

91800
7-4

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
포스트게놈다부처유전체연구개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004046-01

오믹스 연구 기반 전통누룩 유래 양조 미생물 자원의 산업화

2022.03.29

주관연구기관 / 한국식품연구원
협동연구기관 / 국순당

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

오믹스연구기반전통누룩유래양조미생물자원의산업화

2021

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

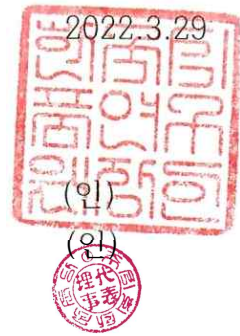
제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “오믹스 연구 기반 전통누룩 유래 양조 미생물 자원의 산업화”(개발기간 : 2018. 4. 25 ~ 2021. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

주관연구기관명 : 한국식품연구원 (대표자) 백형희
협동연구기관명 : 국순당 (대표자) 배상민



주관연구책임자 : 김재호
협동연구책임자 : 신우창

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

최종보고서

최종보고서						보안등급 일반 [●], 보안[]	
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명	사업명	포스트게놈 다부처 유전체사업	
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)			
공고번호				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
				연구개발과제번호		918007-4	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB1702	50 %	LB1703	50 %	%	
	농림식품과학기술분류	PA0102	70 %	PA0199	30 %	%	

총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문						
		영문						
연구개발과제명		국문	오믹스 연구 기반 전통누룩 유래 양조 미생물 자원의 산업화					
		영문	Genomics based research on industrialization of valuable microbes originated in traditional Nuruk					
주관연구개발기관		기관명	한국식품연구원		사업자등록번호	129-82-02585		
		주소	(우) 55365 전라북도 완주군 이서면 농생명로 245		법인등록번호			
연구책임자		성명	김재호		직위	책임연구원		
		연락처	직장전화			휴대전화		
			전자우편			국가연구자번호		

연구개발기간	전체		2018. 04. 25 - 2021. 12. 31. (45개월)				
	단계 (해당 시 작성)	1단계	2018. 04. 25 - 2019. 12. 31 (21개월)				
		2단계	2020 01. 25 - 2022 12. 31 (24개월)				

연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담			그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비 외 지원금
		연구개발비	연구개발비		지방자치단체		기타()		현금	현물	합계	
			현금	현금	현물	현금	현물	현금				
총계	872,000	29,200	262,800					901,200	262,800	1,164,000		
1단계	1년차	189,000	6,300	56,700				195,300	56,700	252,000		
	2년차	207,000	6,900	62,100				213,900	62,100	276,000		
2단계	1년차	238,000	8,000	72,000				246,000	72,000	318,000		
	2년차	238,000	8,000	72,000				246,000	72,000	318,000		

공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고		
						역할	기관유형	
공동연구개발기관	(주) 국순당	신우창	연구소장			연구소 장	중소기업	
위탁연구개발기관								
연구개발기관 외 기관								
연구개발담당자 실무담당자		성명	최재웅		직위	원급		
		연락처	직장전화			휴대전화		
			전자우편			국가연구자번호		

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다

2022 년 3 월 29 일
 연구책임자: 김재호 (인)
 주관연구개발기관의 장: 한국식품연구원장 백형희
 공동연구개발기관의 장: 국순당 배상민



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	포스트게놈 다부처 유전체사업	총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	1545020938		
내역사업명 (해당 시 작성)		연구개발과제번호	918007-4		
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB1702	50%	LB1703	50%
	농림식품 과학기술분류	PA0102	70%	PA0199	30%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)					
연구개발과제명	오믹스 연구 기반 전통누룩 유래 양조 미생물 자원의 산업화				
전체 연구개발기간	2018. 04. 25 - 2021. 12. 31. (45개월)				
총 연구개발비	총 1,164,000 천원 (정부지원연구개발비: 872,000 천원, 기관부담연구개발비 : 292,000 천원)				
연구개발단계	기초[] 응용[] 개발[●] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]	기술성숙도 (해당 시 기재)	착수시점 기준() 종료시점 목표()		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)					
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)					

연구개발 목표 및 내용	최종 목표	<p>NGS 기반 유전체 기술을 활용하여 전통누룩 유래 고기능성 미생물을 종균화하고 고부가가치 기능성 제품으로 산업화 함</p> <ul style="list-style-type: none"> -Omics 정보분석 기반 우수 전통누룩 연구 -전략미생물 유전체, 대사체 정보 분석 -산업화 기술개발 및 안정성 확보 -전통누룩 유래 건강기능성 유전자원 발굴
	전체 내용	<p>○오믹스 연구기반 전통누룩 유래 양조미생물 자원의 산업화</p> <p>● 전통누룩 유래 고기능성 효모 및 곰팡이 균주 발굴</p> <ul style="list-style-type: none"> - 전통누룩에서 230여종 콜로니 분리 후 저온내성, 아황산내성 확인 및 글루타치온 고생산 고기능성 효모 발굴 - 100여종 곰팡이를 분리하여 발효력 및 관능특성 우수 황국 균주개발 <p>● 효모의 프로바이오틱스 특성확인 및 우수 효모 균주 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 내산성, 내담즙성, 당이용성, 장부착능 등의 다양한 특성을 통해 프로바이오틱스화 가능한 효모 <i>S. cerevisiae Boulardii</i>-02를 비롯한 2가지 균주를 발굴하고, 유전체 분석 및 동물실험을 통해 우수성 확보 <p>● 누룩 유해물질 저감을 위한 발효조건 및 유산균 자원 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> - 곰팡이에 의해 발생하는 유해물질인 아플라톡신을 저감화를 목표로, 생성 억제 유산균 스크리닝 (<i>W. paramesenteroides</i>, <i>P. pentosaceus</i> 등) 및 유전체 분석, 기능 유전자, 작용기작 확인 <p>● 아세트알데하이드 저감화 생물자원 발굴 및 적응진화 기반 개량</p> <ul style="list-style-type: none"> - 숙취 유발물질 중에 하나인 아세트알데하이드를 분해할 수 있는 프로바이오틱스 균주(<i>P. acidilactici</i>, <i>S. cerevisiae</i>)를 전통누룩에서 발굴하여, Non-GMO 방식인 아세트알데하이드에 200 세대 이상 적응 진화를 진행하여 균주개량 및 유전체 분석, 동물실험을 진행하여 유효성 확보 <p>○전통누룩 유래 고기능성 미생물 자원을 활용한 고부가가치 제품 개발</p> <p>● 지역기반 전통누룩 양조 및 효소특성 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 경기도, 강원도에 존재하는 전통누룩을 복원 및 다양한 특성 분석을 진행하여 지역기반 맞춤형 전통누룩제조 표준화 및 SOP 작성 <p>● 전통누룩의 과학적 해석 및 제조기술 표준화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 전통누룩에 존재하는 우점 곰팡이를 선정하여 누룩제조 및 술 발효 공정을 통한 특성평가, 관능평가를 거쳐 개량누룩 개발

● **전통누룩 유래 Probiotics 제재 및 효모를 통한 고부가가치 제품 개발**
 - 양조에 적합한 유산균 및 효모를 선별 및 발효조건 최적화를 통하여 신규 Probiotics 막걸리 개발 및 기존 제품 Renewal, 발굴한 유산균을 고급 쌀소주 시제품에 적용하여 고부가가치 제품 개발

- 1) **전통누룩 유래 양조 미생물자원의 확보, 표준화 및 과학적 우수성 증명**
 - 전통누룩에서 다양한 미생물 자원을 확보하여 프로바이오틱스 제재 개발에 성공, 전통누룩의 문제점 중에 하나인 아플라톡신을 저감화하는 유산균을 발굴 및 유전체 및 대사체를 이용하여 오믹스 데이터를 통한 메커니즘 분석
 - 아세트알데하이드 저감화 프로바이오틱스 균주의 스크리닝 및 적응진화를 통한 생물자원을 개량하였으며 동물실험을 통해 컨셉을 증명
- 2) **전통누룩 및 양조 미생물의 현대화를 통한 고부가가치 주류 제품개발**
 - 전통누룩의 현대화를 통해 SOP 확립 및 개량누룩 개발하였으며 이를 통해 우수 양조 미생물 발굴, 기존제품 Renewal 및 신규 제품을 개발하여 제품화에 성공
- 3) **정량적 성과**

성과 목표	사업화지표							연구기반지표								
	지식 재산권		기술 실시 (이전)		사업화			학술성과				교육 지도	정책 활용홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허 출원	특허 등록	건수	기술료	제품화	매출액	고용 창출	논문		학술 발표	정책 활용		홍보 전시			
								SC I	비 SC I			논문 평균 IF				
단위	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	건	건		건	건	건	건		
가중치	10	10	15	15		10	10			5	5		5	10	5	
최종목표	3	2	2	100	4	1,400	3	3	1	2.0	4	8	1	4	2	
1차년도	목표			1	50		100	1			1	2		1		
	실적			0	0			1			1	2		2		
2차년도	목표	1				1	200		1		2.5	1	2	1	1	
	실적	3	1	1	40	1	0		2		1.7	3	2	2	1	
3차년도	목표	1	1	1	50	1	200			1		1	2	1	1	
	실적	1			0	2	2,529		1		2.5		2			
4차년도	목표	1	1			2	300		2		1.5	1	2		1	
	실적	1	2	1		2	5,379			1			1		1	
소계	목표	3	2	2	100	4	1,400	3	3	1	2.0	4	8	1	4	2
	실적	4	4	2	40	4	7,807	1	3	1	2.0	4	6	0	5	0

- 연구개발성과 활용계획 및 기대 효과
- 1) 본 연구를 통해 개발된 전통누룩 유래 생물자원의 라이브러리에서 다양한 후속 기능성 미생물제품이 개발가능하고, 추후 건강기능식품 개별인증형까지 나아갈 수 있는 소재원을 확보한 점에서 본 연구의 우수성이 있음
- 2) 지역맞춤형 누룩의 표준화를 통해 경기도, 강원도 이외의 지역 누룩의 표준화 및 양조과정을 표준화하여 다양한 제품군을 개발할 수 있는 발판을 마련하였고, 제품화 노화우를 통해 추후 고부가가치 제품군을 계속해서 개발 할 수 있을 것으로 기대

연구개발성과의 비공개여부 및 사유												
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	4	5					4		2			
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	전통누룩		양조		프로바이오틱스		효모		곰팡이			
영문핵심어 (5개 이내)	Nuruk		Brewing		Probiotics		Yeast		Fungi			

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요.....	8
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용.....	12
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도.....	172
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성).....	184
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도.....	185
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획.....	185

별첨 자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

1. 연구개발 목표 및 결과

1-1. 최종목표

○ NGS 기반 유전체 기술을 활용하여 전통누룩 유래 고기능성 미생물을 종균화 하고 고부가가치 기능성 제품으로 산업화 함

※ 본 과제에서의 “기능성”의 의미는 발효능, 풍미·향미 등 미생물 및 제품 자체 고품질 특성 뿐 아니라 대사·면역 등 생리기능 향상 및 개선 기능을 포함함



1-2. 연구개발 목표 및 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2018)	오믹스 연구기반 전통누룩 유래 양조미생물 자원의 산업화	전통누룩 유래 미생물 자원의 고기능성 특성 발굴	•고기능성 미생물 균주 탐색 및 확보	•글루타치온 고생성 효모 선발 및 양조적성 평가 •우수 곰팡이 균주를 활용한 한국 제조공정 확립
		기 개발 균주의 유전체 분석 및 핵심유전자 발현 최적화 조건 설정	•기 유전체 분석 균주의 진화적 위치 분석	•98-5 균주의 다양한 활용 확장 가능성을 제시
		유해물질 저감 누룩 발효조건 연구	•아플라톡신 고,저생성 누룩의 메타지놈 분석 •누룩 유래 곰팡이의 아플라톡신 생성확인 •A. flavus 생육억제 균주 탐색	•전통누룩 유래 곰팡이의 안전성 확인 •A. flavus 생육억제 유산균 발굴
		유산균의 발효에의 영향 분석	•시료(누룩) 확보 및 유산균주 분리 •16S RNA sequencing (partial)	•균주 확보 : 누룩 유래 유산균 24종, 효모 230종, 분석용 전통발효식품 유래 유산균 98종) •유산균 122종의 partial sequencing data 확보 •In vitro test set-up
	전통누룩 유래 고기능성 미생물 자원을 활용한 고부가가치 제품 개발	지역기반 전통누룩 양조 및 효소학적 특성 분석	• 경기, 강원 지역기반 전통누룩 제조 • 효소학적 특성 분석 (당화력, 단백질분해력 등) • 양조 특성 분석	• 지역기반에 따른 전통누룩 특성 규명 및 평가 • 효소학적 차이 분석 • 양조 발효 특성 확인
	미생물학적 특성 분석 (효모, 유산균, 누룩곰팡이)	• 지역기반 전통누룩 내 미생물 평가	• 정성, 정량 차이 분석 평가(효모류, 유산균류, 누룩곰팡이)	

				<ul style="list-style-type: none"> • 누룩곰팡이 3종 분리 • 표준화 항목 설정(두께) • 성형 두께에 따른 특성 규명 및 평가 • 분리 누룩곰팡이 이용 개량누룩 시험 생산 및 특성 양조 특성 평가
		전통누룩의 과학적 해석 및 제조기술 표준화 마련	<ul style="list-style-type: none"> • 전통누룩 성형 두께에 따른 특성 분석 • 개량누룩 시험 생산 	
		기 선별된(1단계) 전통누룩 유래 유산균 특성 탐색 및 신규 유전자원 확보	<ul style="list-style-type: none"> • 양조 활용을 위한 특성 평가 • Probiotics 능 평가 • 신규 유전자원 선별 	<ul style="list-style-type: none"> • 기 분리 유산균 및 신규 유산균에 대한 평가 (알코올 내성, 내산성, 내담즙성) • Probiotics로 활용 가능한 미생물 선별 (효모, 유산균, 고초균류)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
2차 년도 (2019)	오믹스 연구기반 전통누룩 유래 양조미생물 자원의 산업화	전통누룩 유래 미생물 생리 기능성 발굴	•전통누룩 유래 프로바이오틱스 활성을 갖는 효모 발굴 및 탁주 적용 연구	•프로바이오틱 효모 개발 및 기능성 평가완료 (특허출원) •산업화 기술이전 완료
		고기능성 균주의 기능유전 체 분석	•곰팡이 독소 억제 유산균 균주의 유전체 분석 •아세트알데하이드 적응 진화된 균주의 유전체분석	•아플라톡신 생산 곰팡이 생육억제 유산균의 비교유전체분석 •적응진화 균주의 genome 특성 분석
		선발 균주의 기능성 특성 발굴	•우수 황국 곰팡이 발굴 및 산업화 연구 •전통누룩 유래 아황산 및 저온 내성을 갖는 효모 균주 발굴	•우수 황국 곰팡이 적용 탁주기술개발, 기술이전 •아황산 및 저온내성 균주 개발 및 양조특성 평가 중
		건강기능성 유전자원 소재 화를 위한 유산균 특성 평 가	•숙취저감을 위한 아세트알데하이드 분해 활성 유산균 특성 평가	•아세트알데하이드 적응 진화 균주 개발 및 genome 특성 확인
		지역 기반 맞춤형 누룩 메 타지놈 분석	• 지역 기반 맞춤형 누룩 제조 표준화 및 매뉴얼화	• 성형 및 발효 조건에 따른 전통누룩 특성 규명 및 제조 표준화 마련 • 양조 발효 특성 확인
	전통누룩 유래 고기능성 미생물 자원을 활용한 고부가가치 제품 개발	전통누룩 유래 효모 특성 규명 및 추가 선별	• 효모, 양조 특성 분석	• 신규 효모 3종 양조 및 관능 특성 평가
		선발 유산균의 probiotics 효과 검증	• 전통누룩 유래 신규 유산균, 관능 및 기능적 특성 평가 • Probiotics 효과 검증	• 신규 유산균 3종 및 기 선별 유산균 1종 평가 (내산성/내알코올성/주류·음료 적합성 평가)
		전통누룩 유래 미생물 유전 자원 맞춤형 pool 구축	• 전통누룩 유래 미생물 유전자원 최종 선별 • 미생물 별 고부가가치 기능성 제품 활용 기준 마련 및 분류	• 효모, 발효 비율 및 원료이용률 기반 pool 구축 • 유산균, 고농도 배양 및 산미 기반 pool 구축
		Probiotics 검증된 유산균의 종균화 및 제재화	• 고농도 배양 조건 확립 • 종균 및 제재화 공정 최적화	• 식물성 천연물 배양 및 식품원료 기반 배지 구축 • 동결 건조 조건 최적화
		Probiotics 적용 기능성 시제 품(주류/음료) 레시피 개발	• 전통누룩 유래 Probiotics 유산균을 활용한 시제품 레시피 개발 및 공정 마련(발효온도 및 기간 등)	• Prebiotics 적용 기능성 주류 레시피 개발 (제조방법신고) • Probiotics 적용 기능성 음료 레시피 개발

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차 년도 (2020)	오믹스 연구기반 전통누룩 유래 양조미생물 자원의 산업화	전통누룩 안전성 확보 연구	<ul style="list-style-type: none"> 전통누룩 유래 유산균의 antifungal 후보물질 선별 전통누룩 유래 유산균의 antifungal 후보물질 동정 	<ul style="list-style-type: none"> Antifungal 특성을 갖는 유산균 2종, <i>W. paramesenteroides</i>와 <i>P. pentosaceus</i> 발굴 antifungal 후보물질 12 종 분석
		선행연구에서 확보된 우수종균 및 지역기반 전통누룩 유래 우수 균주 활용 제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> 프로바이오틱 미생물 소재 개발 저온발효능이 뛰어난 향미 우수 균주 선발 야황산 내성 균주 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 시판중인 <i>S. Boulardii</i> 균주와 유사한 수준의 전통누룩 유래 효모 선발 및 probiotics 효능 평가
		아세트알데하이드 저감화 개량 균주의 특성 확인	<ul style="list-style-type: none"> 아세트알데하이드 분해능이 개선된 유산균의 유전적 및 효소적 특성확인 	<ul style="list-style-type: none"> 아세트알데하이드 분해능이 증대된 Oxidoreductase의 발굴
		숙취 저감화 효모 균주의 발굴 및 개량	<ul style="list-style-type: none"> 숙취요소 제거를 위한 아세트알데하이드 분해 효모 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 적응진화를 통한 개량된 효모균주의 확보 및 Glutathione 생산량 증가된 균주특성 확인
	전통누룩 유래 고기능성 미생물 자원을 활용한 고부가가치 제품 개발	기능성 주류 레시피, 제조공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> 기능성 주류 최적 레시피 및 공정 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 유산균 사균체 활용한 프리바이오테 제품 출시 (20년 1월 출시)
			<ul style="list-style-type: none"> 기능성 주류 맞춤형 유산균 고농도 배양 기술 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 고농도 배양 기술을 통해 수출용 프리바이오테 저칼로리 제품 개발 (21년 출시 예정)
			<ul style="list-style-type: none"> 맞춤형 효모 대량 배양 기술 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 맞춤형 효모 적용 국순당 생막걸리 Renewal (20년 6월 출시)
			<ul style="list-style-type: none"> 유산균을 이용한 원료 쌀 전처리 기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 고알콜 고급 쌀소주 시제품화 (21년 출시 예정)
			<ul style="list-style-type: none"> 유산균을 이용한 한국형 sour-beer 레시피 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> 유산균을 이용한 한국형 sour-beer 레시피 완료 (21년 출시 예정)
		주류 pilot scale 시험 생산	<ul style="list-style-type: none"> 유산균 고농도 배양 30L / 300L Scale-up 	<ul style="list-style-type: none"> 유산균 고농도 배양 300L 매뉴얼 확립
			<ul style="list-style-type: none"> 맞춤형 효모 대량 배양 5L / 30L / 3,000L Scale-up 	<ul style="list-style-type: none"> 효모 대량 배양 3,000L 매뉴얼 확립 및 제품 적용증
			<ul style="list-style-type: none"> 고알콜 고급 쌀소주 5L/ 30L / 3,000L Scale-up 	<ul style="list-style-type: none"> 쌀소주 3,000L 담금, 증류 및 숙성증
제품 기호도, 기능성, 안정성, 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> 수출용 프리바이오테 (저칼로리), 국순당 생막걸리, 쌀소주 기호도, 안정성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 기존 및 경쟁 제품 대비 우수 평가 		

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
4차 년도 (2021)	오믹스 연구기반 전통누룩 유래 양조미생물 자원의 산업화	전통누룩의 안전성 확보	• 전통누룩 및 탁주에 존재하는 아플라톡신 확인	• 아플라톡신 고함유 저함유 누룩 확인 및 진균분석 완료, 탁주에서 생성되는 아플라톡신 검출
		전통누룩의 유해 진균 저해를 위한 항진균 유산균 확보	• 비표적 대사체 분석과 항진균력을 통한 유산균 스크리닝	• 항진균력이 뛰어난 <i>Weiseella paramesenteroids</i> N44-2 균주 발굴 및 유전체 분석
		전통누룩 및 미생물 표준화 기술 개발	• Reverse Engineering을 통해 균주 표준화 기술 개발 및 핵심 SNP 요소 확인하기 위한 SNP 도입	• Oxidoreductase의 SNP 도입한 균주가 아세트알데하이드 조건에서 높은 성장능력을 보여주는 것 확인
		전통누룩 유래 고기능성 유전자원 소재화 및 산업적 활용	• 동물실험을 통한 소재화 및 산업적 적용 가능성 확인	• 알콜성 유도 동물 모델에서 대조군 대비 프로바이오틱스 투여군이 혈중 아세트알데하이드, 알코올 저감화 되는 것을 확인
4차 년도 (2021)	전통누룩 유래 고기능성 미생물 자원을 활용한 고부가가치 제품 개발	기능성 시제품 Scale-up 공정 최적화	• 기능성 주류 맞춤형 효모/유산균 적용 제품개발	• <i>S. cerevisiae</i> KSD-YC, <i>Lb. plantarum</i> KSD-KM7 활용한 국순당 생막걸리 리뉴얼(21년 5월 출시) <i>Lb. plantarum</i> KSD-KM7 활용한 수출용 1000억 막걸리 개발(21년 2월 출시)
			• 유산균을 이용한 원료 쌀 전처리 기술 개발	• 고급 쌀소주 '백세고' 적용(22년 1월 출시)
			• 유산균을 이용한 한국형 sour-beer 시제품 개발	• 유산균을 이용한 한국형 sour-beer 제품 개발 (22년 출시 예정)
		대량 생산시 Lot별 제품 표준화, 균일 생산 매뉴얼 구축	• 제품별 최적 품질 구현을 위한 생산 매뉴얼 구축	• 국순당 생막걸리 4만L 생산 매뉴얼 확립 • 고급 쌀소주 '백세고' 3,000L 매뉴얼 확립 • 한국형 sour-beer 500L 매뉴얼 확립
			시험 제품의 기호도, 기능성, 안전성 및 안정성 평가	• 국순당 생막걸리, 백세고 기호도, 안정성 평가
		• 제품 활용 유산균의 항산화 활성 평가		• 표준 균주 대비 항산화 효과 양호
		제품 출시 및 사업화	• 제품 출시를 위한 제조 및 품목 신고	• 국순당 생막걸리 리뉴얼 • 고급 쌀소주 '백세고' 출시

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

가. 전통누룩 유래 미생물 자원의 고기능성 특성 발굴

(1) 고기능성 효모 및 곰팡이 균주 개발

○ Glutathione 고생성 균주 개발

Glutathione은 글루탐산, 시스테인 및 글리신의 세개의 아미노산이 펩티드 결합한 tripeptide로 항산화 효과가 매우 뛰어나고, 암생성 억제, 면역강화 등의 기능이 있는 것으로 알려져 있다. 특히 Glutathione은 자연계에 널리 분포되어 있지만 효모의 세포내에 일부 존재하여 효모 기반 시스템에서 대량생산을 시도하는 연구가 보고된 바 있다. 따라서 본 연구에서는 glutathione-rich 효모를 선발, 막걸리의 발효균주로 사용하여 막걸리 최종제품의 glutathione 함량을 증가시키고자, glutathione-rich 효모균주 선발을 위한 스크리닝을 수행하였다.

막걸리의 고 기능성 증진을 위해 β -glucan함량이 높으면서 동시에 glutathione-rich 특성을 지닌 효모를 선발하기 위해 β -glucan함량이 높은 효모균주를 대상으로 균체 추출물의 glutathione 함량을 분석해 기능성 균주를 선발하였다

○ Glutathione 고생성 균주 선발을 위한 배양 및 추출

보유하고 있는 효모 균주는 PDB (10mL)배지에서 25°C에서 72시간 동안 배양하였다. 배양한 효모를 3000rpm에서 5분 간 원심 분리 한 후 상등액 9mL은 버리고, pellet 1mL을 beads bottle에 옮겼다. 이를 다시 원심 분리하여 상등액 1mL을 버리고, pellet만 남겼다. 여기에 cold-methanol(100%)을 1mL 넣은 후, 6500rpm으로 20초간 2회 반복하여 균질화(homogenize) 하였다. 균질화 한 효모를 24시간 동안 실온 추출한 뒤, 원심 분리하여 얻은 상등액을 최종 샘플로 하여, UPLC-Q-TOF/MS로 분석하였다.

○ Glutathione 분석

Glutathione 분석은 UPLC system(Agilent 1290 Infinity)과 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight(Q-TOF, Agilent 6520 with jet stream technology)를 이용하여 분석하였다. ESI+Jet stream 방식으로 positive 이온화 모드에서 gas temp. 350°C, drying gas flow 12L/mL, nebulizer pressure 45psi, Vcap 2000V, skimmer voltage 65V, fragmentor voltage 170V로 설정하였다. 이동상은 0.1% formic acid in DW(A)와 0.1% formic acid in ACN(B)의 gradient mode를 사용하였고 유속은 0.9ml/min로 분석하였다. 컬럼은 ACE Excel C18 column(3 μ m, 4.6 \times 150 mm) 을 사용하였고 컬럼 온도는 30°C, injection volume은 0.3 μ L 였다.

분석을 위한 UPLC-Q-TOF/MS 분석 조건은 다음과 같다.

Analysis condition	
System	UPLC system : UHPLC: Agilent 1290 Infinity, USA, Agilent, CA, USA) Q-TOF mass spectrometer (Agilent 6520 with Jet Stream Technology, Agilent)
Column	ACE Excel UHPLC column (EXL-111-1546U, C18, 3µm, 4.6×150 mm)
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in H2O B: 0.1% formic acid in ACN
Column oven / Injection	30°C / 3µL (flow rate: 0.9mL)
Ect	Nebulizer flow 30psi, dry gas flow rate 12L/min, dry gas temperature 350°C, capillary voltage 4kV, skimmer voltage 65V, fragmentor voltage 170V

○ Glutathione 고생성 균주 선발

앞서 선발된 β-glucan 고함유 효모 중 glutathione 생성량이 높은 효모를 선발하였다. 1차 선발된 *Saccharomyces cerevisiae* 효모 배양액의 glutathione 함량을 분석한 결과 대략 1.0–3.16 mg/L 범위로 평균 2.3 mg/L의 농도를 보였다. 분석된 결과를 토대로 glutathione 함량이 높은 *S. cerevisiae* Y-10(89-3-1) 균주를 막걸리의 synbiotics 기능증진을 위한 효모로 선발하였으며 선발된 균주는 *S. cerevisiae* 89-3-1로 명명하였다. *S. cerevisiae* BGG 균주는 알코올 발효력이 뛰어나고, 25.95%의 β-glucan 함량을 갖고 있었으며 배양액의 glutathione 함유량이 3.13 mg/L로 다른 균주에 비해 두 기능성 물질의 함유량이 높아 막걸리의 기능성 증진을 위한 발효균주로 적합하였다.

