

최 종 보 고 서

전통발효유 타락의 발효특성과 건강기능성 규명

(Identification of the Fermentation Characteristics
and Health Beneficial Effects of Korean Traditional
Fermented Milk)

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “전통발효유 타락의 발효특성과 건강기능성 규명”에 대한 최종보고서로 제출합니다.

2012 년 12 월 27 일

성신여자대학교 산학협력단

연 구 진

주관연구기관명 : 성신여자대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 한 영 숙

연구기관명 : 성신여자대학교

연구책임자 : 한 영 숙

연 구 원 : 오 세 옥

연 구 원 : 고 성 희

연 구 원 : 정 진 경

연 구 원 : 강 선 정

연 구 원 : 하 수 정

연 구 원 : 양 승 국

연 구 원 : 임 구 상

연 구 원 : 이 경 수

연구기관명 : 국민대학교

책임연구원 : 임 지 영

연 구 원 : 임 지 현

연 구 원 : 전 소 연

연 구 원 : 전 지 경

연 구 원 : 김 성 규

연 구 원 : 박 형 렬

연구기관명 : 고려대학교

책임연구원 : 전 태 훈

연 구 원 : 한 지 혜

연 구 원 : 배 준 범

연 구 원 : 나 만 흙

요 약 문

I. Title

Identification of the Fermentation Characteristics and Health Beneficial Effects of Korean Traditional Fermented Milk (*Tarak*)

II. Objective

- Discovering the history of *Tarak* in Korea dietary culture and estimation of the value of *Tarak*
- Elucidation of fermentative property of traditional preparation method of *Tarak*
Standardization of *Tarak* with starter culture
- Assessment of the health promoting proportion of *Tarak*

III. Content and Scope

- Collection and organoleptic evaluation of *Tarak*
- Microbial community analysis (MCA) of *Tarak*
- Manufacturing of *Tarak* due to the mixing of the dominant microbes
characterization and starter development.
- Assessment of the health functionality of *Tarak* with in vitro bioassay
- Assessment of the health functionality of *Tarak* with *in vivo* bioassay

IV. The results of research & development

- By using the original *Tarak* and *Makgeolli*, *Tarak* was prepared. And the physicochemical and microbiological properties are determined during fermentation.
- *Tarak* was repeatedly prepared by adding 0.1% vinegar and 10% over-ripened *Makegeolli* to warmed milk (40°C)
- Microbial community analysis was conducted with *Tarak*. There are lots of heterogeneous microbial communities so it was concluded that making *Tarak* with constant qualities maybe somewhat difficult.
- Dominant strains of lactic acid bacteria and yeast was isolated from the *Tarak*, and was used to making *Tarak*. When 1%–2% was used a starter, *Tarak* was successfully prepared.
- Restraining effects of fermented *Tarak*, which was a supernatant fraction of ethanol precipitation, on adipogenesis, hypertension, and inflammation were investigated *in vitro*.
- *Tarak* solvent extracts (ethylacetate, butanol and water) showed DPPH and ABTS radical scavenging activity and this antioxidant effect were increased as

fermentation period increased.

- In terms of anti-adipogenic effect determined using 3T3-L1 preadipocytes, there was decreasing trend in fat accumulation when *Tarak* was treated from 0.25 to 1 mg/mL. The exposure of 3T3-L1 adipocyte to *Tarak* resulted in down-regulated expression of PPAR- γ , the master regulator of fat differentiation, and C/EBP α in a dose dependent manner. *Tarak* did not show cytotoxicity at tested concentrations.
- No antihypertensive effect was found in *Tarak*. There was no inhibitory effect on nitric oxide production when *Tarak* was added to RAW 264.7 macrophages up to 1 mg/mL.
- Evaluation of anti-inflammatory effectiveness of fermented *Tarak* extract by using a small animal(mouse) model suffering from enteritis in order to prove health functionality of *Tarak in vivo*, It was found that de-fatted *Tarak* fermented extract(6day #3) curbed the expression of inflammatory cytokine, thereby alleviating the intestinal inflammation of small animals(mouse).

V. Research achievements and performance utilizing plan

- Establish to a method of manufacturing *Tarak* for Korean traditional fermented milk of reproducing.
- Standardized and reliable starter development of traditional fermented milk *Tarak*
- Securing scientific evidence on the health benefits of *Tarak*
- Content grant of Korean traditional fermented food
- Build of various promotional materials and utilized for Korea food globalization.
- Establish a stable manufacturing conditions through analysis that fermentation microorganisms of *Tarak*

I. Title

전통발효유 타락의 발효특성과 건강기능성 규명

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 우리 식문화에서 발효유 이용 역사 재조명 및 타락의 가치 부각
- 전통발효유 타락의 전통제법 재현을 통한 발효특성 규명
- 전통발효유 타락제조에 필요한 스타터 개발을 통한 표준화
- 전통발효유 타락의 건강기능성 규명을 통한 과학적 우수성 확보

III. 연구개발 내용 및 범위

- 전통발효유 타락의 수집 및 관능평가
- 타락의 발효 기작 이해를 위한 미생물군집 분석(MCA)
- 우점균의 혼합에 의한 타락 제조 특성 파악 및 스타터 개발
- *In vitro bioassay*를 이용한 전통발효유 타락의 건강기능성 검증
- *in vivo bioassay*를 이용한 전통발효유 타락의 건강기능성 검증

IV. 연구개발결과

- 본타락과 막걸리를 이용하여 타락을 제조하였으며 숙성중 이화학적 변화 및 미생물적 변화를 측정하였다.
- 막걸리로 타락을 제조할 경우, 중탕한 우유에 0.1% 식초를 첨가하고 과숙성된 막걸리를 10% 첨가할 경우 타락이 재현성있게 제조되었다.
- 미생물군집 분석 결과, 본타락과 타락사이에는 상이한 미생물적 군집이 존재하였으므로 타락 제조가 매우 까다로움을 알 수 있었다.
- 우점균인 젖산균과 효모균을 분리하였으며 이를 이용하여 타락을 제조한 경우, 1.0%와 2.0% 첨가구에서 타락이 제조되었다.
- 타락의 ethylacetate, butanol, water 분획에서는 DPPH, ABTS 라디칼 소거능과 같은 항산화 활성이 확인되었으며 항산화 활성은 발효 기간이 경과함에 따라 증가하였다.
- 타락 발효물을 에탄올 침전 한 후의 상정액을 이용하여 지방분화억제, 항고혈압효과, 항염증 활성을 *in vitro*로 살펴본 결과는 다음과 같다.
- 3T3-L1 adipocyte를 이용하여 측정한 지방분화 억제 효과에서는 지방의 축적이 감소하는 경향이 나타났으며 지방분화의 master regulator인 PPAR- γ 와 C/EBP α 의 발현이 용량 의존적으로 감소하였고 세포 독성은 나타나지 않았다.
- Angiotensin converting enzyme의 저해 활성으로 평가한 항고혈압 효과나 RAW 264.7 macrophage의 NO 생성 저해 효과로 측정한 항염증 활성에서는 최대 1mg/mL 농도 수준

의 시료 처리에도 유의적인 효과가 관찰되지 않았다.

- 타락의 *in vivo* 건강기능성 규명을 위하여 장염증 소동물(생쥐) 모델을 이용하여 타락 발효 추출물의 항염증 효능을 평가한 결과 탈지 타락 발효 추출물(6day #3)이 염증성 cytokine의 발현을 억제하여 장염증 소동물(생쥐) 모델에서 염증을 완화하는 것으로 확인되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 타락의 제조방법을 확립하여 한국전통 발효유의 재현
- 전통발효유 타락의 안정적인 스타터 개발 및 표준화
- 타락의 건강증진 효과에 대한 과학적 근거 자료 확보
- 한국 전통 발효식품의 콘텐츠 부여
- 한식세계화를 위한 홍보자료 구축 및 활용
- 타락의 발효 미생물 분석을 통해 안정적 제조 조건 확립

CONTENTS

I. 1st detail project : A making condition establishment of Korean traditional fermented milk(*Tarak*) and starter development.

1) Literature review of *Tarak*

- 2) The *Tarak* making condition establishment
- 3) The optimum created condition understanding experiment of *Tarak*
- 4) The set of optimum fermented condition of *Tarak* by a sensory test
- 5) The *Tarak* making and quality test using separation of dominant germs, separated culture
- 6) The establishment of stability after making starter development, lyophilization form

II. 2nd detail project : in vitro functionality verification of Korean traditional fermented milk(*Tarak*)

1) A research method.

- (1) The extract making and line subdividing of Korean traditional fermented milk(*Tarak*)
- (2) The analysis of antioxidative activity
- (3) The making of sample to analyse anti-hypertension and inhibition-activity of lipolysis
- (4) The analysis of anti-hypertension effect
- (5) The analysis of inhibited lipolysis effect
- (6) The making of sample to analyse anti-inflammation activity
- (7) The assessment of anti-inflammation activity

2) A research result

- (1) The antioxidative activity of *Tarak* solvent extraction fraction
- (2) The analysis of anti-hypertension effect about *Tarak*
- (3) The anti-obesity effect of *Tarak*
- (4) The anti-inflammation effect of *Tarak*

III. 3rd detail project : investigation about health functionality of *Tarak*

- 1) A mechanism analysis about measuring inflammatory activity in macrophage of fermented *Tarak* extract
- 2) The inflammatory activity measurement and mechanism analysis in T-lymphocyte of fermented *Tarak* extract
- 3) A verification about inflammatory effect of fermented *Tarak* extract in a animal model having enteritis

IV. Reference

목 차

I. 제 1 세부 과제: 전통발효유 타락의 제조조건 확립 및 스타터 개발

- 1) 문헌고찰을 통한 타락
- 2) 타락 제조 조건 확립
- 3) 타락의 최적 생성 조건 파악 실험
- 4) 관능검사에 의한 타락 최적 발효조건 설정
- 5) 우점균 분리, 분리균주를 이용한 타락 제조 및 품질평가
- 6) 스타터 개발, 동결건조 형태로 제조하여 안정성을 확보

II. 제 2 세부과제: 전통발효유 타락의 *in vitro* 기능성 검증

1) 연구방법

- (1) 전통 발효유 타락의 추출물 제조 및 계통 분획
- (2) 항산화 활성 분석
- (3) 항고혈압 및 지방분해 억제활성 분석을 위한 시료의 제조
- (4) 항고혈압 효과 분석
- (5) 지방분화억제 효과 분석
- (6) 항염증 활성 분석을 위한 시료의 제조
- (7) 항염증 활성의 평가

2) 연구결과

- (1) 타락 용매추출 분획의 항산화 효과
- (2) 타락의 항고혈압 효과 분석
- (3) 타락의 항비만 효과
- (4) 타락의 항염증 효과

III. 제 3 세부과제: 타락의 *in vivo* 건강기능성 규명

- 1) 타락 발효 추출물의 대식 세포 내 항염증 활성 측정 기전분석
- 2) 타락 발효 추출물의 T림프구 내 항염증 활성 측정 및 기전분석
- 3) 장염증 동물모델에서의 타락 발효 추출물의 항염증 효과 검증

IV. 참고문헌

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 전통발효유 타락의 발효특성과 건강기능성 규명		
	(영문) Identification of the Fermentation Characteristics and Health Beneficial Effects of Korean Traditional Fermented Milk (<i>Tarak</i>)		
연 구 기 관	성신여자대학교 산학협력단	연 책 임 자	성신여자대학교
참 여 기 관	국민대학교, 고려대학교		한영숙
연 구 비	계	155,000,000	총 연 구 기 간 2011. 12. 30 ~ 2012. 12. 29.(12개월)
참 여 연 구 원	19 명 (연구책임자: 1 명, 책임연구원: 2명, 연구원: 2 명, 연구보조원 14명)		

○ 연구개발 목표 및 내용

- 우리 식문화에서 발효유 이용 역사 재조명 및 타락의 가치 부각
- 전통발효유 타락의 전통제법 재현을 통한 발효특성 규명
- 전통발효유 타락제조에 필요한 스타터 개발을 통한 표준화
- 전통발효유 타락의 건강기능성 규명을 통한 과학적 우수성 확보

○ 연구결과

- 본타락과 막걸리를 이용하여 타락을 제조하였으며 숙성중 이화학적 변화 및 미생물적 변화를 측정하였다.
- 막걸리로 타락을 제조할 경우, 중탕한 우유에 0.1% 식초를 첨가하고 과숙성된 막걸리를 10% 첨가할 경우 타락이 재현성있게 제조되었다.
- 미생물균집 분석 결과, 본타락과 타락사이에는 상이한 미생물적 균집이 존재하였으므로 타락제조가 매우 까다로움을 알 수 있었다.
- 우점균인 젖산균과 효모균을 분리하였으며 이를 이용하여 타락을 제조한 경우, 1.0%와 2.0% 첨가구에서 타락이 제조되었다.
- 타락의 ethylacetate, butanol, water 분획에서는 DPPH, ABTS 라디칼 소거능과 같은 항산화 활성이 확인되었으며 항산화 활성은 발효 기간이 경과함에 따라 증가하였다.
- 타락 발효물을 에탄올 침전 한 후의 상정액을 이용하여 지방분화억제, 항고혈압효과, 항염증 활성을 in vitro로 살펴본 결과는 다음과 같다
- 3T3-L1 adipocyte를 이용하여 측정한 지방분화 억제 효과에서는 지방의 축적이 감소하는 경향이 나타났으며 지방분화의 master regulator인 PPAR- γ 와 C/EBP α 의 발현이 농도 의존적으로 감소하였고 세포 독성은 나타나지 않았다.

- Angiotensin converting enzyme의 저해 활성으로 평가한 항고혈압 효과나 RAW 264.7 macrophage의 NO 생성 저해 효과로 측정된 항염증 활성에서는 최대 1mg/mL 농도 수준의 시료 처리에도 유의적인 효과가 관찰되지 않았다.
- 타락의 *in vivo* 건강기능성 규명을 위하여 장염증 소동물(생쥐) 모델을 통하여 타락 발효 추출물의 항염증 효능을 평가한 결과 탈지 타락 발효 추출물(6day #3)이 염증성 cytokine의 발현을 억제하여 장염증 소동물(생쥐) 모델에서 염증을 완화하는 것으로 확인되었다.

○ 연구성과 및 성과활용 계획

- 전통식문화의 계승 및 발전 유도
- 한국 전통식품중 유발효 제품에 대한 홍보자료 구축
- 타락의 미생물 발효특성 규명을 통해 한국전통 발효유의 재발견
- 전통발효유 타락의 안정적인 스타터 개발 및 표준화
- 타락의 건강증진 효과에 대한 과학적 근거 자료 확보
- 한국 전통 발효식품의 다양화
- 한식의 다양성과 우수성을 알림으로써 한식세계화를 위한 홍보자료 구축 및 활용

1. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

<연구개발의 목표>

- 우리 식문화에서 발효유 이용 역사 재조명 및 타락의 가치 부각
- 전통발효유 타락의 전통제법 재현을 통한 발효특성 규명
- 전통발효유 타락제조에 필요한 스타터 개발을 통한 표준화
- 전통발효유 타락의 건강기능성 규명을 통한 과학적 우수성 확보

<연구개발 수행내용>

- 전통발효유 타락의 표준제법 재현
- 타락의 발효과정 중 미생물 발효특성 및 이화학적 특성 분석
- 타락의 발효 기작 이해를 위한 미생물군집 분석(MCA)
- 우점균의 혼합에 의한 타락 제조 특성 파악 및 스타터 개발
- *In vitro bioassay*를 이용한 전통발효유 타락의 건강기능성 검증
- *in vivo bioassay*를 이용한 전통발효유 타락의 건강기능성 검증

2. 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
전통발효유 타락의 제조조건 확립 및 스타터 개발	<ol style="list-style-type: none"> 1. 전통제법 재현 <ul style="list-style-type: none"> - 타락 수집, 분석, - 직접 제조 및 분석 2. 이화학 특성 및 관능 특성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - pH, 산도, 점도 분석, 관능평가 3. 타락 우점균 파악 <ul style="list-style-type: none"> - MCA(microbial community analysis) 4. 스타터 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 분리 젖산균, 효모 이용 - 타락 제조 및 재현성 평가 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 전통발효유 타락의 전통제법 재현을 구하여 안동에서 타락을 수집하여 분석하고 또한 직접적으로 제조하여 특성을 파악함 2. 발효 과정 중 pH, 산도, 점도 분석을 통하여 이화학적 특성 및 관능특성을 분석함 3. 수집타락 중 최적의 타락을 선발하여 우점균 분석을 위한 microbial community analysis 의뢰 4. 타락 Bulk 및 분리균주를 이용한 타락 제조 및 발효 재현성 있는 스타터 개발
전통발효유 타락의 <i>in vitro</i> 기능성 검증	<ol style="list-style-type: none"> 1. 추출물 제조 및 계통 분획 조건 확립 2. 항산화 효과 분석 3. 항고혈압 효과 분석 4. 항비만 효과 분석 5. 항염증 효과 분석 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 항산화 효과: DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능 2. 항고혈압 효과 분석: ACE 억제효과 분석 3. 항비만 효과 분석: 3T3-L1 adipocyte 사용. MTT assay로 세포독성 확인 4. 항염증 효과 분석: NO생성저해활성
전통발효유 타락의 <i>in vivo</i> 건강 기능성 규명	<ol style="list-style-type: none"> 1. 염증성 장 질환 소동물 모델 (생쥐모델) 확립 2. 염증성 장 질환 소동물 모델 (생쥐모델)에서 전통발효유 타락의 항염증 효능평가 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 장염증 소동물(생쥐) 모델을 구축하고 타락 발효 추출물의 면역 세포 내 항염증 활성 측정 및 기전분석을 분석 2. 항염증 효과가 있는 타락 발효 추출물을 구축된 장염증 소동물(생쥐) 모델을 통하여 항염증 효능을 평가

3. 세부연구수행 결과

I. 제 1 세부과제: 전통발효유 타락의 제조 조건 확립 및 스타터 개발

1) 문헌고찰을 통한 타락

○ 발효유는 동지중해(지중해~페르시아만)지역에서 아마도 페니시아(Phoenicia)시대(B.C. 3000년경)이전에 유래되어, 그 후에 중동부 유럽지역으로 전파되었던 것으로 알려져 있다. 요구르트의 기원에 대한 대표적인 유래는 사막의 유목민들이 우유를 가죽부대에 넣고 사막을 횡단하던 중 우유가 반고형 상태로 응고된 것을 발견하였는데 그 당시에는 젖소, 양, 염소, 낙타, 말 등에서 짠 생유가 사막의 더운 기후에서 세균에 의해 자연 발효되어 응유(curd)가 형성되었는데 이것이 자연적인 발효유의 탄생이었으며, 생유에 오염되어 발효유를 만들어준 세균은 유산균이었을 것이라고 추정된다.

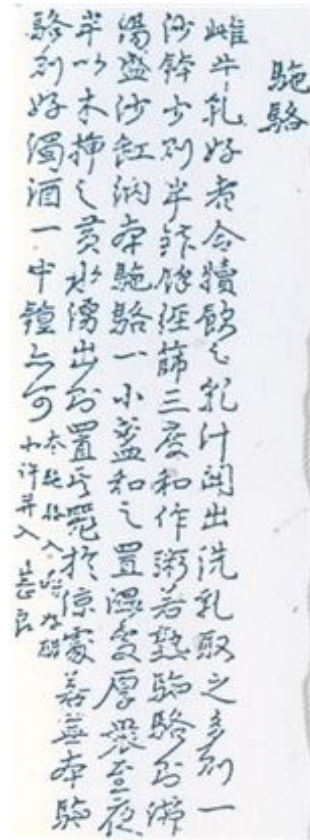
○ 중앙아시아의 유목민인 아리아인은 말젖(馬乳)으로 만든 쿠미스(kumiss)라는 알콜성의 발효유를 음용하였으며, 메소포타미아 지역의 아무르인은 가축의 젖으로 만든 발효유를 식생활이나 의료에 음용했다고 전해지고 있다. 발효유는 구약성서 창세기 18장에도 그 기록이 있는 것으로 보아도 오랜 역사를 갖고 있음을 알 수 있다. 이와 같이 고대 중앙아시아인이나 유럽인들은 동물의 젖을 그대로 먹는 것 보다는 유산균으로 발효시켜 먹는 것이 소화에도 좋고 영양적으로도 우수하다는 것을 경험으로 알고 있었다.

○ 우리나라의 유산균 발효식품이라고 하면 모두들 김치를 이야기 하지만 발효유에 대한 기록이 많이 남아있지 않을 뿐, 고대부터 우리 민족은 발효유를 고급 식품과 약의 일종으로 사용했다. 고대 및 삼국시대의 건국설화에서 보면 고구려의 주몽이 말의 젖을 먹었고 후백제의 시조는 범의 젖을 먹었다고 한다. 일본에서는 백제인 ‘복상(福常)’이 일본의 유조(乳祖)로 칭송되는 것으로 미루어 볼 때 우리 민족은 이미 우유를 음용하였음을 알 수 있다. 고려시대에는 불교의 연등행사인 팔관회에서 수(酬)라는 연유형태의 제품이, 조선시대에 낙죽(酪粥)이라는 우유로 만든 죽이 있었으나 그 소비가 급증하자 세종 2년(1420)에 우유소(牛乳所)라는 관청을 폐지하였으며 그 후 약으로만 사용하였다는 기록들이 동의보감, 임원십육지(1620), 향림집성방(1433) 등에서 언급되고 있다.

○ 본 연구팀에서는 『수운잡방』에서 발효유 제조법을 발견하였다.

○ 『수운잡방(需雲雜方)』은 탁청공 김유(1481-1552)에 의해 지어진 것으로 상하권 두 권에 술 담는 법을 비롯하여 108가지 음식 만드는 법을 기록해 놓고 있어 500년전 안동 사림계층의 식생활을 엿볼 수 있다. 우리나라 최고의 요리서로 알려진 허균의 『도문대작』(1611)보다 100여년 전에 나온 것으로 추정되며, 고려 말기에서 조선전기에 걸친 한 시대의 음식법을 추정할 수 있는 귀중한 자료로 평가되고 있다. 현재까지 발견된 가장 오래된 한문필사본 조리

서인 이 『수운잡방』 (1540년)에 보면 ‘타락’ 이라 하여 우유에 탁주를 넣어 발효시킨 발효유가 등장한다.



○ 『수운잡방』에서 타락 제조법을 보면;

若駝駱卽沸 盛沙缸納本駝駱一小盞和之 置溫處厚 至夜半以木插之 黃水湧出卽置其器於涼處
若無本駝駱則好濁酒一中中鍾亦可 本駝駱入時好醋少許并入甚良

“우유가 끓어서 익게 되거든 오지 향아리에 담고 본타락 작은 잔 한잔을 섞어서 따뜻한 곳에 놓은 다음 두껍게 덮어둔다. 밤중에 나무 막대로 찌러 보아서 누런 물이 솟아오르면 그 그릇을 시원한 곳에 둔다. 본타락이 없으면 탁주 한 중바리를 넣어도 좋다. 본타락을 넣을 때 좋은 식초를 조금 같이 넣으면 더욱 좋다”라고 되어있어 발효유가 이용되었음을 알 수 있다. 따라서 그대로 재현한 결과 품질 좋은 발효유가 제조되었다.

○ 이와 같이 한반도에서도 우유를 음용한 역사가 길며, 발효유 또한 존재하나 널리 알려져 있지 않으며 그 가치 또한 평가되어 있지 않다. 발효유는 전 세계에 널리 알려진 대로 그 기능적 가치가 우수하며, 우리나라 발효유인 타락은 전통주인 탁주를 넣어 발효시켰다는 점에서 다른 나라의 발효유와는 성상, 영양적, 미생물적 가치, 기능성 또한 차이가 있으리라 생각된다.

○ 또한 타락이란 ‘말린 우유’라는 뜻의 몽골어 ‘토라크’에서 유래된 말로 몽골에는 ‘타락’이라는 발효유가 있으며 이것이 고려 말기에 우리나라에 들어와 일부 소수가 음용하였으며 그 기록이 『수운잡방』에 남아 있는 것으로 추정된다.

2) 타락 제조 조건 확립

가. 본타락을 이용한 타락 제조

안동지방에서 본타락을 수집하였으며 이를 접종원으로 하여 타락을 제조하여 관능적인 특성을 파악하고자 하였다. 본타락(n)에서 타락(n+1, n+2, n+3)을 제조하여 단맛, 신맛, 짙은 맛, 알코올취 여부 대하여 7점 평점법으로 관능검사 하였다. 그 결과 전반적인 기호도가 n+3이 가장 좋은 것으로 나타났지만 타락 특유의 냄새인 알코올취가 매우 감소한 상태이었다.

Table 1. Sensory evaluation of *Tarak*

	n	n+1	n+2	n+3
전반적 기호도	2.41	3.58	3.58	4.25
외관 기호도	1.5	3.33	3.83	4.25
맛/향 기호도	2.58	3.5	3.75	4.25
조직감 기호도	2.25	3.33	3.91	4.33
알코올취 여부	2.16	2.16	2.33	1.91
단맛	1.75	1.91	2.5	1.91
신맛	5.91	3.83	3.75	3.16
짙은맛	3.08	3.25	3.58	2.25
끈적임 정도	1.83	3.16	3.16	2.58
단단한 정도	2.41	3.83	3.75	3.25
입안 촉감(거친정도)	3.5	3.5	3.25	2.91

또한 n+1, n+2 타락의 숙성 중 이화학적 특성을 측정된 결과, 비슷한 품질 지표를 가지고 있는 것으로 판단되었다. 따라서 본타락을 제조하는 것이 가장 중요한 과정이라고 생각되었다. 한편,

n+2 타락을 2 L 제조하여 2개의 세부연구기관에 공수하여 기능성 실험을 위한 시료를 제공하였다.

n을 접종원으로 이용하여 n+1, n+2 타락을 제조하여 발효특성을 조사하였다. 타락은 총량의 10%를 첨가하였으며 37°C 온도에서 숙성하였다. 그 결과 pH는 6.5 근방에서 숙성이 진행됨에 따라 감소하여 pH 4.5 수준까지 저하되었다. n+1 타락이 n+2 타락에 비하여 pH가 조금 낮은 것으로 측정되었다. 숙성 중 적정산도를 측정하여 그 결과를 Fig. 1의 b)에 나타내었다. 산도는 0.3 이하에서 계속적으로 증가하여 0.8 수준을 나타내었다. Brix는 초기 일정한 값을 나타내다가 급격히 저하되었으며 그 이후 일정한 값을 나타내었다. 젖산균은 초기 5 log 수준을 나타내었으며 이후 8 log 이상으로 증가하였으며 효모는 초기 완만히 증가하였다가 발효 후기에 급격하게 증가하여 6 log 수준을 나타내었다.

a)

b)

c)

d)

e)

Fig. 1. Fig. 15. Physicochemical and microbiological properties during n, n+1 *Tarak* fermentation. a) pH, b) titratable acidity, c) Brix, d) lactic acid bacteria, e) yeast

나. 타락의 최적 생성 조건 파악 실험

수은잡방에 따라 우유를 증탕한 후에 식초 0.1%를 첨가하였으며 막걸리를 1%, 2%, 5%, 10% 첨가하여 실험한 결과 모두 타락이 생성되지 않았다. 막걸리 농도와 식초 농도를 각각 다르게 첨가하였을 때 (막걸리 7% + 식초 0.5%)와 (막걸리 3% + 식초 0.3%, 0.5%) 처리구에서 18시간 발효 하였을 때 타락이 형성되었지만 안동지방에서 수집한 타락과는 차이가 있는 것으로 판단되었다. 우유를 80℃로 데워서 40℃로 식힌 후 타락을 제조한 경우 막걸리 10%에 식초를 0.1% 첨가하였을 때 고체 형태로 타락이 형성되었지만 악취가 발생하였다. 또한 식초를 넣지 않고 막걸리만 2.5%, 5%, 7.5%, 10% 첨가하였을 때 타락이 생성되지 않았다. 따라서 막걸리를 이용한 타락제조는 많은 변수가 있는 것으로 판단되었으며 최적 생성조건 설정도 매우 어려울 것으로 판단되었다.

