

[별지 제32호 서식]

# 최 종 보 고 서

편집순서 1 (표지)

(뒷면)		(앞면)
<p data-bbox="128 1024 274 1109">주 의 (편집순서 8)</p> <p data-bbox="128 1220 296 1244">(15 포인트 고딕계열)</p> <p data-bbox="196 1260 229 1316">↑ 6cm ↓</p>	<p data-bbox="352 363 375 1125">전 통 막 걸 리 와 그 유 용 유 산 균 에 대 한 특 성 규 명 및 효 능 검 증</p> <p data-bbox="352 1220 375 1340">농 립 수 산 식 품 부</p> <p data-bbox="352 1364 375 1420">↑ 3cm ↓</p>	<p data-bbox="414 363 700 406">발간번호(11-1541000-001750-01) 5cm</p> <p data-bbox="672 430 688 454">↓</p> <p data-bbox="420 518 991 598">전통 막걸리와 그 유용 유산균에 대한 특성 규명 및 효능 검증 (Characterization and functional validation of traditional Makgeolli and its functional strains)</p> <p data-bbox="638 1061 722 1141">↑ 9cm ↓</p> <p data-bbox="543 1228 868 1252">농 립 수 산 식 품 부(17포인트 명조계열)</p> <p data-bbox="638 1308 672 1388">↑ 4cm ↓</p>

## 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “전통 막걸리와 그 유용 유산균에 대한 특성 규명 및 효능 검증에 관한 연구”에 대한 최종보고서로 제출합니다.

2012년 12월 29일

연구기관명 : 전북대학교

## 연 구 진

연구기관명 : 전북대학교

연구책임자 : 차연수

책임연구원 : 차연수

연구보조원 : 문연정

연구보조원 : 박정은

연구보조원 : 김민아

연구보조원 : 문혜정

연구보조원 : 배초롱

제2세부과제

책임연구원 : 백상호

연구보조원 : 송영란

연구보조원 : 송노을

연구보조원 : 김종희

연구보조원 : 이선희

## 요 약 문

### I. 제 목

전통 막걸리와 그 유용 유산균에 대한 특성 규명 및 효능 검증

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

한식문화를 대표하는 전통문화유산인 막걸리는 많은 장점에도 불구하고 전반적인 우호도가 낮은 상황이 지속되고 있고 외국산 수입주류인 와인 및 청주 등에 비해 소외시 되고 인식이 평가 절하되어 있는 실정임. 따라서, 한식의 기능성을 높이고 그 우수성을 과학적으로 규명하여 한식의 소비촉진을 유도하고자 전통방식으로 제조된 대표 막걸리로부터 각각의 추출물에 대한 기능성을 세포 및 실험동물모델을 통해 검증하고 그 유효성분을 밝히고자 하였음. 또한, 전통막걸리로부터 유산균주를 분리하고, 기능성성분인 추출물을 확보하고자 하였으며, 이들의 *in vitro* 생리화학적 특성과 *in vivo* 세포주 실험을 통해 기능성을 탐색하고자 하였음. 이로써 한식의 한상차림에 필수적인 우리 술 막걸리의 우수성을 과학적으로 규명하고자 함.

### III. 연구개발 내용 및 범위

1. 전통방식으로 제조되는 막걸리의 품질표준화를 위하여 누룩의 함량과 막걸리 품질과의 상관관계를 파악하고자 하였음.
2. 표준화된 전통방식에 의해 제조된 막걸리의 추출물을 준비하여 *in vitro* 수준에서 항산화 관련 기능성을 확인하고 다양한 세포주 및 만성 알코올 섭취 실험동물모델을 이용하여 기능성을 검증 하였음.
3. 전통 막걸리로부터 생리활성물질을 분리, 정제 및 그 특성을 확인함.
4. 전통 막걸리로부터 유산균주를 분리하고, 대사산물의 항산화 활성, 유산균 추출물의 항균활성 분석을 통하여 기능성 유산균주를 선별 및 동정하였음.
5. 다양한 세포주 및 고지방식이섭취 실험동물모델을 이용하여 유산균주의 기능성을 검증 하였음.
6. 선별된 기능성 유산균의 생화학적 특성 및 probiotics로서의 검증을 위한 내산성, 내담즙성 및 장내점착능을 시험하였으며, 기능성 유산균이 생성하는 세포외다당류의 특성을 조사하였음.

### IV. 연구개발결과

1. 누룩만을 사용하여 전통방식으로 제조되는 막걸리의 품질표준화를 위하여 누룩함유량을 달리하여 막걸리의 품질특성을 분석한 결과, 양조 및 품질특성, 항산화능 및 관능 특성 결과를 바탕으로 10%(w/v) 누룩으로 제조된 막걸리가 가장 적합하였음.

2. 다양한 세포주를 이용하여 표준화된 전통 막걸리의 용매별 추출물의 기능성을 시판 막걸리와 비교 하였음. 또한, 표준화된 전통 막걸리 및 알코올을 제거한 전통 막걸리에 대한 지질 대사 및 간 기능 개선 효과를 확인한 결과 알코올을 제거한 막걸리에서 혈중 GOT 및 GPT 농도 개선 및 지질대사 관련 유전자의 개선 효과를 나타내었음.
3. 전통 막걸리로부터 항산화능을 보유하는 peptide를 분리 및 정제하였음.
4. 전통 막걸리로부터 분리된 유산균주를 대상으로 *B. cereus*에 대한 뛰어난 항균활성 및 균주 배양액으로부터 분리된 세포외다당류의 높은 항산화능을 바탕으로 strain M76이 기능성 유산균주로 선발되었으며, 16S rDNA sequencing 및 생화학적 특성 결과를 바탕으로 *Pediococcus acidilactici* 로 동정되었음.
5. *P. acidilactici* M76 (PA)은 뛰어난 내산성, 내담즙성 및 장내점착능을 나타내면서 probiotics로서의 가능성이 검증되었음.
6. 다양한 세포주를 이용하여 PA의 기능성을 스크리닝하고, PA 및 이에 대한 공시 균주의 항비만 효과를 고지방식이 섭취 실험동물모델을 이용하여 확인한 결과 PA 섭취 그룹에서 항비만 효과를 나타내었음.
7. PA는 또한 glucose만으로 이루어진 약 67.2 kDa 분자량을 가지는 뛰어난 항산화능을 보유하는 세포외다당류를 생성할 수 있었으며, 그 생산성은 2,048 mg/L 수준임.

## V. 연구성과

1. 특허 : 막걸리로부터 분리된 유용 유산균과 그 대사산물 (No. 10-2012-0025644), 백상호, 차연수, 송영란
2. 논문
  - *Latobacillus plantarum* LG-42 isolated from Gajami Sik-Hae Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocyte, BioMed Research International(SCI), *in press*
  - Exopolysaccharide Produced by *Pediococcus acidilactici* M76 isolated from the Traditional rice wine, Makgeolli, Journal of Microbiology and Biotechnology(SCIE), *under revision*
3. 학술발표
  - *Padiococcus Acidilactici* (PA) Isolated from Traditional Makgeolli have Cellular Protective and Anti-Lipid Accumulation Effects on Various Cell Lines, 한국식품영양과학회, 2012.11.01.
  - Characterization of *Pediococcus acidilactici* M76 Isolated from Traditional Korean Rice Wine, Makgeolli as Probiotics, 한국식품영양과학회, 2012.11.01.

## SUMMARY

### (영문요약문)

#### I. Contents and range of research and development

1. The analysis a correlation between nuruk content and makgeolli quality for standardization of traditionally prepared makgeolli was conducted.
2. The extracts of the standardized traditional makgeolli was prepared and analysis of functional characteristics of the extracts was confirmed.
3. We investigated the cellular protective and lipid accumulation inhibitory effect of makgeolli extract, *P. Acidilactici* (PA) and EPS isolated from traditional makgeolli on 3T3-L1, RIN-m5F, HepG2 and SK-N-SH cell lines.
4. A bioactive peptide from makgeolli was isolated, purified, and charactezied.
5. Among lactic acid bacteria isolated from traditional makgeolli, a fuctional strain was selected based on results of antimicrobial activity and antioxidant activity of its metabolite and identified.
6. To investigate the anti-obesity effect of PA extract on diet-induced obesity using rodent model.
7. To find the effects of traditional makgeolli supplementation on lipid profiles, alcohol clearance and enzymes related to alcohol metabolism in chronically alcoholic rats.
8. To verify suitability as probiotics, biochemical properties on acid resistance, bile-acid resistance, and adhesive property was examined and characterization of exopolysaccharide procued by a selected strain was investigated.

#### II. Results of research and development

1. To standardize makgeolli quality prepared traditionally using nuruk, the makgeolli with different nuruk contents were prepared and the quality characteristic was invetrigated. As a result, makgeolli prepared using 10%(w/v) nuruk was the most suitable.
2. The cellular protective and lipid accumulation inhibitory effect of PA, EPS and makgeolli extracts on 3T3-L1, RIN-m5F, HepG2 and SK-N-SH cell lines.
3. A peptide isolated and purified from traditional makgeolli showed excellent antioxidant activity.
4. To screen a functional lactic acid strain from makgeolli, the analyses of antimicrobial effect of cell extract on *B. cereus* and antioxidant effect of exopolysaccharide extracted from cell culture were conducted. Based on the results, a strain M76 was selected as a functional strain and identified as *Pediococcus acidilactici* by 16S rDNA sequencing and biochemical analyses.
5. *P. acidilactici* M76 is suitable for probiotics since a strain M76 showed a distinguished ability on acid resistance, bile-acid resistance, and adhesive property.

6. We suggest PA extract exert an anti-obesity effect in C57BL/6J mice by enhancing the lipid metabolism.
7. Supplementation of makgeolli prevents metabolic disorders induced by chronic administration of alcohol.
8. *P. acidilactici* M76 produces exopolysaccharide 2,048 mg/L which was consisted only glucose with molecular weight of about 67.2 kDa and showed excellent antioxidant activity.

## CONTENTS

### (영 문 목 차)

Summary	10
I. Introduction	12
II. Materials and Methods	15
1) Chapter 1	15
1. Sample preparation	15
2. Lipid accumulation and proliferation inhibition effect of samples (PA, EPS and makgeolli) on 3T3-L1 cell line	15
3. Protective effect of samples (PA, EPS and makgeolli) on RIN-m5F against alloxan induced toxicity	16
4. Protective effect of samples (PA, EPS and makgeolli) on HepG2 against CCl <sub>4</sub> induced toxicity	16
5. Protective effect of PA samples on SK-N-SH against A $\beta$ induced toxicity	16
6. Effects of makgeolli sample (0% and 10%) on lipid metabolism and alcohol clearance in rat	17
7. Antiobesity effect of PA sample against diet induced obesity in C57BL/6J mice	18
2) Chapter 2	21
1. Analysis of functional characteristics of the extracts of the standardized traditional makgeolli and the isolation of bioactive metabolites from makgeolli	21
1.1. Materials	21
1.2. The establishment of manufacturing process for standardization of makgeolli	21
1.3. Analysis of functional characteristics of the extracts of the standardized traditional makgeolli	26
1.4. The isolation, purification, and characterization of bioactive peptide from makgeolli	28
2. The isolation of lactic acid bacteria from traditional makgeolli and the screening of a functional strain	30
2.1. Materials	30
2.2. The isolation of lactic acid bacteria from traditionally prepared makgeolli	30
2.3. The screening of a lactic acid bacteria producing a functional metabolite	30
2.4. Antimicrobial effect of the crude extract of <i>P. acidilactici</i> M76	32
2.5. Identification of a selected lactic acid bacteria	33
2.6. Characterization of selected functional lactic acid bacteria	34



2.7. Production of exopolysaccharide by <i>P. acidilactici</i> M76 . . . . .	35
2.8. Characterization of exopolysaccharide produced by <i>P. acidilactici</i> M76 . . . . .	35
2.9. Adhesive property of a <i>P. acidilactici</i> M76 strain . . . . .	36
3. Statical analyses . . . . .	37
III. Results and Discussion . . . . .	38
1) Chapter 1 . . . . .	38
1. Screening of functional property of PA extract using cell lines . . . . .	38
2. Screening of functional property of EPS extract using cell lines . . . . .	42
3. Screening of functional property of makgeolli sample using cell lines . . . . .	45
4. Selection of functional target using PA extract and makgeolli . . . . .	51
5. Effects of makgeolli sample (0% and 10%) on lipid metabolism and alcohol clearance in rat . . . . .	51
6. Antiobesity effect of PA sample (reference stain and PA) sample against diet induced obesity in C57BL/6J mice . . . . .	54
2) Chapter 258 . . . . .	
1. Analysis of functional characteristics of the extracts of the standardized traditional makgeolli and the isolation of bioactive metabolites from makgeolli . . . . .	58
1.1. The establishment of manufacturing process for standardization of makgeolli . . . . .	58
1.2. Analysis of functional characteristics of the extracts of the standardized traditional makgeolli and the isolation of bioactive peptide from makgeolli . . . . .	69
2. The isolation of lactic acid bacteria from traditional makgeolli and the screening of a functional strain . . . . .	75
2.1. The isolation of lactic acid bacteria from makgeolli and the screening and characterization of a functional lactic acid bacteria . . . . .	75
2.2. Production and characterization of exopolysaccharide by <i>P. acidilactici</i> M76 . . . . .	82
IV. Conclusion . . . . .	88
V. References . . . . .	89

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 전통 막걸리와 그 유용 유산균에 대한 특성 규명 및 효능 검증 (영문) Characterization and functional validation of traditional Makgeolli and its functional strains		
연 구 기 관	전북대학교	연 책 임 자	(소속) 전북대학교
참 여 기 관			(성명) 차 연 수
연 구 비	계	150,000,000	총 연 구 기 간 2011. 12. 30~2012. 12. 29( 1년)
참 여 연 구 원	11명 (연구책임자: 1명, 책임연구원: 명, 연구원: 1명, 연구보조원 9명)		
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <p>▶ 전통 방식으로 제조된 막걸리의 우수성을 미생물학적인 관점 (기능성 유산균 과 영양학적인 관점 (기능성 영양성분의 세포주 및 실험동물모델 연구)에서 과학적으로 증명하고자 함.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 전통방식으로 제조되는 막걸리의 품질표준화를 위하여 누룩의 함량과 막걸리 품질과의 상관관계를 파악하고자 하였음.</li> <li>2. 표준화된 전통방식에 의해 제조된 막걸리의 추출물을 준비하여 in vitro수준에서 항산화 관련 기능성을 확인하고 다양한 세포주 및 만성 알코올 섭취 실험동물모델을 이용하여 기능성을 검증 하였음.</li> <li>3. 전통 막걸리로부터 생리활성물질을 분리, 정제 및 그 특성을 확인함.</li> <li>4. 전통 막걸리로부터 유산균을 분리하고, 대사산물의 항산화 활성, 유산균 추출물의 항균활성 분석을 통하여 기능성 유산균주를 선발 및 동정하였음.</li> <li>5. 다양한 세포주 및 고지방식이섭취 실험동물모델을 이용하여 유산균주의 기능성을 검증 하였음.</li> <li>6. 선발된 기능성 유산균의 생화학적 특성 및 probiotics로서의 검증을 위한 내산성, 내담즙성 및 장내 정착능을 시험하였으며, 기능성 유산균이 생성하는 세포외다당류의 특성을 조사하였음.</li> </ol> <p>○ 연구결과</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 누룩만을 사용하여 전통방식으로 제조되는 막걸리의 품질표준화를 위하여 누룩함유량을 달리하여 막걸리의 품질특성을 분석한 결과, 양조 및 품질특성, 항산화능 및 관능 특성 결과를 바탕으로 10%(w/v) 누룩으로 제조된 막걸리가 가장 적합하였음.</li> <li>2. 다양한 세포주를 이용하여 표준화된 전통 막걸리의 용매별 추출물의 기능성을 시판 막걸리와 비교 하였음. 또한, 표준화된 전통 막걸리 및 알코올을 제거한 전통 막걸리에 대한 지질대사 및 간 기능 개선 효과를 확인한 결과 알코올을 제거한 막걸리에서 혈중 GOT 및 GPT 농도 개선 및 지질대사 관련 유전자의 개선 효과를 나타내었음.</li> <li>3. 전통 막걸리로부터 항산화능을 보유하는 peptide를 분리 및 정제하였음.</li> </ol>			

4. 전통 막걸리로부터 분리된 유산균주를 대상으로 *B. cereus*에 대한 뛰어난 항균활성 및 균주 배양액 으로부터 분리된 세포외다당류의 높은 항산화능을 바탕으로 strain M76이 기능성 유산균주로 선발되었으며, 16S rDNA sequencing 및 생화학적 특성 결과를 바탕으로 *Pediococcus acidilactici*로 동정되었음.
  5. *P. acidilactici* M76 (PA)은 뛰어난 내산성, 내담즙성 및 장내점착능을 나타내면서 probiotic로서의 가능성이 검증되었음.
  6. 다양한 세포주를 이용하여 PA의 기능성을 스크리닝하고, PA 및 이에 대한 공시 균주의 항비만 효과를 고지방식이 섭취 실험동물모델을 이용하여 확인한 결과 PA 섭취 그룹에서 항비만 효과를 나타내었음.
  7. PA는 또한 glucose탄으로 이루어진 약 67.2 kDa 분자량을 가지는 뛰어난 항산화능을 보유하는 세포외다당류를 생성할 수 있었으며, 그 생산성은 2,048 mg/L 수준임.
- 연구성과 및 성과활용 계획
1. 특허 : 막걸리로부터 분리된 유용 유산균과 그 대사산물 (No. 10-2012-0025644), 백상호, 차연수, 송영란
  2. 논문
    - *Latobacillus plantarum* LG-42 isolated from Gajami Sik-Hae Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocyte, BioMed Research International(SCI), *in press*
    - Exopolysaccharide Produced by *Pediococcus acidilactici* M76 isolated from the Traditional rice wine, Makgeolli, Journal of Microbiology and Biotechnology(SCIE), *under revision*
    - *Padiococcus Acidilactici* (PA) Isolated from traditional makgeolli inhibits lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte and obesity in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. 진행중.
  3. 학술발표
    - *Padiococcus Acidilactici* (PA) Isolated from Traditional Makgeolli have Cellular Protective and Anti-Lipid Accumulation Effects on Various Cell Lines, 한국식품영양과학회, 2012.11.01.
    - Characterization of *Pediococcus acidilactici* M76 Isolated from Traditional Korean Rice Wine, Makgeolli as Probiotics, 한국식품영양과학회, 2012.11.01.
    - *Padiococcus Acidilactici* (PA) Isolated from traditional makgeolli inhibits lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte and obesity in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. Experimental Biology, Boston, USA, 2013.04.20. No. 6299 예정.

## I. 머리말

한국의 대표적인 전통술인 막걸리는 우리나라 고유의 술로서 천여 년 이상 양조되어 왔으며 탁주 또는 농주(農酒)라고도 하며, 주세법상 전분질 원료와 곡을 주원료로 하여 발효시킨 술덧을 혼탁하게 제정한 것을 말함. 막걸리는 다른 주류에 비해, 알코올 도수가 상대적으로 낮고 곡류를 이용한 발효식품으로서 위에 부담을 주지 않을 뿐 아니라, 단백질,식이섬유, 당질이 풍부하게 함유되어 있고, 비타민 B 복합체, 술 발효 중 효모 및 유산균에 의해 생성된 다양한 유기산과 inositol, acetylcholine, 리보플라빈 등 각종 유용한 생리활성 물질을 포함하고 있으며, 인체 내 신진대사에 관여하는 10여종의 필수 아미노산을 함유하고 있는 것으로 알려져 있음(Lee 등, 2011). 특히 다량의 유산균을 함유하고 있는 것으로 알려짐에 따라서 막걸리는 영양학적, 기능적 가치가 높은 전통의 술로 그 가치가 재평가 되고 있음. 최근 일본, 중국 등에서 막걸리에 관한 관심은 해외에서 신도하는 역류 현상을 보이며, 막걸리의 기능성과 함께 수출량이 증가함에 따라서 막걸리의 세계화의 가능성을 입증함. 이러한 영향으로 최근 국내에서도 전통주인 막걸리에 대한 관심이 급증하고 있으며 이에 따른 각종 기능성 막걸리의 개발이 이루어지고 있으나, 현재까지도 특정계층과 지역에서만 선호도를 보일뿐 전반적인 우호도가 낮은 상황이 지속되고 있음. 특히 서구지향적인 라이프스타일의 가속화와 더불어 외국인 수입주류인 와인 및 청주 등에 비해 소외되고 인식이 평가 절하되어 있는 실정임. 이러한 경향은 와인, 청주 등은 그에 대한 우수성을 과학적으로 다양하게 규명하고 있는 반면 막걸리가 지닌 기능성 및 건강성에 대한 과학적인 연구들이 많이 이루어져 있지 않아 막걸리의 건강성에 대한 타당성 입증에 어렵기 때문에 결과적으로 대외 홍보용으로 소비를 촉진시키기 어려운 상태임. 일본의 경우 일본 각 지역 고유의 쌀과 물을 원료로, 지방 특유의 제조법으로 이어 온 일본 청주는 이제 쌀 소비 확대를 위한 지역 특산품에서 벗어나 일본 유주문화와 결합된 고부가가치 수출품으로 발전해 나가고 있음. 또한, 칠레의 와인 같은 경우 대대적이며 체계적인 연구 전략을 통하여 칠레에서 생산하는 포도와 그것으로 만들어지는 와인에 대한 인식이 '가격 대비 좋은 품질의 와인' 그 이상의 명성을 얻게 하였음. 우리 고유의 전통 발효주를 포함한 한식의 세계화는 음식과 문화를 수출한다는 부분에서도 큰 의미가 있을 것으로 사료됨. 즉, 일본의 사계 문화가 고풍·고급스러운 문화로 일식과 함께 세계화 작업에 함께 이바지한 것처럼 막걸리도 친숙하면서도 고급스러운 이미지로 한식과 더불어 세계화에 함께 이바지 할 수 있을 것으로 사료됨.

그러나, 현재 이러한 막걸리는 지금까지 단일 균주를 사용한 일본식 제조방식에 대부분 의존해 오면서 획일화되어 전통적으로 제조된 막걸리에 비하여 독특한 향이 없고, 아미노산 함량이 낮으며, 입국에서 오는 유기산의 신맛이 지나치게 강하여 독특한 고유의 맛과 풍미가 사라지고 밋밋한 맛을 지닌 좋지 않은 술로 하향 평준화 경향을 나타내고 있음. 전통적인 제조방법에 의해서 생산되어 왔던 우리의 전통 막걸리는 누룩으로부터 유래되는 다양한 미생물의 기작에 의하여 발효기질인 전분을 곰팡이의 amylase로 당화하고, 만들어진 당을 효모가 알콜로 전환함. 또한 그 안에서 유산균은 발효 초기과정에서 발효액의 pH를 빠르게 낮추어 잡균의 오염을 막는 역할과 함께 막걸리의 맛과 향미를 증진 시킬 뿐만 아니라 아미노산, 유기산, 폴리페놀류 등의 영양성분을 생성하는 것으로 알려짐. 이렇듯 누룩으로부터 유래한 미생물들이 막걸리 발효에 다양한 영향을 미침에도 불구하고 누룩에서 분리된 곰팡이를 사용한 막걸리 제조(Lee 등, 2002), 누룩 유래 곰팡이의 액화력, 당화력 및 생분분해력 등의 효소활성 검토(Kim 등, 1998) 또는 전분분해활성과 알코올 발효능 보유 효모 육종(Ju 등, 2008) 등 몇몇의 연구만이 이루어져 있음. 특히 와인 발효에 있어서 유산균은 맛과 향미 증진에 영향을 미친다고 알려져 있고, 특히 유산균 유래의 발효 대사산물의 향균, 항암, 면역증진 및 성인병 예방 효과에 대한 많은 연구들이 수행되었으며, 발효시 유산균이 와인의 기능성에 미치는 영향이 큰 것으로 알려져 있음. 막걸리의 유산균의 균종(diversity)에 대한 연구에 의하면 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* 및 *Pediococcus* sp. 등 다양한 유산균이 존재하는 것으로 알려짐(Jin 등, 2008; Seo 등 2007). Kwon 등(2012)은 전통적인 방식으로 제조되는 금정산성 막걸리의 발효기간 동안 *Lactobacillus* 속(*L. curvatus*, *L. kisonensis*, *L.*

*plantarum*, *L. sakei* 및 *L. gasserii*)이 5종, *Pediococcus* 속(*P. acidilactici*, *P. parvulus*, *P. agglomerans*, *P. pentosaceus*)이 4종 그리고 *Enterobacteriaceae*과에 속하는 *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*와 *Citrobacter freundii*을 포함하는 12종의 유산균군을 확인하였고, Kim 등(2011)은 막걸리의 저장기간 중 *L. harbinensis*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. perolens*, *L. gallinarum*, *L. brevis*, *P. acidilactici*, *Oryza sativa* 등의 유산균이 존재한다고 보고하였음. 또한 Hoon 등(2013)의 연구결과에 의하면 다양한 지역으로부터 수집된 누룩으로부터 *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Weissella paramesenteroides*, *W. cibaria*의 다양한 유산균이 존재하여 이러한 유산균들이 막걸리 발효에 직접적으로 관여할 것이라 예상할 수 있음. 그러나 이러한 유산균들의 역할에 대한 체계적인 연구는 이루어지지 않고 있어 명확하게 막걸리 속에 함유된 유산균으로부터 유래되는 건강 기능적 효과에 대한 체계적인 연구 및 과학적인 데이터는 매우 미미한 수준임.

전통적인 제조방식에 의한 막걸리는 누룩 중의 미생물에 의한 효소작용으로 원료성분이 분해되어 생성되는 당분, 아미노산, 유기산 등의 맛성분과 효모나 젖산균 등의 미생물에 의한 알코올 발효로 향미 성분이 생성되어 색과 함께 탁주의 품질이 조화를 이룸(Han 등, 1997). 술의 품질은 술을 담금하기 위하여 사용하는 원료와 담금 방법에 따라 좌우되며, 사용균주 등에 따라서도 매우 특유한 향미를 형성함(Lee 등, 2007) 막걸리의 표준화를 위한 지표는 여러 가지가 있을 수 있으나 막걸리의 전통식 제조 방법 중에 미생물원으로 제공되는 누룩에 대한 표준화가 가장 중요한 선결 요건임. 특히 누룩은 제조원, 제조일, 제조장소 및 그 방법 등에 따라 미생물 균종의 변화가 심하고 당화력이 제각기여서 누룩을 사용한 전통 막걸리 제조방식의 표준화에 있어서 가장 큰 변수로 작용하고 있음. 즉, 전통적인 막걸리 양조에는 누룩이 주발효제로 사용되고, 재래누룩에는 곰팡이, 효모, 젖산균, 고초균 등의 여러 종류의 미생물이 생육하므로 막걸리 담금에 사용하는 누룩의 종류 및 그 양에 따라 이들 미생물에 의한 효소활성, 유기산 생산력 및 알코올 발효력 등이 상이하여 막걸리의 맛, 향기, 색 등의 품질 차이가 예상됨. 막걸리에 사용하는 전분질원료, 누룩, 용수, 용기에 따라 막걸리의 주질이 차이가 있으나 이중 누룩의 영향이 가장 큼(Han 등, 1997). 현재까지 막걸리 관련 연구는 원료와 누룩의 종류에 따른 막걸리 품질 특성(Song and Park, 2003; Lee 등, 1996)과 술덧의 성분 변화 그리고 향기 성분에 대한 내용(Lee 등, 1996; Lee 등, 2007), 막걸리 술덧 중의 미생물 분류에 관한 내용(11), 막걸리 발효 중 유기산 성분 분석(Lee 등, 2011), 효모를 이용한 막걸리 품질 특성에 대한 내용(Jeon 등, 2012), 그리고 생리 활성에 대한 연구로 triglyceride와 total cholesterol 등 혈중지질 감소 효과(Kim 등, 2001) 등이 보고되어 있음. 그러나, 전통 막걸리의 장점을 살린 현대화를 위한 제조공정의 표준화 및 제조공정과 관련된 품질 지표에 대한 보고는 없음.

우리나라는 삼한시대부터 곡주를 바탕으로 전통주를 제조해왔으며 삼국 및 통일신라를 거쳐 고려시대에 이르러 송과 원의 양조법이 도입되면서 곡류 양조법이 발달하게 되었음. 고려 인종원년(仁宗元年)에 송나라 사신인 '서공'의 [고려도경]에 보면 고려초에 술은 미곡(米穀)으로 빚었는데 찹쌀이 없고 모두 맷쌀에 누룩을 넣어 술을 빚었다는 기록이 있음(Lee 등, 2010). 즉, 전통적인 방식으로 제조되는 쌀 막걸리는 불린 쌀로 고두밥을 만든 후, 양조용수를 넣고 누룩을 첨가하여 숙성시킨 것을 말함. 그 중 방문주는 진도지방, 밀양지방 등 옛 주막에서 상용화 되던 주품으로 [고려대 규합총서], [술빚는법], [음식방문], [시의전서], [주방문], [규합총서], [고려대 한국민속대관] 등 여러 문헌에서 등장하는 과거 전국적으로 빚어 졌던 술로 대중적이며, 물 양이 많은 술로 경제성이 높고 상대적으로 다른 술 빚기에 비해 빚기 쉬운 술임. 이러한 방문주는 빚는 방법(술제조법) 또한 지역에 따라 매우 다양한 형태로 발전되어왔으며, 주로 죽, 설기, 범벅의 형태로 즐겨 제조함. 대표적으로 경상도에서 사용되는 방문에는 죽을 밀술로 빚는 세가지 방문이 알려져 있으며, 이는 발효기간이 매우 짧고, 성적이 급한 술이지만 술 맛이 부드럽고 도수가 낮은 것이 특징임. 반면 설기 떡으로 빚어지는 것으로 전해지는 전라도 지역의 방문주는 감칠맛이 뛰어나고 술 향이 좋은 특징이 있음. 전라도에서 사용한 방문은 예로부터 누룩제조여건이 갖추어지지 않아 누룩의 발효력(역가)이 매우 낮았으며, 이로 인해 많은 양의 누룩을 사용할 수 밖에 없는 제조

방식을 택하였음. 이러한 많은 양의 누룩의 사용은 강한 누룩취와 함께 술의 품질을 열화시키는 요인이 되고 있음. 그러나, 현대에 들어서 누룩 제조 여건의 개선으로 인하여 누룩의 당화력이 강해짐에 따라 전통적인 방식으로 제조한 방문주의 경우, 누룩의 사용량이 과다해지면 알콜생성에 비해서 당화가 급격하게 진행되고 당내성이 약한 효모의 군집에 영향을 미쳐 발효가 제대로 진행이 되지 않거나, 술덧의 점도와 감미가 증가하는 감패가 발생하는 문제점을 나타냄. 이러한 원인은 누룩의 과다 사용 이외에도 여러 가지 요인이 있을 수 있겠으나, 그 중에서도 급격한 당화에 의한 효모 군총에의 악영향과 유산균의 급격한 증식에 의한 감산패의 유발로 인한 산도의 급격한 증가로 인해 알콜발효가 10-13% 내외에서 정지되는 문제가 가장 큰 영향을 미치는 것으로 사료됨. 따라서, 전라도 지역의 전통막걸리인 방문주를 고품질의 막걸리화 하기 위해서는 제조공정을 표준화할 필요성이 있으며, 특히 사용되고 있는 누룩에 대한 정확한 사용량과 누룩의 함량에 따라 제품의 품질특성인 양조특성, 품질특성, 맛의 변화 및 저장성에 미치는 영향을 확인하여 최적의 조건을 확립해야만 함.