표 1. Glutathione 고생성 효모 선발을 위한 유효성분 분석 결과

Yeast No	glutathione contents (mg/L)	β-glucan contents (% w/w, dry basis)
Y-1	2.57	7.68±0.63
Y-2	2.11	17.57±1.62
Y-3	2.18	10.88±0.96
Y-4	1.49	7.59±2.38
Y-5	2.05	20.18±1.68
Y-6	2.45	18.61±0.74
Y-7	1.85	18.01±2.64
Y-8	2.06	13.38±0.84
Y-9	2.80	22.16±0.83
Y-10	3.13	25.95±0.76
Y-11	2.94	19.40±1.39
Y-12	2.50	15.35±0.34
Y-13	2.72	17.21±0.12
Y-14	1.58	13.88±0.14
Y-15	-	11.94±0.24
Y-16	1.08	14.83±0.44
Y-17	2.16	24.66±0.90
Y-18	2.83	10.90±0.31
Y-19	2.32	26.83±1.22
Y-20	2.60	18.77±0.31
Y-21	1.95	18.43±0.56
Y-22	2.86	23.67±1.19
Y-23	2.27	19.05±1.23

Y-24	2.67	22.29±0.42
Y-25	2.42	15.99±0.20
Y-26	2.35	22.71±0.67
Y-27	1.72	17.62±1.35
Y-28	1.62	16.92±0.92
Y-29	3.04	14.52±1.03

○ 고기능성 효모 선발

전통누룩 유래 효모 중 알코올 발효력이 뛰어난 효모를 1차 선발하여 양조에 적합한 *S cerevisiae*로 동정된 약 230종의 콜로니를 확보하였다. 확보된 각 콜로니는 다음 표 가-2와 같으며, 이를 대상으로 고기능성 효모 선발 연구를 진행 중에 있다. 선발을 위한 주요 효모 특성으로는 저온내성우수, 프로바이오틱 기능 보유, 아황상 내성 우수, acetaldehyde 고분해능 등이 있으며, 선발된 우수 균주는 양조에의 활용 또는 자체균주로서의 활용성 개발을 통해 산업화 할 예정이다.

표 2. 분리한 효모의 동정결과 및 알코올 발효능

Nuruk	Yeast NO	Yeast Identification	similarity (%)	Fermentation time		Alcohol(%)
				24H	48H	
NO 1 주곡방문	ReY1-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY1-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY1-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY1-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++	
	ReY1-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++	
	ReY1-6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY1-7	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
NO 2 추모곡	ReY2-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY2-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY2-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY2-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY2-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	1.73
	ReY2-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY2-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY2-8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
NO 3 오메기곡	ReY3-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY3-2	<i>Wickerhamomycesanomalus</i>	99	++	++	
	ReY3-3	<i>Wickerhamomycesanomalus</i>	99	++	++	
	ReY3-4	<i>Wickerhamomycesanomalus</i>	99	++	++	
	ReY3-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	1.35
	ReY3-6	<i>Wickerhamomycesanomalus</i>	99	+	++	
	ReY3-7	<i>Wickerhamomycesanomalus</i>	99	+	++	
	ReY3-8	<i>Wickerhamomycesanomalus</i>	99	+	++	
NO 4 죽곡	ReY4-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	1.71
	ReY4-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY4-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	1.41
	ReY4-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.56
	ReY4-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.55
	ReY4-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.69
	ReY4-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.35
NO 5 죽곡II	ReY5-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.29
	ReY5-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.57
	ReY5-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.03

	ReY5-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.65
	ReY5-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.61
	ReY5-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.66
	ReY5-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.50
NO 6 공병곡	Y6-2	<i>Pichia guilliermondii</i>	98	-	+	
	BY6-3	<i>Cryptococcus sp.</i>	99	-	+	
	ReY6-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY6-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY6-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.13
	ReY6-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY6-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY6-6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
NO 7 곡	Y7-T1	<i>Pichia burtonii</i>	99	-	+	
	Y7-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y7-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y7-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100	-	+	
	Y7-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY7-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY7-2	<i>Pichia anomala</i>	99	-	+	
	ReY7-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY7-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY7-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY7-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.46
	ReY7-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.67
NO 8 면곡	ReY8-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.10
	ReY8-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY8-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.68
	ReY8-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.80
	ReY8-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.95
	ReY8-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY8-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.07
NO 9 신곡	ReY9-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++	
	ReY9-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++	
	ReY9-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.61
	ReY9-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.64
	ReY9-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.14
	ReY9-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.61
	ReY9-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.87
NO 10 진주춘추곡	ReY10-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++	
	ReY10-2	<i>Pichia anomala</i>	99	+	++	
	ReY10-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++	
	ReY10-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++	
NO 11 여곡	ReY11-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.27
	ReY11-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.32
	ReY11-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.74
	ReY11-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	-	
	ReY11-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.99
	ReY11-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.81
	ReY11-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	

NO 12 설향곡	ReY12-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.53
	ReY12-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.98
	ReY12-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.06
	ReY12-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.90
	ReY12-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.83
	ReY12-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	-	
	ReY12-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
NO 13 설향곡	ReY13-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.81
	ReY13-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.09
	ReY13-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.05
	ReY13-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.14
	ReY13-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.37
	ReY13-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.04
	ReY13-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.87
NO 14 백곡	YF14-T1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	-	+	
	YF14-T2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	-	+	
	ReY14-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.47
	ReY14-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.36
	ReY14-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY14-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.89
	ReY14-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.13
	ReY14-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.57
	ReY14-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.88
NO 15 백곡Ⅱ	ReY15-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.75
	ReY15-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.31
	ReY15-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.29
	ReY15-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.22
	ReY15-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.82
	ReY15-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.54
	ReY15-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.26

NO 16 여곡	ReY16-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.91
	ReY16-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.03
	ReY16-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.38
	ReY16-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.01
	ReY16-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	-	
	ReY16-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.22
	ReY16-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.96
NO 17 분곡	ReY17-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.88
	ReY17-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY17-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	1.74
	ReY17-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	1.76
	ReY17-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+	++	
	ReY17-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+	++	
	ReY17-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+	++	
NO 18 병곡	Y18-T1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	-	+	
	Y18-T2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	-	+	
	Y18-T3	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	-	+	
	ReY18-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY18-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY18-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY18-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY18-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY18-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	1.60
	ReY18-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	1.54
NO 19 이화주곡	Y19-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y19-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y19-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	92	-	+	
	Y19-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	98	-	+	
	Y19-6	<i>Pichia anomala</i>	99	-	+	
	Y19-8	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y19-9	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100	-	+	
	Y19-10	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100	-	+	
	Y19-11	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y19-12	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	97	-	+	
	Y19-14	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	++	
	Y19-17	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	++	
	Y19-18	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	91	+	++	
NO 20 이화곡	Y20-6	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99	-	+	
	Y20-7	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y20-8	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99	-	+	
NO 21 조곡법	ReY21-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.09
	ReY21-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY21-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY21-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	

	ReY21-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY21-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
NO 22 향온곡	ReY22-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY22-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY22-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.39
	ReY22-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.15
	ReY22-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY22-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY22-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
NO 23 향온곡 II	ReY23-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.24
	ReY23-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY23-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY23-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++		3.40
	ReY23-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY23-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY23-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
NO 24 백수환동	Y24-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y24-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY24-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.75
	ReY24-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.70
	ReY24-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY24-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
NO 25 내부비전곡	Y25-T1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	-	+	
	Y25-T2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	100	-	+	
	ReY25-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY25-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY25-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY25-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.27
	ReY25-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY25-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
NO 26 녹미주곡	ReY26-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY26-2	<i>Saccharomyces bayanus</i>	99	++	+++	
	ReY26-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.28
	ReY26-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY26-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98	++	+++	
	ReY26-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++		3.22
	ReY26-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
NO 27 녹두곡	Y27-1	<i>Cryptococcus albidus</i>	100	-	+	
	Y27-2	<i>Cryptococcus albidus</i>	100	-	+	
	ReY27-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	0.82
NO 28 곡	Y28-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y28-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y28-3	<i>Pichia guilliermondii</i>	91	-	+	
	Y28-4	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	96	-	+	
	Y28-T5	<i>Pichia burtonii</i>	99	-	+	
	ReY28-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.27
	ReY28-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.22
	ReY28-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.41
	ReY28-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.08
	ReY28-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.66
	ReY28-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	5.20
	ReY28-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	5.11
NO 29 미곡	Y29-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y29-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100	-	+	
	ReY29-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY29-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY29-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY29-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.54
	ReY29-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.04
ReY29-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++		

	ReY29-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
NO 30 면곡	ReY30-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.90
	ReY30-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY30-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY30-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY30-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.58
	ReY30-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY30-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
NO 31 곡	Y31-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y31-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y31-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y31-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y31-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY31-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.52
	ReY31-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
NO 32 요곡	Y32-1	<i>Clavispora lusitania</i>	99	-	+	
	Y32-2	<i>Clavispora lusitania</i>	99	-	+	
	Y32-3	<i>Clavispora lusitania</i>	99	-	+	
	Y32-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100	-	+	
NO 33 대주백타곡	Y33-1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99	-	+	
	Y33-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y33-3S	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y33-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y33-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y33-6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
NO 34 백료곡	ReY34-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.73
	ReY34-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.10
NO 35 양능곡	ReY35-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY35-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.98
	ReY35-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.37
	ReY35-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY35-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.44
	ReY35-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.22
	ReY35-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.51
NO 39 정화곡	ReY39-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.05
	ReY39-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.54
	ReY39-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.57
	ReY39-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.07
	ReY39-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.14
	ReY39-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.93
	ReY39-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.00
NO 42 미곡	Y42-1	<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>kuezingii</i>	99	-	+	
	ReY42-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY42-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY42-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY42-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY42-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY42-6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
NO 43 신곡	ReY43-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.05
	ReY43-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.06
	ReY43-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.45
NO 45 신곡Ⅲ	Y45-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY45-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.62
	ReY45-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
NO 46 하동신곡	ReY46-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY46-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.33
NO 47	ReY47-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	

진주곡자 (얇은뱅이 밀)	ReY47-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.14
	ReY47-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.20
	ReY47-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.03
N○ 48 진주곡자 (금강밀)	Y48-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y48-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y48-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	95	-	+	
	Y48-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y48-T2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	95	-	+	
	ReY48-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY48-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY48-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.56
ReY48-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.10	
N○ 49 진주곡자 (미국산)	Y49-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y49-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y49-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y49-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y49-6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY49-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY49-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98	++	+++	
	ReY49-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY49-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	+++	-	3.45
	ReY49-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.47
	ReY49-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.63
ReY49-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.02	
ReY49-8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++		
N○ 50 송학곡자 (소울곡)	Y50-T1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	100	+	+	
	Y50-T2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	100	-	+	
	Y50-T3	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	100	-	+	
	Y50-T4	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	100	-	+	
	Y50-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	95	-	+	
	Y50-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	95	-	+	
	Y50-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	94	-	+	
	Y50-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	95	-	+	
	Y50-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	92	-	+	
	ReY50-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.38
	ReY50-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY50-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY50-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
N○ 51 심순분할머 니 누룩(우리 밀)	Y51-1	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99	-	+	
	Y51-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98	++	-	
	Y51-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	-	
	ReY51-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.78
	ReY51-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	5.27
	ReY51-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.78
	ReY51-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY51-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98	++	+++	
	ReY51-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
ReY51-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++		
ReY51-8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++		
N○ 52 심순분할머 니 누룩(이화 곡)	Y52-5	<i>Pichia farinosa</i>	99	-	+	
	Y52-S4	<i>Ogataea polymorpha</i>	99	+	++	
	Y52-7	<i>Ogataea polymorpha</i>	99	+	++	
	Y52-6	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99	+	++	
	Y52-1	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99	+	++	
	Y52-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95	++	-	
	ReY52-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.39

	ReY52-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
NO 53 푸른들농산	Y53-1	<i>Clavispora lusitaniae</i>	99	+	++	
	Y53-3	<i>Clavispora lusitaniae</i>	99	+	++	
	Y53-4	<i>Filobasidiella neoformans</i>	99	-	+	
	Y53-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++	
	Y53-6	<i>Cryptococcus albidus</i>	99	-	+	
	Y53-T1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	+	++	
	Y53-T2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	+	++	
	Y53-T3	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	-	+	
	Y53-T4	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	-	+	
	Y53-T5	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	-	+	
	ReY53-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY53-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	1.83
	ReY53-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY53-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
NO 54 금정산성누 룩	Y54-1	<i>Clavispora lusitaniae</i>	99	-	+	
	Y54-3	<i>Clavispora lusitaniae</i>	100	-	+	
	Y54-4	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99	-	+	
	Y54-5	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99	-	+	
	Y54-6	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99	-	+	
	ReY54-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	1.99
	ReY54-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.18
	ReY54-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.19
	ReY54-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY54-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY54-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
ReY54-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++		
NO 55 한산소곡주 누룩	Y55-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y55-3	<i>Pichia anomala</i>	99	-	+	
NO 56 술샘 (국샘미인 곡)	Y56-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y56-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY56-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.07
	ReY56-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.78
	ReY56-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY56-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY56-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY56-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
ReY56-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.44	
NO 57 이가수불 누룩	Y57-3	<i>Candida parapsilosis</i>	99	-	+	
	F57-W1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	-	+	
	F57-W2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	-	+	
	F57-W3	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	+	++	
	F57-W4	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	100	+	++	
	F57-W5	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	+	++	
	F57-W6	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	+	++	
	F57-W7	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	-	+	
	F57-W8	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	-	+	
	F57-W9	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	+	++	
	F57-P7	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	90	+	++	
	ReY57-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.00
	ReY57-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.83
	ReY57-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.10
	ReY57-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.82
ReY57-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.00	

	ReY57-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	4.00
	ReY57-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
N○ 58 송명섭누룩	Y58-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	Y58-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++	
	Y58-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++	
	Y58-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++	
	Y58-5	<i>Pichia kudriavzevii</i>	96	+	++	
	Y58-6	<i>Pichia kudriavzevii</i>	96	+	++	
	Y58-7	<i>Pichia kudriavzevii</i>	93	+	++	
	Y58-T1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	+	++	
	Y58-T2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	-	+	
	ReY58-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.73
	ReY58-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY58-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY58-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.46
	ReY58-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.44
	ReY58-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.05
ReY58-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++		
N○ 59 제주도 붉은보리누 룩	ReY59-1	<i>Pichia kudriavzevii</i>	98	-	+	
	ReY59-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	+++	-	2.50
	ReY59-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	1.74
	ReY59-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.27
	ReY59-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.83
	ReY59-6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	++	+++	
	ReY59-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	3.80
	ReY59-8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	+++	-	2.00
N○ 60 제주도 원다리누룩	ReY60-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++	
	ReY60-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++	
	ReY60-3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	+	++	
	ReY60-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY60-5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	
	ReY60-6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99	-	+	

○ 우수 황국균주 *Aspergillus oryzae* Singok 균주를 활용한 황국 제조기술 개발

선행연구를 통해 전통누룩 및 곡물로부터 분리한 곰팡이 100여종을 대상으로 당화력 및 산 생성능, 양조특성을 분석하여 최종 우수 황국균주 *Asp. oryzae* Singok을 선발하였다. 선발된 균주는 고품질 황국 제조에 활용함으로써 발효력 및 관능특성 우수한 탁주 제품 개발이 가능할 것으로 여겨진다.

○ 황국 품질 분석

황국의 산도는 첨가물 공전에 따라 입국 20g에 물 100ml를 가해 30°에서 3시간이상 침출하고 여과하여 이 여액 10ml에 혼합지시액 2~3방울을 가하여 0.1N 수산화나트륨용액으로 담홍색에서 옅은 청색으로 될 때까지 적정하여 산출하였다. 당화력은 2% 가용성 전분용액을 기질용액으로 하여 입국침출액을 55℃에서 1시간 효소반응 시킨 후 생성된 환원당의 양을 DNS법으로 측정하여 입국 1g이 가용성 전분 1g에 작용하여 생성된 포도당을 가용성 전분 1g에 대한 백분율인 당화율에 희석배수를 곱한 값을 당화력으로 나타내었다.

○ 황국 발효시간별 당화력 분석

전통누룩에서 분리된 우수 황국균주 *Asp. oryzae* Singok 균주를 활용한 황국 생산공정 확립을 위해 발효시간에 따른 황국의 당화력 분석을 실시하였다. 분석결과 황국의 색도 및

당화력을 고려하여 최종 파국 후 31-32 시간 후 건조공정을 수행하는 것이 바람직한 한 것으로 판단하였다(그림 2-7-8). 본 연구를 통해 개발된 우수 황국균을 활용한 황국제조기술은 기술이전 후 프리미엄 탁주 생산에 활용될 예정이다.

○ Aspergillus oryzae Singok 균주를 이용한 황국 제조

1 일	09:00-13:30	침지 ↓	4시간 30분
	13:30-14:30	탈수 ↓	1시간
	14:30-15:30	증자/뜸들이기 ↓	1시간
	15:30-16:30	냉각 ↓	1시간, 37~40℃
	16:30-17:30	접종 및 보쌈 ↓	종국 0.3~0.5% 파종, incubator 온도 35℃ 셋팅, 품온 35~36℃ 유지
2 일	17:30-09:00	15시간 30분 배양 ↓	15시간 30분 배양, incubator 온도 30℃ 셋팅
	09:00-09:30	1차 뒤섞기 ↓	품온 34~36℃ 유지 / 품온이 40℃ 넘지 않게 유의 보쌈해둔 고두밥의 내부는 하얗게 균사체가 펴. 외부는 마름, 마른 고두밥은 일부 제거 함
	13:30	4시간 뒤, 2차 뒤섞기 ↓	품온 34~36℃ 유지
	17:30	4시간 뒤 보쌈 풀어서 얇게 펴서 배양 ↓	품온 34~36℃ 유지
	21:30	4시간 뒤 갈아쌓기 ↓	품온 34~36℃ 유지 고두밥의 표면이 많이 마름, 멸균수 뿌려줌
3 일	01:30	4시간 뒤 갈아쌓기 ↓	고두밥의 표면이 많이 마름, 일부 포자가 피기 시작하여 전체적으로 색이 어두워짐
	03:30	2시간 뒤 갈아쌓기 ↓	멸균수 뿌려 둔 고두밥은 쌀알이 물러지면서 갈색으로 변함(일부 폐기). 한번 마른 고두밥은 균사가 잘 피지 않음. 포자가 피기 시작하여 전체적으로 색이 어두워짐
	05:30	출국 ↓	포자가 펴서 파종 36시간 경과 후 출국
	05:50-	건조시작	4~5시간 건조

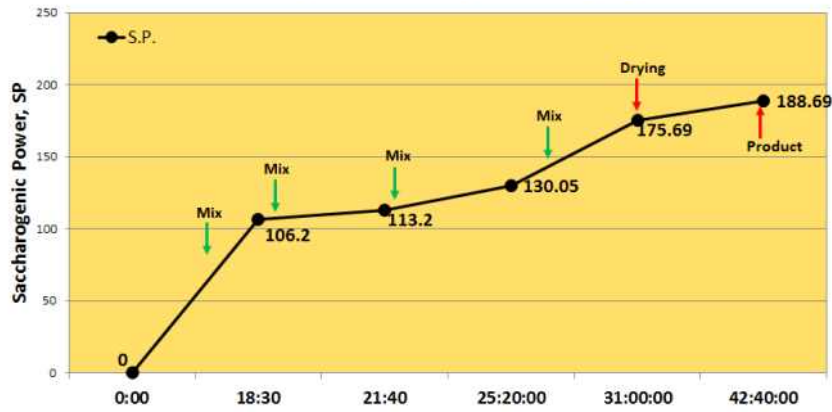


그림 1. 파국 후 배양 시점 별 당화력

○ 황국 시제품 제조 및 당화력 분석 (총 3회 제작)

제조된 황국 시제품의 수분 및 당화력 분석 결과는 다음과 표와 같다. 총 3회에 이르는 시제품 제조 결과 Singok로 제조된 황국의 수분함량은 27-29% 범위였으며, 당화력은 159.34-177.91 sp로 평균 약 170에 이르는 높은 당화력을 갖는 것으로 나타났다. 또한 당화력을 비롯한 황국의 품질이 매우 균일하여, 탁주제조 활용 시 높은 품질안정성을 갖을 것으로 사료되었다.

표 3. 황국 시제품의 수분 및 당화력 분석 결과

	수분 함량(%)	당화력(SP)
1차 시제품 제조	29%	177.91±2.78
2차 시제품 제조	28%	159.34±11.85
3차 시제품 제조	27%	175.30±7.71



그림 2. 황국 시제품 생산테스트(좌, 중) 및 최종 시제품(우)

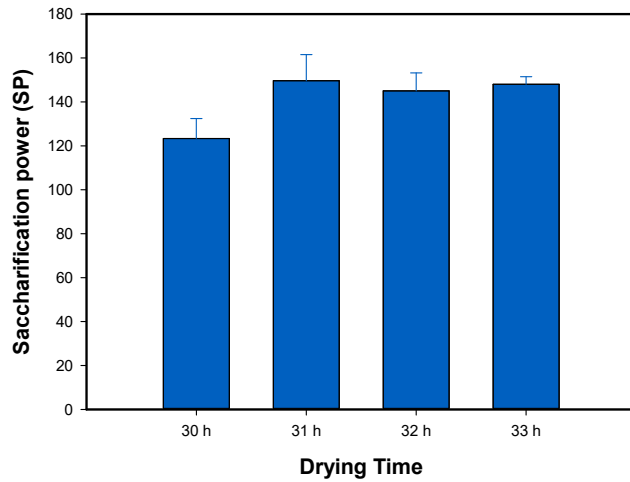


그림 3. 황국 송풍 건조시간에 따른 당화력 분석

○ *Asp. oyzae* Singok 균주의 중국 안정성 확인

고품질 황국제조를 위한 Singok 균주를 활용한 중국 발효안정성을 확인하였다. 산업체에서 대량생산된 조제종국과, 실험실 제조종국으로 발효한 황국 시제품을 제작하여 최종 당화력을 분석하고 최적 발효시간을 설정하였다. 분석결과 대량생산된 조제종국은 실험실에서 자체 제조한 종국보다 낮은 당화력을 보였으나, 평균 120—130 sp 범위의 안정적인 당화력을 갖는 것으로 나타났고 이때 최적 발효시간은 약 32시간인 것으로 확인되었다. 입국의 당화력 품질기준이 60sp 이며, 일반적으로 시판되고 있는 입국의 경우 100sp 이내의 당화력을 갖는 것을 감안하였을 때 본 연구로 개발된 Singok 황국 균주는 매우 우수한 당화력 품질을 안정적으로 나타내는 것으로 사료된다. 본 기술은 서울장수주식회사에 기술이전 통해 프리미엄 탁주 제조를 위한 종균으로 활용될 예정이다.



그림 4. 중국제조를 위한 발효조건 설정

표 4. 중국제조 공정 확립을 위한 조제종국 및 실험실 제조종국으로 발효한 황국의 당화력 결과

	조제종국 (SP)	실험실 제조 종국 (SP)
28h	99.57±4.93	
30h	102.24±3.61	
32h	119.57±3.21	
32h (건조 O)	132.24±2.65 ¹⁾	166.57±4.93 ³⁾
34h	118.57±1.53	153.91±3.2
34h (건조 O)	128.91±7.37 ²⁾	178.57±2.52 ⁴⁾

- 1) 수분함량 18%
- 2) 수분함량 13%
- 3) 수분함량 14%
- 4) 수분함량 15%

○ 고기능성 곰팡이 선발

고기능성 백국 및 흑국 곰팡이 개발을 위해 전통누룩 유래 한국식품연구원 보유 곰팡이 약 50 종을 대상으로 1차 콜로니 및 포자 생육도 및 색 분석을 통해 1차 15종의 곰팡이를 선발하였다. 개발된 15종의 곰팡이 중 전분분해력이 높은 6종의 곰팡이로 쌀입국을 제조, 발효특성 및 발색 정도를 확인하였다 (그림) 향후 전통주 제조시 관능 및 향미특성을 기준으로 최종 고품질 전통주 개발을 위한 백국 곰팡이를 선발 산업화에 활용할 예정이다.

