유전자의 염기 서열 분석을 수행하였다. 염기 분석은 National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 에서 제공하는 BLAST 염기분석 프로그램과 GenBank database 를 이용하여 수행하였다. PCR-RFLP 패턴별 16S rRNA 유전자 염기분석 결과 다음과 같았다.

Table 3. PCR-RFLP 패턴별 16S rRNA 유전자 분석 결과

Pattern	Species-identification	Identity(%)	GenBank accession No.
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	CP002222.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	AB362755.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	AB362768.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	FJ386491.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	EU621849.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	AB362652.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	GU552552.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	FJ386491.1
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99	AB362758.1
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99	FJ386571.1
2	<i>Lactobacillus casei</i>	99	FM177140.1
	<i>Lactobacillus casei</i>	99	CP001084.1
	<i>Lactobacillus casei</i>	99	AY091596.1
	<i>Lactobacillus casei</i>	99	HQ293086.1
	<i>Lactobacillus casei</i>	99	AB008204.1
	<i>Lactobacillus casei</i>	99	GQ395613.1
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99	AB362761.1
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99	DQ462440.1
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99	EU184020.1
	<i>Lactobacillus crustorum</i>	99	AM285454.1
	<i>Lactobacillus crustorum</i>	99	AM285453.1
4	<i>Lactobacillus crustorum</i>	98	FJ645924.1
	<i>Lactobacillus brevis</i>	99	AB362619.1
	<i>Lactobacillus brevis</i>	99	AB362618.1
	<i>Lactobacillus brevis</i>	99	CP000416.1
5	<i>Lactobacillus brevis</i>	99	AY974809.1
	<i>Lactobacillus rossiae</i>	99	AM920330.1
6	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99	AB362626.1
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	97	AP008937.1

16S rRNA 염기 분석 결과 각각의 패턴들은 *Lactobacillus plantarum/pentosus*, *Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus*, *Lactobacillus crustorum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rossiae*, *Lactobacillus fermentum*로 규명되었다[16].

*Lactobacillus plantarum/pentosus*의 경우 17개의 제품에서 존재하였다. 각 회사별 유산균의 근원 관계는 다음 Fig. 4와 같다.

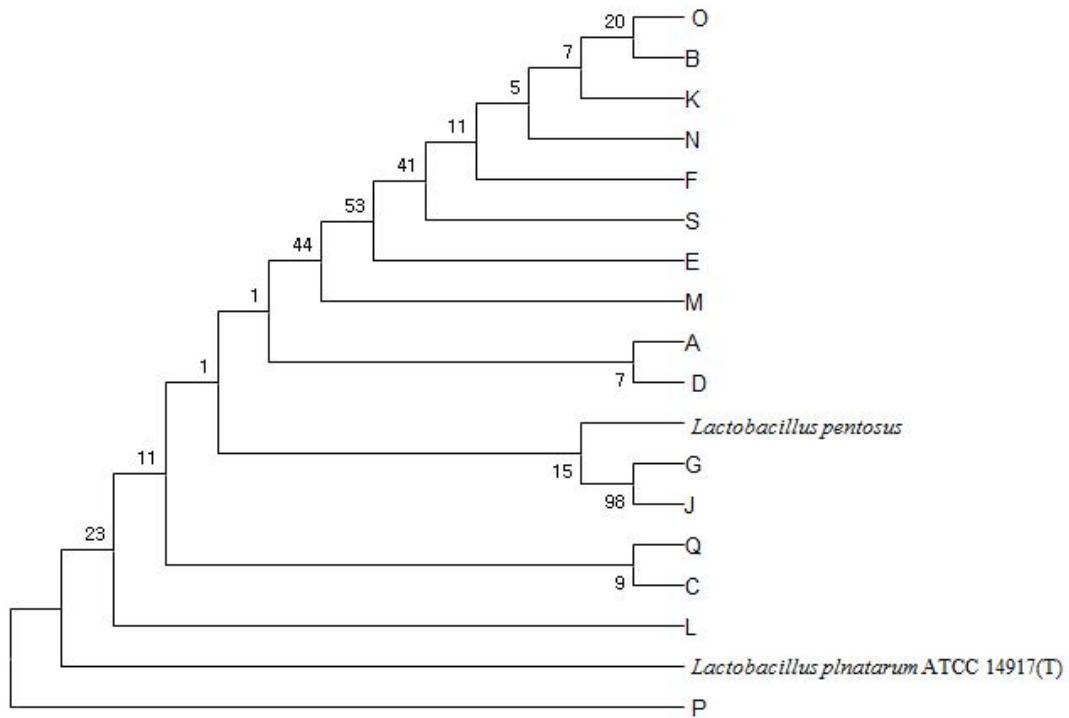


Fig. 4 생막걸리 제품별 유래 *Lactobacillus plantarum/pentosus* 계통수

각 제품별로 *Lactobacillus plantarum* 분류와 *Lactobacillus pentosus* 분류로 나뉘는 것을 확인하였다. 확인된 균주를 NCBI database에 존재하는 type strain 균주 및 whole genome sequencing이 완료된 균주의 16S rRNA 염기서열과 비교하여 근원 관계를 확인하였다. 모든 제품은 기존에 알려진 type strain 및 whole genome sequencing이 완료된 균주와는 완전히 일치 하지 않는다는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라 각 제품 사이들에서도 균주의 상동성이 적은 것으로 나타났다. 이는 각 생 막걸리마다 같은 종이 존재하지만 그 종들은 차이가 존재함을 의미한다.

비슷한 근원 관계로 나타난 B와O, A와 D, G와 J, Q와 C의 생산 지역과 회사를 비교하였다. B와 O는 제조지역은 같지만 회사가 다르며, 그 외 제품들은 제조 회사 및 생산 지역이 다른 것으로 확인되었다. 이는 지역과 회사에 따른 미생물의 분포의 영향이 적은 것으로 생각되어 진다.

*Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus*의 경우 16개의 제품에 존재함을 확인할 수 있다 (Fig. 5). 계통수 분석을 통한 제품별 균주의 분포를 보면, *L. plantarum/pentosus* 분류와 마찬가지로 동일한 균 제품마다 발견된 미생물이 다양한 subspecies로 존재한다는 것을 확인할 수 있다.

계통수 분석 결과, *Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus*의 경우 J, Q, C, N, A, R O분류 I, T, D, K, P, B, M분류, S와 E 분류, L, H 분류로 나뉘어졌다. 모든 제품은 *L. casei* type strain과는 근원 관계가 떨어져 있는 것으로 나타났다. 비록 각각 제품의 미생물 마다 차이는 있지만 어느 정도의 유사한 근원관계가 존재하는 것으로 나타났다.

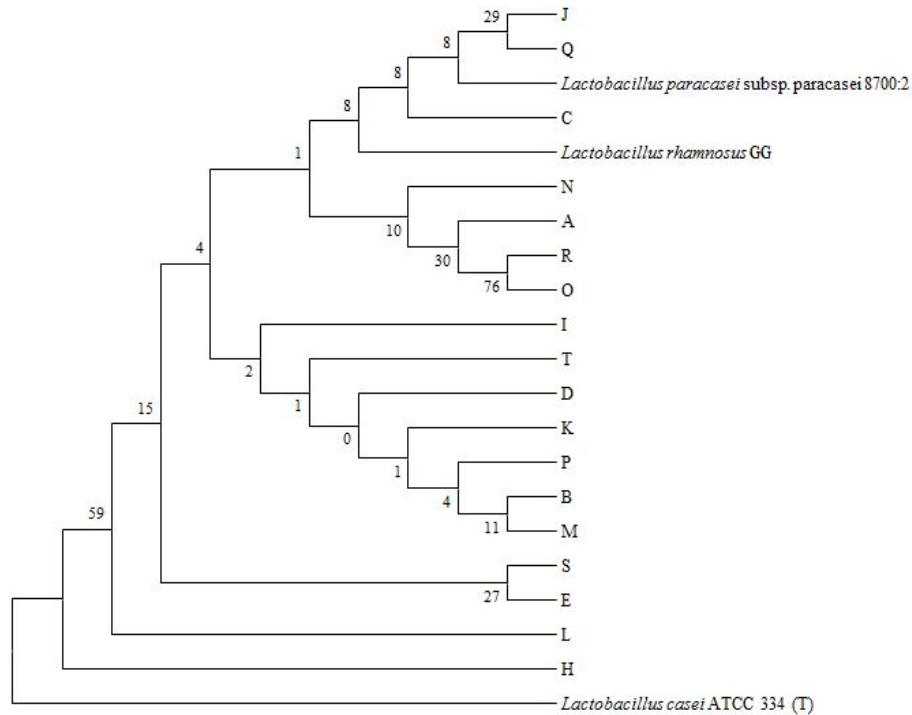


Fig. 5 생막걸리 제품별 유래 *Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus* 계통수

패턴 3은 *Lactobacillus crustorum*으로 동정이 되었다. 총 5개의 제품에서 발견이 되었으며, H, I, O제품의 우점종으로 확인 되었다. Type strain인 *Lactobacillus crustorum* LMG 23699의 16S rRNA 염기와 상동성은 다음 Fig. 6과 같다.

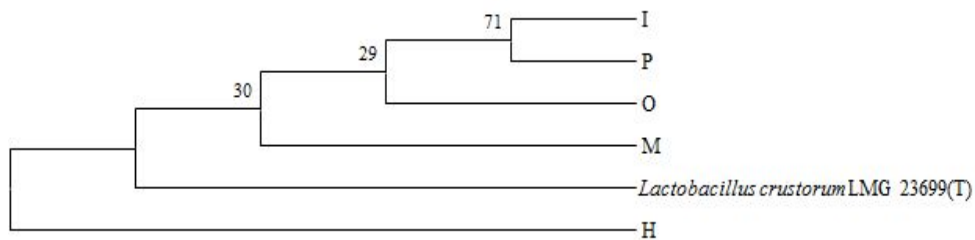


Fig. 6 생막걸리 제품별 유래 *Lactobacillus crustorum* 계통수

균주들 모두 type strain과는 계통적 차이가 있으며, 가장 많이 발견된 제품인 H, I, O에서의 *L. crustorum*도 차이가 존재함을 확인할 수 있었다.

패턴 4는 5개의 제품에서 발견되었으며 *Lactobacillus brevis*로 나타났다. type strain과 염기분석을 하면, type strain과 기준으로 A, F, M 과 P, S로 두 분류로 분류된다는 것을 알 수 있다. P와 S에서 분류된 미생물은 동일한 P와 S의 경우 동일한 미생물로 나타났으며 A와 F도 근원관계가 높은 것으로 나타났다. P와 S는 부산과 강원도, A와 F는 강원도와 경기에서 만들어진 생막걸리로 이 결과 또한 미생물이 지역 및 회사에 영향을 받지 않는다는 것을 알 수가 있다.

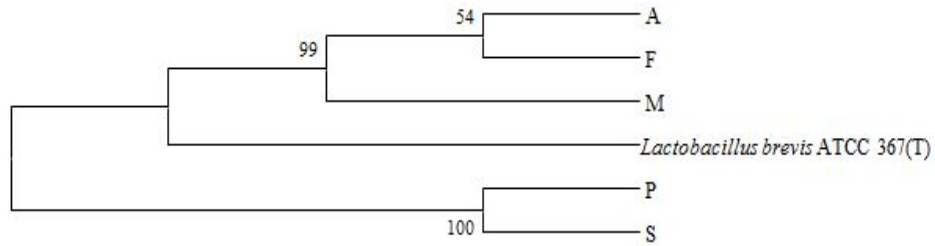


Fig. 7 생막걸리 제품별 유래 *Lactobacillus brevis* 계통수

전국 지역 생막걸리에서 존재하는 유산균 중 가장 낮은 비율을 차지하는 것으로 *Lactobacillus rossiae*와 *Lactobacillus fermentum*으로 PCR-RFLP 패턴 5와 6으로 확인되었다. 이 미생물들은 극히 일부 제품에서 낮은 비율로 관찰되었다.

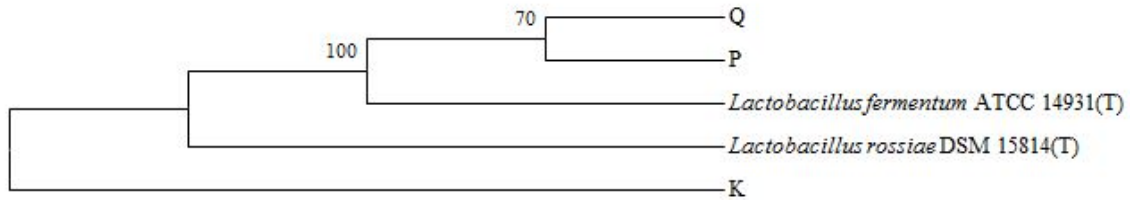


Fig. 8 생막걸리 제품별 유래 *Lactobacillus rossiae*와 *Lactobacillus fermentum* 계통수

국내 시판되는 20종의 생막걸리의 유산균 총수, 유산균의 균종을 확인한 결과, 거의 모든 제품이  $10^6$  이상에 해당하는 유산균을 함유하고 있었다. 대부분의 제품에서 미생물은 *Lactobacillus plantarum/pentosus*, *Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus*이 분포하고 있음을 확인할 수 있었다. 몇몇 제품들은 *Lactobacillus crustorum* 또는 *Lactobacillus brevis*가 우점종으로 존재함을 확인하였다.

## 2. 생막걸리 유래 유산균의 기능성

### 가. 항균활성

생막걸리에서 분리한 유산균의 항균 활성을 확인해 보기 위해 4 종류의 Gram (+)와 5 종류의 Gram (-), 총 9 종류의 indicator 균주를 사용하였다(Table 4).

Table 4. Indicator strain used in antibacterial activity test

Indicator strain
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (G-) KCTC 1621
<i>Escherichia coli</i> (G-) KCTC 1039
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G-) KCTC 2004
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (G-) KCTC 2515
<i>Vibrio para-haemolyticus</i> (G-)
<i>Bacillus cereus</i> (G+) KCTC 1012
<i>Listeria monocytogenes</i> (G+)KCTC 3569
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (G+) KCTC 3100
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (G+) KCTC 1021

거의 모든 유산균에서 항균 활성이 나타났다. 유산균은 성장을 하면서 다양한 유기산등을 생산하게 된다. 이러한 유기산은 배양액의 pH를 낮추게 되고, 이러한 산성 조건은 미생물이 배양하기 어려운 환경이 된다. 또한 일부 유산균들은 자신 이외의 미생물의 성장을 억제하는 peptide 단위의 단백질을 생산하여 항균 활성을 나타나게 된다. 이러한 단백질을 ‘Bacteriocin’ 이라고 명명한다.

막걸리 유래 유산균의 항균 활성이 유기산에 의한 pH에 의한 것인지 아니면 bacteriocin에 의한 것인지를 알아보았다. 유산균 배양액을 NaOH를 이용하여 pH 7.0로 조정하여 항균 활성 실험을 수행하였다. 배양액의 pH를 중성으로 조정하여도 항균 활성이 있는 것은 배양액의 pH에 의한 영향이 아니라는 것이고, 이는 배양액에 bacteriocin과 같은 항균물질에 의한 영향으로 추론할 수 있다.

pH를 중성으로 조정하였어도 항균 활성이 있는 샘플을 protease K 처리를 하였다. Bacteriocin과 같은 단백질 물질에 의한 항균 활성은 단백질을 분해하는 protease K 처리 시 활성이 사라지게 될 것이다. 이는 유산균의 항균물질이 bacteriocin 여부를 확인하는 1차 선별 작업이 된다.

막걸리 유래 유산균의 경우 대부분의 샘플이 pH를 중성으로 조절하였을 때, 대부분의 indicator strain에서 항균 활성이 나타나지 않았다. *Listeria monocytogenes*에서 몇몇 유산균 샘플들이 중성의 조건에서도 항균 활성이 나타났다. 이에 이 샘플들을 protease K 처리를 하여 항균 활성을 알아보았다(Table 5). Table 36은 유산균 샘플이 indicator strain에 나타나는 항균 활성의 clear zone (indicator strain이 자라지 않은 부분)의 지름을 나타낸 것이다.

Table 5. Results of *Listeria* sp. antibacterial activity test

Indicator strain		<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3569				
LAB	Cultured	Washed cell	Supernatant	Supernatant pH 7.0	Supernatant (Treatment of proteinaseK)	Supernatant pH7.0 (Treatment of proteinaseK)
A	+ 5 mm	+ 6 mm	-	-		
B-1	+ 4 mm	+ 4 mm	-	-		
B-2	+ 6 mm	+ 5 mm	-	-		
B-3	-	-	-	-		
E	+ 6 mm	+ 4 mm	+ 2 mm		-	-
F	+ 7 mm	+ 9 mm	-	-		
K-1	+ 8 mm	+ 8 mm	+ 2 mm	-		
K-2	+ 6 mm	+ 7 mm	+ 1 mm	-		
M-1	+ 5 mm	+ 6 mm	+ 2 mm	-		
M-2	+ 9 mm	+ 9 mm	+ 2 mm	-		
P	+ 7 mm	+ 7 mm	-	-		
Q-1	+ 14 mm	+ 6 mm	+ 3 mm	-		
Q-2	+ 5 mm	+ 5 mm	-	-		
R-1	+ 10 mm	+ 10 mm	+ 3 mm	+ 2 mm	-	-
R-2	+ 10 mm	+ 12 mm	+ 2 mm	+ 1 mm	-	-
S	+ 12 mm	+ 12 mm	+ 3 mm	+ 2 mm	-	-
I-1	+ 5 mm	+ 4 mm	-	-		
I-2	+ 5 mm	-	-	-		

*Listeria monocytogenes*에 항균 활성이 나타난 유산균의 경우, pH 7.0로 보정 후 항균 활성이 나타난 샘플을 protease K 처리 시 항균 활성이 없어짐을 확인하였다. 이는 일부 막걸리 유래 유산균들이 *Listeria monocytogenes*에 특이적인 항균 활성을 나타내는 bacteriocin 또는 bacteriocin-like 물질을 생산함을 확인할 수 있었다. 하지만 그 항균 활성은 기존에 알려진 물질보다는 뛰어나지 않았다.

#### 나. gamma-Aminobutyric acid 생산 유산균

20 종류의 생막걸리에서 총 1,056 종류의 유래 유산균을 확보하였다. 이들 확보된 유산균을 GABA가 생산이 여부를 확인하기 위해, GABA의 전구체인 glutamic acid가 첨가된 배지에 배양하였다. 배양된 유산균을 thin-layer chromatography를 통하여 GABA의 생산 여부[17]를 확인 하였다(Fig. 9).

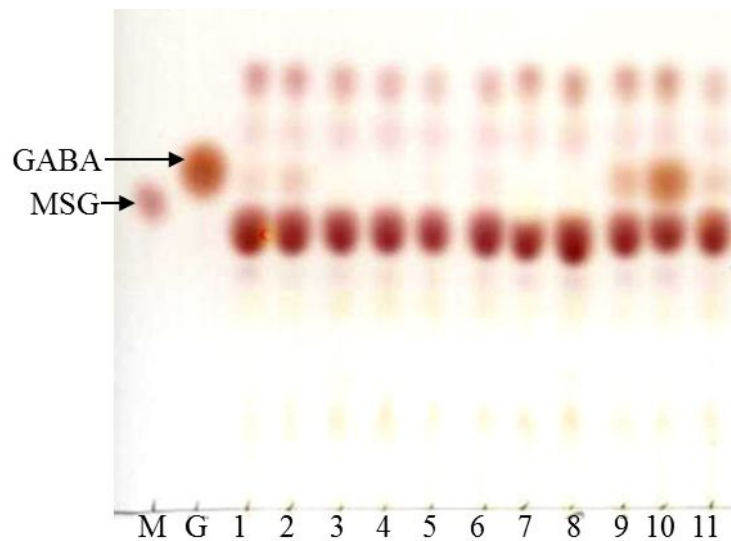


Fig. 9 TLC analysis of isolation of GABA production LAB.

Lane M : monosodium glutamate (MSG); lane G : GABA; Lane 1~11 : lactic acid bacteria samples

유산균들의 GABA 생성량은 일정하지 않았다. 총 1,056 종류의 저장된 유산균 중 179개의 유산균만이 GABA를 생성하였다. 생산된 유산균의 분포는 *Lactobacillus plantarum*이 90 종류로 가장 많았으며, 총 9개의 제품 유래 막걸리에서 검출 되었다. 그 뒤로는 *Lactobacillus brevis*가 60 종류였지만, 이는 단 2가지 제품에서만 검출 되었다. *Lactobacillus casei*는 총 29 종류가 선발 되었지만, 총 8개의 막걸리 제품에서 검출된 유산균으로 *Lactobacillus brevis*보다 다양한 제품에서 존재함을 알 수 있었다(Table 6)[18, 19].



Table 6. Produced GABA from lactic acid bacteria in rice wine samples

Sample ID	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. casei</i>
A	11		
B		4	2
E			14
F	49		
K		8	5
G		18	
M		8	1
P		7	2
Q		9	3
R		2	1
S		34	1

이중 GABA의 생산량이 좋은 균주인 *Lactobacillus brevis*의 GABA 생성[20]에 관한 유전자에 대한 연구를 진행하였다.

미생물은 glutamate decarboxylase 효소에 의해서 전구체인 glutamic acid의 탈탄산 반응에 의해서  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)로 변환하게 된다. 이에 생막걸리 유래 유산균에서 가장 높은 GABA 변환율이 나온 *Lactobacillus brevis*의 GAD 유전자를 cloning 하여 효소의 특성을 알아보았다.

PCR을 통하여 성공적으로 GAD 유전자를 성공적으로 증폭하였다. 증폭된 유전자를 NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))에서 제공하는 BLAST program으로 분석하였다. 증폭된 유전자의 amino acid 서열은 *Lactobacillus plantarum* 유래 GAD와는 84%, *Enterococcus faecium*과는 72%의 상동성이 나타났다[21].

증폭된 GAD 유전자를 pET vector system에 construction 하였다. pET vector system은 IPTG induction 강제 발현을 통하여 대장균에서 원하는 단백질을 손쉽게 대량으로 얻을 수 있는 system이다.

대장균을 이용한 pET 발현 system을 이용하여 *L. brevis* 유래 GAD 효소를 성공적으로 대장균에서 발현하였다. 발현된 GAD 효소는 Ni-NTA 친화성 chromatography를 통하여 순수 분리, 정제하였다(Figure 10).

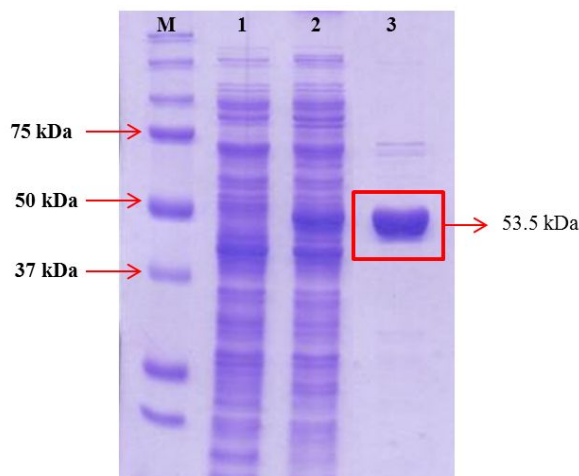


Fig. 10 SDS-PAGE of purified enzymes. M ; Protein marker, 1 ; LBgad crude enzyme without IPTG induction, 2 ; LBgad crude enzyme with 0.4 mM IPTG, 3 ; Purified recombinant LBgad elute enzyme

정제된 재조합 GAD 효소의 기본적인 특성을 알아보기 위해, 다양한 pH buffer와 pyridoxal-phosphate (PLP) 첨가 유무에 따른 활성 변화 대해 알아보았다. 재조합 GAD 효소는 낮은 pH에서 높은 GABA 전환율이 나타났다[22]. PLP는 일부 효소의 보결분자단 (prosthetic group)의 역할을 하며, 단백질의 대사에서 아미노산의 deamination, transamination, transulfuration와 GABA 합성 등에 관여하는 것으로 알려졌다. 재조합 GAD를 사용하여 glutamic acid를 GABA로 전환할 때, 10 mM PLP를 첨가하면 GABA에 대한 전환율이 급격하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 11).