본 제2세부과제에서는 전통적인 방문을 사용하여 지속되어 온 전통막걸리인 방문주의 표준화 및 고급막걸리 개발을 위하여 현재 사용중인 누룩의 사용량에 대한 표준화를 실시하고자 하였으며, 발효를 위한 종균으로서 누룩만을 사용하는 전통적인 방문주 제조방식을 사용한 전통막걸리의 제조 과정에서 누룩함량에 따른 양조특성 차이를 식품분석 지표와 미생물 지표를 이용하여 조사하고, 동시에 품질 및 관능특성의 차이를 조사함으로써 누룩의 함량과 막걸리의 품질과의 상관관계를 파악하고자 하였음. 이를 통해 전통막걸리의 제조방식의 표준화를 위한 지표를 제공하고, 전통막걸리의 품질을 증진시키는데 필요한 기초자료를 제공하고자 하였음. 또한 이러한 표준화된 전통 막걸리 제조방식에 의해 제조된 전통막걸리 제품 유래의 유효성분에 대한 과학적인 데이터의 확보를 위하여 1) 유산균주를 분리하고 2) 기능성성분인 추출물을 확보하고자 하였으며 3) 이들의 *in vitro* 생리화학적 특성과 *in vivo* 세포주 실험을 통해 기능성을 탐색하고자 하였으며 4) 제1세부에 이러한 성분을 제공함으로써 실험동물모델을 통해 그 기능성 검증하도록 하여, 한식 세계화에 필수적인 우리 전통술인 막걸리의 우수성을 과학적으로 규명하고자 하였음.

## II. 연구방법

### 1) 제 1세부 연구 방법

#### 1. 시료의 전처리

전통 막걸리의 분획별 추출액, 세포의 다당류(EPS) 및 PA(*P. acidolactici*)-M76은 제 2세부에서 제공받아 사용하였음.

PA의 경우 실험동물모델에 경구투여시에는 PA를 동결건조한 powder를 일정 농도로 녹여 사용하였으며, 세포 처리시에는 PA를 sonication 한 후의 조효소액(crude extract)을 처리하였음.

#### 2. 3T3-L1을 이용한 지질축적 억제 효과

##### 2.1 세포 배양 및 분화

3T3-L1세포는 10% bovine serum (BS, Gibco)과 1% penicillin/streptomycin (Hyclone)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였음. confluence 80%가 되면 1mM trypsin-EDTA (hyclone) 용액으로 탈착시켜 계대배양 하였으며 배지는 2일마다 교환하였음.

세포 분화는 계대배양과 동일한 방법으로 탈착시켜 2×10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 6 well plate에서 배양하고 2일 후에 세포가 완전히 성장하게 되면 0.5mM isobutylmethylxanthine (IBMX), 1μM dexamethasone(sigma), insulin(10μg/ml)이 함유된 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)-DMEM 배지로 교환한 뒤, 시료를 첨가하여 2일간 분화시켰음. 분화가 유도되면 insulin(10μg/ml)이 포함된 배지로 교환하고 시료를 다시 첨가하여 6일 동안 배양함.

##### 2.2 세포 성장 억제율 측정

세포를 2×10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 분주하여 10% BS와 1% penicillin/streptomycin (Hyclone)이 함유된 DMEM 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였음. 세포밀도 70%가 되면 시료 처리를 하지 않고 바로 initial 세포성장 억제율을 측정함. 또는 새 배지로 교환하여 각 군별로 시료를 첨가한 후 각각 24시간, 48시간 또는 30시간 배양하여 cell viability assay kit (EZ-cytox, Dogen)로 세포성장 억제율을 측정함.

##### 2.3 Oil red O stain

3T3-L1 preadipocyte를 adipocyte로 분화 후 PBS로 2회 세척함. 10% formalin으로 24시간 실온에서 세포를 고정하고, Oil red O로 18시간 동안 염색하였음. Oil red O 제거 후 60% isopropanol로 5초간 탈색하고 증류수로 세척 후 완전히 건조하여 현미경 (CKK41, olympus)으로 염색된 지방구를 확인하였음.

##### 2.4 Triglyceride (TG) 측정

분화 후 배지를 완전히 제거하고 5% triton-X100으로 homogenize한 후 heating과 실온에서 식히기를 2회 반복함. 원심분리하고 상등액을 취한 뒤 회석하여 triglyceride quantification kit (abcam)로 측정하였음.

### 3. RIN-m5F를 이용한 항당뇨 효과

#### 3.1 세포 배양 및 증식능 측정

췌장 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclon)과 penicillin/streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였음. 세포 증식능 측정을 위해 96well plate에 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640 배지를 이용하여 1x10<sup>4</sup>/well씩 분주 한 후 overnight 배양하였고, 각 샘플을 RPMI-1640에 농도별로 희석하여 72시간을 배양하여 전처리하였음. 이후 배지를 cell viability assay kit (EZ-CYTox, Daeil Lab Service, Seoul, KOREA)가 포함된 RPMI-1640 배지로 교체한 후 2시간 이후에 450 nm에서 흡광도를 측정하여 MTT assay를 실시하였음.

#### 3.2 alloxan에 대한 세포 보호 효과

각 샘플을 RPMI-1640에 농도별로 희석하여 48, 72시간을 배양하여 전처리하였음. 이후 배지를 농도별로 샘플이 혼합된 free glucose RPMI-1640으로 바꾸어 2시간 배양하고 10 ~ 20 mM alloxan을 처리하여 2시간을 더 배양하였음. alloxan이 처리된 배지를 cell viability assay kit가 포함된 RPMI-1640 배지로 교체한 후 2시간 이후에 450 nm에서 흡광도를 측정하여 MTT assay를 실시하였음.

#### 3.3 SOD 활성 측정

trypton X-100이 함유된 PBS를 이용하여 세포를 부유하여 상등액을 취하였음. 얻어진 상등액은 SOD assay kit(dojindo molecular technologies, japan)를 사용하여 SOD 활성을 측정하였음.

### 4. HepG2를 이용한 간세포 보호 효과

#### 4.1 세포배양 및 증식능 측정

HepG2 세포를 10% heatinactivated FBS를 함유한 RPMI 배지에 분주하고 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 37°C에서 12시간 배양하였음. 세포 증식능 측정을 위해 세포를 2x10<sup>4</sup>cell/well로 분주하고 24시간 배양하고, 시료가 포함된 배지로 교체하여 24 시간 및 48시간 배양하였음. 배양이 끝난 후 배지를 cell viability assay kit (EZ-CYTox, Daeil Lab Service, Seoul, KOREA)가 포함된 RPMI 배지로 교체한 후 2시간 이후에 MTT assay를 실시하였음.

#### 4.2 CCl<sub>4</sub>에 대한 세포 보호 효과

배양된 세포에 다양한 농도의 CCl<sub>4</sub>를 처리하여 20% 이상 억제 효과가 있는 농도를 최종 배지에 처리하였음. 24시간 및 48시간 동안 배양한 후 580nm에서 MTT assay를 실시하였음.

### 5. SK-N-SH를 이용한 뇌세포 보호 효과

#### 5.1 세포 배양 및 증식능 측정

SK-N-SH은 가열로 불활성화시킨 fetal bovine serum(FBS)이 10% 첨가된 RPMI 1640 medium에서 37°C, 습도 95%, CO<sub>2</sub> 5%를 유지한 상태로 배양함. 세포 증식능 측정을 위해 96well plate에 10% FBS가 첨가된 MEM 배지를 이용하여 1x10<sup>5</sup>/ml씩 분주 한 후 overnight 배양하였고, 각 샘플을 MEM 배지에 농도별로 희석하여 24시간 배양하여 전처리하였음. 이후 배지를 cell viability assay kit가 포함된 MEM (welgene, Korea) 배지로 교체한 후 2시간 이후에 450 nm에서 흡광도를 측정하여 MTT assay를 실시하였음.



## 5.2 Aβ에 대한 세포 보호 효과

각 샘플을 MEM 배지에 농도별로 희석하여 24시간을 배양하여 전처리하였음. Aβ를 농도별로 처리하여 20% 이상 억제 효과가 있는 농도를 최종 배지에 처리하였음. 48시간 배양한 후 배지를 cell viability assay kit가 포함된 MEM 배지로 교체한 후 2시간 이후에 450 nm에서 흡광도를 측정하여 MTT assay를 실시하였음.

## 6. 만성알코올을 섭취 실험동물모델을 이용한 지질 대사 및 알코올 분해능 확인

### 6.1 시료 준비 및 실험동물 사육

전통막걸리 0도 및 10도 시료는 제2세부에서 제공받아 사용하였음. 시료 투여량은 4g/kg body weight으로 하였음. 참고문헌(Journal of Medicinal Food, 11(1), 2008, 38-45)에 의하면 만성 알코올 섭취 모델을 위해 20% ethanol을 4g/kg BW으로 투여 하였으나, 본 연구과제의 시료는 전통막걸리이므로 제조하였을 때의 알코올 농도를 바탕으로 10도로 결정하였음.

실험동물은 생후 4주된 수컷 Sprague-Dawley(SD)계 흰쥐를 중앙실험동물에서 구입하였음. 2주일 동안 식이 및 동물실의 적응기간을 거쳐 randomized block design에 의해 Figure 1.과 같이 대조군(NC), 알코올 투여군(EC, 4g/kg BW), 전통막걸리 0도 투여군(MC0, 4g/kg BW), 전통막걸리 10도 투여군(MC10, 4g/kg BW), 총 4군으로 나누어 경구투여 하였음. 실험동물은 6주 동안 stainless steel cage에 2마리씩 분리 사육하였음. 동물실의 온도는 23~25℃, 습도는 50%로 유지하였으며 명암은 12시간(8:00~20:00) 주기로 조절하였음. 선정된 실험동물은 실험기간 동안 D12450B(research diet, USA)와 충분한 물을 공급하였음. 실험동물을 각각의 체중은 1주일에 한번씩 측정하였고, 식이섭취량은 격일로 식이잔량을 측정하여 1일 식이섭취량으로 환산하였음.

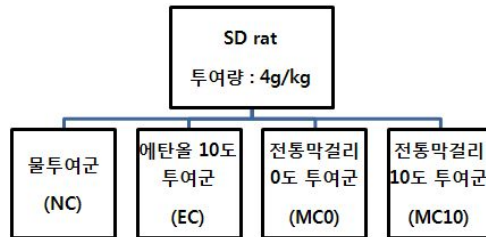


Figure 1. Experimental design.

### 6.2 실험동물의 희생 및 시료 보관

실험동물은 12시간 동안 절식 후 희생시켰음. 혈액 샘플은 ether로 마취시켜 심장 채혈법에 의해 혈액을 채취하여 약 1시간 동안 ice에 방치 한 후 1,100×g, 4℃에서 15분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였음. Liver는 채혈 후 즉시 적출하여 생리 식염수로 씻은 다음 여과지로 물기를 제거하였음. 분리된 혈청과 간장은 -80℃에서 분석때까지 보관하였음.

### 6.3 혈청 및 간의 지질 성상 확인

혈청 중 Total cholesterol(TC), triglycerides(TG), High-density lipoprotein (HDL-c), GOT(Glutamic Oxaloacetic Transaminase) 및 GPT(Glutamic Pyruvic Transaminase)는 혈액자동분석기(fujifilm, Japan)로 분석하였음. low-density lipoprotein (LDL-c)은 TG, TC 및 HDL-c을 바탕으로 환산하였음.

간 조직은 시료 0.1g에 차가운 식염수를 넣어 sonic dismembrator(fisher scientific)로 30초간 차가운 상

태로 sonication 한 후 1,500g, 4℃에서 10분간 원심분리로 상등액을 얻었음. 간의 TC 및 TG는 효소법으로 시판되는 kit(Asan Pharm. Co., LTD., Korea)를 사용하여 측정하였음.

#### 6.4 알코올 분해능 (alcohol clearance) 측정

whole blood를 수집은 Rat을 12시간 절식시켜 10% ethyl alcohol을 경구투여한 후 꼬리정맥에서 0min, 30min, 60min, 120min, 240min, 360min에 각각 EDTA가 처리된 capillary tube를 사용하여 실시하였음. 수집한 혈액의 에탄올 농도는 ethanol assay kit(biovision, USA)를 이용하여 측정하였음.

#### 6.5 혈청의 alcohol dehydrogenase(ADH) 측정

혈청의 ADH 농도 측정은 alcohol dehydrogenase activity assay kit(Biovision, USA)를 사용하여 측정하였음.

#### 6.6 지질대사 관련 유전자 수준 변화 확인

간조직을 Trizol-Reagent(Invitrogen, USA) 1ml에서 균질화한 후 잘게 분쇄된 조직을 상온에서(15~30℃) 5분간 정치시킨 뒤, chloroform을 250ul 첨가한 후 15초 동안 vortex하였음. 다시 상온에서 2~3분간 둔 뒤 4℃에서 12,000 rpm(MICRO 17R, Hanil)로 15분간 원심분리 하였음. 상등액을 조심스럽게 새로운 tube로 옮겨 Isopropyl alcohol을 500ul 첨가한 뒤 상온에서 10분 동안 두었음. 그리고 4℃에서 12,000 rpm(MICRO 17R, Hanil)로 15분간 원심분리 하였음. 상등액을 버리고 RNA pellet을 얻었음. 획득한 RNA pellet을 75% ethanol 1ml을 넣고 vortex한 후 4℃에서 12,000 rpm(MICRO 17R, Hanil)로 5분간 원심분리 하였음. RNA pellet을 vacumm에서 10분간 건조시키고 DEPC(diethyl pyrocarbonate) water로 희석하여 55~65℃로 10분간 dissolve 시킨 다음 사용하였음.

각 효소들의 reverse 및 forward primer, DNA polymerase, dNTPs를 첨가하여 PCR kit(SYBR Green)(ABgene, USA)를 이용한 Real-time PCR(applied biosystems, USA)을 실시한 후 증폭된 PCR product를 확인함.

#### 7. 고지방식이섭취 실험동물모델을 이용한 항비만/당뇨 효과

##### 7.1 투여량 결정

C57BL/6J mice에서 *Pedilococcus*에 대한 항비만 효과를 확인한 논문(PLOS ONE 7(2) e30696, 2012.)을 바탕으로 동결건조된 PA powder에 대한 균수를 측정한 후  $1.25 \times 10^9$  cfu/ml이 되도록 녹여 4ml/kg을 경구투여 하였음.  $1.25 \times 10^9$  cfu/ml 농도는 3T3-L1 및 RIN cell에서 효과가 있었던  $62.5 \mu\text{l/ml}$ 와 비교하면 약 5배 높은 비율임.

##### 7.2 실험동물 사육

실험동물은 출생시기가 동일한 4주령 C57BL/6J 계 수컷(Charles River Laboratories, Japan)을 중앙실험 동물에서 구입하여 사용하였음. 2주일 동안 환경에 적응 시킨 후 randomized block design에 의해 Figure 2와 같이 정상식이 섭취 증류수 투여군(ND, 10% kcal % fat), 고지방식이 섭취 증류수 투여군(HD, 60% kcal % fat), 고지방식이 섭취 공시균주 투여군(PR) 및 고지방식이 섭취 *P. acidolactici* 투여군(PA)으로 총 4그룹임.

실험 식이는 Research Diet(New Brunswick, NJ, USA)의 AIN-93 diet를 변형한 정상식이(10% fat kcal)와 고지방식이(60% fat kcal)를 구입하여 섭취하도록 하였으며(Table 1), 시료는 사육기간 12주 동안 하루 1회 경구투여 하였음. 사육실의 온도는  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도는  $50 \pm 5\%$ 로 유지 하였으며, 명암은 12시간 주기(7:00~19:00)로 조절하였음.

실험동물의 체중은 일주일에 한번 측정하였고, 식이섭취량은 2일 간격으로 잔량을 측정하여 1일 섭취량으로 환산하였음. 12주 사육기간 동안 물과 식이는 자유롭게 섭취시켰음.

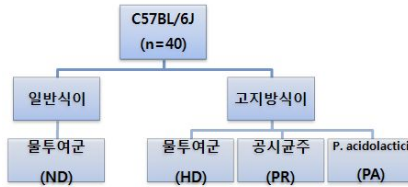


Figure 2. Experimental design.

Table 1. The composition of experimental diets.

Ingredient (g)	ND <sup>1)</sup>	HD <sup>2)</sup>
Casein,lactic	18.96	25.84
L-cystine	0.28	0.39
Corn Starch	29.86	-
Maltodextrin	3.32	16.15
Sucrose	33.17	8.89
Cellulose	4.74	6.46
Soybean Oil	2.37	3.23
Lard	1.90	31.66
Mineral Mix	0.95	1.29
Dicalcium Phosphate	1.23	1.68
Calcium Carbonate	0.52	0.71
Potassium Citrate	1.56	2.13
Vitamin Mix	0.95	1.29
Choline Bitartrate	0.19	0.26
FD&C Yellow Dye #5	-	-
FD&C Blue Dye #1	-	0.01
Total	100	100
Kcal	385	524
Kcal/g	3.9	5.2

### 7.3. 실험동물의 희생 및 시료 보관

실험동물은 12시간 동안 절식 후 희생시켰음. 혈액 샘플은 안구적출법에 의해 혈액을 채취하여 약 1시간 동안 ice에 방치 한 후 1,100×g, 4℃에서 15분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였음. Liver는 채혈 후 즉시 적출하여 생리 식염수로 씻은 다음 여과지로 물기를 제거하였음. 분리된 혈청과 간장은 -80℃에서 분석때까지 보관하였음.

### 7.4 혈청 및 간의 지질성상 확인

혈청 중 Total cholesterol(TC), triglycerides(TG) 및 High-density lipoprotein (HDL-c)는 혈액자동분석기(fujifilm, Japan)로 분석하였음. low-density lipoprotein (LDL-c)은 TG, TC 및 HDL-c을 바탕으로 환산하였음.

간 조직은 시료 0.1g에 차가운 식염수를 넣어 sonic dismembrator(fisher scientific)로 30초간 차가운 상태로 sonication 한 후 1,500g, 4℃에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었음. 간의 TC 및 TG는 효소법으로 시판되는 kit(Asan Pharm. Co., LTD., Korea)를 사용하여 측정하였음.

#### 7.5 insulin 및 leptin 함량 측정

혈청중 insulin은 mouse insulin ELISA kit(중앙실험동물, 한국)을 leptin 함량은 mouse leptin immunoassay kit(R&D system, USA)을 사용하여 측정하였음.

#### 7.6 혈당 변화 확인

12시간 절식 후 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 시판되고 있는 혈당 측정기 (ARKRAY, KDA CORPORATION, JAPAN)을 이용하여 5주, 7주, 9주 및 11주에 측정하였음.

#### 7.7 글루코스 내당능 측정

실험동물 사육 12주 쯤 12시간 절식시킨 후 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 공복시 혈당 수준을 측정하고 50% GLUCOSE 용액(0.1g glucose/100g body weight)을 경구투여 한 후 30분, 60분, 120분 및 180분에 꼬리정맥으로부터 채혈하여 정맥혈의 혈당 농도변화를 혈당 측정기 (ARKRAY, KDA CORPORATION, JAPAN)로 측정하였음.

#### 7.8 지질대사 관련 유전자 수준 변화 확인

간 중 지질대사 관련 유전자(PPAR $\gamma$ , ACO, PPAR $\alpha$ , FAS 및 CPT1 $\alpha$  등) 변화를 관찰하였음. 즉, 간조직을 Trizol-Reagent(Invitrogen Life Technologies; Carlsbad, CA, USA) 1ml에서 균질화한 후 상온에서 (15~30℃) 5분간 정치시킨 뒤, chloroform을 250 $\mu$ l 첨가한 후 15초 동안 vortex함. 다시 상온에서 2~3분간 둔 뒤 4℃, 12,000rpm(Micro 17R; Hanil Science Co., Seoul, Korea)로 15분간 원심분리함. 상등액을 조심스럽게 새로운 tube로 옮겨 isopropyl alcohol을 500 $\mu$ l 첨가한 뒤 상온에서 10분 동안 정치하고 4℃, 12,000rpm(Micro 17R; Hanil Science Co., Seoul, Korea)로 10분간 원심분리함. 상등액을 버리고 total RNA pellet을 얻음. 획득한 total RNA pellet을 70% ethanol 1ml로 세척하고 건조한 뒤 DEPC(diethyl pyrocarbonate) water로 희석, 재부유함. 그 후 각 유전자들의 reverse 및 forward primer, DNA polymerase, dNTPs를 첨가하고 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Woolston, Warrington, UK)를 이용하여 Real-time PCR(7500 real time PCR system; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 실시하고 증폭된 PCR product를 확인하여 지질 대사 관련 유전자의 발현 정도를 측정하였음.

#### 8. 통계학적 분석

모든 실험 결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었음. 각 군간의 유의성 검증은 SPSS(Statistical Package for Social Science) ver. 12.0을 이용하여 one-way ANOVA로 분석하였으며, 군간에 유의한 차이가 있을 경우 Duncan's Multiple Range test를 실시하여  $p < 0.05$  수준에서 검증하였음. 단, 실험동물모델에 대한 분석시 일반식이와 고지방식이간의 비교가 필요할 경우 independent t-test를 실시하였음.

## 2) 제 2세부 연구 방법

### 1. 표준화된 전통 막걸리 추출물의 기능성분석 및 막걸리유래 고 생리활성 물질 분리

#### 1.1. 실험재료

본 실험에 사용된 막걸리 양조용 원료미인 백미와 찹쌀은 현재 전주 전통술박물관에서 사용 중인 2011년도산 신동진쌀(전북, 부안)을 원료로 하였으며, 누룩은 전통누룩 제조장인 전라남도 송정의 송학곡자에서 제조된 것으로 당화력(saccharogenic power)이 300 sp인 재래누룩을 사용하였음. 유리아미노산 분석을 위해 사용된 표준시약은 모두 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 항산화 분석을 위한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), ascorbic acid, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, EDTA, 2-deoxyribose, trichloroacetic acid(TCA), tribarbituric acid(TBA), potassium ferricyanide 또한 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였음. Pyrogallol, bovine serum albumin은 Sigma Chemical Co.에서 ammonium sulfate는 Junsei Chemical Co.(Japan)에서 구입하여 하였음. 그 외 ethanol, methanol, dichloromethane, butanol 등 실험에 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였음.

#### 1.2. 전통막걸리의 표준화 지표 확립을 위한 제조공정의 확립

##### 1.2.1. 전통 막걸리 제조

본 연구에서 사용한 전통적인 방식에 의한 막걸리 제조는 진도지방의 방문주 원방문에 의거하여 누룩의 비율을 달리하여 2단 담금을 실시하였음. 이러한 2단 담금법은 일반적으로 방문주 제조 시 사용되는 방법으로, 막걸리 발효의 starter로서 밀술을 제작하는 작업으로 알코올 발효를 위한 효모의 증식과 당화의 촉진, 품온의 균일화, 효모 증식에 필요한 산소의 공급, 누룩이 분비하는 각종 효소 및 산의 침출 등을 위해 발효하는 과정인 1단 담금과 덧술을 제조하는 2단 담금으로 구분되어짐(Song and Park, 2003). 구체적으로 1단 담금의 경우 백미 1kg를 백세하여 하룻밤 동안 상온에서 침지한 후 분쇄하여 쌀가루 형태로 하여 끓인 물을 준비된 쌀가루에 골고루 부어 익혀 범벅(반생반숙)함으로써 설기 형태로 만들. 약 30분 동안 반유동체 형태인 쌀과 고체인 누룩 액체인 물을 한 대 섞어 치대기함으로써 누룩과 혼합한 후 항아리에 보쌘하여 25°C에서 약 36시간 동안 발효하였음. 이때 사용된 누룩은 각각 0.5 kg(5%), 1.0 kg(10%), 2.0 kg(20%)으로 그 비율을 달리하여 첨가하였으며, 품온이 약 37°C일 때 발효를 완료하여 10도 이하에서 냉각하면서 시료를 채취한 것을 밀술로 하였음. 이 후 막걸리의 2단 담금을 위한 덧술을 제작하는 과정으로 찹쌀 8 kg을 백세하여 하룻밤 동안 침지한 후 증자함으로써 술밥을 짓고, 상온에서 냉각하였음. 냉각된 술밥은 준비된 밀술과 혼합한 후 25°C에서 약 48시간 동안 주발효시킴으로써 효모의 수가 점차적으로 증가하여 알코올 발효가 원활하게 진행하게 됨. 주발효 완료 후 막걸리의 숙성을 위하여 10°C이하에서 냉각 후 15°C에서 약 32일간 후발효 시켰음. 후발효 과정이 완료된 후 탁주 형태로 채주(거르기) 후 병입하고 4°C에서 약 28일간 저장하였음. 본 연구에서 제조된 막걸리의 전체 공정도는 figure 1과 같음.

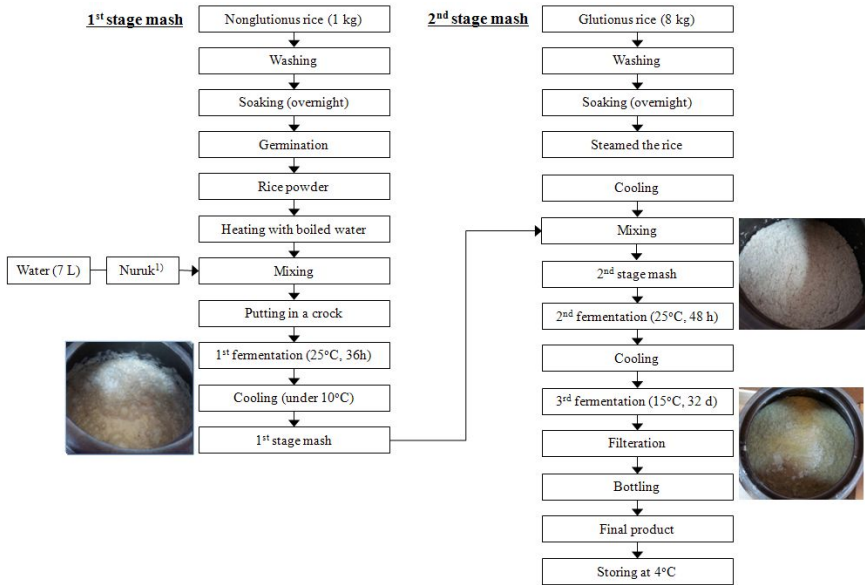


Figure 1. Schematic diagram of makgeolli manufacturing process using different nuruk content<sup>1)</sup>.

## 1.2.2. 누룩함량별로 제조된 막걸리의 품질특성

### 1.2.2.1. 알코올 및 당 함량

알코올 함량 측정은 증류법으로 분석하였음. 제조된 막걸리를 10,000 rpm에서 20분 동안 원심분리 (GYROZEN, 1580MGR, Daejeon, Korea)한 상등액 시료 10 mL와 GC분석을 위한 내부표준물질로서 10%(v/v) isopropyl alcohol 10 mL을 첨가하여 혼합한 후 그 액을 증류 플라스크에 옮긴 후 열을 가하고 냉각기에 연결하여 증류하였음. 증류액 1 mL은 알코올 정량 분석을 위한 GC분석 시료로 사용되었음. 알코올 함량 측정은 가스크로마토그래피(GC, gas chromatography)로 분석하였고, 그 분석 조건은 table 1과 같음. 이때 5% isopropyl alcohol을 정량분석을 위한 내부표준물질로 사용하였고, ethanol의 표준품을 사용하여 GC분석한 검량선에 근거하여 그 알코올 함량을 산출하였음 (figure 2). 당도는 원심분리한 상등액 200  $\mu$ L를 취하여 디지털 굴절당도계 (Refractometer PLA ATAGO, Tokyo, Japan)로 측정하여  $^{\circ}$ Brix로 나타내었음.

Table 1. Condition of gas chromatography for alcohol analysis

Gas chromatography(HP 6890 system)	
Detector	Flame ionization detector(FID)
Column	DB-5 column 30 m×0.25 mm id(0.25 μm film thickness)
Mobile phase	He
Flow rate	1.3 mL/min
Split raio	50:1
Detector temp.	250°C
Oven temp.	70°C for 2 min, 20°C/min to 150°C

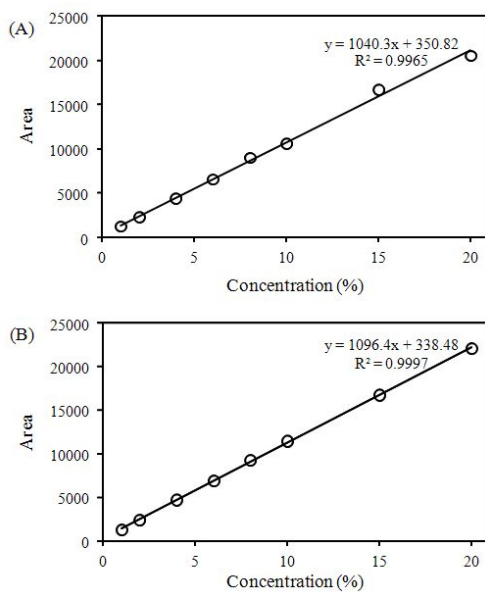


Figure 2. Standard curves of ethanol(A) and isopropyl alcohol(B) for alcohol content analysis.

### 1.2.2.2. pH 및 총산 측정

pH는 제조된 막걸리를 10,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 상등액을 Orion model 710 pH meter(Thermo, Beverly, MA, USA)로 측정하였으며, 산도 측정은 상등액 10 mL에 혼합지시약 (bromothymol blue 0.2 g, neutral red 0.1 g, absolute ethanol 300 mL) 2-3방울을 가한 뒤 0.1N NaOH 로 담록색이 나타날 때까지 적정 시키는데 소요되는 mL수를 산도로 표시하여 계산하였음.

### 1.2.2.3. 미생물 측정

막걸리의 미생물수는 평판배양법으로 측정하였음. 효모수의 측정은 세균의 배양을 억제하기 위한 penicillin-streptomycin solution을 포함하는 YM agar(Difco, USA), 젖산균은 MRS agar(Difco, USA), 총균은 plate count agar(Difco, USA) 배지를 사용하였고, 1%(w/v) pepton solution을 사용하여 심진법으로 희석한 샘플을 100 µL 도말(spread) 하였음. 효모는 29°C에서 48시간 배양하였으며, 젖산균과 총균을 위한 plate는 37°C에서 36시간 배양 한 후 30-300개의 집락(colony)을 형성한 plate의 colony 수를 측정하였음. 생균수는 log cfu(colony forming unit)/mL으로 표현하였음.

### 1.2.2.4. 일반성분 분석

제조된 막걸리의 수분함량은 수분자동측정기(Ohaus, switzerland)를 사용하여 측정하였고, 조단백질과 조지방의 함량은 AOAC법(16)에 준하여 측정하였음. 조단백은 Kjeldahl 질소정량법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조회분은 550°C 직접회화법을 이용하여 분석하였음. 이때 탄수화물의 함량은 100에서 다른 성분들의 함량을 뺀 나머지 값으로 하였음.

### 1.2.2.5. 유리 아미노산 분석

유리아미노산은 일정량의 시료를 취해 70% ethanol을 가하여 균질하고 80°C에서 15분간 Branson 2510 Bransonic ultrasonic bath(Brandson Ultrasonics, Danbury, CT, USA)를 이용하여 추출하였음. 추출액은 여과지(Advantec, No.2)로 감압여과 후 45°C 이하에서 감압 농축(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)하여 ether 20 mL 가하여 지방층을 제거하였음. 위의 과정을 통해 얻어진 아미노산을 45°C 이하에서 감압 농축하여 여액을 완전히 제거한 후 sodium citrate buffer(pH 2.2)에 용해하여 0.45 µm membrane filter(Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Tokyo, Japan)로 여과한 후 amino acid analysis system(Sykam S-4300, Sykam GmbH, Germany)을 이용하여 분석하였음(Table 2).

Table 2. Condition of amino acid analyzer for free amino acid analysis.