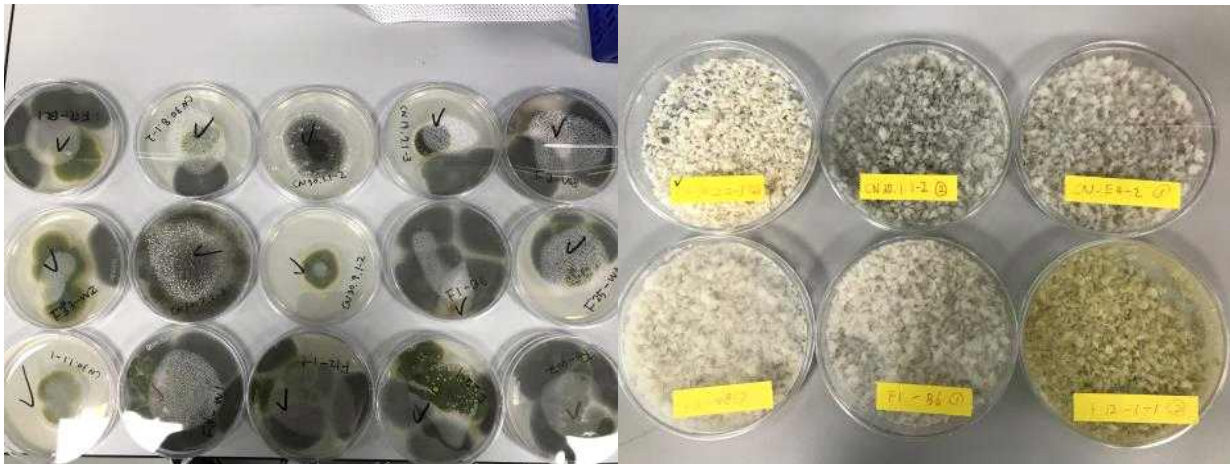

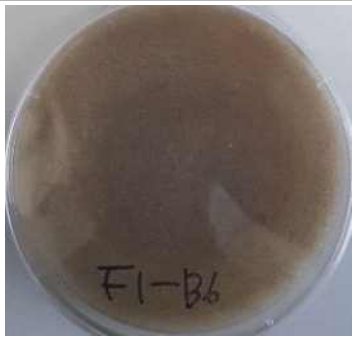

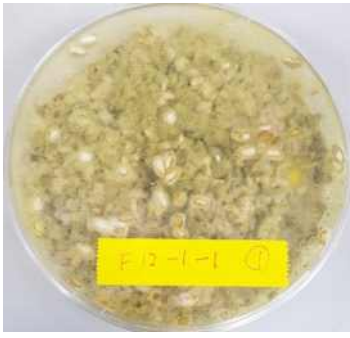

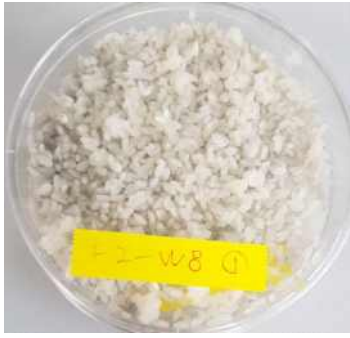



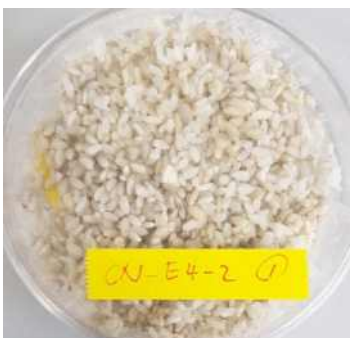
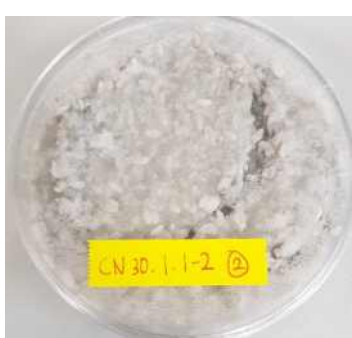



그림 5. 우수 곰팡이 선발을 위한 균주 배양 및 입국미 시험제조

표 5. 우수 곰팡이 선발을 위한 균주 배양 및 입국미 시험제조

		
		
<p>F12-1-1 <i>Aspergillus oryzae</i></p>	<p>F1-B6 <i>Rhizomucor variabilis</i></p>	<p>F2-W8 <i>Mucor circinelloides</i></p>
		
		
<p>CN-E4-2</p>	<p>CN30.1.1-2 <i>Rhizopus sp.</i></p>	<p>CN30.2.2-3 <i>Rhizopus delemar</i></p>

(2) 전통누룩 유래 기능성 효모 개발 및 산업화 연구

생물다양성협약 (Convention on Biological diversity, CBD) 이전의 유전자원(genetic resources)은 인류공동유산으로 접근과 이용이 자유로웠다. 선진국은 제약 없이 개발도상국의 유전자원을 이용하여 경제적 이익의 얻었고 그 권리를 지식재산권으로 보장받았다. 이러한 비합리적인 기존 제도에 대한 반대와 기후변화로 인한 자원 이용의 한계로 인하여 새로운 보호체계가 요구되었다. 이에 따라 1992년 각국 정부대표가 모인 유엔환경개발회의 (United Nations Conference on Environment and Development, UNCED)에서 ‘생물다양성 보존’, ‘구성요소의 지속가능한 이용’, ‘유전자원 이용으로부터 발생하는 이익의 공정·공평한 공유’를 목적하는 생물다양성협약을 채택하였다. CBD를 기반으로 2002년에 ‘유전자원 접근과 유전자원의 이용으로 발생하는 이익의 공유 (Access to genetic resources and Benefits-Sharing, ABS)’에 대한 Bonn 지침을 채택하였고, 2010년 제10차 생물다양성협약 당사국총회에서 ‘생물다양성협약 부속 유전자원에 대한 접근 및 유전자원의 이용으로부터 발생하는 이익의 공정하고 공평한 공유’에 관한 ‘나고야 의정서’를 채택하였다. 나고야의정서는 유전자원과 전통지식 (traditional knowledge)의 이용으로 발생하는 이익을 보호한다. 우리나라는 자국의 생물다양성 보전 및 기업 피해 방지하기 위하여 2012년 「생물다양성 보전 및 이용에 관한 법률 (생물다양성법)」과 2017년 「유전자원의 접근 및 이익 공유에 관한 법률 (유전자원법)」을 제정하였고 국가 차원에서 유전자원의 수집, 데이터베이스 구축, 활용 등 다양한 연구를 수행하고 있다.

발효식품은 유전자원이 많이 활용되는 산업이다. 그러나 국내 발효식품에 사용되는 대부분의 미생물 종균은 수입이며 이에 따른 무역수지 적자가 지속되고 있다. 따라서 경제적 손실 및 국내 미생물 산업 축소 방지를 위한 토착 미생물자원을 확보하기 위한 노력이 진행되고 있다. 국내 주류 연구에서도 수입 종균을 대체하기 위한 종균개발 연구가 수행되고 있다. 누룩은 전통지식이 결합된 유전자원으로 국내 재래종, 야생종, 고유종 미생물 확보에 적합하다. 따라서 본 연구는 알코올 제조에 활용가능하면서 동시에 기능성을 갖는 토종 미생물자원 확보를 목적하였다. 이를 위하여 아황산 내성 (SO₂-tolerant), 저온 내성(low temperature-tolerant), 프로바이오틱 (probiotic) 기능을 갖는 누룩 분리 효모 균주를 우선적으로 선발하였다. 첫째, 아황산은 포도주 품질을 저해하는 야생 미생물의 생육을 억제하는 항균제이다. 초기에는 알코올 발효가 지연되지만 아황산 내성이 약한 알코올 비생산 효모의 증식을 억제함으로써 아황산 내성이 강한 알코올 생성 효모의 증식을 도와 결과적으로 알코올 발효가 활발하게 진행된다. 둘째, 일반적으로 주류의 관능적 품질과 발포성 포도주 (sparkling wine)의 CO₂의 형성은 저온에서 우수하다. 셋째, 최근 대장 질환의 영역에서 프로바이오틱스를 이용한 치료를 시도하고 있다. 대부분의 프로바이오틱스는 *Lactobacillus* sp. 유산균이며 이외에 *Saccharomyces* 속 미생물이 있다. 현재 활용되고 있는 대표적인 *Saccharomyces* 속 미생물은 *S. Boulardii* 이다. 국내에서 *S. Boulardii*에 대한 특허는 총 3건 정도 존재하고 각각 비만조절, 글리코겐 고생산, 구강염증 억제에 관한 특허로 출원하였다. *S. Boulardii*는 *S. cerevisiae*의 한 균주로 유전적 유사성이 99% 이상이며 갈락토오스를 이용하지 않거나 이용률이 낮은 것으로 알려져 있다. 따라서 프로바이오틱 효모 균주 발굴을 위해 낮은 갈락토오스 발효 능력과 내산 및 내고온성을 갖는 효모 균주를 선발하였다. 본 연구에서 선발된 효모 균주는 후속 연구에서 양조특성 검증이 필요하며 다양한 주류 양조에 활용 가능할 것으로 예상된다.

본 연구는 알코올 제조 및 기능성을 갖는 토종 미생물자원 확보를 목적으로 누룩 분리 효모 *S. cerevisiae* 200여 균주에서 아황산 내성, 저온 내성, 프로바이오틱 기능을 갖는 균주를 선발하였다. 아황산 내성을 갖는 효모는 1, 2차 실험을 통해 237 균주에서 3개 균주 ReY9-4, 57-6, 59-4가 최종 선발되었다. 3개 균주 모두 아황산 농도 200 ppm의 배지에 6 log

cells/mL로 접종하여 25°C에서 배양하였을 때 2일안에 CO₂를 발생하였다. 저온 내성을 갖는 효모는 1, 2차 실험을 통해 237 균주에서 4개 균주 ReY12-3, 16-7, 26-3, 57-2가 최종 선발되었다. 4개 균주 모두 배양 온도 6°C 조건에서 7일 안에 CO₂를 발생하였다. 프로바이오틱 기능을 갖는 효모는 1차 갈락토오스 발효능 시험과 2차 내산성 및 고온내성 실험을 통해 297 균주에서 3개 균주 ReY25-6, 28-7, 57-3가 최종 선발되었다. 3개 균주 모두 갈락토오스 이용률이 낮았고, pH 2의 37°C 배양조건에서 3일 안에 CO₂를 발생하였으며, 배양 11일 이후 일반 YM 고체 평판배지에서 콜로니를 형성하였다. 본 연구에서 선발된 효모 균주는 후속 연구에서 양조특성 검증이 필요하며 다양한 주류 양조에 활용될 것이다.

○ 효모 배양액 준비

선행연구에서 고문헌의 제조방법에 따라 제조 및 수집된 전통누룩 60여종으로부터 분리한 효모 200여종을 사용하였다. 효모를 YM 고체 평판배지에 접종하여 25°C에서 48시간 동안 활성화하였다. 활성화된 효모 콜로니를 YM 액체배지에 접종하여 25°C에서 48시간 배양하였다. 준비된 효모 배양액을 이후의 모든 실험에 사용하였다. 모든 기능성 효모는 두 단계를 통해 선발하였으며 배지조성과 배양조건은 표 1에 제시하였다.

○ 기능성 효모 균주 선발을 위한 screening

아황산 내성 균주 screening

1단계 아황산 내성 효모 선발에서는 pH 3.2에 SO₂농도가 200 ppm인 YM 액체배지를 사용하였다. 효모 배양액 100 µL를 접종하여 25°C에서 배양하였으며 CO₂ 가스를 발생시키는 균주를 선발하였다. 2단계에서는 pH 3.2에 SO₂ 농도가 0, 100, 200 ppm인 YM 액체배지를 사용하였다. 총 균수가 6 log cells/mL인 효모 배양액을 배지에 접종하여 25°C에서 배양하였다. 최종적으로 CO₂ 가스를 신속하게 발생시키는 균주를 선발하였다.

표 6. 배지 조성 및 발효 조건

Condition s	Ingredients	SO ₂ -tolerance		Low temp.-tolerance		Probiotics	
		1st-step	2nd-step	1st-ste p	2nd-ste p	1st-step: Fermentation of galactose	2nd-step: Acid- and high temp.-tolerance
	D.W. (mL)	1,500		1,500		1,500	1,500
	YM broth (g)	31.5		31.5		-	31.5
	Glucose (g)	45		135		-	-
	YN base (g)	-		-		10.05	-
	Agar (g)	-		-		-	30
1	SO ₂ (ppm)	200	0	-	-	-	-
			100				
			200				
2	pH	3.2		-		-	2.0
3	Incubation temp. (°C)	25		6		25	37
4	Galactose (g)	-		-		150	-

저온 내성 균주 screening

1단계 저온 내성 효모 선발에서는 일반 YM 액체배지를 사용하였다. 효모 배양액 100

μL를 접종하여 6°C에서 배양하여 CO₂ 가스를 발생시키는 균주를 선발하였다. 외부 온도의 영향을 차단하기 위해 최대한 신속하게 접종하였다. 2단계에서는 총 균수가 6 log cells/mL인 효모 배양액을 배지에 접종하여 6°C에서 배양하였다. 최종적으로 CO₂ 가스를 신속하게 발생시키는 균주를 선발하였다.

프로바이오틱 활성 효모 screening

1단계 프로바이오틱 효모 선발에서는 갈락토오스 이용률이 낮은 균주를 선발하였다. 대표적인 프로바이오틱 효모 *S. Boulardii*는 갈락토오스를 발효하지 못하거나 아주 소량 사용한다. 따라서 탄소원이 갈락토오스인 YM 액체배지에 효모 배양액 100 μL를 접종하여 25°C에서 배양하였으며 CO₂를 발생하지 않거나 최대한 늦게 생성하는 효모 균주를 선발하였다. 2단계에서는 총 균수가 6 log cells/mL인 효모 배양액을 pH 2.0로 조절된 YM 액체배지에 접종하여 37°C에서 배양하였다. CO₂ 가스를 생성하는 효모 균주를 선발하여 일반 YM 평판배지에 접종하였으며 콜로니를 형성하는 균주를 최종 선발하였다.

○ **아황산 내성 효모 선발**

효모의 1차 아황산 내성 결과를 아래 표에 나타내었다. *S. cerevisiae* 237 균주에서 5 균주 ReY09-4, 57-4, 57-6, 59-2, 59-4가 아황산 200 ppm이 포함된 YM 액체배지에서 6 일 안에 CO₂를 발생하였다. 이들을 아황산 내성을 가진 균주로 판단하였으며 2차 선발을 위한 후보균주로 선발하였다.

표 7. 아황산 내성 효모 1차 선발 결과

Nuruk no.	Nuruk name	Yeast no.	Strains	Fermentation time (days)				Nuruk no.	Nuruk name	Yeast no.	Strains	Fermentation time (days)			
				1	2	3	6					1	2	3	6
2	추모곡	ReY02-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	26	녹미주곡	ReY26-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
2	추모곡	ReY02-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	26	녹미주곡	ReY26-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
2	추모곡	ReY02-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	26	녹미주곡	ReY26-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
2	추모곡	ReY02-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	26	녹미주곡	ReY26-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
2	추모곡	ReY02-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	26	녹미주곡	ReY26-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
2	추모곡	ReY02-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	26	녹미주곡	ReY26-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
2	추모곡	ReY02-8	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	27	녹미주곡	ReY27-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
3	오메기곡	ReY03-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	28	곡	ReY28-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
3	오메기곡	ReY03-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	28	곡	ReY28-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
4	죽곡	ReY04-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	28	곡	ReY28-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
4	죽곡	ReY04-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	28	곡	ReY28-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
4	죽곡	ReY04-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	28	곡	ReY28-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
4	죽곡	ReY04-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	28	곡	ReY28-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
4	죽곡	ReY04-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	28	곡	ReY28-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
4	죽곡	ReY04-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	29	미곡	ReY29-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
4	죽곡	ReY04-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	29	미곡	ReY29-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
5	죽곡	ReY05-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	29	미곡	ReY29-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
5	죽곡	ReY05-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	29	미곡	ReY29-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
5	죽곡	ReY05-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	29	미곡	ReY29-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
5	죽곡	ReY05-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	29	미곡	ReY29-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
5	죽곡	ReY05-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	29	미곡	ReY29-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
5	죽곡	ReY05-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	30	면곡	ReY30-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
5	죽곡	ReY05-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	30	면곡	ReY30-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
6	공멸곡	ReY06-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	30	면곡	ReY30-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
7	곡	ReY07-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	30	면곡	ReY30-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
7	곡	ReY07-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	30	면곡	ReY30-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
7	곡	ReY07-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	30	면곡	ReY30-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
8	면곡	ReY08-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	30	면곡	ReY30-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
8	면곡	ReY08-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	31	곡	ReY31-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
8	면곡	ReY08-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	31	곡	ReY31-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
8	면곡	ReY08-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	34	백료곡	ReY34-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
8	면곡	ReY08-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	34	백료곡	ReY34-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
8	면곡	ReY08-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	35	양양곡	ReY35-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
9	신곡	ReY09-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	35	양양곡	ReY35-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
9	신곡	ReY09-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	++++	++++	35	양양곡	ReY35-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
9	신곡	ReY09-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	35	양양곡	ReY35-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
9	신곡	ReY09-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	35	양양곡	ReY35-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
9	신곡	ReY09-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	35	양양곡	ReY35-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
11	어곡	ReY11-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	35	양양곡	ReY35-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
11	어곡	ReY11-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	39	정화곡	ReY39-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
11	어곡	ReY11-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	39	정화곡	ReY39-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
11	어곡	ReY11-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	39	정화곡	ReY39-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
11	어곡	ReY11-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	39	정화곡	ReY39-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
11	어곡	ReY11-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	39	정화곡	ReY39-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
12	설향곡	ReY12-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	39	정화곡	ReY39-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
12	설향곡	ReY12-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	39	정화곡	ReY39-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
12	설향곡	ReY12-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	43	신곡	ReY43-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
12	설향곡	ReY12-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	43	신곡	ReY43-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
12	설향곡	ReY12-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	43	신곡	ReY43-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-

12	신곡	ReY12-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	45	신곡III	ReY45-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
12	신곡	ReY12-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	45	신곡III	ReY45-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
13	신곡	ReY13-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	46	하동신곡	ReY46-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
13	신곡	ReY13-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	46	하동신곡	ReY46-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
13	신곡	ReY13-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	47	진주곡자(알은백미)	ReY47-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
13	신곡	ReY13-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	48	진주곡자(금강밀)	ReY48-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
13	신곡	ReY13-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	48	진주곡자(금강밀)	ReY48-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
13	신곡	ReY13-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	48	진주곡자(금강밀)	ReY48-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
13	신곡	ReY13-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	48	진주곡자(금강밀)	ReY48-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
14	백곡	ReY14-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	49	진주곡자(미곡산)	ReY49-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
14	백곡	ReY14-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	49	진주곡자(미곡산)	ReY49-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
14	백곡	ReY14-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	49	진주곡자(미곡산)	ReY49-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
14	백곡	ReY14-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	49	진주곡자(미곡산)	ReY49-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
14	백곡	ReY14-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	49	진주곡자(미곡산)	ReY49-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
14	백곡	ReY14-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	49	진주곡자(미곡산)	ReY49-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
14	백곡	ReY14-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	49	진주곡자(미곡산)	ReY49-8	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
15	백곡II	ReY15-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	50	송하곡자(소출곡)	ReY50-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
15	백곡II	ReY15-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	50	송하곡자(소출곡)	ReY50-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
15	백곡II	ReY15-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	50	송하곡자(소출곡)	ReY50-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
15	백곡II	ReY15-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	50	송하곡자(소출곡)	ReY50-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
15	백곡II	ReY15-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	51	심삼순분(우리밀)	ReY51-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
15	백곡II	ReY15-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	51	심삼순분(우리밀)	ReY51-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
15	백곡II	ReY15-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	51	심삼순분(우리밀)	ReY51-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
16	어곡	ReY16-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	51	심삼순분(우리밀)	ReY51-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
16	어곡	ReY16-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	51	심삼순분(우리밀)	ReY51-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
16	어곡	ReY16-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	51	심삼순분(우리밀)	ReY51-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
16	어곡	ReY16-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	51	심삼순분(우리밀)	ReY51-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
16	어곡	ReY16-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	51	심삼순분(우리밀)	ReY51-8	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
16	어곡	ReY16-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	52	심삼순분(이화곡)	ReY52-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
16	어곡	ReY16-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	52	심삼순분(이화곡)	ReY52-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
17	분곡	ReY17-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	53	푸른들농산	ReY53-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
17	분곡	ReY17-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	53	푸른들농산	ReY53-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
17	분곡	ReY17-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	53	푸른들농산	ReY53-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
17	분곡	ReY17-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	53	푸른들농산	ReY53-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
18	금곡	ReY18-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	54	금정성농산물	ReY54-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
18	금곡	ReY18-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	54	금정성농산물	ReY54-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
18	금곡	ReY18-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	54	금정성농산물	ReY54-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
18	금곡	ReY18-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	54	금정성농산물	ReY54-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
18	금곡	ReY18-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	54	금정성농산물	ReY54-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
18	금곡	ReY18-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	54	금정성농산물	ReY54-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
18	금곡	ReY18-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	54	금정성농산물	ReY54-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
21	조곡법	ReY21-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	56	술샘(국인인곡)	ReY56-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
21	조곡법	ReY21-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	56	술샘(국인인곡)	ReY56-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
21	조곡법	ReY21-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	56	술샘(국인인곡)	ReY56-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
21	조곡법	ReY21-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	56	술샘(국인인곡)	ReY56-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
21	조곡법	ReY21-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	56	술샘(국인인곡)	ReY56-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
21	조곡법	ReY21-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	56	술샘(국인인곡)	ReY56-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
22	조곡법	ReY22-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	56	술샘(국인인곡)	ReY56-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
22	항산	ReY22-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	57	이가수분	ReY57-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
22	항산	ReY22-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	57	이가수분	ReY57-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
22	항산	ReY22-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	57	이가수분	ReY57-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
22	항산	ReY22-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	57	이가수분	ReY57-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	++++	++++	++++
22	항산	ReY22-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	57	이가수분	ReY57-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
22	항산	ReY22-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	57	이가수분	ReY57-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++++
23	항산	ReY23-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	57	이가수분	ReY57-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
23	항산	ReY23-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	58	송명정	ReY58-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
23	항산	ReY23-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	58	송명정	ReY58-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
23	항산	ReY23-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	58	송명정	ReY58-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
23	항산	ReY23-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	58	송명정	ReY58-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
23	항산	ReY23-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	58	송명정	ReY58-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
23	항산	ReY23-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	58	송명정	ReY58-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
24	백수수	ReY24-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	58	송명정	ReY58-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
24	백수수	ReY24-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	59	제주도	ReY59-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	++++	++++	++++
24	백수수	ReY24-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	59	제주도	ReY59-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
24	백수수	ReY24-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	59	제주도	ReY59-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	++++	++++	++++
25	내부비전	ReY25-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	59	제주도	ReY59-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
25	내부비전	ReY25-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	59	제주도	ReY59-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
25	내부비전	ReY25-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	59	제주도	ReY59-8	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
25	내부비전	ReY25-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	59	제주도	ReY59-9	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
25	내부비전	ReY25-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	59	제주도	ReY59-10	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
25	내부비전	ReY25-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	59	제주도	ReY59-11	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-

(-, 발효 못함; +, Durham 관의 1/4 발효, Durham 관의 2/4 발효; ++, Durham 관의 3/4 발효; +++, Durham 관 전체 발효)

1차 screening에서 선발된 *S. cerevisiae* 5 균주의 2차 아황산 내성 결과를 아래 표에 제시하였다. 아황산 농도 0 ppm의 배지에서 5균주 모두 배양 1일에 CO₂를 발생하였다. 아황산 농도 100 ppm의 배지에서 5균주 모두 배양 2일에 CO₂를 발생하였다. 아황산 농도 200 ppm의 배지에서 3 균주 ReY9-4, 57-6, 59-4가 배양 2일에 CO₂를 발생하였고 배양 4일에 나머지 두개의 균주 ReY57-4와 59-2가 CO₂를 발생하였다. 아황산 농도 200 ppm이 선별력이 있었고 여기서 CO₂를 신속하게 발생시킨 *S. cerevisiae* 3개 균주 ReY9-4, 57-6, 59-4를 아황산 내성 우수 균주로 최종 선발하였다.

표 8. 아황산 내성 효모 2차 선발 결과

SO ₂ (ppm)	Nuruk no.	Nuruk name	Yeast no.	Strains	Fermentation time (days)		
					1	2	4
0	9	신곡	ReY09-4	<i>S. cerevisiae</i>	++++	/	/
	57	이가수불	ReY57-4	<i>S. cerevisiae</i>	++++	/	/
	57	이가수불	ReY57-6	<i>S. cerevisiae</i>	++++	/	/
	59	제주도 붉은보리	ReY59-2	<i>S. cerevisiae</i>	++++	/	/
	59	제주도 붉은보리	ReY59-4	<i>S. cerevisiae</i>	++++	/	/
100	9	신곡	ReY09-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	++++	/
	57	이가수불	ReY57-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	++++	/
	57	이가수불	ReY57-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	++++	/
	59	제주도 붉은보리	ReY59-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	++++	/
	59	제주도 붉은보리	ReY59-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	++++	/
200	9	신곡	ReY09-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	++++	/
	57	이가수불	ReY57-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	++++
	57	이가수불	ReY57-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	++++	/
	59	제주도 붉은보리	ReY59-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	++++
	59	제주도 붉은보리	ReY59-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	++++	/

결론적으로 1단계에서 선발한 *S. cerevisiae* 5균주 중에서 3균주를 아황산 내성 우수 균주로 선발하였고 다음 그림에 제시하였다.

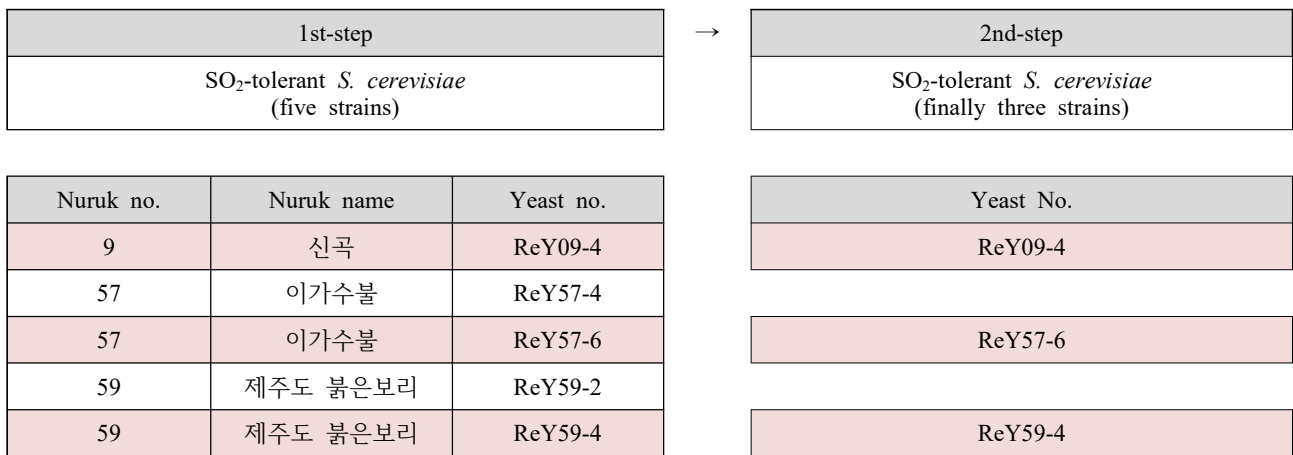


그림 6. 아황산 내성 우수 효모균주 선발

○ 저온 내성 효모 선발

효모의 1차 저온 내성 결과를 아래 표에 나타내었다. *S. cerevisiae* 237 균주에서 11 균주 ReY08-4, 11-3, 12-3, 16-7, 21-1, 26-3, 28-1, 31-7, 56-4, 56-5, 57-2가 6°C에서 7일 안에 CO₂를 발생하였다. 이들을 저온 내성을 가진 균주로 판단하였고 2차 단계에서 우수균주 선발 대상으로 사용하였다.