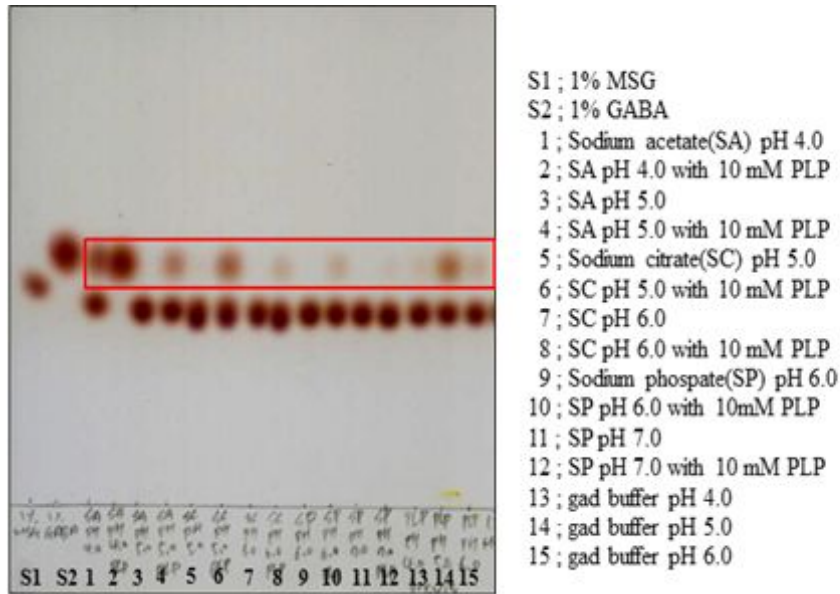


Fig. 11 pH effect determination of LBgad enzyme

재조합 GAD 효소를 sodium acetate pH 4.0 버퍼에서 25~45°C 범위로 반응하여 최적 효소 활성 온도를 확인하였다. 재조합 GAD의 최적 활성 온도는 30°C로 나타났으며, 이는 10 mM PLP를 첨가하여도 변하지 않았다(Fig. 12). 최적 활성 온도와 pH에서 재조합 GAD 효소를 반응하였을 때, 20 mg/ml MSG를 18 mg/ml GABA로 변환하였다.

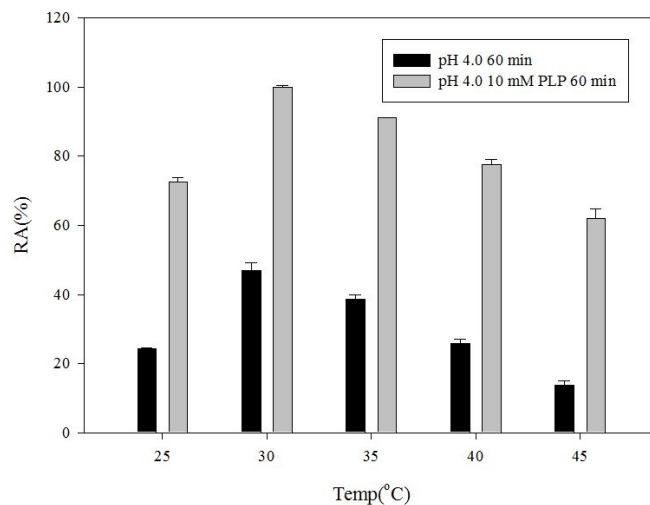


Fig. 12. LBgad enzyme's optimum pH and temperature revealed relative activity

GABA 생산능이 뛰어난 *Lactobacillus brevis*를 이용하여 막걸리 제조에 이용한다면, GABA를 함유한 막걸리 제조가 가능할 것이다. 본 *Lactobacillus brevis* 유래 GAD 효소의 특성에 관한 연구는 GABA가 함유된 유산균 막걸리를 제조할 때 유용하게 사용될 수 있는 기초 연구 자료임이 틀림이 없을 것이다.

다. 생막걸리 유래 EPS 생산 유산균 분리

20종류 막걸리에서 유래한 유산균의 EPS 생산 여부를 확인해 보았다. 유산균이 잘 자라는 배지인 MRS 배지에 5% sucrose를 첨가하였다. 막걸리 유래 유산균을 sucrose 첨가 MRS 배지에 streaking을 수행하여 30℃에서 48 시간 배양하였다. EPS를 생산하는 유산균은 sucrose가 첨가된 배지에서 colony를 형성할 때, colony 주변에 불투명 또는 투명한 점질물을 형성하는 것으로 알려졌다. 모든 유산균등 중 단 하나의 균만 점질물을 형성하였다(Fig. 13).

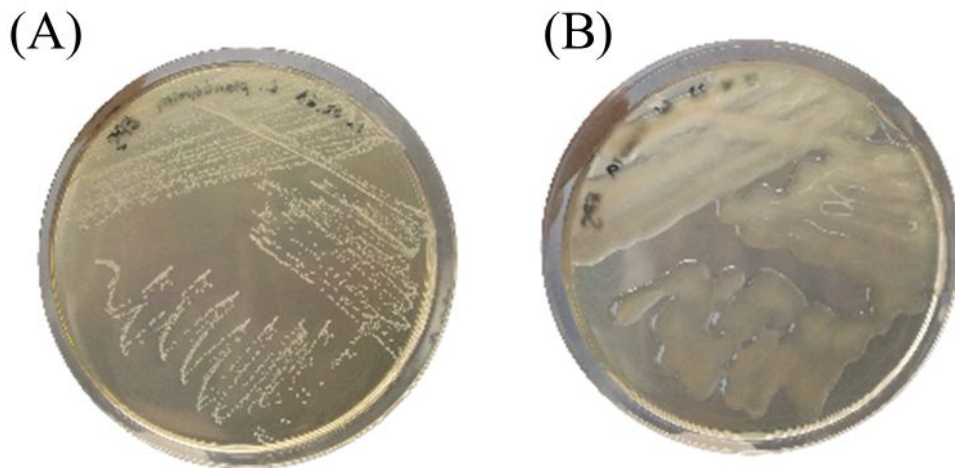


Fig. 13 EPS production comparison between *Lactobacillus planatrum* (A) and *Weissella* sp. (B)

이 균주를 16S rRNA 염기 분석 결과 *Weissella cibaria*로 분석되었으며, *W. cibaria* KSD-914로 명명하였다[23]. 최근 문헌에서 *Weissella cibaria*에 glucansucrase 유전자가 존재하는 것이 보고되었다. Glucansucrase는 세포 외로 분비되는 효소이며, sucrose를 이용하여 glucan이라는 고분자의 glucose polymer를 합성한다. 유산균 유래 glucansucrase가 합성하는 고분자 glucan은 대부분 α-glucan 형태로 주 결합 연결 종류에 따라서, α-(1,6)-glycosidic 결합으로 된 dextran, 또는 α-(1,3)-glycosidic결합으로 연결된 mutan, α-(1,6)-과 α-(1,3)-glycosidic결합이 교대로 연된 형태의 alternan이 있고, α-(1,4)-glycosidic결합으로 형성된 reuteran이 있다.

*Weissella cibaria* KSD-914가 형성한 EPS의 종류를 확인해 보기 위해, *Weissella cibaria* KSD-914가 생성한 glucan을 에탄올 침전법을 이용하여 침전 및 분리하였다. 분리된 glucan을 dextransase 효소 처리를 하여, 시중에 판매되는 dextran과 TLC 및 HPLC로 산물을 분석하였다 (Fig. 14, 15).

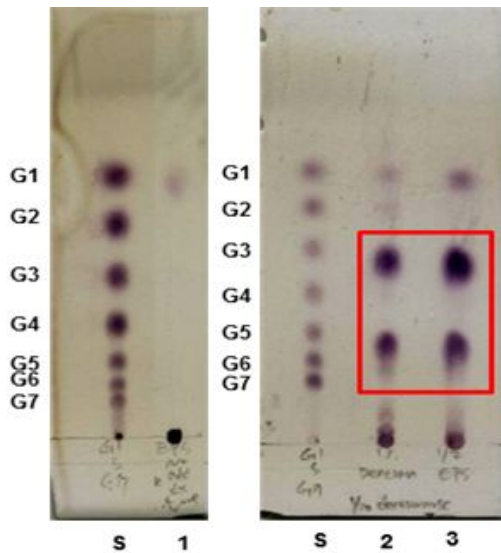


Fig. 14 Detection of hydrolyzed EPS using TLC analysis. S ; G1~G7 std, 1 ; EPS (no add dextranase), 2 ; 1% dextran (dextranase treatment 1/10), 3 ; EPS (dextranase treatment 1/10)  
\* EPS from *Weissella* sp.

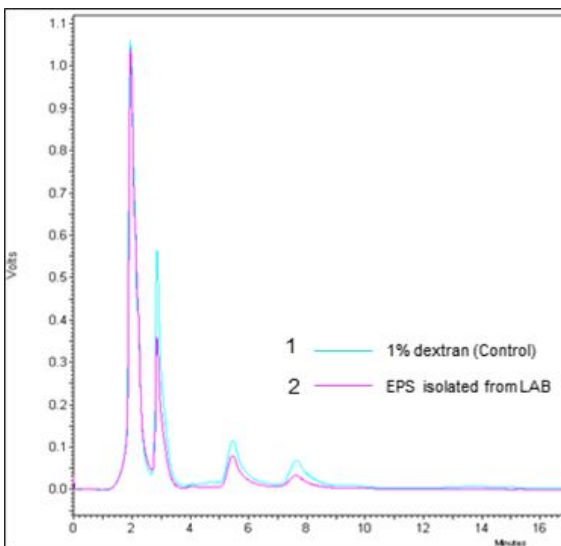


Fig. 15 Detection of Hydrolyzed EPS using HPLC analysis. 1 ; 1% dextran (dextranase treatment 1/10), 2 ; EPS (dextranase treatment 1/10)

Dextranase 효소 처리 산물을 분석 결과, *Weissella cibaria* KSD-914가 생성하는 glucan과 시중에 판매되는 dextran과의 분해 산물이 동일 한 것으로 관찰되었다. 또한 최근에 보고된 *W. cibaria* CMU의 glucansucrase도 dextransucrase로 밝혀졌다. 이에 막걸리에서 분리된 *Weissella cibaria* KSD-914가 생성한 EPS도 dextransucrase에 의해 형성된 dextran으로 추론할 수 있다.

*Weissella cibaria* KSD-914가 생산하는 dextran에 대해 알기 위해, *Weissella cibaria* KSD-914에 존재하는 dextransucrase 유전자를 cloning 하였다. 추출한 genomic DNA와 염기 분석을 통하여 제작된 primer (WDS-F, WDS-R)를 사용하여 PCR을 수행하였으며 그 결과 약 4.4 kb 크기의 PCR product를 agarose gel electrophoresis를 통해 확인하였다. 염기분석 결과 이들 유전자는 4,377 bp의 open reading frame (ORF)로 1,458개의 아미노산을 coding 하고 있음을 확인할 수 있었다. 결과적으로 WeDS의 크기는 160 kDa, 이론적인 pI 값은 4.78로 계산되었다.

*weds* gene을 대장균에서 발현하기 위해 pET-21(a)+ vector를 발현 벡터로 사용하여

pET-WeDS를 제작하였다. WeDS는 IPTG 유도발현을 통해 효율적으로 발현되었다. 250 mL culture broth에서 생성된 WeDS를 100 mM sucrose를 기질과 반응했을 때 그 활성은 3.0 U으로 측정되었다. 정제된 단백질의 활성은, 정제된 단백질은 10% SDS-PAGE를 통해 확인하였고 그 결과 아미노산 서열에서 계산된 분자량과 일치하는 약 150 kDa 부근의 위치에서 순수 분리된 WeDS 효소의 band를 확인할 수 있었다(Fig. 16).

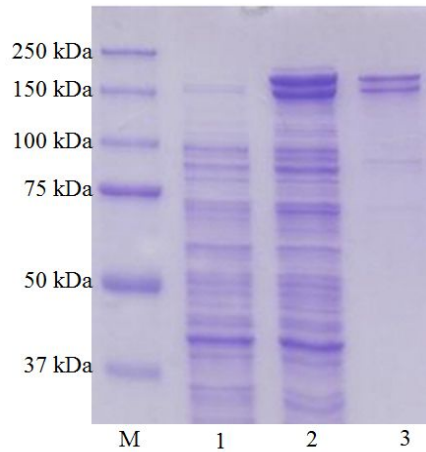


Fig. 16 SDS-PAGE analysis of expression and purification of pET-WeDS using affinity chromatography.

DSase는 약 160 kDa의 고분자량의 효소로서, 일반적으로 대장균 등의 host에서 단백질 발현도가 매우 낮은 것이 문제점으로 대두되고 있다. 기존의 발현연구를 분석한 결과, 강력한 T7 RNA polymerase promoter를 사용하는 pET vector 시스템의 경우 저온발현을 통해 목적 유전자의 발현도가 증가된 보고가 있으며, 본 연구에서도 발현조건에 따른 생산성 향상을 기대하며 15°C에서 저온발현을 시도하였다. 또한 16°C에서 18 시간 동안 반응한 기존의 연구 결과를 토대로 8 시간에서 16 시간 범위 내에서 2 시간 단위로 효소 발현 및 활성을 측정하였는데 그 결과 배양 14 시간 후에 가장 높은 활성을 나타내었고, 이후에는 급격히 활성이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 17).

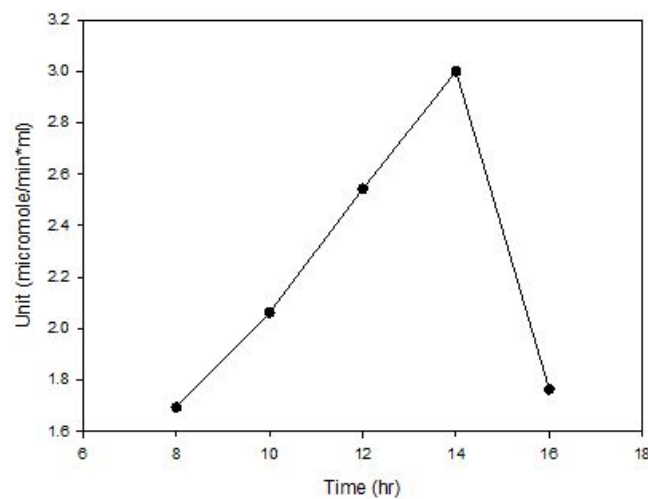


Fig. 17 Time profile of WeDS expression in *E. coli* BL21(DE3)Star.

정제된 WeDS 효소의 최적 반응조건을 확인하기 위해 환원당 측정법(DNS method)으로 효소활성을 측정하였다(Figure 18). 우선 WeDS의 최적온도를 확인하고자 다양한 온도(20, 25, 30, 35, 40, 45°C)에서 활성을 측정하였으며 이 때 1 mM CaCl<sub>2</sub>를 포함한 40 mM sodium acetate buffer 사용하였다. 재조합 WeDS는 35°C에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 최적 pH 및 buffer를 결정하기 위하여 1 mM CaCl<sub>2</sub>를 포함한 100 mM의 sodium acetate (pH 4.0~5.0), sodium citrate (pH 5.0~6.0), sodium phosphate (pH 6.0~7.0), tris-HCl (pH 7.0~9.0), glycine-NaOH (pH 9.0~10.0)를 사용하여 35°C에서 반응하였으며 그 결과 sodium citrate (pH 5.0)을 사용했을 때 가장 높은 활성이 측정되었다. 이는 기존에 일반적으로 사용되고 있는 *L. mesenteroides* 유래 DSase의 반응 최적 pH와 유사한 값이다. 또한 *Weissella cibaria* KSD-914에서 유래한 DSase의 최적 pH, buffer 및 반응 온도가 각각 pH 5.2, sodium acetate, 30°C인 기존 연구 자료를 고려했을 때 약간의 차이가 있는 것으로 나타났다. 재조합 WeDS는 pH 값은 유사하나 사용된 최적 buffer가 다르며 최적 반응 온도는 기존에 조사된 *W. cibaria* KSD-914 유래 DSase보다 5°C 높았다.

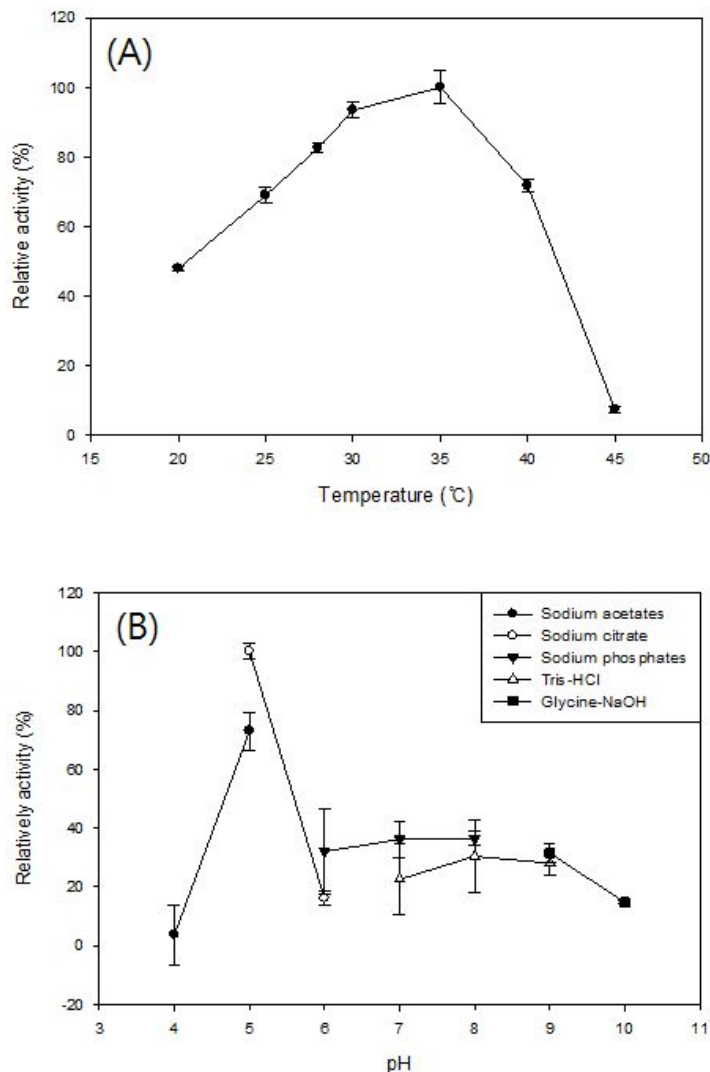


Fig. 18 Optimum temperature (a) and pH (b) of purified WeDS.

온도변화에 따른 효소 안정성을 확인하고자 WeDS를 30°C, 35°C, 40°C, 45°C에서 각각 방치 하면서 10분 간격으로 sampling한 후, 최적 반응조건에서 잔존 활성을 측정하였다. 그 결과 35°C 이상에서는 WeDS의 열 안정성이 크게 감소함을 알 수 있었다(Fig. 19). 특히 40°C 이상에서는 10분 이후 활성이 나타나지 않아 좀 더 정확한 효소 활성 변화패턴을 알아보기 위해 10초 간격으로 재측정을 시도하였다. 그 결과 WeDS는 35°C에서 반응 시 가장 큰 활성을 나타내었으나 30°C 이상의 열은 효소 활성에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 35°C에서의 WeDS의 열안정도를 측정하였을 때 half life는 18.64 min으로 나타났으며 40°C 이상의 온도에서 효소의 활성이 급속히 떨어졌다. 결과적으로 WeDS는 내열성이 매우 낮아 저장 온도에 크게 영향을 받으며 30°C 보다 높은 온도에서는 활성이 점차 감소하는 것으로 나타났다.

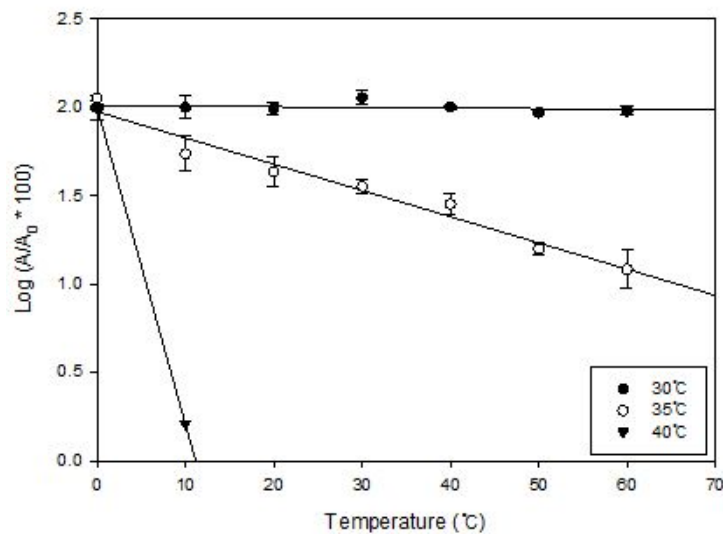


Fig. 19. Thermal stability of purified WeDS was performed at 30°C, 35°C, and 40°C

WeDS의 반응산물을 알아보기 위해 TLC 분석을 수행하였다. DSase는 가수분해, 중합반응, 수용체 반응의 3가지 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, WeDS는 sucrose를 완전히 분해 한 후 중합반응에 의해 dextran을 합성하는데, 이는 TLC 분석 결과로 확인할 수 있었다. 또한 육안으로는 반응이 진행됨에 따라 반응액의 점성이 증가하면서 dextran이 형성되는 것을 확인할 수 있었다. Dextran이 형성되기 시작한 후부터 TLC plate 시작점에서 진하게 나타나는 spot이 관찰되는데 이것이 dextran이라고 추측할 수 있으며 효소반응의 부산물로서 fructose가 생성됨을 관찰할 수 있었다. 시간에 따른 dextran의 생성량을 비교해보면 3시간 반응 이후부터 6, 12, 24시간 반응 했을 때와 큰 차이가 보이지 않았다. Sucrose의 농도를 높여 실험을 했을 때에도 같은 결과가 나왔으며 이는 WeDS의 내열성이 낮다는 특성에 근거하여 효소의 활성이 일정 시간 이상 지속되지 않는다고 추측할 수 있었다(Fig. 20).

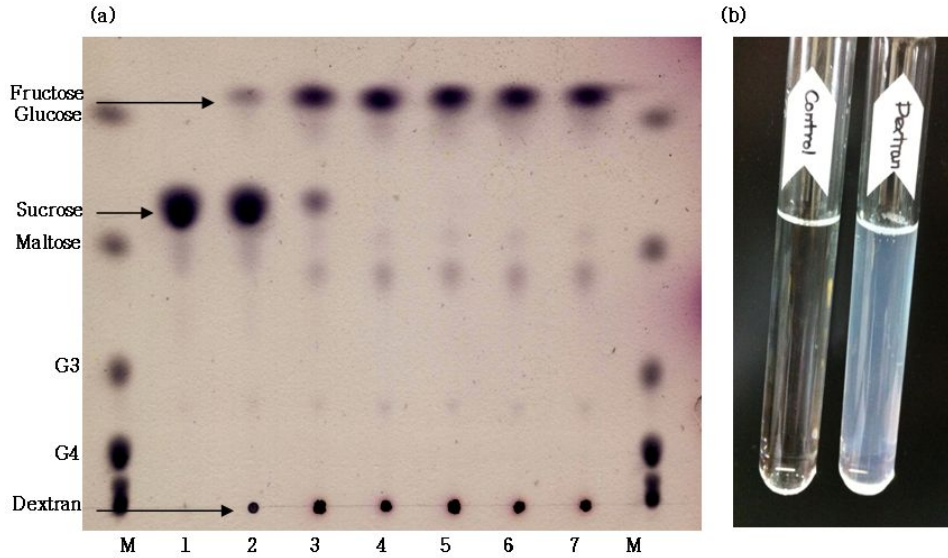


Fig. 20 TLC analysis of WeDS reaction product.

당전이 활성이 존재하는 dextransucrase[24] 효소를 가지고 있는 *Weissella cibaria* KSD-914를 이용하여 막걸리 제조에 이용한다면, 막걸리 발효에 발생하는 당을 이용하여 막걸리 발효 중 isomaltooligosaccharide의 합성할 가능할 것이다. Isomaltooligosaccharide는 유산균의 증식을 도와주는 prebiotic으로써 이것은 probiotic와 prebiotic을 동시에 존재하는 기능성 막걸리 막걸리이다. *Weissella cibaria* KSD-914 유래 DSase 효소의 특성에 관한 연구는 prebiotic가 함유된 유산균 막걸리를 제조할 때 유용하게 사용될 수 있는 기초연구 자료임이 틀림이 없을 것이다.