Sykam S-4300 amino acid analyzer	
Column	Cation separation column LCAK60/Na(4.6 mm×150 mm)
Column temp.	50 to 80°C
Mobile phase	pH 3.3, pH 4.2, pH 5.2, pH 10.1 sodium citrate buffers
Flow rate	Buffer 50 mL/h, ninhydrin 25 mL/h



### 1.2.2.6. 생리기능성 측정

#### 제조된 막걸리의 성분 추출방법

생리기능성 분석을 위한 성분 추출을 위하여, 시료 누룩함량별로 제조된 막걸리의 각각 100 mL에 400 mL의 MeOH을 각각 가한 후 60°C에서 4시간 동안 진탕 추출하였음. 원심분리(10,000 rpm, 20 min, 4°C)를 통하여 회수된 상등액은 여과지(whatman No.2)로 2번 여과한 후, 진공회전 농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 40°C에서 농축한 후 -80°C 동결건조(PVTFD100R, Ilshin Lab. Ltd., Korea)하였음. 막걸리의 동결건조 시료는 초저온 냉동고(-80°C)에 보관하면서 다음 분석시 적당량 농도로 희석한 후 사용하였음.

#### DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 전자공여작용(electron donating abilities, EDA)에 대한 효과로 Blois(1958)의 방법에 따라 DPPH에 대한 수소공여 효과로 측정하였음. DPPH 용액은 100 mL 메탄올에 DPPH 0.2 mM로 녹인 후 증류수와 혼합하여 517 nm에서 흡광도가  $0.97 \pm 0.01$ 이 되도록 조정하여 만들었음. 추출된 시료를 농도별로 희석한 0.1 mL에 DPPH 용액 0.4 mL을 가한 후 37°C에서 30분간 상온에서 방치하여 반응시킨 후 분광광도계(UV-Vis spectrophotometer)를 이용하여 517 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였음. 이때 대조군으로 ascorbic acid를 사용하여 시료와 동일한 방법으로 분석하였음. 각 시료의 전자공여능(Electron donating ability, EDA)은 아래의 식에 따라, 시료를 첨가하지 않은 대조군과 흡광도 차이를 백분율로 나타내어 DPPH 자유 라디칼의 제거활성을 계산하였음.

$$\text{전자공여능}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리 구의 흡광도}}\right) \times 100 \quad (1)$$

#### Hydroxyl 라디칼 소거능

Fenton반응으로 생성된 hydroxyl 라디칼에 의한 2-deoxyribose의 산화정도를 Gutteridge의 방법에 따라 측정하였음(Gutteridge JM, 1984). 0.1 mM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 mL, 10 mM EDTA 용액 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 용액 0.2 mL에 막걸리 추출액 시료 0.2 mL, 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0) 1.0 mL, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 mL을 가하여 37°C에서 3시간 반응시킨. 그 뒤 2.8% TCA 용액 1 mL를 가하여 반응을 정지시키고, 색의 변화를 위하여 1.0% TBA 용액 1 mL를 가한 후 100°C 10분간 중탕하였음. 실온에서 냉각시킨 반응액은 분광광도계를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조군으로 ascorbic acid를 사용하여 시료와 동일한 방법으로 분석하였음. 각 시료의 hydroxyl 라디칼 소거활성(%)은 아래의 식에 따라, 시료를 첨가하지 않은 대조군과 흡광도 차이를 백분율로 나타내어 계산하였음.

$$\text{Hydroxyl 라디칼소거활성}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리 구의 흡광도}}\right) \times 100 \quad (2)$$

#### 환원력

환원력 평가는 reductions이 제공하는 수소원자가 프리라디칼 사슬을 분해함으로써 시작되면 흡광도 수치가 시료의 환원력을 나타내고, 높은 환원력을 가지는 물질일수록 흡광도 값이 높은 것으로서

Gordon 등(1990)의 방법을 통해서 측정하였음. 즉, 0.4 mL의 시료에 0.2 M phosphate buffer(pH 6.6) 0.4 mL와 1% potassium ferricyanide solution 0.4 mL를 첨가하고 50℃에서 30분 동안 반응시켰음. 10% TCA 0.4 mL를 첨가하여 반응을 종료한 후 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 최수한 상등액을 증류수로 2배 희석하였음. 희석액 1.0 mL와 0.1% ferric chloride 용액을 혼합하고 분광광도계를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였음. 표준용액은 ascorbic acid를 사용하였음.

### 1.2.2.7. 관능평가

관능검사에는 전주시 20-60대 성인 남녀 총 50명을 대상으로 막걸리 관능검사 경험이 있는 훈련된 패널로 구성하여 기호도 조사를 실시하였음. 평가항목으로는 외관(appearance), 향기(fragrance), 쓴맛(bitter taste), 단맛(sweet taste), 신맛 및 새콤한 맛(sour taste), 구수함(delicate taste), 청량감(feeling of refreshment), 텁텁함(soupy), 목넘김(swallowing), 알코올맛(alcoholic taste), 뒷맛(aftertaste), 전반적 기호도(overall acceptability)로 하였고 각 항목에 대하여 7점 척도법을 사용하여(1점: “매우 싫다”, 4점: “좋지도 싫지도 않다, 7점: “매우 좋다”) 평가하도록 하였음. 막걸리 시료를 담은 용기에는 무작위로 선택한 세 자리 숫자를 표시하였고, 시료와 시료 사이에는 입을 행갈 수 있도록 정수된 물을 함께 제공하여 각 시료의 특성에 따른 혼란과 감각의 둔화를 최소화 하였음.

## 1.3. 표준화된 전통 막걸리 추출물의 기능성분석

### 1.3.1. *in vitro* 실험을 위한 막걸리 추출물의 제조

누룩 10%를 사용하여 전통방식으로 제조된 막걸리 샘플 200 mL를 시료로하여 40℃ 조건하에서 각각 감압농축기(MG-2200, EYELA, Japan)를 사용하여 준비된 막걸리 농축물에 3차 증류수, ethanol, methanol 800 mL의 용매를 각각 가한 후, 4시간 동안 열수(90℃) 및 용매(60℃) 추출하였음. 원심분리(10,000 rpm, 10 min, 4℃)를 통하여 최수된 상등액은 whatman No.2 여과지로 2번 여과한 후, 동결건조(PVTFD100R, Ilshin, Yangjugin, Korea)하였음. 동결건조 샘플은 초저온 냉동고(-80℃)에 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 다음 분석을 위해 사용되었음.

### 1.3.2. 막걸리 추출물의 *in vitro* 항산화능 분석

#### DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능은 Blois(1958)의 방법을 변형하여 전자공여작용(electron donating abilities, EDA)에 대한 효과로써 각 시료의 환원력을 측정하였음. 즉, 시료 0.1 mL에 0.2 mM DPPH solution(99% MeOH에 용해) 0.4 mL을 가하고 30분간 상온에서 방치한 후 분광광도계(0)를 사용하여 517 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였음. 각 시료의 라디칼 소거능은 아래의 식(1)에 의해 시료 첨가구 및 무 첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었음.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100 \quad (1)$$

#### SOD 유사활성능 측정

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성능은 superoxide 라디칼 소거능을 분석하는 방법으로서 Marklund 와 Marklund(1974)의 방법을 변형하여 실시하였음. 즉, 시료 0.3 mL을 취하여 0.9 mL의 Tris-HCl buffer(pH 8.2) 및 60  $\mu$ L의 7.2 mM pyrogallol과 잘 섞어 준 후 25°C에서 10분간 방치함으로써 반응시켰음. 반응을 정지시키기 위하여 0.2 mL의 1N HCl을 첨가한 후, 분광광도계를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였음. 각 시료의 SOD 유사활성능은 아래의 식(2)에 의해 시료 첨가 및 무 첨가 구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었음.

$$\text{SOD-like (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리 구의 흡광도}}\right) \times 100 \quad (2)$$

### 1.3.3. *In vivo* 실험을 위한 막걸리 추출물의 제조

세포주 실험을 통한 막걸리의 기능성 검증을 위한 막걸리 추출물의 제조 과정은 figure 3과 같음. 먼저 막걸리 2 L는 감압농축기(EYELA MG-2200)를 사용하여 40°C에서 농축하였는데, 이때 3차 증류수로 2번의 washing을 수행함으로써 존재하는 알코올 성분을 제거한 막걸리 농축물을 준비하였음. 농축물은 증류수를 이용하여 최종적으로 1 L가 되도록 정용한 다음, dichloromethane( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 1 L로 3회 반복하여 용매분획 한 후 water( $\text{H}_2\text{O}$ ) 층은 다시 n-BuOH 1L로 3회 반복하여 분획 하였음. 각각의 분획물은 whatman No.2 여과지를 사용하여 2번 여과하여 40°C에서 농축(EYELA MG-2200) 한 후 -80°C 조건하에서 동결건조(PVTFD100R)하여 초저온 냉동고(-80°C)에 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 다음 분석을 위해 사용되었음. 또한 준비된 막걸리 추출물은 *in vivo* 세포주를 이용한 기능성 검증을 위하여 제1세부과제로 제공하였음.

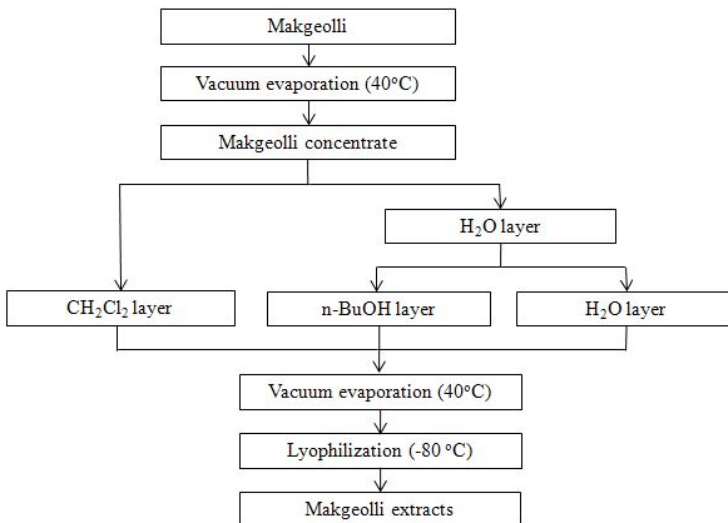


Figure 3. Fractionation procedure for preparation of makgeolli extracts.

## 1.4. 막걸리로부터 활성 peptides의 분리, 정제 및 특성분석

### 1.4.1. 막걸리로부터 crude peptides의 분리

8,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 500 mL의 막걸리 상등액에 30%(w/v) 및 50%(w/v)를 ammonium sulfate로 처리하여 4°C에서 12시간 동안 단백질을 침전 시킨 후 8,000 rpm, 5분 동안 원심 분리하여 단백질을 분리하였음. 침전된 단백질은 10 mL의 Tris-HCl buffer로 현탁한 후 Tris-HCl buffer(pH 7.2)에서 snake skin pleated dialysis tubing(Thermo Scientific, USA)을 사용하여 12시간 동안 투석(dialysis)함으로써 염을 제거하였음. 최종적으로 회수된 약 30 mL의 crude peptide 용액은 분광학적 방법으로 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 280 nm에서 단백질 농도를 측정함으로써 확인하였음.

### 1.4.2. Ion Exchange Chromatography(IEC) 정제

약 24 mL의 crude peptide 용액은 0.45 µm membrane filter(Advantec, Tokyo, Japan)로 여과시킨 후 FPLC(Fast protein liquid chromatography) system(BioRad, CA, USA)을 사용하여 IEC 정제를 수행하였음. 유속 1.0 mL/min로 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.1)를 평형화 시킨 UNO Q1 ion-exchange column(Bio-Rad)에 crude peptide 시료를 주입(load)하였음. 이때 동일 완충액인 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.1)를 사용하여 0 M에서 0.3 M NaCl의 기울기를 주어 용출시킴으로써 흡착된 peptide를 elution시켰음.

### 1.4.3. Gel Filtration Chromatography(GFC) 정제

8,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 500 mL의 막걸리 상등액에 ammonium sulfate 30%, 50%를 넣고 4 °C에서 12시간 동안 단백질을 침전 시킨 후 8,000 rpm, 5분 동안 원심분리함으로써 crude peptide를 분리하였음. 침전된 peptide는 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.1) 5 mL에 0.45 µm membrane filter(Advantec)로 여과 한 후 GFC를 수행하였음. GFC 정제는 FPLC system(BioRad)하에서 sephadex G-25 gel filtration column(1.5 cm×20 cm)을 사용하였음. 완충액(0.5 M NaCl이 함유된 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.1)을 0.5 mL/min의 유속으로 흘리면서, GFC 정제물은 280 nm에서 그 흡광도를 측정하여 정제분획을 얻음. 회수된 GFC 분획의 peptide의 분자량은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행함으로써 확인하였음.

### 1.4.4. Solid Phase Extraction(SPE) 정제

Methanol 50 mL로 활성화시킨 후 3차 증류수 50 mL로 수세한 소수성 column인 C18 Sep-Pak cartridge(Waters Co., Ireland)에 60 mL의 fraction액을 통과시켜 소수성 물질들을 흡착시키고 50 mL의 3차 증류수로 다시 수세한 뒤 methanol 5 mL를 사용하여 C18 Sep-Pak column에 흡착된 소수성 성분을 용출시켰음. Methanol로 용출된 시료는 원심농축기를 이용하여 용매인 methanol을 완전히 제거하였음. 준비된 건조시료는 100 mL의 20 mM Tris-HCl(pH 8.1) 완충액에 녹여 다음 정제에 사용하였음. 완충액에 녹인 샘플은 RP C18 column(Grace Smart 5m, 4.6X250 mm)을 사용하여 분리하였고, 이동상은 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid을 A용액으로 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid을 포함한 100% Acetonitril 혼합액을 B용액으로 이용하여 5%에서 40%까지 linear gradient (농도구배)를 1.0 ml/분의 유속으로 1 ml씩 fraction을 모아 다음 분석에 사용하였음.

#### 1.4.5. 항산화 활성 assay

막걸리로부터 분리된 crude peptide는 DPPH 라디칼 소거능 assay를 통하여 항산화능 분석을 수행하였음. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능은 Blois(1958)의 방법을 변형하여 전자공여작용 (electron donating abilities, EDA)에 대한 효과로 각 시료의 환원력을 측정하였음. 즉, 시료 0.1 mL에 0.2 mM DPPH solution 0.4 mL을 가한 후 30분간 상온에서 방치한 후 분광광도계를 사용하여 흡광도 517 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였음. 각 시료의 라디칼 소거능은 아래의 식(1)에 의해 시료 첨가구 및 무 첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었음.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리 구의 흡광도}}\right) \times 100 \quad (1)$$

## 2. 전통 막걸리 유래 유산균분리 및 유용균주의 탐색

### 2.1. 실험재료

본 연구에서 항균성 시험을 위한 병원성 균주로 *Bacillus cereus* KACC 10097와 *Pediococcus* sp. 공시 균주로서 *P. acidilactici* KACC 12307, *P. stilesii* KACC12300, *P. pentosaceus* KACC 12311은 한국농업미생물자원센터로부터 분양받아 사용하였으며, 장내부착능 시험을 위한 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)은 *Caenorhabditis* Genetics Center (<http://www.cbs.umn.edu.CGC>)으로부터 분양받아 사용하였음. 실험에 사용된 균주의 배양 배지로 Lactobacilli MRS broth 및 agar, Enterococcus agar, nutrient broth(NB) 및 agar는 Difco Laboratories(Detroit, MI, USA) 제품을 구입하여 사용하였음. 분석을 위해 사용된 표준시약 trichloroacetic acid(TCA), ampicillin, glutaraldehyde, osmium tetroxide, potassium chloride(KCl), calcium chloride(CaCl<sub>2</sub>), dinitrosalicylic acid(DNS), trifluoroacetic acid(TFA), sulfuric acid, p-anisaldehyde, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), ascorbic acid 및 당 표준물질 등은 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 하였음. 그 외 ethanol, n-butanol, 2-propanol, acetic acid 등 실험에 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였음.

### 2.2. 전통 방식으로 제조된 막걸리로부터 유산균의 분리

전주전통술박물관으로부터 10%(w/v)의 누룩만을 사용하여 전통적인 방식으로 제조된 막걸리를 유산균 분리용 시료로 사용하였음. 유산균의 분리를 위하여 막걸리 시료는 멸균된 0.85%(w/v) 생리식염수(NaCl)를 사용하여 십진법으로 희석한 후 100 µL를 MRS agar, Enterococcus agar, LAMVAB agar(55 g/L MAR broth, 0.05 g/L cystein-HCl, 0.005 g/L bromocresol green, 2 g/L vancomycin, 15 g/L agar) plate에 각각 도말(spread)하여 37°C 배양기에서 48시간 배양하였음. 배양 완료 후 plate상의 단일 집락(colony) 40개를 무작위로 선별하여 동일한 배지에 획선평판법(streak plate)으로 분리 접종 후 37°C 배양기에 24시간 배양하였음. 분리된 균주는 MRS 액체 배지에 접종 후 37°C에서 16시간 배양하여 30% glycerol stock을 제조하여 초저온 냉동고(-80°C)에 보관하여 실험에 사용하였음.

### 2.3. 기능성 배양 추출액(세포외다당류) 생성 유산균의 선별

#### 2.3.1. 유산균 배양액으로부터 세포외 다당류의 분리

생리활성 다당류를 생성하는 유산균주의 선별을 위해 막걸리로부터 분리한 유산균주의 배양액으로부터 세포외 다당류(exopolysaccharide, EPS)의 분리는 Song 등(2011)의 방법을 응용하여 분리하였으며, 그 과정은 figure 4와 같음. 40주의 유산균은 5%(w/v)의 glucose가 첨가된 MRS 액체 배지에 50 mL에 1%(v/v) 접종된 후 37°C, 150 rpm의 조건으로 진탕배양기(Model LSI-3016R, Daihan LabTech, Namyangju, Korea)에서 48시간 동안 배양되었음. 배양 완료된 균체 배양액(cell culture)은 항온수조(Water bath)에서 100°C, 20분 동안 열탕 처리하여 효소를 불활성화 시켰으며, 또한 배양액의 단백질 제거를 위하여 4°C 상태의 배양액에 최종농도가 4%가 되게 TCA로 처리한 후 원심분리(10,000g, 20분, 4°C)를 통해 균체와 침전된 단백질을 제거하였음. 수용성 다당류(soluble EPS)를 추출하기 위해서, 상등액 3배(v/v)의 차가운 에탄올(EtOH)을 첨가 및 교반 한 뒤 4°C에서 하룻밤동안 추출 및 침전시켰음. 원심분리(10,000g, 20분, 4°C)를 통해 얻어진 수용성 다당류 침전물은 남아있는 에탄올의 제거를 위하여 진공농축기(EYELA MG-2200)를 사용하여 40°C에서 농축 및 세척되었음. 에탄올을 제거한 세포외 다당류는 3차 증류수에 재용해하였고 배양액으로부터 유래되어 존재할 수 있는 유리당의 제거를 위해 4°C에서

48시간 동안 투석(3,500 Mw cutoff, Thermo-Scientific, MA, USA)하였음. 얻어진 세포의 다당류는 -80°C 하에서 동결건조(PVTFD100R) 후 조 세포의다당류(crude EPS) 시료로 사용하였음.

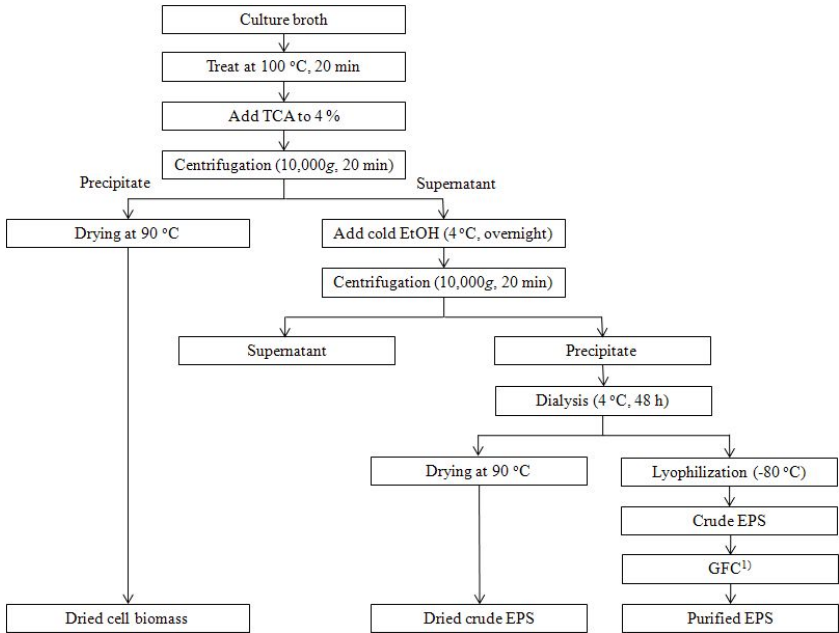


Figure 4. Purification of EPS from culture broth of *P. acidilactici* M76; <sup>1)</sup>GFC: gel filtration chromatography with a Sephadex G-200 by FPLC.

### 2.3.2. 유산균 추출액(세포의다당류)의 항산화활성

막걸리 유래 유산균 배양액으로부터 정제된 조 세포의다당류(crude EPS)의 항산화능을 분석하기 위하여 전자공여작용(electron donating abilities, EDA)에 대한 효과로 DPPH 라디칼에 대한 소거활성 분석 방법을 사용하였음. 즉, 1.0 mg/mL의 농도로 물에 녹인 crude EPS 시료 0.5 mL에 0.2 mM DPPH solution(99% MeOH에 용해) 2.0 mL을 가한 후 30분간 상온에서 암실보관한 후 분광광도계를 사용하여 517 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였음. 각 시료의 라디칼 소거능은 아래의 식(1)에 의해 시료 첨가구 및 무 첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었음.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리 구의 흡광도}}\right) \times 100 \quad (1)$$

### 2.3.3. GFC를 이용한 세포의다당류의 정제

*P. acidilactici* M76 배양액으로부터 부분정제된 조세포의 다당류의 정제를 위하여 Bio-Logic FPLC(fast protein liquid chromatography system) 시스템(BioRad, CA, USA)을 사용하여 겔 여과 크로마토그래피(GFC)를 수행하였다. 분리를 위하여 sephadex G-200(GE Healthcare, Freiburg, Germany)을 충전한 Econo-column(1.5 cm×14 cm, BioRad, CA, US)을 사용하였으며, 0.15 M NaCl 용액을 이동상으로 1.0 mL/min의 속도로 흘려주었다. 블루 덱스트란 2000 kDa(blue dextran 2000, GE Healthcare)과 gel filtration standard set(thyroglobulin 670 kDa, bovine gamma-globulin 158 kDa, chicken ovalbumin 44kDa, equine myoglobin 17 kDa, vitamin B<sub>12</sub> 1.35 kDa)를 사용하여 표준 분자들의 용출 시간비와 분자량과의 관계에 대한 GFC-elution profile을 작성하여 결정하였다. 이때 2분 간격으로 샘플을 분획(fraction)하였으며 회수된 분획의 당 함양 여부를 확인하기 위해 Masuko 등(2005)의 방법을 변형하여 총당측정법(phenol-sulfuric acid method)으로 분석하였다. 즉, 분획 시료 0.1 mL에 5%(v/v) phenol solution 0.1 mL을 첨가하여 잘 섞어준 뒤 0.5 mL의 sulfuric acid를 혼합하여 실온에서 20분간 반응시킴. 반응액은 분광광도계로 흡광도 파장 490 nm에서 분석함으로써 확인되었고, 이때 표준물질로서 glucose를 사용하였다. 또한 막걸리 유래의 유산균 *P. acidilactici* M76의 배양액으로부터 정제된 세포의 다당류(EPS) 시료는 *in vivo* 세포주를 이용한 기능성 검증을 위하여 제1세부과제로 제공하였다.

#### 2.4. *P. acidilactici* M76 추출물의 항균활성

막걸리로부터 분리 및 선발된 유산균주 *P. acidilactici* M76을 MRS 액체배지에서 1%(v/v) 접종한 후 37°C, 150 rpm의 조건으로 24시간 배양하였다. 원심분리(10,000 rpm, 10분, 4°C)를 통해 배양액으로부터 회수된 *P. acidilactici* M76 균주를 50 mM phosphate buffer(pH 7.2)로 2회 세척한 후 4°C에서 30초간 4회 sonication(Sonic Dismembrator 550, Fisher, Pittsburgh, PA)하여 세포벽을 파쇄하였다. 원심분리(10,000 rpm, 20분, 4°C)를 통해 얻어진 상등액은 0.22 µm membrane filter(Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Tokyo, Japan)에 여과하여 멸균한 다음 이를 유산균 추출물(crude extract) 시료로 사용하였다.

한편, 항균활성 실험에 사용된 균주는 gram 양성균으로 병원성 균주인 *B. cereus* KACC 10097는 분양 받은 후 3회 계대배양하여 사용하였으며, 시험균주는 5 mL의 nutrient 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C, 150 rpm의 조건으로 진탕배양기에서 24시간 배양되었다. *Bacillus cereus* KACC 10097를 plate에 100 µL 도달한 후, 멸균된 8 mm paper disc(Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Tokyo, Japan)에 *P. acidilactici* M76균주 추출물 시료를 흡수시켜 plate 표면 위에 놓아 37°C, 24-48시간 동안 배양한 후 disc 주위의 생육저해환(clear zone)의 크기를 직경(mm)으로서 비교하였다. 대조구는 유산균 추출물 대신 50 mM phosphate buffer(pH 7.2)와 항생제인 50 mg/L의 ampicillin solution를 대체하여 처리한 것을 사용하였다. 한편, 동일한 방법으로 준비된 유산균 추출물(crude extract) 시료는 *in vivo* 세포주를 이용한 기능성 검증을 위하여 제1세부과제로 제공하였다.



## 2.5. 전통 방식으로 제조된 막걸리로부터 분리된 유산균의 동정

### 2.5.1. 16S rDNA sequencing 분석

분리된 유산균주의 16S rDNA 염기서열 분석을 하기 위하여, MRS 액체 배지에 분리균주를 접종하여 37°C에서 16시간 동안 배양하였음. 배양액은 1.5 mL microcentrifuge tube에 옮겨 15,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 bacterial pellet을 수집하였음. 회수된 pellet은 50 µL TE buffer(10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)와 함께 99°C에서 10분 동안 가열된 후 15,000 rpm에서 1분간 원심분리되고, 얻어진 상등액은 PCR(polymerase chain reaction) 반응을 위한 crude total genomic DNA로 사용되었음. 16S rDNA를 증폭시키기 위하여 Taq DNA polymerase(GeneAll Biotech., Korea), forward primer(27F): (5'-AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3')와 reverse primer(1490R): (5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT C-3')는 사용되었음(Table 3). PCR cycler(Primus 25, MWG Biotech, UK)를 사용한 PCR 조건은 94°C에서 5분간 변성 후, 95°C에서 1분, 54°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 30 cycle을 반복 하였으며, 72°C에서 5분간 반응 후 종료하였음. PCR 반응산물은 1×TBE buffer를 사용한 1.2% agarose gel로 전기영동을 실시하여 확인하였음. 확인된 PCR 반응산물(총 40 균주)은 유전자 배열결정 quality를 좋게 하기 위하여 PCR product purification 후 ABI PRISM 3700 DNA analyser로 sequencing 분석 되었으며, 결정 된 염기서열은 NCBI BLAST([www.ncbi.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nih.gov/blast/))를 이용하여 GenBank에 보고된 균주와의 상동성을 조사하였음.

Table 3. PCR reaction condition.

Reaction mixture		PCR condition
10×Taq reaction buffer	5 µL	95°C, 2 min 95°C, 1 min ———— 54°C, 30 sec ———— 72°C, 1 min ———— 72°C, 5 min
dNTP mix(2.5 mM each)	4 µL	
primer 27F	0.5 µL	
primer 1490R	0.5 µL	
template	15 µL	
Enzyme(2.5U/µL)	0.5 µL	
3DW	up to 50 µL	

### 2.5.2. 생화학적 특성 분석

유산균주의 생화학적 특성 분석을 위하여 API 50 CHL reagent kit(BioMerieux, France)을 제조회사의 시험방법에 따라 사용하였음. 0.85% NaCl suspension medium 5 mL에 단일 colony를 균일하게 혼탁 시킨 다음 CHL medium 2.5 mL을 첨가하였음. 다양한 탄소원이 들어있는 API 50 CHL kit의 49개의 strip에 무균적으로 균주를 분주한 후 37°C에서 24-48시간 동안 배양하면서 배양액 색의 변화 여부를 관찰함으로써 각각의 당을 탄소원으로 이용하는지의 여부를 실험하였으며, 동정결과는 apiweb program (<http://apiweb.biomerieux.com>, Biomerieux)을 이용하여 확인하였음.

### 2.5.3. 주사전자현미경(SEM)에 의한 형태학적 분석

37°C에서 16시간 배양한 *P. acidilactici* M76 배양액 1 mL을 10,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 상등액을 제거하고 9%(w/v) NaCl 용액으로 2번 pellet을 세척한 뒤 2.5% glutaraldehyde(v/v) 1차 고정, 1% osmium tetroxide(v/v) 2차 고정, ethanol 탈수과정을 거쳤음. 고정된 균을 0.22 µm membrane filter에 옮기고 건조시킨 뒤 ion sputter로 20분간 금(Au)을 코팅시켜 주사전자현미경(Bio-LV SEM, Hitachi, Japan)에서 관찰하였음.

## 2.6. 선발된 기능성 유산균의 특성

### 2.6.1. 생육 온도, pH

*P. acidilactici* M76 균주의 생육 가능한 온도와 pH 범위를 살펴보았음. 먼저 본 균주의 생육온도를 살펴보기 위하여 MRS 액체 배지에 16시간 배양한 균주를 10 mL의 MRS 액체배지에 접종한 후 각각 다른 온도(35, 37, 40, 45, 50, 52, 53, 54, 55°C)에서 150 rpm으로 진탕배양기에서 2일간 배양한 후 생균수를 측정하였음. 생육 pH를 살펴보기 위하여 MRS 액체 배지에 16시간 배양한 균주를 HCl 용액과 NaOH 용액을 사용하여 각각 다른 pH(pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10)로 조정한 10 mL의 MRS 액체배지에 접종한 후 37°C, 150 rpm으로 진탕배양기에서 2일간 배양한 후 생균수를 측정하였음. 이때 probiotics로서 사용되고 있는 *Pediococcus* 3종(*P. acidilactici* KACC 12307, *P. stilessii* KACC 12300, *P. pentosaceus* KACC12311)을 공시균주로 하여 동일한 조건에서 분석함으로써 비교하였음.

### 2.6.2. 내당성 및 내염성 측정

*P. acidilactici* M76 균주의 내당성 시험은 MRS 액체 배지에 16시간 배양한 균주를 glucose 4, 6, 8, 10, 12, 14%(w/v)가 포함되도록 각각 첨가한 MRS 액체배지에 접종한 후 37°C, 150 rpm으로 진탕배양기에서 2일간 배양한 후 생균수를 측정하여 내당성을 비교하였음. 내염성 시험은 MRS 액체 배지에 16시간 배양한 균주를 NaCl(sodium chloride)이 4, 6, 8, 10, 12, 14%(w/v)가 포함되도록 각각 첨가한 MRS 액체배지에 접종한 후 37°C, 150 rpm으로 진탕배양기에서 2일간 배양한 후 생균수를 측정하여 내산성을 비교하였음. 이때 probiotics로서 사용되고 있는 *Pediococcus* 3종(*P. acidilactici* KACC 12307, *P. stilessii* KACC 12300, *P. pentosaceus* KACC12311)을 공시균주로 하여 동일한 조건에서 분석함으로써 비교하였음.