표 9. 저온 내성 효모 1차 선발 결과

Nuruk no.	Nuruk name	Yeast no.	Strain	Fermentation time (days)					Nuruk no.	Nuruk name	Yeast no.	Strain	Fermentation time (days)				
				1	2	3	4	7					1	2	3	4	7
2	추모곡	ReY02-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	++	++++	++++	26	녹미주곡	ReY26-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	++	++	++++
2	추모곡	ReY02-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+	26	녹미주곡	ReY26-3	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	++	++++
2	추모곡	ReY02-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	26	녹미주곡	ReY26-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++
2	추모곡	ReY02-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++++	++++	26	녹미주곡	ReY26-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	++++
2	추모곡	ReY02-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	26	녹미주곡	ReY26-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++
2	추모곡	ReY02-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	++++	26	녹미주곡	ReY26-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++	++++
2	추모곡	ReY02-8	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+	27	녹두곡	ReY27-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++
3	오메기곡	ReY03-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	++	+++	28	곡	ReY28-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	++++	+++	++++
3	오메기곡	ReY03-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++	28	곡	ReY28-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++++	++++
4	죽곡	ReY04-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	+++	28	곡	ReY28-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	++++
4	죽곡	ReY04-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	+++	28	곡	ReY28-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	++++
4	죽곡	ReY04-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	+++	28	곡	ReY28-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++
4	죽곡	ReY04-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	28	곡	ReY28-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++	++++
4	죽곡	ReY04-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++	28	곡	ReY28-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	++++

4	죽곡	ReY04-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	29	미곡	ReY29-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++
4	죽곡	ReY04-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	29	미곡	ReY29-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++
5	죽곡Ⅱ	ReY05-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++	29	미곡	ReY29-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++
5	죽곡Ⅱ	ReY05-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	29	미곡	ReY29-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++
5	죽곡Ⅱ	ReY05-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++	+++	29	미곡	ReY29-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++
5	죽곡Ⅱ	ReY05-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++	29	미곡	ReY29-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++
5	죽곡Ⅱ	ReY05-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	++++	29	미곡	ReY29-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++
5	죽곡Ⅱ	ReY05-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++	30	면곡	ReY30-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++
5	죽곡Ⅱ	ReY05-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	++++	30	면곡	ReY30-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++
6	공병곡	ReY06-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	30	면곡	ReY30-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-
7	곡	ReY07-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	30	면곡	ReY30-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++
7	곡	ReY07-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	30	면곡	ReY30-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++
7	곡	ReY07-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	++++	30	면곡	ReY30-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++
8	면곡	ReY08-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	30	면곡	ReY30-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++
8	면곡	ReY08-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++	31	곡	ReY31-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++
8	면곡	ReY08-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++	31	곡	ReY31-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	++++	++	++++
8	면곡	ReY08-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	++	+++	++++	34	백료곡	ReY34-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++
8	면곡	ReY08-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	++++	34	백료곡	ReY34-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++	++
8	면곡	ReY08-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++	++++	35	양능곡	ReY35-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++
9	신곡	ReY09-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	+++	35	양능곡	ReY35-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	++
9	신곡	ReY09-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	35	양능곡	ReY35-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++
9	신곡	ReY09-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	35	양능곡	ReY35-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++
9	신곡	ReY09-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	35	양능곡	ReY35-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+
9	신곡	ReY09-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	35	양능곡	ReY35-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	++++
11	여곡	ReY11-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	35	양능곡	ReY35-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++
11	여곡	ReY11-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	39	정화곡	ReY39-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	+
11	여곡	ReY11-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	+	++++	39	정화곡	ReY39-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++
11	여곡	ReY11-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++	++++	39	정화곡	ReY39-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	++++
11	여곡	ReY11-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	39	정화곡	ReY39-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++
11	여곡	ReY11-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	39	정화곡	ReY39-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+
12	설향곡	ReY12-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	39	정화곡	ReY39-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++
12	설향곡	ReY12-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++	39	정화곡	ReY39-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++
12	설향곡	ReY12-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	++	+++	++++	43	신곡	ReY43-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+
12	설향곡	ReY12-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	43	신곡	ReY43-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+
12	설향곡	ReY12-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	++++	43	신곡	ReY43-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++
12	설향곡	ReY12-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	45	신곡Ⅲ	ReY45-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++
12	설향곡	ReY12-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	+++	45	신곡Ⅲ	ReY45-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+
13	설향곡	ReY13-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	++	46	하동신곡	ReY46-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++
13	설향곡	ReY13-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	++++	46	하동신곡	ReY46-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++
13	설향곡	ReY13-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	++++	47	진주곡자(얇은뱅이밀)	ReY47-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++
13	설향곡	ReY13-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	+++	48	진주곡자(금강밀)	ReY48-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++
13	설향곡	ReY13-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	48	진주곡자(금강밀)	ReY48-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+
13	설향곡	ReY13-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	48	진주곡자(금강밀)	ReY48-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+
13	설향곡	ReY13-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	48	진주곡자(금강밀)	ReY48-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++
14	백곡	ReY14-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	++++	49	진주곡자(미국산)	ReY49-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-
14	백곡	ReY14-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++	49	진주곡자(미국산)	ReY49-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++
14	백곡	ReY14-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++	49	진주곡자(미국산)	ReY49-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++
14	백곡	ReY14-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++	++++	49	진주곡자(미국산)	ReY49-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-
14	백곡	ReY14-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	49	진주곡자(미국산)	ReY49-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-
14	백곡	ReY14-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	49	진주곡자(미국산)	ReY49-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-
14	백곡	ReY14-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	49	진주곡자(미국산)	ReY49-8	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++
15	백곡Ⅱ	ReY15-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	50	송학곡자(소율곡)	ReY50-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	+
15	백곡Ⅱ	ReY15-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	50	송학곡자(소율곡)	ReY50-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-
15	백곡Ⅱ	ReY15-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	++++	50	송학곡자(소율곡)	ReY50-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	+++
15	백곡Ⅱ	ReY15-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+++	++++	50	송학곡자(소율곡)	ReY50-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++
15	백곡Ⅱ	ReY15-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	++++	51	심순분할머니(우리밀)	ReY51-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++
15	백곡Ⅱ	ReY15-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++	51	심순분할머니(우리밀)	ReY51-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++
15	백곡Ⅱ	ReY15-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++	51	심순분할머니(우리밀)	ReY51-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++
16	여곡	ReY16-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	++++	51	심순분할머니(우리밀)	ReY51-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++	++++
16	여곡	ReY16-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	51	심순분할머니(우리밀)	ReY51-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	++	++	+++

16	여곡	ReY16-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	51	심순분할머니(우리밀)	ReY51-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	++++	
16	여곡	ReY16-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	51	심순분할머니(우리밀)	ReY51-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++	+++	
16	여곡	ReY16-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+++	++++	51	심순분할머니(우리밀)	ReY51-8	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	++++	
16	여곡	ReY16-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	+++	52	심순분할머니(이화곡)	ReY52-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	
16	여곡	ReY16-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	++	++++	52	심순분할머니(이화곡)	ReY52-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++	
17	분곡	ReY17-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++	++++	53	푸른들농산	ReY53-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	
17	분곡	ReY17-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	+++	53	푸른들농산	ReY53-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	
17	분곡	ReY17-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	53	푸른들농산	ReY53-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++	
17	분곡	ReY17-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	53	푸른들농산	ReY53-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++	
18	병곡	ReY18-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	54	금정산성누룩	ReY54-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++	
18	병곡	ReY18-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	54	금정산성누룩	ReY54-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	
18	병곡	ReY18-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	54	금정산성누룩	ReY54-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++	
18	병곡	ReY18-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	54	금정산성누룩	ReY54-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	
18	병곡	ReY18-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++	++++	54	금정산성누룩	ReY54-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	
18	병곡	ReY18-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	54	금정산성누룩	ReY54-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	++	++	++++	
18	병곡	ReY18-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	54	금정산성누룩	ReY54-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	++	++	++++	
21	조곡법	ReY21-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	++	+++	++++	56	술샘(국샘미인곡)	ReY56-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	
21	조곡법	ReY21-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++	56	술샘(국샘미인곡)	ReY56-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	
21	조곡법	ReY21-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	56	술샘(국샘미인곡)	ReY56-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++	
21	조곡법	ReY21-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++	56	술샘(국샘미인곡)	ReY56-4	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	++++	
21	조곡법	ReY21-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	56	술샘(국샘미인곡)	ReY56-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	++	+++	++++	
21	조곡법	ReY21-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	56	술샘(국샘미인곡)	ReY56-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	
22	향온곡	ReY22-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	+	+++	56	술샘(국샘미인곡)	ReY56-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	
22	향온곡	ReY22-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	57	이가수불	ReY57-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	
22	향온곡	ReY22-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	57	이가수불	ReY57-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	+	++++	
22	향온곡	ReY22-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	++++	57	이가수불	ReY57-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++	++++	
22	향온곡	ReY22-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++	57	이가수불	ReY57-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	
22	향온곡	ReY22-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++	57	이가수불	ReY57-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	+++	
22	향온곡	ReY22-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	+	+++	57	이가수불	ReY57-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+	
23	향온곡II	ReY23-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	++++	57	이가수불	ReY57-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	
23	향온곡II	ReY23-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	58	송명섭누룩	ReY58-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++	+++	
23	향온곡II	ReY23-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	58	송명섭누룩	ReY58-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	
23	향온곡II	ReY23-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++	+++	58	송명섭누룩	ReY58-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	+++	
23	향온곡II	ReY23-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++	58	송명섭누룩	ReY58-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	
23	향온곡II	ReY23-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++	58	송명섭누룩	ReY58-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	++++	
23	향온곡II	ReY23-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	+++	58	송명섭누룩	ReY58-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	
24	백수환동	ReY24-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	++++	58	송명섭누룩	ReY58-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++++	
24	백수환동	ReY24-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++	++++	59	제주도 붉은보리	ReY59-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++	
24	백수환동	ReY24-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++	59	제주도 붉은보리	ReY59-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	
24	백수환동	ReY24-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	++++	59	제주도 붉은보리	ReY59-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	++++	
25	내부비전곡	ReY25-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	59	제주도 붉은보리	ReY59-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	
25	내부비전곡	ReY25-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+	++++	59	제주도 붉은보리	ReY59-7	<i>S. cerevisiae</i>						
25	내부비전곡	ReY25-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	++	++++	59	제주도 붉은보리	ReY59-8	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	++++	
25	내부비전곡	ReY25-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++	++++									+	++++
25	내부비전곡	ReY25-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+++										
25	내부비전곡	ReY25-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	++										

(-, 발효 못함; +, Durham 관의 1/4 발효, Durham 관의 2/4 발효; +++, Durham 관의 3/4 발효; +++++, Durham 관 전체 발효)

1단계에서 선발된 *S. cerevisiae* 11 균주의 2차 저온 내성 결과를 아래 표에 제시하였다. 배양 온도 6°C 조건에서 4개의 균주 ReY12-3, 16-7, 26-3, 57-2가 배양 7일에 CO2를 발생하였고 저온 내성 우수 균주로 최종 선발하였다.

표 10. 저온 내성 효모 2차 선발 결과

Nuruk no.	Nuruk name	Yeast no.	Strains	Fermentation time (days)			
				1	2	4	7
8	면곡	ReY08-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
11	여곡	ReY11-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
12	설향곡	ReY12-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++++
16	여곡	ReY16-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++
21	조곡법	ReY21-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+
26	녹미주곡	ReY26-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+++
28	곡	ReY28-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
31	곡	ReY31-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
56	술샘 (국샘미인곡)	ReY56-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
56	술샘 (국샘미인곡)	ReY56-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+
57	이가수불	ReY57-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++++

결론적으로 1단계에서 선발한 *S. cerevisiae* 11균주 중에서 3균주를 저온 내성 우수 균주로 선발하였고 아래 그림에 제시하였다.

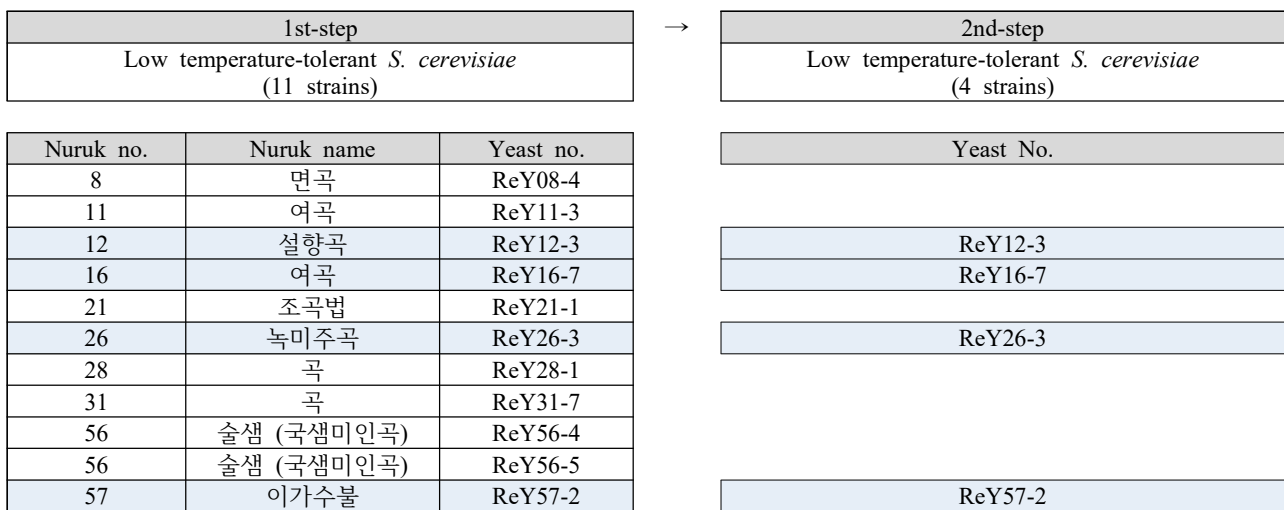


그림. 저온 내성 우수 효모균주 선발

(3) 전통누룩 유래 미생물 생리기능성 발굴

○ 전통누룩 유래 프로바이오틱 활성을 갖는 효모 선발

프로바이오틱스(probiotics)란 ‘충분한 양을 투여할 때 숙주의 건강에 유익한, 살아있는 미생물’을 말한다. 지금까지 보고된 대부분의 프로바이오틱스는 유산균으로 알려져 있으며, 최근 과민성 대장 증후군이나 항생제 연관 설사, 염증성 장질환, 변비 등과 같은 대장 질환의 영역에서 최근 점차 프로바이오틱스의 사용을 시도해보는 추세이다. 프로바이오틱스로 유산균을 사용하였을 때 야기될 수 있는 가장 큰 단점은 항생제에 대한 내성이 부족하다는 점을 들 수 있다. 따라서 항생제에 저해받지 않으면서 장내에서 프로바이오틱스 기능을 보이는 효모균이 최근 정장제로 크게 활용되고 있다. 이에 본 연구에서는 항생제에 영향을 받지 않고 알코올 발효력이 뛰어나 프로바이오틱 활성을 갖는 각종 식품 및 의약품에도 사용할 수 있는 새로운 균주인 사카로마이세스 세레비지에 보울라디-03 균주를 개발하고 이의 기능성을 확인함으로써 산업화 종균으로 활용하고자 하였다.

Saccharomyces Boulardii 균주의 특성 중 갈락토오스 발효능이 매우 낮다는 점을 활용하여 갈락토오스 이용정도를 통해 1차 효모 선발을 진행하였다. 갈락토오스 발효능을 통해 확인한 효모의 1차 프로바이오틱 기능 결과를 아래 표에 나타내었다. *S. cerevisiae* 237 균주에서 갈락토오스 이용률이 낮은 12 균주 ReY15-6, 25-5, 25-6, 27-1, 28-2, 28-7, 30-1,

30-2, 30-4, 30-6, 53-4, 57-3를 2차 선발을 위한 후보균주로 선발하였다.

표 11. 프로바이오틱 효모 1차 선발 결과 - 갈락토오스 이용률

Nuruk no.	Nuruk name	Yeast no.	Strains	Fermentation time (days)				Nuruk no.	Nuruk name	Yeast no.	Strains	Fermentation time (days)			
				1	3	4	7					1	3	4	7
2	추모곡	ReY02-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	26	녹미주곡	ReY26-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
2	추모곡	ReY02-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	26	녹미주곡	ReY26-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++
2	추모곡	ReY02-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	26	녹미주곡	ReY26-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
2	추모곡	ReY02-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	26	녹미주곡	ReY26-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++
2	추모곡	ReY02-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	26	녹미주곡	ReY26-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++
2	추모곡	ReY02-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	26	녹미주곡	ReY26-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++
2	추모곡	ReY02-8	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	27	녹두곡	ReY27-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+
3	오메기곡	ReY03-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	28	곡	ReY28-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++
3	오메기곡	ReY03-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	28	곡	ReY28-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+++
4	죽곡	ReY04-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	28	곡	ReY28-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
4	죽곡	ReY04-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	28	곡	ReY28-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++
4	죽곡	ReY04-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	28	곡	ReY28-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
4	죽곡	ReY04-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	28	곡	ReY28-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
4	죽곡	ReY04-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	28	곡	ReY28-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+++
4	죽곡	ReY04-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	29	미곡	ReY29-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
4	죽곡	ReY04-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	29	미곡	ReY29-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
5	죽곡Ⅱ	ReY05-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	29	미곡	ReY29-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
5	죽곡Ⅱ	ReY05-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	29	미곡	ReY29-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++
5	죽곡Ⅱ	ReY05-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	29	미곡	ReY29-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	++	+++
5	죽곡Ⅱ	ReY05-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	29	미곡	ReY29-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++
5	죽곡Ⅱ	ReY05-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	29	미곡	ReY29-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
5	죽곡Ⅱ	ReY05-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	30	면곡	ReY30-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+++
5	죽곡Ⅱ	ReY05-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	30	면곡	ReY30-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+++
6	공병곡	ReY06-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	30	면곡	ReY30-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
7	곡	ReY07-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	30	면곡	ReY30-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+++
7	곡	ReY07-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	30	면곡	ReY30-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
7	곡	ReY07-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	30	면곡	ReY30-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+++
8	면곡	ReY08-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	30	면곡	ReY30-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++
8	면곡	ReY08-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	31	곡	ReY31-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++
8	면곡	ReY08-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	31	곡	ReY31-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
8	면곡	ReY08-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	34	백료곡	ReY34-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
8	면곡	ReY08-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	34	백료곡	ReY34-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	++	+++
8	면곡	ReY08-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++	35	양능곡	ReY35-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
9	신곡	ReY09-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	35	양능곡	ReY35-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
9	신곡	ReY09-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	35	양능곡	ReY35-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
9	신곡	ReY09-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	35	양능곡	ReY35-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
9	신곡	ReY09-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	35	양능곡	ReY35-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
9	신곡	ReY09-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	35	양능곡	ReY35-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++
11	여곡	ReY11-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	35	양능곡	ReY35-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++
11	여곡	ReY11-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	39	정화곡	ReY39-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
11	여곡	ReY11-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	39	정화곡	ReY39-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
11	여곡	ReY11-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	39	정화곡	ReY39-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
11	여곡	ReY11-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	39	정화곡	ReY39-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
11	여곡	ReY11-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	39	정화곡	ReY39-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++
12	설향곡	ReY12-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	39	정화곡	ReY39-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
12	설향곡	ReY12-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	39	정화곡	ReY39-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
12	설향곡	ReY12-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	43	신곡	ReY43-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
12	설향곡	ReY12-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	43	신곡	ReY43-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
12	설향곡	ReY12-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	43	신곡	ReY43-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	++	+++
12	설향곡	ReY12-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	45	신곡Ⅲ	ReY45-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
12	설향곡	ReY12-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	45	신곡Ⅲ	ReY45-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++
13	설향곡	ReY13-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	46	하동신곡	ReY46-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
13	설향곡	ReY13-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	46	하동신곡	ReY46-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++
13	설향곡	ReY13-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	47	진주곡자(얇은뱅이밀)	ReY47-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++

13	설향곡	ReY13-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	48	진주곡자 (금강밀)	ReY48-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
13	설향곡	ReY13-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	48	진주곡자 (금강밀)	ReY48-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
13	설향곡	ReY13-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	48	진주곡자 (금강밀)	ReY48-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
13	설향곡	ReY13-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	48	진주곡자 (금강밀)	ReY48-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
14	백곡	ReY14-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	49	진주곡자 (미국산)	ReY49-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
14	백곡	ReY14-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	49	진주곡자 (미국산)	ReY49-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
14	백곡	ReY14-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	49	진주곡자 (미국산)	ReY49-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++
14	백곡	ReY14-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	49	진주곡자 (미국산)	ReY49-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
14	백곡	ReY14-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	49	진주곡자 (미국산)	ReY49-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
14	백곡	ReY14-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	49	진주곡자 (미국산)	ReY49-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
14	백곡	ReY14-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	49	진주곡자 (미국산)	ReY49-8	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
15	백곡Ⅱ	ReY15-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	50	송학곡자 (소울곡)	ReY50-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++
15	백곡Ⅱ	ReY15-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	50	송학곡자 (소울곡)	ReY50-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
15	백곡Ⅱ	ReY15-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	50	송학곡자 (소울곡)	ReY50-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
15	백곡Ⅱ	ReY15-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	50	송학곡자 (소울곡)	ReY50-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
15	백곡Ⅱ	ReY15-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	51	심순분할머니(이화곡)	ReY51-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
15	백곡Ⅱ	ReY15-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+++	51	심순분할머니(이화곡)	ReY51-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++
15	백곡Ⅱ	ReY15-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	51	심순분할머니(이화곡)	ReY51-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
16	여곡	ReY16-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	51	심순분할머니(이화곡)	ReY51-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
16	여곡	ReY16-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	51	심순분할머니(이화곡)	ReY51-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
16	여곡	ReY16-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	51	심순분할머니(이화곡)	ReY51-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
16	여곡	ReY16-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	51	심순분할머니(이화곡)	ReY51-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
16	여곡	ReY16-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	51	심순분할머니(이화곡)	ReY51-8	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
16	여곡	ReY16-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++	52	심순분할머니(이화곡)	ReY52-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
16	여곡	ReY16-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++	52	심순분할머니(이화곡)	ReY52-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
17	분곡	ReY17-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	53	푸른들농산	ReY53-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
17	분곡	ReY17-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	53	푸른들농산	ReY53-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
17	분곡	ReY17-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	53	푸른들농산	ReY53-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+++
17	분곡	ReY17-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	53	푸른들농산	ReY53-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
18	병곡	ReY18-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	54	금정산성	ReY54-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
18	병곡	ReY18-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++	54	금정산성	ReY54-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
18	병곡	ReY18-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	54	금정산성	ReY54-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
18	병곡	ReY18-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++	54	금정산성	ReY54-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
18	병곡	ReY18-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	54	금정산성	ReY54-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
18	병곡	ReY18-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	54	금정산성	ReY54-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
18	병곡	ReY18-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	54	금정산성	ReY54-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
21	조곡법	ReY21-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++	56	술샘 (국샘미인곡)	ReY56-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
21	조곡법	ReY21-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++	56	술샘 (국샘미인곡)	ReY56-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
21	조곡법	ReY21-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	56	술샘 (국샘미인곡)	ReY56-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++
21	조곡법	ReY21-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++	56	술샘 (국샘미인곡)	ReY56-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
21	조곡법	ReY21-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	56	술샘 (국샘미인곡)	ReY56-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
21	조곡법	ReY21-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++	56	술샘 (국샘미인곡)	ReY56-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
22	향온곡	ReY22-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++	56	술샘 (국샘미인곡)	ReY56-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
22	향온곡	ReY22-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++	57	이가수불	ReY57-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
22	향온곡	ReY22-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	57	이가수불	ReY57-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
22	향온곡	ReY22-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	57	이가수불	ReY57-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+++
22	향온곡	ReY22-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	57	이가수불	ReY57-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
22	향온곡	ReY22-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	57	이가수불	ReY57-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
22	향온곡	ReY22-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++	57	이가수불	ReY57-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++
23	향온곡Ⅱ	ReY23-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	57	이가수불	ReY57-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++
23	향온곡Ⅱ	ReY23-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	58	송명섭	ReY58-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
23	향온곡Ⅱ	ReY23-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	58	송명섭	ReY58-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
23	향온곡Ⅱ	ReY23-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	58	송명섭	ReY58-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++
23	향온곡Ⅱ	ReY23-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	58	송명섭	ReY58-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++
23	향온곡Ⅱ	ReY23-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	58	송명섭	ReY58-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
23	향온곡Ⅱ	ReY23-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++	58	송명섭	ReY58-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++
24	백수환동	ReY24-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++	58	송명섭	ReY58-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++
24	백수환동	ReY24-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++	59	제주도 붉은보리	ReY59-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	+++	+++	+++
24	백수환동	ReY24-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	59	제주도 붉은보리	ReY59-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
24	백수환동	ReY24-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+++	59	제주도 붉은보리	ReY59-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++

25	내부비전곡	ReY25-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	59	제주도 붉은보리	ReY59-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	++	+++	+++
25	내부비전곡	ReY25-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	59	제주도 붉은보리	ReY59-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+++	+++
25	내부비전곡	ReY25-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++	59	제주도 붉은보리	ReY59-8	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+++	+++
25	내부비전곡	ReY25-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	++	+++								
25	내부비전곡	ReY25-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+++								
25	내부비전곡	ReY25-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	+++								

(-, 발효 못함; +, Durham 관의 1/4 발효, Durham 관의 2/4 발효; +++, Durham 관의 3/4 발효; +++++, Durham 관 전체 발효)

1단계에서 선발된 *S. cerevisiae* 12 균주의 2차 프로바이오틱 기능 결과를 표 7에 제시하였다. 12균주 모두 pH 2.0 및 37°C의 배지 환경에서 배양 3일에 CO₂를 발생하였다. 배양 11일 이후 효모 배양액을 YM 고체 평판배지에 도말하여 25°C에서 3일 동안 배양하여 생존 실험을 수행하였다. 3개 균주 ReY25-6, 28-7, 57-3가 콜로니를 형성하였으며 프로바이오틱 기능을 가질 것으로 예상하여 최종 선발하였다.

표 12. 프로바이오틱 효모 선발 2차 결과 - 내산성 및 내고온성

Nuruk no.	Nuruk name	Yeast no.	Strains	Fermentation time (days)			Colony formation
				1	3	11	
15	백곡II	ReY15-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	-
25	내부비전곡	ReY25-5	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	-
25	내부비전곡	ReY25-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	-
27	녹두곡	ReY27-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	-
28	곡	ReY28-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	-
28	곡	ReY28-7	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	-
30	면곡	ReY30-1	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	-
30	면곡	ReY30-2	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	-
30	면곡	ReY30-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	-
30	면곡	ReY30-6	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	-
53	푸른들농산	ReY53-4	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	-
57	이가수불	ReY57-3	<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	-

결론적으로 1단계에서 선발한 *S. cerevisiae* 12균주 중에서 3균주를 프로바이오틱 기능을 갖는 우수 균주로 선발하였고 아래 그림에 제시하였다.

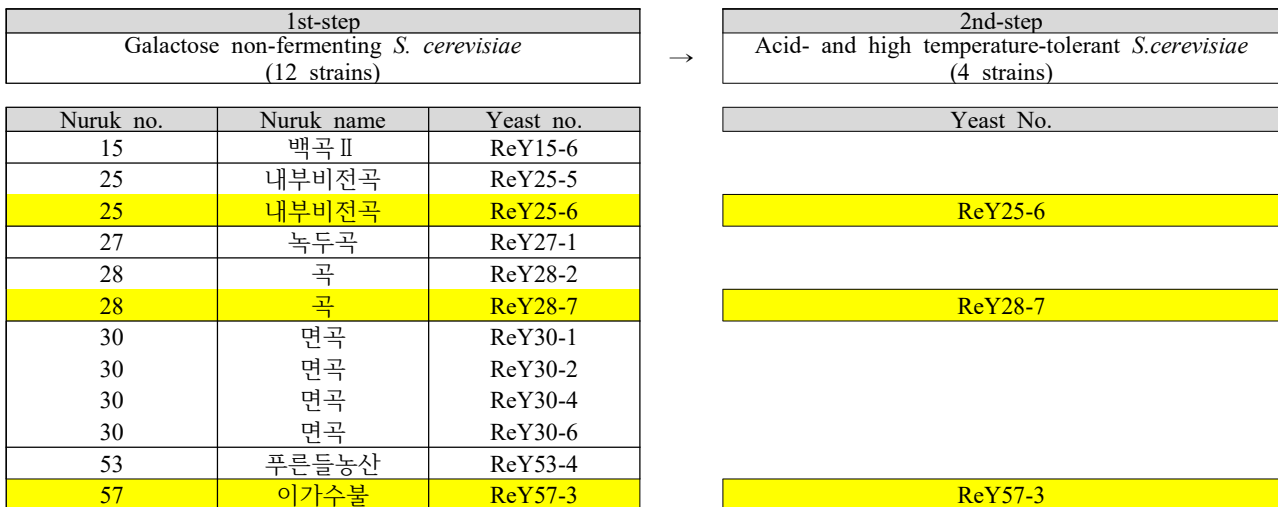


그림 7. 프로바이오틱 효모 선발 도표

선발된 균주를 바탕으로 담즙산염 내성 및 장부착능을 분석하여 최종 Rey57-3 균주를 선발하였으며 선발된 균주는 *Saccharomyces cerevisiae Boulardii-03*으로 명명, 한국미생물보존센터 기탁하여 기탁번호 KFCC 11826P를 부여받았다.