#### 라. *Weissella cibaria* KSD-914 whole genomic sequence

막걸리에서 분리된 *Weissella cibaria* KSD-914의 전체염기서열을 분석하기 위하여 50 ml의 배양한 균체로부터 genomic DNA를 추출하였다. 전체염기서열의 서열분석은 Macrogen의 454-Pyrosequencing 기법을 사용하였다. 전체 *Weissella cibaria* KSD-914의 genome 크기는 약 2.39 Mb의 크기로 GC content는 45.1%로 확인되었다. 이는 기존에 보고된 *Weissella* sp.의 genome 중에 크기가 크다고 알려진 *Weissella confusa* (2.28 Mb) 나 *Weissella cibaria* (2.41 Mb) 보다 더 큰 genomic DNA를 가지고 있어 다른 *Weissella* 균주들에 비해 다양한 유전자를 추가적으로 더 보유하고 있을 것이라 예상된다. 또한 genomic DNA 이외에도 *Weissella cibaria* KSD-914는 약 5.1 kb 과 30 kb 의 두 종류의 plasmid를 가지고 있는 것 또한 확인할 수 있었다(Fig 21).



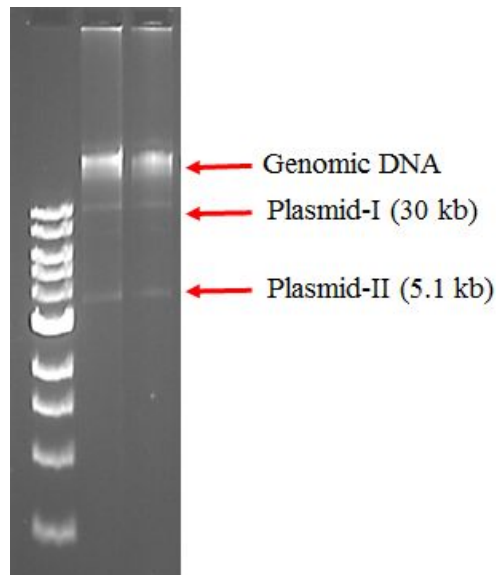


Fig 21. Genomic DNA in *Weissella cibaria* KSD-914

현재 *Weissella cibaria* KSD-914의 genome DNA는 분석 중에 있으며 최초의 12 조각으로 이루어진 genomic DNA scaffolds 는 PCR을 이용하여 gap filling을 진행한 결과 현재 720,873 bp (Scaffolds A), 1,593,552 bp (Scaffolds B), 77,698 bp (Scaffolds C) 이렇게 3개의 scaffolds 로 연결을 완료하였다. Genome 염기서열의 유사성을 확인하기 위하여 전체염기서열을 BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 분석을 통하여 확인해본 결과 각각의 Scaffold 들은 기존에 보고된 바 있는 여러 균주들 중 *Weissella thailandensis* fsh4-2, *Weissella koreensis* KACC 15510와 가장 가까운 유연관계가 있는 것으로 분석이 되었다(Table 7).

Table 7. Homology analysis of genome in *Weissella cibaria* KSD-914

Scaffold	Length	Strains	Identity
Scaffold-A	720,873 bp	<i>Weissella thailandensis</i> fsh4-2	7%
		<i>Weissella koreensis</i> KACC 15510	7%
		<i>Pediococcus clausenii</i> ATCC BAA-344	2%
Scaffold-B	1,593,552 bp	<i>Weissella koreensis</i> KACC 15510	4%
		<i>Pediococcus clausenii</i> ATCC BAA-344	2%
Scaffold-C	77,698 bp	<i>Weissella thailandensis</i> fsh4-2	11%
		<i>Weissella koreensis</i> KACC 15510	4%
		<i>Lactobacillus salivarius</i> CECT 5713	1%

하지만 10% 미만의 상동성으로 보아 기존의 보고된 *Weissella* sp.균주들과는 염기서열의 유사도가 매우 낮았다. 대부분의 동일 species 내에 존재하는 균주들 간의 상동성이 50~90% 정도로 나타난다는 점에서 볼 때 *Weissella cibaria* KSD-914의 경우는 genome 염기서열이 다른 *Weissella* 와는 많이 다르다는 것을 알 수가 있다. *Weissella cibaria* KSD-914 내에 존재하는 유전자와 metabolic pathway를 분석하기 위하여 바이오인포매틱스 프로그램인 Glimmer 3.0,

FgenesB, GeneMarkS를 이용하여 유전자 여부를 예측을 하였으며 그 결과 이 균주 내에 약 2,380여개의 유전자가 존재할 것으로 예상이 되었다. 또한 이를 기반으로 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 데이터베이스를 기반으로 하여 Metabolic pathway를 분석한 결과 전형적인 heterofermentative 균주처럼 *Weissella cibaria* KSD-914 안에는 glucose로부터 lactic acid, acetic acid 등을 포함하여 여러 유기산을 생성하는 pathway가 존재하였다. 특히 D-form 및 L-form lactic acid를 생성하는 유전자가 다수 존재하여 pyruvate로부터 두 가지 form의 lactic acid를 생성할 수 있을 것이라 예측된다.

### 3. 생막걸리 유래 유산균의 probiotic 확인

#### 가. 생막걸리 유래 유산균의 면역증강효과

최근에는 대식세포의 활성화를 통한 면역 증강 작용 작용이 유산균의 중요한 기능으로 주목 받고 있다. 특히 대식세포는 숙주의 면역반응에 있어서 중요한 작용을 하는 세포로서 nitric oxide(NO)와 같은 신호전달을 매개하는 펩타이드를 분비하여 숙주의 면역을 효율적으로 조절할 수 있다. 이에 기능성 막걸리 제조가 가능한 생막걸리 유래 *Lactobacillus brevis*, *Weissella* sp. KSD1와 새로 막걸리에서 분리된 *Pediococcus acidilactici* K5와 *Pediococcus pentosaceus* K5를 이용하여 면역 증강여부를 확인하였다(Fig. 22).

Nitric oxide production 활성을 평가하기 위해서 macrophage인 RAW 264.7 cell을 사용하여 NO assay를 수행하였다. RAW 264.7( $1 \times 10^5$  cells)을 96well에 세포배양 plating하고 10~12 시간 배양한 후 과밀도로 자란 세포들에 fetal bovine serum(FBS)가 포함된 배지를 첨가하고 *Pediococcus acidilactici* K5, *Pediococcus pentosaceus* K5를 원하는 농도별로 처리하였다. 24시간 배양 후, 배지를 수집하여 Griess reaction을 유도하였다. 이 후 spectrometer를 이용해 540nm 파장에서 흡광도를 얻어 내어 nitric oxide의 양을 정량하였다

NO production (Tukey HSD)

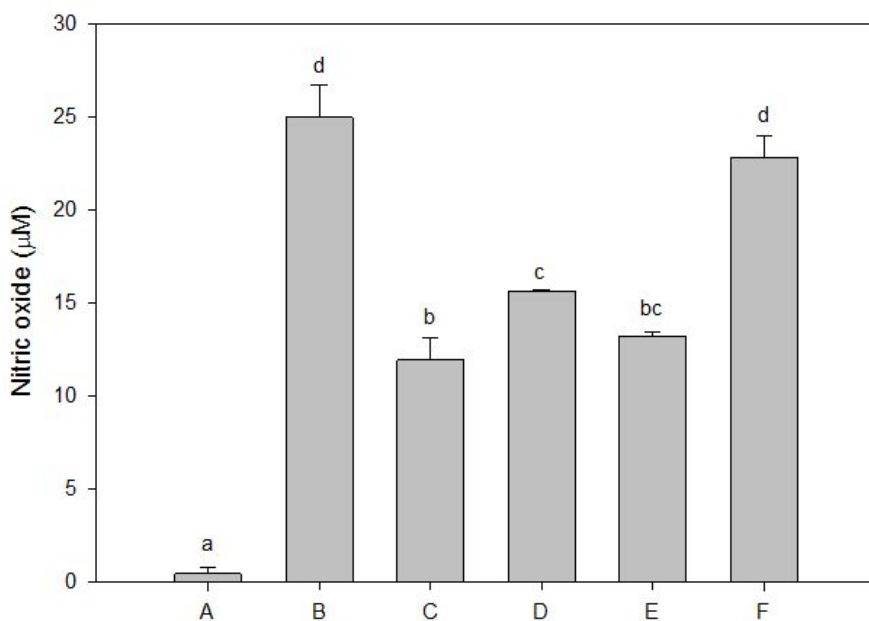


Fig 22. 생막걸리 유래 유산균에 의한 대식세포의 NO production. (A):Negative control (B):peptidoglycan, (C):*Lactobacillus brevis*, (D):*Weissella cibaria*, (E):*Pediococcus acidilactici*

K5, (F):*Pediococcus pentosaseus*

NO는 Lipopolysaccharide(LPS), lymphokines, interferin과 같은 물질에 의해 생성되는데, 이 중에서 LPS는 그람음성세균 표층의 외막구성성분인데, 본 실험에서 사용한 시험균은 모두 그람양성세균이므로 positive control로서 peptidoglycan을 설정하였다.

모든 유산균들은 NO를 생성하였으며, 이는 유산균에 의해 면역에 관련있는 대식세포가 활성화가 되었음을 의미한다. 모든 측정결과는 ANOVA test로 통계 처리하였다. 측정결과 *Pediococcus pentosaseus*가 가장 높은 NO 생성량( $22.81 \pm 1.17 \mu\text{M}$ )을 나타내었고 이는 positive control인 peptidoglycan과 유의적 차이가 나타나지 않았다. *Weissella* sp. KSD1은  $15.67 \pm 0.05 \mu\text{M}$ 을 생성하였다. *Pediococcus acidilactici* K5의 경우도 *Pediococcus pentosaseus*에 비해서는 낮은 농도의 NO가 생성 ( $13.24 \pm 0.24 \mu\text{M}$ ) 되었지만 *Lactobacillus brevis*보다 ( $11.93 \pm 1.17 \mu\text{M}$ ) 높은 NO를 생성하였다[25].

나. 생막걸리 유래 유산균의 내산성 및 내담즙성

유산균이 probiotics로서 효과를 가질 수 있도록 하기 위해서는 다양한 조건이 충족되어야 하는데 가장 중요한 것은 유산균이 식품과 함께 우리 몸에 섭취되어 위에 도달하였을 때 위산과 같은 낮은 pH에 살아남아야 하고, 십이지장에 도달하였을 때는 담즙산에도 노출되기 때문에 이에 높은 내성을 가져야 한다. 이에 선택된 4가지의 유산균의 내산성을 확인하였다. 이때 probiotic로 공인된 *Lactobacillus rhamnosus* GG를 control 균주로 이용하였다.

내산성 실험은 균체만을 회수 후, 2회 세척하고 1ml PBS buffer(pH 7.2)로 다시 균체를 풀어준 후 시험관에  $100 \mu\text{l}$ 을 분주한다. 여기에 각각 pH 2.5와 pH 3.0 PBS buffer 2ml씩 넣어주고 잘 섞어준다. 30°C 배양기에서 4시간 동안 배양 후 감소한 균수를 확인하였다.

Table 8. 생막걸리 유래 유산균의 내산성

pH 2.5 (acid tolerant)	Viable bacteria ( $\log_{10}$ CFU $\text{ml}^{-1}$ )		
	0 hr	4 hr	Log reduction
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	$1.52 \times 10^9$	$1.13 \times 10^7$	2.13
<i>Lactobacillus brevis</i>	$6.90 \times 10^7$	$3.52 \times 10^2$	5.29
<i>Weissella cibaria</i> KSD-914	$3.22 \times 10^7$	-	7.51
<i>Pediococcus acidilacti</i>	$1.11 \times 10^9$	$7.50 \times 10^6$	2.17
<i>Pediococcus pentosaceus</i> K5	$2.06 \times 10^9$	$1.58 \times 10^6$	3.12

*Lactobacillus brevis*와 *Weissella cibaria* KSD-914 두 균주는 pH 2.5인 산성조건에서 4시간 방치 하였을 때, 급격히 균수가 감소했음을 알 수 가 있었다. 이에 반해 *Pediococcus acidilactici*와 *Pediococcus pentosaceus* K5는 같은 산성조건에서 균주의 감소폭이 크지가 않았다. 특히 *Pediococcus acidilactici* K5는 probiotic로 알려진 *Lactobacillus rhamnosus* GG와 산성조건에서 유사한 균주 감소폭이 나타났다[26]. 이것으로 보아 *Pediococcus* 두 균주가

probiotic로서의 역할을 할 수 있다고 사료된다. 이에 두 균주의 내담증성을 확인하였다(Table 9).

내담증성은 배양한 균을 0.3% Oxgall (Sigma Co.)을 첨가하여 pH 8.0로 조정 한 MRS에 접종한 후 30℃에서 4시간 배양한 다음 표준한천평판배양법으로 잔존하는 균수를 측정한다.

Table 9. 생막걸리 유래 내산성 유산균의 내담증성

pH 8.0 (bile salt)	Viable bacteria (log10 CFU ml <sup>-1</sup> )			
	0 hr	4 hr	Log reduction	The ratio of survival (%)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	1.20 × 10 <sup>9</sup>	2.32 × 10 <sup>9</sup>	-0.28	195.53
<i>Pediococcus acidilactici</i> K5	4.08 × 10 <sup>10</sup>	6.33 × 10 <sup>10</sup>	-0.19	154.97
<i>Pediococcus pentosaceus</i> K5	5.58 × 10 <sup>10</sup>	7.51 × 10 <sup>10</sup>	-0.13	134.57

Probiotic인 *Lactobacillus rhamnosus* GG의 경우 내담증성에서 균주의 감소가 나타나지 않았고, 오히려 균주가 증가했음을 알 수 가 있었다. 또한 내산성을 가지고 있는 *Pediococcus acidilactici* K5와 *Pediococcus pentosaceus* K5도 균주가 감소하지 않고, 증가하는 것으로 보아 산성이 잘 버티는 *Pediococcus* 두 균주 모두 내담증성도 뛰어나다는 것을 알 수가 있었다.

#### 다. 생막걸리 유래 유산균의 장 부착성

유산균이 장에 도착하여 증식하려면 장내의 세포에 우월하게 부착되어야 한다. 다양한 식품과 동물에서 분리한 유산균의 내산성과 내담증성에 관한 연구는 오래 전부터 보고된바, 유산균이 장에 부착되는 정도를 판단할 수 있는 장 부착성에 관한 연구는 기존에 Caco-2 cells을 모델로 하여 진행되어왔다. 한국 전통 식품인 김치에서 발견되는 유산균을 분리하는 연구에서도 유산균의 내산성과 내담증성, Caco-2 cells 부착능, 항균성 등을 토대로 유산균을 동정하고 있으며 우수한 probiotics로서 작용한다고 밝히고 있다. 이에 내산성과 내담증성이 뛰어난 *Pediococcus acidilactici* K5와 *Pediococcus pentosaceus* K5의 장 부착성을 확인하였다(Fig. 22, Table 10).

Caco-2 cells에 대한 부착능 시험은 시험균으로 *Pediococcus acidilactici* K5, *Pediococcus pentosaceus* K5를 사용하였다. Caco-2 cell monolayer는 Caco-2 cells 를 10% fetal calf serum과 20 μl/ml의 genamicin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)에 1.2X10<sup>5</sup>cells/ml 농도로 접종하고 six-well tissue culture plate(Becton, Dickinson and Company, USA) well 당 1ml 분주하여 7일간 배양한 후, Phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)으로 2회 세척하여 제조하였다. 시험균 시료는 각각 MRS 10 ml를 원심분리하여 균체를 회수하고 PBS buffer로 2회 세척한 다음 1ml PBS에 재현탁하고 DMEM에 1X10<sup>8</sup> cfu/ml농도로 희석하여 조제하였다. 모든 반응은 37℃, 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 실시하였으며 시험균은 MRS 평판배지에서 생균수를 측정하였다. 각각에 대한 부착율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Caco-2 cells 부착율(\%)} = (\text{부착균수} / \text{초기 처리균수}) \times 100$$

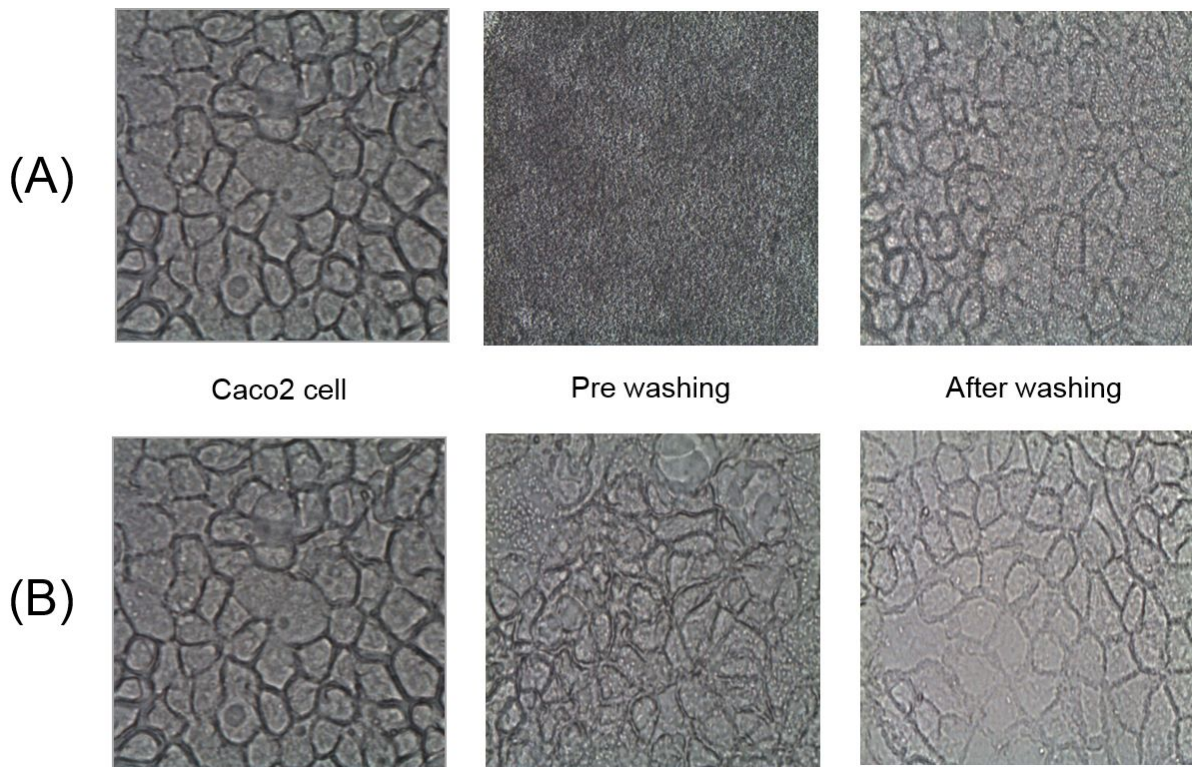


Fig. 23. Adhesion to Caco-2 cell. (A) : *Pediococcus acidilactici* K5 (B) : *Pediococcus pentosaceus* K5

Table 10. Caco-2 cell을 이용한 장 부착능.

Bacteria strain	Viable bacteria(log10 CFU ml-1)		
	The number of initial bacteria	The number of total attached bacteria	Adhesion rate(%)
<i>Pediococcus acidilactici</i> K5	$9.60 \times 10^8$	$1.83 \times 10^8$	19.0
		$4.25 \times 10^8$	43.4
<i>Pediococcus pentosaceus</i> K5	$2.70 \times 10^8$	$4.70 \times 10^6$	1.7
		$3.02 \times 10^7$	8.8

*Pediococcus acidilactici* K5 와 *Pediococcus pentosaceus* K5는 각각 19~44%, 1.7~8.8%의 부착율을 보였다. 기존의 유산균의 장 부착성은 2.6~14.4%로 알려져 있다. *Pediococcus acidilactici* K5의 경우 기존에 알려져 있던 유산균보다 평균적으로 높은 장 부착율을 나타내고 있다. 따라서 *Pediococcus acidilactici* K5은 내산성과 내담즙성뿐만 아니라 장 부착성이 뛰어나 probiotics로 상당히 우수한 조건을 충족시키고 있었고 *Pediococcus pentosaceus* K5는 *Pediococcus acidilactici* K5에 비해서는 상대적으로 낮은 장 부착율을 보이지만, 면역증강 효과가 뛰어나고 기존의 알려진 유산균의 장 부착성과 유사하면, 내산성과 내담즙성이 뛰어나기 때문에 이 또한 probiotic로 훌륭한 유산균이라고 할 수 있다[27,28].

### 제 3 절

#### 제2협동과제 : 막걸리의 생리 기능성 규명/확립 - 성균관대학교 홍성렬

##### 1. 시중 유통 막걸리의 생리 기능활성 평가 (항암 및 비만 저해 활성)

###### 가. 혈관 생성 억제 활성

막걸리 동결건조물의 혈관 생성 억제 활성을 확인하기 위해 CAM assay를 수행하였다. (Table 1 & Figure 4). 사용한 막걸리는 서울과 경기도에서 유통되고 있는 제품이며, 살균막걸리와 살균하지 않은 비살균막걸리 등 13종을 하나로 마트에서 구매하여 사용하였다. 각 막걸리 700 mL을 균일하게 섞어서 동결건조물을 제조하여 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다. 수정된 유정란의 표면을 70% 에탄올로 닦아준 후 37°C에서 배양하였다. 3.5일 후 유정란의 알부민을 3mL 추출한 후 window를 내고 4.5일이 되는 날 시료를 농도별로 chorioallantoic membrane (CAM)에 처리하였다. 6.5일째, 유정란의 CAM에 intralipose를 채워 맥관 형성을 관찰하였다.

시제품 막걸리 B, C, D, F, I, J의 동결건조물 처리에 의해 50% 이상 혈관신생을 억제하였으며, 특히 막걸리 B, C, I, J는 양성 대조군인 retinoic acid와 동등 이상의 효과를 관찰하였다. 정상적인 CAM에 형성되는 혈관들의 밀도가 감소하여, 이로 인해 형성되는 무혈관 지역이 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 막걸리 동결건조물이 생체 내에서의 혈관신생에 강하게 억제한다는 점을 시사한다.

Table 1. Effects of Makgeolli on angiogenic activity

Makgeolli	Final concentration	No. of viable eggs	No. of positive eggs	% Relatively inhibitory activity <sup>1)</sup>
DMSO	1 $\mu$ l	10/10	0	0
Retinoic acid	1 $\mu$ M	11/11	7	63.6
A	50 $\mu$ g	8/11	3	37.5
B	50 $\mu$ g	10/12	8	80.0
C	50 $\mu$ g	9/11	6	66.7
D	50 $\mu$ g	10/12	6	60.0
E	50 $\mu$ g	10/11	4	40.0
F	50 $\mu$ g	8/9	4	50.0
G	50 $\mu$ g	11/11	4	36.4
H	50 $\mu$ g	11/12	4	45.5
I	50 $\mu$ g	12/12	8	66.7
J	50 $\mu$ g	10/10	7	70.0
K	50 $\mu$ g	10/10	4	40.0
L	50 $\mu$ g	9/10	4	44.4
M	50 $\mu$ g	8/10	3	37.5

Each assay employed about 9 - 12 eggs per sample. Relative activity (%) = (number of positive eggs/number of viable eggs)  $\times$  100%

## 나. 비만 저해 활성화

전구 지방세포(preadipocyte)에서 지방세포(adipocyte)로의 분화는 성장과정 중 특정 호르몬의 급작스러운 양적 변화와 과잉 영양공급에 의해 유발될 수 있다. 지방세포의 크기는 한계가 있으므로 과잉 영양공급이 될 때, 에너지를 신속히 저장하기 위하여 지방세포수의 증가가 일어나게 된다. 본 연구는 막걸리 동결건조물의 처리가 미분화 상태 전구 지방세포인 3T3-L1 세포의 지방세포로 분화에 미치는 영향을 평가한 결과, 모든 막걸리에서 지방세포 분화 저해활성을 나타내었다(Table 3). 대조군에 비해 막걸리 A 등 11개 제품의 막걸리 100 µg/mL에서 40-70% 저해하였고, 50 µg/mL에서 10-50% 정도의 저해 활성을 보여 막걸리는 지방세포의 분화 지표로 사용되는 lipid droplet의 형성을 저해하는 것을 통해 지방세포 분화를 저해하는 것을 확인할 수 있었다(Table 2).