다. 막걸리 미생물상 변화에 따른 타락 제조

나. 의 타락 제조 조건에서 가장 가능성이 높을 것으로 예상되는 타락 제조 조건인, 우유를 80℃로 끓인 후 40℃로 식히고 막걸리를 우유의 3~10%를 접종한 처리구와 우유를 40℃에서 증탕 후 우유의 3~10%를 접종한 조건에서 37℃ incubator에서 24시간 제조하였다. 그 결과 막걸리를 이용한 타락제조는 재현성이 매우 낮게 나타나 동일한 품질의 타락을 계속적으로 얻는 것이 매우 어려운 것으로 판단되었다. 이는 베이스로 사용되는 우유의 상태에 따라 존재하는 미생물이 다를 수 있으며 또한 타락 형성에 커다란 영향을 미치는 소재인 막걸리 상태에 따라 막걸리에 존재하는 미생물상이 다를 수 있기 때문이라고 생각되었다. 따라서 막걸리 상태에 따라 존재하는 미생물이 다르므로 서로 다른 타락이 제조될 수 있을 것이라고 생각되었다. 따라서 다양한 상태의 막걸리를 제조하여 타락을 제조하여 특성을 고찰하고자 하였다. 막걸리는 동일한 날짜에 구입하여 한 처리구는 20℃에서 숙성시켰으며 한 처리구는 30℃에 숙성시켰다.

Table 2. 막걸리의 미생물분포 변화를 위한 막걸리 보관 시간 및 보관 온도 처리

	pH		적정산도(%)	
	20℃	30℃	20℃	30℃
4 day	4.06	4.24	0.48	0.58
3 day	3.86	4.15	0.46	0.54
2 day	3.82	4.13	0.39	0.45
1 day	3.73	3.97	0.36	0.38
0 day	3.68		0.36	

그 결과, 30℃에서 보관한 처리구가 20℃에서 보관한 막걸리 보다 pH가 낮게 나타났으며 적정 산도도 높게 측정되었다. 이렇게 제조된 막걸리를 이용하여 타락을 제조하였으며 pH 및 적정산도를 Table 3에 나타내었다.

Table 3. 막걸리를 이용하여 제조된 타락의 pH 및 적정산도

특성	pH		적정산도(%)	
	20℃	30℃	20℃	30℃
4 day	6.09	5.88	0.54	0.45
3 day	6.41	5.76	0.45	0.45
2 day	6.34	5.87	0.63	0.45
1 day	6.01	6.06	0.45	0.27
0 day	6.31		0.36	

관능검사 결과, 20℃에서 제조된 막걸리로는 모든 처리구에서 타락이 제조되지 않고, 악취가 생성되었으며 30℃에서 보관한 막걸리로 제조한 것이 타락이 형성되었다. 따라서 막걸리로 타락을 제조할 때에는 막걸리를 과숙성 시킨 후 제조하는 것이 타락이 제대로 형성됨을 알 수 있었다. 따라서 이후 타락의 제조에는 서울장수막걸리를 구입하여 30℃에서 4일간 숙성시킨 막걸리를 이용하여 타락을 제조하였다.



Fig. 2. 막걸리를 첨가한 타락의 제조

3) 전통발효유 타락의 제조 조건에 따른 발효특성 정밀 분석

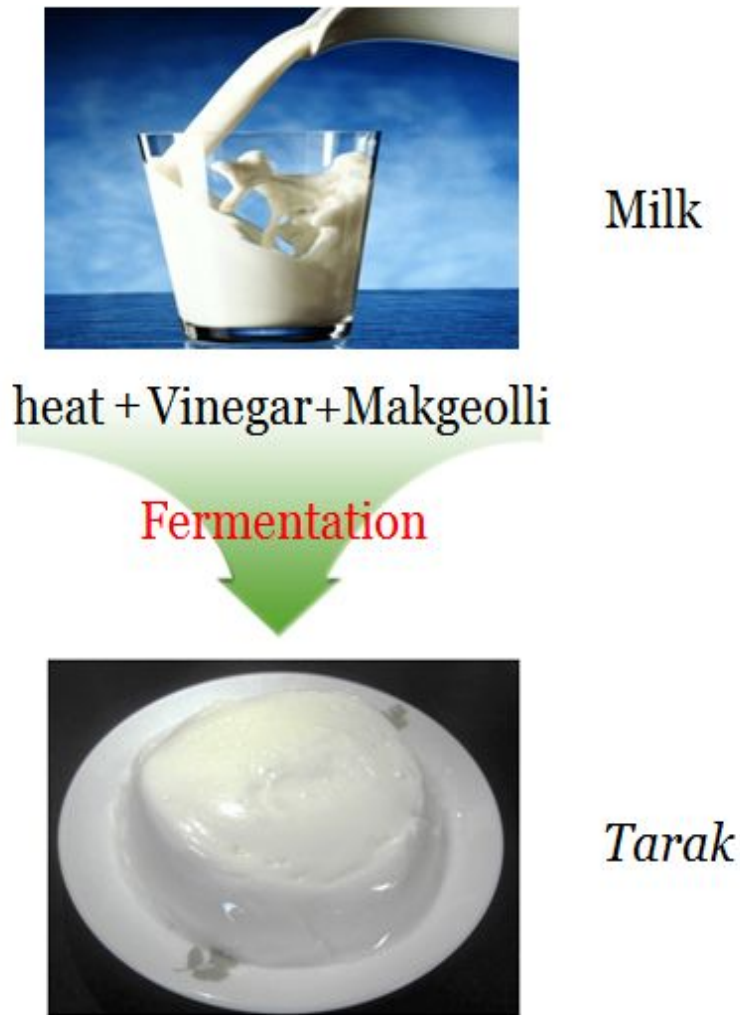
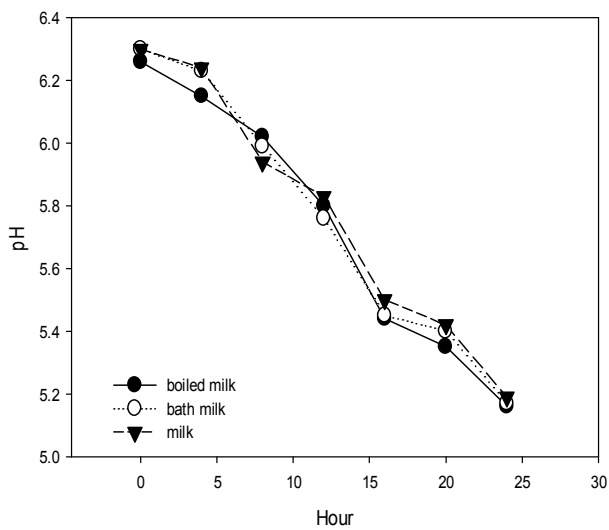


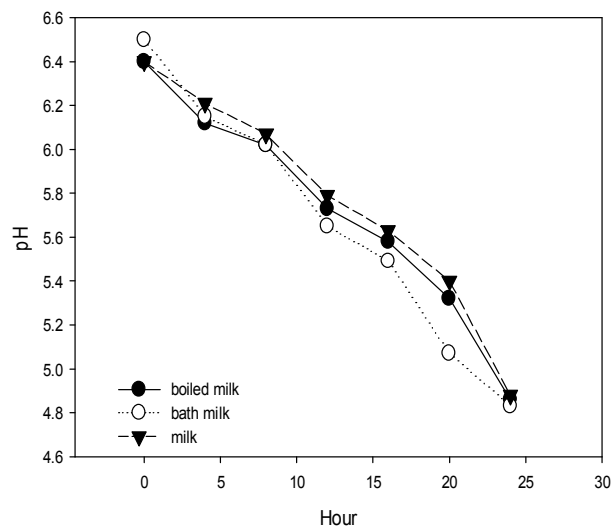
Fig. 3. 타락 제조 방법

가) 열처리 방법에 따른 타락 제조 특성

80°C로 끓인 후 식힌 우유, 50°C로 중탕한 후 식힌 우유와 생우유 식초를 0%, 0.1%, 0.3%, 0.5% 첨가하였으며 30°C에서 4일간 숙성시킨 막걸리를 10% 첨가하여 37°C에서 24시간 발효시켜 타락을 제조하였다. 4시간 간격으로 시료를 취하여 pH, 산도, 젖산균, 효모수와 brix를 측정하였다. 우선 발효 과정중 pH의 변화를 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. 식초를 첨가하지 않은 처리구나 식초를 첨가한 처리구 모두 시간이 경과함에 따라 pH가 저하되었지만 식초를 첨가하지 않은 처리구는 24시간 후에 5.2 정도를 나타낸 반면 식초를 첨가한 처리구는 4.8 정도의 pH를 나타내었다. 우유의 상태에 따라서는 중탕을 하여 열처리가 처리구가 가장 빠르게 pH가 저하되는 것으로 나타났다. 이는 막걸리 첨가에 따라 우유로 옮겨진 젖산균이 중탕처리한 우유에서 원활하게 성장하였음을 의미하였다.



(a)



(b)

(c)

(d)

Fig. 4. Changes of pH in *Tarak* with different vinegar concentration at 37°C for 24 hr.

(a) vinegar 0%, (b) vinegar 0.1%, (c) vinegar 0.3%, (d) vinegar 0.5%

발효 과정중 적정산도 변화를 측정하여 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 식초를 첨가하거나 첨가하지 않은 모든 처리구에서 중탕으로 열처리한 우유가 가장 빠르게 산도가 증가하는 것으로 나타났다. 이는 중탕으로 처리한 우유의 pH가 가장 빠르게 저하되었다는 것과 연관이 있다고 생각되었다. 전체 그래프에서 산도의 증가는 중탕으로 열처리한 우유 > 끓여서 열처리한 우유 > 생우유 순이었다. 생우유의 경우 우유에 존재하는 natural microflora에 의해 젖산균이 성장이 약간은 억제되는 결과를 나타내었다고 생각되었으며 80°C로 끓여서 식힌 우유는 열에 의해 젖산균 성장에 필요한 영양분이 파괴되어 성장이 조금 억제 되었을 거라고 생각되었다.

(a)

(b)

(c)

(d)

Fig. 5. Changes of Titratable acidity in *Tarak* with different vinegar concentration at 37°C for 24 hr. (a) vinegar 0%, (b) vinegar 0.1%, (c) vinegar 0.3%, (d) vinegar 0.5%

발효 과정 중 젖산균의 변화를 측정하여 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 전체 처리구에서 8 시간 이내에 젖산균이 급격히 성장하였다. 중탕으로 열처리한 우유에서의 젖산균이 높게 측정되어 성장이 원활히 일어남을 알 수 있었다. 생우유에서의 젖산균의 성장이 다소 낮은 것으로 나타났지만 열처리한 우유와 차이는 크지 않은 것으로 나타났다.

(a)

(b)

(c)

(d)

Fig. 6. Changes of lactic acid bacteria count in *Tarak* with different vinegar concentration at 37°C for 24 hr. (a) vinegar 0%, (b) vinegar 0.1%, (c) vinegar 0.3%, (d) vinegar 0.5%

발효 과정 중 효모의 균수를 측정하여 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 효모는 젖산균과는 달리 초기의 균수가 높게 나타났는데, 이는 10% 정도 첨가된 막걸리에서 기인하였다고 생각되었다. 젖산균은 우유 처리 조건에 따라 효모수에서 커다란 차이를 나타내지 않았다. 따라서 타락에 존재하는 효모는 막걸리에서 높은 균수로 유입되며 이후 3~4 log 수준의 성장이 발생함을 알 수 있었다. 이렇게 성장된 효모는 타락에서 알코올을 생성하여 독특한 향을 나타내는데 관여할 것이라고 생각되었다.

(a)

(b)

(c)

(d)

Fig. 7. Changes of yeast count in *Tarak* with different vinegar concentration at 37°C for 24 hr. (a) vinegar 0%, (b) vinegar 0.1%, (c) vinegar 0.3%, (d) vinegar 0.5%

나) 식초첨가량에 따른 타락 제조 특성

식초첨가량이 타락 제조에 미치는 영향을 파악하기 위하여 끓인 우유, 중탕우유, 생우유에 식초 첨가량을 달리하는 데이터로 정리하였다. 먼저, pH에 미치는 영향을 파악하기 위하여 발효과정 중 pH 변화를 측정하여 Fig. 8에 나타내었다. 모든 처리구에서 식초를 첨가하지 않은 처리구의 pH가 다른 것에 비하여 높게 유지되는 것으로 나타났다. 식초는 처리 농도에 관계없이 식초가 첨가된 처리구는 유사하게 pH가 저하되는 특성을 나타내었다.

(a)

(b)

(c)

Fig. 8. Changes of pH in *Tarak* with different vinegar concentration at 37°C for 24 hr.

(a) 80°C 끓인 우유, (b) 중탕한 우유, (c) 생우유

발효과정 중 끓인 우유, 중탕 우유, 생우유에 식초 첨가량을 달리하였을 경우 산도의 변화를 측정하여 그 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 식초 첨가량이 높을수록 산도가 높은 경향을 나타내었다. 식초를 첨가하지 않은 처리구와 0.1% 첨가한 처리구는 다른 처리구에 비하여 낮은 산도를 나타내었다.

(a)

(b)

(c)

Fig. 9. Changes of Titratable acidity in *Tarak* with different vinegar concentration at 37°C for 24 hr. (a) 80°C 끓인 우유, (b) 중탕한 우유, (c) 생우유

발효과정 중 젖산균의 변화를 측정하여 그 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 80°C에서 열처리한 우유의 경우 초기 3 log 수준의 젖산균이 존재하다가 발효시간이 경과됨에 따라 급격하게 젖산균수가 증가되었다. 식초 첨가량이 높을수록 젖산균이 높게 측정되었다. 50°C에서 중탕한 우유의 경우 식초 첨가량에 무관하게 젖산균이 증가하는 것으로 나타났다. 생우유의 경우 식초 첨가량이 높을수록 젖산균이 높게 나타나는 경향이 있었다.

(a)

(b)

(c)

Fig. 10. Changes of lactic acid bacteria count in *Tarak* with different vinegar concentration at 37°C for 24 hr. (a) 80°C 끓인 우유, (b) 중탕한 우유, (c) 생우유

발효과정 중 효모의 변화를 측정하여 그 결과를 Fig. 11에 나타내었다. 효모는 젖산균에 비하여 초기에 높은 균수를 나타내어 6~7 log 수준의 균수를 나타내었으며 이후 발효시간에 따라 계속적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 80°C에서 열처리한 우유의 경우 식초 첨가량에 따라 균수의 차이가 크지 않았으며 특히 발효 중후기에는 거의 차이가 없는 것으로 나타났다. 다른 우유 처리구도 비슷한 양상을 나타내었다. 발효말기인 24시간 쯤에는 효모수가 감소하는 경향을 나타내었다.

(a)

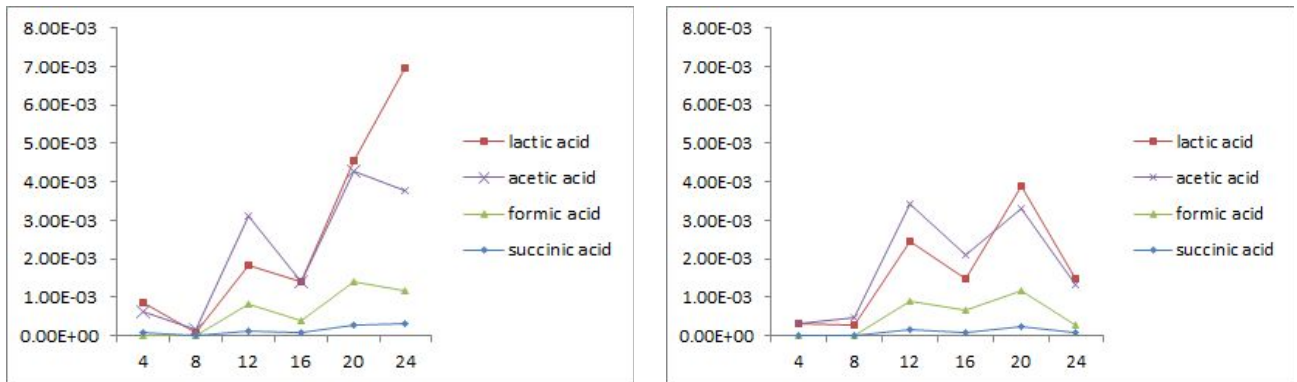
(b)

(c)

Fig. 11. Changes of yeast count in *Tarak* with different vinegar concentration at 37°C for 24 hr. (a) 80°C 끓인 우유, (b) 중탕한 우유, (c) 생우유

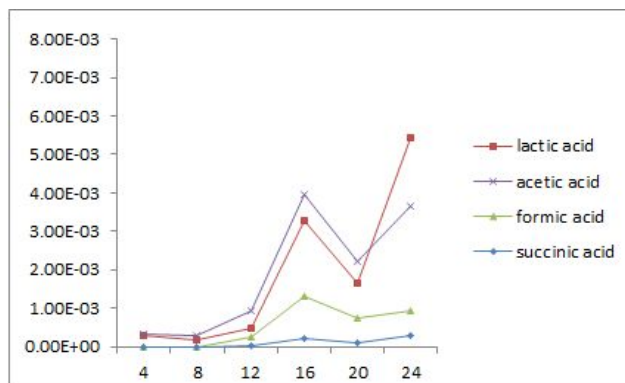
다) 타락 제조 방법에 따른 유기산 생성

데운 우유에 vinegar 0.1 %, 0.3 %, 0.5 %첨가하여 제조한 타락의 유기산 분석결과 주로 lactic acid, acetic acid가 검출되었으며 미량의 succinic acid, formic acid도 검출되었다. 이것은 타락의 젖산발효가 정상형(homo type)과 이상형(hetero type) 정상 발효가 혼합된 형태로 이루어져 다양한 젖산균이 작용하였음을 알 수 있었다.



(a)

(b)

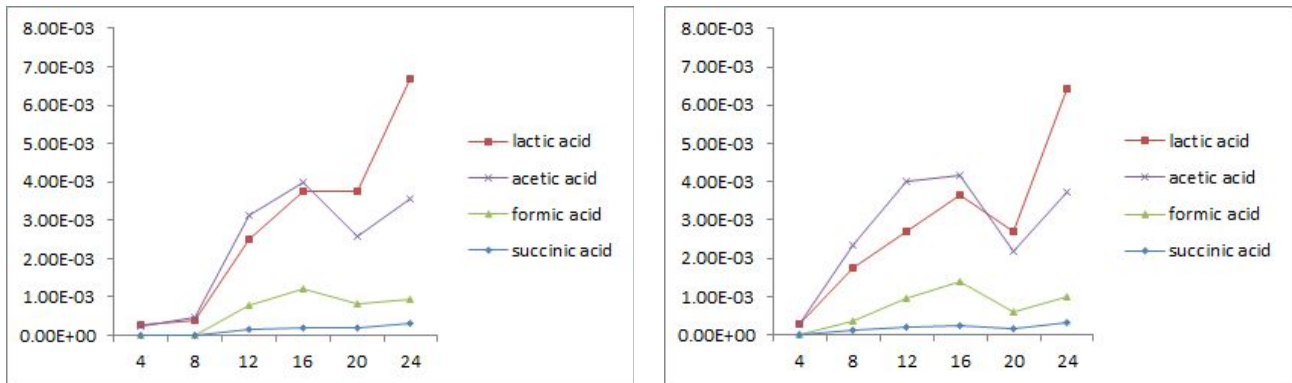


(c)

Fig 12. Changes of organic acid in *Tarak* with different vinegar concentration at 37°C for 24 hr. (a) 80°C boiled milk with vinegar 0.1 %, (b) 80°C boiled milk with vinegar 0.3%, (c) 80°C boiled milk with vinegar 0.5 %.

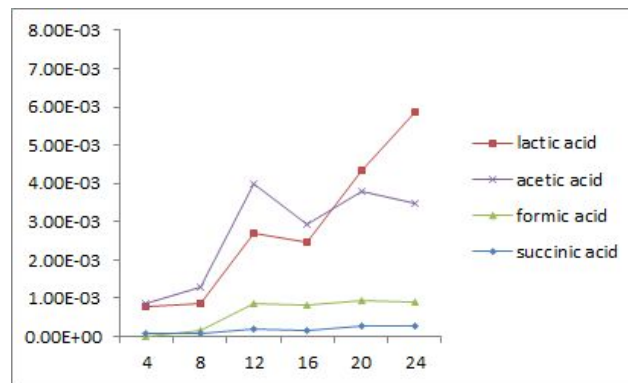
Table 6.에서 우점균을 보면 *Lactobacillus paracasei* 인데 이 균은 정산젖산발효를 하는 것으로 알려져 있으나 그 이외의 균에 의해 acetic acid를 비롯한 젖산 이외의 유기산도 생성하는 것으로 생각되며 식초 0.1% 첨가시 24시간 시점에 가장 높은 젖산생성을 나타내었다.

중탕우유에서도 마찬가지로 lactic acid와 acetic acid가 주로 검출되었다. 분석결과 식초 0.1% 첨가시 가장 높은 젖산 생성률을 보임을 알 수 있었다.(Fig 13)



(a)

(b)



(c)

Fig 13. Changes of organic acid in *Tarak* made with 50°C boiled milk added vinegar concentration at 37°C for 24 hr. (a) 50°C bathed milk with vinegar 0.1 %, (b) 50°C bathed milk with vinegar 0.3%, (c) 50°C bathed milk with vinegar 0.5 %.

생우유에서도 같은 결과를 나타내 Lactic acid, acetic acid가 타락의 주요 유기산을 구성하였음을 알 수 있었고 이는 주 발효균인 *Lactobacillus paracasei*의 영향과 부 발효균들의 이상 발효에 의한 결과와 동시에 첨가된 식초에 의한 영향임을 알 수 있었다. 0.3% 첨가한 경우 젖산 생성량이 가장 많았다. (Fig 14)

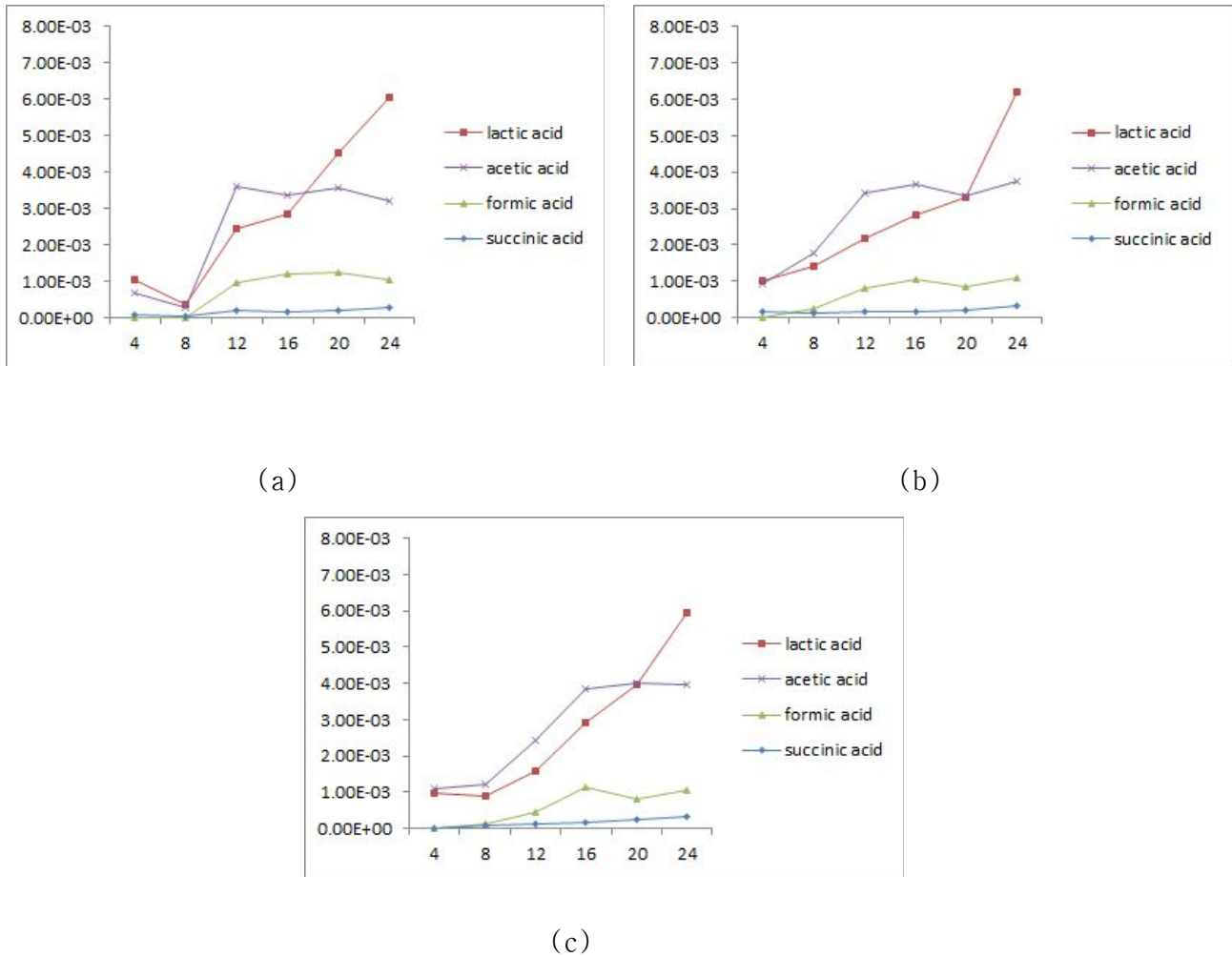
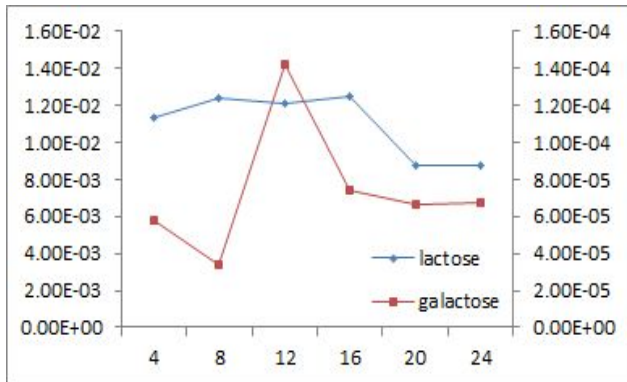


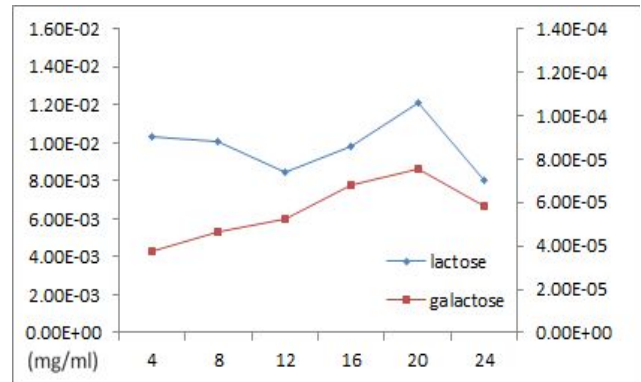
Fig 14. Changes of organic acid in *Tarak* made with raw milk added vinegar concentration at 37°C for 24 hr. (a) raw milk with vinegar 0.1 %, (b) milk with vinegar 0.3%, (c) milk with vinegar 0.5 %.

라) 유리당 분석에 따른 타락 제조 특성

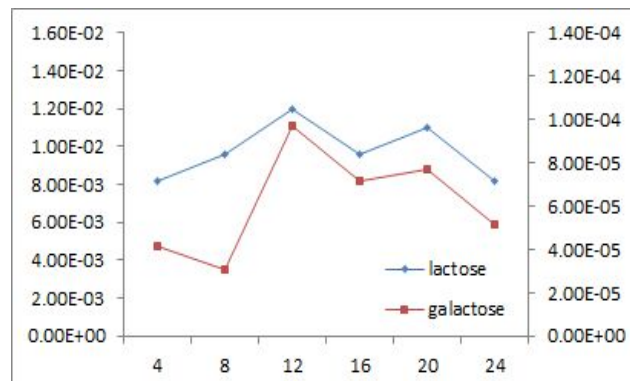
타락의 유리당 분석결과 우유 처리 방법에 따라 크게 차이를 보이지는 않았다. 검출된 당은 lactose와 galactose 였으며 galactose는 발효의 경과와 더불어 검출량이 증가 되어 lactose가 분해되어 glucose는 미생물에의 이용되었고 galactose 만이 검출된 것으로 생각되었다. 식초양에 따른 당의 변화 양상은 0.1 %, 0.3 %, 0.5% 첨가구에서 비슷한 경향을 보였다.