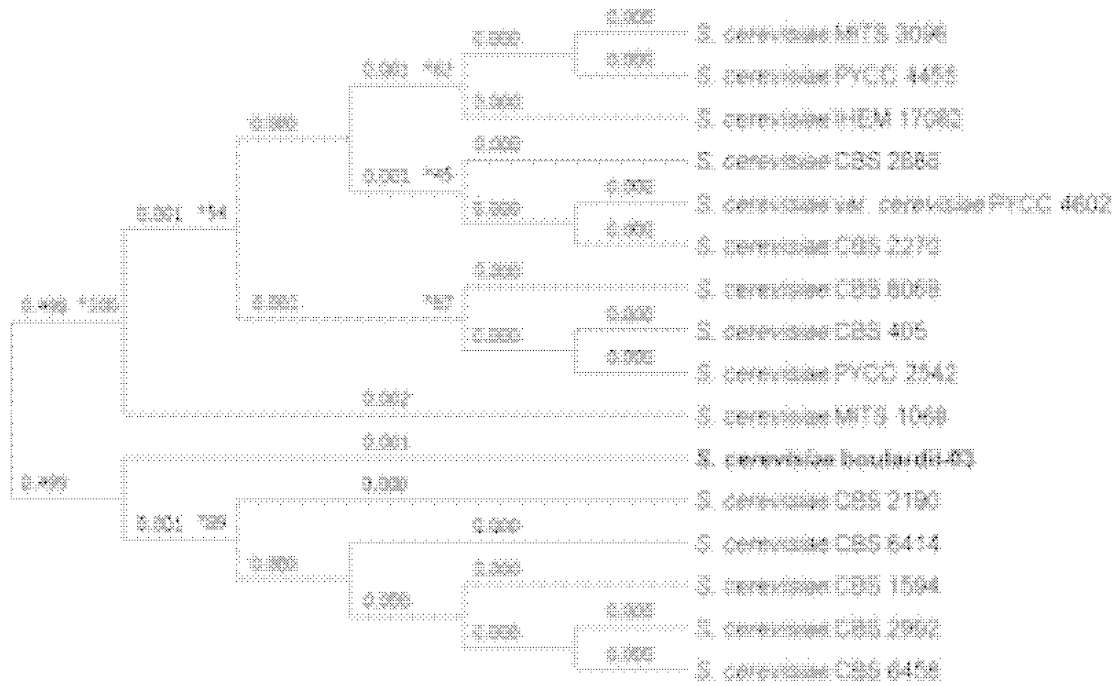


그림 8. *Saccharomyces cerevisiae Boulardii-03*

0.3% 담즙산 농도에서 *S. cerevisiae Boulardii-03* 균주는 약 90%의 높은 생존율을 보이는 것으로 나타났고, 담즙산에 대한 내성 정도는 대조군으로 사용한 비오플에 비해서도 더 우수한 것으로 나타났다. 또한 장부착능에 있어 비오플 균주에 비해 유의적으로 2배 이상 높은 장부착능을 보이는 것으로 나타났다. 따라서 해당 균주는 장내 환경에 생존하기 적합하고 같은 종의 균주보다 더 우수한 장내 부착능을 가지는 것으로 확인된 바, 우수한 프로바이오틱스 기능을 갖는다고 사료되어, 실제 경구투여에 의한 장내 probiotic 기능성 평가를 수행하였다.

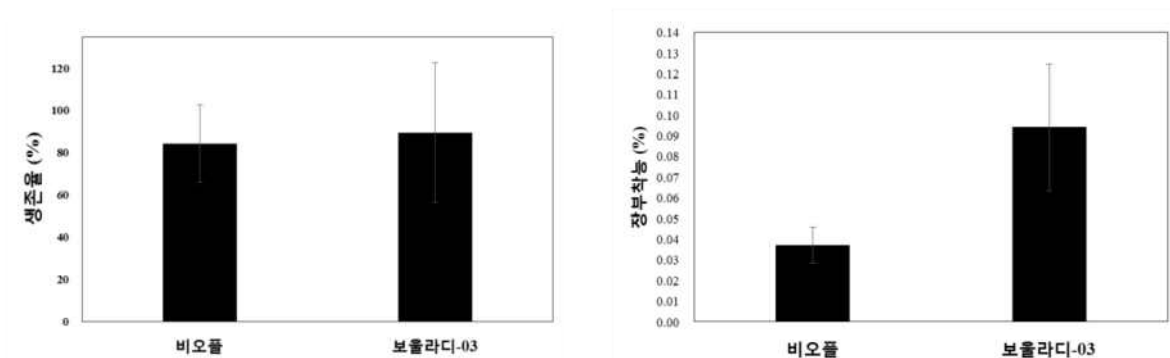


그림 9. 내산성 및 장부착능 비교

(4) 동물모델에서 *S. cerevisiae Boulardii*-03의 프로바이오틱스 활성 분석

○ 프로바이오틱 효능 검증을 위한 동물모델 준비

누룩으로부터 동정한 신균주인 *S. cerevisiae Boulardii*-03이 실제로 섭취 시 host의 건강에 도움을 주는 프로바이오틱스로서 효능이 있는지 확인하기 위하여 동물실험을 진행하였다. 프로바이오틱스 효능은 DSS(dextran sodium sulfate)로 유도된 대장염 (colitis) 마우스 모델을 사용하였으며, 이 모델은 염증성 장질환 (inflammatory bowel disease, IBD)나 과민성 대장 증후군 (Irritable bowel syndrome, IBS)와 관련된 장내의 염증을 유발하는 모델로 널리 사용되고 있다. 특히 현재 프로바이오틱 효모로 시판중인 비오플 (Bioflor)의 효능 검증에도 활용된 동물모델이다. DSS는 음수에 1-3% 수준으로 섞어 마우스에 급여하고 일주일 이내로 장 내의 염증이 발생하여 설사 및 혈변, 체중 감소 등의 징후를 보이게 된다. 이때 기준지표에 따라 질병점수 (disease activity index, DAI)를 매기고 최종적으로 마우스 희생 후 대장 (colon)의 길이 단축, 과도한 염증으로 인한 대장 내 무게 증가 등을 측정하여 무게/길이의 지표로 나타냄으로서 장염증 정도를 확인하였다. 해당 균주의 프로바이오틱스 효능을 확인하기 위하여 20g 내외의 6주령 C57BL/6 수컷 마우스 (Orient Bio)를 실험에 사용하였으며, 실험 전 마우스는 1주간 순화과정을 거쳤다. 마우스는 실험 내내 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 온도 및 $55\%\pm 10\%$ 습도가 조절된 사육실에서 자유식으로 사육되었으며 명암 주기는 12시간 주기로 조절하였다. 모든 동물실험은 한국식품연구원 동물실험운영규정에 준하여 수행하였다.

○ 균주 투여

S. cerevisiae Boulardii-03 균주의 효능 평가를 위하여, 마우스들을 랜덤으로 다섯 그룹으로 나누어 진행하였다. Cont은 정상군, DSS 그룹은 음수에 DSS (36-50kDA, MPBio)를 3%의 농도로 급여하여 장내 염증이 유도된 군이다. 또한, 3% DSS 급여 전에 2주간 108 CFU/day로 각각 *S. cerevisiae Boulardii*-03 (Boulardii-03), 비오플 (Bi), 표준 효모균주인 *S. cerevisiae* strain s288c (*S. cerevisiae*) 균주를 경구투여 하였다. 2주간의 효모 투여 이후, 1주일간 3%의 농도로 DSS를 음수에 섞어 급여하였고 이 기간 동안에는 매일 무게, 분변 형태, 출혈패턴을 표 1의 기준에 따라 점수를 매겨 DAI를 기록하였으며 7일째 되는 날 DSS를 다시 일반 음수로 교체 후 이틀간 안정화시켰다. 혈액과 대장조직은 15시간 공복 후 마취하여 채혈한 후 획득하였고, 대장조직의 길이는 캘리퍼스로 측정하여 기록하였다. 실험의 통계분석을 위하여 one-way ANOVA (Dunnett's test vs. DSS)를 사용하여 그룹 간 평균수치 유의차를 확인하였으며, 0.05 보다 낮은 p 값을 가질 경우에 유의미한 결과로 고려하였다 (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$).

Score	Weight loss (% of initial wt.)	Occult/gross bleeding	Stool consistency
0	<1	None	Normal stools
1	1~4.99	Small spots of blood in stool; dry anal region	Soft pellets not adhering to the anus
2	5~10	Large spots of blood in stool; blood spears through anal orifice	Very soft pellets adhering to the anus
3	>10	Deep red stool; blood spreads largely around the anus	Liquid stool on long stream; wet anus
4	>20	Gross bleeding	Diarrhea

DAI (disease activity index) = (Weight loss+Occult+Stool consistency)/3

○ 장염증 개선 효능 분석

위에서 언급한 바와 같이 총 5그룹에 대한 장염증 개선 정도를 분석하였다. DAI(disease activity index) score 결과는 7일동안 측정된 값의 area under curve (AUC)를 측정하여 개선 효능을 통계적으로 분석하였다. 그 결과, *S. cerevisiae Boulardii*-03과 비오플 (Bi) 처리 시 DSS 단독 처리와 비교하였을 때 유의적으로 DAI의 AUC 값이 감소하는, 장내 염증이 개선된 효능을 확인하였다. 반면, 표준 효모균주 *S. cerevisiae* strain s288c (*S. cerevisiae* type strain) 처리는 DSS 단독 처리와 통계적 차이가 나타나지 않았으므로 단순 효모의 투여만으로 장내 염증이 모두 개선되는 것은 아니며, 특정 균주 처리 시에만 장염 개선 효과를 보임을 확인하였다.

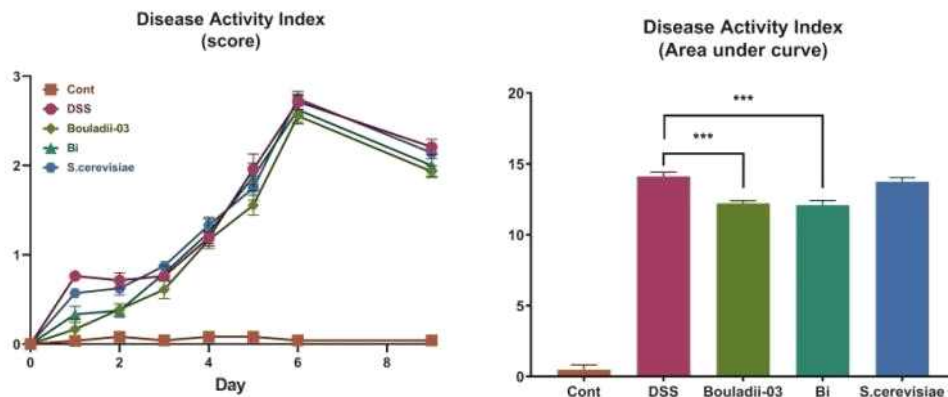


그림 10. DSS 처리 후 장내 염증 변화

DSS를 음수에 섞어 장내 염증이 유발되면 장 내의 염증성 사이토카인이 분비되고 장벽에 폴립이 형성되는 등, 대장 길이 당 무게가 증가하므로 무게/길이로서 대장염의 측정 지표로 사용될 수 있다. 마우스 희생 후 대장의 길이와 무게를 측정한 결과, 정상군 대비 DSS 처리군은 길이 대 무게 비율이 유의적으로 증가하였으나 *S. cerevisiae Boulardii*-03과 비오플 투여군에서는 이러한 증가가 유의적으로 감소하는 결과를 확인하였다. 역시, 표준효모균주 처리구에서는 이러한 효과가 미비하였다.

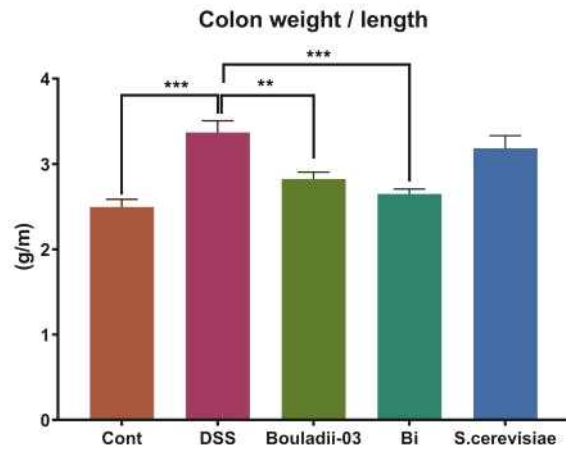
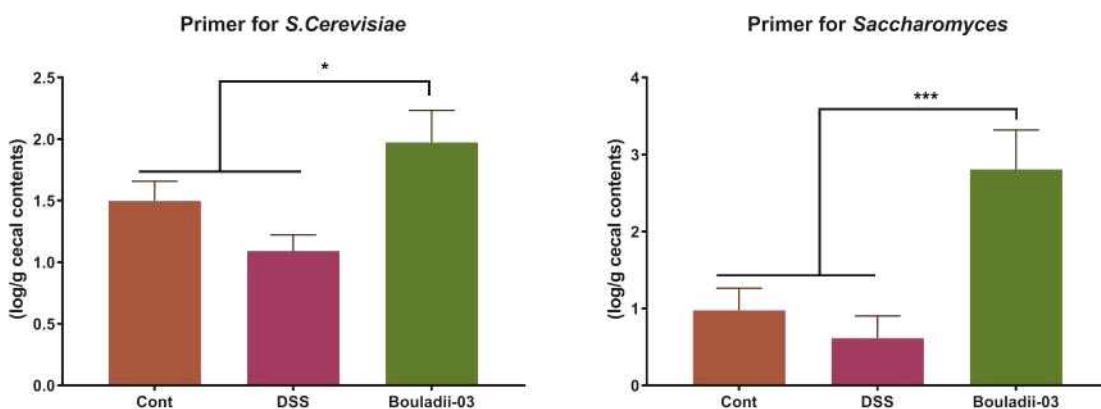


그림 11. 염증에 따른 장 무게 대비 길이 변화

위의 이러한 결과를 통하여 누룩으로부터 동정한 신균주인 *S. cerevisiae Boulardii-03*가 DSS로 유도되는 대장내 염증을 완화시키는 등의 개선 효능이 있음을 확인하였다.

○ 경구투여된 생균 효모의 장내 생존여부 확인

DSS로 유도되는 대장염에 있어서 *S. cerevisiae Boulardii-03*가 시판 중인 비오플과 유사한 수준으로 염증 개선 효능이 있음을 동물실험을 통하여 확인하였다. 따라서 in vivo경구투여 시에 실제 장까지 이들 균주가 생존할 수 있는지를 확인하기 위하여 맹장 내의 RNA를 추출하여 살아있는 균주(효모)의 log수를 확인하였다. 이를 위하여 실험 마우스는 희생 전날 *S. cerevisiae Boulardii-03* (108 CFU)를 투여하고 15시간의 절식 후 마취하여 맹장 내용물을 획득하였다. 맹장 내용물은 무게를 측정 후 RNase, DNase free의 깨끗한 튜브에 옮겨 담아 total RNA를 추출하였다. RNA 추출은 RNeasy PowerMicrobiome Kit (Qiagen)를 사용하였으며 RNA 농도 측정은 spectrophotometer (Varioskan, Thermo Electron Co.)로 수행하였다. *S.cerevisiae Boulardii-03*의 strain specific primer의 제작은 불가능하므로 *S. cerevisiae* specific primer와 Saccharomyces primer 두 종류의 primer를 사용하였다. RNA를 cDNA로 합성 후 두 종류의 프라이머를 사용하여 quantitative RT-PCR (StepOnePlus, Applied Biosystems)을 활용하여 측정하였다. Standard curve는 생균수를 측정된 표준효모균주 *S. cerevisiae* strain s288c의 RNA를 활용하였으며, 이에 대비하여 맹장 내 효모의 RNA를 정량하였다. 그 결과, 아래의 그림과 같이 맹장 내용물(g) 당 log 값이 *S. cerevisiae Boulardii-03* 투여에 의하여 유의적으로 증가하였기 때문에 해당 신균주인 *S. cerevisiae Boulardii-03*는 균주 자체를 경구로 섭취하여도 장 내에서 우수한 생존율을 가진다는 것을 확인하였다.



(5) 기확보 전통누룩 유래 미생물 생리기능성 추가 발굴

○ 전통누룩 유래 프로바이오틱 활성을 갖는 효모 선발

프로바이오틱스(probiotics)란 ‘충분한 양을 투여할 때 숙주의 건강에 유익한, 살아있는 미생물’을 말한다. 지금까지 보고된 대부분의 프로바이오틱스는 유산균으로 알려져 있으며, 최근 과민성 대장 증후군이나 항생제 연관 설사, 염증성 장질환, 변비 등과 같은 대장 질환의 영역에서 최근 점차 프로바이오틱스의 사용을 시도해보는 추세이다. 프로바이오틱스로 유산균을 사용하였을 때 야기될 수 있는 가장 큰 단점은 항생제에 대한 내성이 부족하다는 점을 들 수 있다. 따라서 항생제에 저해받지 않으면서 장내에서 프로바이오틱스 기능을 보이는 효모균이 최근 성장제로 크게 활용되고 있다. 이에 2차년도 (2019년)에서는 항생제에 영향을 받지 않고 알코올 발효력이 뛰어나 프로바이오틱 활성을 갖는 사카로마이세스 세레비지에 보울라디-03 균주를 개발하고 이를 산업화 종균으로 활용 (서울장수 기술이전)하였다. 당해연도 연구에서는 막걸리 등의 식품에 한정짓지 않고 현재 의약품으로 판매중에 있는 바이오플 (Bioflor, 사카로마이세스 보울라디 균주)에 비견될 수준의 우수한 프로바이오틱 활성을 갖는 효모를 추가적으로 선발하여 그 효능을 평가하였다.

2차년도 (2019년)에 최종적으로 프로바이오틱 효모 후보로 선발한 3종에 대한 정보는 아래의 표와 같다.

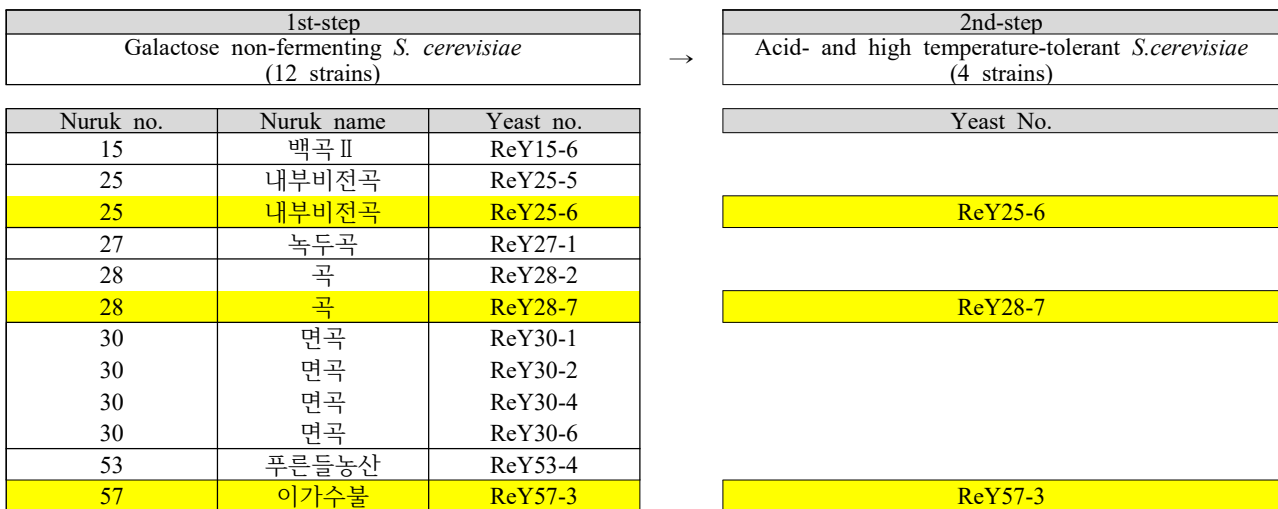


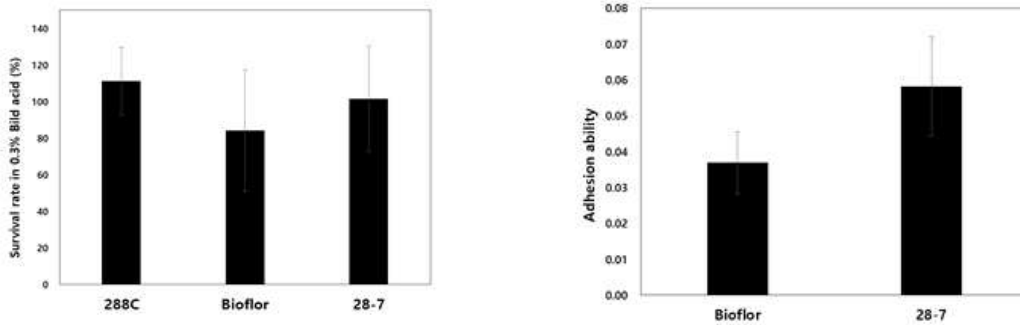
그림 12. 그림. 프로바이오틱 효모 선발 도표

선발된 균주를 바탕으로 담즙산염 내성 및 장부착능을 분석하였으며, 막걸리 담금을 통하여 최종적으로 막걸리에 적용한 ReY57-3 균주를 제외한 ReY28-7를 선발하였으며 선발된 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* 28-7로 명명, 한국미생물보존센터 기탁하여 기탁번호 KFCC11825P를 부여받았다.

0.3% 담즙산 농도에서 *S. cerevisiae* 28-7 균주 (28-7로 표기)는 약 90%의 높은 생존율을 보이는 것으로 나타났고, 담즙산에 대한 내성 정도는 대조균으로 사용한 바이오플에 비해서도 더 우수한 것으로 나타났다. 내산성 또한 pH 2와 pH3에서 생존율이 0으로 나타난 표준균주 288C와 달리 28-7에서는 바이오플에 비견될 수준으로 나타났다. 또한 장부착능에 있어 바이오플 균주에 비해 약 2배 높은 장부착능을 보이는 것으로 나타났다. 따라서 해당 균주는 장내 환경에 생존하기 적합하고 같은 종의 균주보다 더 우수한 장내 부착능을 가지는 것으로 확인된 바, 우수한

프로바이오틱스 기능을 갖는다고 사료되어, 실제 경구투여에 의한 장내 probiotic 기능성 평가를 수행하였다.

■ 내담즙산염 (0.3% bile acid) ■ 장부착능 우수



■ 내산성 (pH 2-3)

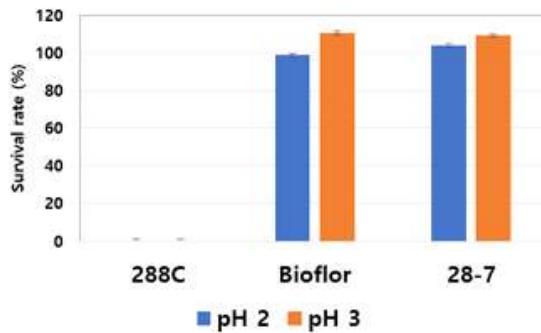


그림 13. 표준균주 (288C) 대비 프로바이오틱스 특성 비교

(6) 동물모델에서 *S. cerevisiae Boulardii*-02 (ReY28-7) 균주의 프로바이오틱스 활성 분석

○ 프로바이오틱 효능 검증을 위한 동물모델 준비

누룩으로부터 동정한 신탄균주인 *S. cerevisiae* 28-7 (28-7)이 실제로 섭취 시 host의 건강에 도움을 주는 프로바이오틱스로서 효능이 있는지 확인하기 위하여 동물실험을 진행하였다. 프로바이오틱스 효능은 DSS(dextran sodium sulfate)로 유도된 대장염 (colitis) 마우스 모델을 사용하였으며, 이 모델은 염증성 장질환 (inflammatory bowel disease, IBD)나 과민성 대장 증후군 (Irritable bowel syndrome, IBS)와 관련된 장내의 염증을 유발하는 모델로 널리 사용되고 있다. 특히 현재 프로바이오틱 효모로 시판중인 바이오플 (Bioflor)의 효능 검증에도 활용된 동물모델이다. DSS는 음수에 1-3% 수준으로 섞어 마우스에 급여하고 일주일 이내로 장 내의 염증이 발생하여 설사 및 혈변, 체중 감소 등의 징후를 보이게 된다. 이때 기준지표에 따라 질병점수 (disease activity index, DAI)를 매기고 최종적으로 마우스 희생 후 대장 (colon)의 길이 단축, 과도한 염증으로 인한 대장 내 무게 증가 등을 측정하여 무게/길이의 지표로 나타냄으로서 장염증 정도를 확인하였다. 해당 균주의 프로바이오틱스 효능을 확인하기 위하여 20g 내외의 6주령 C57BL/6 수컷 마우스 (Orient Bio)를 실험에 사용하였으며, 실험 전 마우스는 1주간 순화과정을 거쳤다. 마우스는 실험 내내 22±1℃ 온도 및 55%±10% 습도가 조절된 사육실에서 자유식으로 사육되었으며 명암 주기는 12시간 주기로 조절하였다. 모든 동물실험은 한국식품연구원 동물실험운영규정에 준하여 수행하였다.

○ 균주 투여

28-7 균주의 효능 평가를 위하여, 마우스들을 랜덤으로 다섯 그룹으로 나누어 진행하였다. C은 정상군, DSS 그룹은 음수에 DSS (36-50kDA, MPBio)를 3%의 농도로 급여하여 장내 염증이 유도된 군이다. 또한, 3% DSS 급여 전에 2주간 10⁸ CFU/day로 각각 *S. cerevisiae* 28-7 (28-7), 비오플 (Bi), 표준 효모균주인 *S. cerevisiae* strain s288c (*S. cerevisiae*) 균주를 경구투여 하였다. 2주간의 효모 투여 이후, 1주일간 3%의 농도로 DSS를 음수에 섞어 급여하였고 이 기간 동안에는 매일 무게, 분변 형태, 출혈패턴을 표 1의 기준에 따라 점수를 매겨 DAI를 기록하였으며 7일째 되는 날 DSS를 다시 일반 음수로 교체 후 이틀간 안정화시켰다. 혈액과 대장조직은 15시간 공복 후 마취하여 채혈한 후 획득하였고, 대장조직의 길이는 캘리퍼스로 측정하여 기록하였다. 실험의 통계분석을 위하여 one-way ANOVA (Dunnett's test vs. DSS)를 사용하여 그룹 간 평균수치 유의차를 확인하였으며, 0.05 보다 낮은 p 값을 가질 경우에 유의미한 결과로 고려하였다 (*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001).