### 2.6.3. 내산성 및 내담즙성 측정

*P. acidilactici* M76 균주의 내산성 시험을 위해 10 mL의 MRS 액체배지에 접종한 후 37°C, 150 rpm으로 진탕배양기에서 16시간 배양한 후 원심분리(10,000g, 10분, 4°C)를 통해 배양액의 상등액을 제거하였음. 배양된 균수가 약  $1 \times 10^7$  cell/mL 되도록 링거액(NaCl: 8 g/L, KCl: 0.3 g/L, CaCl<sub>2</sub>: 0.33 g/L)으로 희석하고, 각각 pH 2.5와 7.0으로 조정된 9 mL의 PBS(phosphate buffer saline)에 균주 희석액 1 mL를 넣어준 후 37°C에서 2시간 배양을 하였음. 희석한 배양액은 링거액을 사용하여 적당한 농도로 희석한 후, MRS-agar plate를 사용하여 37°C에서 48시간 배양한 후 균수를 측정하였음. 이때 probiotics로서 사용되고 있는 *Pediococcus* 3종(*P. acidilactici* KACC 12307, *P. stilessii* KACC 12300, *P. pentosaceus* KACC12311)을 공시균주로 하여 동일한 조건에서 분석함으로써 비교하였음. 내담즙산 시험은 10 mL의 MRS 액체배지에 접종한 후 37°C, 150 rpm으로 진탕배양기에서 16시간 배양한 균주를 약  $1 \times 10^7$  cell/mL 되도록 링거액으로 희석한 후, 희석된 균주를 oxgall powder를 0.0, 0.3, 1.0, 3.0, 5.0%가 되도록

록 각각 첨가한 MRS-agar 배지에 도달한 후 37°C에서 48시간 배양한 후 생균수를 측정함으로써 담즙 산에 대한 내성을 측정하였음.

## 2.7. *P. acidilactici* M76의 세포외다당류(EPS) 생성량 (kinetic)

신발된 유산균주 *P. acidilactici* M76의 배양시간에 따른 균체량(biomass) 및 세포외다당류(EPS)의 생성량, 배양액의 pH 변화 및 배양액의 잔당량(residual sugar content) 변화의 발효양상을 살펴보았음. *P. acidilactici* M76는 5%(w/v)의 glucose가 첨가된 MRS 액체 배지에 50 mL에 1%(v/v) 집중한 뒤 37°C, 150 rpm의 조건으로 진탕배양기에서 총 24시간 동안 배양하면서 배양액의 균체량, 세포외다당류 생성량, 배양액의 pH 및 배양액의 잔당량을 살펴보았음. 균체량과 세포외다당류의 생성량은 figure 2에 나타난 것과 같이 각각 회수된 후 90°C에서 건조시키면서 무게 변화가 없을때까지의 건조중량으로 확인하였으며, 배양액의 pH는 회수된 배양액의 원심분리(10,000g, 20분, 4°C)를 통해 상등액을 취하여 DNS 방법(Miller, 1959)으로 잔당량을 측정하였음.

## 2.8. *P. acidilactici* M76로부터 생성된 EPS의 특성

### 2.8.1. GFC를 이용한 세포외다당류의 분자량 분석

*P. acidilactici* M76으로부터 생성 및 정제된 세포외다당류의 분자량을 측정하기 위해 Bio-Logic FPLC 시스템(BioRad)을 사용하여 겔 여과 크로마토그래피(GFC)를 수행하였음. 분자량 분리를 위하여 sephadex G-200(GE Healthcare)을 충전한 Econo-column(1.5 cm×14 cm)을 사용하였으며, 세포외다당류 시료를 버퍼에 5 mg/mL의 농도로 하여 주입한 후 0.15 M NaCl 용액을 이동상으로 1.0 mL/min의 속도로 흘려주었음. 블루 텍스트란 2000 kDa(blue dextran 2000)과 gel filtration standard set(thyroglobulin 670 kDa, bovine gamma-globulin 158 kDa, chicken ovalbumin 44kDa, equine myoglobin 17 kDa, vitamin B<sub>12</sub> 1.35 kDa)를 사용하여 표준 분자들의 용출 시간비와 분자량과의 관계에 대한 GFC-elution profile을 작성하여 결정하였음. 이때 회수된 분획의 당 함유 여부를 확인하기 위해 Masuko 등(2005)의 방법을 변형한 총당측정법(phenol-sulfuric acid method)을 사용하여 분석하였음. 틸새부피(V<sub>0</sub>)의 측정을 위하여 블루 텍스트란(Mw=2,000 kDa)을 사용하였으며, thyroglobulin (670 kDa), bovine gamma-globulin(158 kDa), chicken ovalbumin(44 kDa), equine myoglobin(17 kDa), vitamin B<sub>12</sub>(1.35 kDa)은 표준검량선(figure 8B)을 작성하는데 사용되었음.

### 2.8.2. TLC 및 HPLC를 이용한 세포외다당류의 당성분 분석

*P. acidilactici* M76로부터 생성 및 정제된 세포외다당류의 구성당을 조사하기 위하여 산가수분해법(Zhao et al., 2008)을 이용하여 전처리한 후 TLC 및 HPLC 분석하였음. 세포외다당류 시료 10 mg을 2N TFA 1 mL에 첨가한 뒤 100°C에서 6시간 동안 가열하여 가수분해하였음. 실온에서 냉각시킨 산 가수분해물은 동일한 양(v/v)의 증류수에 녹인 후 1N NaOH 용액에 의하여 중화시켰으며, 0.45 µm membrane filter(Advantec)로 여과한 액을 TLC 및 HPLC-ELSD 분석을 위한 시료로 사용하였음. 이때, 표준물질로 glucose, galactose, fructose, mannose, maltose, lactose, arabinose를 함께 사용하였음. TLC(thin layer chromatography, 얇은막 크로마토그래피) 분석은 silica gel 60 F254 plate(Merck, Darmstadt, Germany)와 전개용매로써 n-butanol/2-propanol /water/acetic acid(7:5:4:2, v/v/v/v)를 사용하여 수행하였음. standard 5 µL, 시료 10 µL를 각각 점적(spotting)한 plate를 전개용매에 2번 전개시켰으며, 성분(spot) 확인을 위하여 ethanol/sulfuric acid/p-anisaldehyde(18:1:1, v/v/v) 발색용액을 뿌린 뒤 120°C에서 1분 동안 발색시켜 당 표준물질의 R<sub>f</sub> 값과 분리된 spot의 색상 등으로 확인하였음.

HPLC(high performance liquid chromatography, 고속 액체 크로마토그래피) 분석은 Supelcosil™ LC-NH<sub>2</sub> column을 이용하여 등용매 용리법으로 분리하고, ELSD(evaporative light scattering detector, 증기화 광산란 검출기)에 의하여 검출함으로써 수행되었음. 세포외다당류의 산 가수분해 시료의 HPLC 분리조건은 table 4에 나타내었으며, 이때 당 표준물질은 동일한 조건에서 분석되었으며, 그 머무름시간(retention time)을 비교함으로써 확인하였음.

Table 4. HPLC-ELSD analysis condition.

Instrument	Agilent 1100 Series HPLC system(Agilent, CA, USA)
Detector	Alltech 500 ELSD detector(Alltech, IL, USA)
Column	Supelcosil™ LC-NH <sub>2</sub> , 5 μm, 4.6×250 mm (GL Sciences Inc. Japan)
Mobile Phase	water:MeCN = 25:75
Drift tube Temp.	55°C
Column Temp.	room temp.
Flow Rate	1.0 mL/min
Injection Vol.	10 μL

### 2.8.3. 적외선 분광 분석(FT-IR)을 통한 세포외다당류의 구조 분석

세포의 다당류의 구조 확인을 위해 적외선 분광분석(Fourier transform infrared spectrometry)을 실시하였음. KBr(spectroscopic-grade potassium bromide) 분말과 세포외다당류 시료(100:1, w/w)를 취하여 혼합한 후 마쇄하고 10,000 kgf/cm<sup>2</sup>의 압력을 가하여 1 mm의 pellet으로 투명한 박막을 만들었음. 그리고 Bruker IFS 66v FT-IR spectrophotometer(Bruker, Karlsruhe, Germany)로 400 cm<sup>-1</sup> ~ 4,000 cm<sup>-1</sup>의 범위에서 측정하여 스펙트럼 양상을 비교하였음.

### 2.9. *P. acidilactici* M76의 장내점착능

*P. acidilactici* M76의 *Caenorhabditis elegans*(*C. elegans*, 예쁜꼬마선충) 장내 점착능 측정을 위하여, *C. elegans*을 *P. acidilactici* M76 lawm에 1, 3, 5일 동안 각각 노출시킨 후 colonization 정도를 측정하였음. 즉, 균주 배양을 위하여 5 mL의 MRS 액체배지에 *P. acidilactici* M76 전배양액을 1%(v/v) 접종한 뒤 37°C, 150 rpm에서 약 16시간 배양하였음. 원심분리(13,000 rpm, 1 min)를 통해 배양 상등액을 제거시켜 회수한 균주 pellet은 M9 buffer에 현탁하여 5회 washing 한 뒤 최종적으로 5배 농축·현탁하고 NGM agar plate(60 mm)의 중앙에 200 μL씩 분주한 뒤 건조시킴. 각 plate에 *C. elegans* 약 100 마리를 옮긴 뒤, 80% 습도하에서 실온에서 배양하였음. 1, 3, 5일 마다 *C. elegans*를 취하여 gentamycin solution에 5 μL씩 5분간 실온에서 노출시킨 후 M9 buffer로 3회 washing 후 최종적으로 100 μL의 1% tritonX-100를 함유하는 M9 buffer에 현탁시킴. Pellet pestle motor를 이용하여 10초씩 6회 분쇄한 후 *C. elegans* extract를 MRS agar plate에 spreading함. 각각의 MRS agar plate는 37°C에서 48시간 동안 정지 배양 한 후 형성된 균수를 측정하여 계산함. 이때 *L. rhamnosus* GG는 negative control로 동일한 조건에서 시험하였음.

### 3. 통계학적 분석

본 실험결과는 관능평가를 제외하고 각 시료마다 독립적으로 3회 이상 반복 실시하여 얻은 결과를 평균±표준편차로 나타내었음. 실험군 간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS 12.0 for windows program을 이용하여 ANOVA test를 실시한 후 유의성이 있는 경우,  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였음.

### III. 연구결과

#### 1) 제 1세부 연구 결과

1. 세포주를 이용한 전통 막걸리 유래 유산균(PA)의 기능성 스크리닝

1.1 3T3-L1을 이용한 PA의 지질 축적 억제 효과

1.1.1 지방 세포 성장 억제능 측정

3T3-L1 세포에 처리할 PA의 최적 농도를 도출하기 위해 분화 전 세포에 다양한 농도의 PA를 처리하여 지방세포 성장 저해능을 확인하였음(Figure 3). 48시간에서 저농도 처리군에서는 세포성장을 높였으나, 7.8 $\mu\text{l/ml}$  보다 높은 농도에서는 지방 세포 성장이 낮아짐을 확인하였음. 따라서, 15.6, 31.3, 62.5 $\mu\text{l/ml}$  농도를 최적 농도로 선택하여 TG 함량을 확인하였음.

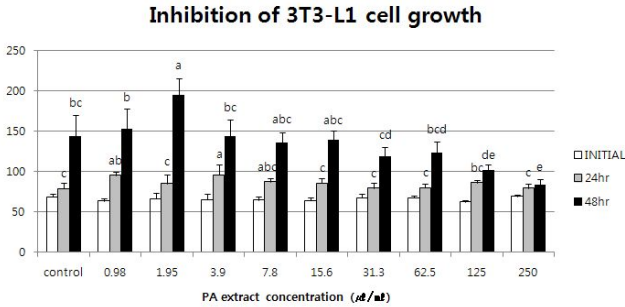


Figure 3. Inhibition of 3T3-L1 cell growth by PA crude extract.

1.1.2 Triglyceride(TG) 측정

도출된 농도를 바탕으로 세포를 분화시키면서 PA를 처리한 결과 농도 의존적으로 중성지방 함량이 감소하였음(Figure 4).

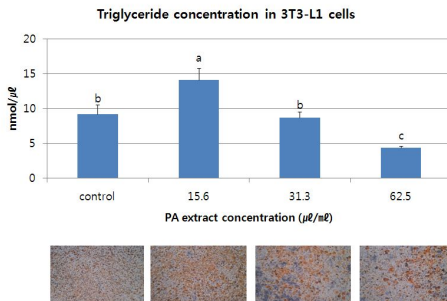


Figure 4. TG concentration in 3T3-L1 cells using PA crude extract.

1.2 RIN-m5F를 이용한 PA의 항당뇨 효과

### 1.2.1 세포 증식능 측정

RIN cell에 처리할 PA의 최적 농도를 도출하기 위해 alloxan을 처리하지 않은 세포에 다양한 농도의 PA를 처리하여 세포 증식능을 확인하였음(Figure 5). 그 결과 농도 의존적으로 세포생존능이 높아졌으며, 62.5 $\mu\text{l/ml}$  보다 높은 농도에서는 control에 비해 유의적으로 낮아졌음. 따라서 7.81 ~ 62.5 $\mu\text{l/ml}$  농도를 최적 농도로 선택함.

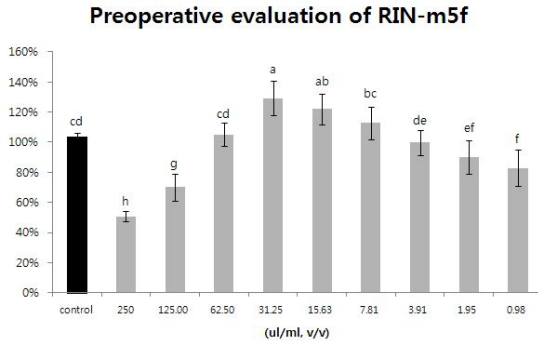


Figure 5. Preoperative evaluation with PA crude extract in RIN cells.

### 1.2.2 alloxan 처리를 위한 적정 농도 도출

free glucose media로 교체한 후 alloxan을 농도별로 처리한 결과 농도 의존적으로 세포생존능이 낮아졌으며 (Figure 6), 10mM을 alloxan의 최적 농도로 선택함.

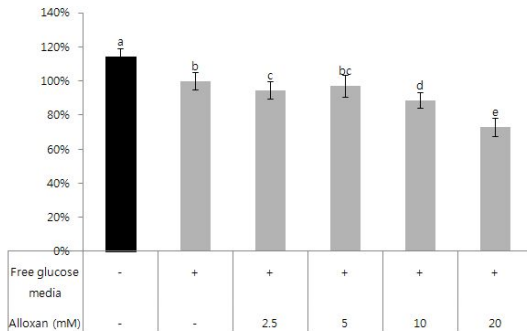


Figure 6. Cell viability with alloxan in RIN cells.

### 1.2.3 alloxan에 대한 세포 보호 효과

세포 증식능을 통해 도출된 농도(7.81, 15.63, 31.25, 62.5 $\mu\text{l/ml}$ )로 시료를 전처리한 후 10mM alloxan을 처리한 결과 (Figure 7) 모든 처리군에서 농도 의존적으로 세포 생존능이 증가하였음.

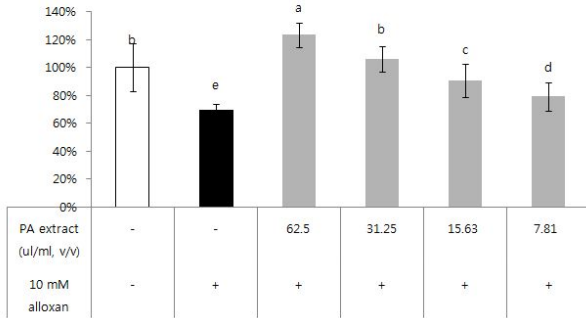


Figure 7. Cell viability with PA crude extract of Rin cells.

### 1.3 HepG2를 이용한 PA의 간세포 보호 효과 확인

#### 1.3.1 세포 증식능 측정

HepG2에 처리할 PA의 최적 농도를 도출하기 위해 CCl<sub>4</sub>를 처리하지 않은 세포에 다양한 농도의 PA를 처리하여 세포 증식능을 확인하였음. control에 비해 31.3 $\mu$ l/ml 보다 높은 농도에서 세포 생존능이 유의적으로 높아졌음(Figure 8). 따라서, 50 $\mu$ l/ml 이상의 농도를 최적 농도로 선택함.

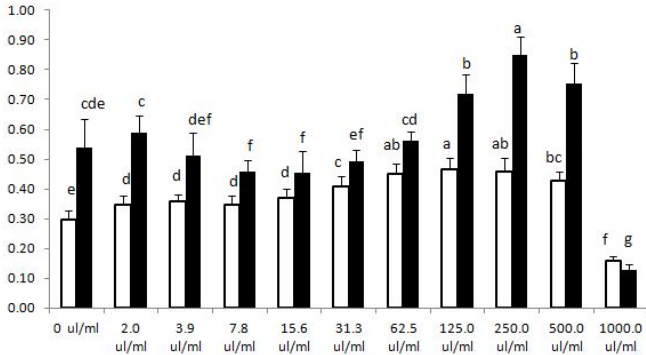


Figure 8. Cell viability for HepG2 treated for 24 and 48 hrs with PA crude extract.

#### 1.3.2 CCl<sub>4</sub>에 대한 세포 보호 효과

도출된 농도를 바탕으로 PA의 CCl<sub>4</sub>에 대한 보호 효과를 관찰한 결과 농도 의존적으로 세포 생존능이 증가하였음(Figure 9)



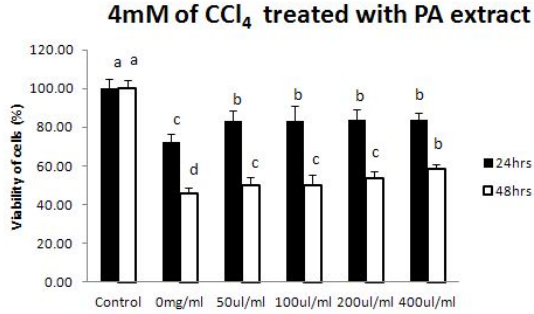


Figure 9. Cell viability of PA crude extract against 4mM of CCl<sub>4</sub>.

#### 1.4 SK-N-SH를 이용한 PA의 뇌세포 보호 효과 확인

##### 1.4.1 세포 증식능 측정

SK-N-SH에 처리할 PA의 최적 농도를 도출하기 위해 Aβ를 처리하지 않은 세포에 다양한 농도의 PA를 처리하여 세포 증식능을 확인하였음 (Figure 10). 15.6 μl/ml 이상의 농도에서는 농도 의존적으로 세포 증식능이 낮아졌음. 따라서 1 ~ 7.8 μl/ml 농도를 최적 농도로 선택함.

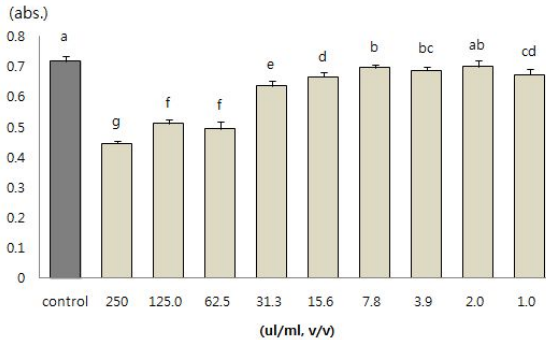


Figure 10. Cell viability with PA crude extract in SK-N-SH cells.

##### 1.4.2 Aβ에 대한 세포 보호 효과

도출된 농도를 바탕으로 PA의 Aβ에 대한 보호 효과를 관찰한 결과 농도별 유의적인 차이가 없었음 (Figure 11).

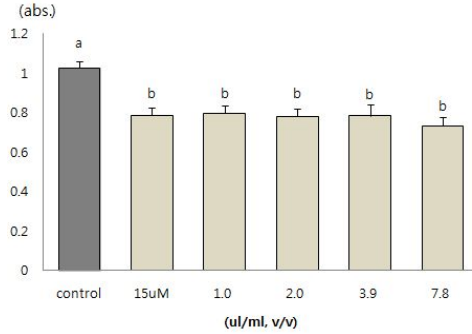


Figure 11. Cell viability of PA crude extract against 15uM of Aβ.

## 2. 세포주를 이용한 유산균 유래 세포외다당류(EPS)의 기능성 스크리닝

### 2.1 3T3-L1을 이용한 EPS의 지질 축적 억제 효과

#### 2.1.1 지방 세포 성장 억제능 측정

3T3-L1 세포에 처리할 EPS의 최적 농도를 도출하기 위해 분화전 세포에 다양한 농도의 EPS를 처리하여 세포 저해능을 확인하였음(Figure 12). EPS 농도가 높아질수록 세포성장이 유의적으로 높아졌음.

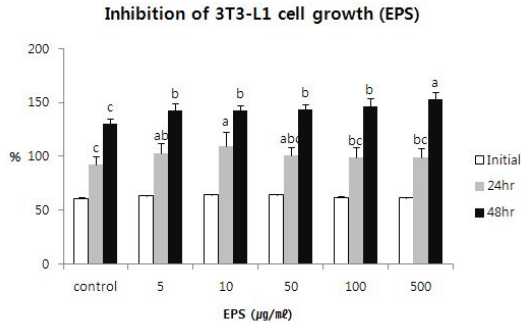


Figure 12. Inhibition of 3T3-L1 cell growth by EPS.

#### 2.1.2 Triglyceride(TG) 측정

EPS의 세포 성장 억제능이 나타나지 않아 세포를 분화시키면서 같은 농도로 EPS를 다시 처리한 결과 유의적인 차이가 없었음(Figure 13).

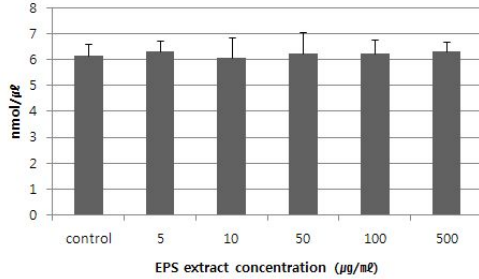


Figure 13. TG concentration in 3T3-L1 cells using EPS.

## 2.2 RIN-m5F를 이용한 EPS의 항당뇨 효과

### 2.2.1 세포 증식능 측정

RIN cell에 처리할 EPS의 최적 농도를 도출하기 위해 alloxan을 처리하지 않은 세포에 다양한 농도의 EPS를 처리하여 세포 증식능을 확인하였음(Figure 14). EPS 농도가 높아질수록 250μg/ml까지 농도 의존적으로 세포 증식능이 증가 하였음.

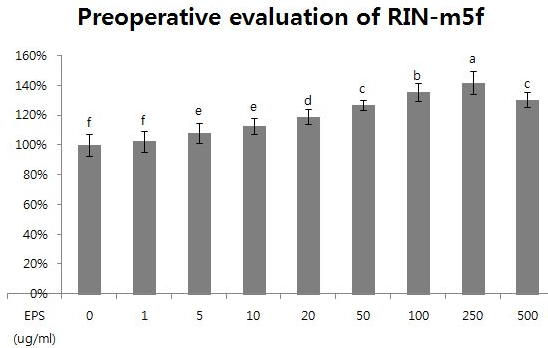


Figure 14. Cell viability with EPS in RIN cells.

### 2.2.2 alloxan에 대한 세포 보호 효과

도출된 농도를 바탕으로 EPS의 alloxan에 대한 보호 효과를 관찰한 결과(Figure 15) control에 비해 모든 농도에서 세포 생존능이 유의적으로 낮아졌음.

### Cell viability of RIN-m5F with EPS

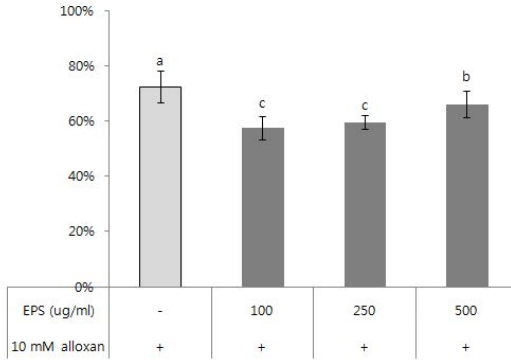


Figure 15. Cell viability of RIN cell with EPS.

### 2.3 HepG2를 이용한 EPS의 간세포 보호 효과 확인

#### 2.3.1 세포 증식능 측정

HepG2에 처리할 EPS의 최적 농도를 도출하기 위해 CCl<sub>4</sub>를 처리하지 않은 세포에 다양한 농도의 EPS를 처리하여 세포 증식능을 확인하였음(Figure 16). 24시간 처리시 0.05 ~ 0.2mg/ml 농도에서 control에 비해 세포 생존율이 증가하였음.

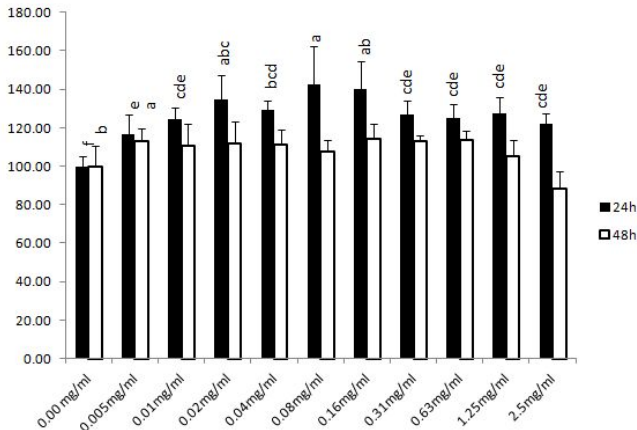


Figure 16. Cell viability for HepG2 treated for 24 and 48 hrs with EPS

#### 2.3.2 CCl<sub>4</sub>에 대한 세포 보호 효과

도출된 농도를 바탕으로 EPS의 CCl<sub>4</sub>에 대한 보호 효과를 관찰한 결과(Figure 17) 농도별 유의적인 차이가 없었음.

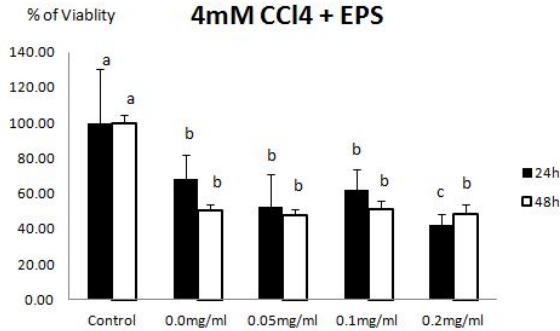


Figure 17. Cell viability of EPS against 4mM CCl<sub>4</sub>.

## 2.4 SK-N-SH를 이용한 EPS의 뇌세포 보호 효과 확인

### 2.4.1 세포 증식능 측정

세포에 다양한 농도의 EPS를 처리하여 세포 증식능을 확인한 결과 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 가장 높은 세포 증식능을 보였음(Figure 18).

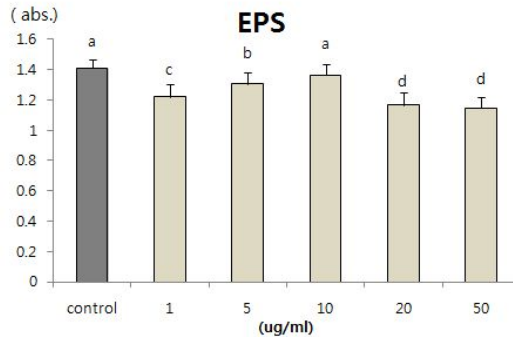


Figure 18. Cell viability of SK-N-SH cell with EPS.

## 3. 세포주를 이용한 막걸리 추출액의 기능성 스크리닝

MH(전통막걸리 물추출물), MB(전통막걸리 BuOH 추출물), MC(전통막걸리 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 추출물) 및 CH(시판 막걸리 물추출물), CB(시판막걸리 BuOH 추출물), CC(시판막걸리 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 추출물)에 대한 기능성을 확인하였음.

### 3.1 3T3-L1을 이용한 전통 막걸리 추출액의 지질 축적 억제 효과

#### 3.1.1 지방 세포 성장 억제능 측정

분화전 세포에 막걸리 추출액을 다양한 농도로 처리하여 세포 지해능을 확인한 결과(Figure 19), 24시

간 처리시 control에 비해 모든 시료에서 지방 세포 성장이 유의적으로 낮아진  $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 최적 농도로 선택하였음.

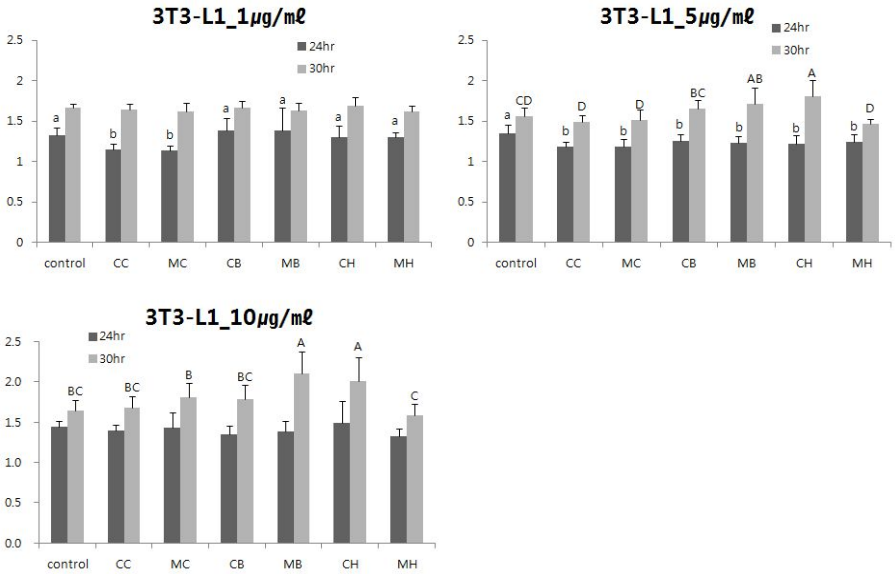
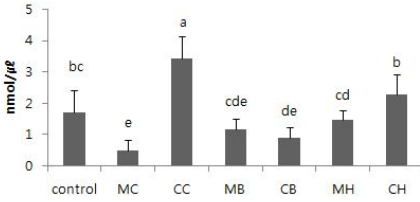


Figure 19. Cell viability in 3T3-L1 cells using Makgeolli.

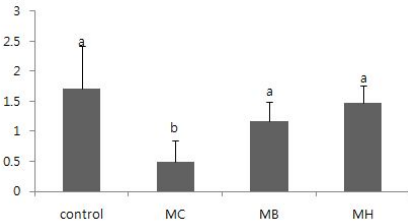
### 3.1.2 Triglyceride(TG) 측정

도출된  $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 바탕으로 세포를 분화시키면서 시료를 처리한 후 TG를 측정 한 결과(Figure 20. A) 다양한 추출물 중  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  추출물의 TG 농도가 control에 비해 유의적으로 낮아졌으며(Figure 20. B),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  추출물에 대해서 전통막걸리와 시판막걸리를 비교한 결과 전통막걸리의 TG 농도가 control에 비해 유의적으로 낮아졌음(Figure 20. C).

A)



B)



C)

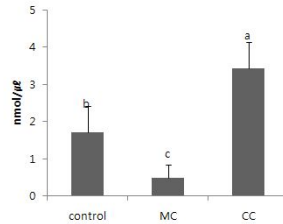


Figure 20. TG concentration in 3T3-L1 using Makgeolli.

### 3.2 RIN-m5F를 이용한 전통 막걸리 추출액의 항당뇨 효과

#### 3.2.1 세포 증식능 측정

다양한 막걸리 추출액 시료를 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 후 세포 증식능을 확인한 결과 control에 비해 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 및 BuOH 추출물의 세포 증식능이 유의적으로 높아졌음(Figure 21).

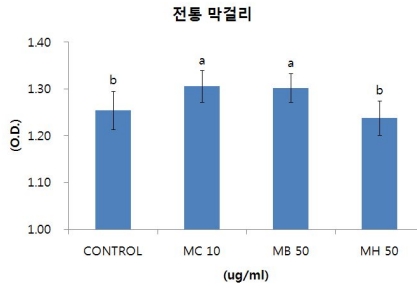


Figure 21. Cell viability of RIN-m5F using Makgeolli.

#### 3.2.2 alloxan에 대한 세포 보호 효과

세포를 분화시키면서 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 시료를 처리한 후 생존능을 확인한 결과(Figure 22) 다양한 추출물 중 BuOH 및 물추출물의 세포 생존능이 유의적으로 증가하였으며, 각각의 추출물에 대해서 전통막걸리와 시판막걸리를 비교한 결과 전통막걸리의 세포 생존능이 alloxan control에 비해 유의적으로 높아졌음.