(a)



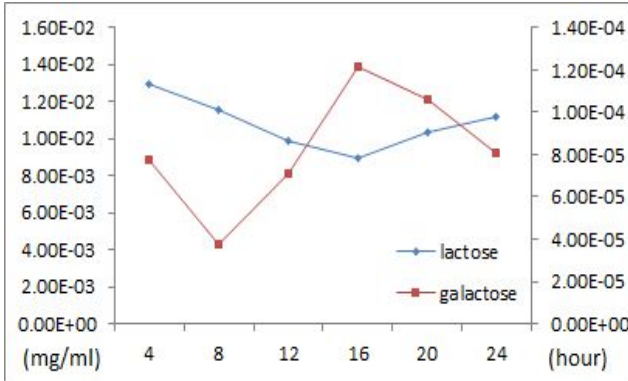
(b)



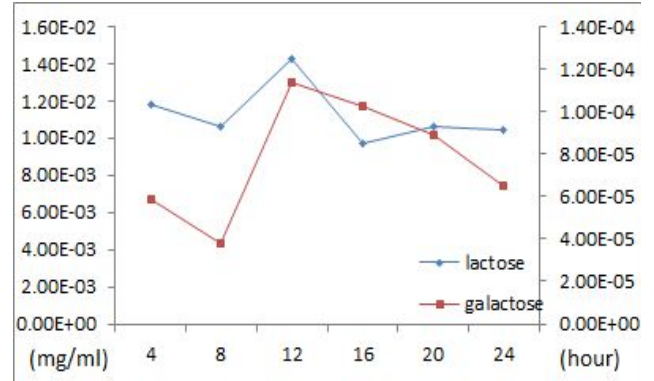
(c)

Fig 14. Changes of free sugar in *Tarak* made with 80°C boiled milk added vinegar concentration at 37°C for 24 hr. (a) 80°C boiled milk with vinegar 0.1 %, (b) 80°C boiled milk with vinegar 0.3%, (c) 80°C boiled milk with vinegar 0.5 %.

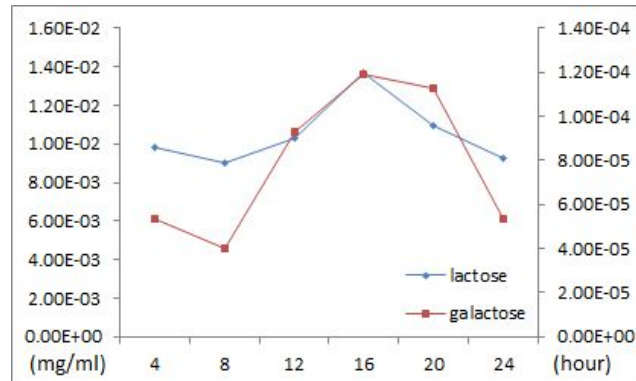
중탕우유로 만든 타락에서는 끓인 우유와 유리당의 변화 양상은 큰 차이를 보이지 않고 lactose가 주된 당이며 발효의 경과와 더불어 감소되며 이에 반비례하여 galactose 함량이 증가 되는 양상을 보였다. 식초 첨가량에 따른 큰 차이는 없었다.(Fig 15)



(a)



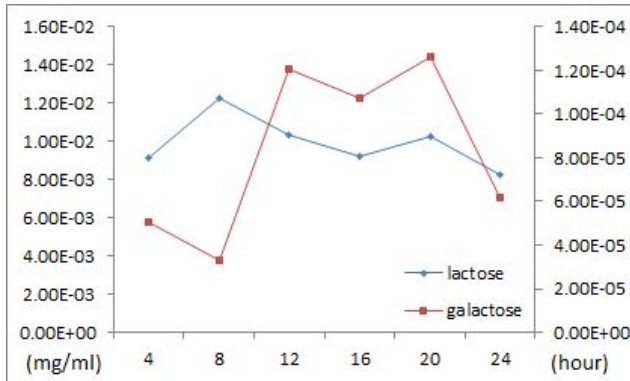
(b)



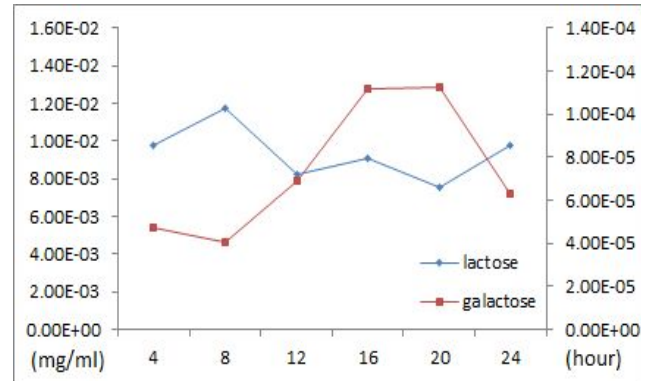
(c)

Fig 15. Changes of free sugar in *Tarak* with different vinegar concentration at 37°C for 24 hr. (a) 50°C bathed milk with vinegar 0.1 %, (b) 50°C bathed milk with vinegar 0.3%, (c) 50°C bathed milk with vinegar 0.5 %.

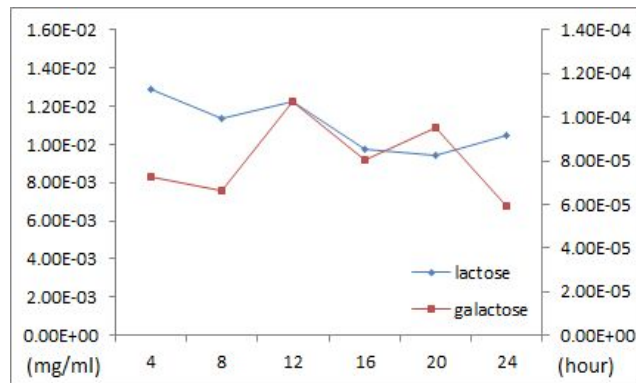
생우유로 만든 타락에서도 유리당은 다른 두 처리구인 중탕우유 끓인 우유와 비슷한 변화 양상을 보였다. (Fig 16)



(a)



(b)



(c)

Fig 16. Changes of free sugar in *Tarak* with different vinegar concentration at 37°C for 24 hr. (a) milk with vinegar 0.1 %, (b) milk with vinegar 0.3%, (c) milk with vinegar 0.5 %.

마) 관능검사에 의한 타락 최적 발효조건 설정

우유의 열처리 방법 및 식초 첨가량을 달리하여 타락을 제조하여 관능검사를 실시하여 최적 발효조건을 설정하고자 하였다. 모든 처리구에 과숙성된 막걸리는 10% 첨가하여 제조하였으며 온도는 37°C를 유지하여 발효시켰다. 그 결과 12종의 타락을 제조하였으며 생성된 타락에 대하여 전체적인 기호도에 대해서만 7점 평점법으로 관능검사 실시하여 최적 타락 발효조건을 설정하였다. 80°C로 끓인 우유의 경우 식초를 첨가하지 않은 처리구는 3.65의 기호도를 나타내었다. 식초를 0.1% 첨가한 처리구가 가장 높은 기호도를 나타내어 4.36을 나타내었다. 0.3% 첨가한 처리구는 4.29를 나타내어 2번째로 기호도가 높게 나타났다. 식초의 양을 0.5%로 증가시킨 처리구는 3.74를 나타내어 식초 첨가량이 증가할 수록 기호도가 감소하는 효과가 있었다. 우유를 50°C로 중탕한 처리구의 경우 식초를 첨가하지 않은 처리구가 4.35의 기호도를 나타내었으며 0.1% 첨가한 처리구가 5.13의 기호도를 나타내어 전체 처리구중 가장 높은 기호도를 나타내었다. 식초를 0.3% 첨가한 처리구도 5.07을 나타내어 타 처리구에 비하여 높은 기호도를 보였다. 역시 식초 첨가량이 증가할 수록 관능적 기호도는 감소하여 0.5% 첨가 처리구는 4.84의 기호도를 나타내었다. 생우유에 식초를 첨가한 처리구는 80°C에서 끓인 우유에 비해서는 높은 기호도를 나타내었으며 50°C 중탕한 우유에 대해서는 낮은 기호도를 나타내었다.

Table 4. 최적 발효조건 설정을 위한 관능검사 결과

	0%	0.1%	0.3%	0.5%
80°C 끓인 우유	3.65	4.36	4.29	3.74
50°C 중탕 우유	4.35	5.13	5.07	4.84
생우유	3.24	4.76	4.81	4.52

따라서 막걸리를 이용한 타락제조 최적 조건으로는 과숙성된 막걸리를 사용, 50°C로 우유를 중탕하여 사용, 식초는 0.1% 첨가하여 37°C에서 숙성 발효 시키는 것이 가장 좋은 타락 제조조건이라고 파악되었다.

4) 유용 미생물 분리를 위하여 타락을 수집, 타락의 발효우점균 파악을 위한 미생물 균총 분석

유용 미생물 분리를 위한 기초자료를 확보하기 위하여 안동지방에서 수집한 타락(n)과 n+1 타락에 대한 미생물 균총 분석(microbial community analysis)을 실시하였다. MCA는 pylosequencing 기술을 이용하여 실시하였다. 2개의 샘플로부터 얻은 염기서열(total reads)의 수는 본타락과 n+1 타락이 각각 2,168, 5,316개였으며 염기서열의 길이는 300~517 bp이었으며 각각의 평균 염기서열 길이는 본타락이 463 bp, 제조된 타락이 477 bp였다. Rarefaction curve를 봤을 때 n+1 타락의 경우 곡선이 plateau에 도달하였으나 본타락은 plateau에 도달하지 못하였다. OTUs는 본타락에서 84개로 나타났으며 제조된 타락에서는 33개로 나타났다. 이결과는 ACE, Chao1, Shannon등의 다른 diversity index의 분석결과와 유사하게 나타났다. 본타락과 제조된 타락의 OTUs와 diversity index를 비교해 봤을 때 본타락이 제조된 타락에 비해서 diversity가 모든 index에서 높은 수준으로 나타났다. 이것은 본타락의 미생물 군집이 본타락을 스타터로 사용하여 제조된 n+1 타락보다 더 복잡한 것을 의미한다.

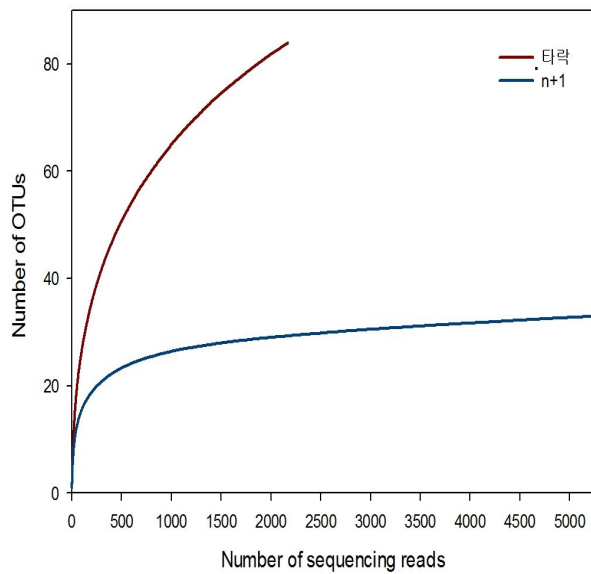


Fig. 17. Rarefaction curves of OTUs for *Tarak* samples

Table 5. Bacterial diversity indices of each *Tarak* samples

Sample	Total reads	OTUs	Ace	Chao1	JackKnife	Shannon	Simpson	Goods Lib. Coverage
타락	2168	84	132	106	110	3.05	0.08	98.8%
n+1	5316	33	42	38	38	2.32	0.15	99.9%

Phylum 수준에서는 본타락과 n+1 타락 모두 *Firmicutes*가 균집의 대다수를 차지하는 것으로 나타났다. 그러나 본타락에서는 *Firmicutes* 이외에도 *Streptophyta*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*와 *Actinobacteria*가 나타났지만 n+1 타락에서는 *Firmicutes*가 99%이상 차지하였고 *Proteobacteria*가 소수 나타났다. Genus 수준에서는 본타락과 n+1 타락의 차이가 더욱 더 크게 나타났다.

본타락에서는 *Lactobacillus*와 *Leuconostoc*속이 균집의 90% 이상을 차지하는 것으로 나타난 것에 비해 n+1 타락에서는 *Lactococcus*속이 60% 이상을 차지하는 것으로 나타났다. Species 수준에서 고찰하면 본타락과 n+1 타락의 미생물 균집 차이가 더욱 달라지는 것을 알 수 있었는데 본타락의 경우 *Leuconostoc citreum*이 40% 이상으로 나타나며 우점균으로 나타났으며 이밖에도 *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*와 *Lactobacillus graminis*등의 *Lactobacillus*속의 균주들이 다수를 차지하는 것으로 나타났다.

이에 비해 n+1 타락에서는 *Lactococcus lactis*가 미생물 균집 비율의 60%이상을 차지하며 우점균으로 나타났으며 대다수의 균이 *Lactococcus*속으로 나타났다. 또한 본타락에서 나타났던 *Lactobacillus*속 균주들의 대다수가 크게 감소하였거나 나타나지 않았으며 특히 본타락에서 20% 이상을 차지하던 *Lactobacillus pentosus*는 나타나지 않는 것으로 나타났다. 또한 본타락에서 40% 이상을 차지하여 우점균으로 나타났던 *Leuconostoc citreum*이 n+1에는 전혀 존재하지 않는 것으로 나타났다. 이에 비하여 *Lactobacillus paracasei*는 본타락에서의 균집 비율에 비해 크게 증가하여 n+1 타락에서는 20% 이상 차지하는 것으로 나타났다.

n+1 타락의 우점균으로 나타난 *Lactococcus lactis*를 비롯한 *Lactococcus*속 균주들은 본타락에서는 나타나지 않았던 균주들인데 이 균주들이 n+1 타락에서 우점균으로 나타났다. 이것은 막걸리로 제조된 본타락의 미생물이 계속적으로 변화될 수 있음을 의미한다. 따라서 타락에 사용된 막걸리의 미생물분포, 사용된 우유의 미생물 분포 및 타락 제조의 관계된 여러 가지 환경적인 조건에 따라 서로 상이한 미생물분포를 가질 것으로 생각되었다.

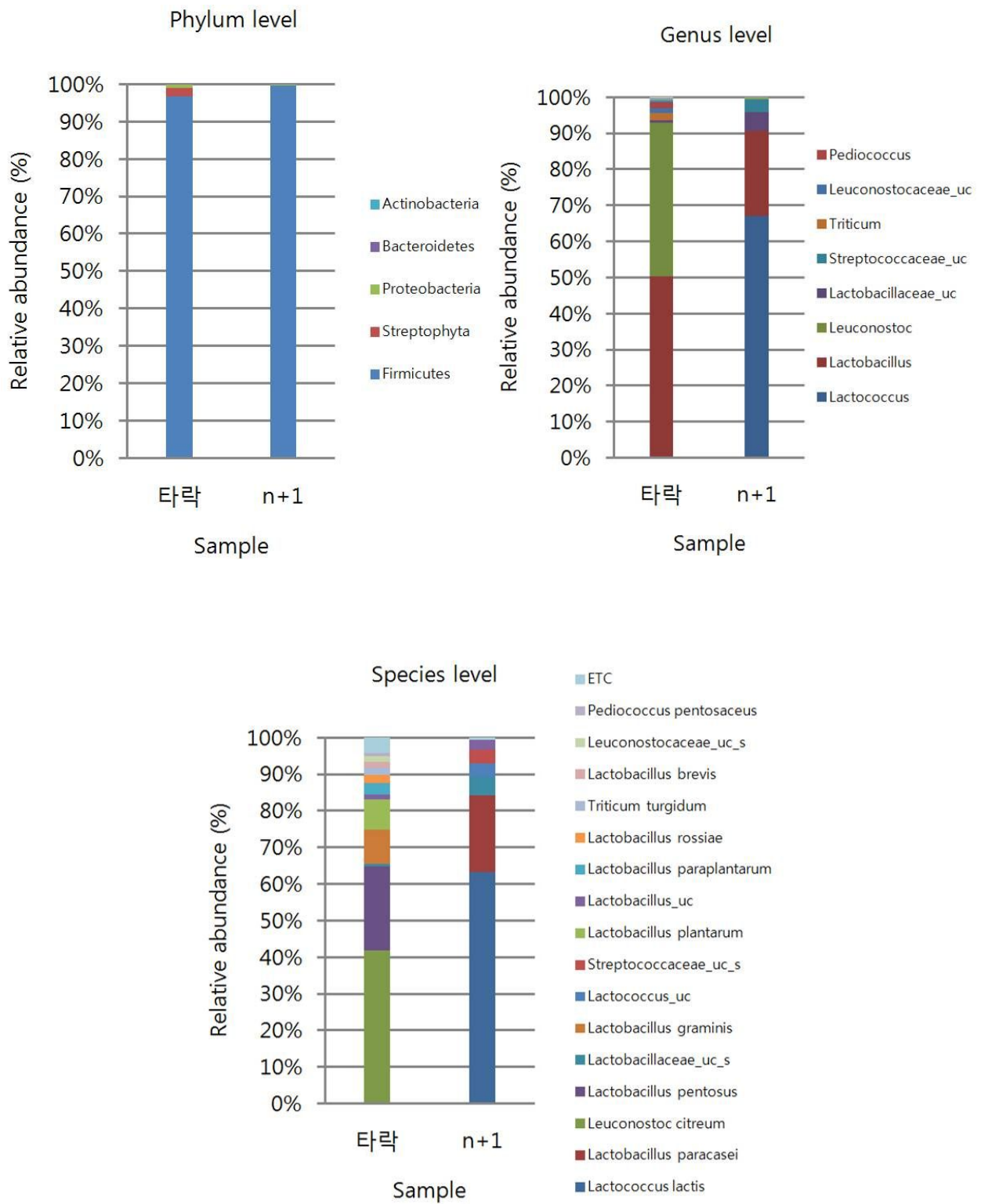


Fig. 18. Relative abundance of each phylum, genus and species level from *Tarak*

5) 우점균 분리, 분리균주를 이용한 타락 제조 및 품질 평가

Microbial community analysis 결과에 의해 우점균을 파악한 후 실험실 배지를 이용하여 우점균을 분리하여 스타터로 활용하고자 하였다. 앞에서 기술한 바와같이 안동에서 수집된 본타락과 n+1 타락에 대한 관능검사 결과, n+1 타락이 우수한 관능적 특성을 나타내었으므로 n+1을 대상으로 젖산균 분리 실험을 실시하였으며 그 결과를 Table 6에 나타내었다.

mRS broth를 이용하여 분리한 젖산균은 총 8종이었으며 이를 순수 분리하여 배양한 후 solvent에 보내 16S rDNA sequencing에 의한 균주 confirmation을 실시하였다. 그 결과 8개의 균주 모두 *Lactobacillus paracasei* 인 것으로 확인되었다. n+1 타락에 대한 MCA 결과에 의하면 가장 우점균은 *Lactobacillus lactics*로 60% 이상을 차지하는 것으로 나타났었지만 흥미롭게도 실험실 배지를 이용하여 분리된 균주는 모두 n+1 타락에서 20% 정도 분포하는 것으로 알려져 있는 *Lactobacillus paracasei*이었다. 또한 PDA를 이용하여 분리된 yeast는 2종이었으며 *Saccharomyces cerevisiae* 이었다.

Table 6. Isolated strains and yeast from *Tarak*

Closest Relative	Acession	Identify(%)
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. tolerans strain NBRC 15906	NR 041054.1	98
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. paracasei strain R094	NR 025880.1	98
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. tolerans strain NBRC 15906	NR 041054.1	97
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. paracasei strain R094	NR 025880.1	97
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. tolerans strain NBRC 15906	NR 041054.1	99
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. paracasei strain R094	NR 025880.1	99
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. tolerans strain NBRC 15906	NR 041054.1	98
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. paracasei strain R094	NR 025880.1	98
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. tolerans strain NBRC 15906	NR 041054.1	97
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. paracasei strain R094	NR 025880.1	97
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. tolerans strain NBRC 15906	NR 041054.1	98
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. paracasei strain R094	NR 025880.1	98
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. tolerans strain NBRC 15906	NR 041054.1	98
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. paracasei strain R094	NR 025880.1	98
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Kyokai	BABQ01000122 .1	99%

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Kyokai	BABQ01000122 .1	99%
--	--------------------	-----

6) 스타터 개발, 동결건조 형태로 제조하여 안정성을 확보

가. 타락에서 분리한 젖산균과 효모를 스타터로 이용하여 타락 제조.

타락에서 분리한 젖산균과 효모를 스타터로 이용하여 타락을 제조하고자 하였다. 젖산균과 효모는 bulk starter의 개념을 도입하여 멸균우유에 성장시켰으며 이를 동결건조 한 후 스타터로 사용하고 싶어 하였다. 우선적으로 젖산균 및 효모가 우유에서 성장하는 패턴을 파악하기 위하여 멸균우유에 젖산균과 효모를 인위적으로 접종시킨 후 성장 pattern을 분석하였다. 젖산균은 초기 4 log 수준으로 접종하였으며 시간이 경과함에 따라 급격히 성장하여 10시간 이후 8 log 수준으로 증가하였다. 효모는 멸균우유에서 성장이 더디게 나타나므로 carbon source로 dextrin을 첨가하여 배양하였다. 효모도 초기 3 log 수준으로 접종하였으며 7 log 수준까지 성장하였다(Fig. 19).

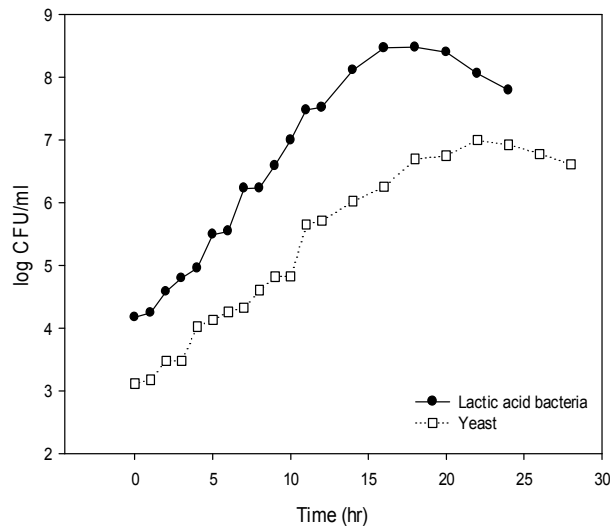


Fig. 19. Growth curves of Lactic acid bacteria and Yeast in sterilized milk at 37°C

타락에서 분리된 젖산균 8종 중에서 6종을 10시간 배양하였으며 이를 동결건조하여 수율을 측정하였다. 동결건조 전에 비하여 무게는 11~12% 정도로 수율이 측정되었으며 균에 대한 수율은 최저 13%에서 최고 71% 까지 나타났다. 효모는 분리된 2균주를 2반복으로 수율을 측정하였다. 효모에 대한 수율은 최저 1%에서 최고 28%로 나타나 prokaryotic인 젖산균에 비하여 낮은 survival ratio를 나타내었다.

Table 7. Yield of lyophilized milk containing lactic acid bacteria and yeast

	동결건조 전		동결건조 후		수율	
	무게 (g)	Cell	무게 (g)	Cell	무게 수율	균 수율
젖산균	21.76	2.5×10^7	2.6	3.6×10^6	12%	14%
	24.09	2.5×10^7	2.85	3.28×10^6	12%	13%
	20.26	2.5×10^7	2.49	1.78×10^7	12%	71%
	24.19	2.5×10^7	2.87	7.8×10^6	12%	31%
	20.31	2.5×10^7	2.5	5.6×10^6	12%	22%
	20.31	2.5×10^7	2.43	1.24×10^7	12%	50%
효모	37.33	1.18×10^7	3.98	3.26×10^6	11%	28%
	38.58	1.84×10^7	4.06	2.78×10^6	11%	15%
	37.02	2.58×10^7	4.12	3.7×10^5	11%	1%
	38.35	1.22×10^7	3.91	3.1×10^5	10%	3%

동결건조한 젖산균과 효모를 0.5%(w/w), 1.0%(w/w)와 2.0%(w/w) 첨가하여 타락을 제조하였다. 동결 건조한 균을 스타터로 사용하여 50°C에서 30분간 중탕한 우유에 0.5%, 1.0%, 2.0% 농도로 접종시키고 식초를 0.1% 첨가하여 타락을 제조하였으며 24시간 동안 4시간 간격으로 타락의 pH, 적정산도, 당도의 변화와 젖산균과 효모의 성장패턴을 측정하였다. 실험결과 스타터를 0.5% 농도로 접종한 처리구에서는 타락이 제조되지 않았으며 1.0% 와 2.0% 농도로 접종한 처리구에서는 타락이 제조되었다. 먼저 이화학적 특성변화를 살펴보면 산도의 변화는 스타터 접종량이 많을수록 빠르게 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 세 처리구 모두 스타터를 접종하지 않은 일반적인 타락의 산도에 비하여 낮은 수준임을 알 수 있었다. pH 변화 역시 산도의 변화와 같은 패턴으로 변하였다. 접종농도가 높을수록 pH 변화가 빠르고 최종 pH 역시 더 낮은 수준을 보였으나 일반적인 타락에 비하여 높은 최종 pH를 보였다. 타락을 제조할 때 막걸리를 사용하여 제조한 타락(막걸리+식초)은 막걸리에 다양한 유산균이 존재하기 때문에 pH 변화가 더 크게 일어나며 스타터를 이용한 타락은 단일 균주만을 이용하였기 때문에 산도와 pH 변화가 일반적인 타락에 비하여 적은 것이라고 생각 되었다. Brix는 발효가 시작될 때 증가하는 것 같았으나 직후 급격하게 감소하였으며 세 처리구 모두 같은 패턴으로 변하였으며 최종 당도 역시 서로 큰 차이가 나지 않았다. 일반적인 방법으로 제조한 타락과 비교 하였을 때도 변화 패턴은 거의 유사하였고 최종 당도역시 1% 정도의 차이밖에 나지 않았다. 젖산균의 변화는 초기에는 접종량과 같은 차이가 있었으나 시간이 지나면서 최종적으로는 모두 8 log CFU/ml 이상 수준까지 증가하였다. 다만 2.0% 접종한 타락이 다른 두 타락에 비하여 젖산균의 농도가 다소 높은 것으로 나타났다. 그러나 효모의 경우 모두 초기 접종량에 비하여 거의 성장하지 않았으며 2.0% 접종한 타락에서만 약 1 log CFU/ml 정도 증가하는 것으로 측정되었다. 이것은 효모가 우유내의 다른 미생물과 비교하였을 때 경쟁력이 떨어지기 때문인 것으로 생각되었다. 또한 우유 내에 효모가 성장하기에 적합한 영양소가 부족한 것 역시 원인으로 생각 할 수 있다. 실제로 멸균우유에 효모를 접종하였을 경우 거의 성장하지 않지만 dextrose를 첨가해 주면 8 log CFU/ml 수준까지 성장하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 스타터를 이용하여 타락을 제조할 경우, 우선 타락 형성에 결정적인 영향을 하는 균주의 선발, 선발된 균주의 적정 균수 농도 조정 등이 필요할 것으로 생각되었다. 따라서 현재의 연구단계에서는 단일 균주를 분리하여 성장시킨 후 starter로 사용하는 것 보다는 타락 전체를 동결건조하여 스타터로 활용하거나 관여 균을 멸균우유에 성장시켜 전체를 동결건조하여 starter로 사용하는 bulk starter로 접근하는 것이 바람직하다고 생각되었다.

a)

b)

c)

d)

e)

Fig. 20. Physicochemical and microbiological properties during *Tarak* fermentation by
bulk stater

a) pH, b) titratable acidity, c) Brix, d) lactic acid bacteria, e) yeast

나. Bulk starter를 이용한 타락의 제조

50°C로 우유를 중탕한 우유에 과 숙성된 막걸리 0.1%의 식초를 첨가하여 37°C에서 24시간 동안 숙성발효시킨 타락을 동결건조하여 bulk starter를 제조하였다. 이 bulk starter를 (a) 1.0% bulk starter (b) 1.0% bulk starter and 0.1 % vinegar (c) 1.5% bulk starter (d) 1.5% bulk starter and 0.1 % vinegar 0.1% 첨가하여 타락을 제조하여서 4시간 간격으로 타락의 pH, 적정산도, 점도의 변화를 보고 이 후 (a) 1.0% bulk starter (c) 1.5% bulk starter를 제조하여 4시간 간격으로 타락의 pH, 적정산도의 변화와 젖산균과 효모의 성장패턴을 측정하였다.