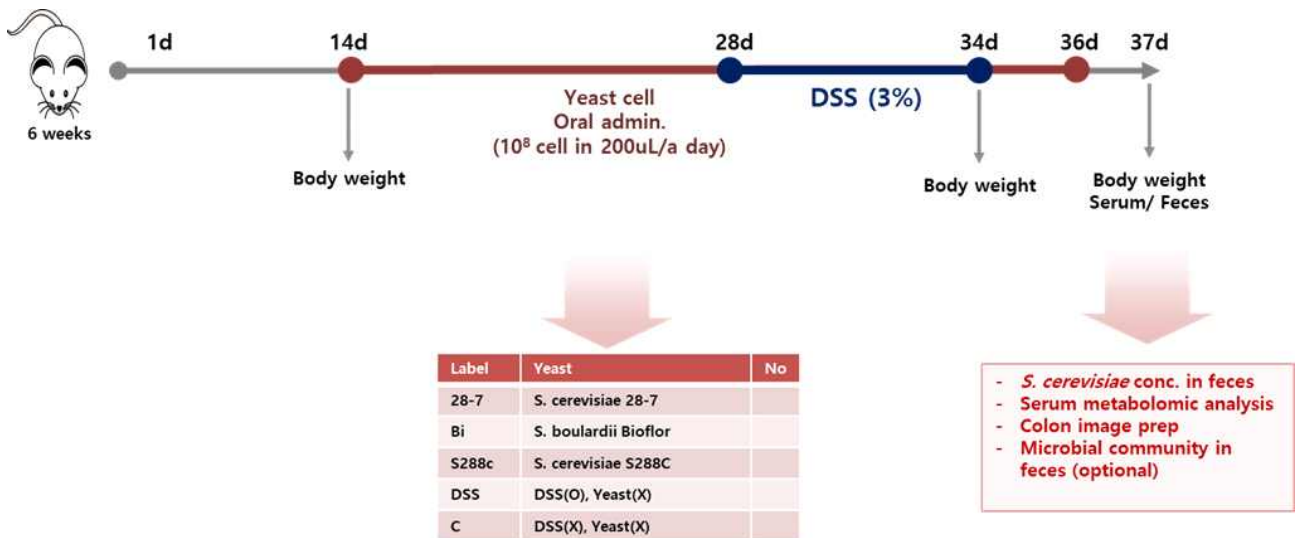


그림 14. 프로바이오틱 효모 평가를 위한 동물실험 모식도

표 13. 장내 염증수준 수치화를 위한 기준표

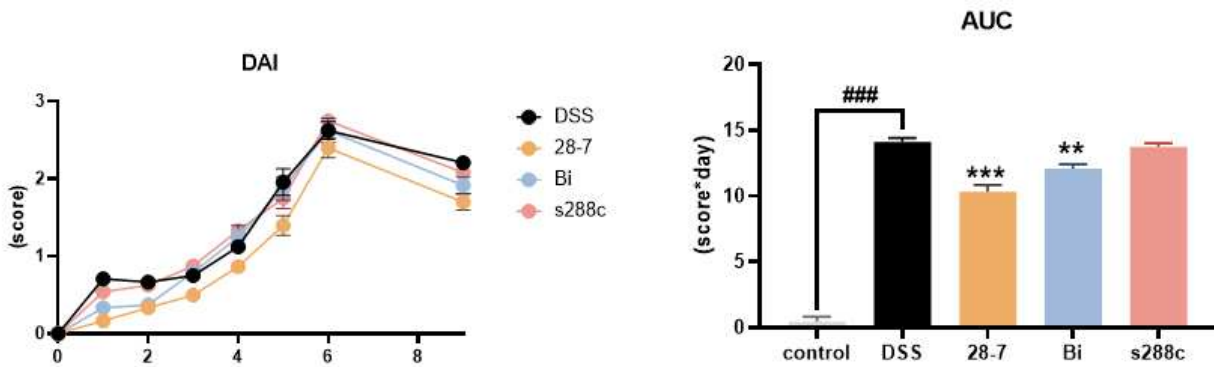
Score	Weight loss (% of initial wt.)	Occult/gross bleeding	Stool consistency
0	<1	None	Normal stools
1	1~4.99	Small spots of blood in stool; dry anal region	Soft pellets not adhering to the anus
2	5~10	Large spots of blood in stool; blood appears through anal orifice	Very soft pellets adhering to the anus
3	>10	Deep red stool; blood spreads largely around the anus	Liquid stool on long stream; wet anus
4	>20	Gross bleeding	Diarrhea

DAI (disease activity index) = (Weight loss+Occult+Stool consistency)/3

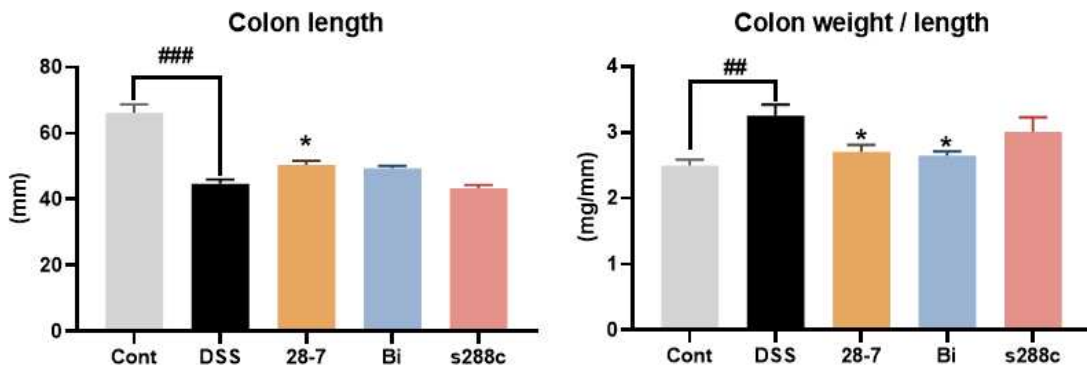
○ 장염증 개선 효능 분석

위에서 언급한 바와 같이 총 5그룹에 대한 장염증 개선 정도를 분석하였다. DAI(disease activity index) score 결과는 7일동안 측정된 값의 area under curve (AUC)를 측정하여 개선

효능을 통계적으로 분석하였다. 그 결과, 28-7과 비오플 (Bi) 처리 시 DSS 단독 처리와 비교하였을 때 유의적으로 DAI의 AUC 값이 감소하는, 장내 염증이 개선된 효능을 확인하였다. 반면, 표준 효모균주 *S. cerevisiae* strain s288c (*S. cerevisiae* type strain) 처리는 DSS 단독 처리와 통계적 차이가 나타나지 않았으므로 단순 효모의 투여만으로 장내 염증이 모두 개선되는 것은 아니며, 특정 균주 처리 시에만 장염 개선 효과를 보임을 확인하였다. 특히 28-7는 수치상으로는 비오플보다 우수한 수준의 장내 염증 개선효능을 가지는 것을 확인하였다.

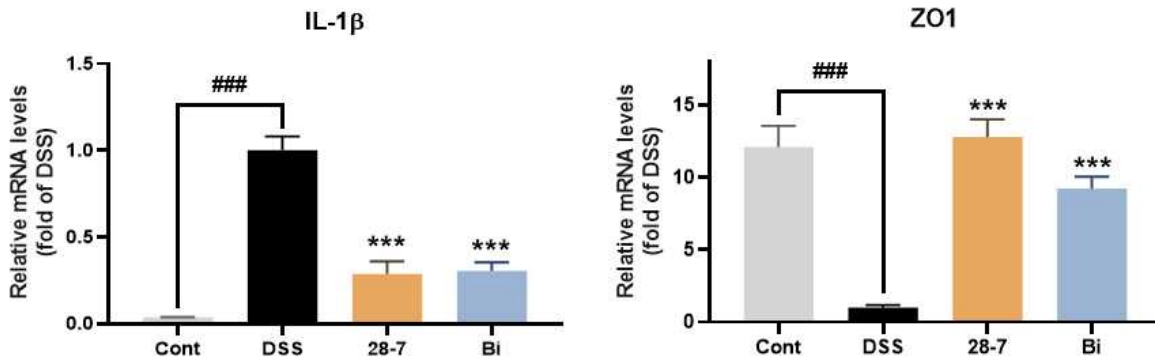


DSS를 음수에 섞어 장내 염증이 유발되면 장 내의 염증성 사이토카인이 분비되고 장벽에 폴립이 형성되는 등, 대장벽이 두꺼워지고 길이가 감소하며 따라서 대장 길이 당 무게가 증가하므로 이를 대장염의 측정 지표로 사용될 수 있다. 마우스 희생 후 대장의 길이와 무게를 측정한 결과, 정상군 대비 DSS 처리군은 길이 대 무게 비율이 유의적으로 증가하였으나 28-7 균주와 비오플 투여군에서는 이러한 변화가 유의적으로 개선되는 결과를 확인하였다. 특히 28-7 균주 처리시에는 DSS에 의하여 감소한 장길이가 유의적으로 증가하기도 하였다. 그러나 표준효모균주 처리구에서는 이러한 효과가 미비하였다.

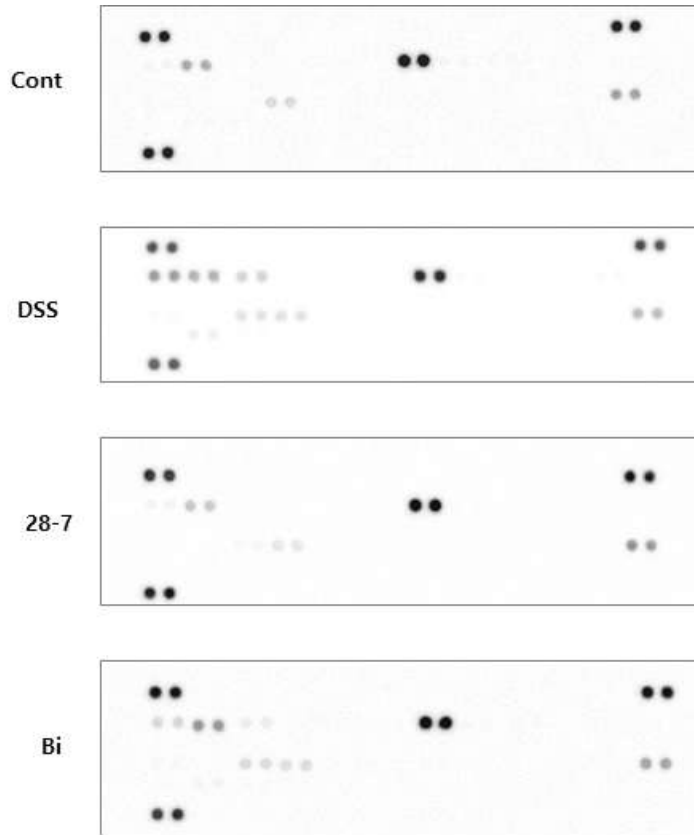


DSS 처리에 의하여 장내 염증반응이 유도가 되면 다양한 염증성 사이토카인의 분비가 증가하고 이에 따라 장관벽의 항상성이 깨지게 되면서 장투과성 (gut permeability)가 증가하는 등의 악영향을 유발하게 된다. 28-7 투여에 의하여 실제로 이러한 염증성 사이토카인 분비와 장누수와 관련된 지표들을 개선되는지를 확인하기 위하여 대표적인 염증성 사이토카인인 인터루킨 1베타 (Interleukin-1 β , IL-1 β)와 장관벽 관련 지표인 ZO1 (zonula occludens 1)의 mRNA 수준을 탐식하였다. 이를 위하여 대장 조직으로부터 mRNA를 추출하고 이를 cDNA로 합성하였다. RNA 추출은 RNeasy PowerMicrobiome Kit (Qiagen)를 사용하였으며 RNA 농도 측정은 spectrophotometer (Varioskan, Thermo Electron Co.)로, cDNA로 합성 후 IL-1 β 와 ZO1

두 종류의 프라이머를 사용하여 quantitative RT-PCR (StepOnePlus, Applied Biosystems)을 활용하여 측정하였다. DSS 처리에 의하여 염증성 사이토카인인 IL-1 β 의 대장 내 mRNA 발현 수준은 크게 증가하였고 이러한 증가가 28-7과 비오플 처리에 의하여 70% 가량 감소한 것을 확인하였다. ZO1은 이와 반대로 DSS 처리에 의하여 정상군 대비 1/12 수준으로 감소하였는데, 이는 장관벽의 투과성이 높아져 장관벽누수가 일어났음을 의미한다. 28-7과 비오플 투여에 의하여 이 역시 회복되는 것을 확인하였으며 특히 28-7은 비오플 대비 더 뛰어난 보호 효능과 더불어 정상군 수준으로의 회복을 유도하는 것을 확인하였다.



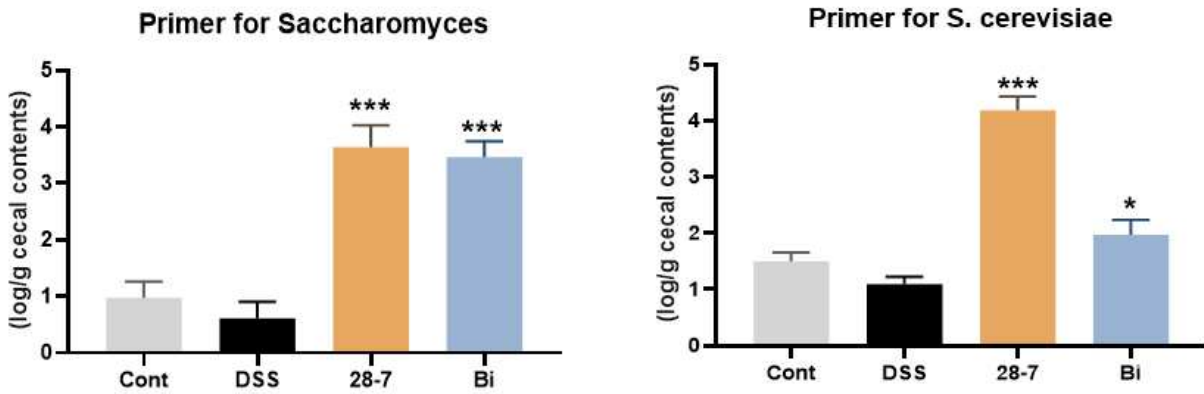
이러한 28-7의 DSS로 유도되는 염증에의 개선효능을 추가적으로 확인하기 위하여 혈액 (serum) 시료를 활용하여 혈중 염증성사이토카인 수준을 탐색하는 cytokine antibody array를 수행하였다. 이는 Mouse cytokine array kit (R&D systems, ARY006)을 사용하여 제조사가 제공하는 프로토콜에 맞추어 실험하였다. 해당 실험은 혈액 내의 단백질이 멤브레인에 부착된 안티바디와 반응하여 스팟형태로 나타나게 되는데 이를 검출하여 사이토카인 분비/발현 정도를 상대적 정도로 검출할 수 있도록 한다. 정상군 (Cont)과 DSS 유도군 (DSS), 28-7 균주와 비오플 (Bi) 투여군 총 4개의 그룹의 혈액을 활용한 결과, 28-7에서 두드러지게 Cont과 유사한 발현 패턴을 가지는 것을 확인하였으며 이는 비오플에 의한 개선보다 뛰어난 것으로 판단된다.



이러한 결과들은 누룩으로부터 동정한 신균주인 *S. cerevisiae* 28-7 (28-7)이 DSS로 유도되는 대장내 염증을 완화시키는 등의 개선 효능이 있음을 의미한다.

○ 경구투여된 생균 효모의 장내 생존여부 확인

DSS로 유도되는 대장염에 있어서 28-7 균주가 시판 중인 비오플과 유사한 수준으로 염증 개선 효능이 있음을 동물실험을 통하여 확인하였다. 따라서 *in vivo* 경구투여 시에 실제 장까지 이들 균주가 생존할 수 있는지를 확인하기 위하여 맹장 내의 RNA를 추출하여 살아있는 균주(효모)의 log수를 확인하였다. 이를 위하여 실험 마우스는 희생 전날 28-7 균주 (108 CFU)를 투여하고 15시간의 절식 후 마취하여 맹장 내용물을 획득하였다. 맹장 내용물은 무게를 측정 후 RNase, DNase free의 깨끗한 튜브에 옮겨 담아 total RNA를 추출하였다. RNA 추출은 RNeasy PowerMicrobiome Kit (Qiagen)를 사용하였으며 RNA 농도 측정은 spectrophotometer (Varioskan, Thermo Electron Co.)로 수행하였다. *S. cerevisiae* 28-7의 strain specific primer의 제작은 불가능하므로 *S. cerevisiae* specific primer와 *Saccharomyces* primer 두 종류의 primer를 사용하였다. RNA를 cDNA로 합성 후 두 종류의 프라이머를 사용하여 quantitative RT-PCR (StepOnePlus, Applied Biosystems)을 활용하여 측정하였다. Standard curve는 생균수를 측정한 표준효모균주 *S. cerevisiae* strain s288c의 RNA를 활용하였으며, 이에 대비하여 맹장 내 효모의 RNA를 정량하였다. 그 결과, 아래의 그림과 같이 맹장 내용물(g) 당 log 값이 *S. cerevisiae* Boulardii-02 투여에 의하여 유의적으로 증가하였기 때문에 해당 신균주인 *S. cerevisiae* Boulardii-02는 균주 자체를 경구로 섭취하여도 장 내에서 우수한 생존율을 가진다는 것을 확인하였다. 특히 *S. cerevisiae* 특이적인 primer를 사용하여 검출하였을 때 비오플 투여 시 보다 28-7 균주 투여시의 살아있는 *S. cerevisiae*의 농도가 102배 이상 높은 것으로 확인하였다. 이는 비오플보다 28-7 균주가 더 안정적으로 장내에 생존할 수 있음을 간접적으로 확인한 결과이다.



위의 결과들을 종합적으로 보았을 때, *S.cerevisiae* 28-7 (28-7)은 프로바이오틱 효모로서의 가능성이 충분하며 특히 일부 효능에 대해서는 시판중인 의약품 비오플보다 효능이 뛰어난 것을 확인하였다. 향후 이를 활용하여 건강기능식품이나 의약품 개발이 가능할 것으로 판단되는 만큼, 추가 효능 평가를 통한 충분한 데이터 확보 후 막걸리 외의 타 제품에 적용할 수 있을 것이라 생각된다.

(7) 기 개발 균주의 유전체 분석 및 핵심유전자 발현 최적화 조건 설정

○ *Saccharomyces cerevisiae* 98-5, KSD-YC 효모의 유전체 분석

두 균주의 진화적 위치를 확인하기 위해 변이율이 높은 13개 유전자를 marker로 사용하여 시퀀스 비교를 통해 진화적 위치가 다양한 여러 균주들과 비교 분석을 진행하였다(그림 59). 분석 결과, KSD-Yc 균주는 일본의 사케 발효 균주인 K7과 매우 유사하게 분석되었으며, KFRI 균주는 아시아 계열의 균주들이 아닌 유럽 계열의 균주에 속하는 YJM1381, EC1118, YJM270 등과 유사하게 분석되었다 (그림. 유전체 정보 기반 누룩 유래 산업용 막걸리 효모 KSD-Yc와 KFRI의 진화적 위치 분석).

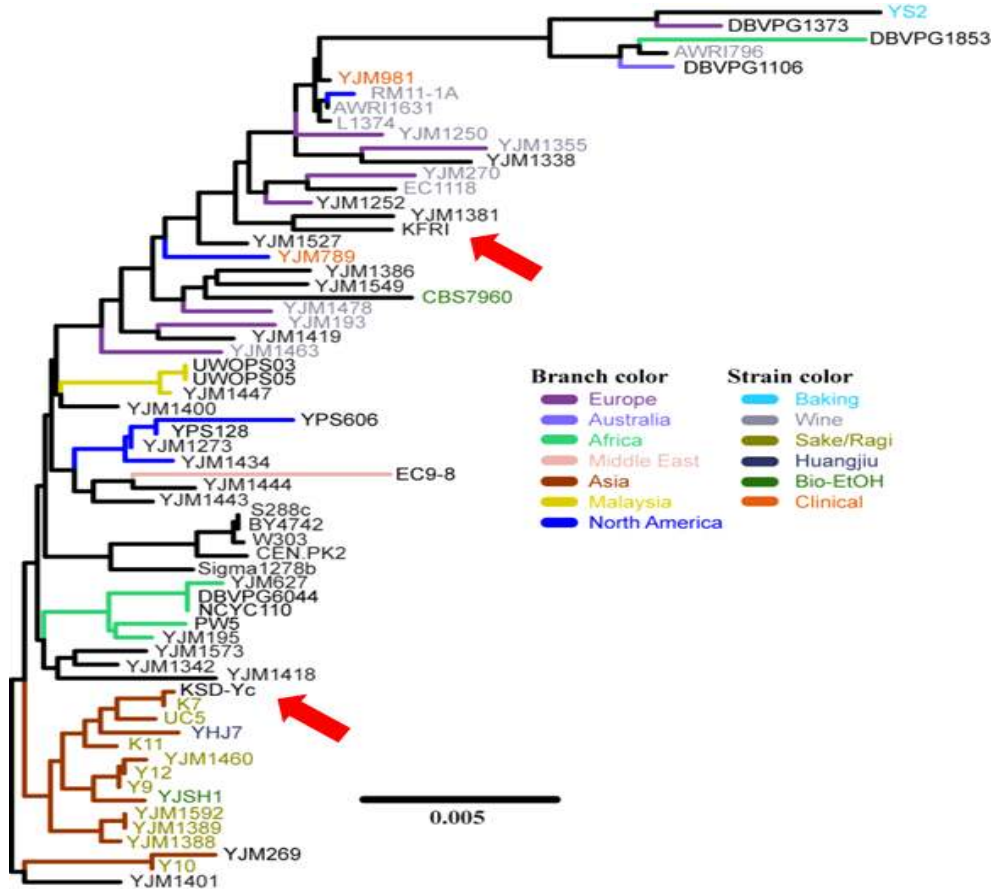


그림 15. 유전체 정보 기반 누룩 유래 산업용 막걸리 효모 KSD-Yc와 KFR1의 진화적 위치 분석

이전 연구를 통해 KFR1 균주는 12번 염색체의 크기가 S288C 유래의 잘 알려진 실험용 균주 및 KSC-Yc 균주와도 다르게 1.8 배 가량 크게 나타났다. 이를 확인하기 위해 진화적으로 비슷하게 분석된 위 균주들의 게놈 데이터도 확인한 결과 진화적으로 가장 가까운 YJM1381 균주에도 염색체 12번의 비슷한 확장된 부분이 존재함이 확인되었다(그림 나-2). 흥미롭게도 YJM1381 균주는 쿠바의 럼(rum) 발효공정에 사용되고 있는 산업 균주여서 KFR1 균주의 활용도를 막걸리 발효에서 다양한 종류의 알콜 발효 균주로서의 확장 가능성을 제시하고 있다.

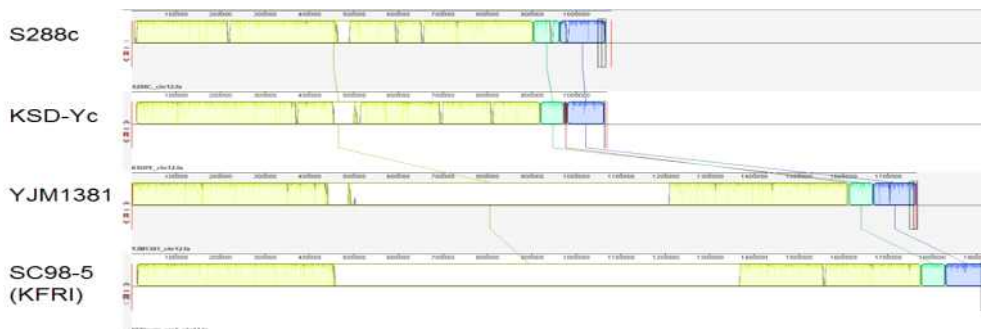


그림 16. *S. cerevisiae* KSY-YC와 YJM1

(8) 유해물질 저감 누룩 발효조건 연구

아플라톡신 (aflatoxin, AF)은 독성과 발암성을 갖는 전 세계적으로 인간과 가축에 심각한 공중보건 문제를 발생시키는 곰팡이 2차 대사물질이다. 아플라톡신 생성 곰팡이는 주로 토양에 존재하며 농작물, 특히 옥수수과 땅콩과 같은 곡류와 견과류를 오염시켜 아플라톡신을 생성한다.

1981년 케냐에서 아플라톡신 오염 옥수수에 의하여 20명의 급성간염 환자가 발생하였고 이 중 12명이 사망하였다. 2005년 미국에서는 아플라톡신 오염 사료를 섭취한 개 75마리가 죽고 백여 마리 이상이 심각한 간 손상을 겪었다.

아플라톡신에 의한 식품 및 사료 오염 사건은 주로 아프리카와 같은 아열대 기후에서 발생한다. 아플라톡신 주요 원인균인 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus parasiticus*가 아열대의 고온다습한 환경의 부패 식물에서 주로 발견되며 *A. flavus*의 아플라톡신 생산량 또한 증가하기 때문이다. 농작물에서 주로 발견되는 아플라톡신은 B1, B2, G1, G2 로 그 중에서도 특히 아플라톡신 B1은 독성이 가장 강하여 1993년 국제암연구소 (International Agency for Research on Cancer, IARC)에 의해 '1차적으로 인간에 대한 발암성이 확인된 1 군 (Group 1)'으로 분류되었다. AF B1은 간에서 대사되어 두 번째로 독성이 강한 AF M1으로 전환된다. AF M1은 모유를 통해 다음 세대로 전이된다. 따라서 식품과 사료에서 AF 오염을 방지하기 위한 많은 연구가 수행되었다.

국내에서도 전통식품 및 누룩에 존재하는 아플라톡신으로 인한 문제점이 부각되고 있다. 2021년 7월 식품의약품안전처는 A 제조회사에서 제조·판매한 옷말전통된장(식품유형: 한식된장)에서 아플라톡신이 기준치(B1, B2, G1 및 G2의 합 15.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하, 단 B1은 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하)를 초과(합 62.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, B1 57.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)해 판매 중단 및 회수 조치한다고 30일 밝혔다.

누룩 (Nuruk)은 전통주의 발효제 (fermentation starter)로 찌 곡물가루로 성형한 덩어리에 야생 미생물이 생육하여 제조된다. 따라서 미생물 군집이 매우 복잡적이며 비의도적으로 바람직하지 않은 미생물이 생육할 가능성이 있다. 다행히 현재까지 누룩에서 분리된 곰팡이의 독소 생산 능력은 0~1.11 ppb 미만으로 안전하다고 보고되었으나 기후 변화로 인한 온도 상승으로 인해 아플라톡신 오염의 위험성을 배제할 수 없다. 실제 유럽연합은 2003~2004년 기온상승으로 심각한 작물 곰팡이오염 사건을 겪었고, 이후 집행위원회 규칙 (Commission Regulation (EC)) NO 1881/2006에 의거하여 아플라톡신 B1과 총 아플라톡신의 최대허용량을 각각 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 강화하였다.

식품에서 곰팡이독소는 경쟁미생물을 이용하여 제어할 수 있다. 유산균 (lactic acid bacteria, LAB)은 고대부터 식품발효에 활용되었으며 미국 식품의약국 (Food and Drug Administration, FDA)의 '일반적으로 안전한 물질 (generally recognized as safe, GRAS)'에 등록될 정도로 안전성이 입증되었기에 이를 활용한 AF 억제 연구가 상당수 진행되었다. Antifungal activity를 갖는 LAB는 유제품, sourdough, 김치, 신선채소, 육제품 등 다양한 식품에서 분리되었다. 대부분 *Lactobacillus* 속이며 그 외에 *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus* 속 등으로 확인되었다. LAB는 세포벽 결합과 AF 생성 관여 유전자의 발현 억제를 통해 AF을 제거하며 organic acids, phenolic compounds, peptidic compounds 등의 antifungal metabolites를 생성한다. 그러나 상세한 억제 메커니즘은 아직 밝혀지지 않았고 antifungal metabolites의 대부분이 비동정 상태이다.

따라서 본 연구는 전통주와 전통누룩의 곰팡이독소에 대한 안전성 향상을 위하여 누룩에서 LAB를 분리하여 aflatoxigenic 곰팡이의 생육과 AF 생성을 제어하는 것을 목적으로 하였다. 이를 위해 첫째, 누룩에서 LAB를 분리하였고, 둘째, 분리된 LAB의 곰팡이 생육 억제력과 AF 생성 억제력을 확인하였다. 이 과정에서 누룩 제조에 유용한 *A. oryzae*의 생육을 방해하지 않으면서 동시에 *A. flavus*의 생육을 억제하는 LAB를 선별하였다. 셋째, LAB가 이미 존재하는 AF을 감소시키는지 확인하였고, 넷째, AF 생성 억제 LAB의 기능성 유전자 발굴을 위해 NGS 기반 전유전체 분석을 수행하였다.