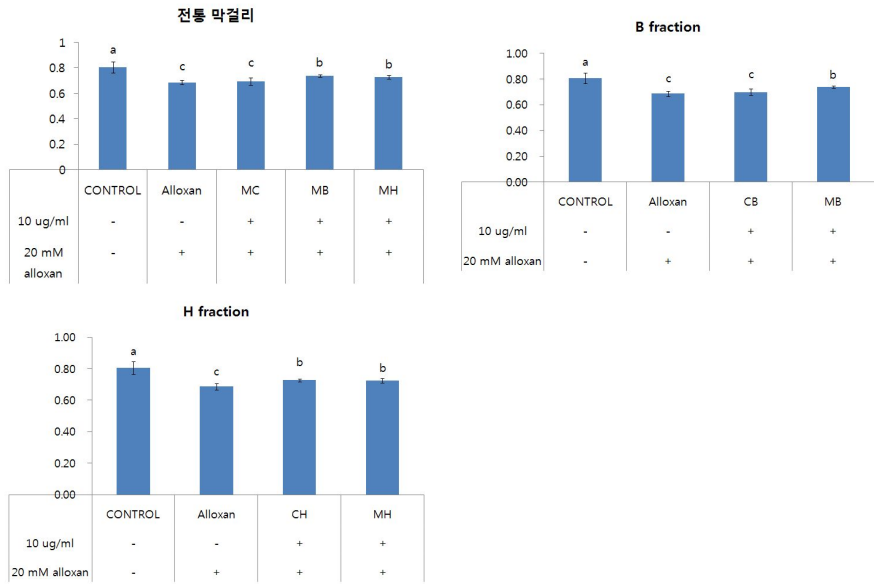


Figure 22. Cell viability of RIN-m5F using Makgeolli.



### 3.2.3 SOD 활성 측정

막걸리 추출액 처리 후 SOD 활성을 측정된 결과(Figure 23) BuOH 추출물에서 항산화 활성이 유의적으로 가장 높았음. 각각의 추출물에 대해서 진통막걸리와 시판막걸리를 비교한 결과 두 그룹간의 유의적인 차이는 없었음.

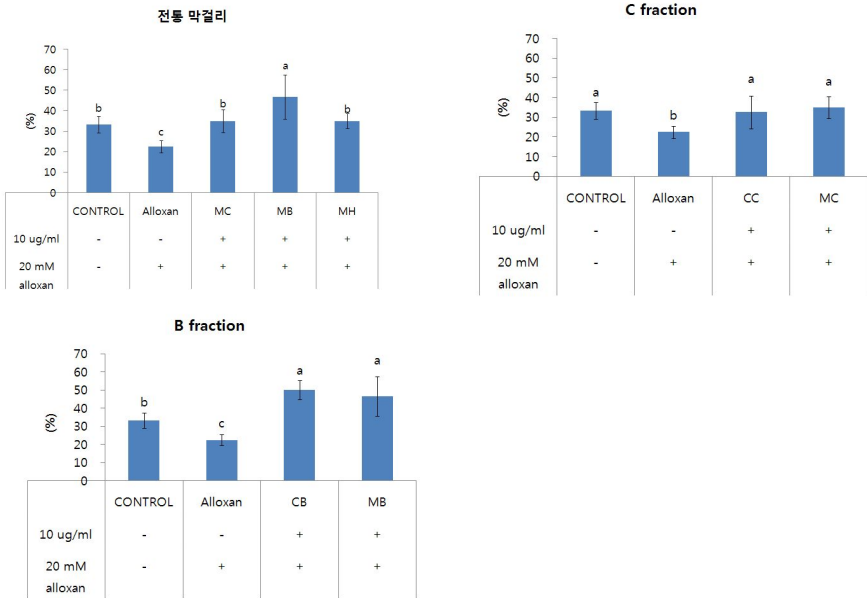


Figure 23. SOD activity of RIN-m5F treated with Makgeolli.

### 3.3 HepG2를 이용한 전통 막걸리 추출액의 간세포 보호 효과 확인

#### 3.3.1 세포 증식능 측정

다양한 전통 막걸리 추출액을 처리하여 세포 증식능을 확인한 결과(Figure 24) 추출 용매별로 다른 세포 증식능을 나타내었음. 이를 바탕으로 CCl<sub>4</sub>에 대한 세포 보호 효과를 확인하였음.

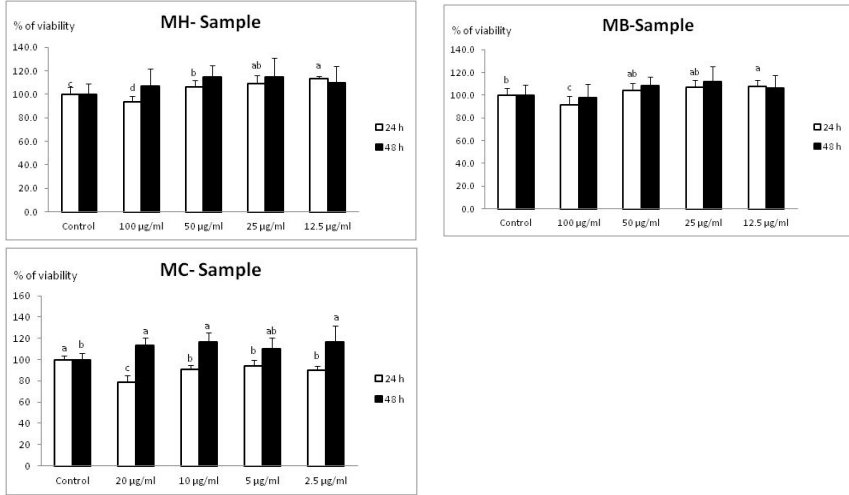


Figure 24. Cell viability of HepG2 cells using Makgeolli.

#### 3.3.2 CCl<sub>4</sub>에 대한 세포 보호 효과

도출된 농도를 바탕으로 전통 막걸리 추출액의 CCl<sub>4</sub>에 대한 보호 효과를 확인한 결과 모든 처리군에서 유의적으로 세포 생존능이 유의적으로 증가하였으며(Figure 25 A), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 추출물에 대해서 전통막걸리와 시판막걸리를 비교한 결과 시판막걸리보다 전통막걸리의 세포 생존능이 유의적으로 높았음(Figure 25 B).

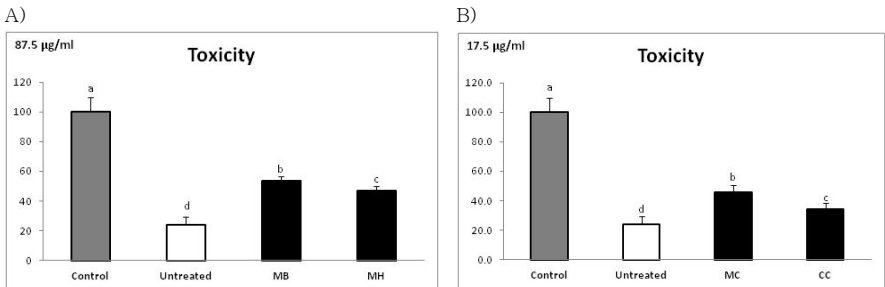


Figure 25. Cell viability of HepG2 using Makgeolli against 4mM CCl<sub>4</sub>.

4. 세포 실험 결과를 바탕으로 한 우수 대표(타겟) 기능성 선별

PA 및 EPS는 세포주를 이용한 기능성 스크리닝 결과 지질 축적 억제 효과의 경우 EPS 보다 PA의 기능이 우수하였으며, 실험동물이 섭취할 양을 고려할 때 EPS 보다 PA가 용이하다고 판단함.

따라서, 실험동물모델에서의 PA의 기능성 확인은 고지방식이 섭취시 비만/당뇨가 유발되는 C57BL/6J mice를 사용하여 항비만/당뇨 효과를 확인하였음. 또한, 막걸리 추출액은 과제 심사자의 의견 및 술의 특성을 반영하여 알코올 함유 및 알코올이 배제된 상태의 시료에서 지질대사 및 알코올 분해 효과를 확인하였음.

5. 만성 알코올 섭취 실험동물모델을 이용한 전통 막걸리의 지질 대사 및 알코올 분해능 확인

5.1 체중 변화 및 식이 섭취량

초기체중, 마지막 체중, 부고환 주변 지방, 식이 섭취 및 에너지효율은 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았음.

Table 2. Body weight and feed intake of rat.

	NC	EC	MCO	MC10
initial body weight (g)	181.01±6.8 <sup>ns</sup>	184.07±9.05	179.47±4.10	182.36±5.59
final body weight (g)	453.42±28.27 <sup>ns</sup>	446.58±23.48	449.50±17.23	446.91±17.73
weight gain (g)	272.41±21.86 <sup>ns</sup>	262.51±18.91	270.03±14.85	264.55±19.01
epididymal fat (g)	10.5±3.85 <sup>ns</sup>	9.25±1.16	10.62±2.47	10.30±2.28
feed intake (g/day)	21.17±1.1 <sup>ns</sup>	20.53±0.90	20.93±0.90	20.58±1.22
energy intake (kcal/day)	81.49±4.23 <sup>ns</sup>	79.04±3.46	80.58±3.46	79.24±4.71

### 5.2 혈청 및 간의 지질성상 확인

혈청 TG는 에탄올 섭취 그룹(EC)에서 가장 높았으며 EC와 비교시 MC0(전통막걸리 0도) 그룹에서 유의적으로 낮아졌음. 혈청 총콜레스테롤(TC) 및 혈청 HDL-c(high density lipoprotein cholesterol)은 그룹 간의 유의적인 차이가 없었음.

간중 TG는 EC군에서 가장 높았으며, MC0군에서 유의적으로 낮아졌음. 간중 TC 함량은 EC와 비교시 모든 막걸리 투여군에서 유의적인 차이를 보이지 않았음.

Table 3. lipid profiles in rat.

	NC	EC	MC0	MC10
<i>Serum (mg/dl)</i>				
Triglyceride (TG)	113.20±14.59 <sup>b</sup>	143.30±21.27 <sup>a</sup>	123.50±12.94 <sup>b</sup>	126.86±11.73 <sup>ab</sup>
Total cholesterol (TC)	168.50±47.37 <sup>ns</sup>	183.70±34.35	240.67±93.78	191.57±56.92
HDL-c	40.30±8.33 <sup>ns</sup>	40.50±5.21	40.00±4.05	40.29±5.44
<i>Liver (mg/g)</i>				
TG	46.73±11.94 <sup>c</sup>	92.69±19.69 <sup>d</sup>	65.77±15.96 <sup>b</sup>	77.96±13.99 <sup>ab</sup>
TC	1.00±0.53 <sup>b</sup>	4.09±1.50 <sup>a</sup>	3.33±1.39 <sup>a</sup>	3.40±2.53 <sup>a</sup>

### 5.3 혈청의 GOT 및 GPT 측정

혈청 중의 GOT(glutamic-oxaloacetic transaminase) 농도는 EC 그룹과 비교시 MC0 군에서 유의적으로 낮아졌으며, GPT(glutamic-pyruvic transaminase) 농도는 EC 그룹과 비교시 MC0 및 MC10 그룹에서 낮아졌음.

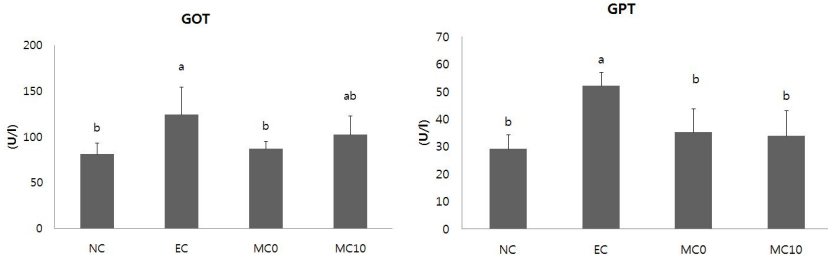


Figure 26. GOT and GPT concentration in serum.

#### 5.4 알코올 분해능 (alcohol clearance) 측정

알코올 섭취후 30, 60, 120, 240 및 360분에 꼬리에서 전혈을 채취하여 혈중 ethanol을 측정한 결과 그룹간의 유의적인 차이는 없었음.

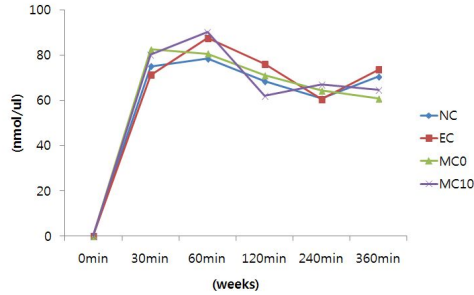


Figure 27. alcohol clearance test

#### 5.5 Alcohol dehydrogenase(ADH) 측정

혈중의 ADH의 농도는 유의적인 차이가 없었으나, 간중의 ADH의 농도는 EC 그룹에 비해 MC10 그룹에서 높아지는 경향을 보였음.

Table 4. ADH concentration.

ADH (mU/ml)	NC	EC	MCO	MC10
serum	6.29±1.19 <sup>ns</sup>	4.51±1.77	4.31±1.02	4.54±1.93
liver	28.56±9.52 <sup>a</sup>	17.15±4.24 <sup>b</sup>	12.11±6.40 <sup>b</sup>	20.56±6.86 <sup>ab</sup>

#### 5.6 지질대사 관련 유전자 수준 변화 확인

지방조직의 생성을 유도하는데 필수적인 PPAR $\gamma$ (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ )는 EC군에서 수준이 증가하였고 모든 막걸리 투여군에서 낮아졌음. 지질 산화에 관여하는 ACO(acyl-CoA oxidase)는 EC군에 비해 MCO군에서 높아졌음.

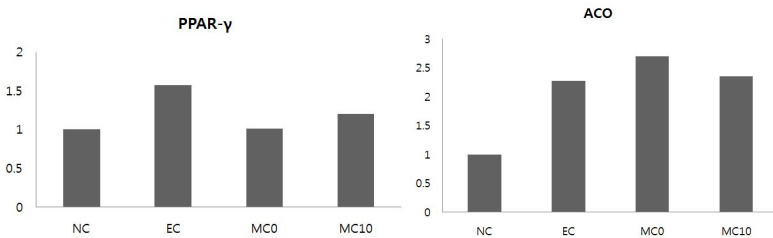


Figure 28. hepatic lipid metabolic gene expression level.

6. 고지방식이섭취 실험동물모델(C57BL/6)을 이용한 PA의 항비만/당뇨 효과 확인

6.1 체중 변화 및 식이 섭취량

초기체중은 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 12주 후의 체중 및 부고환주변지방량은 고지방식이 섭취에 의해 증가하였으며, HD 그룹과 비교시 PA 그룹에서 유의적으로 낮아졌음. 식이섭취량은 ND에 비해 HD 그룹에서 증가하였으나, HD 그룹간의 유의적인 차이는 없었음.

Table 5. Body weight and feed intake of mice.

	ND	HD	PR	PA
initial body weight (g)	18.86±0.77 <sup>NS</sup>	19.00±0.43	19.05±1.43	19.13±0.68
final body weight (g)	23.72±1.07 <sup>c</sup>	40.69±3.58 <sup>a</sup>	39.37±2.60 <sup>ab</sup>	37.63±4.38 <sup>b</sup>
epididymal fat (g)	0.43±0.19 <sup>c</sup>	3.02±0.82 <sup>a</sup>	2.53±0.48 <sup>ab</sup>	2.26±0.58 <sup>b</sup>
feed intake (g/day)	2.06±0.05	2.43±0.18 <sup>*</sup>	2.19±0.07	2.32±0.11
energy intake (kcal/day)	7.92±0.21	12.71±0.93 <sup>*</sup>	11.45±0.36	12.14±0.55

feed intake & energy intake : ND compared with HD by Independent t-test at  $p < 0.05$ .

6.2 혈청의 지질성상 확인

총콜레스테롤(TC), LDL콜레스테롤(LDL-c)은 고지방식이 섭취에 의해 유의적으로 증가하였으며, HD 그룹과 비교시 PA 그룹에서 유의적으로 낮아졌음. 중성지방(TG)은 유의적인 차이가 없었음.

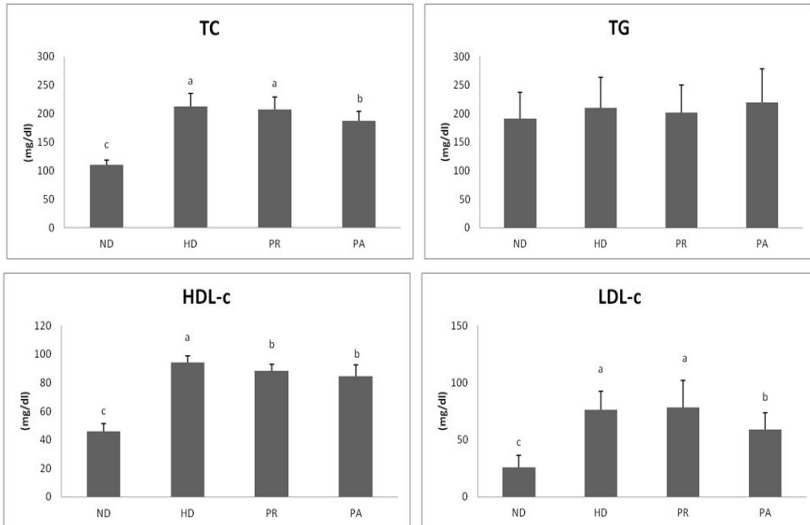


Figure 29. Serum lipid profiles.

### 6.3 간중 지질성상 확인

간중 TG 및 TC 함량은 고지방식이 섭취에 의해 유의적으로 증가하였으며, HD 그룹과 비교시 PA 그룹에서 유의적으로 낮아졌음.

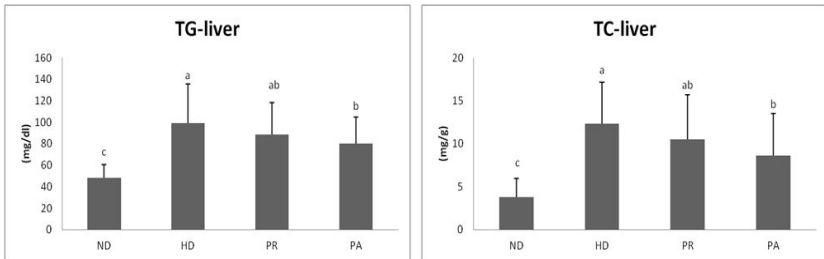


Figure 30. Hepatic liver profiles.

### 6.4 insulin 및 leptin 함량 측정

인슐린 유의적인 차이를 보이지 않았음. 지방세포에서 분비되는 호르몬인 leptin은 HD군과 비교시 모든 섭취군에서 유의적으로 낮아졌음.

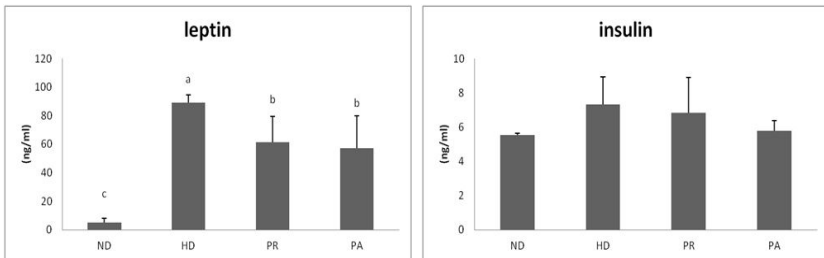


Figure 31. Serum insulin & leptin concentration.

### 6.5 혈당 변화 확인

공복시 혈당 변화는 시료 투여 5주부터 모든 HD군에서 유의적으로 높았으며, 11주에는 HD군과 비교 시 PA 군에서 유의적으로 낮아졌음.

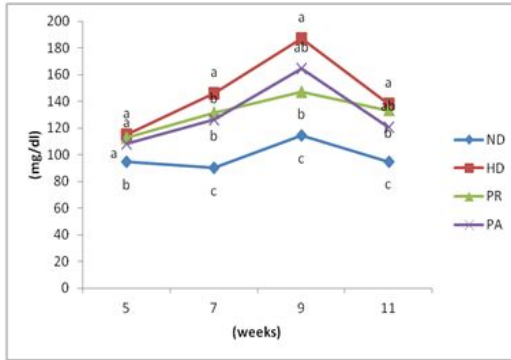


Figure 32. Fasting blood glucose levels.

### 6.6 내당능 측정

0분에는 ND군을 제외한 모든 투여군에서 유의적으로 높았으나, 투여군간에는 유의적인 차이를 보이지 않았음. 포도당 투여 후 120분부터 HD군과 비교 시 PR 및 PA 그룹에서 유의적으로 혈당이 낮아졌음.

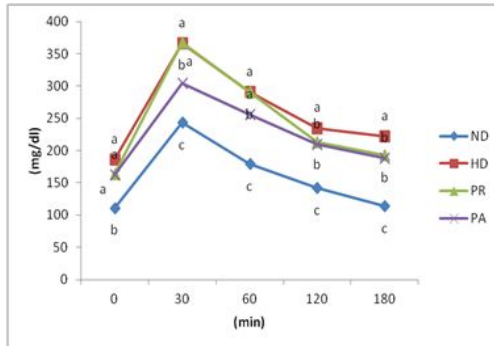


Figure 33. Oral glucose tolerance test.



6.7 지질대사 관련 유전자 수준 변화 확인

지질 대사에서 지질 합성에 관여하는 ACC(acetylco-CoA carboxylase), FAS(fatty acid synthase) 및 PPAR $\gamma$ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)는 HD군과 비교시 PA군에서 유의적으로 감소하였음. 지질 산화에 관여하는 CPT I (Carnitine palmitoyltransferase I)은 HD군과 비교시 PA군에서 유의적으로 증가하였음. 그러나 ACO(acyl-CoA oxidase) 수준은 HD군과 비교시 모든 섭취군에서 낮아졌으며, PPAR $\alpha$ (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha)의 수준은 유의적인 차이가 없었음.

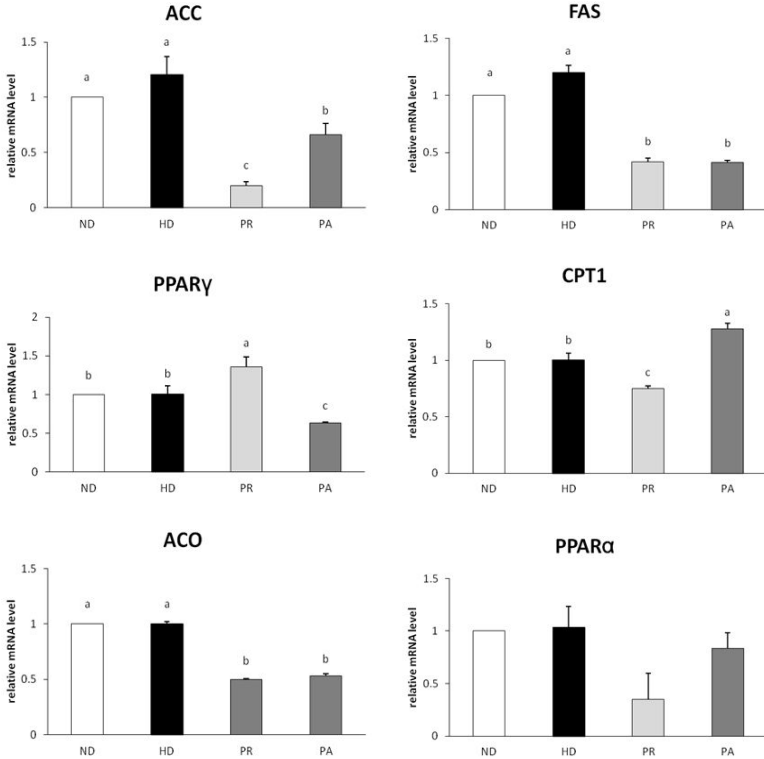


Figure 34. Hepatic lipid metabolic gene expression level.

## 2) 제 2세부 연구 결과

### 1. 표준화된 전통 막걸리 추출물의 기능성분석 및 막걸리유래 고 생리활성 물질 분리

#### 1.1. 전통막걸리의 표준화 지표 확립을 위한 제조공정의 확립

##### 1.1.1. 알코올 및 당 함량

전라도 지역의 전통막걸리인 방문주 제조방식에 의한 막걸리 제조법은 막걸리 발효를 위한 종균으로써 누룩만을 사용하며, 누룩이 10% 내외로 첨가되어지지만, 현재 사용되는 누룩은 전통누룩 제조장인 전라남도 송정의 송학곡자에서 제조된 것으로 당화력(saccharogenic power)이 300 sp로 효소역가에 비하여 과다하게 첨가되는 점을 고려하여, 누룩의 첨가량을 검토할 필요가 있었음. 따라서 최적의 누룩함량을 결정하기 위하여 각각 5%(MN5), 10%(MN10), 20%(MN20)의 누룩이 함유된 막걸리를 제조하였음. 밀술 완료 3일째, 덧술의 주발효 완료 지점인 7일째 및 후발효 32일을 포함하는 45일간의 발효기간과 발효 후 4°C에서 28일간 저장하는 동안 알코올 함량과 당 함량의 변화를 측정 한 결과는 다음과 같음.

먼저, 알코올 농도는 막걸리의 주질을 결정하는데 중요한 요소 중 하나로, 알코올 발효는 당분을 에탄올과 CO<sub>2</sub>로 분해한 것으로 figure 1과 같이 담금 후 기포 발생의 유무로 알코올 발효가 진행되고 있음을 알 수 있었음(Lee 등, 2000; Kim 등, 2007). 본 연구에서 누룩 함유량 별로 제조된 막걸리의 알코올 함량(%)을 살펴본 결과, figure 5(A)와 같이 주발효가 완료된 발효 7일의 알코올 함량은 MN20에서 20.8%로 MN10(17.6%), MN5(13.6%)와 비교하여 상대적으로 가장 높은 알코올 함량을 나타내면서 누룩 함유량이 높을수록 초기 알콜 생성 속도가 더 빠르다는 것을 알 수 있었음. 그러나 32간의 후발효가 완료된 발효 45일째의 알코올 함유량은 MN5에서 18.2%, MN10에서 18.1%, MN20에서 17.3%로 17% 내외의 원주가 만들어졌음. 이러한 결과는 누룩함유량이 적을수록 초기 알코올 생성 속도는 상대적으로 느렸으나, 후발효 동안 점차 그 생성량이 증가되었으며 소비된 알코올 함량이 적었던 것으로 생각됨. 또한 막걸리 제조 후 4°C에서 28일간 저장되는 동안 알코올 함량은 MN5(73일째, 18.2%)에서는 뚜렷한 변화의 경향 없이 유지되는 반면 MN10(73일째, 16.3%)과 MN20(15.5%)에서는 초기보다 다소 감소하는 것으로 나타났음. Lee 등(2011)에 따르면 시판 막걸리의 알코올 함량은 5.99-7.46% 수준으로 나타났고, Jeon 등(2012)의 보고에 의하면 전통적으로 제조된 막걸리의 알코올 함량은 9.0-18.5% 수준인 것으로 나타났음. 시판 막걸리는 물을 희석하여 알코올 도수를 낮추기 때문에 전통적으로 제조된 막걸리와 비교하여 상대적으로 낮은 알코올 함량을 보이는 것으로 생각되고, 본 연구에서 제조된 막걸리는 17.3-18.2%로 전통적으로 제조된 다른 막걸리들과 유사한 수치를 나타냈음.

전통주 중의 당분은 미생물의 발효 기질로 이용되어 막걸리의 에탄올 생성과 감미도에 관여하는 성분으로 중요시됨(Kim and Eun, 2012). 본 연구에서 누룩 함유량별로 제조된 막걸리의 45일간의 막걸리 제조 기간 및 4°C에서 28일간 저장하면서 당함량(°Brix)의 변화를 살펴본 결과는 figure 5(B)와 같음. 밀술이 완료된 3일의 당함량은 10.1-11.7°Brix 정도였고, 주발효가 완료된 발효 7일의 당 함량은 MN20에서 29.3°Brix로 MN10(24.1°Brix)과 MN5(26.6°Brix)과 비교하여 상대적으로 가장 높은 당 함량을 나타냈음. 이러한 초기의 당함량은 누룩의 함량이 높을수록 당도가 높음으로써 알코올 발효가 잘 진행되어 초기 MN20에서 높은 알코올 함량이 나타난 것으로 미루어 짐작 할 수 있음. 그 후 발효 기간 및 저장 기간이 증가함에 따라 당 함량은 뚜렷한 변화의 경향 없이, 저장 28일인 72일째 당 함량은 MN5에서 23.4°Brix, MN10에서 27.5°Brix, MN20에서 29.4°Brix로 나타났음. 이러한 결과는 누룩함유량이 많을수록 제조된 막걸리의 당함량이 높게 나타나는 경향을 보였음. 시판 막걸리의 당 함량이 6.13-19.70°Brix 수준인 것과 비교하여(Jeong 등, 2011) 본 연구에서 전통적으로 제조된 막걸리는 24.1-29.3°Brix로 상대적으로 더 높은 수준인 것으로 나타났음. 발효기간 중의 당도 측정결과는 당이 효모의 활동을 위하여 이용되나,

당의 이용 속도에 차이가 있음을 보여줌(Ji 등, 2009). 당화 amylase 작용으로 원료의 전분질은 당분으로 분해되고 동시에 효모의 영양원이나 발효기질로 이용되므로 발효 후기에 효모의 증식시 당함량이 감소됨. 누룩만을 가지고 막걸리를 제조하였을 때, 밀술 제조 시 첨가되는 누룩 함량이 높을수록 더 높은 당 함량을 가지게 되어, 그 첨가량이 높을수록 막걸리의 당도가 더 높게 측정된 것으로 판단 됨.

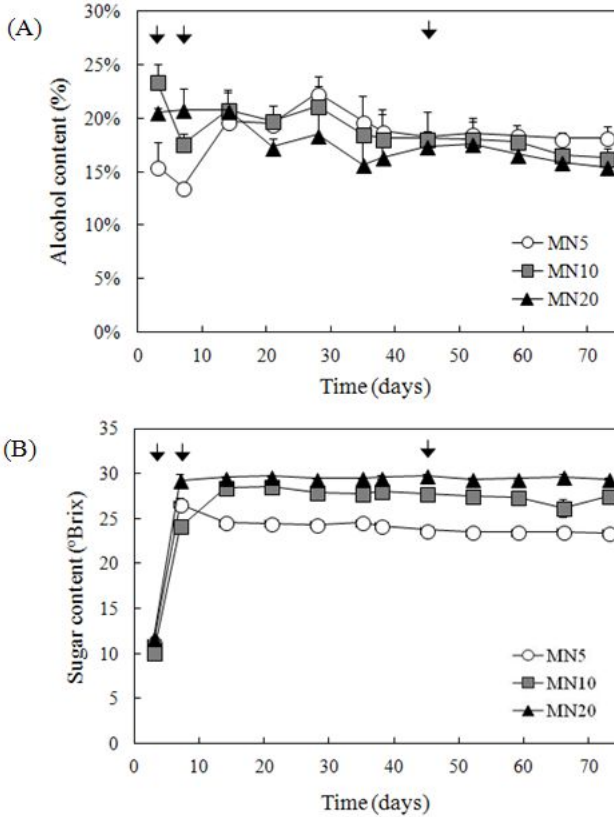


Figure 5. Alcohol(A) and sugar(B) contents of makgeolli prepared with different nuruk contents.