Table 2. Effects of Makgeolli on adipocyte differentiation analyzed by Oil red O staining and extraction method

Makgeolli	Percentage of Differentiation Rate <sup>1)</sup>		
	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Positive control	100		
A	106.71±4.10	99.89±5.58	52.27±7.37**
B	97.32±2.84	86.0±6.49	40.08±4.67**
C	96.71±1.92	72.32±4.63**	43.80±6.78**
D	100.86±0.64	83.65±4.22	55.46±2.39**
E	85.38±6.06*	61.13±7.42**	43.36±6.68**
F	109.06±5.31	99.18±8.53	67.40±8.29**
G	107.45±3.91	93.44±1.77	48.09±6.79**
H	93.78±7.54	72.99±6.11**	51.64±6.52**
I	83.16±8.57**	55.83±9.49**	33.86±0.72**
J	75.22±4.61**	51.95±5.27**	36.13±7.74**
K	109.63±2.35	94.47±4.71	59.52±11.33**
L	104.98±3.17	91.92±7.29	80.32±6.71**
M	81.14±5.81**	64.15±6.91**	38.45±4.75**

<sup>1)</sup>Percentage of Differentiation Rate: relative percentage of positive control

<sup>2)</sup>Each value represents the mean±SD, n=3, \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, significantly different from the control value.

## 2. 막걸리 메탄올 추출물

### 가. 항암활성

#### (1) 암 전이 억제 활성 탐색

하나의 장기에서 발생한 악성 종양은 시간이 지남에 따라 순환계를 통해 원발 부위로부터 다른 조직으로 퍼져나간다. 이렇게 종양이 처음 발생한 조직으로부터 다른 조직으로 퍼져나가 증식하는 것을 전이 (metastasis)라고 한다. 또한 metalloproteinase-9 (MMP-9)은 암의 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어져 왔다. 따라서 암 전이 억제 활성을 평가하기 위해 종양의 이동성 (cell motility) 와 MMP-9의 발현, 활성 저해 효과를 확인하였다.

(가) 암세포 이동성 억제 활성 탐색

암 전이 억제 활성을 평가하기 위해서 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231이 사용하여 wound healing assay를 수행하였다(Figure 1). 암 세포주 ( $2 \times 10^5$  cells/mL)를 24-well 세포배양 플레이트 seeding하고 10~12 시간 배양 후, 과밀도로 자란 세포들을 yellow-tip을 사용하여 세포 표면에 wound를 만들고 PBS로 2번, 무혈청 배지로 한번 세척하였다. FBS가 포함된 배지를 첨가하고 막걸리 80% 메탄올 추출물(80MME)을 원하는 농도별로 처리한다. 24시간 배양 후 현미경으로 각 세포들의 전이현상을 4% paraformaldehyde로 고정시킨 후 관찰하였다.

인간 유래 유방암 세포주인 MDA-MB-231에서 막걸리 80% 메탄올 추출물(80MME)은 농도 의존적인 암 이동성 억제 활성을 나타내었다.

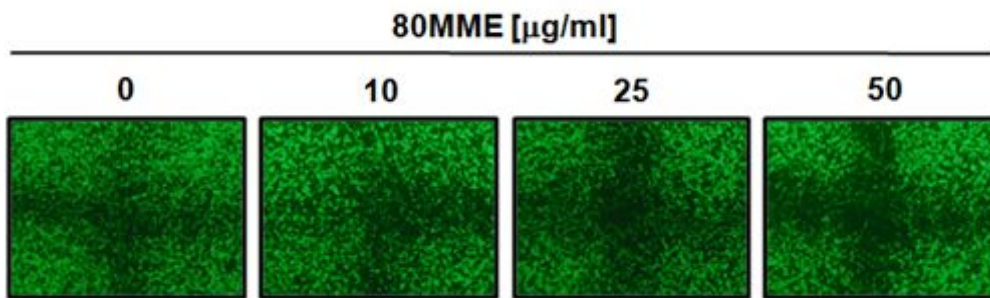


Figure 1. Anti-metastatic activities of the makgeolli 80% methanol extract on the human breast cancer cell line, MDA-MB-231

(나) 암세포 침투성 억제 활성

종양 침투성 억제 활성을 평가하기 위해서 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231이 사용하여 invasion assay를 수행하였다(Figure 2). 우선 안쪽 벽을 matrigel로 코팅한 insert에 암 세포주 ( $5 \times 10^4$  cells)를 seeding하고 10~12 시간 배양한 후 FBS가 포함되지 않은 배지를 첨가하고 막걸리 80% 메탄올 추출물(80MME)을 원하는 농도별로 처리하였다. 이 때 chemoattractant로 10% FBS를 사용하였다. 24시간 배양 후 윗면의 세포는 cotton swab으로 제거하였고 4% paraformaldehyde으로 고정, hematoxylin-eosin으로 염색한 후 invasive cell을 관찰하였다.

인간 유래 유방암 세포주인 MDA-MB-231에서 막걸리 80% 메탄올 추출물(80MME)은 농도 의존적으로 암 침투성 억제 활성을 나타내었다.

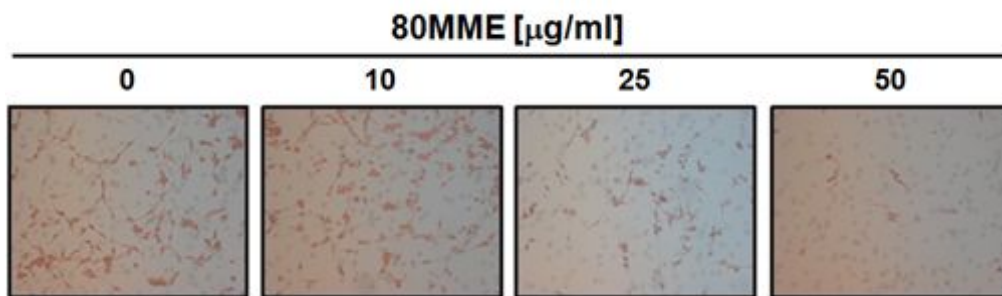


Figure 2. Anti-invasive activities of the makgeolli 80% methanol extract(80MME) on the human breast cancer cell line, MDA-MB-231



(다) MMP 억제 활성

막걸리 80% 메탄올 추출물의 MMP 활성 효과를 평가하기 위해 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231을 사용하여 zymography를 수행하였다(Figure 3-1). 암 세포주 ( $2 \times 10^6$  cells/mL)를  $100 \times 20$ mm 세포배양 플레이트 seeding하고 10~12 시간 배양 후, 과밀도로 자란 세포들에 FBS가 포함된 배지를 첨가하고 막걸리 80% 메탄올 추출물(80MME)을 원하는 농도 별로 처리하였다. 24시간 배양 후, 배지를 수집하여 농축하여 acrylamide gel에 전기영동하였다. 이 후 37°C에서 18시간동안 developing 후, Coomassie brilliant blue로 염색한 뒤 탈색하였다.

인간 유래 유방암 세포주인 MDA-MB-231에서 막걸리 80% 메탄올 추출물(80MME)은 농도 의존적으로 MMP-9의 활성을 억제하였다.

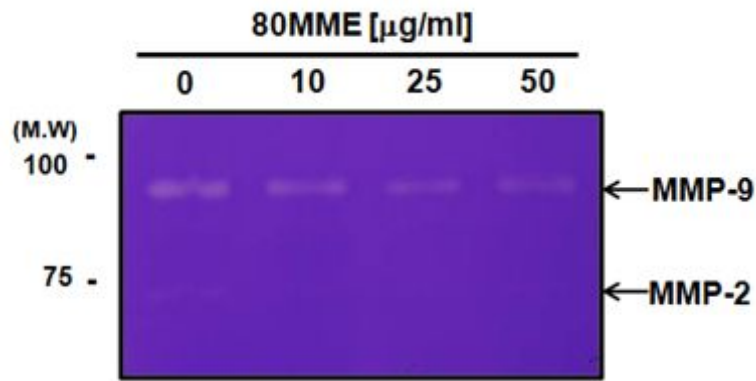


Figure 3-1. Decrease of MMP-9 activities from the human breast cancer cell line, MDA-MB-231 by the makgeolli 80% methanol extract

MMP-9과 MMP-2의 분비 억제 효과를 평가하기 위해 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231이 사용하여 western blotting을 수행하였다(Figure 3-2). 암 세포주 ( $2 \times 10^6$  cells/ml)를  $100 \times 20$ mm 세포배양 플레이트 seeding하고 10~12 시간 배양 후, 과밀도로 자란 세포들에 FBS가 포함된 배지를 첨가하고 막걸리 80% 메탄올 추출물(80MME)을 원하는 농도 별로 처리하였다. 24시간 배양 후, 배지를 수집하여 농축하여 MMP-2와 MMP-9에 대한 blotting을 수행하였다.

인간 유래 유방암 세포주인 MDA-MB-231에서 막걸리 80% 메탄올 추출물(80MME)은 농도 의존적으로 MMP-9의 분비를 억제하였으나 MMP-2의 분비에는 영향을 미치지 않았다.

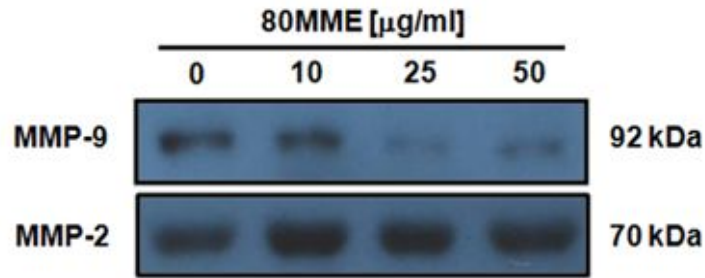


Figure 3-2. Effect of the makgeolli 80% methanol extract on MMP-9 and MMP-2 secretion from the human breast cancer cell line, MDA-MB-231

MMP-9과 MMP-2의 발현 억제 효과를 평가하기 위해 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231이 사용하여 western blotting을 수행하였다(Figure 3-3). 암 세포주 ( $2 \times 10^6$  cells/mL)를  $100 \times 20\text{mm}$  세포배양 플레이트 seeding하고 10~12 시간 배양 후, 과밀도로 자란 세포들에 FBS가 포함된 배지를 첨가하고 막걸리 80% 메탄올 추출물(80MME)을 원하는 농도 별로 처리하였다. 24시간 배양 후, PROPREP을 이용해 lysate를 extract한 후 MMP-2와 MMP-9에 대한 western blotting을 수행하였다. 또한, 80% 메탄올 추출물(80MME) 시간별로 처리하여 FAK, Akt, NF- $\kappa$ B에 대한 western blotting을 수행하였다.

인간 유래 유방암 세포주인 MDA-MB-231에서 막걸리 80% 메탄올 추출물(80MME)을 25mg/mL, 50mg/mL을 처리하였을 때 MMP-9과 MMP-2의 발현이 감소하였다.

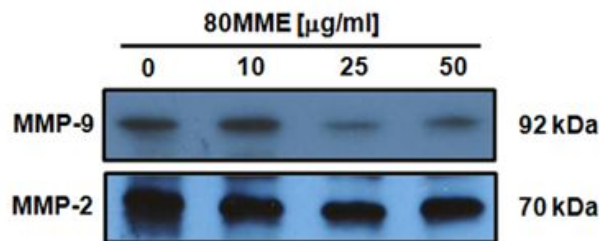


Figure 3-3. Effect of the makgeolli 80% methanol extract on MMP-9 and MMP-2 expression from the human breast cancer cell line, MDA-MB-231

MDA-MB-231에 50mg/mL의 막걸리 80% 메탄올 추출물(80MME)을 시간별로 처리하였을 때, 암세포의 전이에 관여하는 단백질인 FAK이 시간 의존적으로 감소하였고, 특히 120분에서 확연히 감소하였다(Figure 3-4).

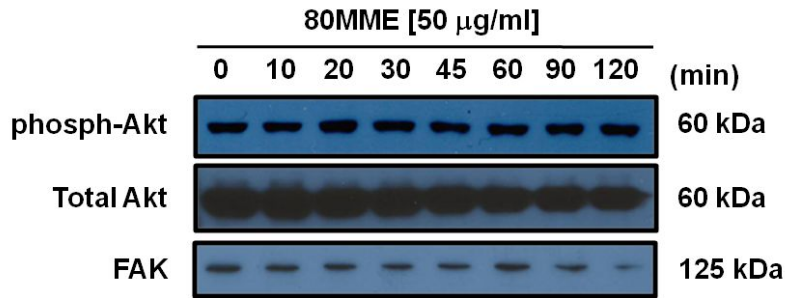


Figure 3-4. Effect of the makgeolli 80% methanol extract on phosph-Akt, total Akt and FAK expression from the human breast cancer cell line, MDA-MB-231

반면, NF-κB는 막걸리 80% 메탄올 추출물(80MME)에 의해 480분에서 증가하였다(Figure 3-5).



Figure 3-5. Effect of the makgeolli 80% methanol extract on NF-κB expression from the human breast cancer cell line, MDA-MB-231

## (2) 혈관 생성 억제 활성

생체 내 혈관신생은 잘 알려진 유정란의 chorioallantoic membrane (CAM) assay를 이용하여 측정하였다. 입란전 유정란을 양성바이오 (Yongin, Korea)에서 구매하여 온도 37°C, 습도 70%의 항온항습기에서 3일 동안 부화시켰다. 유정란의 끝부분에 구멍을 내어 주사기로 알부민을 3-4 mL를 뽑아낸 뒤, 계란의 공기주머니가 있는 쪽을 70% 알코올로 소독한 후 메스를 이용하여 지름 3 cm 크기의 원형창문을 만들었다. 공기주머니 아래에 있는 막은 핀셋으로 제거한 후 유리테이프로 구멍을 막았다. 계속 배양기에서 키워 1.5일 후, 시험물질 1 mL를 Thermanox coverslip (Nunc, Naperville, IL, USA)에 점적하여 2시간 동안 말린 다음, 유정란에 만든 원형창문을 통해 노출된 CAM 위에 얹고 다시 유리테이프로 창문을 막았다. 이를 배양기에서 1일 동안 배양시킨 후 10% fat emulsion (Intralipid, Green Cross, Suwon, Korea)을 CAM막 안쪽에 주입하여 해부현미경으로 혈관신생 효과를 관찰하였다.

Negative control인 0.1% DMSO를 1mL/egg 처리했을 때 60%의 신규 혈관 형성 억제 효과가 나타났고 positive control인 retinoic acid를 1mM/egg 처리했을 때 80% 정도의 억제 효과를 나타냈다. 또한, 막걸리 100% 메탄올 추출물 (100MME)을 50mg/ml/egg 처리하였을 때 retinoic acid와 비슷한 80%정도의 혈관생성억제 활성을 확인하였다. 이는 막걸리 100% 메탄올 추출물 (100MME)이 antiangiogenic 활성이 있음을 시사한다(Figure 4 & Table 3).

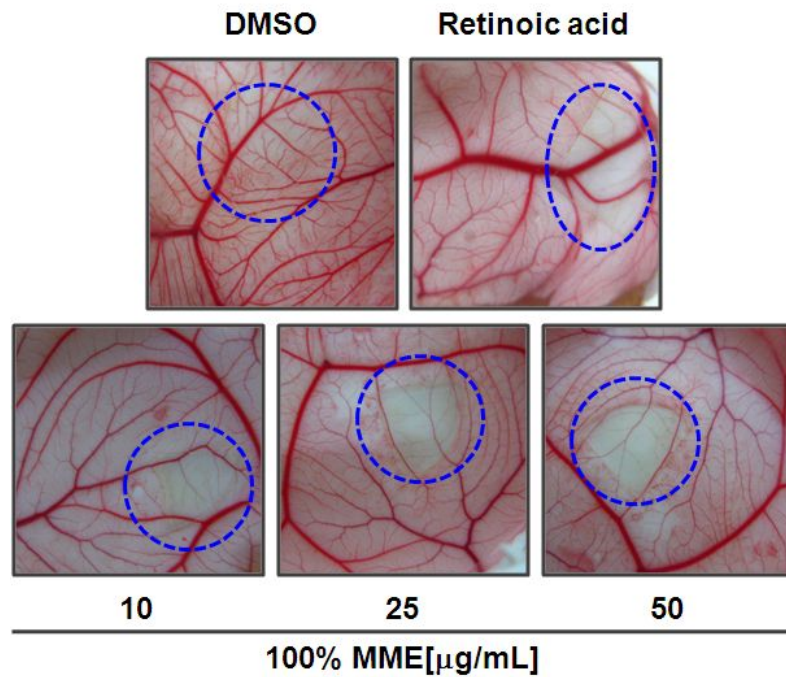


Figure 4. Effect of makgeolli 100% methanol extract on angiogenesis in the CAM assay

Table 3. Anti-angiogenic effect of 100MME

	Final concentration (mg/mL)	Employed eggs	Viable eggs	Positive eggs	% Relatively inhibitory activity <sup>1)</sup>
0.1% DMSO <sup>2)</sup>	1	5	5	3	60
Retinoic acid <sup>3)</sup>	1	5	5	4	80
100MME	10	10	9	3	33
	25	10	3	2	67
	50	10	6	5	83

1) Each assay employed 20 eggs per sample. Relative activity (%) = (number of positive eggs/number of viable eggs) × 100%

2) Unit of 0.1% DMSO: mL

3) Unit of retinoic acid: mM

#### 나. 비만 개선 활성

##### (1) 전지방세포 분화 억제 활성

전지방세포는 분화과정동안 지질생성 (adipogenesis)이 일어난다. 분화된 지방세포는 지방 droplet을 포함하고 있으며 지질생성의 증가는 비만과 연관된다. 전지방세포인 3T3-L1 섬유아 세포를 계대배양과 동일한 방법으로 탈착시켜  $4 \times 10^4$  cells/well의 농도로 48-well plate에 넣은 다음, 완전한 confluent 상태까지 배양하였다. 이로부터, 2일 후에 분화유도 물질인 0.25mM DEX, 0.5 mM IBMX, insulin (10 mg/mL)이 함유된 배지와 시험물질을 함께 처리하여 3일 동안 배양하였다. 여기에 insulin (1 mg/mL)만 포함된 배지를 다시 넣어 2일 동안 배양 후, 2일

에 한번씩 DMEM을 새로 바꾸어 주어 지방세포로 완전히 분화시켰다. 3T3-L1 세포의 분화는 역상현미경으로 관찰하여 세포 내 밝은 색의 작은 지방과립의 형성이 생기는 것으로 확인하였고, 세포의 분화 정도는 Oil red O로 염색하여 측정하였다. Oil red O stock solution (60% triethyl-phosphate 100 mL에 500 mg Oil red O)을 녹여 여과한 후 용액 12 mL을 취하고 여기에 8 mL의 증류수를 첨가하여 실험에 이용하였다. 세포배양 8일 후 분화된 세포를 관찰하기 위해 4% formaldehyde 처리 후 30 시간 동안 고정시켰다. PBS로 두 번 세척하였고 1 mL Oil red O 용액을 처리하여 1시간 동안 암조건에서 염색하였다. 40% isopropanol로 3번 세척하고 100% isopropanol로 추출한 염료액을 모아 microplate reader (Silicon Valley, CA, USA)을 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

전지방세포에 메탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과 농도 의존적인 지질생성의 감소가 나타났다. 특히, 메탄올 추출물을 50, 100mg/mL로 처리한 군에서는 대조군과 비교하여 약 40%의 지질생성의 감소를 보였다(Figure 5).

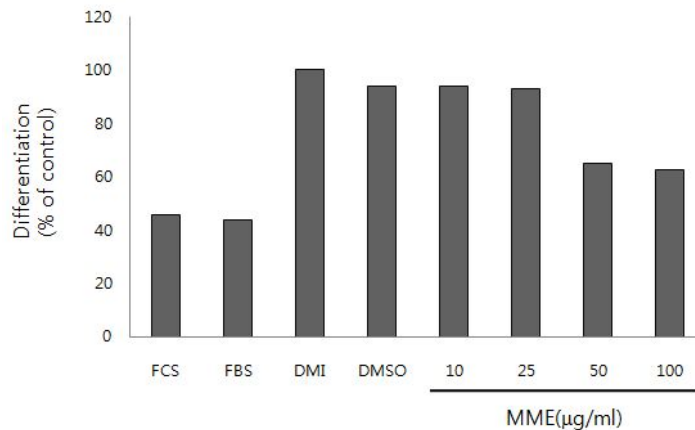


Figure 5. effect of makgeolli 100% methanol extract on adipogenesis

### 3. 시제품1의 생리 기능활성 평가(지질대사 개선 활성)

#### 가. 전지방세포 분화 억제 활성

전지방세포는 분화과정동안 지질생성 (adipogenesis)이 일어난다. 분화된 지방세포는 지방 droplet을 포함하고 있으며 지질생성의 증가는 비만과 연관된다. 전지방세포인 3T3-L1 섬유아 세포를 계대배양과 동일한 방법으로 탈착시켜  $4 \times 10^4$  cells/well의 농도로 48-well plate에 넣은 다음, 완전한 confluent 상태까지 배양하였다. 이로부터, 2일 후에 분화유도 물질인 0.25mM DEX, 0.5 mM IBMX, insulin (10 mg/mL)이 함유된 배지와 시험물질을 함께 처리하여 3일 동안 배양하였다. 여기에 insulin (1 mg/mL)만 포함된 배지를 다시 넣어 2일 동안 배양 후, 2일에 한번씩 DMEM을 새로 바꾸어 주어 지방세포로 완전히 분화시켰다. 3T3-L1 세포의 분화는 역상현미경으로 관찰하여 세포 내 밝은 색의 작은 지방과립의 형성이 생기는 것으로 확인하였고, 세포의 분화 정도는 Oil red O로 염색하여 측정하였다. Oil red O stock solution (60% triethyl-phosphate 100 mL에 500 mg Oil red O)을 녹여 여과한 후 용액 12 mL을 취하고 여기에 8 mL의 증류수를 첨가하여 실험에 이용하였다. 세포배양 8일 후 분화된 세포를 관찰하기

위해 4% formaldehyde 처리 후 30 시간 동안 고정시켰다. PBS로 두 번 세척하였고 1 mL Oil red O 용액을 처리하여 1시간 동안 암조건에서 염색하였다. 40% isopropanol로 3번 세척하고 100% isopropanol로 추출한 염료액을 모아 microplate reader (Silicon Valley, CA, USA)을 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

전지방세포에 시제품 1의 추출물 50µg/ml을 처리 후 대조군과 비교한 결과 지질생성의 감소를 확인 할 수 있었다. 특히, 일반적으로 비만개선을 한다고 알려진 누룩 추출물과 비교하여 시제품의 1의 지질생성의 현저한 감소를 보였다(Figure 6).

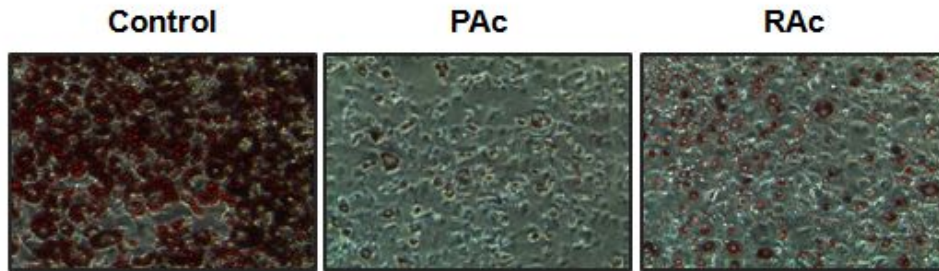


Figure 6. Effects of prototype product 1 extract and Nuruk extract on 3T3-L1 preadipocyte differentiation. (PAc= prototype product 1 extract, RAc = Nuruk extract)

#### 나. 전지방세포 분화 관련된 mRNA의 활성화

비만은 오랜 시간에 걸쳐 영양분을 과다하게 섭취하여 나타나는 것이 일반적이다. 이런 잘못된 식습관은 지질이나 지방의 대사과정에 중요한 역할을 하는 mRNA의 과발현이나 기능장애에 영향을 주기도 한다. 그리하여 지방이나 지방형성에 중요한 역할을 하는 PPAR- $\gamma$ , adiponectin, Steroyl-CoA desaturase-1(SCD1)의 mRNA발현의 양을 확인하였다.

이와 같은 mRNA expression 분비 억제 효과를 평가하기 위해 전지방세포인 3T3-L1 섬유아세포를 사용하여 reverse transcription(RT) PCR을 수행하였다. 위의 전지방세포 분화를 동일한 방법으로 시행 하여 분화시켜 자란 세포들에 FBS가 포함된 배지를 첨가하고 누룩추출물, 시제품 1 추출물을 50µg/mL로 처리하였다. 24시간 배양 후, TRIzol Reagent(Gibco BRL)를 넣어 제조사의 protocol을 따라 mRNA를 얻어 RT-PCR을 수행하였다. 시제품1의 추출물과 누룩추출물을 처리한 군에서 이들 gene의 감소를 확인하였고 누룩 추출물 처리군보다 시제품1의 추출물 처리군에서 보다 현저한 억제 양상을 확인하였다.