○ 전통누룩 확보 및 유산균 분리 동정

전통누룩의 제조 및 시약구입

‘전통누룩 유래 자생 미생물 자원 유용성 연구 과제’의 일환으로 2015년에 복원 및 수집한 전통누룩 61종에서 총 아플라톡신 함량이 15 ppb 이상인 누룩 14종 (high-AF)과 4 ppb 미만의 누룩 3종 (low-AF)에서 LAB를 분리하였다. AF 표준물질 (CRM46304, supelco, USA)은 시그마-알드리치에서 구매하였다 (표). 이외의 모든 시약은 HPLC 분석 등급을 사용하였다. 표준균주 *Aspergillus oryzae* RIB40 (ATCC42149)와 *Aspergillus flavus* NRRL3357 (ATCC200026)는 미국균주은행 (American Type Culture Collection, ATCC)에서 분양 받았다. LAB 분리에는 Raka-Ray 배지 (sigma-aldrich), BCP 배지, MRS 배지 (Difco)를 사용하였고 곰팡이 배양에는 PDA, YES 배지를 사용하였다.

표 14. Aflatoxin standard composition

CAS No	Aflatoxins	Concentration (μ g/mL)	Formula	Molecular weight	Exact Mass (m/z)	[M]+H (m/z)
1162-65-8	B ₁	1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312.28	312.0634	313.0707
1165-39-5	G ₁	1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328.27	328.0583	329.0656
7220-81-7	B ₂	0.3	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.29	314.0824	315.0863
7241-98-7	G ₂	0.3	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.29	330.0740	331.0812

유산균의 분리 및 동정

누룩분말 1 g을 0.85% 멸균 생리식염수에 넣어 완전히 혼합하였다. 실온에서 1시간 방치 후 106까지 연속적으로 10진 희석 하였다. 각 희석배수의 상층부에서 1 mL를 취하여 LAB 선택배지 Raka-Ray에 접종하여 확산평판 법으로 30°C에서 48시간 배양하였다. Raka-Ray에 생성된 콜로니를 BCP 배지에 희석 도말하여 30°C에서 48시간 배양하였다. BCP 배지에서 노란색 환을 형성한 콜로니를 LAB로 간주하여 MRS 평판배지에 순수 분리 및 보관하여 이후 실험에 사용하였다.

순수분리 된 균주의 동정은 16S rRNA를 사용하여 수행되었다. 프라이머는 27F 5'(AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'와 1492R 5'(TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'를 사용하였다. 분리 균의 gDNA는 InstaGene Matrix (BIO-RAD, hercules, CA, USA)로 추출하였다. 추출된 DNA는 20 ng의 genomic DNA 주형에 대하여 30 μ L 반응물에서 EF-Taq (SolGent, Daejeon, Korea)을 사용하여 PCR로 증폭되었다. Tap polymerase를 95°C에서 2분 동안 활성화 하였고, 95°C에서 1분 동안 변성, 55°C에서 1분 동안 annealing, 72°C에서 1분 동안 extension하는 과정을 35 cycle 반복하였다. 뒤이어 final extension은 72°C에서 10분 동안 진행하였다. 증폭된 최종 산물은 multiscreen filter plate (Millipore Corp., Billerica, MA, USA)로 정제하였다. 시퀀싱 반응은 PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit로 수행하였다. Extension products를 함유한 DNA는 Hi-Di formamide (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 혼합하여 95°C에서 5분 동안 배양하고 5분 동안 얼음에 방치하였다. 최종 산물은 ABI Prism 3730XL analyzer (Applied Biosystems)로 분석되었고 Variant Report Software version 11 (Applied Biosystems)로 시퀀싱 데이터를 분석하였다.

○ 메타지놈 및 유전체 분석

메타지놈 분석

전통누룩의 세균 군집을 차세대염기서열분석 (next generation sequencing analysis, NGS)으로 분석하였다. DNA는 PowerMax Soil DNA Isolation Kit (MO BIO, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 추출하였다. 각 시퀀스는 V3와 V4 region (519F-806R)을 증폭시키기 위해 Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library protocols을 따라 준비하였다. DNA quality 는 PicoGreen과 Nanodrop으로 측정하였고 input gDNA (10 ng)는 PCR로 증폭되었다. Paired-end (2×300 bp) sequencing은 MiSeq™ platform (Illumina, San Diego, USA)으로 수행되었다. Reads의 품질을 향상시키기 위해 short reads와 chimeric reads를 제거하고 extra long tails을 손질하였다. Non-chimeric reads는 97% OUT cutoff 수준에서 조작분류단위 (Operational Taxonomic Units, OTUs)로 그룹되었고 미생물의 분류와 다양성 계산은 Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME)로 수행되었다. 각 OUT에 대한 대표서열은 SILVA (release123) DB를 reference로 두고, UCLUST (v. 1.2.22)를 사용하여 분류학적 정보를 확인하였다. 미생물 분류를 위해 각각의 OTU로부터 대표적인 sequences를 사용하여 계통수 (phylogenetic trees)를 구성하였다. 통계분석을 통해 publication-quality graphic results를 시각화 하였다.

유산균 전장유전체 분석

시퀀싱 라이브러리 제작: *W. paramesenteroides*의 genomic DNA는 FastDNA Spin kit for Soil을 사용하여 제조사의 방법을 따라 추출하였다. 추출한 gDNA의 온전성은 아가로스 겔 전기영동으로 확인하였고 Quant-IT PicoGreen (Invitrogen)으로 정량하였다. 시퀀싱 라이브러리는 업체 지침 20-kb Template Preparation Using BluePippin™ Size-Selection System에 따라 PacBio DNA Template Prep Kit 1.0.을 사용하여 준비하였다. 즉, 정량한 gDNA 10 µg을 g-tubes (Covaris)를 사용하여 20 kb 크기의 단편으로 절단하였고 여기에 purified, end repaired, blunt end SMARTbell adapters를 부착하였다. 라이브러리는 Quant-IT PicoGreen (Invitrogen)으로 정량하였고 high-sensitivity DNA chip (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)으로 정성하였다. 이어서 구출된 라이브러리 서열은 PacBio P6C4 chemistry in 8-well-SMART Cell v3 in PacBio RSII로 분석하였다.

전장유전체 서열분석: *W. paramesenteroides* N44-2 균주의 유전체는 Pacbio sequencing data를 사용한 de novo로 구축하였다. 서열분석은 Chunlab, Inc에서 수행하였다. PacBio sequencing data는 HGAP2 protocol (Pacific Biosciences, USA)을 사용하여 PacBio SMRT Analysis 2.3.0으로 구성되었다. PacBio sequencing data에서 얻어진 contigs는 Circlator 1.4.0 (Sanger institute)로 원형화되었다.

데이터 분석: 단백질 암호화 영역 (protein-coding sequence, CDS)은 gene prediction 알고리즘 Prodigal (PROkaryotic DYnamic programming Gene-finding ALgorithm) 2.6.2로 예측하였다. tRNA 코딩 유전자는 tRNAscan-SE 1.3.1를 사용하여 검색하였다. rRNA와 기타 non-coding RNAs는 Rfam 12.0 database를 사용하는 공분산 모델 (covariance model search)로 검색하였다. CRISPRs는 PilerCR 1.06와 CRT 1.2에 의해 탐지되었다. CDS는 orthologous groups (EggNOG 4.5; <http://eggnogdb.embl.de>)을 참조하여 기능에 따라 분류되었다. 추가적인 functional annotation을 위해 예측된 CDS는 UBLAST program 을 사용하여 Swissprot, KEGG, SEED 데이터베이스와 비교되었다.

○ *Aspergillus flavus* 생육 억제 유산균 탐색

곰팡이 포자 현탁액 및 유산균 배양액 준비

곰팡이를 PDA 평판배지에 접종하여 25℃에서 8일 동안 배양하였다. 포자를 백금으로 수확하여 멸균 0.1% Tween 80에 현탁하였고 멸균거즈에 여과하여 균사체를 제거하였다.

현탁액의 포자수를 혈구계 (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany)로 계수하여 농도가 105 spores/mL이 되도록 YES broth로 희석하여 이후 실험에 사용하였다. LAB 배양액은 MRS 액체배지 1 mL에 분리 균을 접종하여 30°C에서 48시간 배양하여 준비하였다. 이후 모든 실험에서 동일한 방법으로 포자현탁액과 LAB 배양액을 준비하였다.

곰팡이 생육 억제능력 분석

LAB의 *A. flavus* 생육 억제력은 disk diffusion technique과 agar spot assay를 조합하여 분석하였다. 15 mL 용량의 MRS 평판배지 표면 위의 직경 5 mm의 멸균 disk에 LAB 배양액 5 µL를 접종하고 30°C에서 48시간 동안 배양하였다. 이어서 포자수가 10⁶ spores/mL인 0.8% agar 함유 molten YES 고체배지 10 mL를 중첩하고 25°C에서 48시간 배양하였다. 대조균은 LAB 배양액 대신 MRS broth를 사용하였다. Disk 주변에 투명 환을 생성하는 LAB가 곰팡이 생육을 억제한다고 판단하였다.

○ 아플라톡신 생성 억제 및 분해 유산균 탐색

아플라톡신 생성 억제

곰팡이포자 현탁액과 LAB 배양액을 위에 서술한 방법과 동일하게 준비하였다. 30°C에서 48시간 배양시킨 LAB 배양액 0.8 mL를 포자현탁액 (107 spores/mL) 0.8 mL와 혼합하여 25°C에서 3일 동안 배양하였다. LAB와 포자 혼합 배양액을 진탕하고 5°C, 13000 rpm에서 1분 동안 원심 분리하여 상층액 1 mL를 분리하였다. 1% formic acid를 함유한 methanol:dichloromethane:ethyl acetate=1:2:3 (v/v/v) 혼합용매 1 mL를 넣고 5°C, 13000 rpm에서 1분 동안 원심 분리한 다음 하층액을 분리하였다. AF 추출액의 추출용매는 refrigerated centriVap. concentrator로 40°C에서 제거하였다. 건조물은 100% methanol로 수화하였다. 수화액은 0.45 µm syringe filter (Advantec)로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다.

아플라톡신 분해

곰팡이포자 현탁액과 LAB 배양액은 위에 서술한 방법으로 준비하였다. MRS 액체배지 900 µL에 1000 ppb AF 50 µL와 LAB 배양액 50 µL를 접종하여 28°C에서 48시간 배양하였다. 대조균은 LAB 배양액 대신 MRS 액체배지를 사용하였다. AF은 위의 AF 생성 억제에서 서술한 방법과 동일하게 추출하였다.

LC-MS QTOF 분석 조건

아플라톡신은 Agilent 6520 QTOF MS/MS (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA)가 장착된 Agilent HPLC 1200 infinity series로 분석하였다. HPLC 시스템은 autosampler (G4226A), binary pump (G4220A), column oven (G1316C)으로 구성되었고 이온화원은 dual electrospray ionization (ESI) 방식이었다.

분석 조건은 Varga et al. (2016)의 방법을 참고하였다. 이동상은 0.1% formic acid를 함유한 물 (A)과 0.1% formic acid를 함유한 ACN 용매 (B)를 사용하였다. Gradient mode로 9분 동안 B 용매의 비율을 10% (0.0-0.5분), 95% (3.0-7.5분), 60% (7.5-8.0분), 10% (8.0-9.0분)로 변화시켰다. 농도별 표준용액과 시료를 5 µL 주입하여 InfinityLab poroshell 120 EC-C18 컬럼 (2.1 mm × 100 mm, 2.7µm) (Agilent, USA)에서 0.4 mL/min 속도로 아플라톡신을 분리하였다. Post time은 5분, 오븐 온도는 30°C로 설정하였다.

질량분석은 positive 모드에서 scan으로 수행하였고 분석조건은 다음과 같다: Capillary voltage 4000 V, fragmentor voltage 130 V, drying gas의 온도와 유량 130°C와 10 L/min,

nebulizer pressure 30 psig, mass range 250–400 m/z였다. Reference mass는 121.05087 m/z와 922.00980 m/z를 사용하였다. 데이터 분석과 아플라톡신 정량은 탑재된 MassHunter Workstation software (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA)로 수행하였다.

○ 세균 군집의 다양성 분석

1차 년도에서 Illumina MiSeq 시스템으로 아플라톡신 고 함유 (high-AF) 누룩과 저 함유 (low-AF) 누룩 17종의 메타지놈을 분석하였다. 32~70 개의 OTU가 유사도 97% 에서 분류되었다. 미생물 군집의 α -다양성 (alpha-diversity) 평가 지표를 아래 표에 나타내었다. OTUs, Chao1 지수, Shannon 지수의 평균이 high-AF 누룩보다 low-AF 누룩에서 높은 것을 통해 low-AF 누룩의 세균 군집이 high-AF 보다 정량적으로 다양하다는 것을 알 수 있다. Coverage가 100%로 누룩에 있는 대부분의 세균이 분석되었다.

표 15. Summary of alpha-diversities including OTU counts, Chao1, Shannon and coverage for the bacteria in 17 varieties of nuruk.

Group	Nuruk no.	Reads	OTUs	Chao1	Shannon	Coverage (%)
High-AF (>15 ppb)	17	172,486	58	65.2	1.8	100.0
	18	173,402	67	72.0	1.8	100.0
	19	156,244	32	33.5	1.0	100.0
	20	176,062	35	36.0	0.8	100.0
	39	165,958	67	67.3	2.7	100.0
	41	147,531	59	87.0	1.9	100.0
	40	171,706	40	46.0	1.7	100.0
	44	131,239	57	68.0	2.2	100.0
Low-AF (<4 ppb)	25	196,989	70	71.7	1.9	100.0
	12	164,734	57	64.5	1.5	100.0
	33	161,110	39	60.0	2.5	100.0
	56	165,977	81	81.3	2.1	100.0

아래 그림에 제시한 alpha rarefaction 곡선의 기울기가 오른쪽으로 갈수록 완만해졌다. Species/OTU 확인에 사용된 reads의 수가 적당하므로 추가적인 시퀀싱은 진행하지 않았다.

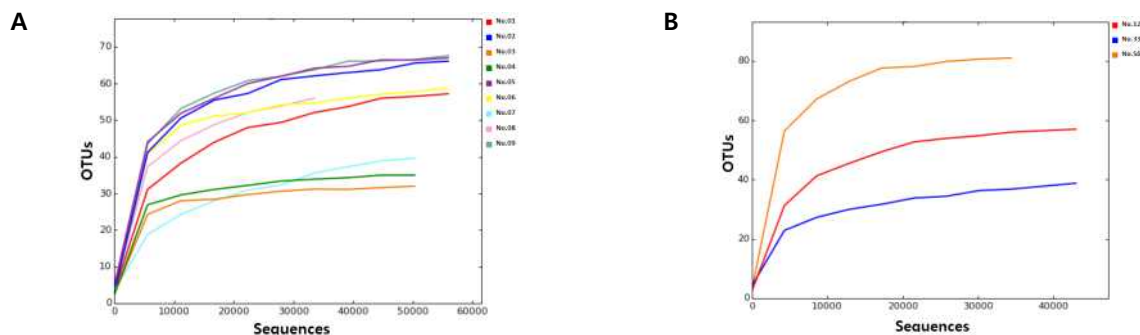


그림 17. Rarefaction curve graph of high-AF (A) and low-AF nuruk samples (B).

○ 세균 군집의 구조

각 시료의 미생물 군집을 속 (genus) 수준으로 아래 그림에 나타내었다. 누룩 33을 제외한 모든 누룩에서 Cyanobacteria에 속하는 Aerosakkonema와 Proteobacteria에 속하는

Kosakonia 그리고 unknown의 비율이 높았다. Low-AF 누룩 (no.12, no.33, no.56)에서 *Kosakonia* genus는 발견되지 않았다. 위에서 언급한 *Aerosakkonema*, *Proteobacteria*, unknown을 제외하고, *Weissella*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Buttiauxella*, *Staphylococcus*, *Curtobacterium*, *Lactococcus* 속의 비율이 높았다. LAB의 경우 *Weissella* 속의 비율은 no.33에서 28.42%로 가장 높았고, no.44에서 19.73%로 두 번째로 높게 나왔다. 또 다른 LAB인 *Lactococcus* genus의 비율은 no.56 3.44%에서 가장 높았고 no.41에서 2.06%로 높았다.

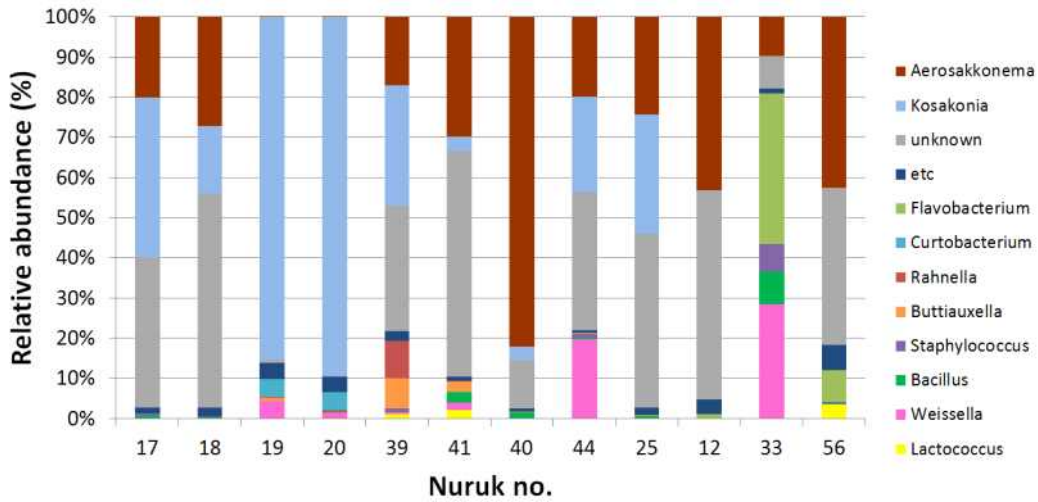


그림 18. Bacterial community profiles of 17 nuruk samples at the genus level.

다음 그림에 제시한 heat-map에서 각 시료 별 종 (species) 수준의 미생물 분포를 확인하였다. OTU heat-map은 각 시료별 OTU counts를 보여주며, 파란색이 진해 질수록 낮은 OUT 백분율을 의미하고 붉은색이 진해 질수록 높은 백분율을 의미한다. High-AF nuruk의 *Weissella* 속은 probiotic 기능이 있고 주로 발효식품에서 발견되는 *W. confusa*로 단일 구성되었고, *Lactococcus* 속은 환경과 식품, 동식물에 널리 분포하는 *L. raffinolactis*로 구성되었다. *L. raffinolactis*는 원유에서도 발견되며 cheese 등에 dairy starter로 사용된다 (Mesiler et al., 2012). Low-AF nuruk에서도 *Weissella* 속과 *Lactococcus* 속은 각각 *W. confusa*와 *L. raffinolactis*로 단일 구성되었다. 또한 *Lactobacillus acidophilus*가 낮은 비율로 확인되었다.

(A) High-AF nuruk

Consensus Lineage

Bacteria__Cyanobacteria__Oscillatoriales__Aerosakkonema funiforme
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Enterobacteriaceae__Kosakonia cowanii
 Bacteria__Cyanobacteria__Oscillatoriales__Aerosakkonema funiforme
 Bacteria__Firmicutes__Bacilli__Lactobacillales__Leuconostocaceae__Weissella__Weissella confusa
 Bacteria__Actinobacteria__Microbacteriaceae__Curtobacterium__Curtobacterium albidum
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Rahnella__Rahnella aquatilis
 Bacteria__Firmicutes__Bacilli__Bacillales__Bacillaceae__Bacillus__Bacillus aerius
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Xanthomonadales__Xanthomonadaceae__Xanthomonas__Xanthomonas theicola
 Bacteria__Firmicutes__Bacilli__Lactobacillales__Streptococcaceae__Lactococcus__Lactococcus raffinolactis
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Enterobacteriaceae__Buttiauxella__Buttiauxella warmboldiae
 Bacteria__Firmicutes__Bacilli__Lactobacillales__Streptococcaceae__Lactococcus__Lactococcus lactis
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Pseudomonadales__Pseudomonadaceae__Pseudomonas__Pseudomonas trivialis
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Pseudomonadales__Pseudomonadaceae__Pseudomonas__Pseudomonas erythribitans
 Bacteria__Firmicutes__Bacilli__Lactobacillales__Lactobacillaceae__Lactobacillus__Lactobacillus graminis
 Bacteria__Firmicutes__Bacilli__Bacillales__Bacillaceae__Bacillus__Bacillus subtilis
 Bacteria__Firmicutes__Bacilli__Bacillales__Staphylococcaceae__Staphylococcus__Staphylococcus saprophyticus
 Bacteria__Firmicutes__Bacilli__Lactobacillales__Leuconostocaceae__Leuconostoc__Leuconostoc pseudomesenteroides
 Bacteria__Proteobacteria__Betaproteobacteria__Burkholderiales__Burkholderiaceae__Burkholderia__Burkholderia plantarii
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Rahnella__Rahnella genomsp.
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Pseudomonadales__Pseudomonadaceae__Pseudomonas__Pseudomonas cremoricolorata
 Bacteria__Proteobacteria__Betaproteobacteria__Burkholderiales__Burkholderiaceae__Paraburkholderia rhizoxinica
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Erwinia__Erwinia gerundensis
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Pseudomonadales__Pseudomonadaceae__Pseudomonas__Pseudomonas punonensis
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Erwinia__Erwinia aphidicola
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Pseudomonadales__Moraxellaceae__Acinetobacter__Acinetobacter albensis
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Rahnella__Rahnella inusitata
 Bacteria__Actinobacteria__Streptomycetaceae__Streptomyces__Streptomyces cacaui
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Pantoea__Pantoea calida
 Bacteria__Firmicutes__Bacilli__Bacillales__Paenibacillaceae__Paenibacillus__Paenibacillus nicotianae
 Bacteria__Actinobacteria__Pseudonocardiaceae__Saccharopolyspora__Saccharopolyspora gloriosae
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Pseudomonadales__Moraxellaceae__Moraxella__Moraxella osloensis
 Bacteria__Bacteroidetes__Flavobacteriales__Flavobacteriaceae__Chryseobacterium__Chryseobacterium nakagawai
 Bacteria__Proteobacteria__Alphaproteobacteria__Sphingomonadales__Sphingomonadaceae__Sphingomonas__Sphingomonas paucimobis
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Pseudomonadales__Pseudomonadaceae__Pseudomonas__Pseudomonas entomophila
 Bacteria__Firmicutes__Bacilli__Bacillales__Bacillaceae__Bacillus__Bacillus aryabhatai
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Xanthomonadales__Xanthomonadaceae__Pseudomonas geniculata
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Enterobacteriaceae__Raoultella__Raoultella planticola
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Xanthomonadales__Luteibacter__Luteibacter jiangsuensis
 Bacteria__Firmicutes__Bacilli__Bacillales__Bacillaceae__Bacillus__Bacillus plakortidis
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Pseudomonadales__Moraxellaceae__Acinetobacter__Acinetobacter oleivorans
 Bacteria__Firmicutes__Bacilli__Lactobacillales__Streptococcaceae__Streptococcus__Streptococcus dentisani
 Bacteria__Proteobacteria__Betaproteobacteria__Burkholderiales__Oxalobacteriaceae__Massilia__Massilia consociata
 Bacteria__Bacteroidetes__Bacteroidia__Bacteroidales__Prevotellaceae__Prevotella__Prevotella copri
 Bacteria__Proteobacteria__Betaproteobacteria__Burkholderiales__Comamonadaceae__Curvibacter__Curvibacter fontanus
 Bacteria__Actinobacteria__Dermacoccaceae__Yimella__Yimella radialis
 Bacteria__Bacteroidetes__Flavobacteriales__Flavobacteriaceae__Flavobacterium__Flavobacterium qiangtangense
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Pantoea__Pantoea septica
 Bacteria__Actinobacteria__Corynebacteriaceae__Corynebacterium__Corynebacterium tuscaniense
 Bacteria__Firmicutes__Bacilli__Bacillales__Bacillaceae__Anoxybacillus__Anoxybacillus tepidamans
 Bacteria__Actinobacteria__Propionibacteriaceae__Propionibacterium__Propionibacterium acnes
 Bacteria__Actinobacteria__Micrococcaceae__Micrococcus__Micrococcus luteus
 Bacteria__Firmicutes__Bacilli__Lactobacillales__Enterococcaceae__Catallicoccus__Catallicoccus marimammalium
 Bacteria__Proteobacteria__Betaproteobacteria__Burkholderiales__Comamonadaceae__Curvibacter__Curvibacter gracilis
 Bacteria__Proteobacteria__Alphaproteobacteria__Rhizobiales__Rhizobiaceae__Agrobacterium__Agrobacterium larrymorei
 Bacteria__Cyanobacteria__Oscillatoriales__Aerosakkonema funiforme
 Bacteria__Firmicutes__Clostridia__Clostridiales__Lachnospiraceae__[Clostridium] indolis
 Bacteria__Proteobacteria__Alphaproteobacteria__Pseudomonadales__Moraxellaceae__Acinetobacter__Acinetobacter guillouiae
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Enterobacteriaceae__Kosakonia cowanii
 Bacteria__Proteobacteria__Epsilonproteobacteria__Campylobacteriales__Campylobacteriaceae__Arcobacter__Arcobacter gomesi
 Bacteria__Proteobacteria__Alphaproteobacteria__Sphingomonadales__Sphingomonadaceae__Sphingomonas__Sphingomonas panaciterra
 Bacteria__Firmicutes__Clostridia__Clostridiales__Lachnospiraceae__Roseburia__Roseburia inulinivorans
 Bacteria__Proteobacteria__Gammaproteobacteria__Pantoea__Pantoea vagans
 Bacteria__Firmicutes__Bacilli__Bacillales__Paenibacillaceae__Paenibacillus__Paenibacillus hunanensis

	U06.V	U09.V	U03.V	U06.V	U09.V	U01.V	U03.V	U07.V	U04.V	denovo ID
9534	18558	17021	17151	7289	12192					denovo0
	22965	10724		8697						denovo1
								15680		denovo2
				7258						denovo3
										denovo4
										denovo5
10821										denovo6
										denovo7
										denovo8
										denovo9
4144										denovo10
										denovo11
										denovo12
										denovo13
										denovo14
										denovo15
										denovo16
										denovo17
										denovo18
										denovo19
										denovo20
										denovo21
										denovo22
										denovo23
										denovo24
										denovo25
										denovo26
										denovo27
										denovo28
										denovo29
										denovo30
										denovo31
										denovo32
										denovo33
										denovo34
										denovo35
										denovo36
										denovo37
										denovo38
										denovo39
										denovo40
										denovo41
										denovo42
										denovo43
										denovo44
										denovo45
										denovo46
										denovo47
										denovo48
										denovo49
										denovo50
										denovo51
										denovo52
										denovo53
										denovo54
										denovo55
										denovo56
										denovo57
										denovo58
										denovo59
										denovo60
										denovo61
										denovo62
										denovo63
										denovo64
										denovo65
										denovo66
										denovo67
										denovo68
										denovo69
										denovo70
										denovo71
										denovo72
										denovo73
										denovo74
										denovo75
										denovo76
										denovo77
										denovo78
										denovo79
										denovo80
										denovo81
										denovo82
										denovo83
										denovo84
										denovo85
										denovo86
										denovo87
										denovo88
										denovo89
										denovo90
										denovo91
										denovo92
										denovo93
										denovo94
										denovo95
										denovo96
										denovo97
										denovo98
										denovo99
										denovo100
										denovo101
										denovo102
										denovo103
										denovo104
										denovo105
										denovo106
										denovo107
										denovo108
										denovo109
										denovo110
										denovo111
										denovo112

(B) Low-AF nuruk

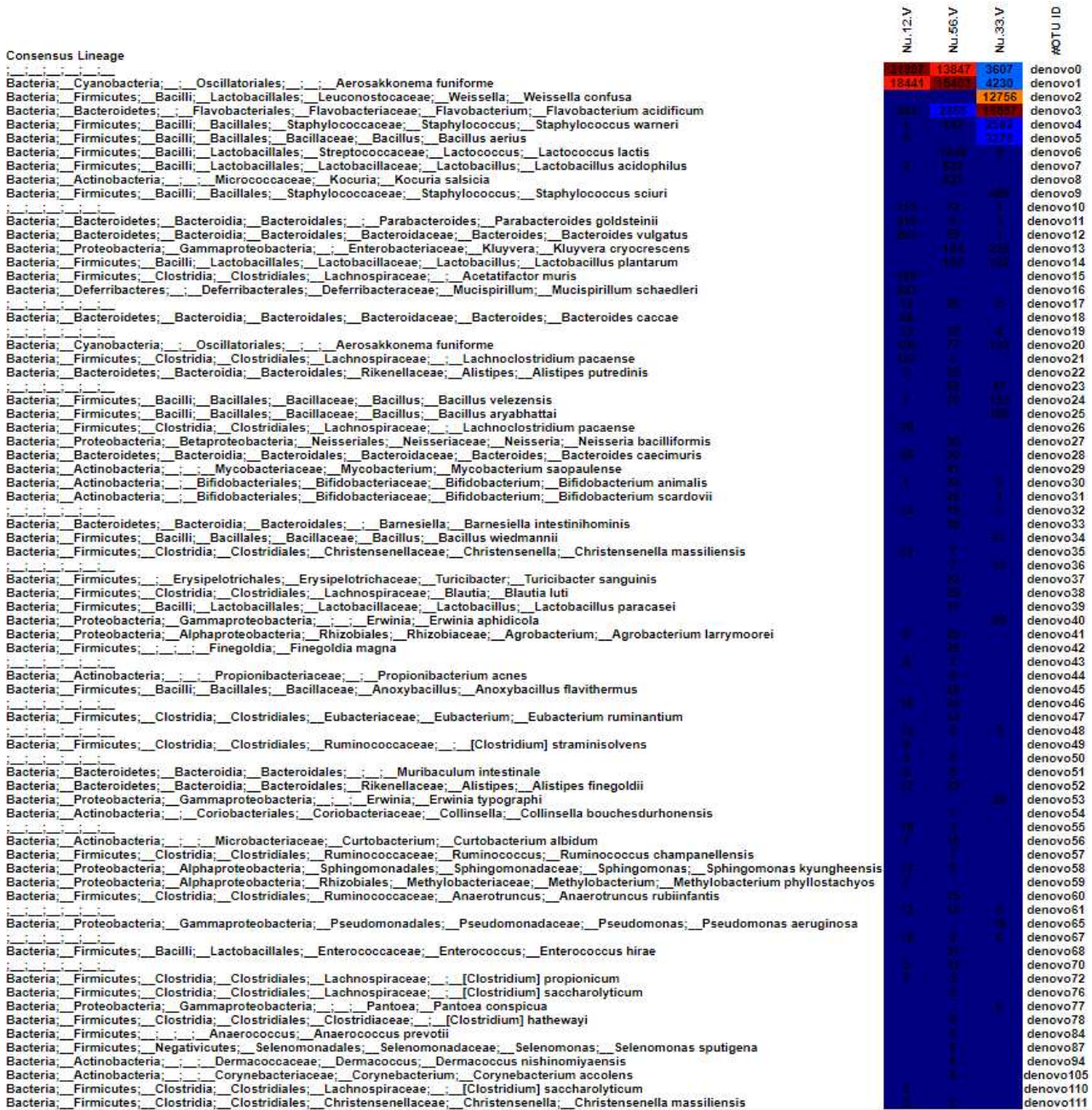


그림 19. Heat map of bacterial communities of high-AF (A) and low-AF nuruk (B).