### 1.1.2. pH 및 총산 측정

발효 과정 중에서 생성되는 유기산, 탄산가스 및 기타 산과 같은 물질들에 의해 완제품의 pH 함량에 영향을 미치는데, 이는 막걸리의 성분변화를 알 수 있는 요인이고 알코올 생성과정에서 복합적으로 생성되어 막걸리의 발효진행 상황도 짐작할 수 있는 중요한 지표성분임(Kim and Eun, 2012; Jeong 등, 2006). 누룩함유량별로 제조된 막걸리의 pH의 변화를 살펴본 결과는 figure 6(A)와 같음. 밀술이 완료된 3일의 pH는 MN5에서 3.44, MN10에서 3.75 및 MN20에서 3.91로 누룩 함량이 높을수록 높은 pH를 나타냈음. 주발효가 완료된 발효 7일의 pH도 MN20에서 4.26로 MN10(4.31)과 MN5(3.81)와 비교하여 가장 높은 pH를 나타냈음. 그 후 발효 기간 및 저장 기간이 증가함에 따라 pH는 뚜렷한 변화의 경향 없이 약간의 증가 후 감소되어, 45일째 pH는 MN5에서 3.94, MN10에서 4.29, MN20에서 4.23으로 나타나며, 최종적인 pH는 MN10에서 가장 높았음. Jeong 등(2011)의 연구결과에 의하면 시판 막걸리의 pH는 3.51-4.59 수준이며, Jeon 등(2012)은 전통적으로 제조된 막걸리는 3.27-3.76의 pH를 나타낸다고 보고하였음. 이러한 결과를 통해 본 연구에서 제조된 막걸리는 전통적으로 제조된 타 막걸리와 비교하여 상대적으로 높은 pH를 나타내며, 그 수치는 시판 막걸리의 수준과 유사하다는 것을 알 수 있었으며, 신맛을 느낄 수 있을 정도까지 pH가 감소할 경우 막걸리는 상품적 가치를 상실하게 되어 보통 상품으로서의 막걸리는 pH 4.2 내외여야 한다는 것을 고려할 때(Lee 등, 2009), 누룩이 10-20%를 함유하여 제조된 막걸리에서 적절한 pH를 나타내었음. 또한 4°C에서 저장 28일간 저장한 72일째 pH는 MN5에서 3.97, MN10에서 4.28, MN20에서 4.18로 나타나 약 1달간의 저장기간 동안 pH는 큰 변화가 없는 것으로 나타났음.

산도의 변화는 막걸리의 성분 변화를 쉽게 알 수 있는 요인 일 뿐 아니라 알코올 생성 과정에서 복합적으로 생성되므로 막걸리의 발효 진행상황을 알 수 있는 중요한 지표성분이 됨(Lee 등, 2009). 누룩함유량별로 제조된 막걸리의 총산도(%)의 변화를 살펴본 결과는 figure 6(B)와 같음. 밀술이 완료된 3일의 총산도는 MN5에서 0.84%, MN10에서 0.53% 및 MN20에서 1.06%으로 10%의 누룩을 첨가한 막걸리에서 가장 낮은 산도를 나타냈음. 주발효가 완료된 발효 7일의 총산도 역시 MN10에서 0.76%으로 MN5(0.84%)과 MN20(0.76%)과 비교하여 가장 낮은 산도를 나타냈음. 그 후 발효 기간이 증가함에 따라 총산도는 증가 추세를 나타내면서 45일째 MN5에서 0.91%, MN10에서 0.76%, MN20에서 1.01로 나타나며, 최종적으로 누룩함량이 가장 높았던 MN20에서 가장 높은 수준을 나타냈음. Lee 등(2011)의 보고에 의하면 시판 막걸리의 총산도는 2.05-4.75% 수준이며, Jeon 등(2012)은 전통적으로 제조된 막걸리는 0.37-0.46%의 총산도를 나타낸다고 보고하였음. 이러한 결과를 통해 본 연구에서 제조된 막걸리는 시판 막걸리와 비교하여 상대적으로 낮은 산도를 나타내며, 전통적으로 제조된 타 막걸리보다는 높은 수준인 것을 알 수 있었음. 또한 4°C에서 저장 28일간 저장한 72일째 총산도는 MN5에서 0.67%, MN10에서 0.61%, MN20에서 0.73%으로 나타나 약 1달간의 저장기간 동안 총산도는 약간 감소되는 것으로 나타났음.

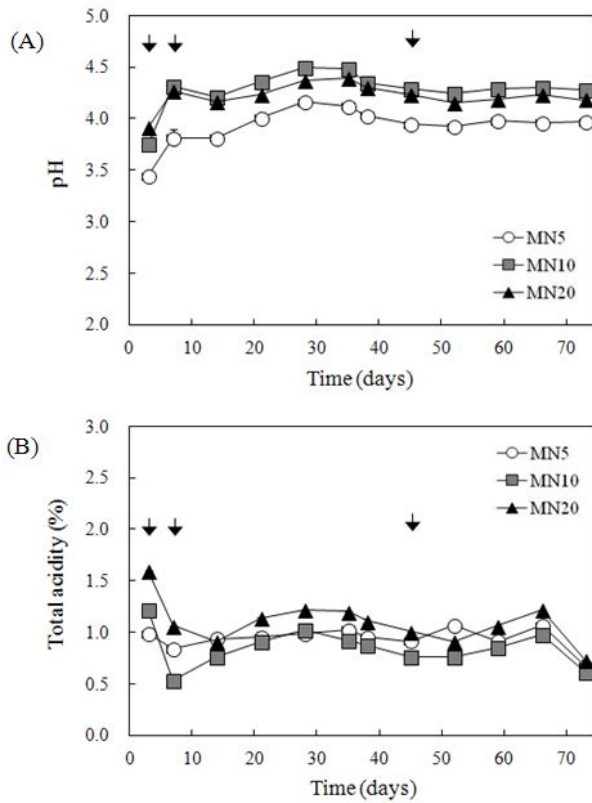


Figure 6. pH(A) and total acidity(B) of makgeolli prepared with different nuruk contents.

### 1.1.3. 생균수의 변화 측정

평판배양법을 통하여 45일간의 막걸리 제조 기간 및 4°C에서 28일간 저장기간 동안 막걸리의 효모, 젖산균 및 일반세균의 생균수 변화를 살펴보았음.

Figure 7(A)와 같이 막걸리 제조과정 중 효모수를 살펴본 결과, 밑술이 완료된 3일의 효모수는 MN5에서 8.23, MN10에서 7.97 및 MN20에서 8.07 log cfu/mL로 5%의 누룩을 첨가한 막걸리에서 상대적으로 가장 높았음. 그러나 주발효가 완료된 발효 7일에서는 MN10에서 8.08 log cfu/mL로 MN5(8.02 log cfu/mL)과 MN20(6.95 log cfu/mL)와 비교하여 가장 높은 수치를 나타냈음. 그 후 발효 기간이 증가함에 따라 효모수는 감소 추세를 나타내면서 45일째 MN5에서 5.18 log cfu/mL, MN10에서 5.88 log cfu/mL, MN20에서 3.29 log cfu/mL로 변화되었음. 최종적으로 MN10에서 가장 높은 수의 효모를 함유하였으나 그 정도는 후발효 32동안 약 2.2 log cycle이 감소되었고, 반면 누룩함량이 가장 높았던 MN20에서 MN5 및 MN10과 비교하여 상대적으로 매우 낮은 수준을 나타내며 32일 간의 후발효 후에 약 3.6 log cycle로 감소의 폭이 가장 컸음. 또한 4°C에서 저장 28일간 저장한 72일째 효모수는 MN5에서 3.91 log cfu/mL, MN10에서 5.31 log cfu/mL, MN20에서 1.60 log cfu/mL로 나타나 상대적으로 변화의 폭이 적었던 MN10 막걸리와 비교하여 MN5에서 약 1.2 log cycle과 MN20에서 약 1.7 log cycle으로 상대적으로 큰 폭 감소된 것을 알 수 있었음.

누룩함유량을 달리하여 제조된 막걸리의 제조과정 중 젖산균의 생균수를 살펴본 결과는 figure 7(B)와 같음. 제조된 막걸리의 초기 젖산균의 수는 MN5에서 8.73, MN10에서 8.06 및 MN20에서 8.78 log cfu/mL로 20%의 누룩을 첨가한 막걸리에서 상대적으로 가장 높았음. 그러나 주발효가 완료된 발효 7일에서는 MN10에서 7.81 log cfu/mL로 MN5(7.72 log cfu/mL)과 MN20(7.57 log cfu/mL)와 비교하여 가장 높은 수치를 나타냈음. 그 후 발효 기간이 증가함에 따라 젖산균의 생균수는 지속적으로 감소되었으며 45일째 MN5에서 5.06 log cfu/mL, MN10에서 5.91 log cfu/mL, MN20에서 4.67 log cfu/mL로 변화되었음. 최종적으로 MN10에서 가장 높은 수의 젖산균을 함유하고 있었고, 또한 4°C에서 저장기간에도 지속적으로 그 수가 감소하여 MN5에서 3.58 log cfu/mL, MN10에서 4.82 log cfu/mL, MN20에서 4.12 log cfu/mL로 나타났음.

누룩함유량을 달리하여 제조된 막걸리의 제조과정 중 일반세균수의 변화를 측정한 결과는 figure 7(C)와 같음. 발효 초기인 3일째의 일반세균수는 MN5에서 8.89, MN10에서 8.09 및 MN20에서 8.72 log cfu/mL로 10%의 누룩을 첨가한 막걸리에서 상대적으로 가장 낮았으며 그 후 발효 기간이 증가함에 따라 젖산균의 생균수는 지속적으로 감소되다 채주(거르기)가 이루어진 45일째에서만 약간 증가하며 MN5에서 7.08 log cfu/mL, MN10에서 7.13 log cfu/mL, MN20에서 5.41 log cfu/mL로 나타났음. 또한 4°C에서 저장기간에도 지속적으로 그 수가 감소하여 MN5에서 3.53 log cfu/mL, MN10에서 4.71 log cfu/mL, MN20에서 3.85 log cfu/mL로 나타났음.

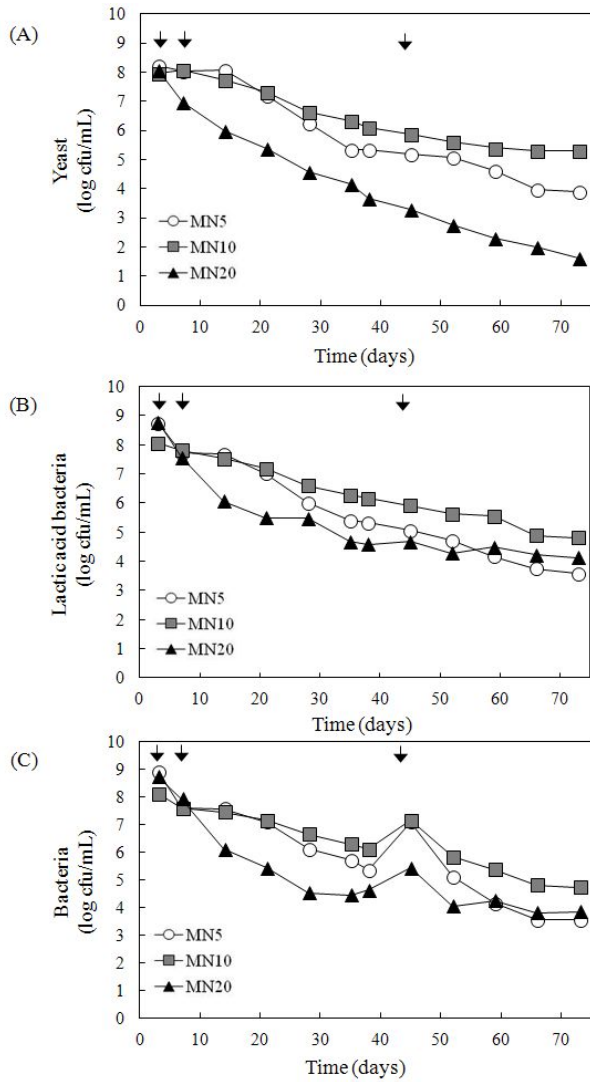


Figure 7. Total viable bacteria(A), LAB(B), and yeast(C) cell counts of makgeolli with different nuruk contents.

### 1.1.4. 일반성분 분석

누룩함유량을 달리하여 제조된 막걸리의 AOAC법을 통하여 일반성분 분석한 결과는 table 5와 같음. 제조된 막걸리의 수분함량은 MN5에서 79.3%, MN10%에서 71.4%, MN20에서 65.5%로 누룩의 함유량이 적을수록 더 높은 함량의 수분을 함유하는 것으로 나타났음. 막걸리의 조단백 함량은 누룩함량이 높은 수록 더 높은 수치를 나타내며 MN5에서 1.97%, MN10%에서 2.21%, MN20에서 2.61%로 나타났으며, 이는 시중에서 판매되는 단백질이 0.5% 이하인 것과 비교하여(Bae 등, 2009), 본 연구에서 제조된 막걸리가 상대적으로 높은 단백질을 함유하고 있음을 보여주는 결과임. 또한 조지방, 조회분, 탄수화물의 함량 역시 발효시 첨가된 누룩 함량이 높을수록 더 높은 수치를 나타내었음.

Table 5. Proximate Compositions of makgeolli with different nuruk contents.

	MN5	MN10	MN20
Moisture(%)	79.26±0.91	71.39±0.91	65.49±0.46
Crude protein(%)	1.97±0.06	2.21±0.17	2.61±0.02
Crude lipid(%)	0.15±0.04	0.21±0.07	0.24±0.08
Crude ash(%)	0.014±0.02	0.018±0.02	0.019±0.03
Carbohydrate*(%)	18.60	26.17	31.65

### 1.1.5. 유리 아미노산 분석

효모의 영양원으로 이용되는 아미노산은 fusel oil과 ester등의 향기성분으로 변화하는 중요한 성분으로, 술에 감칠맛을 부여하나 지나치게 많이 생성될 때에는 술덧이 노주화된 것 같은 느끼한 맛을 냄(Kim 등, 2010). 누룩함유량을 달리하여 제조된 막걸리의 유리아미노산의 함량은 table 6과 같음. 막걸리의 총 유리아미노산 함량은 MN5에서 26.4 mg/g, MN10%에서 11.4 mg/g, MN20에서 25.7 mg/g 수준으로 전반적으로 arginine, tryptophane, leucine, glutamic acid, alanine, proline, phenylalanine, valine, ornithin 등이 높은 함량을 나타내었으며, phosphoethanolamine, urea, hydroxyproline, α-aminoadipic acid, α-aminobutyric acid, β-alanine은 검출되지 않았음. 즉, 제조된 막걸리에서는 필수아미노산인 leucine, valine과 같은 가지사슬 아미노산의 함량이 풍부하였음. 한편, MN5에서 aspartic acid, threonine, serine, asparagine, glutamic acid, glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, histidine, tryptophane, lysine, arginine이 가장 높은 함량을 보였으며, proline, methionine은 MN20에서 가장 높은 수치를 나타내었음.



Table 6. Free amino acid contents of makgeolli with different nuruk contents.

Free amino acids(mg/g)	MN5	MN10	MN20
Phosphoserine	0.057±0.003	0.035±0.001	0.052±0.002
Taurine	0.005±0.000	0.006±0.001	0.004±0.001
Urea	ND	ND	ND
Aspartic acid	0.942±0.033	0.383±0.017	0.912±0.062
Hydroxyproline	ND	ND	ND
Threonine	0.466±0.016	0.213±0.011	0.439±0.017
Serine	0.680±0.023	0.303±0.022	0.643±0.014
Asparagine	0.547±0.018	0.458±0.013	0.500±0.009
Glutamic acid	1.998±0.073	0.872±0.020	1.873±0.071
Proline	1.512±0.050	0.699±0.093	2.058±0.182
Glycine	0.680±0.023	0.310±0.005	0.659±0.006
Alanine	1.746±0.060	0.881±0.029	1.673±0.051
Citrulline	ND	ND	ND
Valine	1.355±0.045	0.516±0.023	1.285±0.012
Cystine	0.033±0.009	0.010±0.005	0.026±0.002
Methionine	0.399±0.013	0.194±0.006	0.401±0.002
Isoleucine	0.723±0.025	0.276±0.006	0.698±0.018
Leucine	2.168±0.080	0.972±0.007	2.041±0.020
Tyrosine	1.224±0.044	0.672±0.031	1.111±0.027
Phenylalanine	1.589±0.061	0.756±0.032	1.558±0.010
Phosphoethanolamine	ND	ND	ND
β-Alanine	ND	ND	ND
α-Aminoadipic acid	ND	ND	ND
β-Aminoisobutyric acid	0.347±0.013	0.392±0.094	0.551±0.022
α-Aminobutyric acid	ND	ND	ND
γ-Aminobutyric acid(GABA)	0.309±0.010	0.095±0.069	0.375±0.011
Histidine	0.489±0.018	0.221±0.005	0.464±0.007
3-Methylhistidine	0.007±0.001	ND	0.006±0.001
1-Methylhistidine	0.009±0.001	0.007±0.002	0.008±0.006
Tryptophane	3.673±0.185	ND	2.886±1.129
Carnosine	0.512±0.249	0.294±0.121	0.633±0.050
Ornithin	0.418±0.015	0.168±0.002	0.401±0.015
Lysine	1.183±0.034	0.782±0.045	1.110±0.002
Ammonia	0.175±0.002	0.098±0.002	0.180±0.002
Arginine	3.196±0.114	1.835±0.022	3.139±0.076

## 1.1.6. 생리기능성 측정

### 1.1.6.1. DPPH radical 소거능

DPPH는 ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민에 의해서 환원되어 짙은 자색이 노란색으로 탈색되는 정도를 측정하는 것으로, 항산화 물질의 전자 공여능력을 측정할 때 사용되고 있음. 즉, DPPH는 분자 내에 위치한 안정한 라디칼을 함유하지만 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되며, 이때의 DPPH의 거동은  $\cdot\text{OH}$ 와 유사하므로 이러한 DPPH 라디칼이 감소하는 정도를 분광광도계로 측정함으로써 시료의 항산화 활성을 측정하는 방법으로 널리 쓰이고 있음 (Molyneux, 2004). 누룩함유량별로 제조된 막걸리의 항산화 효과를 DPPH 라디칼 제거 정도를 측정하여 나타낸 결과, 추출물의 공여량이 증가함에 따라 실험구내에서 DPPH 소거능 또한 비례해서 증가함으로써 농도의존적인 결과를 보였음. 즉, 제조된 막걸리 추출물 50 mg/mL를 기준으로 MN5에서 88.2%, MN10에서 92.2%, MN20에서 94.9%의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었음(Figure 8A). 이는 positive control로 사용한 ascorbic acid의 농도 5 mg/mL(94.9%)의 항산화 활성과 유사한 수준으로 본 연구에서 제조된 막걸리가 뛰어난 항산화 활성을 가지고 있음을 알 수 있었고, 그 활성은 MN5와 비교하여 MN10과 MN20에서 유의적으로 높았음. 또한, 이러한 결과는 DPPH 라디칼 소거능 8.0-66%를 보이는 시판중인 막걸리와 비교하여 본 연구에서 누룩만으로 제조된 전통막걸리의 상대적으로 높은 활성을 나타내었음(Hong 등, 2009; Jeong 등, 2011).

### 1.1.6.2. Hydroxyl radical 소거능

Hydroxyl 라디칼은 활성산소 라디칼 중에서 화학적으로 가장 반응성이 크며, 기질을 산화시킬 수 있는 라디칼로, 특히 superoxide anion( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )을 생성하는 원천으로 작용하여 인접한 분자에 매우 심각한 손상을 초래함. Hydroxyl 라디칼 소거활성은 Fenton reaction에 의해 생성된 hydroxyl 라디칼을 deoxyribose를 분해하고 이 때 생성된 MDA(malondialdehyde)양을 측정함으로써 화합물의 hydroxyl 라디칼 소거능을 측정하였음(Kwon 등, 2007). Figure 8(B)는 누룩 함유량별로 제조된 막걸리의 hydroxyl 라디칼 소거능을 나타낸 것임. 이때, positive control인 ascorbic acid는 5 mg/mL에서 97.1% 정도의 높은 hydroxyl 라디칼 소거능을 보여주었음. 제조된 막걸리위의 추출물에 대한 hydroxyl 라디칼 소거능은 3가지 막걸리 모두 농도의 증가에 따라 hydroxyl radical이 증가하는 경향을 보여주어 농도의존적인 활성효과를 나타냈음. 특히 10 mg/mL의 농도에서 MN20 시료가 hydroxyl 라디칼 소거능이 68.0%로 유의적으로 가장 높았으며, 이때 MN10은 61.7%, MN5는 43.4%의 높은 활성을 나타냈음.

### 1.1.6.3. 환원력

환원력(reducing power)은 reductone이 제공하는 수소원자가 free radical 사슬을 분해함으로써 시작되며 흡광도 수치 자체가 시료의 환원력을 나타내고, 높은 환원력을 가지는 물질일수록 흡광도 값이 높게 나타남. 메탄올(methanol)을 이용한 막걸리의 각 추출물의 환원력을 측정한 결과는 figure 8(C)와 같음. 제조된 막걸리의 추출물에 대한 환원력은 3가지 막걸리 모두 농도의 증가에 따라 hydroxyl radical이 증가하는 경향을 보여주어 농도의존적인 활성효과를 나타냈었으며, 특히 5 mg/mL의 농도에서 MN20 시료가 1.15, MN10이 1.08의 환원력을 나타내며 1.08의 MN5와 비교하여 유의적으로 높은 활성을 나타냄.

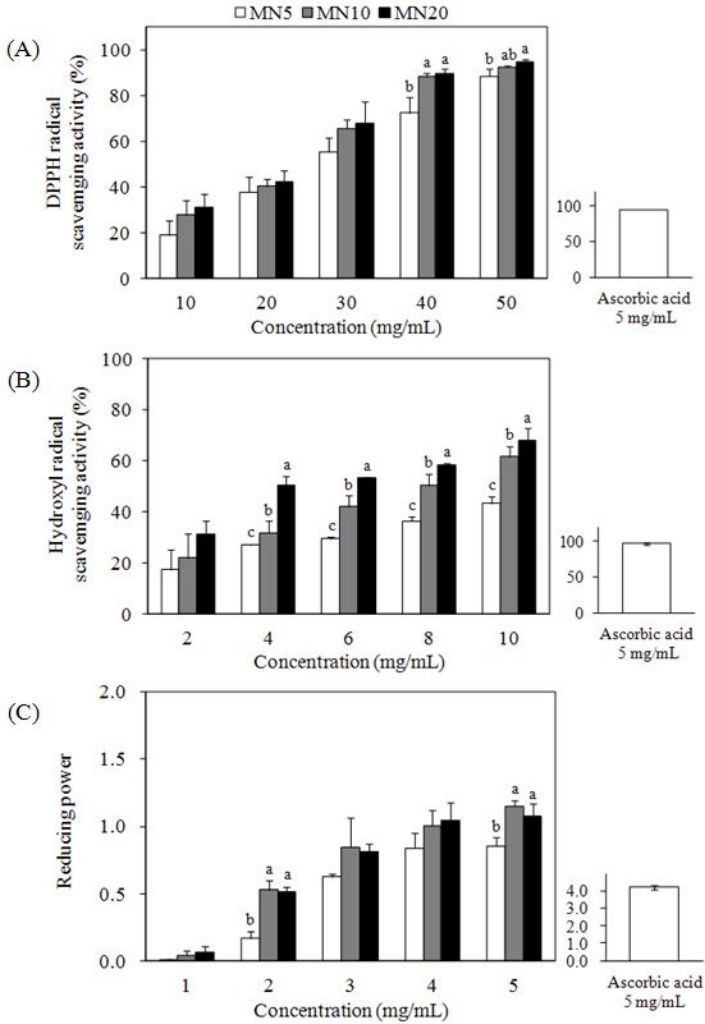


Figure 8. Anti-oxidant activities of makgeolli with different nuruk contents; DPPH radical scavenging activity(A), hydroxyl radical scavenging activity(B), and reducing power(C). Ascorbic acid is used as positive control.

### 1.1.7. 관능평가

누룩 함유량별로 제조된 막걸리를 전주시 20-50대 성인 남녀 총 50명을 대상으로 7점척도법을 사용하여 막걸리 관능검사를 수행한 결과는 table 7과 같음. 막걸리의 외관은 밀술 제조 시 누룩 5%를 첨가하여 제조된 막걸리에서 5.33으로 유의적으로 가장 높은 기호도를 나타냈음. 반면 막걸리의 향기, 쓴맛, 달만, 신맛, 구수함, 청량감, 목넘김, 뒷맛, 전반적인 기호도는 10%의 누룩을 첨가하여 제조된 막걸리에서 유의적으로 가장 높은 기호도를 나타냈음. 한편 텁텁함 항목에서는 20%의 누룩을 첨가하여 제조된 막걸리에서 유의적으로 가장 낮은 기호도를 나타냈으며, 알코올맛의 경우 5%의 누룩을 첨가하여 제조된 막걸리에서 유의적으로 가장 낮은 기호도를 나타냄. 즉, 관능검사 결과 밀술 제조시 10%의 누룩을 첨가하여 제조한 막걸리가 가장 높은 선호도를 보였음. 결론적으로 전통적인 주방문에 의하여 제조하는 방식의 방문주 제조방법은 발효 초기 누룩의 첨가량에 의해서 알코올 생성량 및 당화정도가 영향을 많이 받는 것으로 나타났으나, 긴 숙성기간동안 완료된 제품에 큰 영향을 미치지지는 않았음. 그러나 관능평가에 있어서는 누룩이 과다하게 첨가되었을 경우에는 선호도가 낮게 나타남으로써 누룩 10%를 밀술 제조 시 첨가하여 제조하는 것이 전통 막걸리 제조와 그 제품화에 있어서 가장 적합할 것으로 판단 됨.

Table 7. Sensory evaluation of makgeolli with different nuruk contents.

Variation	MN5	MN10	MN20
Appearance	5.33±0.17 <sup>a</sup>	4.65±0.16 <sup>b</sup>	3.29±0.19 <sup>c</sup>
Fragrance	4.13±0.16 <sup>b</sup>	4.79±0.17 <sup>a</sup>	3.90±0.23 <sup>b</sup>
Bitter taste	3.21±0.18 <sup>c</sup>	4.69±0.18 <sup>a</sup>	4.06±0.21 <sup>b</sup>
Sweet taste	3.65±0.17 <sup>c</sup>	4.88±0.18 <sup>a</sup>	4.27±0.23 <sup>b</sup>
Sour taste	3.85±0.19 <sup>b</sup>	4.69±0.19 <sup>a</sup>	4.19±0.18 <sup>ab</sup>
Delicate taste	3.40±0.17 <sup>c</sup>	4.60±0.16 <sup>a</sup>	3.98±0.16 <sup>b</sup>
Feeling of refreshment	3.98±0.15 <sup>b</sup>	4.54±0.17 <sup>a</sup>	3.98±0.20 <sup>b</sup>
Soupy	4.04±0.19 <sup>ab</sup>	4.31±0.18 <sup>a</sup>	3.54±0.21 <sup>b</sup>
Swallowing	3.66±0.19 <sup>b</sup>	4.79±0.18 <sup>a</sup>	4.00±0.21 <sup>b</sup>
Alcoholic taste	3.48±0.22 <sup>b</sup>	4.52±0.21 <sup>a</sup>	3.98±0.21 <sup>ab</sup>
Aftertaste	3.38±0.20 <sup>c</sup>	4.69±0.19 <sup>a</sup>	4.02±0.22 <sup>b</sup>
Overall acceptability	3.58±0.19 <sup>b</sup>	5.04±0.20 <sup>a</sup>	3.90±0.19 <sup>b</sup>

## 1.2. 표준화된 전통 막걸리 추출물의 기능성분석 및 막걸리유래 고생리활성 물질분리

### 1.2.1. 막걸리 추출물의 제조 및 *in vitro* 항산화 활성 검증

#### 1.2.1.1. 막걸리 추출물의 DPPH 라디칼 소거능

막걸리 추출물을 이용한 *in vivo*상에서의 세포주 검증을 수행하기 전에 water, ethanol, methanol을 이용한 막걸리 추출물의 *in vitro*상에서의 항산화능 분석을 수행하였음. 막걸리 추출물의 항산화 효과를 DPPH 라디칼 제거 정도를 측정하여 나타낸 결과, 추출물의 공여량이 증가함에 따라 실험구내에서 DPPH 소거능 또한 비례해서 증가함으로써 농도의존적인 결과를 보였으며, 제조된 막걸리 추출물 100  $\mu$ L/mL를 기준으로 물 추출물에서 74.5%, 에탄올 추출물에서 80.9%, 메탄올 추출물에서 80.1%의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었음(Figure 9A). 이는 positive control로 사용한 ascorbic acid의 농도 1 mg/mL(76.8%)의 항산화 활성과 유사하거나 더 높은 수준으로 본 연구에서 제조된 막걸리가 뛰어난 항산화 활성을 가지고 있음을 알 수 있었고, 그 활성은 물 추출물과 비교하여 에탄올과 메탄올 추출물에서 유의적으로 높았음. 또한, 이러한 결과는 DPPH 라디칼 소거능 8.0-66%를 보이는 시판중인 막걸리의 항산화능과 비교하여 본 연구에서 사용한 전통막걸리의 추출물은 상대적으로 높은 활성을 나타내었음(Hong 등, 2009; Jeong 등, 2011).

#### 1.2.1.2. 막걸리 추출물의 SOD 유사활성능

SOD(superoxide dimutase)는 superoxide( $O_2^-$ )를 정상상태의 산소로 환원시킴으로써 superoxide가 관여하는 각종 질병이나 노화를 억제할 수 있는 효소이며, SOD 유사활성물질은 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하는 저분자 물질로 주로 phytochemical에 속하여, superoxide의 반응성을 억제하고 superoxide로부터 생체를 보호하는 것으로 보고되고 있으며, 이를 제거함으로써 산화적 장애를 방어하고 노화억제의 효과를 기대할 수 있을 것으로 보고 있음(Kuramoto, 1992). 막걸리 추출물의 항산화 효과를 SOD 유사활성 정도로 측정하여 나타낸 결과, 추출물의 공여량이 증가함에 따라 실험구내에서 SOD 유사활성 또한 비례해서 증가함으로써 농도의존적인 결과를 보였으며, 제조된 막걸리 추출물 100  $\mu$ L/mL를 기준으로 물 추출물에서 30.9%, 에탄올 추출물에서 41.0%, 메탄올 추출물에서 43.4%의 활성을 나타내었음(Figure 9B). 이는 positive control로 사용한 ascorbic acid의 농도 1 mg/mL(67.1%)의 항산화 활성과 유사하거나 더 높은 수준으로 본 연구에서 제조된 막걸리가 뛰어난 항산화 활성을 가지고 있음을 알 수 있었고, 그 활성은 물 추출물과 비교하여 에탄올과 메탄올 추출물에서 유의적으로 높았음. Hong 등(2009)은 시판되고 있는 탁주 5가지의 superoxide 라디칼 소거능을 분석한 결과 21.1-87.6%의 활성을 나타내었다고 보고하였음. 결과적으로 본 연구에서 사용한 전통막걸리의 추출물은 높은 DPPH 라디칼 소거능과 SOD 유사활성능을 나타내었음.

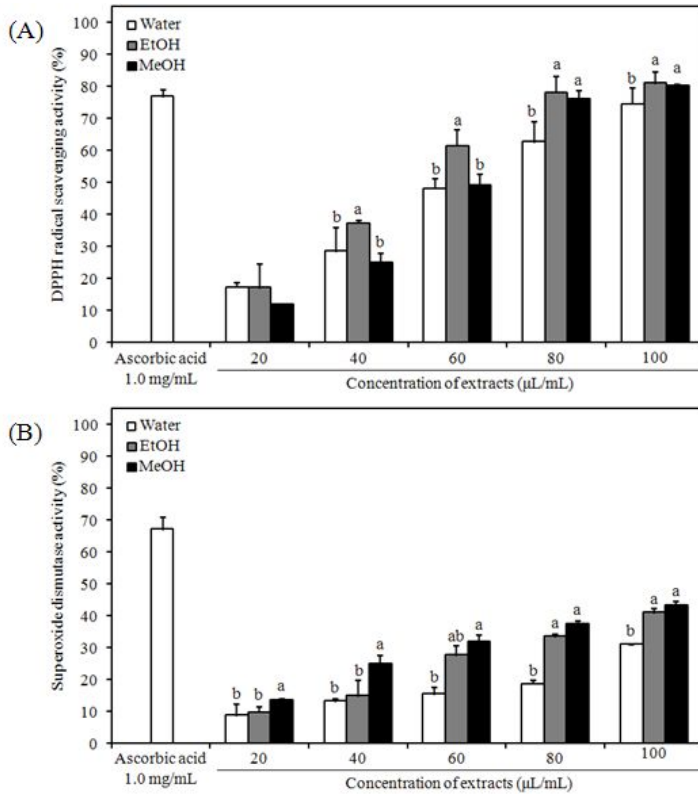


Figure 9. Anti-oxidant activities of makgeolli with makgeolli extracts; DPPH radical scavenging activity(A) and superoxide dismutase activity(B) of makgeolli extracts. Ascorbic acid is used as positive control.