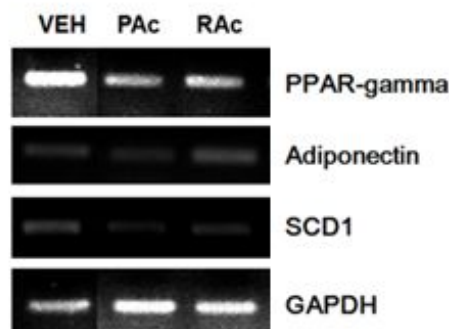


Figure 7. Expression of adipogenic genes (PPAR $\gamma$ , adiponectin, SCD1) was measured by RT-PCR using specific primers

다. 간세포 HepG2를 이용한 중성지방 합성에 관련된 mRNA의 활성화

사람의 간은 여러 기능 중 중성지방, 콜레스테롤, 지방산 합성과 uptake에 관여를 하는 역할이 있다. 이에 SREBPs (sterol regulatory element binding proteins)이 주된 역할을 담당하고 있으며 이는 3가지 isoforms이 (SREBP1a, SREBP1c, SREBP2) 존재한다. 이 다른 종류의 isoforms 중 SREBP1c는 지방합성에 핵심적 역할 담당하고 있으므로 SREBP1c의 mRNA 발현 level을 확인하였다.

#### 4. 유산균 유래 Exopolysaccharide(EPS)의 항암 활성 탐색

##### 가. 암 전이 억제 활성 탐색

하나의 장기에서 발생한 악성 종양은 시간이 지남에 따라 순환계를 통해 원발 부위로부터 다른 조직으로 퍼져나간다. 이렇게 종양이 처음 발생한 조직으로부터 다른 조직으로 퍼져나가 증식하는 것을 전이 (metastasis)라고 한다. 또한 metalloproteinase (MMP)는 암 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어져 왔다. 따라서 암 전이 억제 활성을 평가하기 위해 종양의 이동성 (cell motility)과 MMP의 발현, 활성 저해 효과를 확인하였다.

##### (1) 암세포에 대한 EPS의 독성 탐색

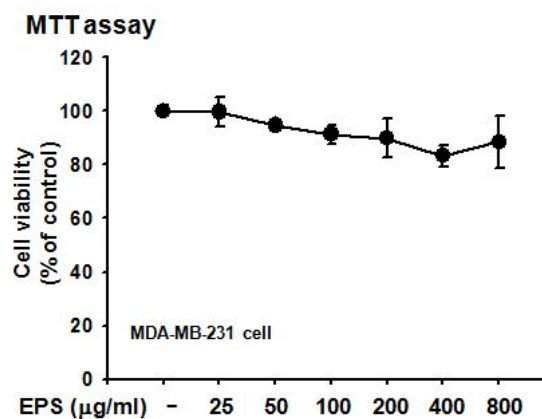


Figure 8. Cell viability of MDA-MB-231 cell at the EPS treatment

##### (2) 암세포 이동성 억제 활성 탐색

암 전이 억제 활성을 평가하기 위해서 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231을 사용하여 wound healing assay를 수행하였다(Figure 9). 암 세포주 ( $2 \times 10^5$  cells/mL)를 24-well 세포배양 플레이트 seeding하고 10~12 시간 배양 후, 과밀도로 자란 세포들을 yellow-tip을 사용하여 세포표면에 wound를 만들고 PBS로 2번, 무혈청 배지로 한번 세척하였다.FBS가 포함된 배지를 첨가하고 유산균 유래 EPS를 원하는 농도별로 처리한다. 24시간 배양 후 현미경으로 각 세포들의 전이현상을 4% paraformaldehyde로 고정시킨 후 관찰하였다.

인간 유래 유방암 세포주인 MDA-MB-231에서 유산균 유래 EPS의 농도 의존적인 암 이동성에 대한 억제 활성은 미미하였다.

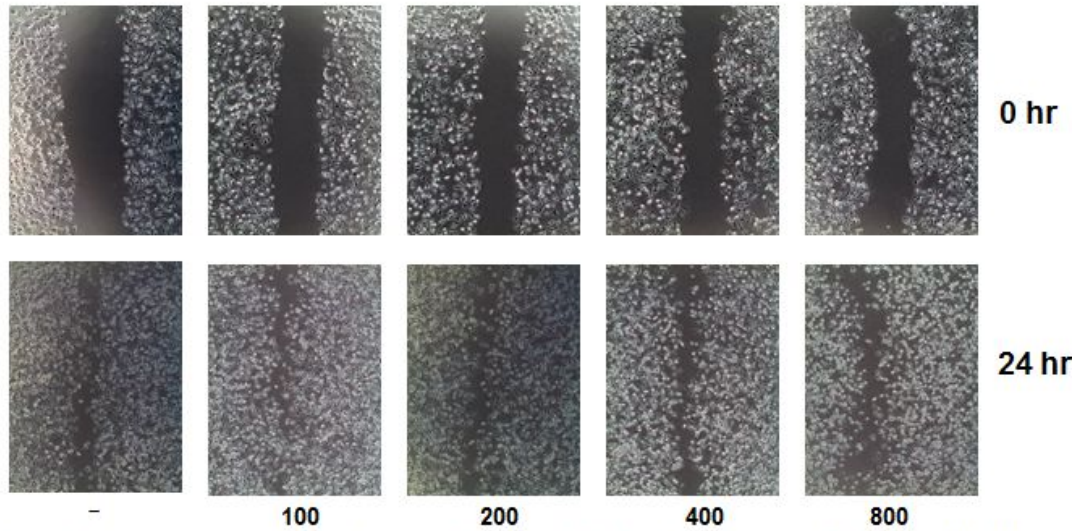


Figure 9. Anti-metastatic activities of Exopolysaccharide on the human breast cancer cell line, MDA-MB-231(3) MMP 억제 활성

유산균 유래 EPS의 MMP 활성 효과를 평가하기 위해 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231을 사용하여 zymography를 수행하였다(Figure 10). 암 세포주 ( $2 \times 10^6$  cells/ml)를  $100 \times 20$ mm 세포배양 플레이트 seeding하고 10~12 시간 배양 후, 과밀도로 자란 세포들에 FBS가 포함된 배지를 첨가하고 유산균 유래 EPS을 원하는 농도별로 처리하였다. 24 시간 배양 후, 배지를 수집하여 농축하여 acrylamide gel에 전기영동하였다. 이 후 37°C에서 18 시간동안 developing 후, Coomassie brilliant blue로 염색한 뒤 탈색하였다. 그 결과 유산균 유래 EPS에 의한 MMP 활성이 저해되지 않았고 지금까지의 결과를 통해 막걸리의 항암효능이 EPS를 통한 직접적인 영향은 아닌 것으로 확인되었다.

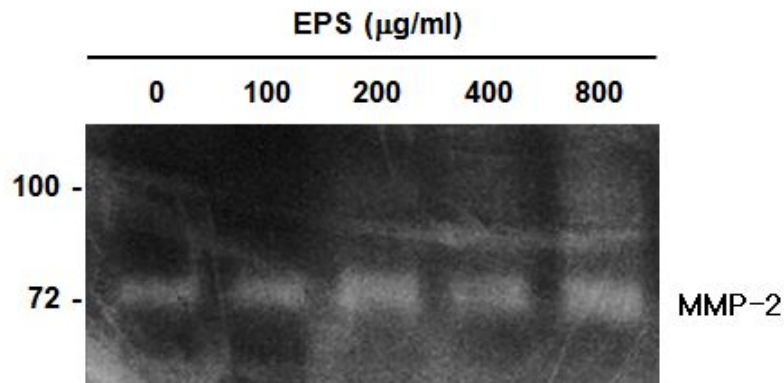


Figure 10. Decrease of MMP activities from the human breast cancer cell line, MDA-MB-231 by Exopolysaccharide(EPS)



## 5. 유산균 유래 EPS의 항염 활성 탐색

대식세포는 다른 대식세포를 활성화시키거나 직접적으로 암세포를 공격하여 암세포의 성장 및 다른 세포로의 침투를 막을 수 있다. 즉, 대식세포의 활성화는 면역증강이라는 의미로 해석될 수 있으며, 이는 항암 또는 외부로부터 들어오는 해로운 인자로 부터의 예방을 도모할 수 있다. 이를 이용하여 항암 또는 항염에 대한 가능성을 부합할 수 있을 것이라 보인다.

### 가. 대식세포 내 mRNA 발현 양상 확인

대식세포의 활성화에 밀접하게 연관되어 있는 NK-kB, AP-1 signaling pathways에 의해 TNF- $\alpha$ , COX-2와 같은 gene의 발현들이 발생한다고 현재까지 많은 보고 있으며, 이에 대한 탐색 및 확인을 통해 EPS의 면역 증강 능에 대한 가능성을 확인 할 수 있다. Macrophage 유래된 RAW 264.7 cell line을 사용하여 Real-time reverse transcription(RT) PCR을 수행하였다. RAW 264.7( $5 \times 10^6$  cells)을 6cm plate에 세포배양 plating하고 10~12 시간 배양한 후 과밀도로 자란 세포들에 FBS가 포함된 배지를 첨가하고 control로 LPS (1 $\mu$ g/mL), EPS를 농도별로 처리하였다. 6시간 배양 후, TRIzol Reagent(Gibco BRL)를 넣어 제조사의 protocol에 따라 mRNA를 얻어 SYBR의 protocol을 이용하여 Realtime-PCR을 수행하였다.

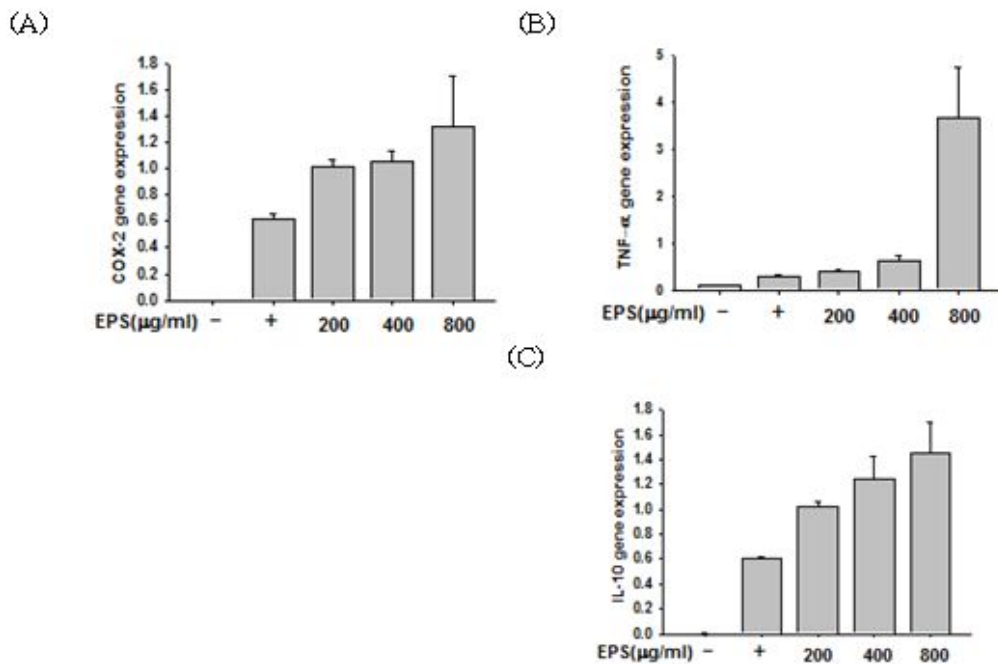


Figure 11. Expression of inflammatory genes(COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-10) was measured by Realtime-PCR using specific primers. (A) COX-2, (B) TNF- $\alpha$ , (C) IL-10 gene expression levels were compared with negative control.

그 결과 대식세포의 활성화 시 나타나는 mRNA 발현들이 모두 EPS 처리의 농도의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이로써 많은 양의 EPS는 보다 강하게 대식세포를 활성화 시킬 것이라는 가능성을 확인하였다.

## 6. 분리된 막걸리 유래 유산균에 대한 기능성 확인 규명

### 가. Nitric oxide 비교

Nitric oxide(NO)는 생체 내 중요한 biological messenger로서 수많은 생리적인 반응에서 다양한 역할을 하고 있다고 알려져 있다. 대표적으로 대식세포가 활성화게 되면 여러 물질들을 만들어 내는 데 NO 역시 그 중의 하나의 지표로 사용되어 진다. 즉, NO의 발생 정도는 대식세포의 활성화 정도를 나타 낼 수 있다.

대식세포의 활성 정도를 비교 평가하기 위해서 macrophage에서 유래된 RAW 264.7 cell line을 사용하여 NO assay를 수행하였다(Figure 12). RAW 264.7( $1 \times 10^5$  cells)을 96well에 세포배양 plating하고 10~12 시간 배양한 후 과밀도로 자란 세포들에 FBS가 포함된 배지를 첨가하고 분리된 막걸리 유래 유산균 (*W. cibaria* KSD-914)과 이에 대한 control 유산균 (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*)을 원하는 농도별로 처리하였다. 24시간 배양 후, 배지를 수집하여 Griess reaction을 유도하였다. 이 후 Spectrometer를 이용해 540nm 파장에서 흡광도를 얻어 내어 NO의 양을 적량 하였다.

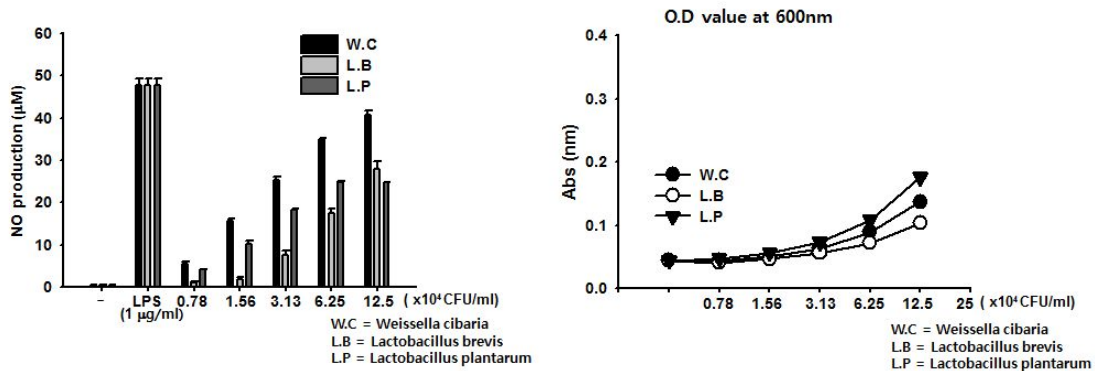


Fig 12. Compared NO production of *W. cibaria* KSD-914 with different lactic acid bacteria at RAW264.7 cells.

NO production level을 확인한 결과 *W. cibaria* KSD-914 (WC) 유산균의 경우 저농도 처리 시 *L. plantarum*(LP)과 *L. brevis*(LB) 유산균에 비해 월등히 높다는 것을 확인 할 수 있었다. 이에 대한 결과가 유산균의 양의 오차로서 발생할 것을 염두에 두어 각각의 CFU/mL의 O.D 값을 측정 한 결과 약간의 O.D 값이 차이가 나지만 LB와 LP를 보며 비교 하였을 때 실험 농도에서의 OD의 차이는 큰 영향을 받지 않는 것으로 보인다.

### 나. 유산균 처리를 통해 면역 증강 및 암세포 증식억제에 관련된 cytokine들을 확인

활성화된 대식세포는 수많은 cytokine을 분비하여, 면역반응을 증강시키거나, 직접적으로 해로운 외부인자를 방어, 제거하는 역할을 한다. 이에 대표적인 cytokine으로는 TNF- $\alpha$ 와 같은 물질이 있다. TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor)는 tumorigenesis나 viral replication을 억제시킨다고 알려져 있다. 즉, 대식세포의 활성을 통한 이러한 cytokine에 의해 암세포의 침투력을 저해시키거나 성장을 억제 시킬 수 있기 때문에 이러한 실험을 수행하였다. 이를 위해 RAW 264.7( $1 \times 10^5$  cells)을 96well에 세포배양 plating하고 10~12 시간 배양한 후 과밀도로 자란 세포들에 FBS가 포함된 배지를 첨가하고 새로 개발된 유산균 (*W. cibaria* KSD-914)과 이에 대

한 control 유산균(*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*)을 원하는 농도별로 처리하였다. 6시간 배양 후, R&D system ELISA assay kit의 protocol을 따라 수행, 이 후 Spectrometer를 이용해 450nm 파장에서 흡광도를 얻어 내어 각각의 양을 적량 하였다.

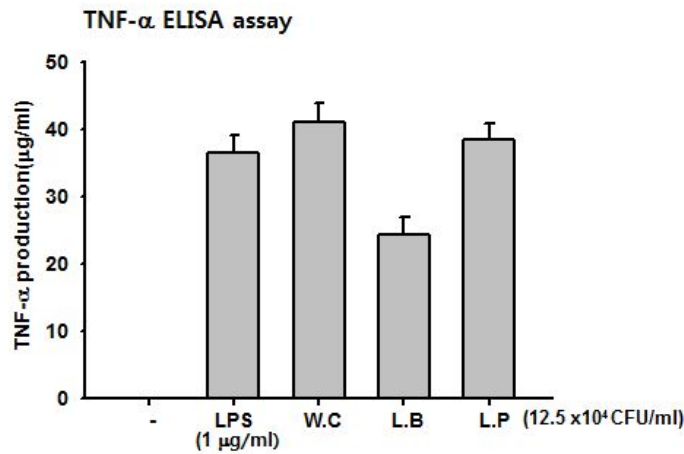


Fig 13. TNF-α production levels of three different groups that treated different lactic acid bacteria.

앞서 NO production level을 통해 설정된 농도 처리 시의 값의 유산균을 처리하고 확인한 결과 이와 유사한 결과를 얻었다. WC 저농도 처리군에서의 TNF-α의 생성량은 위의 결과와 같이 탁월하게 많은 양을 만들어 내었다. 대식세포를 경미하게 활성화시키는 것으로 보이는 LB인 경우 2배정도 낮은 양의 TNF-α 생성량을 확인하였고, LP인 경우 WC와 약하지만 거의 유사한 생성량을 보였다.

다. 대식세포 활성화에 의해 생성되는 mRNA의 발현을 확인

외부의 자극인자에 의해 대식세포의 활성화가 발생하면 여러 많은 cytokines(GM-CSF, iNOS, TNF-α, IFN-β 등)이 발생한다. 이러한 cytokine들은 다른 대식세포나 NK cell을 활성화시키고, 과립구와 단핵구의 생산을 자극을 통한 대식세포의 수를 급격히 늘려 감염반응과 대항할 수 있도록 하거나, 항바이러스, 암 억제 활동에 중요한 역할을 한다. 이러한 이유로, 막걸리에서 분리한 새로운 유산균이 면역증강에 영향을 주는 GM-CSF, iNOS, TNF-α, IFN-β mRNA에 어떠한 변화를 주는지에 대한 확인을 하였다.

Macrophage 유래된 RAW 264.7 cell line을 사용하여 reverse transcription(RT) PCR을 수행하였다(Figure 15). RAW 264.7( $5 \times 10^6$  cells)을 6cm plate에 세포배양 plating하고 10~12 시간 배양한 후 과밀도로 자란 세포들에 FBS가 포함된 배지를 첨가하고 새로 분리된 유산균 (*W. cibaria* KSD-914)과 이에 대한 control 유산균(*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*)을  $12 \times 10^4$  CFU/mL 농도별로 처리하였다. 6시간 배양 후, TRIzol Reagent(Gibco BRL)를 넣어 제조사의 protocol에 따라 mRNA를 얻어 RT-PCR을 수행하였다.

WC 처리군은 LB, LP 처리군에 비해 GM-CSF mRNA 발현양이 높은 것으로 확인되었고, LB 처리군에 비해 모두 월등한 발현양을 보였으며, 나머지 cytokines은 LP 처리군과 유사한 발현양을 확인 할 수 있었다.

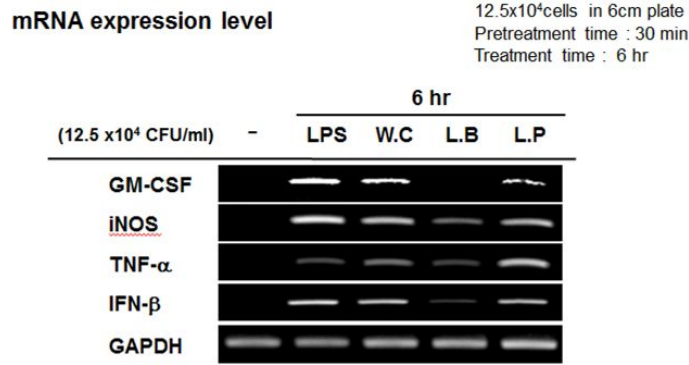


Figure 14. Expression of inflammatory genes(GM-CSF, iNOS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) was measured by RT-PCR using specific primers.

얻어진 결과들을 토대로 막걸리 유래 유산균들의 면역증강 효능은 유사한 것으로 확인되나 종류별로 조금씩 다른 활성 정도를 가지고 있는 것을 얻어내었다. 그 중 저농도 처리시의 W.C 유산균인 경우는 다른 유산균들보다 월등한 면역증강 효능을 보이는 것으로 이는 기존의 유산균보다 probiotics서의 장점인 것으로 보인다.

#### 7. 새로이 분리된 막걸리 유래 유산균에 대한 면역활성 메커니즘 구축

앞선 결과를 통해 다른 균보다 *W. cibaria* KSD-914(WC) 유산균의 probiotics의 장점이 있다는 것을 확인하였으나, 보다 정확한 면역활성 메커니즘에 대한 규명이 미비하여 그에 대한 기작 및 target protein 설정을 위한 실험이 요구되어 수행하였다.

##### 가. 대식세포 활성의 원인 물질을 검색하기 위한 평가

유산균의 생존이 대식세포에 대한 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해 유산균을 sonicator를 이용하여 분쇄하여 생 유산균(sonication을 하지 않은 유산균)과의 비교를 해보았다. 이전 실험과 동일한 방법으로 NO assay를 수행하였고 *W. cibaria* KSD-914 유산균을 30초간 sonication 한 유산균과 물리적인 영향을 주지 않은 생 유산균을 원하는 농도별로 처리하였다. 24시간 배양 후, 배지를 수집하여 Griess reaction을 유도하였다. 이 후 Spectrometer를 이용해 540nm 파장에서 흡광도를 얻어 내어 NO의 양을 적량 하였다.

그 결과 sonication한 균과 하지 않은 균과의 NO production level은 큰 차이를 보이지 않았다. 이로써 유산균에서 만들어지는 새로운 product에 의한 면역증강이라기 보다는 특정 각각 유산균 표면에 생성된 어떠한 물질로서 부터 대식세포들이 활성화되고 면역반응과 관련된 여러 사이토카인들을 만들어내는 것이라는 것을 확인하였다.

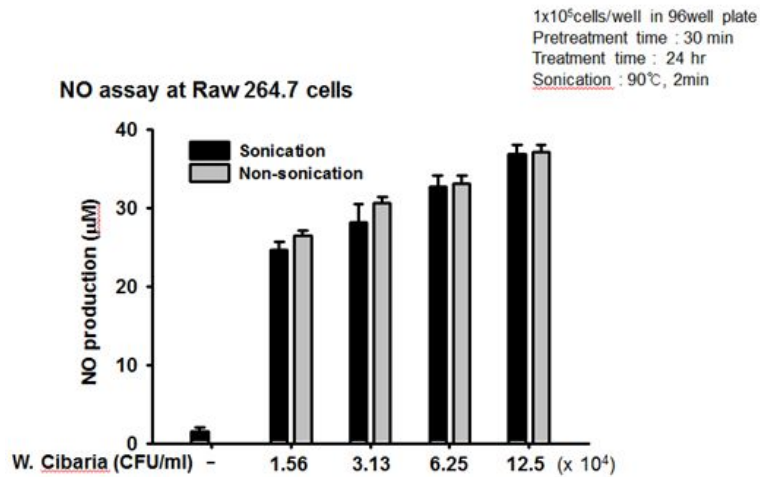


Figure 15. Compared NO production of *W. cibaria* KSD-914 and sonicated *W. cibaria* KSD-914 at RAW264.7 cells.