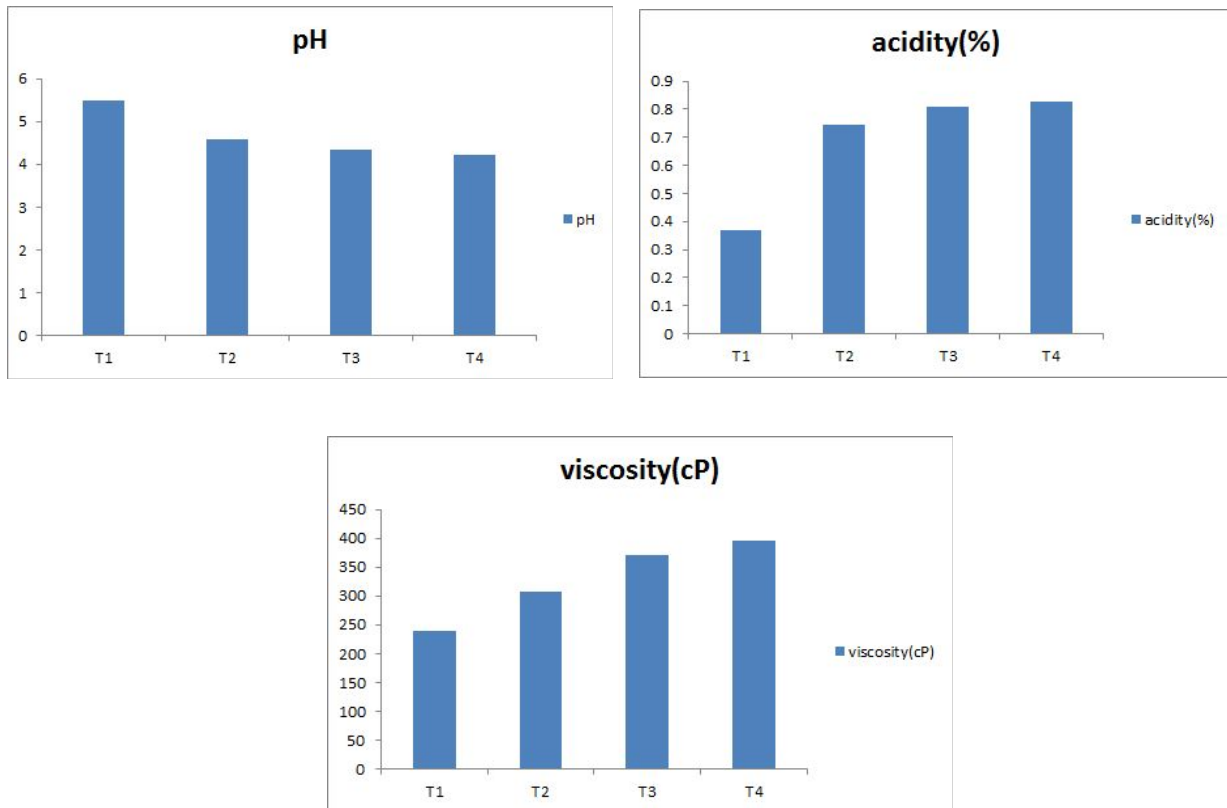
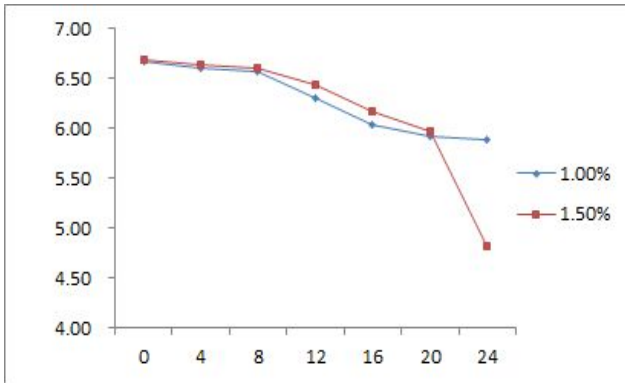
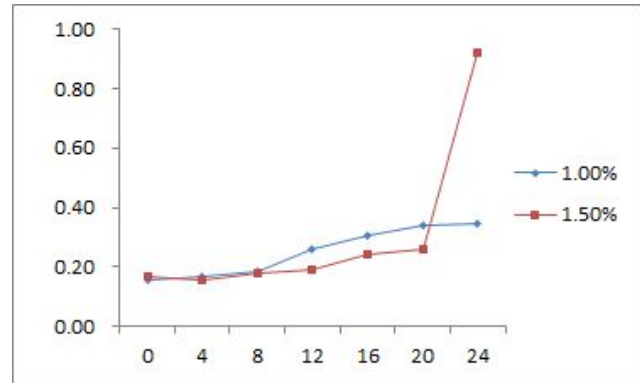


Fig 21. Changes of pH, acidity and viscosity in *Tarak* with different bulk starter and vinegar concentration at 37°C for 24 hr. (T1) 1.0% bulk starter (T2) 1.0% bulk starter and 0.1 % vinegar (T3) 1.5% bulk starter (T4) 1.5% bulk starter and 0.1 % vinegar

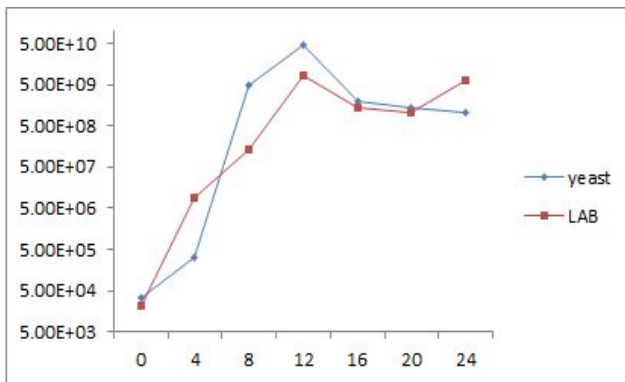


(a)

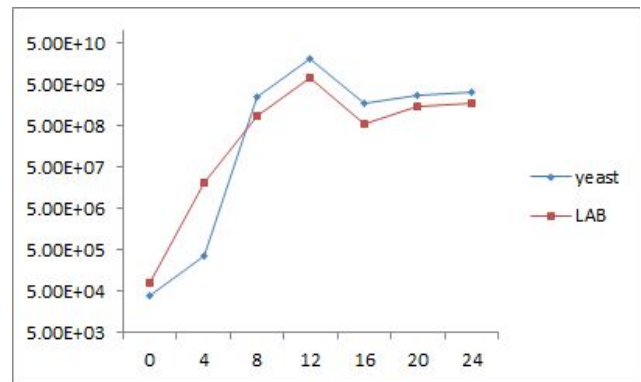


(b)

Fig 22.Changes of pH and acidity in *Tarak* with different bulk starter concentration at 37°C for 24 hr. (a) 1.0% bulk starter (b) 1.5% bulk starter



(a)



(b)

Fig 23. Changes of yeast and LAB(Lactic acid bacteria) in *Tarak* with different bulk starter concentration at 37°C for 24 hr. (a) 1.0% bulk starter (b) 1.5% bulk starter

7) 요약

막걸리를 이용한 타락을 제조하는 최적 조건으로는 50°C로 우유를 중탕하고 식초를 0.1% 첨가한 후 과숙성된(30°C, 4일 숙성) 막걸리를 10% 첨가하여 37°C에서 숙성 발효하는 것이었다. 이 때 사용한 막걸리는 서울 장수막걸리(알콜도수 6%)였으며, 식초는 현미식초(오뚜기:산도 6~7%)를 사용하였다. 최적 조건으로 생산된 타락은 2, 3과제의 연구수행을 위하여 지속적으로 생산 및 공급되었다.

Microbial community analysis 분석 결과 타락과 n+1 타락의 미생물조성이 매우 상이하게 나타났으며 본타락(n)이 n+1 타락에 비하여 미생물군집이 복잡함을 알 수 있었다. n+1 타락에서의 우점균은 *Lactococcus lactis*(60%)와 *Lactobacillus paracasei*(20%)이었다. 분리된 젖산균과

효모를 이용하여 타락을 제조하였을 경우 타락이 제조되었지만 막걸리로 제조된 타락과는 약간의 차이가 있었다.

II 제 2 세부과제: 전통발효유 타락의 *in vitro* 기능성 검증

I. 연구방법

1) 전통 발효유 타락의 추출물 제조 및 계통 분획

가. 제 1세부 과제에서 제조한 전통발효유 타락의 용매분획 조건은 Fig. 1과 같다.

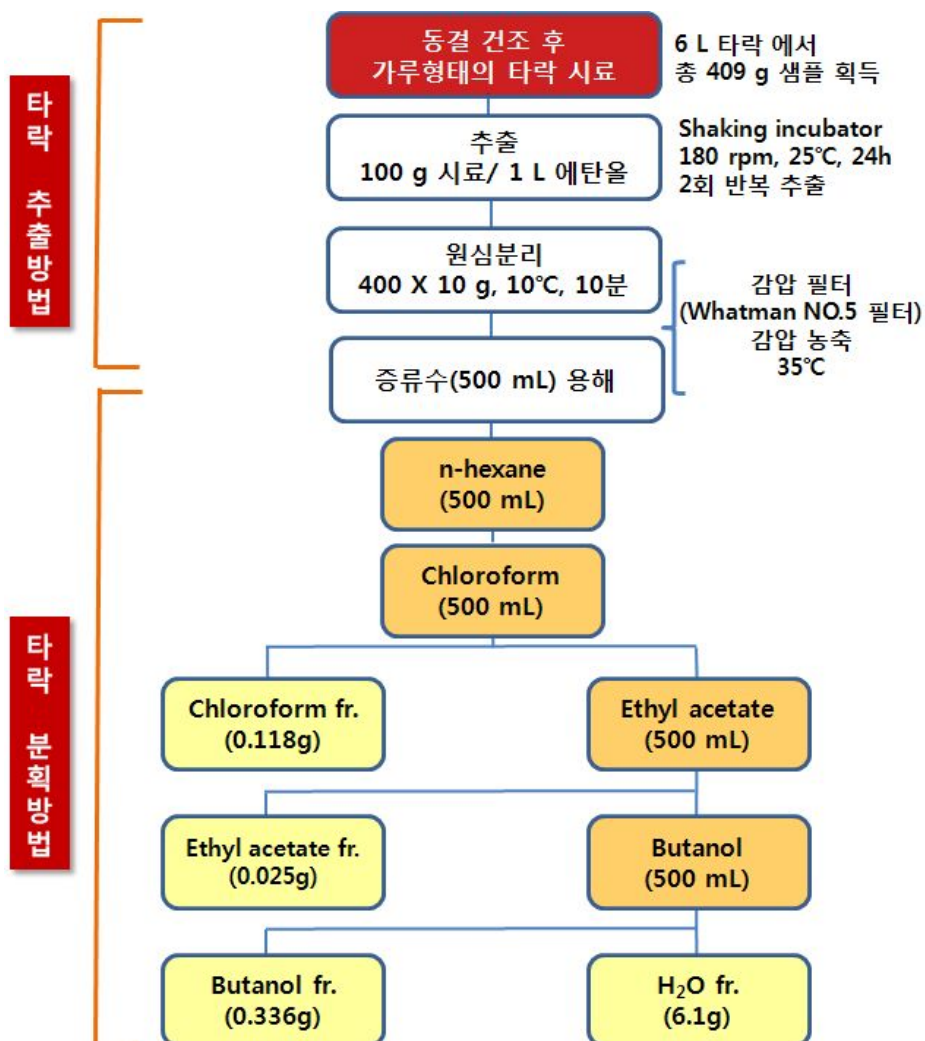


Fig. 1. 전통발효유 타락의 추출, 용매별 분획

약 6 L의 타락을 동결건조 하여 약 409 g 정도의 분말 시료를 얻었다. 100 g 시료 당 1 L의 에탄올을 가한 후 shaking incubator을 이용하여 24 시간동안(25°C, 180 rpm) 추출을 진행

하였다. 시료로부터 에탄올을 제거한 후 용매의 극성을 변화시키며 용매 분획을 실시하였다. n-hexane 층에 용해된 분획은 대부분 지방으로서 제거하였으며 chloroform, ethyl acetate, butanol, water 층으로 분획하여 시료를 회수하였다.

나. 타락 용매추출 분획

Fig. 1.에서 제시한 방법으로 용매추출을 실시하고 각 용매분획의 수율을 최초 타락 시료 무게를 기준으로 산출한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. 타락 용매 분획물의 수율

Fraction	Weight	Yield(%)
Chloroform	0.118	0.059
Ethyl acetate	0.025	0.125
Butanol	0.336	0.168
Water	6.1	3.5

2) 항산화 활성 분석

가. DPPH 라디칼 소거능

시료의 DPPH 라디칼 소거능은 Blois(1958)의 방법을 이용하여 stable 라디칼인 DPPH(2,2-diphenylpicrylhydrazyl)에 대한 시료의 환원력을 측정하였다. 에탄올 100 mL에 DPPH 16 mg을 용해한 후, 여과지로 여과하여 DPPH 라디칼 용액 제조한다. 제조한 DPPH 라디칼 용액 0.8 mL에 에탄올 적당량을 가하여 spectrophotometer의 흡광도 값이 0.95-0.99가 되도록 조정하였다. 에탄올에 용해된 시료 0.2 mL에 DPPH 라디칼 용액 0.8 mL을 가하고 37°C 항온수조에 10분간 방치한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 용액과 동일한 양의 에탄올을 사용하였으며 다음의 식을 이용하여 DPPH 라디칼 소거능을 계산하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = (1 - \text{시료의 흡광도} / \text{대조군 흡광도}) * 100$$

나. ABTS 라디칼 소거능

시료의 ABTS 라디칼 소거능은 Kim et al.(2002)의 방법을 실시하였다. 1.0 M AAPH(2,2'-

axovis-(2-amidinopropane) HCl)와 2.5 mM ABTS(2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)를 PBS(Phosphate buffered saline) buffer에 용해하고 암소에서 24시간 방치하여 ABTS 라디칼 형성하였다. 제조한 ABTS 라디칼 용액 980 uL에 시료 20 uL을 넣고 37°C 항온수조에 10분간 방치한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 용액과 동일한 양의 PBS buffer를 사용하였으며, 다음의 식을 이용하여 ABTS 라디칼 소거능을 계산하였다.

$$\text{ABTS radical 소거능(\%)} = (1 - \text{시료의 흡광도} / \text{대조군 흡광도}) * 100$$

3) 항고혈압 및 지방분해 억제활성 분석을 위한 시료의 제조

항고혈압 효과의 분석을 위한 시료는 Fig. 2와 같이 준비하였다. 타락 500 g을 5,000 x g, 4°C에서 30분간 원심분리하여 상정액을 얻었다. 상정액의 pH를 7로 조정 한 후 200 X 10 g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 얻은 상정액을 동결 건조하여 시료로 사용하였다.



Fig. 2. 항고혈압 및 지방분화 억제 활성 분석을 위한 시료의 제조

4) 항고혈압 효과 분석 (Angiotensin converting enzyme inhibitory activity)

Cushman and Cheung(1971)의 방법에 따라 체내 혈압 상승에 관여하는 angiotensin converting enzyme(ACE)의 억제 효과를 분석하여 항고혈압 효과를 측정하였다. 효소활성은

0.3 M NaCl이 포함된 sodium borate buffer(pH 8.3, 50 mM)에 기질로서 Hippuryl-Histidyl-Leucine(5 mM, 400 uL)과 sodium borate buffer(60 uL)를 섞은 후 시료 40 uL를 혼합하였다. 반응용액에 ACE 효소 40 uL(0.25 unit/mL)를 첨가한 후 37°C에서 40분간 반응시켰으며 1 M HCl 250 uL를 첨가하여 반응을 종료하였다. 반응종료 후에는 ethyl acetate 1.7 mL을 가하고 원심분리하여 상정액을 회수하였으며 용매를 휘발시키고 증류수 1 mL에 재용해 시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 계산식으로 ACE 저해율을 구하였다

$$\text{ACE-inhibitory activity(\%)}=[1-(C-D)/(A-B)]*100$$

A: control의 흡광도, B: control의 대조구 흡광도, C: 시료의 흡광도, D: 시료 대조구의 흡광도

5) 지방분화억제 효과 분석

가. 지방세포의 분화

3T3-L1 지방전구세포(60-70% confluent)에 trypsin-EDTA을 처리하여 세포를 회수한 후, 6 well plate에 세포의 농도가 8×10^4 cell/well이 되도록 접종하였다. 약 3일 후 세포가 완전히 증명한 상태일 때, 3T3-L1 세포에 10% fetal bovine serum(FBS, WelGeNe), 1 μ M dexamethasone(Dex, Sigma), 0.5 mM isobutyl methylxanthine(IBMx, Sigma), 1 μ g/mL insulin(Sigma), 100 μ g/mL penicillin-streptomycin을 넣은 DMEM으로 지방세포 분화를 유도하였다(0 day). 세포 분화 후에는 10% FBS, 1 μ g/mL insulin, 100 μ g/mL penicillin-streptomycin을 넣은 DMEM으로 분화 상태를 유지하였으며(2 day) 세포 분화 후 일정 농도의 폴리감마글루탐산을 처리하여 지방세포 증식과 분화에 미치는 효과를 측정하였다.

나. 지방세포의 생존율 측정 (MTT assay)

3T3-L1 세포를 96 well 배양판에 5×10^3 cell/well이 되도록 접종하였다. 하루 경과 후 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT, sigma, 1.2 mg/mL) 용액을 100 μ L씩 첨가하여 37°C에서 3시간 반응 후 배지를 제거하였다. Formazan crystal을 용해시키기 위하여 DMSO 200 μ L를 첨가하고 10분 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며 다음의 식으로 세포생존율을 측정하였다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = (\text{시료의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도}) \times 100$$

다. 지방세포의 지방구 생성 억제 효과 (Oil-Red O staining)

Ramirez-Zacarias et al.(1992)의 방법에 따라 Oil red O로 지방구를 염색하여 시료의 3T3-L1 성숙지방세포 분화 억제 효과를 측정하였다. 염색을 위하여 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 후, 10% formalin로 고정시킨 세포에 Oil red O 용액을 첨가하여 상온에서 10분간 염색하였다. 염색 직후 증류수로 세척한 후 역상현미경으로 세포를 관찰하였으며 isopropanol로 지방에 염색된 Oil red O를 용출시켜 spectrophotometer를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 중성지방 축적량은 다음의 식으로 백분율로 표현하였다.

$$\text{중성지방의 축적량(\%)} = (\text{시료의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도}) \times 100$$

라. 지방분화 관련 전사인자 발현에 미치는 효과

지방 분화에 중요한 역할을 담당하는 전사인자에 대한 개요는 Fig. 3과 같다. 3T3-L1 지방세포로부터 total RNA를 분리 후 약 2 µg을 cDNA kit(Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 cDNA 용액을 합성하고 real-time PCR을 실시하였다. 100 ng 의 cDNA를 TaqMan® Gene Expression Master Mix(Applied Biosystems, Foster City, CA)으로 총 20 µL로 정용한 후, StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, C)을 이용하였다. 반응조건은 pre-denaturation: 95°C 10분 , cycling stage: 95°C 15초, 60°C 1분 amplification cycle 40회를 반복 수행하는 것으로 설정하였으며 Table 1과 같은 primer를 사용하였다. Taqman probe의 reporter dye로는 5'에 6-carboxyfluorescein (FAM), quencher dye로는 TAMRA quencher를 3'에 사용하였으며 내부표지인자 유전자인 β-actin을 사용하여 comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)로 타겟 유전자의 mRNA 함량을 분석하였다.

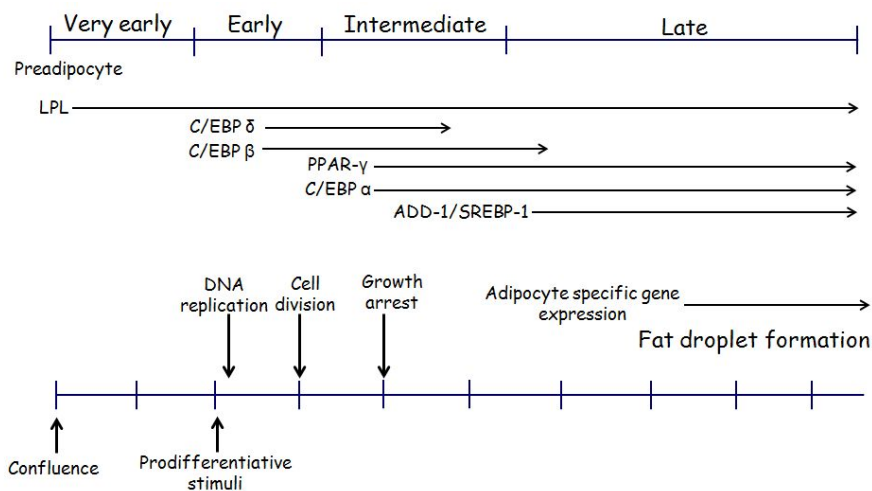


Fig. 3. 3T3-L1 지방전구세포의 분화에 영향을 미치는 전사인자들(Jazet et al., 2003)

Table 1. 본 연구에 사용한 TaqMan® 유전자 발현분석

Gene symbol	Assays ID	Gene names
Actb	Mm00607939_s1	beta-actin
pparg	Mm01184322_m1	peroxisome proliferator activated receptor gamma
Srebf1	Mm00550338_s1	sterol regulatory element binding transcription factor-1
Cebpa	Mm00514283_s1	CCAAT/enhancer binding protein, alpha

마. Triglyceride(TG) 축적 저해 효과

시료 처리에 따른 지방세포내의 총 중성지방의 축적 정도를 알아보기 위해 triglyceride quantification kit(Takara Bio Inc, Otsu, Japan)을 이용하여 측정하였다. TG 축적량은 단백질 양을 측정하여 nmol/mg protein 으로 표현하였다.

6) 항염증 활성 분석을 위한 시료의 제조

주관연구기관에서 제조한 발효 3일이 경과한 타락을 Fig. 4에 제시한 방법으로 시료를 제조하였으며 시료의 항염증활성의 지표로서 NO의 생성 억제 효과를 측정 하였다.

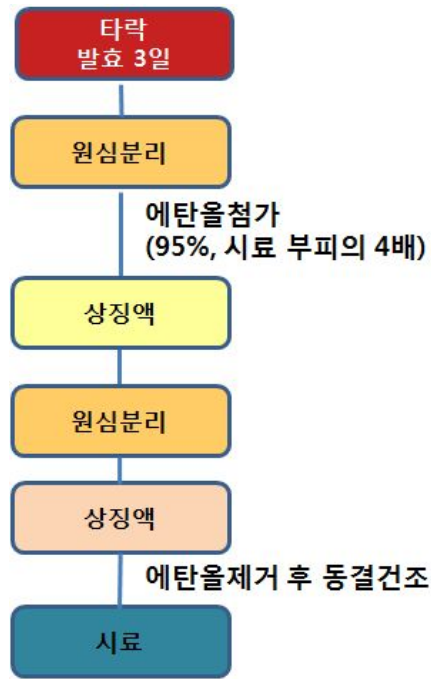


Fig. 4. 항염증 활성 평가를 위한 타락 시료의 제조

7) 항염증 활성의 평가

가. RAW 264.7 대식세포 배양조건

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell(ATCC, Manassas, VA, USA)을 10% FBS와 antibiotic mixture가 함유된 DMEM(Dulbecco's Modified Dagle's Medium)배지에서 CO₂ 5%, 37°C 조건으로 배양하였다.

나. Nitric oxide(NO) 생성 저해 활성

LPS(lipopolysaccharide)에 의하여 유도된 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 저해 활성을 측정하기 위하여 세포를 50,000 cells/well 수준으로 첨가하고 24시간 동안 배양하여 96 well plate에 부착한 후 다양한 농도의 시료와 LPS(1 ug/mL)를 동시에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양 후에는 Marcocci et al. (21)의 방법에 따라 배양 상징액 100 μL를 취하여 동량의 Griess 시약을 첨가하고 10분간 방치한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 nitrite의 농도는 sodium nitrite를 DMEM 배지에 용해한 후 작성한 표준곡선을 이용하여 계산하였으며 LPS를 처리한 대조군과 LPS를 처리하지 않은 대조군에서 생성된 nitrite 양의 차이를 기준으로 하여 각 시료의 NO 생성 저해활성을 구하였다.

다. 세포독성

시료의 세포독성 평가는 RAW 264.7 cell을 이용하여 MTT(3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 실시하였다. 위와 동일한 조건으로 시료를 처리하고 24시간 동안 세포를 배양한 후 상정액을 제거하고 MTT 시약(100 μ L)을 각 well에 분주하여 4시간 동안 배양을 지속하였다. 배양 종료 후 잔여 MTT 시약을 제거하고 DMSO(200 μ L)를 이용하여 용해시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 대조구에 대한 백분율로 표시하였다.

II. 연구결과

1) 타락 용매추출 분획의 항산화 효과

Fig. 1.에서 제시한 방법으로 용매추출을 실시하고 각 용매분획의 수율을 최초 타락 시료 무게를 기준으로 산출한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. 타락 용매 분획물의 수율

Fraction	Weight	Yield(%)
Chloroform	0.118	0.059
Ethyl acetate	0.025	0.125
Butanol	0.336	0.168
Water	6.1	3.5

전지유로 타락을 제조한 경우에는 hexane층에 상당량의 지방이 추출되었으며 용매의 극성이 증가함에 따라 수율이 증가하는 경향을 나타냈다. 각 용매분획의 항산화 활성을 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 이용하여 평가하였으며 각 결과 값은 trolox equivalent로 표시하였다. Fig. 5에

나타낸 바와 같이 DPPH 라디칼 소거능은 ethyl acetate와 butanol 분획층이 다른 분획과 비교하여 상대적으로 우수하였으며 ABTS 라디칼의 경우는 수용액층이 가장 높은 라디칼 소거능을 나타냈다(Fig. 6.)

DPPH와 ABTS 라디칼의 소거활성은 모두 라디칼의 소거 능력을 측정하는 방법임에도 불구하고 두 가지 방법으로 표현된 시료의 항산화 능력은 일치하지 않았다. 이와 같은 차이에 대하여 Mathew and Abraham(2006)은 항산화 성분과 반응하는 두 가지 라디칼의 반응양식이 서로 다르며, 라디칼의 stereoselectivity나 추출물의 용해도 차이가 그 원인이 될 수 있다고 하였다. Wang et al. (1998)도 어떤 항산화 성분은 ABTS 라디칼을 소거할 수 있지만 DPPH 라디칼은 소거할 수 없음을 확인하여 이와 같은 논리를 뒷받침하였다. Chen et al.(2013)에 따르면 우유나 우유 분획의 경우 ABTS 라디칼 소거능 결과가 DPPH 라디칼 소거능으로 측정한 항산화 활성보다 더 민감하게 작용할 수 있다고 하였다.

항산화 성분이 첨가되지 않은 요구르트의 항산화활성은 발효 과정에서 생성되는 펩타이드에서 유래할 수 있으며 발효유의 제조에 사용하는 starter culture의 종류에 따라 다른 효과가 관찰될 수 있다.