## 1.2.2. 막걸리로부터 활성 peptides의 분리, 정제 및 특성분석

### 1.2.2.1. 막걸리로부터 crude peptide의 분리 및 정제

전통막걸리로부터 생리활성 peptide 물질을 정제하기 위하여, 막걸리 상등액을 30%와 50% ammonium sulfate를 사용하여 단백질을 침전시킨 후 UNO Q1 column을 사용한 IEC 및 sephadex G-25 gel filtration column을 사용한 GFC 정제 시료로 사용하였음. 얻어진 crude peptide 분획의 SDS-PAGE를 사용한 분자량 분석 결과 figure 10과 같이 20 kDa 이하의 분자량을 갖는 것으로 peptide로 확인되었음. 한편, Rhee 등(2004)은 prep liquid chromatography를 사용하여1.2 kDa의 저분자량을 보이는 peptides 분획을 분리하였다고 보고하였음. 분리된 peptide를 C18 column에서 분리한 결과 39~63번까지 단백질 농도가 높은 fraction을 얻었음. 이 25개의 fraction의 항산화 활성을 분석한 결과를 figure 11에 나타내었다. DPPH radical scavenging 활성이 30%이상인 5개의 fraction에서 가장 높은 항산화 활성을 보였고, 활성이 25%인 10개의 fraction이 확인되었음. 그 중 단백질 농도에 대한 항산화 활성이 높은 45번 fraction을 C18 column으로 분석한 결과 figure 12에서와 같이 단일 peak로 확인되었음.

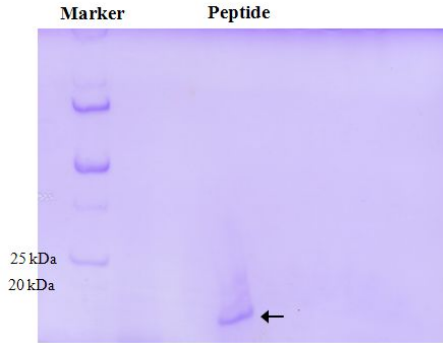


Figure 10. The SDS-PAGE pattern of crude peptides isolated from makgeolli.

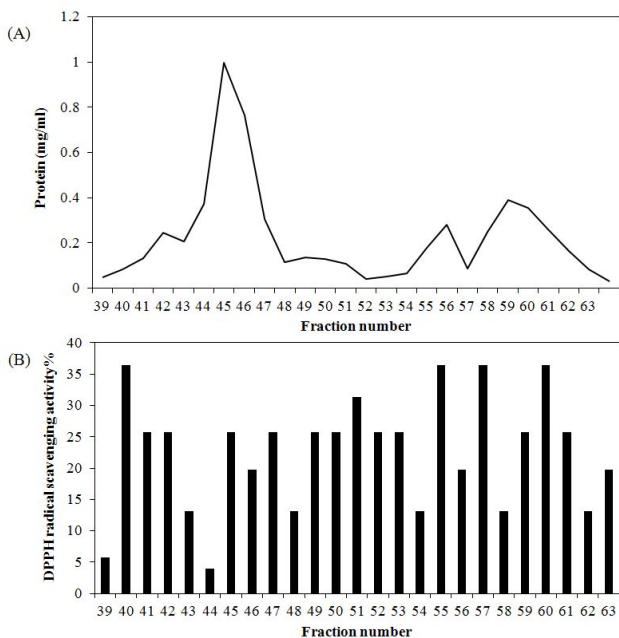


Figure 11. Chromatography of peptide first separated by FPLC with C18 column(A) and free radical scavenging activities of each fraction(B). Elution was performed with the linear gradient of acetonitrile(5-40%) containing 0.1% TFA. Antioxidant activity was measured by the free radical scavenging methods.

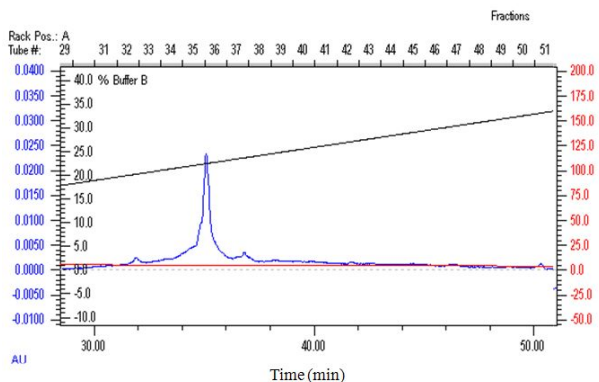


Figure 12. Chromatogram of analytical FPLC second conducted with C18 column. The column was equilibrated and eluted with a linear gradient from 5% to 20% acetonitrile containing 0.1% TFA.



### 1.2.2.2. 항산화 활성 assay

전통막걸리로부터 분리 및 정제된 peptide의 항산화능을 DPPH 라디칼 소거능을 확인함으로써 수행하였음. 그 결과, figure 13과 같이 1.58 mg/mL의 peptide는 72.4%의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었음. 이는 positive control로 사용한 ascorbic acid의 농도 1 mg/mL(84.8%)의 항산화 활성과 유사한 수준으로 전통막걸리로부터 분리된 peptide가 뛰어난 항산화 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었음. Rhee 등(2004)은 prep liquid chromatography를 사용하여 7.3-46.8%의 DPPH 라디칼 소거능을 보이는 peptides 분획을 분리하였다는 결과를 미루어볼 때, 본 연구로부터 분리된 peptides는 상대적으로 뛰어난 항산화능을 보유하는 것으로 보임. 이 분획을 C18 column으로 분리하여 얻은 fraction 45번은 약 27.76%의 항산화능을 보였으며, FPLC 분석 결과 단일 피크로 확인되었고 항산화능은 보다 43.28%로 정제된 peptide의 분획을 얻었음.

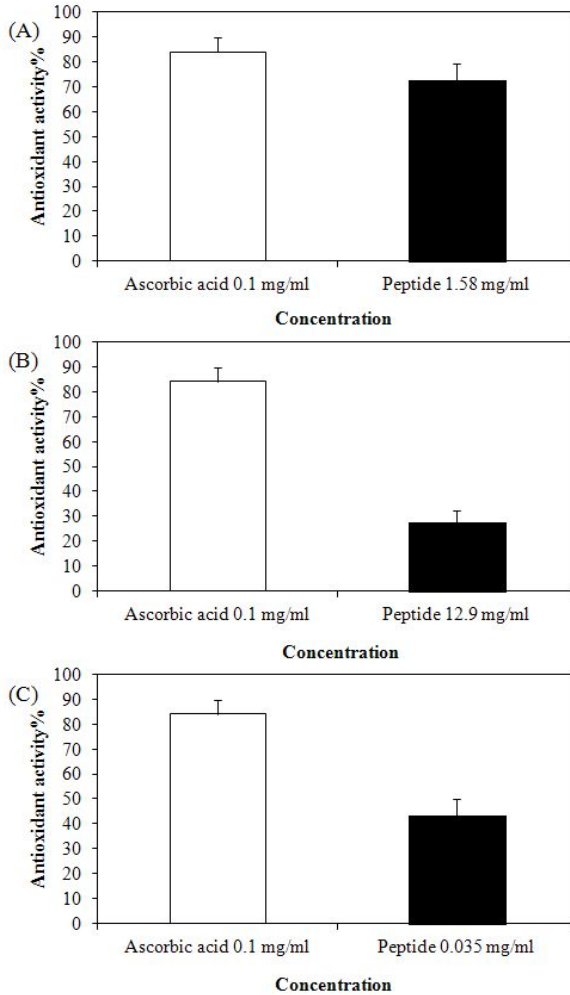


Figure 13. DPPH radical scavenging activity(%) of crude peptide(A) with GFC, peptide(B) first separated by FPLC with C18 column and peptide(C) in 45 fraction second separated by FPLC with C18 column isolated from makgeolli.

## 2. 전통 막걸리 유래 유산균분리 및 유용균주의 탐색

### 2.1. 기능성 유산균의 스크리닝 및 특성 분석

#### 2.1.1 막걸리로부터 유산균의 분리

전통적인 방식으로 표준 제조된 막걸리로부터 유산균을 분리하기 위하여 MRS, Lamva 및 Enterococcus agar 배지를 사용하였으며, 그 결과 각각 log 4.63 cfu/mL, log 4.73 cfu/mL 및 log 5.26 cfu/mL의 유산균이 분리되었음. 분리된 유산균 중에서, 무작위로 40개의 colony를 선택하여 16S rDNA sequencing을 통하여 동정한 결과는 table 8과 같음. 즉, 본 연구에서 사용된 전통막걸리에서 *P. pentosaceus* 17균주, *P. acidilactici* 4 균주, *L. paracasei* 9균주, *L. casei* 7균주, *S. hominis* 2균주와 *E. faecalis* 1균주를 포함하는 *Pediococcus*(21), *Lactobacillus*(16), *Staphylococcus*(2), *Enterococcus*(1)의 4가지 종(species)이 분리되었음. Jin 등(2008)은 *L. paracasei*와 *L. arizonensis*는 막걸리에 우세하게 존재하는 유산균으로 동정되었고 *L. plantarum*, *L. harbinensis*, *L. parabuchneri* 및 *L. brevis*는 열세하게 존재한다고 보고한 반면 Seo 등(2007)은 막걸리에서 *L. plantarum* 균주가 우세하게 존재한다고 보고하였음. 한편, Kim 등(2011)은 막걸리에 *Pediococcus* sp.와 *Lactobacillus* sp.가 우세하게 존재한다고 보고하였음.

Table 8. Lactic acid bacteria isolated from traditional fermented makgeolli.

	Species identificaion	No. of the isolate
<i>Pediococcus</i> sp.	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	17
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	4
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Lactobacillus paracasei</i>	9
	<i>Lactobacillus casei</i>	7
<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus hominis</i>	2
<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus faecalis</i>	1
	Total	40

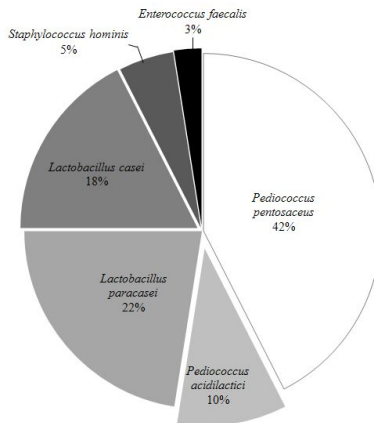


Figure 14. Lactic acid bacteria isolated from traditional fermented makgeolli.

## 2.1.2. 분리된 유산균의 배양 추출물(세포외다당류)의 항산화능 효과 시험

막걸리는 다른 주류와 달리 풍부한 영양성분을 포함하고 있는 것으로 알려져 있음. 특히, 막걸리의 주요 원료성분인 쌀과 누룩으로부터 유래되는 당원(주로 전분질)을 가지고 곰팡이의 효소작용에 의한 당화 및 효모의 알콜대사 등 당대사와 관련된 여러 가지 대사작용이 일어남. 막걸리로부터 활성물질을 분리한 최근 연구보고에 의하면 막걸리로부터 polyphenols, flavonoids 뿐만 아니라 기능성 polysaccharide, polysaccharide-peptide 및 chitoooligosaccharide가 분리되었으며 이러한 성분은 뛰어난 항산화 활성 및 면역증진 활성을 나타내었다고 보고하였음(Bae 등, 2010; Kim 등, 2002), 즉, 이러한 당류유래 물질은 전분원료로부터 막걸리 발효에 관여하는 미생물이 작용하여 분비하는 물질임. 따라서 본 연구에서는 막걸리로부터 당원을 이용한 기능성 대사산물을 생성 및 분비할 수 있는 유산균을 분리하고자 하였음.

막걸리로부터 분리된 유산균 40주를 대상으로 항산화 활성을 가지는 세포외다당류 생성 균주를 분리하고자 하였음. 각각의 균 배양액으로부터 ethanol을 사용하여 회수된 세포외다당류를 함유한 추출물 1 mg/mL의 DPPH 라디칼 소거능을 시험한 결과, strain M76으로부터 생성된 세포외다당류가 48.1%의 가장 높은 소거활성을 나타내어 본 연구에서는 분리된 균주의 주요 기능성성분으로 세포외 다당류에 주목하여 실험을 진행하고자 하였음. Strain M76가 생성하는 세포외다당류의 0.5-5.0 mg/mL의 농도에서 DPPH 라디칼 소거능을 시험한 결과 5 mg/mL의 세포외다당류는 무처리군과 비교하여 54.2%의 DPPH 라디칼을 소거할 수 있었음(Figure 15).

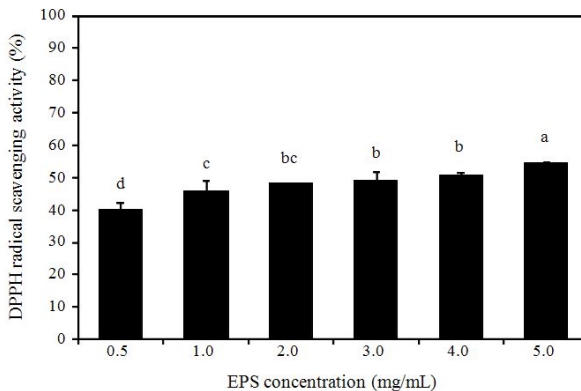


Figure 15. Scavenging activity against DPPH radical of crude EPS produced by the strain M76,  $p < 0.001$ .

## 2.1.3. 기능성 유산균 선발을 위한 추출물의 항균활성

막걸리에서 분리된 균주들의 추출물의 항균활성 검증을 위해, 내열성 포자를 형성하며 Gram 양성 호기성세균으로 식중독 유발균인 *B. cereus*를 대조균으로 사용하여 plate 상에서 저해환을 보이는 것으로 1차 스크리닝을 실시하였음. Figure 16과 같이, PBS buffer 만을 사용한 대조구(시료 C)에서는 저해환을 관찰할 수 없었으나, 결과 검토한 분리 균주중에서 strain M76 추출물을 사용한 시험구(시료 S)에서는 5.0 mm의 clear zone을 형성하면서 높은 항균활성을 보였음. 이때 (+) 대조군으로서 항생제인 50 mg/L

의 ampicillin solution(시료 A)은 10.0 mm의 clear zone을 나타내며, strain M76 추출물은 높은 항균활성을 보인다는 것을 알 수 있었음.



Figure 16. The effect of crude extract of *P. acidilactici* M76 on the inhibition of indicator strain, *B. cereus*. A; ampicillin solution, C; control, S; *P. acidilactici* M76의 crude extract sample.

#### 2.1.4. Strain M76 동정

선택된 M76 균주의 동정을 위하여 16S rDNA sequencing을 이용한 분자생물학적인 분석과 API kit를 사용한 균주의 생화학적 분석을 실시한 결과 *P. acidilactici*와 99.0%의 상동성을 보여 *P. acidilactici*로 동정할 수 있었으나(Figure 17, *P. acidilactici* M76), API kit을 사용하여 기존의 *P. acidilactici*의 공시균주(KACC 12307) 및 현재 probiotics로서 사용되고 있는 *P. stilessii* KACC 12300 및 *P. pentosaceus* KACC12311 균주를 동일한 조건에서 당대사와 관련된 생화학적 특징을 비교분석한 결과, 본 연구로부터 분리된 *P. acidilactici* M76 균주는 galactose(+), ribose(+), glycerol(+), trehalose(+), gluconate(+), maltose(-), sorbose(+), erythritol(+) 및 xylose(+)와 같은 당 이용성이 차이가 있음을 알 수 있었음(Table 10). 또한, strain M76을 2,500× 배로 확대한 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과 균의 형태는 구균으로 0.89-1.06  $\mu\text{m}$   $\times$  0.89-1.06  $\mu\text{m}$ 의 크기를 보였음(Figure 18).

즉, 이러한 결과는 표준화된 전통 막걸리로부터 분리된 *P. acidilactici* M76 균주는 이미 알려진 *P. acidilactici* 균주와는 다른 새로운 균주인 것으로 예상되며 추후 구체적인 동정이 더 필요할 것으로 사료됨. 최근 Kim 등의 연구 결과에 의하면 4°C에서 신선하게 저장된 막걸리에서 분포하는 주요한 유산균은 *Pediococcus* sp. 이었으나 반면에 20°C에서 보관된 막걸리에서 우세하게 존재하는 균주는 *Lactobacillus* sp. 였으며 이러한 균주가 막걸리의 부패(spoilage)에 주로 관여하는 균주로 보고하였음(Kim 등, 2011). 이러한 결과는 막걸리에 존재하는 유산균인 *Pediococcus* sp.는 누룩을 사용하여 제조되는 전통막걸리 발효에 주요한 영향을 미치는 대표적 균주로 여겨지며 이러한 균주의 세포외다당류와 같은 성분이 기능성에 큰 영향을 미치는 인자로 생각되어짐. 최근 전통적으로 제조된 막걸리의 농축물 혹은 추출물에서 뛰어난 항산화능을 보인다는 연구들이 보고되고 있음(Bae 등, 2010; Hong 등, 2009; Jeong 등 2011). 특히 이러한 생리활성은 polyphenols, flavonoids, polysaccharide, polysaccharide-peptide complexes 등과 같은 성분들로부터 유래한 것으로 여겨짐(Lee 등, 1996; Park 등, 2002). 와인의 경우에도 다당류를 생성하는 유산균인 *Oenococcus oeni*는 와인의 품질에 가장 긍정적인 영향을 미치는 균주로 알려져 있으며 *lactobacillus* 및 *Pediococcus*는 일반적으로 부패와 관여하는 균주로 알려져 있으나, 막걸리의 경우,

*Pediococcus*는 와인과는 달리 막걸리의 고유의 신맛을 내는 유기산 생성에 관여함으로써 주요한 균주로 여겨짐. 특히 본 연구결과 분리된 *P. acidilactici* M76은 와인에서 분리된 *O. oeni*와 마찬가지로 세포외 다당류를 생성하는 균주로 확인되었으며 와인의 물성에 영향을 미친다는 보고는 있었으나, 이러한 알코올 음료와 관련된 유산균이 생성하는 세포외다당류가 항산화활성과 같은 기능성을 나타낸다는 보고는 알려져 있지 않았음.

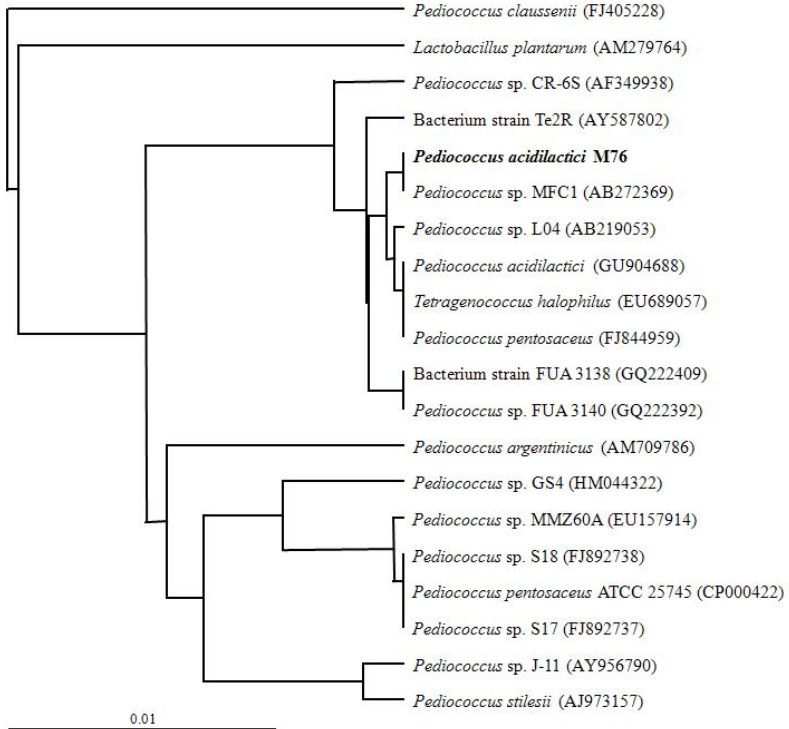


Figure 17. Phylogenetic tree, based on 16S rDNA sequence analysis, showing the taxonomic position of isolate M76 with members of *Pediococcus*.

Table 10. Physiological and biochemical characteristics of isolated *P. acidilactici* M76 using API 50CHL kit.

No.	Substrates	<i>P. acidilactici</i> M76	<i>P. acidilactici</i> KACC 12307	<i>P. stilesii</i> KACC 12300	<i>P. pentosaceus</i> KACC 12311
0	Control	-	-	-	-
1	Glycerol	+	+	+	+
2	Erythritol	+	-	-	-
3	D-arabinose	-	-	-	-
4	L-arabinose	+	+	+	+
5	Ribose	+	+	+	+
6	D-xylose	+	+	+	+
7	L-xylose	+	-	-	-
8	Adonitol	-	-	-	-
9	$\beta$ methyl-xyroside	-	-	-	-
10	Galactose	+	+	+	+
11	D-glucose	+	+	+	+
12	D-fructose	+	+	+	+
13	D-mannose	+	+	+	+
14	L-sorbose	+	+	-	-
15	Rhamnose	+	+	+	+
16	Dulcitol	-	-	-	-
17	Inositol	-	-	-	-
18	Mannitol	-	-	-	-
19	Sorbitol	-	-	-	-
20	$\alpha$ methyl-D-mannoside	-	-	-	-
21	$\alpha$ methyl-D-glucoside	+	-	-	-
22	N-acetyl glucosamine	+	+	+	+
23	Amygdalin	+	+	+	+
24	Arbutin	+	+	+	+
25	Esculin	-	-	-	-
26	Saucin	+	+	+	+
27	Cellobiose	+	+	+	+
28	Maltose	-	+	+	+
29	Lactose	-	+	-	+
30	Melibiose	-	-	-	+
31	Sucrose	-	-	-	+
32	Trehalose	+	+	+	+
33	Inulin	-	-	-	-
34	Melezitose	-	-	-	-
35	D-raffinose	-	-	-	+
36	Starch	-	-	-	-
37	Glycogen	-	-	-	-
38	Xylitol	-	-	-	-
39	$\beta$ gentiobiose	+	-	+	-
40	D-turanose	-	-	-	-
41	D-lyxose	-	-	-	-
42	O-tagatose	+	+	+	+
43	D-fucose	-	-	-	-
44	L- fucose	-	-	-	-
45	D-arabitol	-	-	-	-
46	L-arabitol	-	-	-	-
47	Gluconate	+	+	-	+
48	2 keto-gluconate	-	+	-	+
49	6 keto-gluconate	-	-	-	-

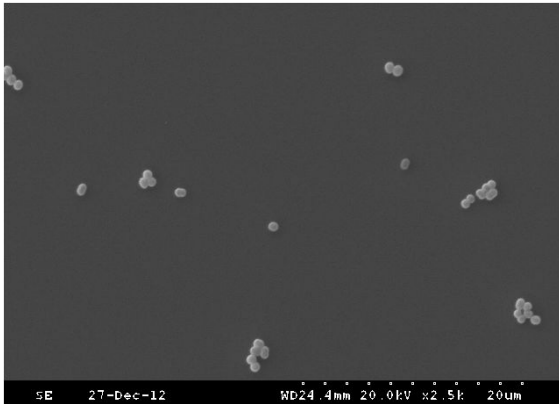


Figure 18. Scanning electron micrograph of the *P. acidilactici* M76.

## 2.1.5. *P. acidilactici* M76 균주의 생화학적 특성

### 2.1.5.1. 생육 온도와 pH

막걸리에서 분리된 유산균주 *P. acidilactici* M76의 생육가능한 온도를 35-55°C의 온도범위에서 시험해 본 결과, 대조균으로 사용한 공시균주인 *P. acidilactici* KACC 12307 균주는 50°C, *P. stilesii* KACC 12300 균주는 45°C, *P. pentosaceus* KACC 12311 균주는 50°C 까지의 온도에서 생육가능 하였으나, 본 연구에서 분리한 균주인 *P. acidilactici* M76은 52°C까지의 고온에서 생육가능한 것으로 나타났음(Table 11). 또한 생육가능한 pH를 2.0-10.0의 pH 범위에서 검토한 결과, 공시균주 *P. acidilactici* KACC 12307, *P. stilesii* KACC 12300, *P. pentosaceus* KACC 12311 균주 모두 pH 4.0-10.0에서 생육 가능하였으며 pH 4 이하에서는 생육이 관찰되지 않았으나, 막걸리에서 분리된 유산균주 *P. acidilactici* M76은 pH 3-9의 범위에서 생육 가능하였으며, 특히 pH 3의 낮은 pH에서도 생육이 관찰됨으로써 장에서 생존가능성이 높을 것으로 사료됨. 따라서 본 균주는 프로바이오틱스로서의 사용가능성도 높을 것으로 사료됨

### 2.1.5.2. 내당성 및 내산성

*P. acidilactici* M76 유산균주의 glucose 내성 및 NaCl 내성을 조사하기 위하여, 각각의 균주를 4-14% 농도의 glucose와 NaCl의 범위에서 시험하였음. 그 결과, 막걸리에서 분리된 *P. acidilactici* M76 및 시험한 공시균주 3종 모두 4-14%의 glucose 농도와 4-8%의 NaCl 농도에서 생육 가능한 것으로 나타나 내당성 및 내산성이 일반적으로 사용되는 프로바이오틱스에 상응하는 정도로 나타나 장내에서의 생육에 유리한 균주특성을 나타내었음(Table 11).



Table 11. Physiological characterization of *P. acidilactici* M76.

	<i>P. acidilactici</i> M76	<i>P. acidilactici</i> KACC 12307	<i>P. stilesii</i> KACC 12300	<i>P. pentosaceus</i> KACC 12311
<i>Physiological characters</i>				
pH	3-9	4-10	4-10	4-10
Temperature	35-52°C	35-50°C	35-45°C	35-50°C
<i>Biochemical characters</i>				
NaCl tolerance	4-8%	4-8%	4-8%	4-8%
glucose tolerance	4-14%	4-14%	4-14%	4-14%

### 2.1.5.3. *P. acidilactici* M76의 내산성과 내담즙성 측정

젖산균이 프로바이오틱스로서 역할을 수행하기 위해서는 우선 강산성의 위를 통과하여 장내로 이동해야 하는데 위에서 분비되는 염산은 평상시 pH 0.78-0.9를 유지하지만, 음식물이 유입 될 때에는 pH가 약 2.0-3.0으로 상승되며, 음식물이 위를 통과하는데 소요되는 시간은 약 2-4시간임. 지금까지 젖산균의 위액에 대한 내산성 실험은 *in vivo*상에서 직접 생존율을 확인하는 실험과, 인공위액 및 PBS 등의 buffer를 이용한 *in vitro*상의 간접적인 방법이 이용되어 왔음. 그러나 위액에 의한 미생물 사멸작용의 주요원인이 염산에 의한 낮은 pH인 것으로 밝혀졌으며, *in vitro*의 실험 결과와 *in vivo*에서의 결과가 거의 유사하다고 보고됨으로써 미생물의 생존은 그들의 낮은 pH에 대한 저항성에 따른 것으로 알려지고 있음(Seo와 Lee, 2007). 본 실험에서는 염산(HCl)으로 pH를 2.5와 7.0으로 달리한 MRS 액체 배지 내에서 3종의 공시균주 및 *P. acidilactici* M76의 내산성을 검토하였으며, 그 결과는 table 12와 같음. 그 결과 pH 7.0의 조건에서의 생존수와 비교하여 77.2%의 생존율을 나타내었으며, 동일한 조건에서 이미 probiotics로 사용되고 있는 공시균주들의 생존율은 72.3-75.3% 범위였음. 따라서 막걸리로부터 분리한 *P. acidilactici* M76 균주는 공시균주와 마찬가지로 산성조건에서도 유효한 수의 균이 위를 통과하여 장으로 이동할 수 있을 것이라 사료됨.

Table 12. Survival on artificial gastric acid of *P. acidilactici* M76.

	<i>P. acidilactici</i> M76	<i>P. acidilactici</i> KACC 12307	<i>P. stilesii</i> KACC 12300	<i>P. pentosaceus</i> KACC 12311
<i>Acid tolerance</i> (log cfu/mL)				
pH 2.5	6.79	7.16	6.9	7.11
pH 7.0	8.8	9.51	9.54	9.51

한편, 담즙산에 대한 내성은 위에서의 산성조건에 대한 저항성과 더불어 프로바이오틱스 미생물이 갖추어야 할 기본적인 특성 중 하나임. 담즙은 소장의 상부에서 분비되어 섭취된 지질식품의 소화, 흡수를 촉진하고, 미생물에 대해 세제와 유사한(detergent-like) 작용을 함으로써 지방과 지방산으로 구성되어있는 미생물의 세포막에 영향을 주어 미생물 살균작용을 하는 것으로 알려졌음. 그러나 몇몇 미생물은 담즙산염 가수분해효소(bile salt hydrolase, BSH)에 의해 담즙산염을 가수분해하여, 그들의 용해도를 감소 시킴으로써 이러한 작용을 저하시킬 수 있음. 특히 *Lactobacillus*를 포함한 많은 종의 젖산균에서 BSH 효소가 발견되었으나, 이들의 담즙산에 대한 작용기작은 아직 확실히 밝혀지지 않았음(Seo와 Lee, 2007).

본 실험에서 oxgall의 농도를 달리한(0.1-2.0%) MRS 액체 배지 내에서 담즙산 내성을 측정된 결과는 Table 13과 같음. 본 실험에서 사용된 유산균주 *P. acidilactici* M76은 0%의 oxgall이 함유된 배지에서의 성장률과 비교하여 3%의 oxgall이 함유된 MRS 배지에서 96.8%의 높은 생존율을 보였음. Erkki와 Petaja(2000)에 의하면, 장내의 oxgall의 농도는 다양하지만, 소화관 내에서 저항성 있는 프로바이오틱스 균주 선별에 이용되는 담즙의 농도는 0.3% 정도라고 알려져 있음. 따라서 본 연구에서 전통막걸리로부터 분리한 유산균주 *P. acidilactici* M76은 실제 소장을 통과할 때에 담즙산에 대한 영향을 크게 받지 않음으로써, 소장을 통과한 많은 균이 대장에 도착할 수 있을 것으로 사료됨.

Table 13. Survival on bile salt of *P. acidilactici* M76.