나. 유산균의 대식세포 활성화 기작에 대한 검색

지금까지 알려져 있는 유산균의 대부분은 대식세포 내의 Toll like receptor 종류의 TLR2 라고 불리는 receptor에 유산균의 Peptidoglycan (PGN) 부분과 결합하여 활성화 일으킨다고 알려져 있다. 그러므로 Gram-positive bacteria의 layer에 주로 형성되어 있는 PGN과의 비교를 통하여 일반적인 유산균과 새로이 분리된 막걸리 유래 유산균(*W. cibaria* KSD-914)의 대식세포 활성화와 그 차이를 규명하기 위해 이와 같은 실험을 수행하였다(Figure 17). 이전과 동일한 방식으로 NO assay를 수행하였고, 대식세포의 활성화와 밀접하게 관련된 NF-κB, AP-1 signaling pathway에 대한 상위 protein의 인산화 작용을 억제하는 억제제를 이용하였다. Bay 11-7082(IκB kinase(IKK) inhibitor), SB 203580(p38 MAP kinase inhibitor), SP 600125 (JNK inhibitor), U1260(ERK inhibitor)을 각각 10mM에서 20mM까지 매뉴얼을 따라 전처리 1시간 후 PGN(10mg/ml), *W. cibaria* KSD-914(12.5 x 10<sup>4</sup>CFU/mL)를 24시간 처리 후 NO를 측정하였다.

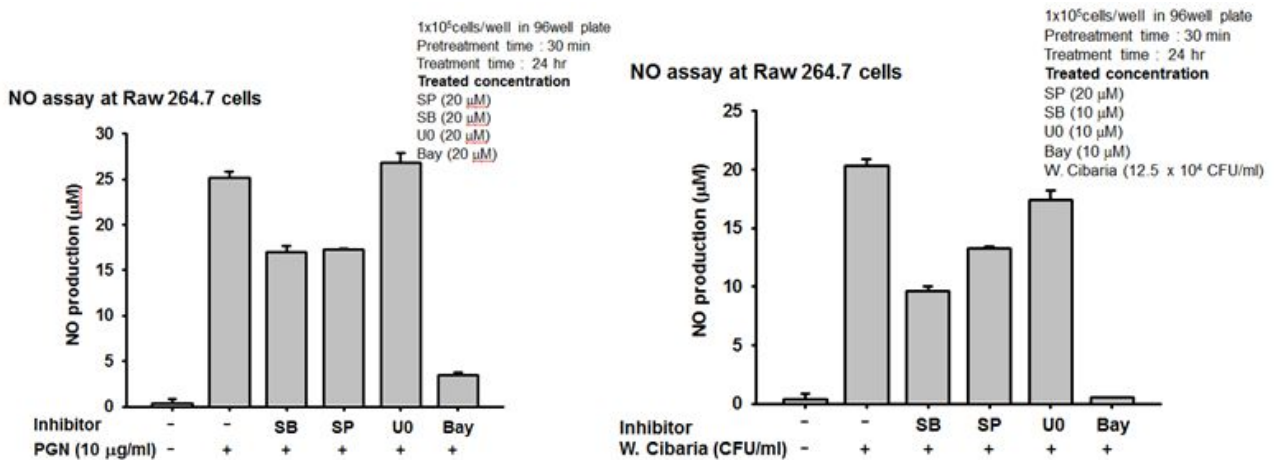


Figure 16. Compared NO production of *W. cibaria* KSD-914 with PGN in inhibitors treated condition at RAW264.7 cells.

Bay 11-7082, SP 600125, U1260 억제제를 사용한 군에서는 PGN 처리군과 WC 처리군에서 대조군 대비 비슷한 수준으로 NO가 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 p38의 억제제인 SB 203580 처리군인 경우 PGN 군 처리에서 약 40% NO 억제율을 보였으나 WC 처리군에서는 약 60% 이상의 NO 억제율을 보였다. 이는 PGN에 비해 WC 처리군에서 NO production 과정 중 p38의 영향을 더 받는다는 것을 사실을 알 수 있었다.

다. 유산균에 의한 정확한 대식세포 활성화 기작에 대한 탐구

*W. cibaria* KSD-914 유산균이 PGN에 비해서 p38의 activation에 중요한 영향을 줄 것이라는 의문점을 가졌고 이를 증명하기 위해 western blotting을 이용하여 분자적 메커니즘 연구를 수행하였다. Raw264.7 cell( $5 \times 10^6$  cells/mL)를 6cm plate에 seeding하고 10~12 시간 배양 후, 과밀도로 자란 세포들에 FBS가 포함된 배지를 첨가하고 LPS, PGN, W.C 를 원하는 농도별로 처리하였다. 원하는 시간에 맞추어 nuclear, whole lysate를 extract한 후 면역 반응과 밀접하게 연관되어 있는 AP-1, NF- $\kappa$ B signaling pathway의 범주에 있는 protein 들의 인산화 작용에 대해 확인해보았다.

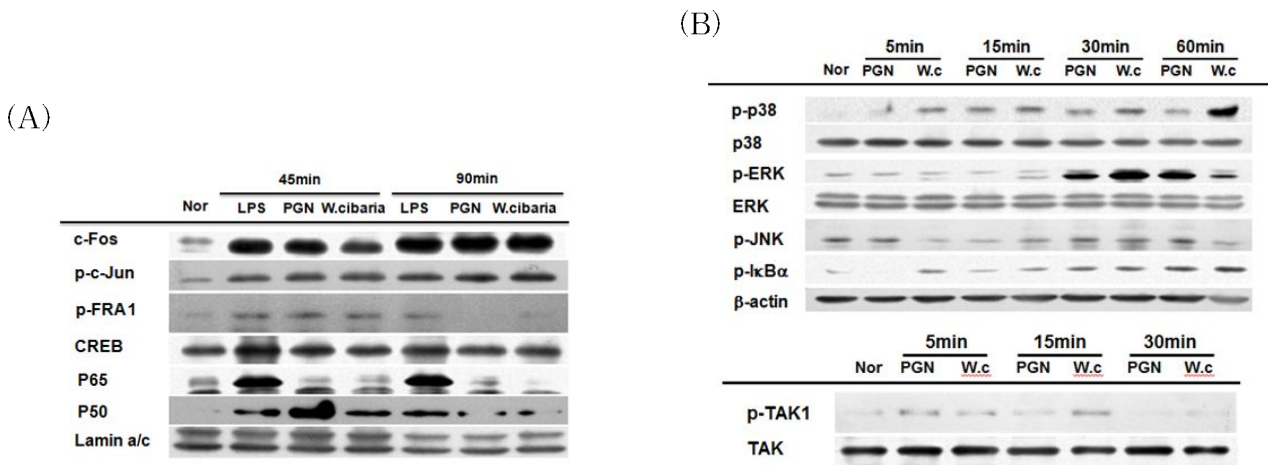


Figure 17. Effect of the *W. cibaria* KSD-914 on NF- $\kappa$ B, AP-1 signaling pathway, (A)Nuclear fraction of Raw 264.7 cells induced by LPS(1  $\mu$ g/mL), PGN (10  $\mu$ g/mL), *W. cibaria* KSD-914 ( $12.5 \times 10^4$  CFU/mL), (B) whole lysate of RAW 264.7 cells treated by PGN (10 mg/mL), W.C ( $12.5 \times 10^4$  CFU/mL)

WC 유산균이 NF- $\kappa$ B, AP-1 signaling pathway를 활성화 정도를 확인하기 위해 각각의 LPS, PGN을 control로 사용하여 확인한 결과 AP-1 signaling pathway에 관련된 c-Fos, c-Jun 의 translocation됨을 확인하였고, NF- $\kappa$ B signaling pathway인 경우 p50 protein의 nuclear로의 많은 양의 translocation을 확인하였다. 이에 대한 결과가 어떠한 기작에 의한 것인지에 대해 확인하기 위해 c-Fos, c-Jun, p-50에 대한 upstream protein들의 활성화 기작에 대해서 시간별로 확인하였다. 그 결과 ERK, JNK, I $\kappa$ B $\alpha$  의 인산화 작용은 control로 사용된 PGN과 매우 유사한 활성을 보였으나, AP-1 signaling pathway의 p38의 인산화 작용은 PGN에 비해 매우 증가하는 것을 확인하였다. 그리고 p38에 대한 upstream인 TAK1의 인산화의

경우 또한 일관성 있는 결과를 얻었다. 즉, 일반적인 유산균의 활성화라 생각되는 PGN에 비해 새로이 분리된 막걸리 유래 유산균인 *W. cibaria* KSD-914의 p38 활성이 저농도의 유산균의 활성화에 중요한 역할을 할 것이라는 가능성을 제시할 수 있었다.

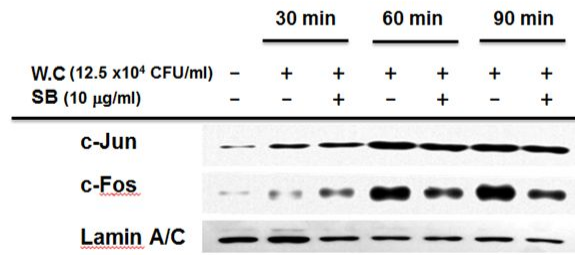


Figure 18. Translocation of AP-1 down-stream molecules in treated-p38 inhibitor condition with *W. cibaria* KSD-914, Inhibitor was one hour pretreated before treating *W. cibaria* KSD-914

*W. cibaria* KSD-914 유산균의 대식세포의 활성화에 관한 p38 인산화 작용이 중요하다는 것을 확인하기 위해 p38 inhibitor를 이용하여 AP-1 signaling pathway와 관련된 molecules(c-Jun, c-Fos)을 확인한 결과 주로 p38의 인산화로 인해 nuclear내로 translocation 되는 c-Fos의 양은 확연히 줄어드는 것을 확인하였고, JNK에 의해 주로 translocation 일어나는 c-Jun인 경우 변화를 보이지 않았다. 그러므로 *W. cibaria* KSD-914 유산균에 대한 p38 인산화가 대식세포의 활성화에 중요한 매개체로 사용될 수 있는 가능성을 확인하였다.

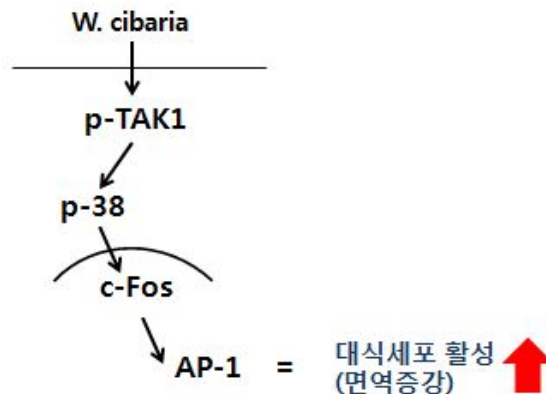


Figure 19. The mechanism of induced AP-1 signaling pathway in Raw264.7 cells by *W. cibaria* KSD-914

#### 8. 막걸리 유래 유산균을 이용한 시제품에 대한 기능성 확인 규명

실질적으로 지금까지 막걸리에서 분리된 유산균을 이용하여 만든 막걸리 시제품에 적용하여 그에 대한 효능을 가져가는 것이 목적이므로, 이를 이용하여 막걸리 시제품을 제작하여 유

산균을 이용하였을 때의 대식세포 증강에 대한 결과가 막걸리 시제품에도 적용이 되는지에 대한 기능성확인이 필요하여 아래와 같은 실험을 수행하게 되었다.

가. 시제품 1의 Nitric Oxide 활성화 평가

실험은 이전 NO assay와 동일한 방법으로 진행하였고, 동일한 양의 기준 시중 유통되는 막걸리 #1, #2, *W. cibaria* KSD-914 유산균 막걸리(시제품1)를 알코올 함량을 최소화하는 방법으로 동결건조하여 PBS에 각각 녹여 Raw 264.7 cells에 24hr 동안 농도별로 처리하였다. 그 후 앞선 실험과 동일한 방법으로 NO의 흡광도를 측정하여 결과를 얻었다(Figure 20).

대식세포의 활성화 정도의 marker로 사용되는 NO production인 경우 control 막걸리인 #2 막걸리가 동일한 농도에서 가장 높은 수치를 가졌고, *W. cibaria* KSD-914 막걸리(시제품1)인 경우 #1 막걸리와 비교 시 약간 높은 활성을 보여줌을 확인하였다.

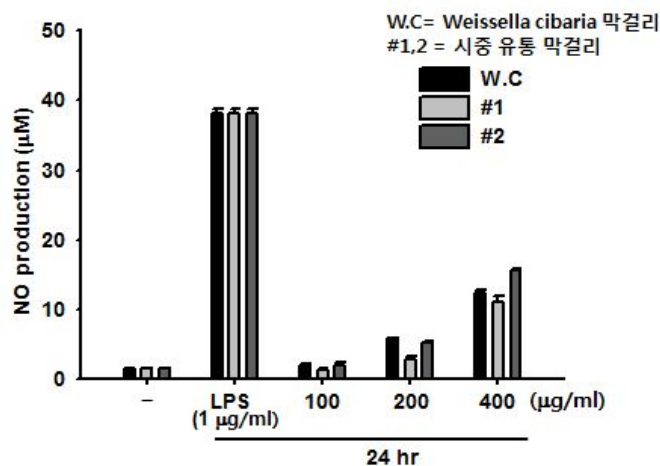


Figure 20. Compared NO production of *W. cibaria* KSD-914 Makgeolli with other Makgeolli(W.C-시제품1, #1 & #2 시판 생막걸리)

나. 시제품1에 의한 대식세포의 TNF-α production과 mRNA 발현 양상 확인

활성화된 대식세포는 수많은 cytokine을 분비하여, 면역반응을 증강시키거나, 직접적으로 해로운 외부인자를 방어, 제거하는 역할에 관여하는 cytokine TNF-α 생산능을 확인 하였고, 각각의 막걸리들의 TNF-α production의 양 또한 이전 실험과 유사한 결과를 얻었다. 하지만, 대식세포 내에서의 각각의 다른 mRNA 발현은 그에 연관된 생산물을 만드는 것을 자극하기 때문에 TNF-α production 외에도 대식세포에 의해 중요 cytokine들의 분비에 필요한 다른 mRNA 발현에 대해서 확인해 보았다.



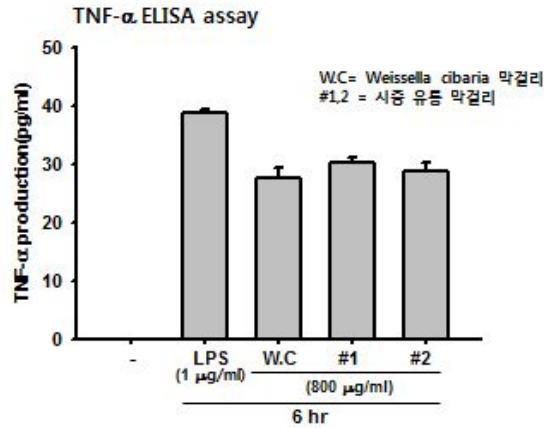


Fig 21. TNF- $\alpha$  production levels of three different groups that treated different Makgeolli (800  $\mu$ g/mL) at 6hr

시제품1은 NO의 생성과 관련된 iNOS, IL-12와 관련된 IFN- $\beta$ 의 mRNA 발현은 다른 막걸리들에 비해서 낮은 활성을 보였지만, 다른 대식세포나 NK cell을 활성화 시키고, 과립구와 단핵구의 생산을 자극을 통한 대식세포의 수를 급격히 늘려 감염반응과 대항할 수 있도록 하는 GM-CSF mRNA 발현은 control 막걸리에 비해 유독 높은 것으로 확인하였다. 이는 p38의 인산화 작용에 의해 크게 활성화 된다는 보고가 있으며, 이를 토대로 *W. cibaria* KSD-914 유산균을 이용한 시제품1 또한 유산균을 이용한 대식세포 활성화와 매우 상관관계 있게 나온다는 것을 알 수 있었다. 유산균 자체 실험에 비해 막걸리 시제품1의 대식세포 활성화의 정도가 control 군에 비해 약하게 나온 것으로 확인 되었다. 이것으로 특정 균의 활성(GM-CSF)은 유지 되지만 어떠한 기작은 약하고 강하게 보이는 것으로 보아 막걸리에 포함된 균의 특성에도 영향을 받지만 제조방법, 제조 기간, 유산균의 함유량에 따라 조금씩 변할 수 있을 것으로 보이기 때문에 이를 점차 상호 보완한다면 매우 향상된 제품이 될 것으로 보인다. 또한 *W. cibaria* KSD-914 유산균을 이용할 시 p38의 인산화에 의한 GM-CSF mRNA의 발현은 대식세포의 활성을 통한 면역증강에 대한 이점을 보였기 때문에 균을 이용하여 여러 조건을 달리하여 제품을 개발한다면 면역증강의 효능을 가질 수 있을 것이라는 가능성을 제시한다.

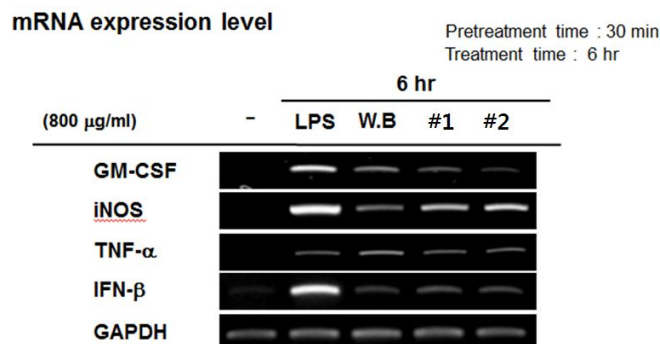


Figure 22. Expression of inflammatory genes(GM-CSF, iNOS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) was measured by RT-PCR using specific primers in treated-Makgeolli at Raw 264.7 cells

다. 시제품 2의 Nitric Oxide 및 TNF-a production 활성 평가

실험은 이전 NO assay와 동일한 방법으로 진행하였고, 동일한 양의 시중 유통 막걸리(#1 & #2)와 막걸리 유래 유산균 *W. cibaria* KSD-914, *Pediococcus pentosaceus* K5, *Pediococcus acidilactici* K5를 복합적으로 사용한 막걸리 시제품2를 알코올의 함량을 최소화하는 방법으로 동결건조하여 PBS에 각각 녹여 Raw 264.7 cells에 24hr 처리하였다. 그 후 앞선 실험과 동일한 방법으로 NO의 흡광도를 측정하여 결과를 얻었다. 그 결과 control에 비해 매우 많은 양의 NO가 생성되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 23A). 그리고 더 나아가 직접적인 대식세포의 TNF-a cytokine 분비능을 확인하였고, 이 역시 NO production과 일맥상통하는 결과를 얻었다(Figure 23B). control로 사용된 LPS처리와 유사한 값을 보였으며 control 막걸리에 비해 거의 3배나 육박하는 생산능을 보였다. 이는 대식세포의 활성이 상당히 발생하였다는 것을 알 수 있다.

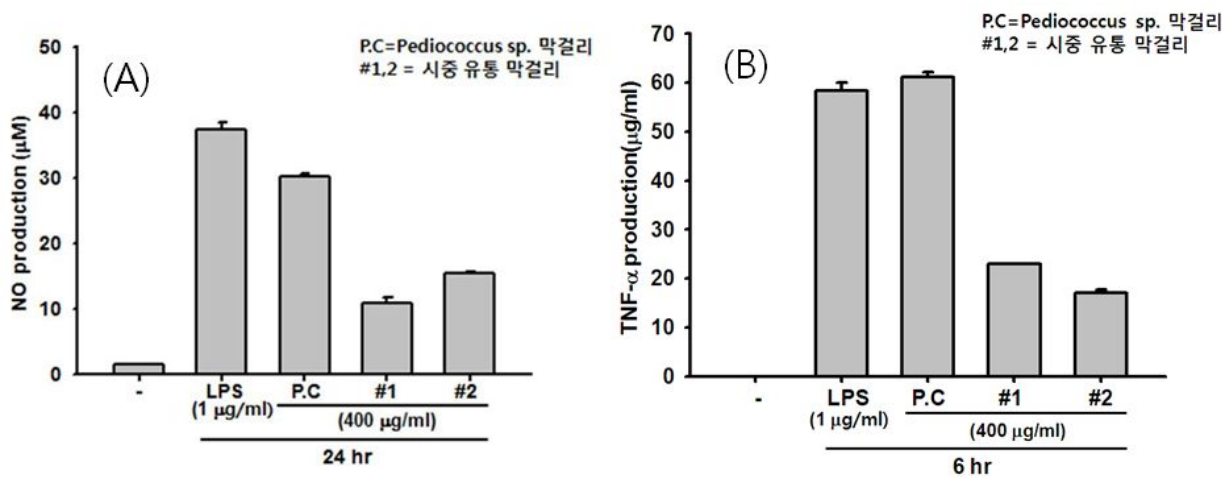


Figure 23. Compared NO and TNF-a production of *Pediococcus* sp. with other Makgeolli (PC-시제품2, #1 & #2-시중 유통 막걸리)

라. 시제품2에 의한 대식세포의 mRNA 발현 양상 확인

이전 시행하였던 실험과 같은 맥락으로서, 시제품2를 이용한 대식세포의 mRNA 발현양상이 어떻게 차이가 나는가에 대해서 확인해보았다. 실험방법은 위와 동일하게 진행하였으며, 시제품2와 대조구로 시판중인 생막걸리(#1 & #2)를 처리하여 비교하였다(Figure 24).