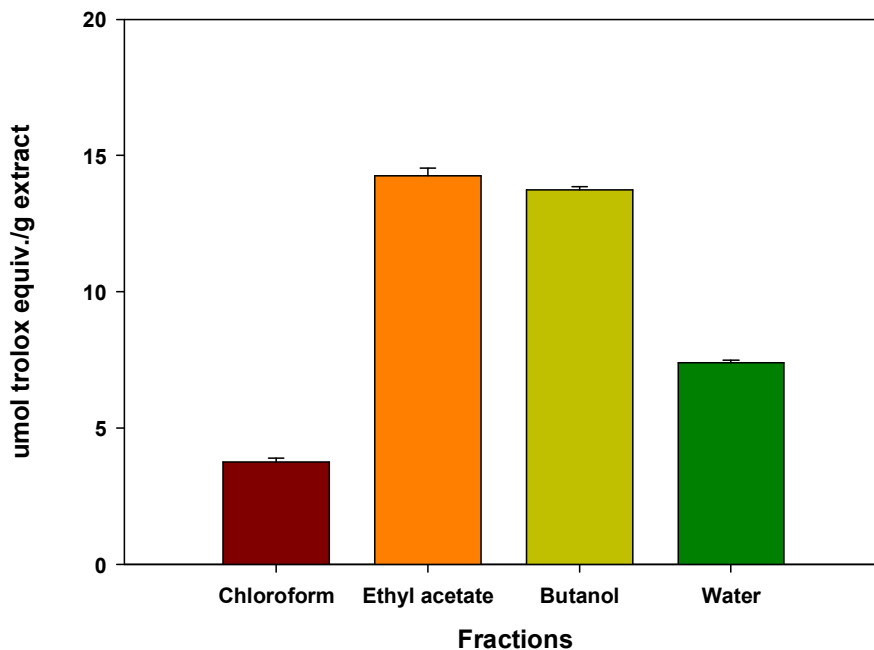


Fig. 5. DPPH 라디칼 소거능으로 평가한 타락 용매 분획의 항산화 효과

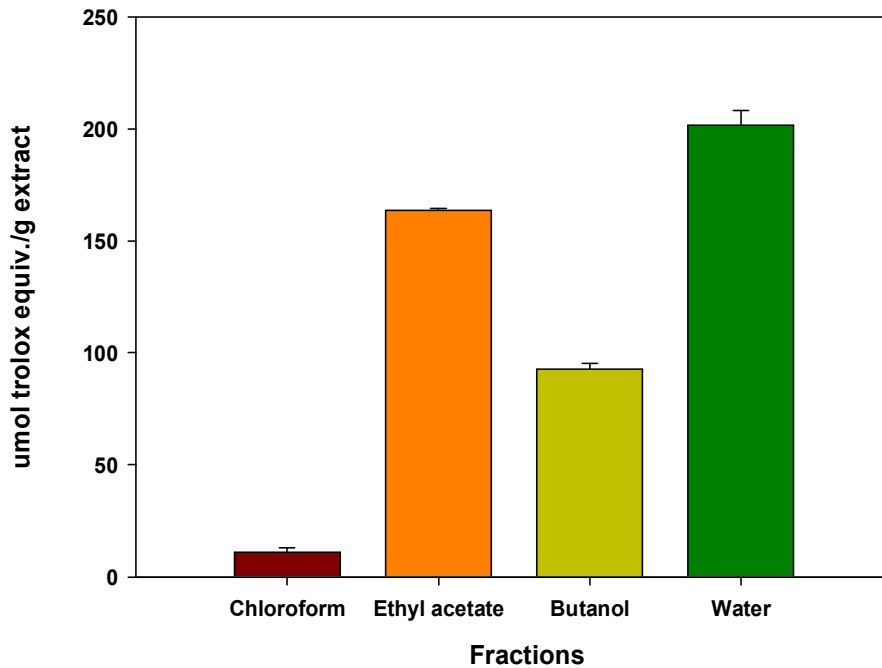


Fig. 6. ABTS 라디컬 소거능으로 평가한 타락 용매 분획의 항산화 효과

Kim et al.(2005)은 균주에 따른 항산화 활성을 비교한 결과 *L. bulgaricus* LB207은 hydroxy radical scavenging activity, iron chelating activity 등으로 평가한 항산화 활성에서 *L. acidophilus* LA5, *L. casei* 01, *L. acidophilus* LA100, *L. bulgaricus* LB207 and *L. rhamnosus* GG744 보다 높은 항산화 활성을 보인다고 하였다.

Farvin et al.(2010)은 항산화 활성을 나타내는 요구르트 펩타이드의 특성을 분석한 결과 모든 펩타이드가 적어도 한 개 이상의 proline 잔기를 포함하고 있었다고 하였으며 일부의 항산화 펩타이드는 N-말단에 valine이나 proline을 함유한다고 보고하였다. 그리고 요구르트와 같은 발효 유는 histidine, tyrosine, threonine, lys과 같은 항산화 활성을 나타내는 유리 아미노산을 상당량 포함하고 있다고 하였다. 따라서 타락의 용매추출 분획층에서 발견되는 항산화 활성은 상당부분 발효과정에서 나타나는 단백질의 펩타이드로의 전환과 관련이 있을 것으로 생각되며 생성된 펩타이드의 분자량이나 아미노산의 종류에 따라 각 용매에 대한 용해성 차이를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다.

Liu et al.(2005)은 우유나 두유에 kefir grain을 첨가하여 발효시킨 후 DPPH 라디컬 소거능을 평가한 결과 발효 전과 비교하여 항산화 활성이 유의적으로 증가함을 보고하였다. 이는 kefir

grain에 존재하는 항산화 성분이 발효 과정 중 우유나 두유로 전달될 수 있음을 시사한다. Wang et al. (2012) 등은 막걸리에서 유래한 항산화 화합물을 분리하여 보고하였다. 막걸리의 용매분획물의 항산화 활성을 비교한 결과 ethyl acetate와 butanol 분획이 다른 용매 분획과 비교하여 상대적으로 높은 항산화 활성을 보였으며 4-hydroxybenzaldehyde, 2-(4-hydroxyphenyl)ethanol(2, tyrosol), trans-ferulic acid, cis-ferulic acid, 1H-indole-3-ethanol(5, tryptophol), dimethyl succinate, succinic acid, 그리고 mono-methyl succinate 등이 동정되었다고 하였다. 타락의 제조 과정이 막걸리에서 유래한 유산균을 이용한 발효과정임을 고려할 때 발효 과정 중 생성된 펩타이드 이외에도 막걸리에서 유래한 항산화 성분이 타락에 전달될 가능성도 배제할 수는 없다.

Fig. 7.은 Fig. 4에서 제시한 방법으로 시료를 제조한 후 발효 직후와 발효 3일 경과 후 타락 시료의 ABTS 라디칼 소거능을 측정된 결과로서 발효 시간이 경과함에 따라 ABTS 라디칼 소거능이 증가하는 경향을 나타냈다. Aloglu and Oner(2011) 등은 유산균 발효에 의한 항산화 활성의 변화 양상은 단백질 분해율의 증가와 높은 상관성을 가진다고 하였다. 이와 같은 연구 결과를 본 연구결과와 관련지어 볼 때 발효시간이 경과함에 따라 단백질 분해 활성이 함께 증진되어 항산화활성이 증가할 수 있을 것으로 생각된다.

Fig. 7. 타락 제조 후 발효시간 경과에 따른 ABTS 라디칼 소거활성의 변화

2) 타락의 항고혈압 효과 분석

고혈압은 심혈관계 질환의 위험성을 증가시키는 중요한 인자 중 하나로서 임상적으로는 치료를 위하여 혈관이완제, 이뇨제, 칼슘채널 흡수 차단제와 더불어 angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitor가 사용된다. ACE는 체내 다양한 조직에 널리 분포되어 있으며 ACE 저해제는 angiotensin I 이 angiotensin II로 전환되어 혈관수축 효과를 일으키는 것을 방지하여 혈압의 상승을 조절할 수 있다.

본 연구에서는 타락의 항고혈압 효과를 평가하기 위하여 Fig. 2와 같이 시료를 준비하고 시료를 농도별로 첨가하여 ACE 저해활성을 조사한 결과 Fig. 7에 나타낸 바와 같이 시료를 50과 100 mg/mL 수준으로 첨가 시에는 ACE 활성을 오히려 증가시키는 것으로 나타났으며 200 mg/mL의 수준으로 첨가한 경우에도 10% 미만의 낮은 ACE 저해 효과를 보였다. 또한, Fig. 4에서 제시한 방법으로 시료를 제조한 후 발효 직후와 발효 3일 경과 후 타락 시료의 ACE 저해활성을 측정하는 경우에도 ACE 저해 활성은 관찰되지 않았다.

Fig. 7. 타락 시료의 ACE 저해 활성

Fig. 8. 타락 제조 후 발효시간 경과에 따른 ACE 저해 활성의 변화

우유의 발효 과정에서 생산되는 다양한 펩타이드는 ACE 저해제로 작용할 수 있는 것으로 보고되어 있지만 그 구조와 기능과의 관계는 명확하게 알려져 있지 않다. ACE 저해제는 적게는 2개에서 많게는 12개의 아미노산으로 구성되어 있으며 C-말단 tripeptide 배열이 중요한 것으로 알려져 있다(Ondetti et al., 1997). ACE의 저해제들은 주로 C-terminal에 proline을 포함하고 있으며 lysine 이나 arginine역시 C-terminal에서 ACE의 저해제 역할을 할 수 있다고 보고된 바 있다(Ariyoshi, 1993). 발효유의 경우 ACE 저해 활성을 가지는 펩타이드는 균주에 따라 차이를 보이는 것으로 보고되어 있으며 타락의 제조에 사용한 starter는 활성을 나타내는 펩타이드를 생성하지 못하는 것으로 생각된다.

3) 타락의 항비만 효과

지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 adipogenesis 과정은 많은 종류의 adipogenic transcription factor들의 단계적인 조절에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다. 특히 이러한 지방생성에 관여하는 전사인자들 중에서 C/EBP 및 PPAR family가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. 지방전구세포가 분화유도인자에 노출되면 몇 시간 이내에 C/EBP β 의 발현이 유발되면서 분화가 시작되며, C/EBP β 는 insulin-sensitive glucose uptake와 같은 성숙한 비만세포의 특징을 증가시키는 C/EBP α 및 PPAR γ 의 발현을 촉진하여 분화과정을 일으킨다(Rosen et al., 2011). 따라서 본 연구에서는 타락 시료의 처리가 adipogenic transcription factor들의 발현에 미치는 효과를 조사하기 위하여 mRNA 발현 양상을 분석하였다.

가. 세포생존성

3T3-L1 세포는 지방으로 분화가 결정된 줄기세포로서 분화유도제에 의하여 지방세포로 분화된다. 타락의 항비만 효과를 조사하기에 앞서 Fig. 2의 방법으로 제조한 시료를 최고 1 mg/mL의 농도로 48시간 동안 3T3-L1 지방전구세포에 처리하고 MTT assay를 실시하여 세포생존율을 측정하였다. 시료가 처리된 세포의 생존율은 Fig. 9에 나타난 바와 같이 100% 이상을 유지하여 세포독성을 나타내지 않았다.

나. 지방분화 관련 전사인자 발현에 미치는 효과

비정상적인 지방세포의 크기나 수의 증가는 체내 지방 축적의 직접적인 원인이 될 수 있으며 지방세포는 특이적인 adipocytokine의 분비를 통해 비만과 비만 유래 대사질환의 발생에 기여한다(Horst and Grimaldi, 2002).

Fig. 8. 타락 시료의 처리가 3T3-L1 preadipocyte의 생존성에 미치는 효과

지방세포 크기의 증가는 지방세포가 활성화되어 지방구를 축적함에 따라 유도되며 지방세포 수의 증가는 지방전구 세포의 증식과 함께 지방세포가 분화되어 발생한다(Attie and Scherrer, 2009). 따라서 타락 시료의 처리가 adipogenesis 유도에 필수적인 전사인자의 발현에 미치는 효과를 분석하였다. 지방분화 억제 효과는 Q-PCR(Applied biosystems, US)을 이용하여 전사인자 발현 정도를 대조구와 비교하여 상대적 정량(relative quantification)으로 표현하였다.

지방세포로의 분화 시 가장 뚜렷한 변화는 triglyceride의 축적이며 지방세포 특이적 marker 단백질의 발현 유도가 나타난다. IBMX와 dexamethasone에 의하여 유도되는 분화과정의 초기에는 C/EBP β 와 C/EBP δ 가 발현되며 이들의 주요 기능은 다음단계의 adipogenesis를 촉진하는 C/EBP α 와 PPAR- γ 가 발현을 유도하는 것이다(Rosen and McDougald, 2006). 분화과정의 중기와 후반부에는 C/EBP α 와 PPAR- γ 가 발현되면서 많은 종류의 지방세포 특이적 mRNA의 활성화를 유도하는데 PPAR- γ 는 중반기 이후 소멸되지 않고 지속적으로 유지되며 지방의 분화에 관여하기 때문에 지방분화의 master regulator로 간주되고 있다.

Fig. 9와 10에 나타낸 바와 같이 타락 시료를 처리한 경우 PPAR- γ , C/EBP α 의 발현이 농도의존적으로 감소하였으며 1 mg/mL의 처리 시 대조구와 비교하여 각각 26%, 15% 감소시켰다.

Fig. 9. 타락 시료의 처리가 PPAR- γ 발현에 미치는 효과

Fig. 10. 타락 시료의 처리가 C/EBP α 발현에 미치는 효과

이들 전사인자는 일반적으로 분화 후 2일이 지나면 발현되는 것으로 알려져 있으며 PPAR- γ 의 직접적인 타겟 유전자로는 fatty acid binding protein4(FABP4/aP2), fatty acid transporter(FAT/CD36), acetylCoA oxidase(ACO), lipoprotein lipase(LPL) 그리고 glucose transporter 4(GLUT4) 등이 보고되어 있다(Huang et al., 2006).

지방분화과정에 관여하는 전사인자 중 adipocyte determination and differentiation factor 1(ADD1)/sterol regulatory binding protein 1(SREBP1)의 역할은 아직 명확히 구명되지 않았으나 내재하는 PPAR- γ ligand의 생성을 촉진하여 활성을 향상시키는 것으로 보고되었다(Rosen et al., 2000). 타락 시료의 처리 시 SREBP1의 발현 양상은 나타나지 않았다(Fig. 11).

Fig. 11. 타락 시료의 처리가 SREBP1의 발현에 미치는 효과

Fatty acid synthase(FAS)는 지방세포에서 일어나는 지방산의 de novo synthesis에 직접적으로 관여하는 효소이다. 타락 시료의 처리는 FAS 발현양의 변화를 초래하여 약 1 mg/mL의 처리 시 약 68%의 감소가 확인되었으나 농도의존적 변화는 관찰되지 않았으며(Fig. 12). Lipoprotein lipase 활성 또한 뚜렷한 경향이 확인되지 않았다(Fig. 13).

Fig. 12. 타락 시료의 처리가 FAS의 발현에 미치는 효과

Fig. 13. 타락 시료의 처리가 LPL의 발현에 미치는 효과

Student(1980)에 의하면 ATP-citrate lyase, acetyl-coA carboxylase, fatty acid synthetase나 pyruvate carboxylase 등의 효소가 최소한 부분적으로는 중성지방의 상승에 기여한다고 하였으며 지방세포의 분화는 혈장 중성지방을 이용하기 위하여 lipoprotein lipase의 활성 증가를 초래한다고 하였다. 따라서 종합적으로 고찰하여보면 adipogenesis는 지방합성에 관여하는 전사인자의 발현양뿐만 아니라 이들의 발현시기와 상호조절을 통하여 제어될 수 있다.

Fig. 14는 Fig. 4에서 제시한 방법으로 타락 시료를 제조한 후 지방축적 억제 효과를 측정하기 위하여 Oil-Red O 염색을 실시하고 중성지방량을 정량한 결과이다. Oil-Red O로 염색하게 되면 중성지방, cholesterol ester만이 염색되고, 그 외 유리지방산, 인지질은 염색이 되지 않으므로 지방축적 및 지방세포 분화 정도를 개괄적으로 평가할 수 있다. Oil-Red O의 이미지 분석에서는 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었으며 지방 세포에 축적 된 중성지방의 양을 분석한 결과 3일 발효된 시료에서 시료의 처리 농도가 증가함에 따라 중성지방의 양이 감소하는 경향을 보였다.

Masao et al.(2008)은 probiotic이 지방세포의 성장에 영향을 미칠 수 있음을 보고하였다. 연구보고에 따르면 *Lactobacillus gasseri* SBT2055 균주를 이용하여 발효시킨 탈지유를 쥐에게 4주간 급여하고 발효전 탈지유를 급여한 대조구와 비교한 결과 복부 백색지방세포의 크기(adipocyte size)가 유의적으로 감소하였으며 작은 크기의 지방세포 비율이 대조구와 비교하여 유의적으로 높았다고 보고하였다. 복부지방세포의 크기가 향후 당뇨로의 진행가능성과 밀접한 관련이 있음을 고려할 때 특정균주에 의한 유산균 발효는 지방세포 분화를 조절할 잠재적 가능성이 있을 수 있다.

Xu et al.(2011)은 치즈의 제조과정에서 rennet의 처리에 의하여 생성되는 κ -casein의 분해산물인 glycomacropeptide가 지방세포의 분화를 억제하는데 효과가 있다고 보고하였으며 시료 처리 효과는 지방세포의 분화 후기보다는 분화 개시 시점에 처리한 경우 상대적으로 뚜렷한 효과가 관찰된다고 하였다. 비록 시료의 효과가 본 연구의 시료 처리 수준보다 높은(최고 5 mg/mL) 농도에서 유의적인 효과가 관찰되었으나 우유에 존재하는 다양한 성분이 체내 지방의 분화에 영향을 미칠 수 있음을 의미하며 타락의 제조와 같은 발효과정에서 생성되는 다양한 성분들은 지방세포 분화를 억제함으로써 항비만 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다.

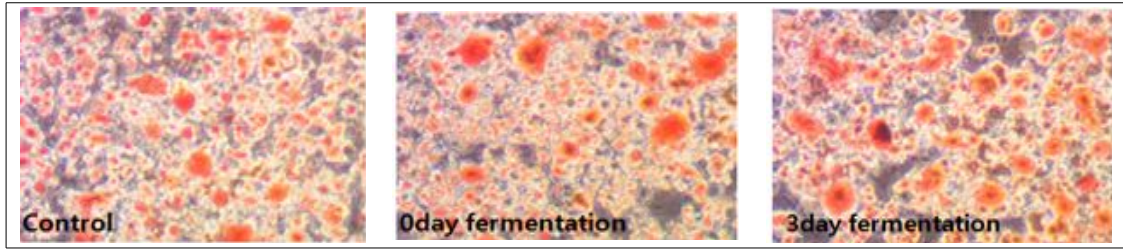


Fig. 13. 타락 시료가 중성지방의 축적에 미치는 효과

4) 타락의 항염증 효과

염증반응은 생체나 조직이 외부 화학적물질의 침입이나 세균반응에 대항하여 손상부위를 회복 재생하려는 반응으로서 대식세포(macrophase), 호중구(neutrophil)등과 같은 면역관련 세포들이 염증성 cytokine, 산화질소(NO), prostaglandinE₂(PGE₂)등의 염증매개물질을 분비하여 발생한다(Chang et al., 2001). 본 연구에서는 위에서 타락시료를 이용하여 염증반응 시 과다하게 생성되어 NO의 억제여부를 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용하여 측정하였으며 또한 동일한 농도에서 24시간 배양한 후 MTT측정법으로 세포생존율을 측정하였다. Fig. 14에 나타난 바와 같이 세포생존율은 최대 1mg/mL 수준을 처리한 경우에도 모두 90%이상을 유지하여 세포독성은 관찰되지 않았다.

(A)

(B)

Fig. 13. 타락 시료의 RAW 264.7 macrophage에 대한 세포독성
(A) Fig. 2의 방법으로 제조한 시료, (B) Fig. 4의 방법으로 제조한 시료

세균 내독소로 알려진 LPS(lipopolysaccharide)는 그람음성균의 세포외막에 존재하는데 RAW 264.7 cell과 같은 대식세포에 처리하면 염증을 일으키는 cytokine을 증가시키며 염증매개물질의 생성은 phospholipase A₂의 활성화에 의해 NO의 생성과정으로 연결된다(MacDaniel *et al.*, 1996). NO는 L-arginine으로부터 NO synthase(NOS)에 의하여 합성되는데 NOS는 체내 항상성 유지에 필요한 endothelial NOS(eNOS)와 염증성 인자에 의하여 유도되는 inducible NOS(iNOS)로 분류되며 iNOS에 의하여 증가된 NO는 패혈성쇼크나 류마티스 관절염과 같은 질병을 유발시키는 원인이 된다(Bogdan, 2001). 타락의 항염증 활성의 지표로서 NO의 생성에 미치는 효과를 측정할 결과 모든 처리구에서 NO의 생성은 관찰되지 않았다(Fig. 14).

(A)

(B)

Fig. 14. 타락 시료의 처리가 RAW 264.7 macrophage의 산화질소 생성에 미치는 효과
(A) Fig. 2의 방법으로 제조한 시료, (B) Fig. 4의 방법으로 제조한 시료

III 제 3 세부과제: 타락의 *in vivo* 건강기능성 규명

1) 타락 발효 추출물의 대식 세포 내 항염증 활성 측정 및 기전분석

가. 탈지 타락의 발효 추출 방법에 따른 대식세포의 항염증 활성 측정

탈지 타락 발효추출물 샘플의 항염증 활성을 측정하기 위해 대식세포주인 생쥐 J774 cell을 6 well plate에 각 well 당 1×10^5 cells씩 seeding하고 하루 동안 배양하여 세포가 monolayer를 형성하도록 하였다. 이때, 약 70%의 confluency가 유지되도록 하였다. 그 후 Fig. 1과 같은 방법으로 추출한 탈지 타락 발효추출물 샘플을 용매인 10% DMSO에 녹여 최종 농도 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ 그리고 200 $\mu\text{g/ml}$ (0.1 % DMSO)로 첨가하여 48시간동안 95% air + 5% CO₂ 37°C 배양기 배양하였다. 그 후 PI staining과 유세포 분석기(flow cytometry)로 cell viability를 측정하였다. 이 때 cell viability 측정은 유세포 분석기에 나타난 PI^{high} 세포는 세포 사멸이 일어난 것으로 간주 하였고, PI^{low} 세포는 생존한 것으로 간주하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 것 같이 모든 분획에서 대식세포의 세포 사멸은 일어나지 않았다.

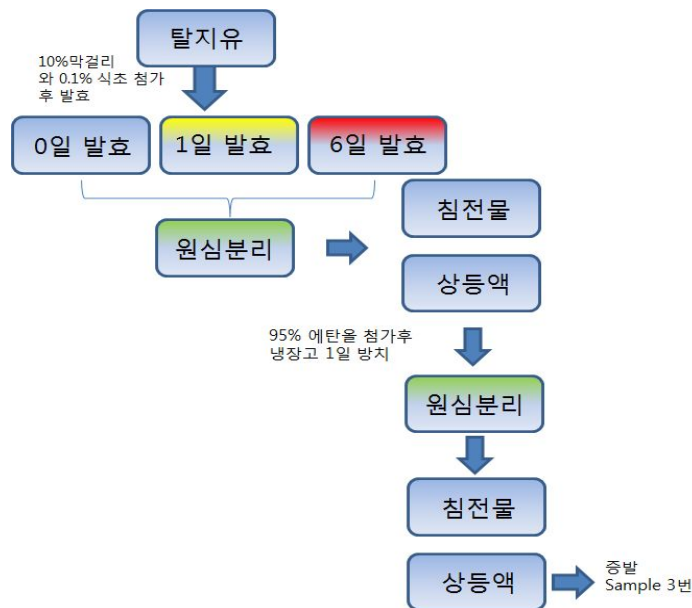


Fig 1. 탈지 타락의 발효일에 따른 샘플 추출 방법.

그 후 탈지 타락 발효추출물의 항염증 활성을 측정하기 위해 cell viability 측정때와 같은 배양조건에서 배양기에서 LPS (lipopolysaccharides) (1 $\mu\text{g/ml}$)와 같이 배양하였다. LPS는 염증 유발 물질로 TLR (Toll-like receptor) signaling에 의해 대식세포에서 주요 proinflammatory cytokine의 발현을 유발하는 것으로 알려져 있다. 세포 배양 후

proinflammatory cytokine의 RNA 수준에서 전사량을 측정하기 위해 각 세포를 PBS로 3회 세척한 뒤 total RNA를 추출하였다. Total RNA 추출은 TRIzol reagent를 사용하여 실시되었다. 세포에서 RNA를 분리하여 RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)을 시행하여 mRNA 발현 정도를 분석하였다. RT-PCR 조건은 95°C에서 5분동안 pre-denaturation 한 후, 35 cycle의 amplification cycle (95°C, 30sec → 60°C, 30sec → 72°C, 30sec)을 진행 하였다. 마지막 extension은 72°C에서 10분간 진행 함. GAPDH는 internal control로써 사용했다. 음성대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 세포에 10% DMSO를 처리하여 비교하였다. 이 때 사용되어진 primer의 sequence, GenBank access number, RT-PCR product size는 Table. 1에 명시하였다.

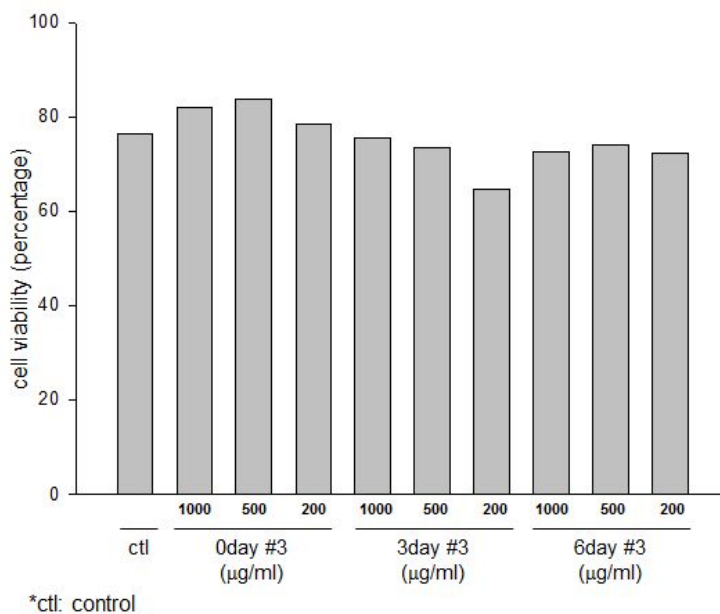


Fig 2. 탈지 타락 추출물 분리 시 서로 다른 발효 일에 따른 샘플의 대식세포 cell viability 변화 측정.

Table 1. 탈지 타락 발효 추출물의 대식세포 항염증 활성 측정 방법에 사용된 RT-PCR primer set.

Gene	Genebank	Sequence		Product size
IL-1 β	NM_008361.3	F	CCA GGA TGA GGA CAT GAG CAC C	358 bp
		R	ATC CAC ACT CTC CAG CTG CAG G	
IL-6	NM_031168.1	F	ACC GCT ATG AAG TTC CTC TCT GC	561 bp
		R	TAG CCA CTC CTT CTG TGA CTC CA	
IL-12 β	NM_008352.2	F	CTG CCA CAA AGG AGG CGA GAC TC	389 bp
		R	CAT ATT TAT TCT GCT GCC GTG CTT C	
TNF- α	NM_013693.2	F	GAC GTG GAA CTG GCA GAA GAG G	502 bp
		R	TGA CGG CAG AGA GGA GGT TGA C	
iNOS	NM_010927.2	F	CAA GTA CGA GTG GTT CCA GGA GC	314 bp
		R	CTG TGT GGT GGT CCA TGA TGGTC	
Gapdh	NM_008084.2	F	ATG ACC ACA GTC CAT GCC ATC	271 bp
		R	CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG	

그 결과 Fig. 3의 결과처럼 탈지 타락 발효추출물 중 발효 6일차 3번 1000 μ g/mg처리 시에 세포 독성이 낮은 반면 염증을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다.