<i>P. acidilactici</i> M76	
Bile salt tolerance(log cfu/mL)	
0.0 %	9.4
0.3 %	9.1
1.0 %	8.9
3.0 %	9.1
5.0 %	9.0

## 2.2. *P. acidilactici* M76의 세포외다당류 생산성 및 그 특성 검색

### 2.2.1. 세포외다당류의 정제 및 *P. acidilactici* M76의 세포외다당류 생산성

표준화된 전통막걸리에서 분리동정된 *P. acidilactici* M76의 세포외다당류 생산성을 측정된 결과, table 14와 같이 *P. acidilactici* M76 균주는 본 연구의 배양조건하에서 5 g의 glucose를 첨가해 준 배지에서 시간당 42.7 mg/L의 생산성을 보이면서 총 48시간 동안 수용성 세포외다당류(EPS) 약 2,048 mg/L를 생성할 수 있었음. 몇몇의 선행연구들은 발효음료로부터 분리된 *P. pentosaceus*, *P. parvulus*와 같은 다른 급원(source)에서 분리된 *Pediococcus* sp. 균주는 세포외다당류를 생성할 수 있다고 보고하였음(Semjonovs 등, 2008; Gaizke 등, 2010). Velasco 등(2009)은 Basque natural ciders로부터 분리된 *P. parvulus* 2.6 균주는 50 g의 glucose를 사용하여 96 시간동안 140 mg/L의 세포외다당류를 생성하였다고 보고하였으며, 이 균주는 이미 산업적으로 사용되고 있음(Table 15). 또한, Walling 등(2005)은 cider로부터 분리된 *P. damnosus* IOEB8801은 20 g의 glucose를 사용하여 102 시간동안 167 mg/L의 세포외다당류를 생성한다고 보고하였으며, Semjonovs 등(2008)의 연구에 의하면 spoiled beer로부터 분리된 *P. pentosaceus* P773 균주는 100 g의 sucrose를 사용하여 48 시간동안 3,900 mg/L의 세포외다당류를 생성하였음. 이러한 연구결과들을 바탕으로, 본 연구에서 막걸리로부터 분리된 *P. acidilactici* M76는 충분히 유의적인 양을 생산하는 것으로 여겨지며 이러한 수준은 향후 EPS의 산업적인 응용을 위한 매우 충분한 양으로 여겨짐.

Table 14. Fermentation kinetics of *P. acidilactici* M76.

Kinetic parameters	Values
Maximum biomass concentration, X (g l <sup>-1</sup> )	6.21
Maximum EPS concentration, P (mg l <sup>-1</sup> )	2048.3
Specific growth rate, m (h <sup>-1</sup> )	0.13
Productivity for EPS, QP (mg l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	42.7
Productivity for biomass, QX (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	129.4
Specific product yield, YP/X (mg EPS per g biomass)	329.7
Product yield, YP/S (mg EPS per g glucose)	146.8
Cell yield, YX/S (g biomass per g glucose)	0.45
Specific production rate of EPS, YP/S (mg EPS per g glucose h <sup>-1</sup> )	30.6

\*Fermentation condition: at 37°C at 150 rpm for 48 h

Table 15. Exopolysaccharide production by different strains of *Pediococcus* sp. from foods.

IS	Strain	CS (g/L)	CT	EP (mg/L)	MW (kDa)	References
Rice wine	<i>P. acidilactici</i> M76	Glu(20) <sup>1</sup>	3 d	2,100	67.2	This study
Ropy and unaltd cider	<i>P. parvulus</i> CUPV1	Glu(50)	4 d	233	10,200	Garai-Ibabe et al. 2010
	CUPV22	Glu(50)	4 d	228	10,500	
	CUPV23	Glu(50)	4 d	243	9,900	
Ropy cider	<i>P. parvulus</i> 2.6	Glu(50)	4 d	140	-	Velasco et al. 2007
Spoiled wine	<i>P. damnosus</i> IOEB8801	Glu(20)	15 d	102	-	Walling et al. 2005
Spoiled beer	<i>P. pentosaceus</i> P773	Suc(100) <sup>2</sup>	2 d	3,900	2,000	Senjonovs et al. 2008
Pork sausage	<i>P. pentosaceus</i> AP-1	Suc(20)		6,000	14	Smitinont et al. 1999
	AP-3	Suc(20)		2,500	6,000	

IS; Isolation source, CS; Carbon source, CT; cultural time, EP; exopolysaccharide production, MW; molecular weight

<sup>1</sup>Glu; glucose

<sup>2</sup>Suc; sucrose

## 2.2.2. *P. acidilactici* M76로부터 생성되는 세포외다당류의 특성 규명

### 2.2.2.1. 세포외 다당류의 분자량

*P. acidilactici* M76로부터 생성된 기능성 세포외다당류의 분자량(molecular weight)은 sephadex G-200 겔을 사용한 겔 여과 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과(Figure 19A), *P. acidilactici* M76로부터 생성된 세포외다당류는 약 73분대의 retention time을 나타내면서 약 67.2 kDa의 분자량을 나타내었음(Figure 18B). Vaningelgem 등(2004)은 다양한 유산균들로부터 유래되는 세포외다당류의 분자량이 일반적으로 10 kDa~2,700 kDa 수준이라고 보고하였음. 그러나, Walling 등(2005)은 cider로부터 분리된 균주 *P. damnosus* IOEB8801가 생성하는 세포외다당류의 분자량이 10,240 kDa라고 보고하였고, Semjonovs 등(2008)은 beer로부터 분리된 균주 *P. pentosaceus* P773로부터 2,000 kDa의 세포외다당류가 생성된다고 보고한 것과 비교하여 본 연구로부터 탁걸리유래의 *P. acidilactici* M76이 생성하는 세포외다당류는 *Pediococcus* 속을 포함하는 다양한 유산균에 의하여 생성되는 세포외다당류에 비하여 상대적으로 저분자량을 가지는 것으로 보임.

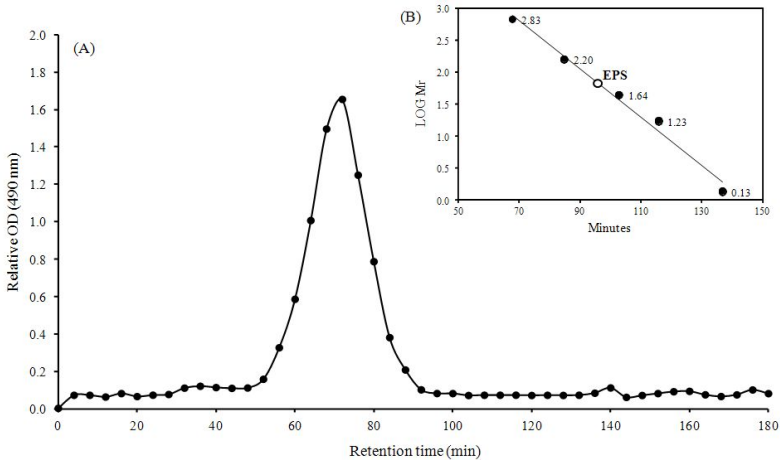


Figure 19. Molecular weight estimation of EPS using a Sephadex G-200. Apparent profile of EPS was detection by phenol-sulfuric acid method at 490 nm. Molecular weight of EPS was calculated with thyroglobulin(670 kDa), bovine gamma-globulin(158 kDa), chicken ovalbumin(44 kDa), equine myoglobin(17 kDa) and vitamin B12(1.35 kDa) as standards.

### 2.2.2.2. 세포의 다당류의 구성당

*P. acidilactici* M76로부터 생성된 세포의다당류의 구성당(monosaccharide composition)을 분석하기 위하여 TLC 및 HPLC를 실시하였음. Figure 20A에 보여지듯 당 표준물질인 mannose( $R_f$  값), arabinose( $R_f$  값), fructose( $R_f$  값), glucose( $R_f$  값), galactose( $R_f$  값), maltose( $R_f$  값), lactose( $R_f$  값)을 나타냈으며, *P. acidilactici* M76 균주가 생성하는 세포의다당류의 산가수분해물의 TLC 크로마토그램은 glucose( $R_f=0.548$ )와 유사한 0.545의  $R_f$  값을 나타내는 하나의 spot이 대부분을 차지하였음.  $NH_2$  컬럼을 사용하여 HPLC-ELSD 분석을 수행한 결과, figure 19B와 같이 대조구로 사용된 산-가수분해 전처리시에 물로만 처리한 시료(Figure 20-B-a)와 비교하여 약 5.98분에 하나의 피크(peak)만이 나타났으며(Figure 20-B-b), 그 머무름시간은 glucose와 동일하였음. 즉, 세포의 다당류를 구성하는 환원당의 주성분은 glucose로 나타났으며, 결론적으로 *P. acidilactici* M76이 생산하는 세포의다당류는 당류로서 glucose로만 이루어진 다당류임을 알 수 있었음. 이전 연구에서 beer로부터 분리된 *P. pentosaceus* P773 균주가 생성하는 세포의다당류는 3:1의 비율로 glucose와 fructose 잔기들로 구성되었으며(Semjonovs 등, 2008), 반면 cider로부터 분리된 *P. parvulus* 2.6와 *P. damnosus* IOEB8801에 의해 합성되는 세포의다당류는 오직 glucose 분자만으로 구성되어있는 glucan이라고 보고되었음(Velasco 등, 2009; Walling 등, 2005).

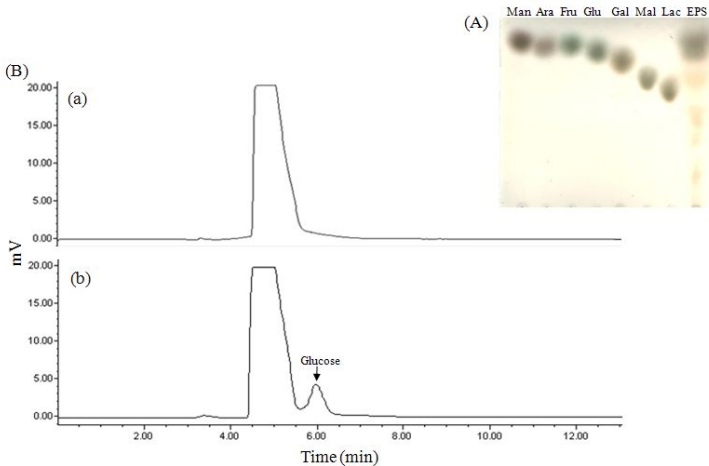


Figure 20. Chromatograms of HPLC-ELSD(A) and TLC(B) analysis on monosaccharide composition of EPS produced by *P. acidilactici* M76. Each chromatogram of hydrolysis product with water(a) and the hydrolysis product with purified EPS(b) was presented by HPLC-ELSD; arabinose, 5.2 min; fructose, 5.7 min; glucose, 6.0 min; galactose, 6.8 min; maltose, 9.1 min; lactose; 9.8 min as retention times of standards.

### 2.2.2.3. 세포의 다당류의 구조

*P. acidilactici* M76로부터 생성된 세포의 다당류의 구조분석을 적외선 흡수스펙트럼 (FR-IR)에서 실시한 결과, 특이적인 흡수띠인  $3492\text{ cm}^{-1}$ 에서 강한 O-H band,  $2932\text{ cm}^{-1}$ 와  $2892\text{ cm}^{-1}$ 에서 C-H stretching band,  $1670\text{ cm}^{-1}$ 과  $1459\text{ cm}^{-1}$ 에서 O=C-O structure의 vibrations,  $1230\text{ cm}^{-1}$ 와  $1028\text{ cm}^{-1}$ 에서 강한 C-O bending bands를 나타내 세포의 다당류의 glycosidic 밴드를 나타내면서, 표준화된 전통 막걸리로부터 유래한 *P. acidilactici* M76이 생성하는 세포의 다당류는 glucose 잔기들로 구성된 글루코스 다당체임을 확인할 수 있었음(Figure 21).

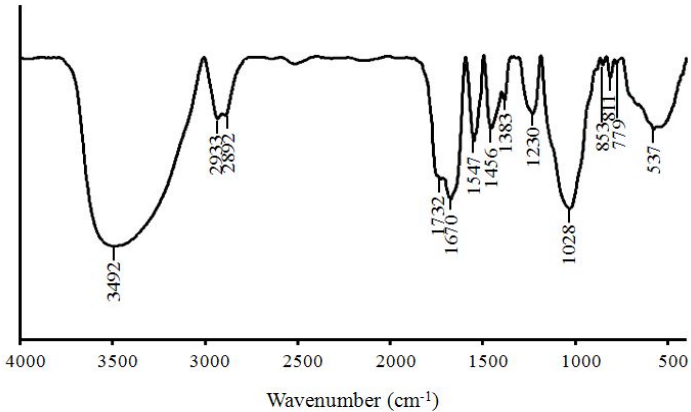


Figure 21. Structural analysis of EPS produced by *P. acidilactici* M76 by FT-IR.

### 2.2.3. *P. acidilactici* M76의 장내점착능

인간의 대장 내 미생물의 균총은 태어난 지 일주일 내에 형성된다고 보고되어 왔으며, 이 대장 미생물들 중 프로바이오틱스의 장내 점착에 대한 점착은 균총 형성을 위한 신행 조건으로 강조되어 왔음 (Fuller, 1989). 장내 점착에 대한 프로바이오틱스의 결합은 점막 중 특정성분 또는 부위와 균주표면에 존재하는 렉틴상 단백질(lectin-like protein)이 관여하고 있으며, Kenji 등(1996)은 *Lactobacillus casei*의 결합능이 대장 점막 중 다양한 당쇄 구조가 장내 점착능에 영향을 준다는 사실을 보고하였으며, biofilm 등의 다당류를 생성하는 유산균은 그렇지 않는 균주와 비교하여 상대적으로 장내점착능이 좋은 것으로 알려져 있음(Reid 등, 1998). 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)은 특정 물질이 생명체에 미치는 영향을 산자수와 지방조직으로의 집적 및 에너지원으로서의 사용 가능성등의 관점에서 평가하기에 적합한 동물시스템으로 막걸리로부터 분리된 유산균의 장내점착능을 시험하기 위하여 사용되었음. 본 연구에서 1일, 3일, 그리고 5일동안 *C. elegans*의 장에서 세포외다당류를 생성하는 *P. acidilactici* M76의 점착능에 대한 실험을 수행한 결과, log cfu/mL/worm은 각각 5.800, 5.026, 그리고 5.539수준으로 상당히 높은 수준으로 *C. elegans*의 장관 내에 부착하는 것이 관찰되었음(Figure 22). 동일한 조건에서 (-) 대조군으로 사용되었던 *L. rhamnosus* GG의 경우 detection limit인 1 log이하로 관찰되어 *P. acidilactici*가 특이적으로 부착능이 우수한 것으로 판단됨. de Palencia 등(2009)은 세포외다당류를 생성하지 못하는 *P. parvulus* 2.6NR 균주와 비교하여 세포외다당류를 생성하도록 유전자조작된 *P. parvulus* 2.6R의 균주가 Caco-2 cells에 대한 부착능(adhesion%)이 더 높았으며, 특히 세포의 다당류의 생성량이 더 많을수록 그 부착능은 증가하였다고 보고하였음. 즉, 막걸리로부터 분리된 *P. acidilactici* M76 균주는 이미 산업적으로 널리 사용되고 있는 유산균주와 비교하여 매우 높은 장내 점착능을 나타내어 사람의 위와 소장을 통과하여 장내에 높은 농도로 점착할 수 있을 것으로 보이며, 특히 이러한 활성은 본 균주의 세포외다당류 생성능으로부터 유래된 것으로 여겨짐.

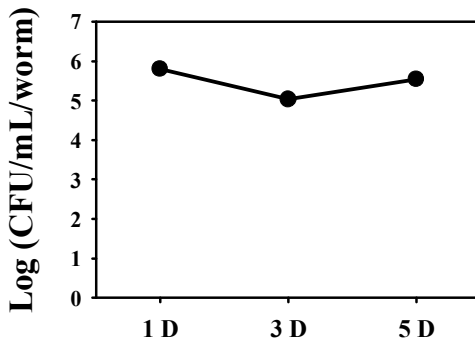


Figure 22. Colonization of *P. acidilactici* M76 on the *C. elegans* intestines.

#### IV. 결론

전라도 지역의 전통막걸리인 방문주의 전통적 제조방식을 표준화하기 위하여 5%, 10%, 20% 각각의 다른 함량의 누룩을 첨가하여 제조된 막걸리의 품질을 식품분석 지표와 미생물 지표로 확인하였음. 막걸리의 생균수 측정 결과는 MN10에서 가장 높은 효모, 일반세균, 젖산균 수를 보인 반면, MN20에서 가장 낮은 수치를 나타냈음. 또한 3가지의 분석방법을 통해 제조된 막걸리의 항산화능을 분석한 결과 MN10과 MN20에서는 유사한 활성을 보인 반면 MN5에서 가장 낮은 활성을 나타냈음. 막걸리의 관능평가 결과 MN10에서 향기, 쓴맛, 단맛, 신맛, 구수함, 청량감, 텁텁함, 목넘김, 알코올맛, 뒷맛을 포함한 전반적 기호도에서 가장 높은 점수를 얻었음. 결론적으로 전통적인 주방문에 의하여 제조하는 방식의 방문주 제조방법은 발효 초기 누룩의 첨가량에 의해서 알코올 생성량 및 당화정도가 영향을 많이 받는 것으로 나타났으나, 긴 숙성기간동안 완료된 제품에 큰 영향을 미치지는 않았음. 그러나 관능평가에 있어서는 누룩이 과다하게 첨가되었을 경우에는 선호도가 낮게 나타남으로써 누룩 10%(w/v)를 밀술 제조시 첨가하여 제조하는 것이 전통 막걸리 제조와 그 제품화에 있어서 가장 적합할 것으로 판단되었음. 결과적으로 표준화된 막걸리를 대상으로 *in vitro*상에서의 항산화능을 water, ethanol, methanol 추출물을 제조하여 시험한 결과, 74.5-80.9%의 뛰어난 DPPH 라디칼 소거능 및 30.9-43.4%의 SOD 유사활성능을 나타내었음. 또한 본 연구로부터 전통막걸리 유래의 뛰어난 항산화능을 보유하는 peptide를 분리하였음.

또한, 다양한 세포주에 PA, EPS 및 전통 막걸리 분획별 추출액을 처리하여 타겟 기능성을 선정하고 실험동물모델을 통해 확인하였음. 실험동물모델에서의 PA의 기능성 확인은 고지방식이 섭취시 비만/당뇨가 유발되는 C57BL/6j mice를 사용하여 항비만/당뇨 효과를 확인하였고, 막걸리 추출액은 술의 특성을 반영하여 알코올 함유 및 알코올이 배제된 상태의 시료에서 지질대사 및 알코올 분해 효과를 확인하였음.

전통막걸리의 지질 대사 및 알코올 분해 효과를 확인한 결과, 같은 농도의 알코올 투여군과 비교시 알코올 제거 막걸리에서 혈중 및 간중 중성지방, 혈중 GOT가 유의적으로 낮아졌으며, 간중의 ADH 농도는 알코올 투여군과 비교시 전통 막걸리 투여군에서 높아지는 경향을 보였음. 지질대사에 관여하는 PPAR- $\gamma$ 는 모든 막걸리 투여군에서 낮아졌으며, ACO는 알코올 제거 막걸리에서 높아졌음.

또한, PA의 항비만 효과를 관찰한 결과, 체중, 지방량은 고지방식이 섭취 군과 비교시 PA그룹에서 낮아졌으며, 혈중 중성지방을 제외한 모든 혈중 및 간중의 지질 성상을 유의적으로 개선시켰음. 내당능 또한 고지방식이 섭취군과 비교시 공시군주 및 PA 섭취군에서 유의적으로 낮아졌으며, 지방합성에 관여하는 ACC, FAS 및 PPAR $\gamma$ 의 수준이 낮아졌음.

따라서, 알코올을 제거한 전통 막걸리는 지질대사에 관여하고 알코올 분해 효과가 있으며, PA는 항비만 효과가 있는 것으로 판단됨.

본 연구에서는 또한 전통막걸리로부터 기능성 균주를 탐색함으로써 유용 균주를 분리하고 그 특성을 파악하고자 하였음. 막걸리로부터 분리된 유산균주들을 대상으로 항균활성 및 배양액으로부터 분리된 대사산물로 세포외다당류의 항산화 활성을 시험한 결과, strain M76은 균주 추출액은 *B. cereus* 식중독균에 대한 뛰어난 항균활성을 보였음. 특히 세포외다당류 1 mg/mL은 48.1%의 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내어, strain M76을 유용균주로서 선발하였음. 선택된 M76 균주는 16S rDNA sequencing과 생화학적 특성 검토를 통하여 *Pediococcus adiaceticus*로 동정되었으며, 특히 M76균주는 뛰어난 내산성, 내담즙성 및 장내점착능을 나타내면서 probiotics로서의 가능성이 검증되었음. 또한 *P. acidilactici* M76는 glucose만으로 이루어진 약 67.2 kDa의 분자량을 가지는 세포외다당류를 생성할 수 있었으며, 그 생성량은 2,048 mg/L의 수준으로 이미 산업적으로 사용되고 있는 *Pediococcus* sp.의 세포외다당류 생성량을 비교하였을 때 이러한 수준은 향후 세포외다당류의 산업적인 응용을 위해 충분한 양임.



## V. 참고문헌

- Effects of Persimmon-Vinegar on lipid metabolism and alcohol clearance in chronic alcohol-fed rats, *Journal of Medicinal Food* 11(1) 38-45, 2008.
- The obesity and fatty liver are reduced by plant-derived *Pediococcus pentosaceus* LP28 in high fat diet-induced obese mice, *PLOS ONE* 7(2) e30696, 2012.
- Anti-complementary activity of enzyme-treated traditional Korean rice wine hydrolysates, *J Sci Food Agric* 92 1765-1770, 2012.
- Unexpected convergence of fungal and bacterial communities during fermentation of traditional Korean alcoholic beverages inoculated with various natural starters, *Food Microbiology* 30 112-123, 2012.
- Moderated ethanol ingestion, redox status, and cardiovascular system in the rat, *Alcohol* 45 381-391, 2011.
- Effect of cashew wine on histology and enzyme activities of rat liver, *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences* 3(2) 31-38, 2011.
- Red wine protects against ethanol-induced oxidative stress in rat liver, *J. Agric. Food Chem* 57 6066-6073, 2009.
- Bae, S.H., Jung, E.Y., Kim, S.Y., Shin, K.S., Suh, H.J., 2010. Antioxidant and immuno-modulating activities of Korean traditional rice wine, takju. *Journal of Food Biochemistry* 34, 233-248.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199-1200.
- Erkki, S., Petaja, E., 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science* 55, 297-300.
- de Palencia, P.F., Werning, M.L., Sierra-Filardi, E., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Corbí, A.L., López, P., 2009. Probiotic properties of the 2-substituted (1, 3)-beta-D-glucanproducing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 4887-4891.
- Fuller R., 1989. Probiotics in man and animal. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365-378.
- Garai-Ibabe, G., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Sierra-Filardi, E., Werning, M.L., López, P., Corbí, A.L., Fernández de Palencia, P., 2010. Naturally occurring 2-substituted (1,3)-beta-D-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains with potential utility in the production of functional foods. *Bioresource Technology* 101, 9254-9263.
- Gutteridge, J.M., 1984. Reactivity of hydroxyl and hydroxyl like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid reactive material from deoxy sugars, nucleosides, and benzoate. *Biochemical Journal* 224, 761-767.
- Han, E.H., Lee, T.S., Noh, B.S., Lee, D.S., 1997. Volatile flavor components in mash of takju prepared by using different nuruks. *Korean Journal of Food Science and Technology* 29, 563-570.
- Hong Y.H., Bae, S.H., Jung, E.Y., Son, H.S., Shin, K.S., Kwon, K.H., Suh, H.J., 2009. Radical scavenging activities of Korean traditional rice wine, Takju. *Journal of Food Science and Nutrition* 14, 109-115.
- Hoon, S.S., Lee, C., Lee, S., Park, J.M., Lee, H.J., Bai, D.H., Yoon, S.S., Choi, J.B., Park, Y.S., 2013. Analysis of microflora profile in Korean traditional Nuruk. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23(1), 40-46.
- Jeong, J.W., Nam, P.W., Lee, S.J., Lee, K.G., 2011. Antioxidant activities of Korean rice wine concentrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 7039-7044.

- Jeong, J.W., Nam, P.W., Lee, S.J., Lee, K.G., 2012. Antioxidant activities of Korean rice wine concentrates. *Journal of agricultural and food chemistry* 59, 7039-7044.
- Jeong, J.W., Park, K.J., Kim, M.H., Kim, D.S., 2006. Quality characteristics of takju fermentation by addition of chestnut peel powder. *Korean Journal of Food Preservation* 13, 329-336.
- Jeon, M.J., Kim, M., Lee, D.G., Hwang, H.J., Kang, M.S., Kim, B.k., Lee, S.W., Jang, H.J., Lee, S.H., 2012. Analysis and properties of makgeolli made by isolated yeast strains from traditional makgeolli. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* 27, 21-27.
- Jin, J., Kim, S.Y., Jin, Q., Eom, H.J., Han, N.S., 2008. Diversity analysis of lactic acid bacteria in takju, Korean rice wine. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 1678-1682.
- Ji, S.H., Han, W.C., Lee, J.C., Kim, B.W., Jang, K.H., 2009. Fermentation characteristics of moru wine fermented with *Rose rugosa* Thuun. *Korean Journal of Food Science and Technology* 41, 186-190.
- Ju, M.N., Hong, S.W., Kim, K.T., Yum, S.K., Kim, G.W., Chung, K.S., 2008. Breeding of yeast strain with starch utilizing and alcohol fermenting ability by protoplast fusion. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* 36, 158-164.
- Kenji, Y., Takuya, M., Hiromu, T., Tomokazu, N., Kyoto, S., Tetsuki, T., Hidehiko, K., 1996. Binding specificity of *Lactobacillus* to glycolipids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 228, 148-152.
- Kim, B.H., Eun, J.B., 2012. Physicochemical and sensory characteristics of Makgeolli with pomegranate (*Punica granatum* L.) juice concentrate added. *Korean Journal of Food Science and Technology* 44, 417-421.
- Kim, H.S., Hyun, J.S., Kim, J., Ha, H.P., Yu, T.S., 1998. Enzymological characteristics and identification of useful fungi isolated from traditional Korean nuruk. *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 26, 456-464.
- Kim, J.Y., Kim, D., Park, P., Kang, H.I., Ryu, E.K., Kim, S.M., 2011. Effects of storage temperature and time on the biogenic amine content and microflora in Korean turbid rice wine, Makgeolli. *Food Chemistry* 128, 87-92.
- Kim, J.Y., Sung, K.W., Bae, H.W., Yi, Y., 2007. pH, acidity, color, reducing sugar, total sugar, alcohol and organoleptic characteristics of puffed rice powder added takju during fermentation. *Korean Journal of Food Science and Technology* 3, 266-271.
- Kim JY and Yi YH. 2010. pH, acidity, color, amino acids, reducing sugars, total sugars, and alcohol in puffed millet powder containing millet takju during fermentation. *Korean Journal of Food Science and Technology* 42, 727-732.
- Kim, M.H., Kim, W.H., Bae, S.J., 2001. The effect of Makkoli on serum lipid concentration in male rats. *J. Nat. Sci. Silla Univ.* 9, 73-84.
- Kuramoto, T., 1992. Development and application of food materials from extract such as SOD. *Up-to-date Food Process.*, 27, 22-23.
- Kwon, G.J., Choi, D.S., Wang, M.H., 2007. Biological activities of hot water extracts from *Euonymus alatus* leaf. *Korean Journal of Food Science and Technology* 39, 569-574.
- Kwon, R.H., Chae, G.Y., Ha, B.J., 2011. The effects of the makgeolri on the antioxidative activity in the endotoxin LPS-treated rats. *Journal of Food Hygiene and Safety* 26, 166-170.
- Kwon, S.J., Ahn, T.Y., Sohn, J.H., 2012. Analysis of microbial diversity in makgeolli fermentation using PCR-DGGE. *Journal of Life science* 22(2), 232-238.

- Lee, H., Lee, T.S., Noh, B.S., 2007. Volatile flavor components in the mash of Takju prepared using different yeasts. *Korean Journal of Food Science and Technology* 39, 593-599.
- Lee, J.H., Lee, H., 2007. Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. *Korean Journal of Food Science and Technology* 39, 681-687.
- Lee, J.S., Lee, T.S., Noh, B.S., Park, S.O. 1996. Quality characteristics of mash of takju prepared by different raw materials. *Korean Journal of Food Science and Technology* 28, 330-336.
- Lee, S.J., Kim, J.H., Jung, Y.W., Park, S., Shin, W.C., Park, C.S., Hong, S., Kim, G.W., 2011. Composition of organic acids and physiological functionality of commercial Makgeolli. *Korean Journal of Food Science and Technology* 43, 206-212.
- Lee, S.M., Lee, T.S., 2000. Effect of roasted rice and defatted soybean on the quality characteristics of takju during fermentation. *Journal of Natural Science* 12, 71-79.
- Lee, S.S., Kim, K.S., Eom, A.H., Sung, C.K., Hong, I.P., 2002. Production of Korean traditional rice-wines made from cultures of the single fungal isolates under laboratory conditions. *The Korean Journal of Mycology* 30, 61-65.
- Lee, T.J., Hwang, D.Y., Lee, C.Y., Son, H.J., 2009. Changes in yeast cell number, total acid and organic acid during production and distribution processes of Makgeolli, traditional alcohol of Korea. *Korean Journal of Microbiology* 45, 391-396.
- Lee, Y.S., Shin, J.S., Song, Y.H., Moon, S.H., Rhee, S.Y., 2010. The trend analysis of traditional makgeolli-brewing technique. 9(2).
- Li, J., Fan, L., Ding, S., 2011. Isolation, purification and structure of a new water-soluble polysaccharide from *Zizyphus jujuba cv. jinsixiaozao*. *Carbohydrate Polymers* 83, 477-482.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.I., Lee, Y.C., 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry* 339, 69-72.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical chemistry* 31, 426-428.
- Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology* 26, 211-219.
- Park, C.S., Lee, T.S. 2002. Quality characteristics of takju prepared by wheat flour *muruks*. *Korean Journal of Food Science and Technology* 34, 296-302.
- Patel, S., Kasoju, N., Bora, U., Goyal, A., 2010. Structural analysis and biomedical applications of dextran produced by a new isolate *Pediococcus pentosaceus* screened from biodiversity hot spot Assam. *Bioresource Technology* 101, 6852-6855.
- Reid, G., Hawthorn, L.A., Mandatori, R., Cook, R.L., Beg, H.S., 1988. Adhesion of lactobacilli to polymer surfaces in vivo and in vitro. *Microbial Ecology* 16, 241-251.
- Rhee, S.J., Lee, C.Y., Kim, M.Y., Lee, C.H., 2004. Potential antioxidant peptidies in rice wine. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 715-721.
- Semjonovs, P., Zikmanis, P., 2008. Evaluation of novel lactose-positive and exopolysaccharide-producing strain of *Pediococcus pentosaceus* for fermented foods. *European Food Research and Technology* 227, 851-856.
- Seo, D.H., Jung, J.H., Kim, H.Y., Kim, Y.R., Ha, S.J., Kim, Y.C., 2007. Identification of lactic acid bacteria involved in traditional Korean rice wine fermentation. *Food Science and Biotechnology* 16, 994-998.
- Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Navarini, L., Bosco, M., Cescutti, P.,

1999. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *International Journal of Food Microbiology* 51, 105-111.

Song, J.C., Park, H.J., 2003. Takju brewing using the uncooked germed brown rice at second stage mash. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 32, 847-854.

Song, Y.R., Song, N.E., Kim, J.H., Nho, Y.C., Baik, S.H., 2011. Exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* strains isolated from Kimchi. *Journal of General and Applied Microbiology* 57, 169-175.

Vanangelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings, J., De Vuyst, L., 2004. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 900-912.

Velasco, S.E., Yebra, M.J., Monedero, V., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., Irastorza, A., 2007. Influence of the carbohydrate source on  $\beta$ -glucan production and enzyme activities involved in sugar metabolism in *Pediococcus parvulus* 2.6. *International Journal of Food Microbiology* 115, 325-334.

Walling, E., Dols-Lafargue, M., Lonvaud-Funel, A., 2005. Glucose fermentation kinetics and exopolysaccharide production by ropy *Pediococcus dammosus* IOEB8801. *Food Microbiology* 22, 71-78.

Zhao, J., Monteiro, M.A., 2008. Hydrolysis of bacterial wall carbohydrates in the microwave using trifluoroacetic acid. *Carbohydrate Research* 343, 2498-2503.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 한식 세계화 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 한식 세계화 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