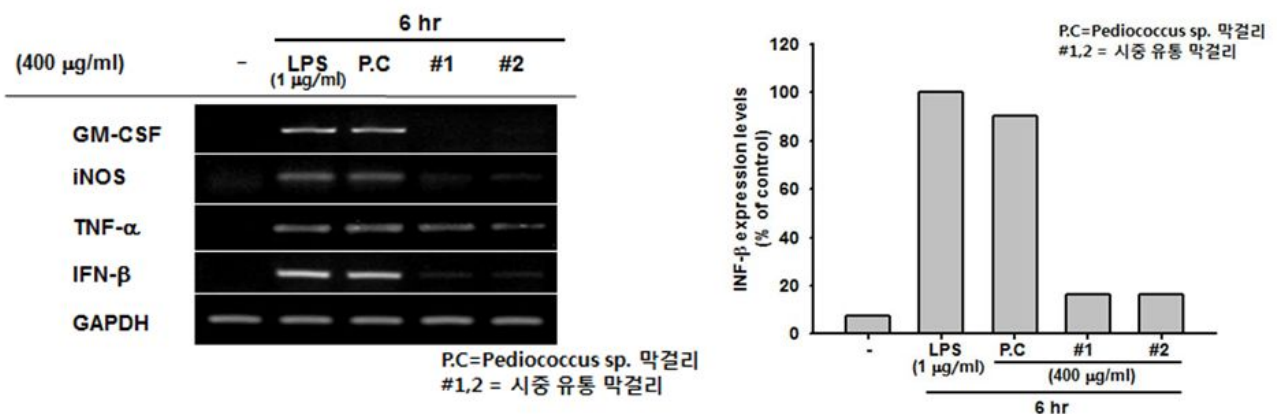


Figure 24. Expression of inflammatory genes(GM-CSF, iNOS, TNF-α, IFN-β) was measured by RT-PCR using specific primers in treated-Makgeolli at Raw 264.7 cells

Figure 24에서 나오는 mRNA 발현은 면역증강에 의해 항암작용을 일으킬 수 있게 도울 수 있는 인자들이다. 그리고 시제품2 막걸리에 의해서 모두 증가한 것을 확인하였다. 모든 인자에서 증가되었으며 그 양도 상당함을 확인하였다. 이는 시제품1과 달리 유산균 특이성이 막걸리 제품화 후에도 상당량 유지된다는 것을 보여준다. 그리고 이는 기존 막걸리 제품에 비해 상당히 기능성이 향상됨을 확인하였다. 이러한 점을 이용하여 다른 양, 같은 기능 부분을 적용하여 생산가를 낮추거나 또는 상당히 면역증강의 기능성이 향상된 막걸리를 제작할 수 있을 것으로 보인다. 하지만 *Pediococcus* sp.에 의한 면역증강의 매커니즘, 그리고 이와 같은 유산균이 막걸리와의 상호작용에 의해 특정 부분의 activity의 변화가 있을 가능성을 배제할 수는 없기 때문에 보다 심도 깊은 연구를 통해 기능성 막걸리 제품에 대한 개발, 뿐만 아니라 향상에 대한 target을 설정하여 기능성 막걸리 제품에 신뢰를 구축할 수 있을 것이라 사료된다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발 목표 및 평가 착안점

#### 1. 연구개발의 최종 목표

최종목표	내 용
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 생막걸리 내 기능성 유산균 발굴 : 기능성 규명 및 확립</li> <li>● 막걸리 알코올 발효 시 유산균 발효 제어 기술 확보</li> <li>● 유산균 및 기능성이 강화된 막걸리 제품 개발 및 상품화(2건 이상)</li> <li>● 막걸리의 생리 기능성 규명 및 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○국내 시판 중인 생막걸리에 존재하는 유산균의 분포 조사 및 동정, 기능성 평가</li> <li>○선정된 유산균을 활용한 막걸리 알코올 발효 시 유산균 발효 제어 기술 확립</li> <li>○선정된 유산균을 활용한 유산균 막걸리 제품 개발 (시제품 1)</li> <li>○선정된 유산균을 활용한 기능성 강화 유산균 막걸리 제품 개발(시제품 2)</li> <li>○막걸리 및 시제품에서의 암 예방/항암, 지질대사 개선 등 생리 기능성 규명 및 확립</li> </ul>

#### 2. 연구개발 목표, 개발 내용 및 범위 가. 1차년도

구분	연구개발의 목표	연구개발 내용 및 범위
[세부과제]	막걸리 발효 시 Microflora 조사 및 전국 시판 막걸리 제품 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>○막걸리 유산균의 근원에 대한 조사</li> <li>○막걸리 발효 시 이화학적 변화 및 microflora 패턴 확인</li> <li>○전국 시판 막걸리 제품의 일반 성분 및 유기산 분석 평가</li> </ul>
	막걸리 유래 유산균의 배양조건 최적화 및 유산균 발효 제어 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○배양조건 최적화(탄소원 및 질소원 선정, 농도 설정)</li> <li>○유산균을 이용한 막걸리 발효 공정 개발</li> </ul>
[제1협동과제]	시중 생막걸리의 유산균 탐색 및 분류	<ul style="list-style-type: none"> <li>○시중에 판매되는 다양한 지역의 20종류의 생막걸리 선발</li> <li>○20종류의 생막걸리에 존재하는 유산균 및 효모수 확인</li> <li>○PCR-RFLP 패턴별 유산균의 분류</li> </ul>
	시중 생막걸리 유래 유산균의 동정	<ul style="list-style-type: none"> <li>○분류된 유산균의 16S rRNA 염기서열 분석</li> </ul>
[제2협동과제]	막걸리의 생리 기능성 규명/확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>○암 예방/항암 활성                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-염증억제 활성, 암세포사 유도 활성</li> <li>-암 전이 억제 (<i>in vivo model</i> 포함)</li> </ul> </li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>○지질대사 개선 활성 (비만·당뇨)                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-전지방세포 분화 억제력</li> </ul> </li> </ul>

나. 2차년도

구분	연구개발의 목표	연구개발 내용 및 범위
[세부과제]	유산균 막걸리 제품 개발 (시제품 1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○유산균 막걸리 개발을 위한 유산균 선정</li> <li>○<i>W. cibaria</i> KSD-914를 이용한 유산균 막걸리 레시피 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유산균 발효 시간·비율 설정</li> <li>- Large scale에서의 시제품 생산</li> <li>- 안정성 평가 및 소비자 기호도 조사</li> <li>- 제조방법신고서</li> </ul> </li> </ul>
[제1협동과제]	생막걸리 유래 유산균의 기능성	<ul style="list-style-type: none"> <li>○생막걸리 유래 유산균의 항균활성 능력</li> <li>○생막걸리 유래 유산균의 <math>\gamma</math>-aminobutyric acid (GABA) 생산 및 관련 유전자 확보</li> <li>○생막걸리 유래 유산균의 Exopolysaccharide (EPS) 생산 확인</li> </ul>
[제2협동과제]	유산균 유래 EPS의 기능 활성 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>○암 예방/항암 활성               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 암 세포사와 전이 억제능 실험</li> <li>- 염증억제 및 세포사 활성</li> </ul> </li> </ul>
	시제품1의 기능활성 평가 및 규명 (항암/지질대사)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○암 예방/항암 활성               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 암 세포사와 전이 억제능 실험</li> <li>- 염증억제 및 세포사 활성</li> </ul> </li> <li>○지질대사 개선 활성 (비만·당뇨)</li> </ul>

다. 3차년도

구분	연구개발의 목표	연구개발 내용 및 범위
[세부과제]	기능성 강화 유산균 막걸리 제품 개발(시제품 2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○기능성 강화 유산균 막걸리 개발을 위한 유산균 선정               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 복합 유산균 선별</li> <li>- 선별된 복합 유산균에 대한 배양 방식 설정</li> </ul> </li> <li>○기능성 강화 유산균 막걸리 레시피 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Large scale에서의 시제품 생산</li> <li>- Shelf-Life Test 및 소비자 기호도 조사</li> <li>- 제조방법신고서</li> </ul> </li> </ul>
[제1협동과제]	기능성 유산균의 장내 생존율 등 Probiotic 능력 검증	○내산성, 내담즙성 및 장 부착능 확인
	EPS 생성 유산균의 EPS 생산 관련 유전자 분석 및 효소 특성 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>○EPS 생성 유산균의 EPS 관련 유전자 확보</li> <li>○EPS 관련 유전자 분석</li> <li>○EPS 관련 유전자 Cloning</li> <li>○재조합 EPS 관련 유전자의 효소 특성</li> </ul>
[제2협동과제]	유산균 유래 EPS의 기능 활성 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ EPS 생산능이 뛰어난 유산균에 대한 기능 활성 규명               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대식세포의 면역 증강능력을 통한 항암효능에 대한 가능성 확인</li> <li>- EPS 강화 유산균에 대한 면역증강 매커니즘 구축</li> </ul> </li> </ul>
	시제품2의 기능활성 평가 및 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 암 예방/항암 활성               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대식세포의 활성을 통한 항암활성 평가</li> </ul> </li> </ul>

### 3. 연구평가의 착안점

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 연도	2010	<b>[세부과제]</b> ○막걸리 유래 유산균 배양 최적화 ○유산균 발효 제어 기술 개발	10% 20%	배지 및 배양조건 확립 유산균 발효 제어 기술 확인
		<b>[제1협동과제]</b> ○전국 생막걸리 유래 유산균 분류 ○전국 생막걸리 유래 유산균 동정	20% 20%	전국 생막걸리의 유산균 분포 확인 전국 생막걸리에 존재하는 우점종 확인
		<b>[제2협동과제]</b> ○막걸리의 생리 기능성 확인	30%	막걸리에 대한 기능성을 탐색 및 기존 유통 막걸리에 대한 기능성 비교 평가
2차 연도	2011	<b>[세부과제]</b> ○유산균 막걸리 제품 개발	40%	제품 레시피 및 제조 공정 개발 (제조방법신고서)
		<b>[제1협동과제]</b> ○생막걸리 유래 유산균의 항균 활성 확인	10%	○생막걸리 유래 유산균이 존재하 는 항균 활성 확인
		○생막걸리 유래 유산균의 GABA 생산 확인	10%	○GABA생산이 가능한 생막걸리 유래 유산균 선발 및 관련 유전자 확보
		○생막걸리 유래 유산균의 EPS 생산 확인	10%	○EPS생산이 가능한 생막걸리 유 산균 확보
<b>[제2협동과제]</b> ○막걸리 유래 EPS의 기능성 평가 ○개발된 막걸리의 기능성 평가	30%	막걸리의 기능활성의 정확한 target 탐색 새롭게 개발된 막걸리에 대한 기능 활성의 평가 및 비교		
3차 연도	2012	<b>[세부과제]</b> ○기능성 강화 유산균 막걸리 제품 개발	40%	제품 레시피 및 제조 공정 개발 (제조방법신고서)
		<b>[제1협동과제]</b> ○기능성 유산균의 probiotic 능 력 검증	10%	○선발된 기능성 유산균의 내산성 및 내담즙성 확인
		○EPS 생성 유산균의 EPS 생산 관련 유전자 분석 및 효소 특성	20%	○선발된 내산성 및 내담즙성 유산 균의 장 부착능 확인 ○EPS 생성 유전자 확보 및 효소 특성 확인
		<b>[제2협동과제]</b> ○막걸리 유래 EPS의 기능활성 규명 ○시제품2의 기능활성 평가	30%	새롭게 개발된 유산균을 이용한 막 걸리의 기능활성 유무에 대한 평가 및 우수성 평가

최종 평가	<p><b>[세부과제]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○유산균 발효 제어 기술 확립 10%</li> <li>○유산균 막걸리 제품 개발 15%</li> <li style="padding-left: 20px;">(시제품1)</li> <li>○기능성 강화 유산균 막걸리 15%</li> <li style="padding-left: 20px;">제품 개발(시제품2)</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>○유산균 발효 제어 기술 확인(특허)</li> <li>○막걸리 유래 유산균을 이용한 막걸리 제품 개발 및 시제품 제조</li> </ul>
	<p><b>[제1협동과제]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○생막걸리에 존재하는 유산균 10%</li> <li style="padding-left: 20px;">확인</li> <li>○생막걸리 유래 유산균의 기능 10%</li> <li style="padding-left: 20px;">성 검증</li> <li>○생막걸리 유래 기능성 유산균 10%</li> <li style="padding-left: 20px;">의 probiotic 능력 확인</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>○생막걸리에 존재하는 유산균을 10%</li> <li style="padding-left: 20px;">분류 및 동정</li> <li>○생막걸리 유래 유산균의 항균활 10%</li> <li style="padding-left: 20px;">성, EPS생산, GABA생산능 확인</li> <li style="padding-left: 20px;">및 관련 유전자 확보</li> <li>○선발된 기능성 유산균의 내산성, 10%</li> <li style="padding-left: 20px;">내담즙성 및 장 부착성 확인</li> </ul>
	<p><b>[제2협동과제]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○막걸리에 대한 기능성 확인 30%</li> <li style="padding-left: 20px;">및 원인 규명</li> <li>○시제품1,2에 대한 기능활성 평가</li> </ul>		유산균에서 유래된 EPS에 대한 면역 증강능력을 확인하여 막걸리에 대한 기능성 증강 가능성을 제시 시제품 1,2에 대한 기능 우수성을 확인 규명

## 제 2 절 연구개발 목표 달성도

### 1. 평가의 착안점에 따른 목표달성도

평가의 착안점	달성도	목표 달성도
<p><b>[세부과제]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 유산균 발효 제어 기술 확립</li> <li>● 유산균 막걸리 제품 개발 (시제품1)</li> <li>● 기능성 강화 유산균 막걸리 제품 개발(시제품2)</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>○막걸리 유래 유산균 배양 공정 구축(배지 등)</li> <li>○유산균 발효 제어 기술 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제어 공정 구축(발효 적용 순서, 시간, 비율)</li> </ul> </li> <li>○유산균 막걸리 제품 개발(시제품1)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>W. cibaria</i> KSD-914 유산균 단독 적용</li> <li>- Pilot scale 시험 생산 완료</li> </ul> </li> <li>○기능성 강화 유산균 막걸리 제품 개발(시제품2)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>W. cibaria</i> KSD-914, <i>P. pentosaceus</i> K5, <i>P. acidilactici</i> K5 복합 유산균 적용</li> <li>- Pilot scale 시험 생산 완료</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>[제1협동과제]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 생막걸리에 존재하는 유산균 확인</li> <li>● 생막걸리 유래 유산균의 기능성 검증</li> <li>● 생막걸리 유래 기능성 유산균의 probiotic 능력 확인</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>○전국 생막걸리에 존재하는 유산균의 종류 및 분류</li> <li>○전국 생막걸리에 유래 유산균의 항균활성 확인</li> <li>○전국 생막걸리에 유래 유산균의 GABA생성 확인               <ul style="list-style-type: none"> <li>- GABA생성이 우수한 유산균선발</li> <li>- GABA생성 관련 유전자 확보 및 효소 특성 확인</li> </ul> </li> <li>○전국 생막걸리에 유래 유산균의 EPS생성 확인               <ul style="list-style-type: none"> <li>- EPS생성이 우수한 유산균선발</li> <li>- 생성된 EPS의 종류 확인</li> <li>- EPS생성 관련 유전자 확보 및 효소 특성 확인</li> </ul> </li> <li>○생막걸리에 유래 기능성유산균의 내산성, 내담즙성 및 장 부착능 확인               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 내산성과 내담즙성이 우수한 유산균선발</li> <li>- 선발된 유산균의 장 부착능 확인</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>[제2협동과제]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 막걸리의 기능성 확인</li> <li>● 막걸리 기능성 원인 물질에 대한 탐색 및 평가</li> <li>● 기능성이 강화된 시제품 기능활성 평가</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>○기존 유통 막걸리에 대한 기능성 활성 평가를 통한 기능성 규명 확립</li> <li>○막걸리의 항암 효능에 대한 EPS의 기능성 활성 평가를 통한 새로운 방향성 제시               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 막걸리의 직접적인 항암능력 보다는 면역증강을 통한 항암효능 가능성을 확인</li> </ul> </li> <li>○기능성이 강화된 시제품을 이용하여 기존 유통제품과 비교 기능활성 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>W. cibaria</i> KSD-914, <i>Pediococcus</i> sp. 막걸리 제품을 통한 기능 우수성 여부를 확인.</li> </ul> </li> </ul>

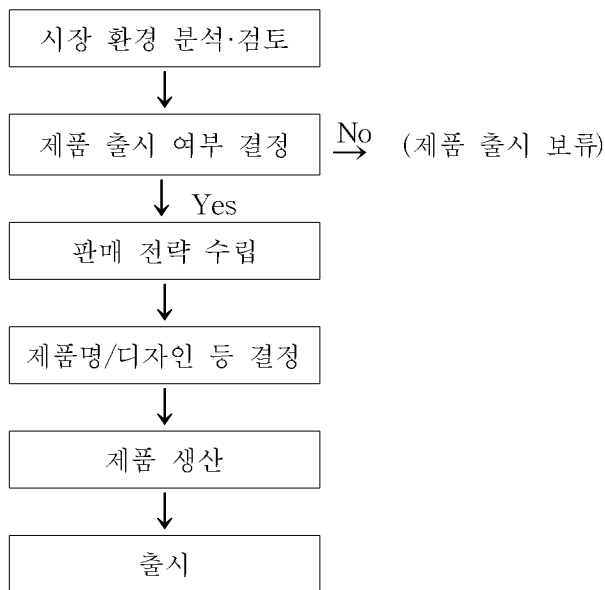


# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 1 절 실용화·산업화 계획

### 1. 시제품의 실용화·산업화 방안

- 실용화·산업화를 위한 시제품의 제조방법추가신고(국세청주류면허지원센터) : 2건[별첨]
- 막걸리 및 막걸리 유래 유산균에 대한 기능성을 규명하고 특정 기능성 유산균 발효를 접목한 제품으로써 막걸리의 가치를 한 단계 높일 수 있어 실용화 가치가 충분할 것으로 판단됨.
- (주)국순당 연구소, 마케팅 및 전략기획팀 주관으로 국내 막걸리 시장 현황 및 기술 경쟁력 등 시장 환경 검토 후 제품 출시 여부 결정할 예정임



○ 국내 막걸리 시장은 최근 10년간 4배 이상 성장해왔다. 2008년 이후 well-being 바람을 타고 판매가 늘기 시작해 2009년과 2010년에는 연평균 50%이상 급성장했다. 하지만 내수는 2011년 중반을 기점으로 성장세가 둔화됐고 수출도 급격히 줄어들고 있다. 저(低) 알코올 술 시장 경쟁 심화로 알코올 도수가 막걸리(6~7%)와 비슷한 와인이나 맥주 수입이 늘고 가격도 내려가면서 주류 소비자 선택의 폭이 넓어진 것도 원인 중 하나인 것으로 보고 있다. 따라서 막걸리 판매가 위축되어가고 있는 상황에서 본 연구개발을 통해 개발된 기능성 막걸리와 밝혀진 막걸리의 기능성을 바탕으로 다시 한 번 막걸리 시장을 일으킬 수 있도록 할 예정임



○ 시제품1에 대한 제조방법신고서

【주세사무처리규정 제50호 서식】

<h2 style="margin: 0;">탁주 제조방법추가 신청서</h2>										
근거 : 주세법 시행령 제65조 제1항										
신청인	① 제조장명칭	(주)국순당				② 전화번호	XXX-XXX-XXX			
	③ 대표자성명	배중호				④ 사업자등록번호	XXX-XX-XXXXX			
	⑤ 제조장소재지	강원도 횡성군 둔내면 현천리 81-3								
신 청 내 용										
⑥ 신청구분	제조방법추가				⑦ 제조방법기호	가	⑧ 변경시(종전번호)			
⑨ 상표명	(시제품1)				⑩ 알콜분규격	6%				
1. 입국 제조방법(원료명 : 쌀, 소맥분, 보리쌀, 옥분 등)										
원 료 배 합										
⑨ 원 료 명	⑩ 사용량 (kg)	⑪ 조제종국 (g)	⑫ 분말종국 (g)	⑬ 중국사용비율(%)						
<u>입국은 제조하지 않음</u>										
2. 밀술 제조방법										
원 료 배 합										
용기용량(ℓ)	⑭ 입국미(kg)	⑮ 효 모(g)	⑯ 누 룩(kg)	⑰ 젖 산(ml)	⑱ 급 수(ℓ)					
<u>밀술은 제조하지 않음</u>										
3. 주류1담금 제조방법 [백미, 소맥분, 전분당(농도) 등 발효원료는 품명별로 품명과 사용량을 기재]							4. 각종 수량 및 비율			
원료종류	주류 1 담금원료배합수량						발효제 당화력 (SP)	담금조 용기용량(ℓ)	10,300	
원료명	밀술	1단 담금	2단 담금	3단 담금	4단 담금	계				
⑰ 쌀		950kg	2,200kg			3,150kg		⑳ 최종담금 숙성술덧 예정수량 (ℓ)	7,534	
⑳ 전분당(백설탕)		48kg				48kg		㉑ 숙성술덧알코올분(%)	17.5	
㉒ 개량누룩		29kg	66kg			95kg	1,800	㉒ 후수수량(ℓ)	14,019	
㉓ 배양효모			32kg			32kg		㉓ 술지게미 수량(ℓ)	220	
㉔ 물		1,283ℓ	2,970ℓ			4,253ℓ		㉔ 제성수량(ℓ)	21,333	
㉕ 첨가물료								㉕ 대원료제성비율	677%	
주세법 시행령 제65조 제1항에 따라 신청합니다.										
2012년 6월 일										
신 청 인 (주)국순당 배 중 호 (서명 또는 인)										
세 무 서 장 귀 하										
첨부서류 : 제조공정 설명서 및 제조방법(신규, 추가, 변경)사유서 1부										

210mm×297mm(신문용지(54g/m<sup>2</sup>))

○ 시제품2에 대한 제조방법신고서

【주세사무처리규정 제50호 서식】

<b>탁주 제조방법추가 신청서</b>									
근거 : 주세법 시행령 제65조 제1항									
신청인	① 제조장명칭	(주)국순당			② 전화번호	XXX-XXX-XXXX			
	③ 대표자성명	배중호			④ 사업자등록번호	XXX-XX-XXXXX			
	⑤ 제조장소재지	강원도 횡성군 둔내면 현천리 81-3							
신 청 내 용									
⑥ 신청구분	제조방법추가				⑦ 제조방법기호	가	⑧ 변경시(종전번호)		
⑨ 상표명	(시제품2)				⑩ 알콜분규격	7%			
1. 입국 제조방법(원료명 : 쌀, 소맥분, 보리쌀, 옥분 등)									
원 료 배 합									
⑨ 원 료 명	⑩ 사용량(kg)	⑪ 조제종국(g)	⑫ 분말종국(g)	⑬ 중국사용비율(%)					
<u>입국은 제조하지 않음</u>									
2. 밀술 제조방법									
원 료 배 합									
용기용량(ℓ)	⑭ 입국미(kg)	⑮ 효 모(g)	⑯ 누 룩(kg)	⑰ 젖 산(ml)	⑱ 급 수(ℓ)				
<u>밀술은 제조하지 않음</u>									
3. 주류1담금 제조방법 [백미, 소맥분, 전분당(농도) 등 발효원료는 품명별로 품명과 사용량을 기재]							4. 각종 수량 및 비율		
원료종류	주류 1 담금원료배합수량						발효제 당화력 (SP)	담금조 용기용량(ℓ)	10,300
원료명	밀술	1단 담금	2단 담금	3단 담금	4단 담금	계			
⑰ 쌀		950kg	2,200kg			3,150kg	⑳ 최종담금 숙성술덧 예정수량(ℓ)	7,121	
⑱ 전분당(백설탕)		48kg				48kg	㉑ 숙성술덧알코올분(%)	16.5	
㉒ 개량누룩		190kg	440kg			630kg	㉒ 후수수량(ℓ)	9,366	
㉓ 배양효모			32kg			32kg	㉓ 술지게미 수량(ℓ)	220	
㉔ 물		1,045ℓ	2,420ℓ			3,465ℓ	㉔ 제성수량(ℓ)	16,267	
㉕ 첨가물료							㉕ 대원료제성비율	516%	
주세법 시행령 제65조 제1항에 따라 신청합니다.									
2013년 6월 일									
신 청 인 (주)국순당 배 중 호 (서명 또는 인)									
세 무 서 장 귀 하									
첨부서류 : 제조공정 설명서 및 제조방법(신규, 추가, 변경)사유서 1부									

210mm×297mm(신문용지(54g/m<sup>2</sup>))

## 제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획

### 1. 인력활용/양성 성과

총 인원	학위별 취득자			성별	
	박사	석사	학사	남	여
7		7		4	3

### 2. 연구 홍보 성과

#### 가. 연구에 대한 언론 홍보

(1) “하루에 반병, 세계와 함께 건강을 마신다”, 중앙일보(2011.06.28)

(2) “막걸리의 새 건강 효능 “비만 예방·염증 억제 효과 기대 돼” 헬스조선(2011.06)

#### 나. (주)국순당 직접 운영하고 있는 직원 및 일반인을 대상으로 한 우리술 교육에서 ‘막걸리의 기능성과 우수성’ 분야에서 교육 콘텐츠로 활용

## 제 3 절 특허·논문 등 지적재산권 확보 계획

### 1. 특허 출원 현황

#### 가. 내산성 및 내담즙성이 있는 와이셀라 시바리아 KSD-914

(1) 출원번호: 10-2012-0061554

(2) 출원일: 2012. 06. 08

(3) 발명자: 신우창, 박선영, 박종욱

#### 나. 프로바이오틱스 유산균의 함량 및 안정성이 높은 유산균 막걸리의 제조방법

(1) 출원번호: 10-2013-0022953

(2) 출원일: 2013. 03. 04

(3) 발명자: 신우창, 박선영, 박종욱

#### 다. 풍미와 안정성이 향상된 막걸리의 제조방법

(1) 출원번호: 10-2013-0053154

(2) 출원일: 2013. 05. 10

(3) 발명자: 신우창, 권희숙, 송숙희

### 2. 학술발표 대회(Poster Section)

Seok-Hwee Park, Jong-Hyun Jung, Dong-Ho Seo, Hye-Lim Lee, Gye-Won Kim, Sun-Young Park, Woo-Chang Shin, Sungyoul Hong, and Cheon-Seok Park, "Cloning and expression of dextransucrase, a dextran-synthesizing enzyme, from *Weissella* sp. KSD1 in *E. coli*", 2012 KFN International Symposium and Annual Meeting Quality of Life (QOL): Food Industry and Health

Eun-Jung Jeon, Jong-Hyn JUNG, Dong-Ho SEO, Ju-Hoon LEE, Sun-Young PARK,

Woo-Chang SHIN and Cheon-Seok PARK, "Genome Sequence of *Weissella* sp. KSD-1 Isolated from Korean Rice Wine", KMB's 40th Anniversary 2013 International Symposium & Annual Meeting

### 3. 논문 출판 및 투고 준비 사항

#### 가. 게재 논문

이상진, 김지혜, 정용우, 박선영, 신우창, 박천석, 홍성렬, 김계원, "시중 유통 막걸리의 유기산 조성 및 생리활성", *Korean J. Food Sci. Technol.* Vol. 43, No. 2, 206-212(2011)

Seok-Hwee Park, Jong-Hyun Jung, Dong-Ho Seo, Hye-Lim Lee, Gye-Won Kim, Sun-Young Park, Woo-Chang Shin, Sungyool Hong, and Cheon-Seok Park, "Differentiation of Lactic Acid Bacteria Based on RFLP Analysis of the *tuf* Gene", *Food Sci. Biotechnol.* 21(3):911-915 (2012)

#### 나. 투고 준비 중인 논문

국내 유통 생막걸리 20종의 유산균 분포(*Korean J. Food Sci. Technol.*)

Probiotics characteristics of *Pediococcus acidilactici* K5, *Pediococcus pentosaceus* K5 isolated from Korean rice wine, *Makgeolli* (Food Science and Biotechnology)

Whole genome sequencing of *Weissella* sp. KSD1

막걸리 유래 *W. cibaria* KSD-914 유산균을 이용한 막걸리 발효 시 이화학적 및 미생물학적 특성(*Korean J. Food Sci. Technol.*)

*W. cibaria* KSD-914에 의한 면역 증강에서 target protein(p38)에 대한 보다 다양한 upstream 을 확인하여 논문 게재 예정(*Journal of Microbiology and Biotechnology*)

### 4. 심포지엄 발표

#### 가. 주관 : 한국식품과학회

나. 일시 및 장소 : 2011.09.27. 포스텔타워3층

다. 발표 주제 및 연사 : 막걸리의 건강 기능성(신우창)

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. 해외 탁주 제조 및 판매 현황

주로 해외 수출을 통한 세계화에 힘썼던 막걸리가 이제는 해외에서 직접 막걸리를 제조하여 판매되기 시작했다. 2010년 전주시는 막걸리 생산업체인 A사와 캐나다 내의 교포 기업과 함께 현지공장 설립 협약식을 갖고 캐나다 토론토 인근의 마감시에 생막걸리 생산 공장을 세우기로 했다. 공장은 연간 5천 톤 안팎으로 생산할 수 있는 규모로 지어지며 생산된 생막걸리는 캐나다와 미국, 멕시코 등 북미 전역에 유통된다고 밝혔다. 또한 2013년 3월 미국 시카고 나일즈시에서도 막걸리가 현지 생산되기 시작했다. 국내 B업체와 시카고 한인 사업가가 상호계약을 맺고 설립한 것으로 막걸리 제조에 쓰이는 생쌀가루와 누룩, 효모 등 기본재료는 B사에서 직접 공급하는 것으로 밝혀졌다. 규모는 크지 않지만 미국에서 생산한 신선한 막걸리를 한인 동포들은 물론 미국 주류 사회에 선보일 수 있는 기회가 될 것으로 판단된다.