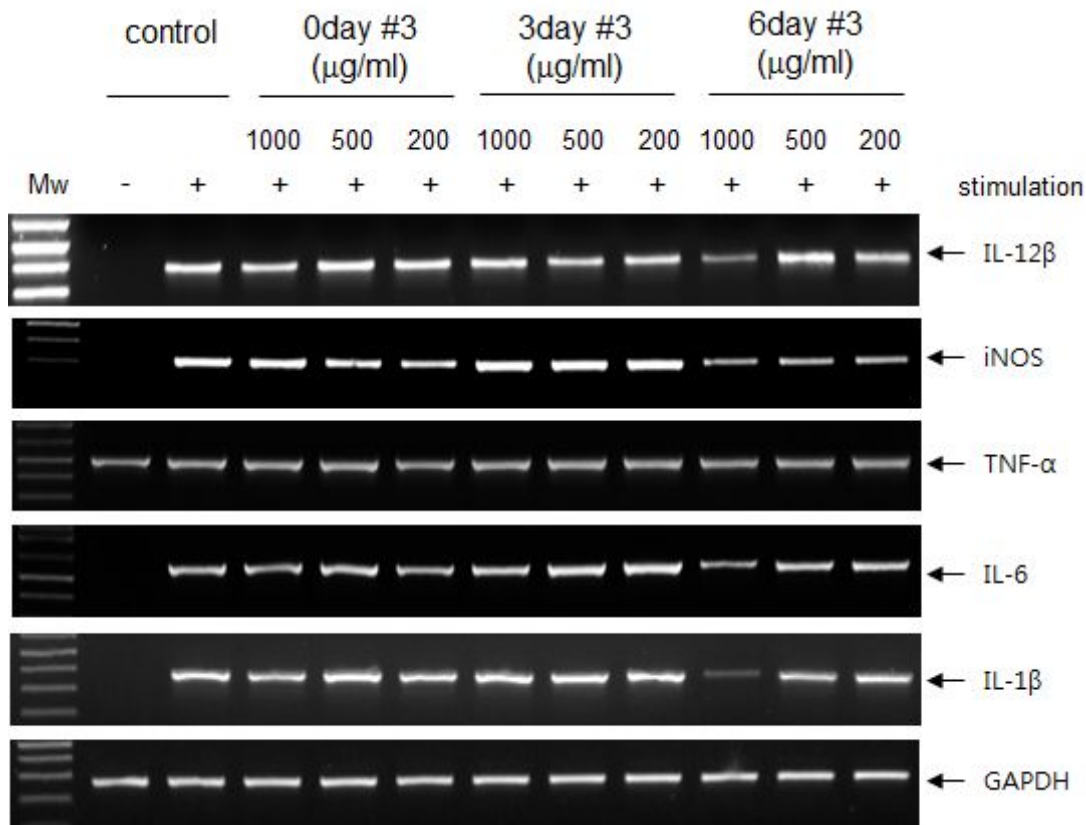


Fig. 3. 탈지 타락 발효추출물 샘플의 대식세포 항염증 작용 평가.

또한 탈지 타락 발효추출물 샘플이 대식세포의 세포 증식(cell proliferation)에 미치는 영향을 측정하기 위해 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] assay를 이용하여 세포 증식을 측정하였다. 우선 생쥐 J774 cell을 6 well plate에 각 well 당 1×10^5 cells씩 seeding하고 하루 동안 배양하여 세포가 monolayer를 형성하도록 하였다. 이때, 약 70%의 confluency가 유지되도록 했다. 그 후 탈지 타락의 발효 후 샘플을 첨가하고 48시간동안 95% air + 5% CO₂ 37°C 배양기에서 배양한 그룹과 생쥐 J774 cell의 활성을 유도하기 위해 LPS (lipopolysaccharides) (1 $\mu\text{g/ml}$)와 같이 배양한 그룹으로 세포를 배양하였다. 세포 배양 후 만들어진 MTT 용액 20 μl 를 넣고 95% air + 5% CO₂ 37°C 배양기에서 4 시간 동안 더 배양하였다. 4 시간 후 MTT 반응을 중단시키기 위해 세포 배지를 제거하고 DMSO 200 μl 를 넣고 흡광도 490 nm에서 상대적인 세포 증식을 측정하였다. 그 결과 탈지 타락 발효추출물 6일차 3번 샘플이 용량 의존적으로 대식세포의 세포 증식을 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 4).

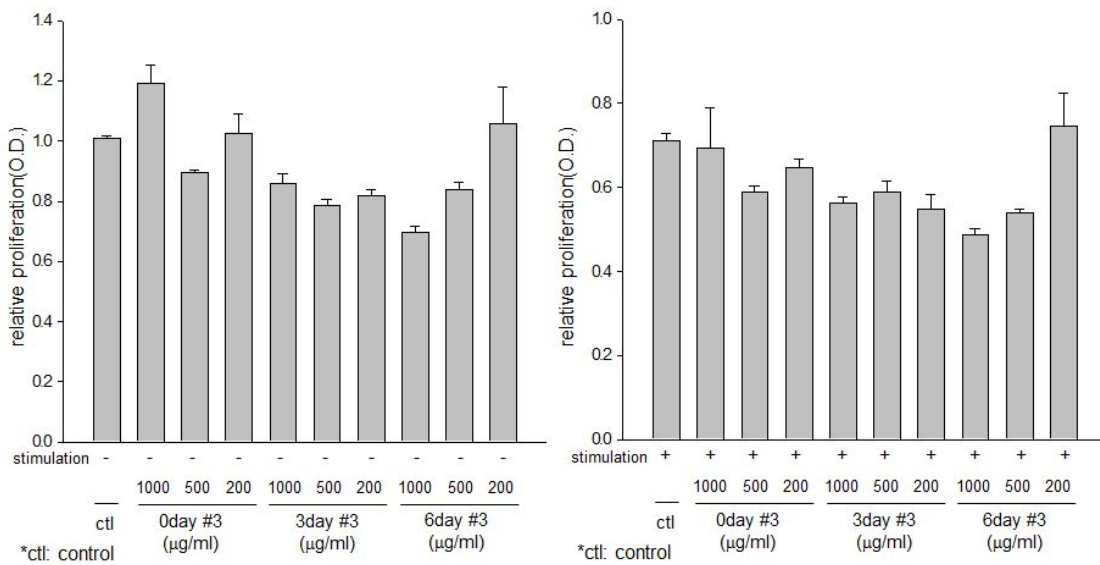


Fig 4. 탈지 타락 추출물의 발효 후 샘플 처리 시 대식세포의 세포 증식 평가. Control, 탈지 타락 발효추출물을 안 넣어준 배지. 좌측 그림, 대식세포주를 stimulation 하지 않고 탈지 타락 발효추출물을 넣어준 배지. 우측 그림, 대식세포주를 LPS (lipopolysaccharides) (1µg/ml)으로 stimulation 하고 탈지 타락 발효추출물을 넣어준 배지.

나. 전지 타락의 발효 추출 방법에 따른 대식세포의 항염증 활성 측정

전지 타락 발효추출물 샘플의 항염증 활성을 측정하기 위해 대식세포주인 생쥐 J774 cell을 6 well plate에 각 well 당 1×10^5 cells씩 seeding하고 하루 동안 배양하여 세포가 monolayer를 형성하도록 하였다. 이때, 약 70%의 confluency가 유지되도록 하였다. 그 후 전지 타락 추출물 샘플을 Fig. 5와 같이 추출하고 용매인 10% DMSO에 녹여 최종 농도 1000 µg/ml, 500 µg/ml 그리고 200 µg/ml (0.1 % DMSO)로 첨가하여 48시간동안 95% air + 5% CO₂ 37°C 배양기 배양하였다. 그 후 PI staining과 유세포 분석기(flow cytometry)로 cell viability를 측정하였다. 이 때 cell viability 측정은 유세포 분석기에 나타난 PI^{high} 세포는 세포 사멸이 일어난 것으로 간주 하였고, PI^{low} 세포는 생존한 것으로 간주하였다. 그 결과 Fig. 6에서 보는 것 같이 모든 분획에서 대식세포의 세포 사멸은 일어나지 않았다.

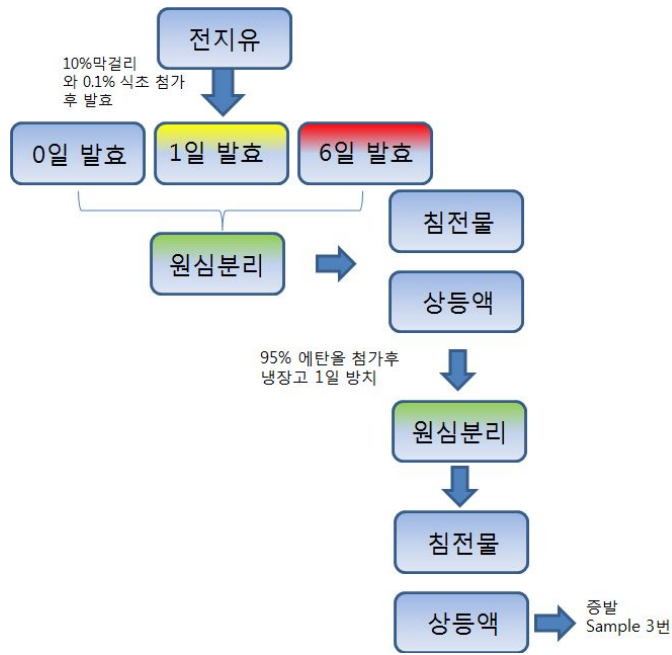


Fig 5. 전지 타락의 발효일에 따른 샘플 추출 방법.

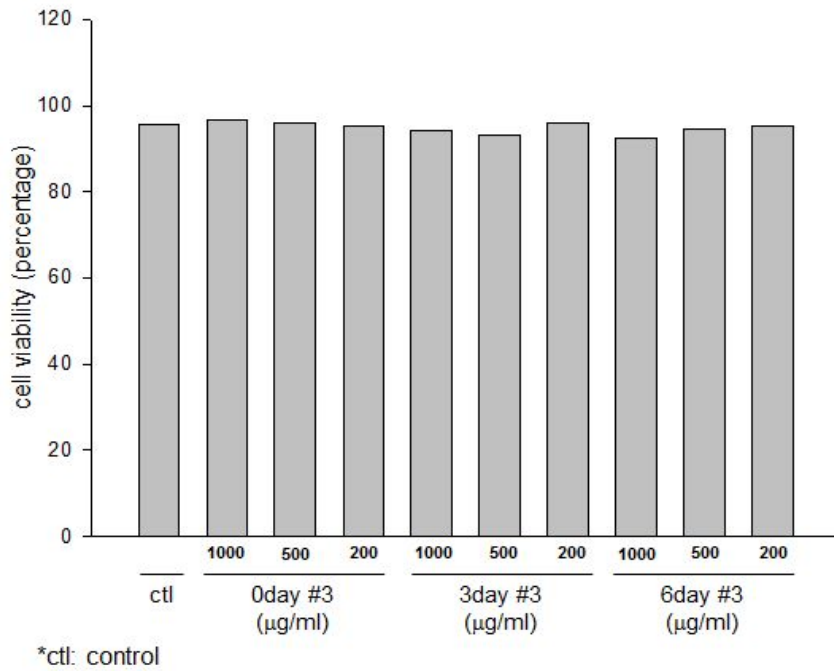


Fig 6. 전지 타락 추출물 분리 시 서로 다른 발효 일에 따른 샘플의 대식세포 cell viability 변화 측정.

그 후 전지 탈락 발효추출물의 항염증 활성을 측정하기 위해 cell viability 측정때와 같은 배양조건에서 배양기에서 LPS (lipopolysaccharides) (1 μ g/ml)와 같이 배양하였다.

LPS는 염증 유발 물질로 TLR (Toll-like receptor) signaling에 의해 대식세포에서 주요 proinflammatory cytokine의 발현을 유발하는 것으로 알려져 있다.

세포 배양 후 proinflammatory cytokine의 RNA 수준에서 전사량을 측정하기 위해 각 세포를 PBS로 3회 세척한 뒤 total RNA를 추출하였다. Total RNA 추출은 TRIzol reagent를 사용하여 실시되었다. 세포에서 RNA를 분리하여 RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)을 시행하여 mRNA 발현 정도를 분석하였다. RT-PCR 조건은 95°C에서 5분동안 pre-denaturation 한 후, 35 cycle의 amplification cycle (95°C, 30sec \rightarrow 60°C, 30sec \rightarrow 72°C, 30sec)을 진행 하였다. 마지막 extension은 72°C에서 10분간 진행 함. GAPDH는 internal control로써 사용했다. 음성대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 세포에 10% DMSO를 처리하여 비교하였다. 이 때 사용되어진 primer의 sequence, GenBank access number, RT-PCR product size는 Table 1에 명시하였다. 그 결과 Fig 7의 결과처럼 전지 탈락 발효추출물의 처리 시에 세포 독성이 낮은 반면 유의한 염증억제 효과는 확인 되지 않았다.

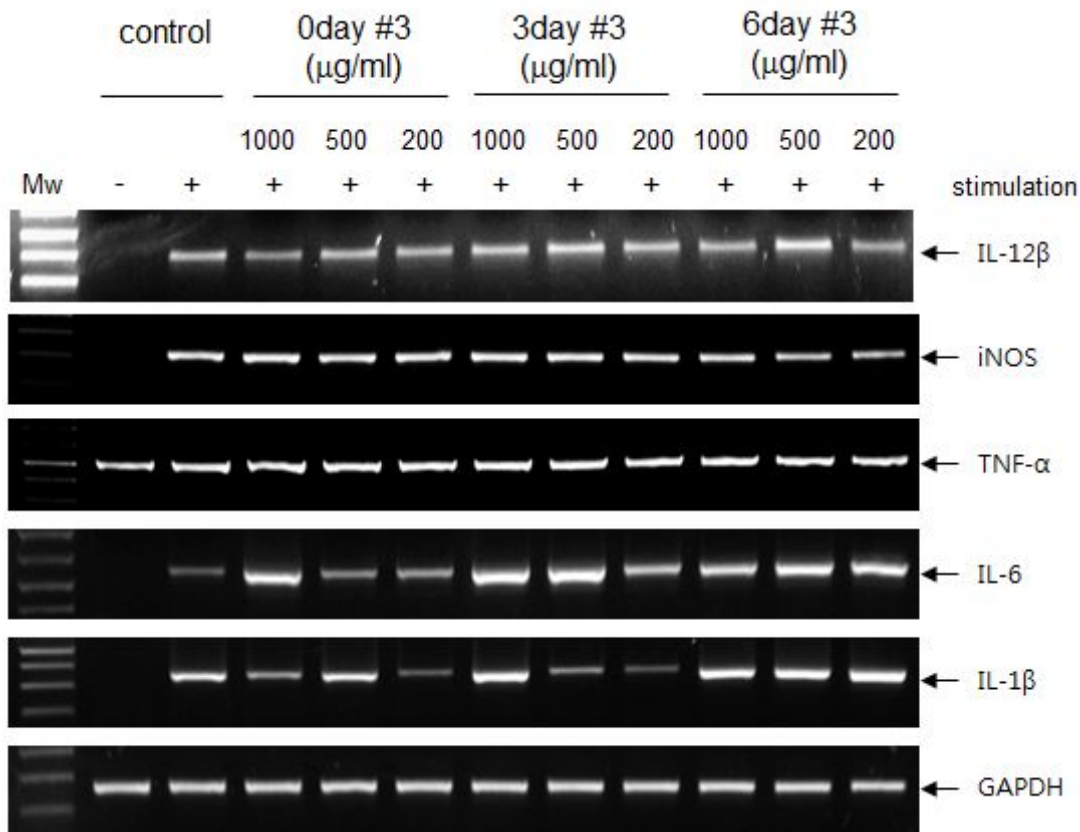


Fig 7. 전지 타락 발효추출물 샘플의 대식세포 항염증 작용 평가.

또한 전지 타락 발효추출물 샘플이 대식세포의 세포 증식(cell proliferation)에 미치는 영향을 측정하기 위해 MTT assay를 이용하여 세포 증식을 측정하였다. 우선 생쥐 J774 cell을 6 well plate에 각 well 당 1×10^5 cells씩 seeding하고 하루 동안 배양하여 세포가 monolayer를 형성하도록 하였다. 이때, 약 70%의 confluency가 유지되도록 했다. 그 후 전지 타락 발효추출물 샘플을 첨가하고 48시간동안 95% air + 5% CO₂ 37°C 배양기에서 배양한 그룹과 생쥐 J774 cell의 활성을 유도하기 위해 LPS (lipopolysaccharides) (1 $\mu\text{g/ml}$)와 같이 배양한 그룹으로 세포를 배양하였다. 세포 배양 후 만들어진 MTT 용액 20 μl 를 넣고 95% air + 5% CO₂ 37°C 배양기에서 4 시간 동안 더 배양하였다. 4 시간 후 MTT 반응을 중단시키기 위해 세포 배지를 제거하고 DMSO 200 μl 를 넣고 흡광도 490 nm에서 상대적인 세포 증식을 측정하였다. 그 결과 전지 타락 발효추출물 샘플은 대식세포의 세포 증식을 감소시키지는 못 하는 것으로 나타났다(Fig 8).

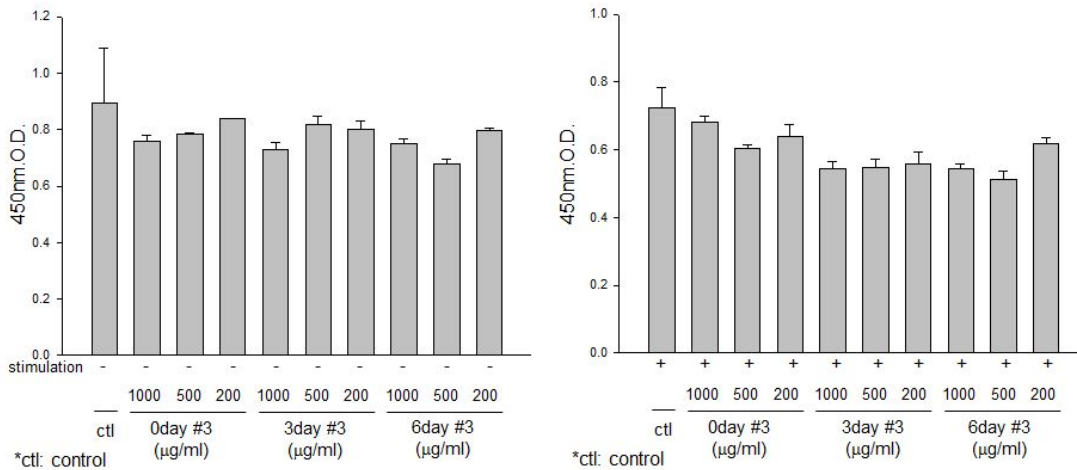


Fig 8. 전지 타락 추출물의 발효 후 샘플 처리 시 대식세포의 세포 증식 평가.

Control, 전지 타락 발효추출물을 안 넣어준 배지. 좌측 그림, 대식세포주를 stimulation 하지 않고 전지 타락 발효추출물을 넣어준 배지. 우측 그림, 대식세포주를 LPS (lipopolysaccharides) (1ug/ml)으로 stimulation 하고 전지 타락 발효추출물을 넣어준 배지.

다. 유기농 전지 타락의 발효 추출 방법에 따른 대식세포의 항염증 활성 측정

유기농 전지 타락 발효추출물 샘플의 항염증 활성을 측정하기 위해 대식세포주인 생쥐 J774 cell을 6 well plate에 각 well 당 1×10^5 cells씩 seeding하고 하루 동안 배양하여 세포가 monolayer를 형성하도록 하였다. 이때, 약 70%의 confluency가 유지되도록 하였다. 그 후 유기농 타락 발효 추출물 샘플을 Fig 9와 같이 추출하고 용매인 10% DMSO에 녹여 최종 농도 1000 µg/ml, 500 µg/ml 그리고 200 µg/ml (0.1 % DMSO)로 첨가하여 48시간동안 95% air + 5% CO₂ 37°C 배양기 배양하였다. 그 후 PI staining과 유세포 분석기(flow cytometry)로 cell viability를 측정하였다. 이 때 cell viability 측정은 유세포 분석기에 나타난 PI^{high} 세포는 세포 사멸이 일어난 것으로 간주 하였고, PI^{low} 세포는 생존한 것으로 간주하였다. 그 결과 Fig 10에서 보는 것 같이 모든 분획에서 대식세포의 세포 사멸은 일어나지 않았다.

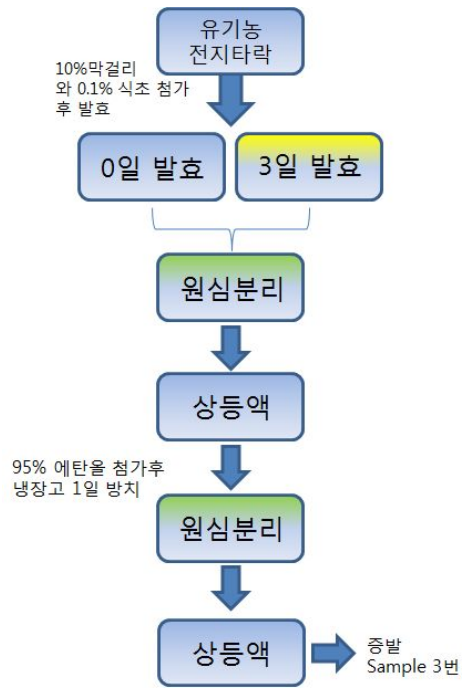


Fig 9. 유기농 전지 타락의 발효일에 따른 샘플 추출 방법.

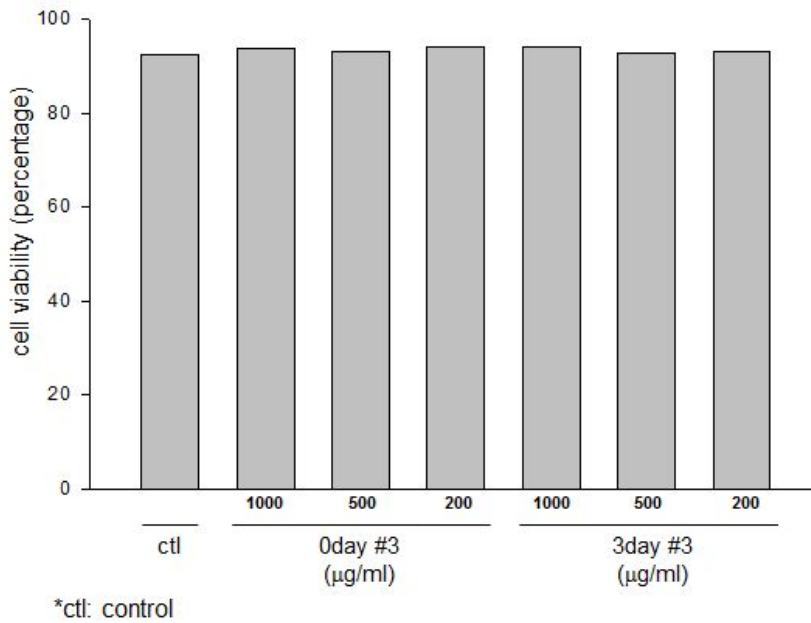


Fig 10. 유기농 전지 타락 추출물 분리 시 서로 다른 발효 일에 따른 샘플의 대식세포 cell viability 변화 측정.

그 후 유기농 전지 타락 추출물의 항염증 활성을 측정하기 위해 cell viability 측정때와 같은 배양조건에서 배양기에서 LPS (lipopolysaccharides) (1 $\mu\text{g/ml}$)와 같이 배양하였다. LPS는 염증 유발 물질로 TLR (Toll-like receptor) signaling에 의해 대식세포에서 주요 proinflammatory cytokine의 발현을 유발하는 것으로 알려져 있다. 세포 배양 후 proinflammatory cytokine의 RNA 수준에서 전사량을 측정하기 위해 각 세포를 PBS로 3회 세척한 뒤 total RNA를 추출하였다. Total RNA 추출은 TRIzol reagent를 사용하여 실시되었다. 세포에서 RNA를 분리하여 RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)을 시행하여 mRNA 발현 정도를 분석하였다. RT-PCR 조건은 95°C에서 5분동안 pre-denaturation 한 후, 35 cycle의 amplification cycle (95°C, 30sec \rightarrow 60°C, 30sec \rightarrow 72°C, 30sec)을 진행 하였다. 마지막 extension은 72°C에서 10분간 진행 함. GAPDH는 internal control로써 사용했다. 음성대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 세포에 10% DMSO를 처리하여 비교하였다. 이 때 사용되어진 primer의 sequence, GenBank access number, RT-PCR product size는 표 1에 명시하였다. 그 결과 Fig 11의 결과처럼 유기농 전지 타락 발효추출물 샘플은 대식세포의 염증반응에 아무런 효과를 안 보이는 것으로 확인되었다.

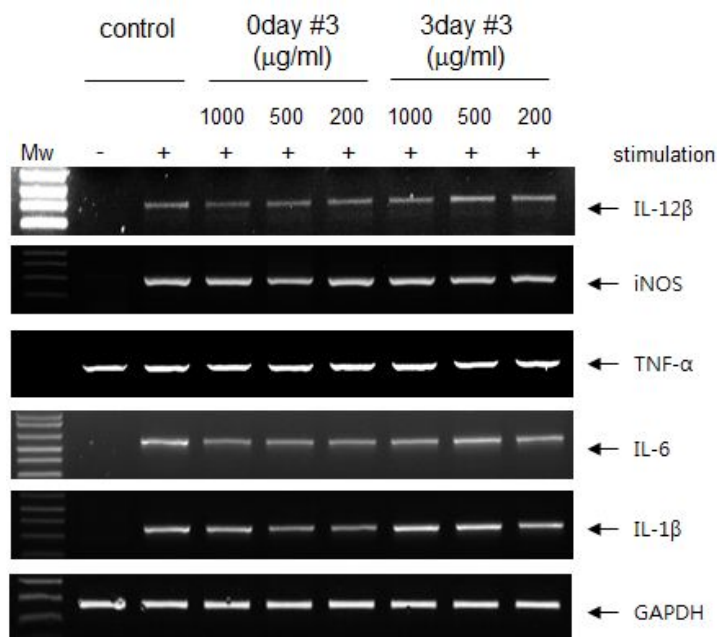


Fig 11. 유기농 전지 타락 발효추출물 샘플의 대식세포 항염증 작용 평가.

또한 유기농 전지 타락 발효추출물 샘플이 대식세포의 세포 증식(cell proliferation)에 미치는 영향을 측정하기 위해 MTT assay를 이용하여 세포 증식을 측정하였다. 우선 생쥐 J774 cell을 6 well plate에 각 well 당 1×10^5 cells씩 seeding하고 하루 동안 배양하여 세포가 monolayer를 형성하도록 하였다. 이때, 약 70%의 confluency가 유지되도록 했다. 그 후 유기농 전지 타락 발효추출물 샘플을 첨가하고 48시간동안 95% air + 5% CO₂ 37°C 배양기에서 배양한 그룹과 생쥐 J774 cell의 활성을 유도하기 위해 LPS (lipopolysaccharides) (1ug/ml)와 같이 배양한 그룹으로 세포를 배양하였다. 세포 배양 후 만들어진 MTT 용액 20 µl를 넣고 95% air + 5% CO₂ 37°C 배양기에서 4 시간 동안 더 배양하였다. 4 시간 후 MTT 반응을 중단시키기 위해 세포 배지를 제거하고 DMSO 200 µl를 넣고 흡광도 490 nm에서 상대적인 세포 증식을 측정하였다. 그 결과 유기농 전지 타락 발효추출물은 세포 증식을 감소시키지는 못 하는 것으로 나타났다(Fig 12).

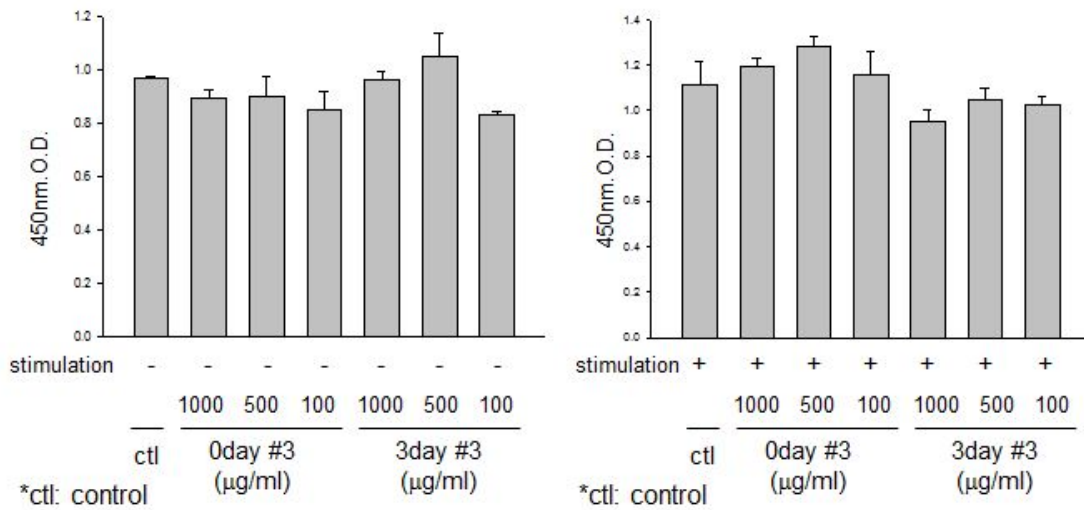


Fig 12. 유기농 전지 타락 추출물의 발효 후 샘플 처리 시 대식세포의 세포 증식 평가. Control, 유기농 전지 타락 발효추출물을 안 넣어준 배지. 좌측 그림, 대식세포주를 stimulation 하지 않고 유기농 전지 타락 발효추출물을 넣어준 배지. 우측 그림, 대식세포주를 LPS (lipopolysaccharides) (1ug/ml)으로 stimulation 하고 유기농 전지 타락 발효추출물을 넣어준 배지.

2) 타락 발효 추출물의 T 림프구 내 항염증 활성 측정 및 기전분석

가. 탈지 타락 발효추출물의 T 림프구 항염증 활성 측정

만들어진 서로 다른 탈지 타락 발효추출물 샘플의 항염증 활성을 측정하기 위해 위에 기술된 방법으로 T 림프구에서 각 각의 cell viability와 항염증 활성을 측정하였다. 이 때 사용되어진 T 림프구는 생쥐 RMA cell을 사용하였으며 6 well plate에 각 well 당 2×10^5 cells씩 seeding하고 대식세포 항염증 측정 방법과 동일한 조건으로 배양기에서 배양하였다. 이 때 T 림프구의 활성을 증진시키기 위해 PMA (10 ng/ml)와 ionomycin (1 μ g/ml)을 세포 배양 시 첨가하였다. 그 후 PI staining과 유세포 분석기(flow cytometry)로 cell viability를 측정하였고, IL-2와 IFN- γ 의 발현양을 RT-PCR로 측정하였다. 이 때 사용되어진 primer의 sequence, GenBank access number, RT-PCR product size는 Table 2에 명시하였다. 그 결과 대식세포의 결과와 마찬가지로 탈지 타락 발효추출물 6일차 3번 분획 샘플이 세포 독성이 낮은 반면 T 림프구 염증반응을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다.

Table 2. 탈지 타락 발효추출물의 T 림프구 항염증 활성 측정 방법에 사용된 RT-PCR primer set.

Gene	Genebank	Sequence		Product size
IL2	NM.008366.2	F	TGG AGC AGC TGT TGA	308 bp
		R	CAC CAC AGT TGC TGA	
IFN- γ	NM_008337.2	F	CTG AGA CAA TGA ACG CTA CAC ACT GC	433 bp
		R	AAC AGC TGG TGG ACC ACT CGG AT	
Gapdh	NM_008084.2	R	ATG ACC ACA GTC CAT GCC ATC	271 bp
		F	CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG	

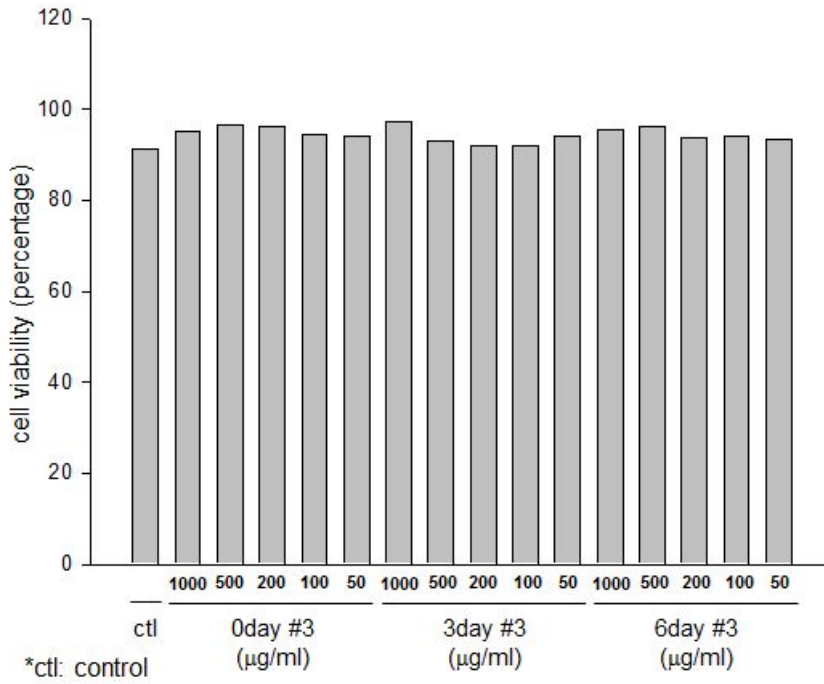


Fig 13. 탈지 타락 발효추출물의 서로 다른 분획 샘플의 T 림프구 cell viability 변화 측정.

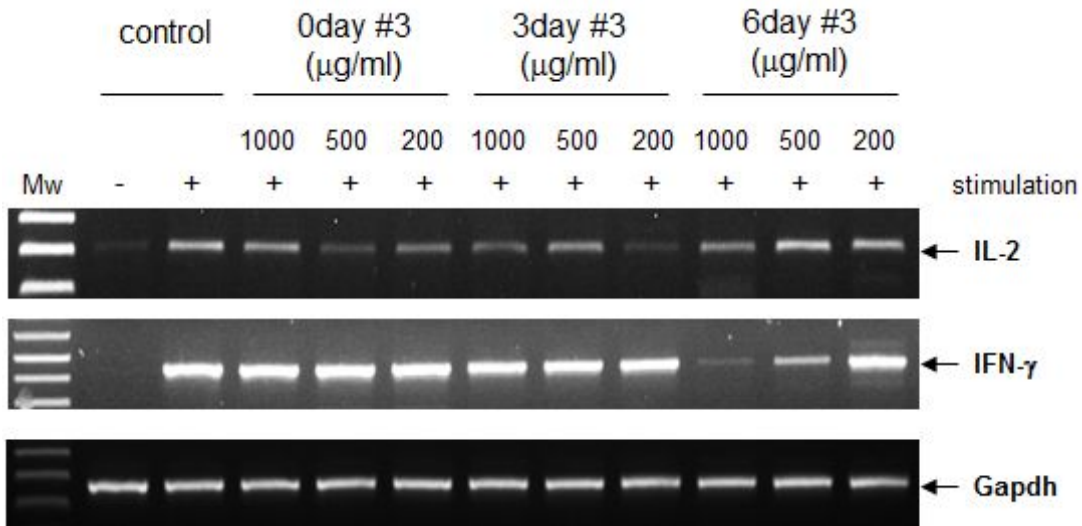


Fig 14. 탈지 타락 발효추출물의 서로 다른 분획 샘플의 T 림프구 항염증 작용 평가.

그 후 탈지 타락 발효 6일차 3번 샘플 분획이 T 림프구 활성화 시 분비되는 주요

cytokine의 분비를 억제하는 원인이 세포 증식을 억제하기 때문인가를 고찰하기 위해, T 림프구 배양 시 탈지 타락 발효추출물 6일차 3번 샘플 분획을 첨가하고 MTT assay를 이용하여 세포 증식을 측정하였다. 그 결과 탈지 타락 발효 6일차 3번 샘플 분획은 T 림프구의 세포 증식을 감소시키는 않는 것으로 나타났다(Fig 15).

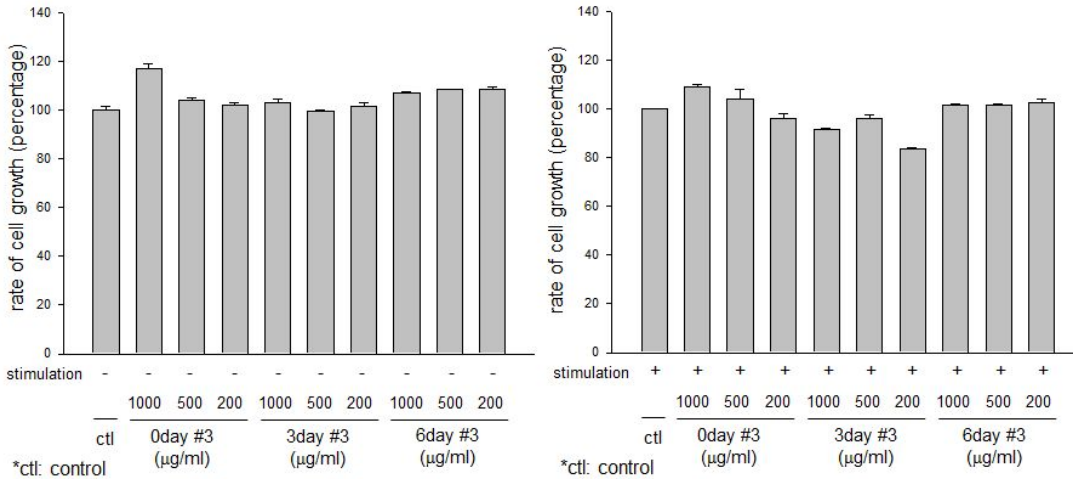


Fig 15. 탈지 타락 발효추출물 분리 시 서로 다른 발효 일에 따른 샘플의 T 림프구 증식 평가. Control, 탈지 타락 발효추출물을 안 넣어준 배지. 좌측 그림, T 림프구를 stimulation 하지 않고 탈지 타락 발효추출물을 넣어준 배지. 우측 그림, T 림프구를 PMA (10 ng/ml)와 ionomycin (1 µg/ml)으로 stimulation 하고 탈지 타락 발효추출물을 넣어준 배지.

나. 전지 타락 발효 추출물의 T 림프구 항염증 활성 측정

만들어진 서로 다른 전지 타락 발효추출물 샘플의 항염증 활성을 측정하기 위해 위에 기술된 방법으로 T 림프구에서 각 각의 cell viability와 항염증 활성을 측정하였다. 이 때 사용되어진 T 림프구는 생쥐 RMA cell을 사용하였으며 6 well plate에 각 well 당 2×10^5 cells씩 seeding하고 대식세포 항염증 측정 방법과 동일한 조건으로 배양기에서 배양하였다. 이 때 T 림프구의 활성을 증진시키기 위해 PMA (10 ng/ml)와 ionomycin (1 µg/ml)을 세포 배양 시 첨가하였다. 그 후 PI staining과 유세포 분석기(flow cytometry)로 cell viability를 측정하였고, IL-2와 IFN- γ 의 발현양을 RT-PCR로 측정하였다. 이 때 사용되어진 primer의 sequence, GenBank access number, RT-PCR product size는 Table 2에 명시하였다. 그 결과 대식세포의 결과와 마찬가지로 전지 타락 발효추출물 분획 샘플은 세포 독성이 낮은 반면 T 림프구 염증반응을 억제하지 않는 것으로 확인되었다(Fig 16, Fig 17).

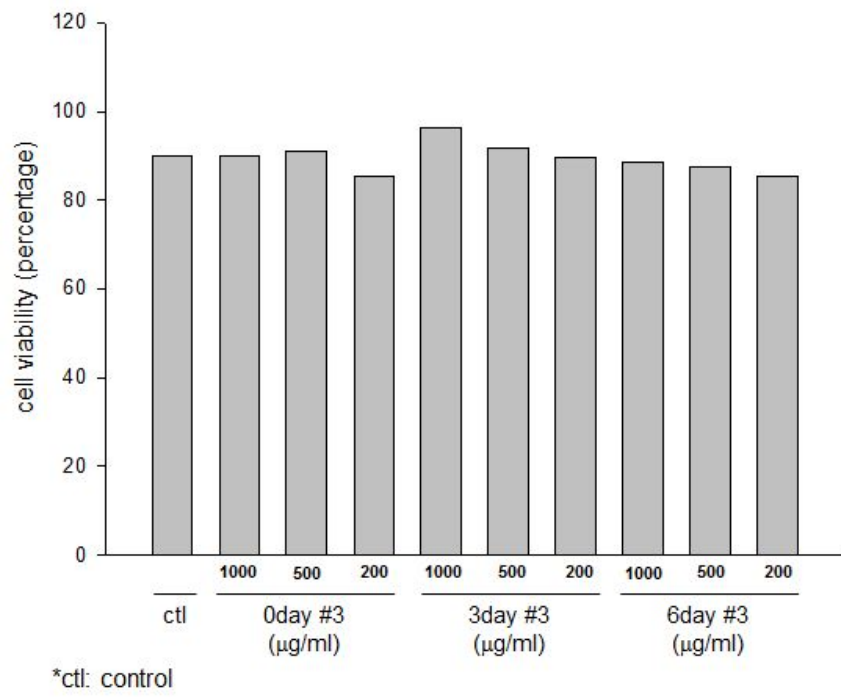


Fig 16. 전지 타락 발효 추출물의 서로 다른 분획 샘플의 T 림프구 cell viability 변화 측정.

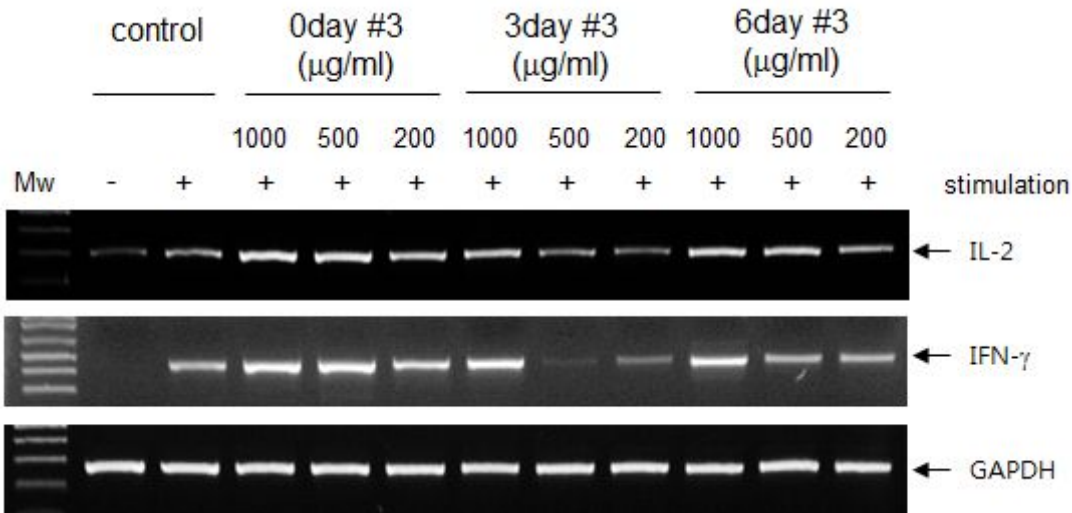


Fig 17. 전지유 타락 발효추출물의 서로 다른 분획 샘플의 T 림프구 항염증 작용 평가.

또한 전지 타락 발효추출물 샘플이 T 림프구의 세포 증식(cell proliferation)에 미치는 영향을 측정하기 위해 위에서 기술한 방법과 동일한 방법으로 MTT assay를 이용하여 세포 증식을 측정하였다. 측정결과 전지 타락 발효 추출물 샘플은 T 림프구의 세포 증식을 억제하지 않는 것으로 나타났다(Fig 18).

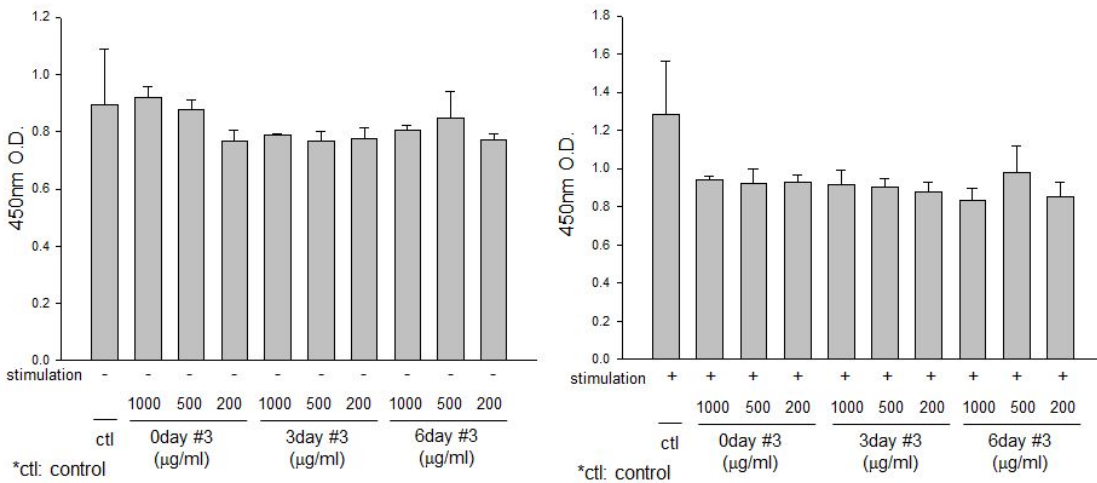


Fig 18. 전지 타락 발효추출물 샘플의 T 림프구 증식 평가. Control, 전지 타락 발효추출물을 안 넣어준 배지. 좌측 그림, T 림프구를 stimulation 하지 않고 전지 타락 발효추출물을 넣어준 배지. 우측 그림, T 림프구를 PMA (10 ng/ml)와 ionomycin (1 μg/ml)으로 stimulation 하고 전지 타락 발효추출물을 넣어준 배지.

3. 유기농 전지 타락 발효추출물의 T 림프구 항염증 활성 측정

만들어진 서로 다른 유기농 전지 타락 발효추출물 샘플의 항염증 활성을 측정하기 위해 위에 기술된 방법으로 T 림프구에서 각각의 cell viability와 항염증 활성을 측정하였다. 이 때 사용되어진 T 림프구는 생쥐 RMA cell을 사용하였으며 6 well plate에 각 well 당 2×10^5 cells씩 seeding하고 대식세포 항염증 측정 방법과 동일한 조건으로 배양기에서 배양하였다. 이 때 T 림프구의 활성을 증진시키기 위해 PMA (10 ng/ml)와 ionomycin (1 μ g/ml)을 세포 배양 시 첨가하였다. 그 후 PI staining과 유세포 분석기(flow cytometry)로 cell viability를 측정하였고, IL-2와 IFN- γ 의 발현양을 RT-PCR로 측정하였다. 이 때 사용되어진 primer의 sequence, GenBank access number, RT-PCR product size는 Table 2에 명시하였다. 그 결과 유기농 전지 타락 발효추출물 샘플 중 발효 3일차 3번 추출물의 경우 세포 독성이 낮은 반면 1000 μ g/ml의 농도에서 T 림프구 염증반응을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다(Fig 19, Fig 20).

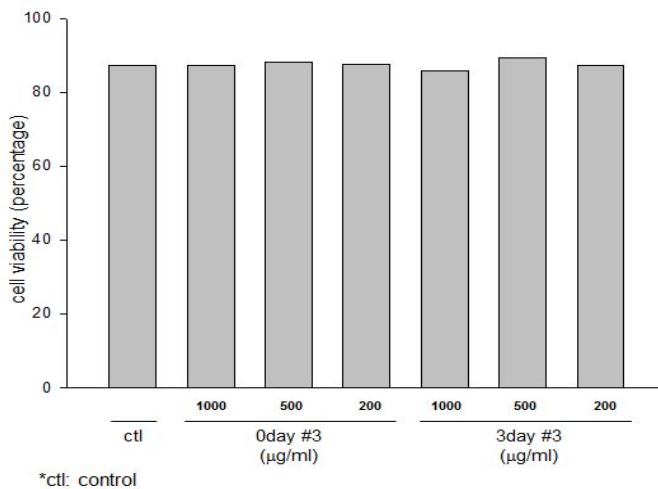


Fig 19. 유기농 전지 타락 발효추출물의 서로 다른 분획 샘플의 T 림프구 cell viability 변화 측정.

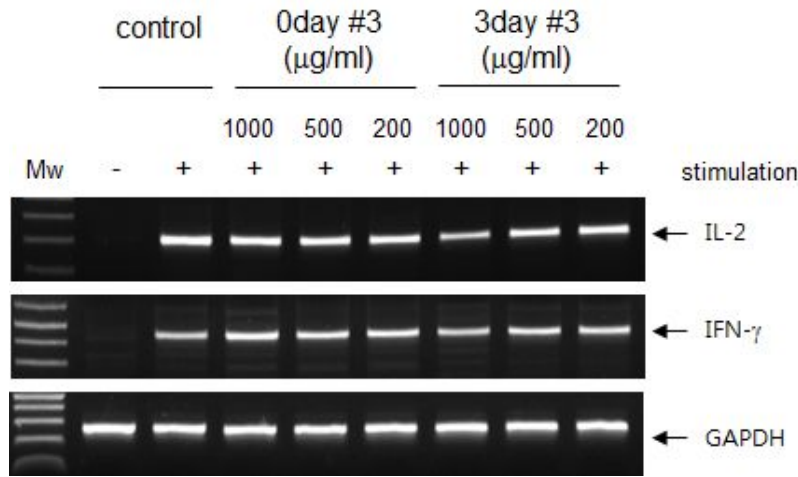


Fig 20. 유기농 전지 타락 발효추출물의 서로 다른 분획 샘플의 T 림프구 항염증 작용 평가.

그 후 유기농 전지 타락 발효추출물 분획이 T 림프구 활성화 시 분비되는 주요 cytokine의 분비를 억제하는 원인이 세포 증식을 억제하기 때문인가를 고찰하기 위해, T 림프구 배양 시 발효 3일차 3번 분획(3day #3)을 첨가하고 MTT assay를 이용하여 세포 증식을 측정하였다. 그 결과 발효 3일차 3번 분획은 T 림프구의 세포 증식을 감소시키는 것으로 나타났다(Fig 21).

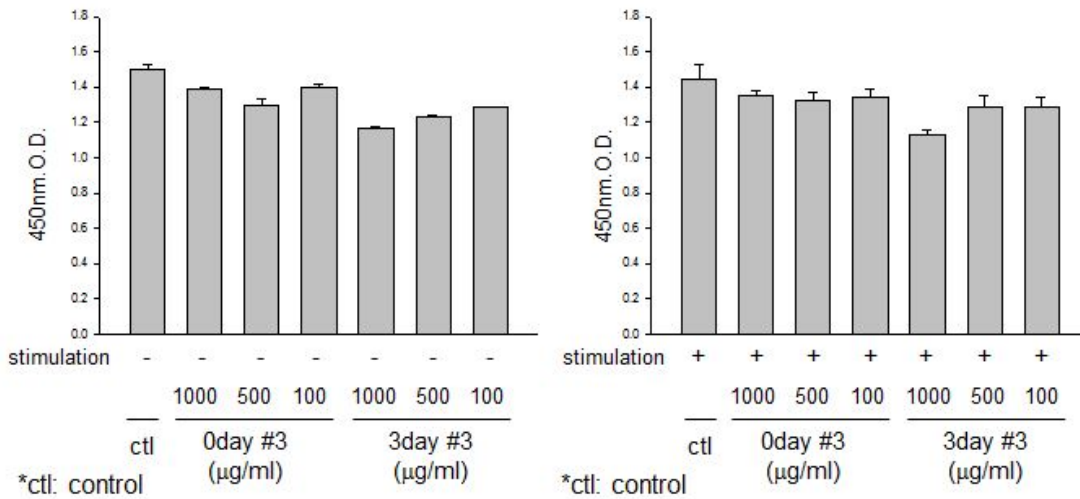


Fig 21. 유기농 전지 타락 발효추출물 샘플의 T 림프구 증식 평가. Control, 유기농 전지 발효추출물을 안 넣어준 배지. 좌측 그림, T 림프구를 stimulation 하지 않고 유기농 전지 타락 발효추출물을 넣어준 배지. 우측 그림, T 림프구를 PMA와 ionomycin으로 stimulation 하고 유기농 전지 타락 발효추출물을 넣어준 배지.

3) 장염증 동물모델에서의 타락 발효 추출물의 항염증 효과 검증

세포주 실험에서 항염증효과가 있는 것으로 확인된 탈지 타락 발효추출물과 유기농 전지 타락 발효추출물을 이용하여 소동물 모델에서 검증을 하였다. 소동물 모델은 검증하려는 시료를 1~2주간 투여한 뒤 장에 인위적으로 염증유발물질인 DSS (dextran sodium sulfate; 분자량 5000, Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)를 투여하여 장내 염증을 유발하였다. 그 뒤에 장 질환에 따른 병변이 어떻게 변화하는지를 측정, 평가하였다.

가. 탈지 타락 발효추출물의 장염증 동물모델에서의 항염증 효과 검증

8주령 암컷 Balb/c 생쥐를 샘타코에서 구입하였다. 생쥐들은 실험 전 1주일 동안 12시간 마다 낮과 밤이 바뀌는 온도 22°C의 사육실에서 적응기간을 가졌다. 생쥐들은 4개의 실험군으로 나뉘었는데, 첫 번째 실험군은 PBS만 처리하였고 두 번째 실험군부터 네 번째 실험군까지는 4% DSS를 자유급수 하면서 100 mg/kg bw의 농도의 sulfasalazine (SIGMA, USA), 500 mg/kg bw의 농도의 탈지 타락 발효추출물(6day 3번 샘플)을 각각 세 번째, 네 번째 실험군에 처리하였다. 이 때 사용되어진 sulfasalazine은 장염증의 치료제로 사용되며(Weber et al., 2000), sulfasalazine 처리군은 양성 대조군으로 사용하였다. 또한 PBS 처리군은 음성 대조군으로 사용하였다. 각 실험군은 각각 3마리의 생쥐를 사용하였다(N=3).

탈지 타락 발효추출물 등 시료는 DSS 처리 7일 전부터 투여하였고, DSS는 7일간 처리하여 염증유발을 하였다. 따라서 탈지 타락 발효추출물 등 시료는 총 14일 동안 경구투여 하였다. DSS를 7일간 처리 후, DSS 급여를 중단하였으며, 그 후 7일간 장염증의 회복 속도에 대한 관찰기간을 가졌다. 결국 탈지 타락 발효 추출물 등 시료 처리 후 3주 후에 실험동물들을 희생시켜 장 질환에 따른 병변을 측정하였다(Fig 22). Table 3은 동물실험에 사용된 각 처리군의 약어이다.

Day	1 to 7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
procedure	pre-treatment	DSS treatment							Observation							
		Daily Body Weight and Food Intake														colon collection

Fig 22. 동물실험 설계

약어	이름
Untreat	PBS 만을 처리한 실험군(음성대조군)
DSS	DSS 만을 처리한 군
SSZ	DSS와 sulfasalazine 처리군(양성대조군)
63	DSS와 탈지유 6day 3번 처리군

Table 3. 장염증 모델에서 각 실험군의 약어.

DSS로 유도된 대장염의 임상평가는 체중변화량, 장 길이의 변화 등으로 수행하였다(Rumi et al., 2004). 각 실험군의 생쥐들은 DSS를 처리한 뒤 14일 후에 희생되었고, 그 후 체중변화량, 장 길이의 변화를 측정하였다. 그 결과 Fig 23, Fig 24에서 보는 것과 같이 탈지 타락 발효추출물을 처리한 군에서는 PBS만을 처리한 군에 비해, 월등히 체중 변화가 증가되며 장 길이도 유지되는 것을 알 수 있었다.

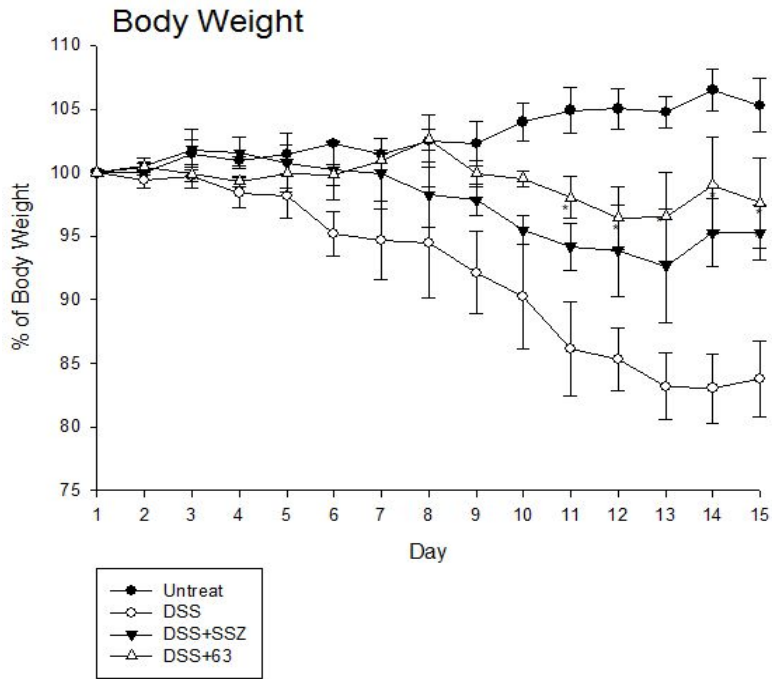


Fig 23. 장염증 모델에서 각 실험군의 체중변화량.