탁주 수출 동향을 살펴보면 농림축산식품부와 관세청, 통계청에 따르면 2012년 막걸리 수출 물량은 3만658톤으로, 정점을 찍었던 2011년(4만3082톤) 대비 29% 줄었다. 수출액도 3689만 3000달러를 기록해 전년대비 30% 감소했다. 지난 2009년부터 한류 붐으로 폭발적이던 성장세가 다소 꺾였다. 또한 막걸리 수출의 90%를 차지하던 일본에서도 소비자의 취향 변화, 엔저 정책 등으로 수출이 크게 감소하였다. 트렌드에 맞는 신제품 개발과 일본 비중이 큰 막걸리 수출도 중국 등으로 다변화해야 할 것으로 판단된다.

### 2. 주류에 대한 기능성 관련 연구

#### 가. 맥주

- 최근 맥주에 함유되어 있는 호프 성분이 근육의 위축을 억제하는 작용을 하는 것으로 밝혀짐. 연구팀은 호프에 함유된 플레닐화 플라보노이드가 근육 단백질의 분해를 촉진하는 효소의 생성을 억제하여 근육 위축을 막는 것으로 보고 있음
- 일본 삿포로 의대 연구팀은 맥주의 원료인 홉 안에 들어있는 humulon 이라는 물질이 호흡기 질환을 일으키는 호흡기 세포융합 바이러스(Respiratory Syncytial Virus, RSV)를 막는데 도움이 된다는 연구결과를 발표했다.
- 맥주의 주원료로 쓰이는 홉의 주성분인 xanthohumole의 항암 효과에 대한 연구 사례 보고

#### 나. 일본주(Sake)

- Koji에서 저분자 물질이 암 세포 독성 효과 및 NK lymphocyte의 활성을 증가를 규명함
- 통계학적으로 사케를 주로 음용할 경우 간암 발병률이 낮은 것으로 밝혀졌으나 어떠한 기전으로 인한 것인지는 계속적으로 연구가 진행되고 있다.
- Sake 및 sakekasu(술지게미)에서 peptide를 분리하여 angiotensin converting enzyme 저해 활성 및 urokinase 활성 증가에 관여해 혈전 생성 억제 효과를 확인하여 관상 동맥성 질환 억제 활성 규명

### 3. 주류에 존재하는 유산균

일본에서는 전통주인 *shochu*로부터 *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc*

*mesenteroides*, *Weissella cibaria*, *Lactobacillus lactis*, and *Eenterobacter faecium* 등의 유산균을 분리하였다. Red wine으로부터 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus lactis*, *Leuconostoc oenos* 등의 유산균이 분리된 것으로 알려져 있다.

#### 4. 유산균의 기능성

유산균은 포도당, 유당과 같은 탄수화물을 분해하여 젖산, 에탄올, 탄산가스 등을 생성하는 박테리아로서, 단백질을 비부패성으로 분해한다. 또한, 인체에 유익한 작용을 하며, 지금까지 알려진 300~400 종 정도의 유산균 중 20여 종이 발효제품을 만드는데 사용되고 있다. 사람의 장내에는 1000여 종 이상의 세균이 존재한다. 이 중에는 인체에 유해한 대장균, 장구균 등의 부패성 세균을 비롯하여 비피더스균과 같은 유익한 유산균이 장내균총을 이루고 있으며, 유산균의 비율이 높을수록 더 건강한 장내 환경이 조성된다. 살아있는 유산균을 섭취하여 유산균이 장내에 도달 및 증식이 가능할 경우 유산균은 부패성 균주와의 증식 장소 및 영양소 경쟁, 장내 pH의 저하 또는 항균성 물질 생성에 의한 부패성 균주 증식 저하, 그리고 장내 유해물질 분해 등을 통해 인체에 유익한 작용을 하게 된다. 또한, 유산균이 소화기관에서 사멸되더라도 유산균으로부터 유리되는 균체 성분이 장내 면역기능을 자극함으로써 면역력 강화에 도움을 줄 수 있다. 이 외에도 장운동 조절, 소화 흡수의 촉진 등 인체에 이로운 작용 및 효과에 대해 많은 연구결과가 발표되었으며, 최근에는 혈중 콜레스테롤 저하 효과 및 항암효과에 관한 연구 역시 보고되고 있고, 일부 유산균은 *r*-aminobutyric acid (GABA) 및 exopolysaccharide (EPS) 를 생성하는 것으로 밝혀졌다.

Exocellular polysaccharide (or Exopolysaccharide; EPS)는 박테리아와 미세조류가 자라면서 생성 및 배출하여 비영구적으로 세포 외벽에 부착되는 다당류 중합체이다. 이와 구조적으로 비슷하지만 세포 외벽에 영구적으로 부착되는 capsular polysaccharide (CPS)와는 구분된다. 균주에 따라 배출하는 EPS의 종류는 매우 다양하며, 이들은 주로 글루코오스, 갈락토오스, 람노오스로 이루어져 있고, 이들의 배합 비율에 따라서 종류와 특성이 구분된다. EPS 생성 시 균주 주변에 점액물질의 구조가 형성된다. EPS 생성 균주는 자신이 생성한 EPS를 에너지원으로 사용하지는 않으며 건조, 박테리오파지, 항생물질 등 외부 환경으로부터 균주를 보호하는 기능으로서 사용한다고 추정된다. 특히 발효유에서 유산균이 생성하는 EPS의 경우 발효유의 점도를 높여줌으로서 질감과 맛을 향상시키는데 도움을 준다. 또한, 이런 단순한 기호적 측면 외에도 EPS는 섭취 시 prebiotics로서 활용되기도 하며, EPS에 의해 유산균이 장내에 더 오랜 시간동안 머무르게 되면서 정착 및 증식할 수 있는 확률 상승 역시 기대할 수 있다. 최근에는 유산균 EPS의 항암효과, 면역학적 효과, 콜레스테롤 저하 효과 등에 대한 연구 결과가 보고되고 있다. 하지만, 와인 생산에 있어서는 이런 유산균의 EPS생산이 오히려 상품성을 저하시키기도 하며, EPS가 모여 만들어지는 생물막에 의해 생물 오염이 일어날 수도 있다는 단점이 있다.

GABA는 비단백질 아미노산으로서 포유류의 중추신경계에 주된 억제성 신경전달물질이며, GABA 생성균은 glutamic acid decarboxylase (GAD)를 이용하여 L-glutamate의 카르복시기를 제거함으로써 CO<sub>2</sub>와 함께 GABA와 에너지를 생성한다.

시넵스에는 세 가지의 GABA 수용체가 존재하는데, GABA 수용체 A와 B는 리간드개폐

형 통로로서 염소 이온 경로이며, GABA 수용체 C 는 G-단백질과 결합된 통로로서 칼륨 및 칼슘 이온 경로의 자극, 그리고 과분극을 통해 시냅스후 전위를 억제하게 된다. 즉, 체내 GABA 농도의 부족은 뇌전증, 파킨슨병, 정신분열, 치매 등의 신경장애를 유발하게 된다. 이러한 체내 GABA 생성 부족의 경우, 식품 또는 의약품을 통해 GABA를 섭취할 경우 앞에서 언급한 신경장애를 예방할 수 있다. 또한, GABA의 섭취는 기억력 증가, 뇌혈류 및 고혈압 정상화, 그리고 항우울 등에 효과가 있다. 인위적인 GABA의 생산에는 대체적으로 유산균이 사용되는데, 이는 유산균을 사용한 GABA 생산이 효율적이기도 하며 유산균은 GRAS (Generally recognized as safe)이기 때문이다.

이와 더불어 최근에는 대식세포의 활성화를 통한 면역 증강 작용 작용이 유산균의 중요한 기능으로 주목 받고 있다. 특히 대식세포는 숙주의 면역반응에 있어서 중요한 작용을 하는 세포로써 nitric oxide(NO)와 같은 신호전달을 매개하는 펩타이드를 분비하여 숙주의 면역을 효율적으로 조절할 수 있다. 유산균이 대식세포의 활성을 유도하여 면역을 증강시키는 효과가 있으며, 오리로부터 분리한 *Lactobacillus* 속이 균주의 면역 활성화에 기여한다는 연구가 현재까지 밝혀져 있다.

## 5. 유산균의 Probiotic

Probiotic는 장내에서 미생물의 균형을 개선함으로써 숙주에 대하여 유익하게 작용하는 미생물을 말하며 대표적으로 유산균이 분류된다. probiotics는 우리 몸이 노출되어 있는 다양한 환경, 예를 들면 항생제의 작용, 유해한 독성물질의 노출, 스트레스 등에도 불구하고 우리 몸의 적절한 균형을 유지할 수 있는 역할을 한다고 알려져 있다. 지금까지 알려진 유산균의 probiotics로서의 기능이 많은 연구를 통해서 막걸리에서도 밝혀지고 있으며 최근 들어 심혈관계 질환 예방이나 항 비만작용 등이 주요하게 연구되고 있다.

유산균이 probiotics로서 효과를 가질 수 있도록 하기 위해서는 다양한 조건이 충족되어야 하는데 가장 중요한 것은 유산균이 식품과 함께 우리 몸에 섭취되어 위에 도달하였을 때 위산과 같은 낮은 pH에 살아남아야 하고, 십이지장에 도달하였을 때는 담즙산에도 노출되기 때문에 이에 높은 내성을 가져야 한다. 또한 유산균이 장에 도착하여 증식하려면 장내의 세포에 우월하게 부착되어야 한다. 다양한 식품과 동물에서 분리한 유산균의 내산성과 내담즙성에 관한 연구는 오래 전부터 보고된 바, 유산균이 장에 부착되는 정도를 판단할 수 있는 장부착성에 관한 연구는 기존에 Caco-2 cells을 모델로 하여 진행되었다. 한국 전통 식품인 김치에서 발견되는 유산균을 분리하는 연구에서도 유산균의 내산성과 내담즙성, Caco-2 cell 부착능, 항균성 등을 토대로 유산균을 동정하고 있으며 우수한 probiotics로서 작용한다고 밝히고 있다



## 제 7 장 참고문헌

- [1] Yoo TJ, "Korean Famous Wine", Central New Book, Seoul, Korea. p96 (1981)
- [2] Kim JY, Sung KW, Bae HW, Yi YH. "pH, acidity, color, reducing sugar, total sugar, alcohol and organoleptic characteristics of puffed rice powder added takju during fermentation", *Korean J. Food Sci. Technol.* 39:266-271 (2007)
- [3] Lee CH. "History of Korean liquor", *Bioindus. News* 6: 4058-4061 (1993)
- [4] Korea Foods Association. Korean Food Standards Codex. Moonyoung Publishing Co., Seoul, Korea. p453-454 (2003)
- [5] Han EH, Lee TS, Noh BS, Led DS. "Quality characteristics in mash of takju prepared by using different nuruk during fermentation" *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 555-562 (1997)
- [6] Ishihara, Y., Oka, M., Tsunakawa, M., Tomita, K., Hatori, M., Yamamoto, H., Kamei, H., Miyaki, T., Konishi, M. and Oki, T., "Melanostatin, A New Melanin Synthesis Inhibitor. Production, Isolation, Chemical Properties, Structure and Biological Activity", *J. Antibiotics*, 44, 25-43(1991)
- [7] Kwak JH, Seo UK, and Han YH(2001) "Inhibitory effect of mugwork extracts on tyrosinase activity". *Korean J Biotechnol Bioeng* 16, 220-223
- [8] Parrado, J., M. Bougria, A. Ayala, A. Castano, and A. Machado. 1999. "Effects of aging on the various steps of protein synthesis: fragmentation of elongation factors 2", *Free Radical Biology & Medicine* 26: 362-370
- [9] Fisher, G. J., S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta, and J. J. Voorhees. 2002. "Mechanisms of photoaging and chronological skin aging". *Arch. Dermatol.* 138: 1462-1470
- [10] Jin, J., et al. 2008. "Diversity analysis of lactic acid bacteria in takju, Korean rice wine". *J. Microbiol. Biotech.* 10: 1678-1682
- [11] Poblet, M., et al. 2000. "Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA". *Letters in Applied Microbiology.* 31: 63-67

- [12] Sato, H., et al. 2000. "Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes in lactic acid bacteria isolated from red wine". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 90: 335-337
- [13] Kim, M and J. Chun. 2005. "Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis". *International Journal of Food Microbiology*. 103: 91-96
- [14] Kullen, M., et al. "Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus*". *Journal of Application and Microbiology*. 89: 511-516
- [15] Collins MD, Rodrigues U, Ash C, Aguirre M, Farrow J.A.E, Martinez Murcia A, Philips B.A, Williams AM, Wallbanks S. 2006. "Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA". *FEMS Microbiology Letters*. 77: 5-12
- [16] Chin HS, Breidt F, Fleming H. P., Shin WC, Yoon SS. 2006. "Identifications of predominant bacterial isolates from the fermenting kimchi using ITS-PCR and partial 16S rDNA sequence analyses". 2006. *Journal of microbiology and biotechnology*. 16(1): 68-76
- [17] N. Komatsuzaki, J. Shima, et al. 2005. "Production of *r*-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods". *Food Microbiology*. 22: 497-504
- [18] SY Cho, MJ Park, et al. 2011. "Production of high *r*-aminobutyric acid (GABA) Sour Kimchi using lactic acid bacteria isolated from Mukeunjee Kimchi". *Food Science and Biotechnology*. 20(2): 403-408
- [19] Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, Momose H, Kimura T. 2005. "Production of [gamma]-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods". *Food Microbiology* 22(6): 497-504
- [20] T. Saito. 2004. "Selection group of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* and their applications to functional foods". *Animal Science Journal*. 75(1): 1-13
- [21] R. Di Cagno, M. De Angelis, et al. 2006. "Glucan and Fructan production by Sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*". *Journal of Agricultural and*

Food Chemistry. 54(26): 9873-9881

- [22] Y. Zhang, L. Song, et al. 2012. "The two-step biotransformation of monosodium glutamate to GABA by *Lactobacillus brevis* growing and resting cells". Applied Microbiology and Biotechnology. 94(6): 1619-1627
- [23] Katina K, Maina NH, Juvonen R, Flander L, Johansson L, Virkki L, Tenkanen M, Laitila A. 2009. "In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough". Food Microbiology 26: 734-743
- [24] Ounaix MS,, Robert H,, Gabriel V, Morel S,, Remaud-Siméon M,, Gabriel B,, Fontagné-Faucher C. 2010. Characterization of dextran-producing *Weissella* strains isolated from sourdoughs and evidence of constitutive dextransucrase expression. FEMS Microbiol. Lett. 311(1): 18-26.
- [25] HJ Choi et al., Immuno-enhancing Effects of *Lactobacillus salivarius* JWS 58 and *Lactobacillus plantarum* JWS 1354 isolated from duck. Korean Journal of Veterinary Research, 2011. 51(4): p. 281-288.
- [26] L Jin, et al., Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chickenintestine. Letters in applied microbiology, 1998. 27(3): p. 183-185.
- [27] SM Lim, DS. Im, Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. Journal of microbiology and biotechnology, 2009. 19(2): p. 178-186.
- [28] Salminen, SJ., Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. International journal of food microbiology, 1998. 41(1): p. 45-51.
- [29] Ishihara, Y., Oka, M., Tsunakawa, M., Tomita, K., Hatori, M., Yamamoto, H., Kamei, H., Miyaki, T., Konishi, M. and Oki, T., "Melanostatin, A New Melanin Synthesis Inhibitor. Production, Isolation, Chemical Properties, Structure and Biological Activity", *J. Antibiotics*, 44, 25-43(1991)
- [30] Kwak JH, Seo UK, and Han YH(2001) "Inhibitory effect of mugwort extracts on tyrosinase activity". *Korean J Biotechnol Bioeng* 16, 220-223
- [31] Parrado, J., M. Bougria, A. Ayala, A. Castano, and A. Machado. 1999. "Effects of aging on the various steps of protein synthesis: fragmentation of elongation factors 2", *Free Radical Biology & Medicine* 26: 362-370

- [32] Fisher, G. J., S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta, and J. J. Voorhees. 2002. "Mechanisms of photoaging and chronological skin aging". *Arch Dermatol.* 138: 1462-1470
- [40] Huo H., Guo X., Hong S., Jiang M., Liu X., Liao K., 2003, "Lipid rafts/caveolae are essential for insulin-like growth factor-1 receptor signaling during 3T3-L1 preadipocyte differentiation induction", *J Biol Chem*, Mar 28;278(13):11561-9.
- [41] Garavello W, Maggioni D, Nicolini G, Motta L, Tredici G, Gaini R, 2010, "Association between metalloproteinases 2 and 9 activity and ERK1/2 phosphorylation status in head and neck cancers: an ex vivo study", *Oncol Rep.* ,24(4):1073-8.
- [42] Lee WJ, Chen WK, Wang CJ, Lin WL, Tseng TH, 2008, "Apigenin inhibits HGF-promoted invasive growth and metastasis involving blocking PI3K/Akt pathway and beta 4 integrin function in MDA-MB-231 breast cancer cells", *Toxicol Appl Pharmacol.*, 226(2):178-91.
- [43] Sen T, Dutta A, Chatterjee A, "Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) downregulates gelatinase-B (MMP-9) by involvement of FAK/ERK/NFkappaB and AP-1 in the human breast cancer cell line MDA-MB-231", 2010, *Anticancer Drugs.*, 21(6):632-44.
- [44] Li W, Li H, Bocking AD, Challis JR, 2010, "Tumor necrosis factor stimulates matrix metalloproteinase 9 secretion from cultured human chorionic trophoblast cells through TNF receptor 1 signaling to IKBKB-NFKB and MAPK1/3 pathway" *Biol Reprod.*, 83(3):481-7.
- [45] Joimel U, Gest C, Soria J, Pritchard LL, Alexandre J, Laurent M, Blot E, Cazin L, Vannier JP, Varin R, Li H, Soria C, 2010, "Stimulation of angiogenesis resulting from cooperation between macrophages and MDA-MB-231 breast cancer cells: proposed molecular mechanism and effect of tetrathiomolybdate", *BMC Cancer.*, 17;10:375.
- [46] Vaish V, Tanwar L, Sanyal SN, 2010, "The role of NF-κB and PPARγ in experimentally induced colorectal cancer and chemoprevention by cyclooxygenase-2 inhibitors", *Tumour Biol.*, 31(5):427-36.
- [47] Lobo SM, Quinto BM, Oyama L, Nakamichi R, Ribeiro AB, Zanella MT, Dalboni MA, Batista MC, 2012, "TNF-α modulates statin effects on secretion and expression of MCP-1, PAI-1 and adiponectin in 3T3-L1 differentiated adipocytes", *Cytokine.*, 60(1):150-6.
- [48] Yang J, Zhang W, Shi P, Chen J, Han X, Wang Y, 2005, "Effects of exopolysaccharide

fraction (EPSF) from a cultivated *Cordyceps sinensis* fungus on c-Myc, c-Fos, and VEGF expression in B16 melanoma-bearing mice”, *Pathol Res Pract.*, 201(11):745-50.

- [49] Matou S, Collicec-Jouault S, Galy-Fauroux I, Ratiskol J, Siquin C, Guezennec J, Fischer AM, Helley D, 2005, “Effect of an oversulfated exopolysaccharide on angiogenesis induced by fibroblast growth factor-2 or vascular endothelial growth factor in vitro”, *Biochem Pharmacol.*, 69(5):751-9.
- [50] Ricciardi A, Parente E, Zotta T, 2009, “Modelling the growth of *Weissella cibaria* as a function of fermentation conditions”, *J Appl Microbiol.*, 107(5):1528-35.
- [51] Yazdi MH, Mahdavi M, Kheradmand E, Shahverdi AR. 2012, “The preventive oral supplementation of a selenium nanoparticle-enriched probiotic increases the immune response and lifespan of 4T1 breast cancer bearing mice”, *Arzneimittelforschung*, 62(11):525-31.
- [52] Ye J, Zhang X, Dong Z, 1996, “Characterization of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene promoter: an AP1 complex and an Sp1-related complex transactivate the promoter activity that is suppressed by a YY1 complex”, *Mol Cell Biol.*, 16(1):157-67.
- [53] Naura AS, Kim H, Ju J, Rodriguez PC, Jordan J, Catling AD, Rezk BM, Abd Elmageed ZY, Pyakurel K, Tarhuni AF, Abughazleh MQ, Errami Y, Zerfaoui M, Ochoa AC, Boulares AH, 2013, “Minocycline blocks asthma-associated inflammation in part by interfering with the T cell receptor-nuclear factor  $\kappa$ B-GATA-3-IL-4 axis without a prominent effect on poly(ADP-ribose) polymerase”, *J Biol Chem.*, 288(3):1458-68.
- [54] Wang W, Xu GL, Jia WD, Ma JL, Li JS, Ge YS, Ren WH, Yu JH, Liu WB, 2009, “Ligation of TLR2 by versican: a link between inflammation and metastasis”, *Arch Med Res.*, 40(4):321-3.
- [55] Nagendraprabhu P, Sudhandiran G, 2011, “Astaxanthin inhibits tumor invasion by decreasing extracellular matrix production and induces apoptosis in experimental rat colon carcinogenesis by modulating the expressions of ERK-2, NF $\kappa$ B and COX-2”, *Invest New Drugs.*, 29(2):207-24.
- [56] Zhang JY, Selim MA, 2012, “The role of the c-Jun N-terminal Kinase signaling pathway in skin cancer”, *Am J Cancer Res.*, 2(6):691-8.
- [57] Wagner EF, Nebreda AR, 2009, “Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways

in cancer development”, *Nat Rev Cancer.*, 9(8):537-49.

[58] Carey CM, Kostrzynska M, 2013, “Lactic acid bacteria and bifidobacteria attenuate the proinflammatory response in intestinal epithelial cells induced by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium”, *Can J Microbiol.*, 59(1):9-17.

[59] Berlec A, Ravnkar M, Strukelj B, 2012, “Lactic acid bacteria as oral delivery systems for biomolecules”, *Pharmazie.*, 67(11):891-8.

## 주 의

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