Group	Colon length (cm)	Colon weight (mg)
Untreated (n=2)	8.55 ± 0.05	0.881 ± 0.003
DSS (n=3)	6.50 ± 0.29	0.744 ± 0.046
DSS + SS (n=3)	7.73 ± 0.15	0.823 ± 0.029
DSS + 탈지유63 (n=3)	7.27 ± 0.15	0.732 ± 0.059

Fig 24. 장염증 모델 실험 후 각 실험군의 장 길이.

장염증 모델에서 각 실험군의 조직학적 검사는 각 동물의 대장 말단 부분을 샘플로 해서 수행되었다. 샘플은 10% 포르말린 용액에 고정되었고 에탄올로 탈수를 한 후에 파라핀에 고정하였다. 그 후, 4 micron-thick section을 준비하고 H&E (hematoxylin과 eosin) 염색을 수행하였다(Dieleman et al. 1998). 염색 후 모든 조직학적 평가는 블라인드 상태에서 validated scoring system으로 진행되었다. 결국, H&E 염색으로 염증과 crypt 손상 부분을 평가하며, 장 점막 손상 정도는 조직학적 심각도 점수와 crypt 부분의 감소 정도에 따라 평가된다(Howarth et al., 1998). 평가 결과 DSS를 처리한 쥐의 대장 부분은 심한 inflammatory response와 crypt loss를 보여주고 상피세포의 파괴와 염증성 세포의 침입을 보여준다(Fig 25). 그러나 탈지 타락 발효추출물(6day#3) 샘플은 정도의 차이는 있지만 조직의 증상을 완화시키는 것을 볼 수 있다(Fig 25).

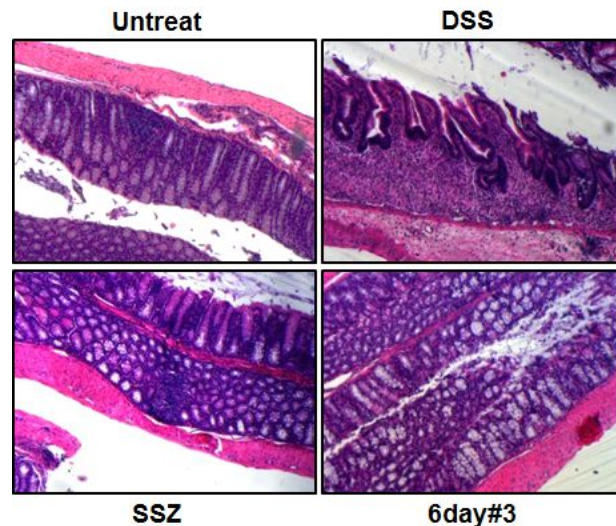


Fig 25. 장염증 모델 실험 후 H&E 염색에 의한 각 실험군의 조직학적 검사

2차 림프기관 중 장 염증과 관련된 draining lymph node는 mesenteric lymph node (MLN)로 알려져 있으며, MLN은 점막 면역계에 중요한 2차 림프기관이다. 따라서, MLN에 존재하는 면역세포의 주요 cytokine mRNA의 발현 양상에 따라 장 염증 정도를 측정할 수 있다(Mantovani et al., 1992). 장염증 모델 실험 후 각 실험군에서 total RNA를 MLN에서 추출하였다. Total RNA 추출은 TRIzol reagent를 사용하여 실시되었다. 그 후 RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)을 시행하여 mRNA 발현 정도를 분석하였다. RT-PCR 조건은 95°C에서 5분동안 pre-denaturation 한 후, 35 cycle의 amplification cycle (95°C, 30sec → 60°C, 30sec → 72°C, 30sec)을 진행 하였다. 마지막 extension은 72°C에서 10분간 진행 하였다. GAPDH는 internal control로써 사용했다. 이 때 사용되어진 primer의 sequence, GenBank access number, RT-PCR product size는 Table 4에 명시하였다.

Table 4. 장 염증 모델에서 mesenteric lymph node (MLN) 내 면역세포의 활성 측정 방법에 사용된 RT-PCR primer set.

<i>Gene name</i>	<i>GenBank Accession No.</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequence (5'-3')</i>	<i>Size (bp)</i>
IL-1β	NM_008361.3	Forward	CCAGGATGAGGACATGAGCACC	358
		Reverse	ATCCACACTCTCCAGCTGCAGG	
TNF-α	NM_013693.2	Forward	GACGTGGAAGTGGCAGAAGAGG	502
		Reverse	TGACGGCAGAGAGGAGGTTGAC	
IFN-γ	NM_008337.2	Forward	CTGAGACAATGAACGCTACACAC TGC	433
		Reverse	AACAGCTGGTGGACCACTCGGAT	
GAPDH	NM_0020463	Forward	ATGACCACAGTCCATGCCATC	271
		Reverse	CCTGCTTCACCACCTTCTTG	

실험 결과 Fig 26과 같이 DSS 만을 처리한 군(DSS)에서는 PBS 만을 처리한 실험군(control)보다 염증성 cytokine인 TNF- α , IFN- γ , IL-1 β 의 발현양이 현저히 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 DSS와 sulfasalazine 처리군(SSZ)은 이 세 가지 cytokine 모두가 저해되는 것을 볼 수 있다. 또한 DSS와 탈지유 타락 발효추출물 처리군(6day#3)에서도 이 세 가지 cytokine이 중등도로 감소되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 볼 때, 탈지유 타락 발효추출물은DSS로 유발되는 염증의 시작을 일정 부분 억제한다는 결론을 얻을 수 있었다.

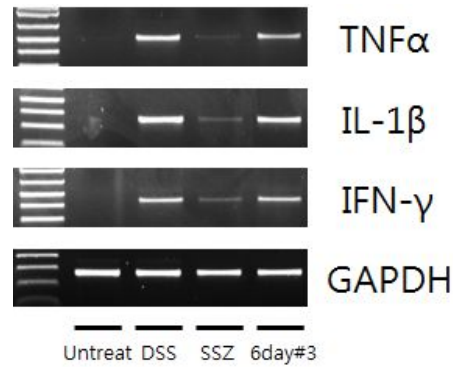


Fig 26. 장 염증 모델에서 mesentric lymph node (MLN) 내 면역세포의 활성화 측정 결과 (RT-PCR 결과). Untreat, PBS 만을 처리한 실험군; DSS, DSS만 처리한 실험군; SSZ, DSS와 sulfasalazine을 처리한 실험군; 6day#3, DSS와 탈지 타락 발효추출물을 처리한 실험군.

나. 유기농 전지 타락 발효추출물의 장염증 동물모델에서의 항염증 효과 검증

8주령 암컷 Balb/c 생쥐를 샘타코에서 구입하였다. 생쥐들은 실험 전 1주일 동안 12시간 마다 낮과 밤이 바뀌는 온도 22°C의 사육실에서 적응기간을 가졌다. 생쥐들은 5개의 실험군으로 나뉘었는데, 첫 번째 실험군은 PBS만 처리하였고 두 번째 실험군에는 4% DSS를 투여하였다. 세 번째 실험군부터 다섯 번째 실험군까지는 4% DSS를 자유급수 하면서 100 mg/kg bw의 농도의 sulfasalazine (SIGMA, USA), 500 mg/kg bw의 농도의 유기농 전지 타락 발효추출물(0day 3번 샘플), 500 mg/kg bw의 농도의 유기농 전지 타락 발효추출물(3day 3번 샘플)을 실험군에 처리하였다. 이 때 사용되어진 sulfasalazine은 장 염증의 치료제로 사용되며(Weber et al., 2000), sulfasalazine 처리군은 양성 대조군으로 사용하였다. 또한 PBS 처리군은 음성 대조군으로 사용하였다. 각 실험군은 각각 5 마리의 생쥐를 사용하였다(N=5).

동물실험의 설계는 탈지 타락 발효추출물과 같이 설계하였다(그림 22). 표 5는 동물실험에 사용된 각 처리군의 약어이다.

Table 5. 장염증 모델에서 각 실험군의 약어.

약어	이 름
Untreat	PBS 만을 처리한 실험군(음성대조군)
DSS	DSS 만을 처리한 군
SSZ	DSS와 sulfasalazine 처리군(양성대조군)
03	DSS와 유기농 전지유 타락 발효추출물 0day 3번 처리군
33	DSS와 유기농 전지유 타락 발효추출물 0day 3번 처리군

DSS로 유도된 대장염의 임상평가는 체중변화량, 장 길이의 변화 등으로 수행하였다(Rumi et al., 2004). 각 실험군의 생쥐들은 DSS를 처리한 뒤 14일 후에 희생되었고, 그 후 체중변화량, 장 길이의 변화를 측정하였다. 그 결과 Fig 27, Fig 28에서 보는 것과 같이 유기농 전지 타락 발효추출물을 처리한 군에서는 PBS만을 처리한 군에 비해, 월등히 체중 변화가 증가되며 장 길이도 유지되는 것을 알 수 있었다.

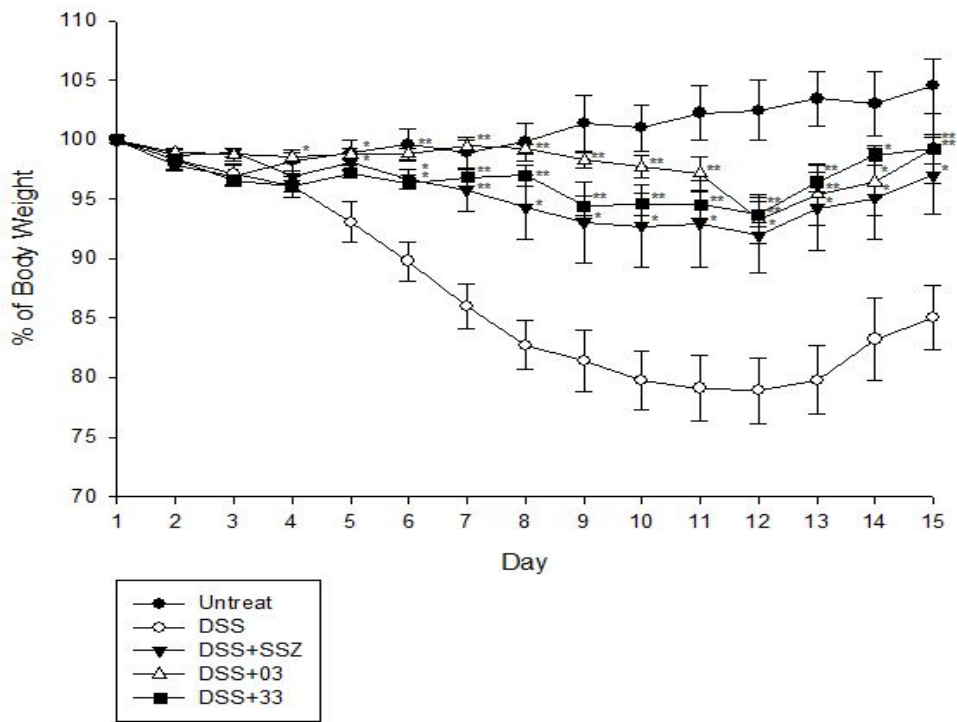


Fig 27. 장염증 모델에서 각 실험군의 체중변화량.

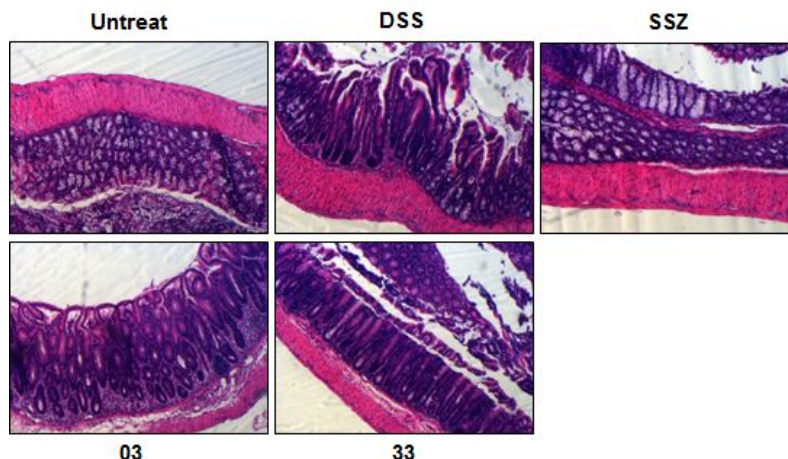


Group	Colon length (cm)	Colon weight (mg)
Untreated (n=5)	7.48 ± 0.14	0.656 ± 0.029
DSS (n=5)	6.18 ± 0.40	0.526 ± 0.088
DSS + SS (n=5)	6.98 ± 0.26	0.682 ± 0.066
DSS + 타락03 (n=5)	7.24 ± 0.11	0.737 ± 0.038
DSS + 타락33 (n=5)	6.82 ± 0.23	0.723 ± 0.041

Fig 28. 장염증 모델 실험 후 각 실험군의 장 길이.

장염증 모델에서 각 실험군의 조직학적 검사는 각 동물의 대장 말단 부분을 샘플로 해서 수행되었다. 샘플은 10% 포르말린 용액에 고정되었고 에탄올로 탈수를 한 후에 파라핀에 고정하였다. 그 후, 4 micron-thick section을 준비하고 H&E (hematoxylin과 eosin) 염색을 수행하였다(Dieleman et al. 1998). 염색 후 모든 조직학적 평가는 블라인드 상태에서 validated scoring system으로 진행되었다. 결국, H&E 염색으로 염증과 crypt 손상 부분을 평가하며, 장 점막 손상 정도는 조직학적 심각도 점수와 crypt 부분의 감소 정도에 따라 평가된다(Howarth et al., 1998). 평가 결과 DSS를 처리한 쥐의 대장 부분은 심한 inflammatory response와 crypt loss를 보여주고 상피세포의 파괴와 염증성 세포의 침입을 보여준다(Fig 29). 그러나 유기농 전지 타락 발효 추출물샘플은 정도의 차이는 있지만 조직의 증상을 완화시키는 것을 볼 수 있다(Fig 29).

Fig 29. 장염증 모델 실험 후 H&E 염색에 의한 각 실험군의 조직학적 검사



2차 림프기관 중 장 염증과 관련된 draining lymph node는 mesenteric lymph node (MLN)로 알려져 있으며, MLN은 점막 면역계에 중요한 2차 림프기관이다. 따라서, MLN에 존재하는 면역세포의 주요 cytokine mRNA의 발현 양상에 따라 장 염증 정도를 측정할 수 있다(Mantovani et al., 1992). 장염증 모델 실험 후 각 실험군에서 total RNA를 MLN에서

추출하였다. Total RNA 추출은 TRIzol reagent를 사용하여 실시되었다. 그 후 RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)을 시행하여 mRNA 발현 정도를 분석하였다. RT-PCR 조건은 95°C에서 5분동안 pre-denaturation 한 후, 35 cycle의 amplification cycle (95°C, 30sec → 60°C, 30sec → 72°C, 30sec)을 진행 하였다. 마지막 extension은 72°C에서 10분간 진행 하였다. GAPDH는 internal control로써 사용했다. 이때 사용되어진 primer의 sequence, GenBank access number, RT-PCR product size는 Table 4에 명시하였다.

실험 결과 Fig 30과 같이 DSS 만을 처리한 군(DSS)에서는 PBS 만을 처리한 실험군(control)보다 염증성 cytokine인 TNF- α , IFN- γ , IL-1 β 의 발현양이 현저히 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 DSS와 sulfasalazine 처리군(SSZ)은 이 세 가지 cytokine 모두가 저해되는 것을 볼 수 있다. 그러나 DSS와 유기농 전지 타락 발효추출물 처리군에서는 이 세 가지 cytokine이 감소되지 않았다. 이러한 결과를 토대로 볼 때, 유기농 전지 타락 발효추출물은 DSS로 유발되는 임상 증상을 일정 부분 억제하지만 면역학적 염증의 억제를 통해서가 아닌 다른 경로를 통해 임상 증상을 완화하는 것으로 생각된다.

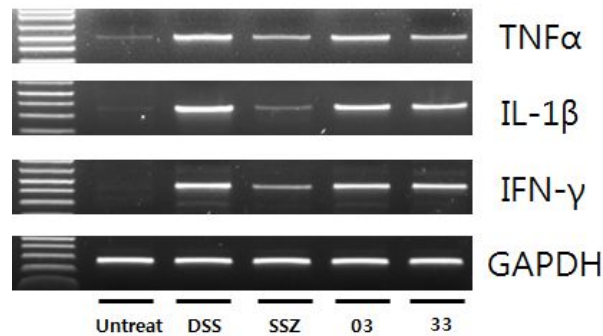


Fig 30. 장 염증 모델에서 mesentric lymph node (MLN) 내 면역세포의 활성화 측정 결과 (RT-PCR 결과). Untreat, PBS 만을 처리한 실험군; DSS, DSS만 처리한 실험군; SSZ, DSS와 sulfasalazine을 처리한 실험군; 03, DSS와 유기농 전지 타락 발효추출물(0일차 3번 추출물)을 처리한 실험군; 33, DSS와 유기농 전지 타락 발효추출물(3일차 3번 추출물)을 처리한 실험군.

IV 참고문헌

C. S. Huh. Development of Korean Dairy Industry – Fermented milk products. *J. Korean dairy Technol. Sci.* 23(2): 146~153, (2005)

(사)수운잡방 음식연구원. 수운잡방. 컴퍼니 마요 (2011)

이효지, 조신호, 정낙원, 차경희 편역. 임원십육지 정조지. 교문사 (2007)

Attie, A. D., Scherer, P. E. Adipocyte metabolism and obesity. *J. Lipid Res.* 50 Suppl: S395–399 (2009)

Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199–1200 (1958)

Berg, R. V. D., Haenen, G. R. M.M., Berg, H. V. D., Bast, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 66: 511–517 (1999)

Chang YH, Lee ST, Lin WW. Effects of cannabinoids on LPS stimulated inflammatory mediator release from macrophages: Involvement of eicosanoids. *J. cell Biochem.* 81: 7115–723 (2001)

Chung C. The historical background of Milk and its health effedct. *Korean J, Diary Sci. Technol.* 28(1): 29–33 (2010)

Cushman, D. W., Cheung, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin–converting enzyme of rabbit lung. *Biochem.Pharmacol.* 13: 1637–1648 (1971)

Dannenber AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, Subbaramaiah K. Cyclo–oxygenase–2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol.* 2: 544–551 (2001)

Dubois RN, Abramson SB, CroffordL, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12: 1063–1073 (1998)

Horst, D., Grimaldi, P. A. New factors in the regulation of adipose differentiation and

metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 13: 241–245 (2002)

Kim, H. S., Chae, H. S., Jeong, S. G., Ham, J. S., Im, S. K., Ahn, C. N., Lee, J. M. Antioxidant Activity of Some Yogurt Starter Cultures. *Asian Aus. J Anim.Sci.* 18: 255–258 (2005)

Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agriculture Food Chem.* 50: 3713–3717 (2002)

Kim J. B., Spiegelman B. M. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 10: 1096–1097 (1996)

Lie, J. R., Chen, M. J., Lin, C. W. Antimutagenic and antioxidant properties of milk–kefir and soymilk–kefir. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2467–2474 (2005)

McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Exp. Biol. Med.* 211: 24–32 (1996)

Masao, S., Kazunori, U., Takeshi, Y., Essam M, H., Hiroshi, K., Hiroaki, M., Ibrahim A, A. Katsumi, I. Effects of milk by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. *Brit. J. Nutr.* 99: 1013–1017 (2008)

Mathew S., Abraham T. E. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food Chem. Toxicol.* 44: 198–206 (2006)

Ramirez–Zacarias, J. L., Castro–Munozledo, F., Kuri–Harcuch, W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red o. *Histochem. Cell Biol.* 96: 493–497 (1992)

Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P. Spiegelman, B. M. Transcriptional regulation of adipogenesis, *Gene Develop.* 14: 1293–1307 (2001)

Sanlidere A. H., Oner, Z. Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *J. Dairy Sci.* 94: 5305–5314 (2011)

- Student, A. K. Hsu, R. Y. Lane, M. D. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 255: 4745–4750 (1980)
- Huang, C., Zang, Y. Gong, Z. Berberine inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through the PPAR gamma pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348: 571–578 (2006)
- Wang, S. J., Lee, H. J., Cho, J. Y., Park, K. H. & Moon, J. H. Isolation and Identification of Antioxidants from Makgeolli. *Korean J. Food Sci Technol.* 44: 14–20 (2012)
- Wang M., Li, J., Rangarajan M., Shao, Y., La Voie, E. J., Huang, T., Ho, C. Antioxidative phenolic compounds from Sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.* 46: 4869–4873 (1998)
- Xu, S. P., Mao, X. Y., Ren, F. Z., Che, H. L. Attenuating effect of casein macropeptide on proliferation, differentiation, and lipid accumulation of in vitro Spargue–Dawley rat preadipocytes. *J. Dairy Sci.* 94: 676–683 (2011)
- Lee HM, Lee Y. A differential medium for lactic acid–producing bacteria in a mixed culture. *Lett. Appl. Microbiol.* 46: 676–681 (2008)
- Jung TH, Kim NC, Park HS, Kwak HS. The effect of starter culture on viscosity of stirred yogurt. *J. Korean Dairy Technol. Sci.* 24: 65–73 (2006)
- Kim MS, Ahn ES, Shin DH. Physico–chemical properties of commercial yoghurt in Korea. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25: 340–344 (1993)
- Jeong EJ, Park LY, Lee SH. Changes of immuno–activity in yogurt prepared with immunized milk containing anti–*Helicobacter pylori* antibody. *J. Korean Soc. Food Sci.* 35: 985–989 (2006)
- Bae HC, Paik SH, Nam MS. Fermentation properties of rice added yogurt made with various lactic acid bacteria. *J. Anim. Sci. Technol.* 46: 677–686 (2004)
- Lee SI, Lee S, Kim HS. Preparation and quality characteristics of yogurt added with *Saururus chinensis*(Lour.) bail. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 411–416 (2002)
- Kim GM, Shin JH, Kang MJ, Yang SM, Sung NJ. Preparation and characteristics of yogurt added with garlic powder. *J. Agri. Life Sci.* 44: 49–56 (2010)
- Brashears MM, Jaroni D, Trimble J. Isolation, selection, and characterization of

- lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J Food Prot.* 66: 355–363 (2003)
- Ashraf R, Shah NP. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt. *Int. J. Microbiol.* 149: 194–208 (2011)
- Shah NP, Shihata A. Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. *Int. Dairy J.* 12: 765–772 (2002)
- Leroy F, Vuyst LD. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends. Food Sci. Tech.* 15: 67–78 (2004)
- Hugas M, Monfort JM. Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chem.* 59: 547–554 (1997)
- Castele S, Vanheuverzwijn T, Ruyssen T, Assche P, Swings J, Huys G. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *Int. Dairy J.* 16: 1470–1476 (2006)
- Charalampopoulos D, Pandiella SS, Webb C. Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *J. Appl. Microbiol.* 92: 851–859 (2002)
- Lee SG, Han KS, Jeong SG, Oh MH, Jang A, Kim DH, Bae IH, Ham JS. A study on the sensory characteristic of yogurt and antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* LHC52 isolated from Kimchi. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 30: 328–335 (2010)
- Lee JY, Lee SK, Cho NJ, Park WJ. Development of the formula for natural bread-making starter. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 1245~1252 (2003)
- So MH, Kim SH, Oh HJ, Park SY. Identification of lactic acid bacteria isolated from gel-type yoghurt in Korea and cell count by species. *Korean J. Food Sci. Resour.* 14: 204–210 (1994)

주 의

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

용역연구과제 검사조서

과 제 명	전통발효유 타락의 발효특성과 건강기능성 규명		
주 관 연구기관	기관명	소재지	대 표
	성신여자대학교 산학협력단	서울시 성북구 동선동3가	안중우
주관연구 책 임 자	성 명	소속 및 부서	
	한영숙	성신여자대학교 식품영양학과	
연구기간	2011 년 12 월 30 일 ~ 2012 년 12 월 29 일(12개월)		
용역연구비	금 일억오천오백만원정 (₩ 155,000,000)		
구 분	계 획	실 적	
연구목표 및 내용	‘별지 작성’		<ul style="list-style-type: none"> ○ 최종검사를 통해 1월 31일 까지 수정·보완하여 제출하겠습니다. ○ 식품과학회, 한국식품조리과학회에 투고 예정.

상기 용역연구과제를 확인·검사합니다.

2012 년 12 월 27 일

검사자 : 성신여자대학교 식품영양학과 교수

성명 : 한영숙 (인 또는 서명)

‘ 별지 ’

연구개발의 목표 및 내용

- 제 1 세부과제: 전통발효유 타락의 스타터 개발
 - 본 타락의 수집 및 선별
 - 선별된 타락의 발효 미생물 균총 파악
 - 타락의 우점균 분리 및 확인
 - 발효 재현성 있는 스타터 개발

- 제 2 세부과제: 전통발효유 타락의 *in vitro* 건강기능성 규명
 - 전통발효유 타락의 추출물 제조 및 계통 분석 조건 확립
 - 전통발효유 타락의 항산화 효과 분석
 - 전통발효유 타락의 항고혈압 효과 분석
 - 전통발효유 타락의 항비만 효과 분석
 - 전통발효유 타락의 항염증 효과 분석

- 제 3 세부과제: 전통발효유 타락의 *in vivo* 건강기능성 규명
 - 염증성 장 질환 소동물 모델(생쥐모델) 확립
 - 염증성 장 질환 소동물 모델(생쥐모델)에서 전통발효유 타락의 항염증 효능 평가

연구성과보고서

과제개요					
과제명	전통발효유 타락의 발효특성과 건강기능성 규명				
주관연구기관	성신여자대학교	주관연구책임자		한영숙	
세부연구기관	성신여자대학교	세부연구책임자		한영숙	
	국민대학교			임지영	
	고려대학교			전태훈	
연구연차	연구기간				용역연구비(단위:천원)
	시작년도	시작월	종료년도	종료월	
1차년도	2011 년	12 월	2012 년	12 월	155,000
2차년도	년	월	년	월	
연구성과 (핵심어 중심 요약 작성)					
내 용	연구계획서			연구성과	
연구목적	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우리 식문화에서 발효유 이용 역사 재조명 및 타락의 가치 부각 ○ 전통발효유 타락의 전통제법 재현을 통한 발효특성 규명 ○ 전통발효유 타락제조에 필요한 스타터 개발을 통한 표준화 ○ 전통발효유 타락의 건강기능성 규명을 통한 과학적 우수성 확보 				
연구내용	<p>제 1 세부과제: 전통발효유 타락의 스타터 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 전통발효유 타락의 전통제법 재현 ○ 이화학 특성 및 관능 특성 분석 ○ MCA(microbial community analysis)를 통한 타락의 우점균 파악 ○ 분리 젖산균, 효모를 이용한 스타터 개발 및 재현성 평가 <p>제 2 세부과제: 전통발효유 타락의 <i>in vitro</i> 건강기능성 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 전통발효유 타락의 추출물 제조 및 계통 분획 조건 확립 ○ 전통발효유 타락의 항산화 효과 분석 ○ 전통발효유 타락의 항고혈압 효과 분석 ○ 전통발효유 타락의 항비만 효과 분석 ○ 전통발효유 타락의 항염증 효과 분석 <p>제 3 세부과제: 전통발효유 타락의 <i>in vivo</i> 건강기능성 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Balb/c 생쥐를 이용하여 DSS을 이용한 염증성 장 질환 소동물 모델(생쥐모델) 확립 ○ 타락 발효 추출물의 면역 세포 내 항염증 활성 측정 및 기전분석을 분석 ○ 염증성 장 질환 소동물 모델(생쥐모델)에서 타락 발효 추출물의 항염증 효능 평가 				