○ 세균 분리 및 동정 결과

1차 년도에서 전통누룩에서 LAB 14균주를 분리하였고 2차 년도에서는 LAB 161 균주를 분리하였다. BCP 배지의 bromocresol purple은 pH indicator로 pH 5.2 이하에서는 노란색으로 변하고 pH 6.8이상에서는 보라색으로 변한다. LAB는 lactose를 사용하여 acid를 생성하므로 BCP 배지에 노란색 환을 형성한 콜로니를 LAB로 간주하였다. 1차 년도에 분리된 모든 LAB은 99%이상의 유사도로 동정되었으며 이들의 계통수와 동정명을 각각 그림 3과 표 3에 제시하였다. 2차 년도에 분리된 LAB는 항진균 활성을 갖는 균주만 분리하여 동정하였으며 그 결과는 이후에 곰팡이 생육 억제 및 아플라톡신 생성 억제 결과와 함께 제시하였다.



그림 20. phylogenetic tree of lactic acid bacteria isolated from korean traditional nuruk.

1차 년도 LAB는 *Pediococcus* 속이 5균주로 비중이 가장 높았고 *Weissella* 속이 4균주, *Enterococcus* 속이 3균주, *Lactobacillus* 속이 2균주였다. LAB는 *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella paramesenteroides*로 동정되었다.

표 16. 16S rDNA sequence analysis of 14 lactic acid bacteria isolates from nuruk.

Group	Nuruk no.	Nuruk name	Isolate label	Isolates	Similarity (%)
High-AF	17	분곡	N17-1	<i>Enterococcus faecium</i>	99
			N17-2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99
	18	병곡	N18-1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99
	19	이화주곡	N19-1	<i>Enterococcus gallinarum</i>	99
			N19-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99
	20	이화곡	N20-1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99
	40	연화곡	N40-1	<i>Lactobacillus curvatus</i>	99
			N40-2	<i>Enterococcus faecium</i>	99
	41	동양주곡	N41-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99
			N41-2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	99
44	신곡	N44-1	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99	
		N44-2	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99	
Low-AF	33	대주백타곡	N33-1	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99
			N33-2	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99

○ 유산균의 곰팡이 생육 억제

1차 년도 전통누룩 분리 LAB 14균주의 *A. flavus* (NRRL3357) 생육 억제 연구를 수행하였다. 사전실험에서 LAB N17-2 (*P. pentosaceus*), N18-1 (*P. pentosaceus*), N20-1 (*P. pentosaceus*), N19-2 (*P. acidilactici*), N33-1 (*W. paramesenteroides*), N33-2 (*W. paramesenteroides*), N41-1 (*P. acidilactici*), N44-1 (*W. paramesenteroides*), N44-2 (*W. paramesenteroides*) 9종의 *A. flavus* 생육 억제능력을 확인하였고 (data not shown), 이중 6종을 선별한 결과를 아래 그림에 제시하였다.

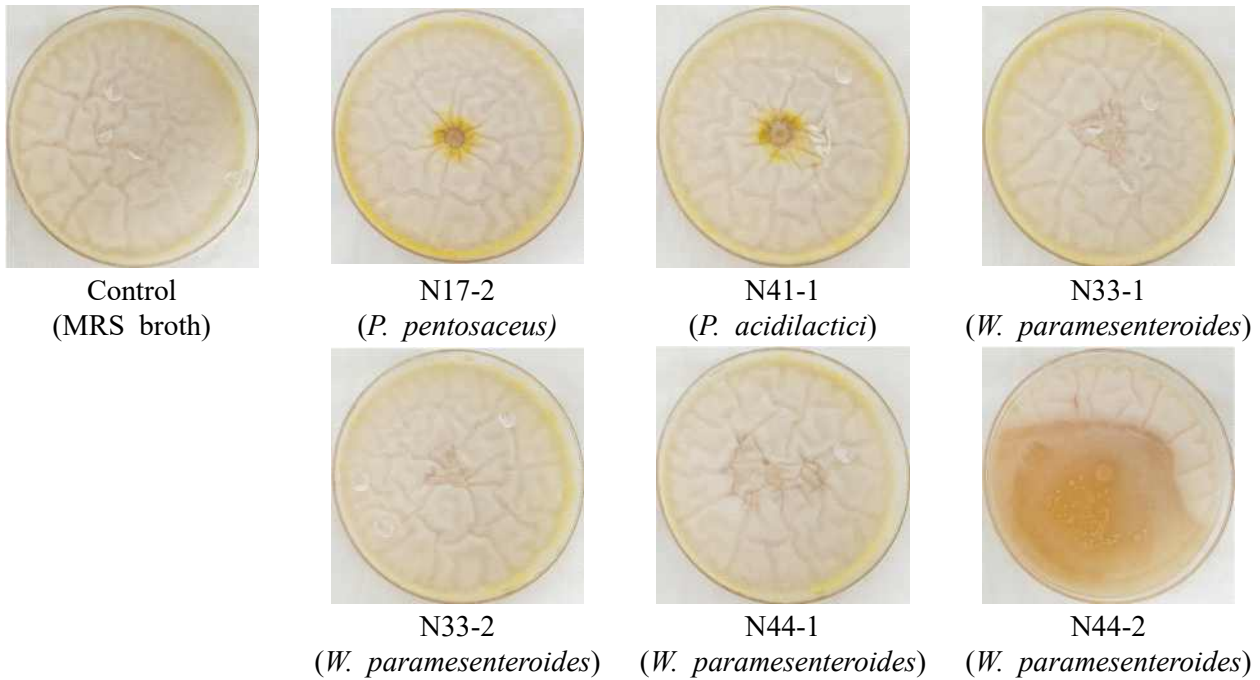


그림 21. Inhibition of *Aspergillus flavus* NRRL3357 growth by lactic acid bacteria isolated from nuruk.

이중 clear zone의 형태가 확실한 N17-2 (*P. pentosaceus*), N41-1 (*P. acidilactici*), N44-2 (*W. paramesenteroides*) 3균주를 한국미생물보존센터 (Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 기탁하였다 (표).

표 17. Deposition data of lactic acid bacteria with *A. flavus* growth inhibition

Source	Isolate label	Isolates	Deposition number
Nuruk 17 (분곡)	N17-2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KFCC11788P
Nuruk 41 (동양주곡)	N41-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KFCC11789P
	N44-2	<i>Weissella paramesenteroides</i>	KFCC11790P

2차 년도 LAB의 곰팡이 생육 억제 연구에서는 양조에 이로운 *A. oryzae*의 생육은 방해하지 않으면서 *A. flavus*의 생육을 억제하는 LAB를 선별하기 위해 표준균주 *A. oryzae* RIB40과 *A. flavus* NRRL3357을 사용하였다. 대부분의 LAB가 *A. oryzae*와 *A. flavus*의 균사체 생육을 억제하지 않았고 결과는 표 5에 제시하였다. *A. oryzae*의 생육을 억제하는 LAB는 13종 그리고 *A. flavus*의 생육을 억제하는 LAB는 28종이었다.

표 18. LAB의 곰팡이 균사체 생육 억제력

No.	Isolate No.	Inhibition of fungal growth		No.	Isolate No.	Inhibition of fungal growth	
		<i>A. oryzae</i>	<i>A. flavus</i>			<i>A. oryzae</i>	<i>A. flavus</i>
1	N17-01	-	-	92	N44-01	-	-
2	N17-02	-	++	93	N44-02	-	+
3	N17-03	-	-	94	N44-03	-	-
4	N17-04	-	-	95	N57-01	-	-
5	N17-05	-	-	96	N57-02	-	-
6	N17-06	-	-	97	N57-03	-	-
7	N17-07	-	-	98	N57-04	-	-
8	N17-08	-	-	99	N57-05	-	-
9	N18-01	++	++	100	N57-06	-	-
10	N19-01	-	-	101	N57-07	-	-
11	N19-02	+	++	102	N57-08	-	-
12	N19-03	-	-	103	N57-09	-	-
13	N19-04	-	-	104	N57-10	-	-
14	N19-05	-	-	105	N57-11	-	-
15	N19-06	-	-	106	N57-12	-	-
16	N19-07	-	-	107	N57-13	-	-
17	N19-08	-	-	108	N57-14	++	++
18	N19-09	-	-	109	N57-15	++	++
19	N19-10	-	-	110	N57-16	-	-
20	N19-11	-	-	111	N57-17	-	-
21	N19-12	-	-	112	N57-18	-	-
22	N19-13	-	-	113	N57-19	-	-
23	N19-14	-	-	114	N57-20	-	-
24	N19-15	-	-	115	N57-21	-	-
25	N19-16	-	-	116	N57-22	-	-
26	N19-17	-	-	117	N57-23	-	-
27	N19-18	-	-	118	N57-24	-	++
28	N19-19	++	++	119	N57-25	-	++
29	N19-20	-	-	120	N57-26	-	++
30	N19-21	-	-	121	N57-27	-	-
31	N19-22	-	-	122	N57-28	-	++
32	N19-23	++	++	123	N57-29	-	-
33	N19-24	++	++	124	N57-30	-	-
34	N19-25	-	-	125	N57-31	-	-
35	N19-26	-	-	126	N57-32	-	-
36	N19-27	-	-	127	N57-33	-	-
37	N19-28	-	-	128	N57-34	-	-
38	N19-29	-	-	129	N57-35	-	++
39	N19-30	-	++	130	N57-36	-	-
40	N19-31	-	-	131	N57-37	-	-
41	N19-32	-	-	132	N57-38	-	-
42	N19-33	-	-	133	N57-39	-	-
43	N19-34	-	-	134	N57-40	-	-
44	N19-35	++	++	135	N57-41	-	-
45	N19-36	-	-	136	N57-42	-	-
46	N19-37	-	++	137	N57-43	-	++
47	N19-38	-	-	138	N57-44	-	-
48	N19-39	-	-	139	N57-45	-	-
49	N19-40	-	-	140	N57-46	-	-
50	N19-41	-	-	141	N57-47	-	-
51	N19-42	-	-	142	N57-48	-	-
52	N19-43	-	-	143	N57-49	-	-
53	N19-44	-	-	144	N57-50	-	-
54	N19-45	-	-	145	N57-51	-	-
55	N19-46	-	-	146	N57-52	-	-
56	N19-47	-	-	147	N57-53	-	-

57	N19-48	-	-	148	N57-54	-	-
58	N19-49	-	-	149	N57-55	-	-
59	N19-50	-	-	150	N57-56	-	-
60	N19-51	-	-	151	N57-57	-	-
61	N19-52	-	-	152	N57-58	-	-
62	N19-53	-	-	153	N57-59	-	-
63	N19-54	-	-	154	N57-60	-	-
64	N19-55	-	-	155	N57-61	-	-
65	N19-56	-	-	156	N57-62	-	-
66	N20-01	++	++	157	N57-63	-	-
67	N20-02	-	-	158	N57-64	-	-
68	N20-03	-	-	159	N57-65	-	-
69	N20-04	-	-	160	N57-66	-	-
70	N33-01	-	+	161	N57-67	-	-
71	N33-01-1	-	+	162	N57-68	-	-
72	N33-01-2	-	+	163	N57-69	-	-
73	N33-02	-	-	164	N57-70	-	-
74	N34-01	-	-	165	N57-71	-	-
75	N39-01	-	++	166	N57-72	-	-
76	N39-02	-	-	167	N57-73	-	-
77	N39-03	-	-	168	N57-74	-	-
78	N39-04	-	-	169	N57-75	-	-
79	N40-01	-	-	170	N57-76	-	-
80	N40-02	-	-	171	N57-77	-	-
81	N40-03	-	-	172	N57-78	-	-
82	N40-04	-	-	173	N57-79	-	-
83	N40-05	-	-	174	N57-80	-	-
84	N40-06	-	-	175	N57-81	-	-
85	N40-07	-	-	176	N57-82	-	-
86	N40-08	-	-	177	N57-83	-	-
87	N40-09	-	-	178	RL48-01	++	++
88	N40-10	-	-	179	RL48-02	++	++
89	N41-01	+	++	180	RL48-03	++	++
90	N41-02	-	-	181	RL48-10	-	++
91	N41-03	-	-				

○ 유산균의 아플라톡신 생성 억제

1차 년도에서 누룩 분리 LAB 14균주의 아플라톡신 생성 억제능력을 분석하였다. 개별 아플라톡신 B1, B2, G1, G2 표준물질의 Total Ion Current (TIC) 그리고 여기에 해당하는 Extracted Ion Current (EIC)와 mass spectrum을 아래 그림에 나타내었다.

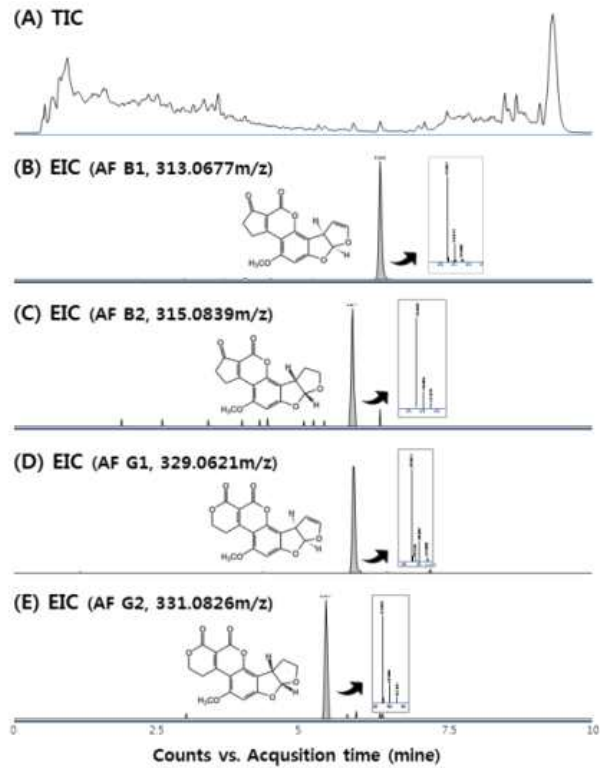


그림 22. TIC chromatogram (A) and EIC chromatogram of AF B1 (B), AF B2 (C), AF G1 (D), AF G2 (E).

표준균주 *A. flavus* NRRL3397은 다량의 B1과 미량의 B2를 생산하는 것이 특징이다. 본 연구에서 대조군 대비 AF B1과 B2의 함량이 낮은 실험군은 N44-2 (*W. paramesenteroides*)와 N33-1 (*W. paramesenteroides*)이며 그 결과를 아래 그림과 표에 제시하였다. 그림은 대조군과 N44-2, N33-1 실험군의 배지 추출물에서 검출한 AF B1과 B2의 EIC와 mass spectra를 나타내었다. 대조군 대비 두 실험군의 AF B1과 B2의 EIC의 면적이 감소하였고 특히 N44-2 실험군의 면적이 유독 낮음을 확인하였다.

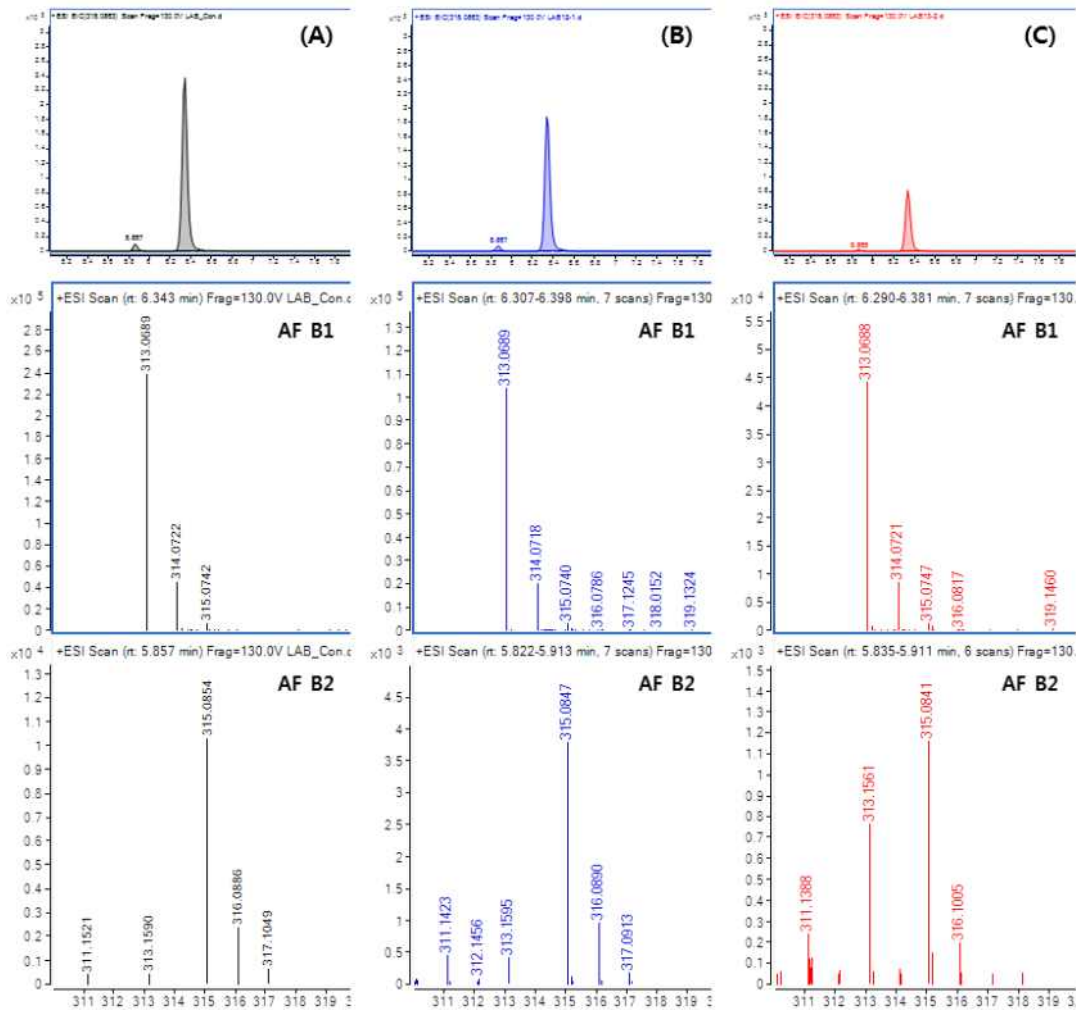


그림. EIC chromatogram and mass spectra of extract of control (*A. flavus* NRRL3357) (A), of N33-1 (*W. paramesenteroides*) (B) and of N44-2 (*W. paramesenteroides*)

대조군과 실험군의 AF B1과 B2 함량을 아래 표에 제시하였다. 대조군에서 AF B1은 341.8 ppb, AF B2는 4.6 ppb였고, 실험군 N44-2에서 AF B1과 B2는 각각 113.4 ppb와 1.5 ppb로 대조군 대비 1/3정도로 감소하였다. 실험군 N33-1의 AF B1과 B2의 함량은 270.3 ppb와 3.5 ppb로 N44-2에 비해 감소폭은 적지만 *A. flavus*의 생육을 감소시키지 않으면서 AFs 생산량을 감소시키는 점이 흥미롭다.

표 19. Aflatoxin producibility of *Aspergillus* sp. isolated from nuruk.

Group	Isolate label	Isolates	Concentration (ppb)				Total**
			AF B1	AF B2	AF G1	AF G2	
Control	Con.	-	341.8	4.6	nd	nd	346.4
High-AF	N17-2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	477.2	5.6	nd	nd	482.8
	N41-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	417.3	5.2	nd	nd	422.6
	N44-1	<i>Weissella paramesenteroides</i>	349.4	4.1	nd	nd	353.5
	N44-2	<i>Weissella paramesenteroides</i>	113.4	1.5	nd	nd	114.8
Low-AF	N33-1	<i>Weissella paramesenteroides</i>	270.3	3.5	nd	nd	273.8
	N33-2	<i>Weissella paramesenteroides</i>	314.1	4.1	nd	nd	318.2

*nd, not detected.

**Total is sum of four aflatoxins B1, B2, G1 and G2.

2차 년도 전통누룩 분리 LAB의 AF 생성 억제능력을 분석하였다. 선행연구에서 분리한 누룩 유래 *Aspergillus*는 대부분이 *A. oryzae* 이었고 일부만이 AF B1과 B2를 생성하였다. 따라서 다량의 AF B1과 미량의 AF B2를 생산하는 표준균주 *A. flavus* NRRL3357을 대조군으로 사용하였다. 대조군 보다 AF B1의 함량이 낮은 실험군의 LAB가 AF 생성을 억제한다고 판단하였다. LAB의 아플라톡신 생성 억제 결과는 아래 표에 제시하였다. 표준균주 *A. flavus* NRRL3357의 AF B1과 B2 생산량은 각각 1.94 ppb와 0.16 ppb이었다. 대부분의 LAB가 AF B1의 생성을 억제하였고 17개 균주는 억제하지 못하였다.

표 20. 전통누룩 분리 LAB의 AF 생성 억제력

No.	Isolate no.	AF production by <i>A. flavus</i>		No.	Isolate no.	AF production by <i>A. flavus</i>	
		Initial level of B ₁ 1.94 (ppb)	Initial level of B ₂ 0.16 (ppb)			Initial level of B ₁ 1.94 (ppb)	Initial level of B ₂ 0.16 (ppb)
1	N17-01	+	+	92	N44-01	+	+
2	N17-02	+	+	93	N44-02	+	+
3	N17-03	-	-	94	N44-03	+	+
4	N17-04	-	-	95	N57-01	+	+
5	N17-05	-	-	96	N57-02	+	+
6	N17-06	+	+	97	N57-03	+	+
7	N17-07	+	+	98	N57-04	+	+
8	N17-08	+	+	99	N57-05	+	+
9	N18-01	+	+	100	N57-06	+	+
10	N19-01	+	+	101	N57-07	+	+
11	N19-02	+	+	102	N57-08	+	+
12	N19-03	+	+	103	N57-09	+	+
13	N19-04	-	-	104	N57-10	+	+
14	N19-05	-	-	105	N57-11	+	+
15	N19-06	+	-	106	N57-12	+	+
16	N19-07	-	-	107	N57-13	+	+
17	N19-08	+	-	108	N57-14	+	+
18	N19-09	+	-	109	N57-15	+	+
19	N19-10	+	+	110	N57-16	+	+
20	N19-11	-	-	111	N57-17	+	+
21	N19-12	+	-	112	N57-18	+	+
22	N19-13	-	-	113	N57-19	+	+
23	N19-14	-	-	114	N57-20	-	+
24	N19-15	-	-	115	N57-21	+	+
25	N19-16	-	-	116	N57-22	+	+
26	N19-17	+	+	117	N57-23	+	+
27	N19-18	+	+	118	N57-24	+	+
28	N19-19	+	+	119	N57-25	+	+
29	N19-20	+	+	120	N57-26	+	+
30	N19-21	-	+	121	N57-27	+	+

31	N19-22	+	+	122	N57-28	+	+
32	N19-23	+	+	123	N57-29	+	+
33	N19-24	+	+	124	N57-30	-	+
34	N19-25	+	+	125	N57-31	+	+
35	N19-26	+	+	126	N57-32	+	+
36	N19-27	+	+	127	N57-33	+	+
37	N19-28	+	+	128	N57-34	+	+
38	N19-29	+	+	129	N57-35	+	+
39	N19-30	+	+	130	N57-36	+	+
40	N19-31	+	-	131	N57-37	+	+
41	N19-32	-	-	132	N57-38	+	+
42	N19-33	+	-	133	N57-39	+	+
43	N19-34	+	-	134	N57-40	+	+
44	N19-35	+	+	135	N57-41	+	+
45	N19-36	+	-	136	N57-42	+	+
46	N19-37	-	-	137	N57-43	+	+
47	N19-38	+	-	138	N57-44	+	+
48	N19-39	-	-	139	N57-45	+	+
49	N19-40	+	-	140	N57-46	+	+
50	N19-41	+	+	141	N57-47	-	-
51	N19-42	+	+	142	N57-48	+	+
52	N19-43	+	+	143	N57-49	+	+
53	N19-44	+	-	144	N57-50	+	+
54	N19-45	+	+	145	N57-51	+	+
55	N19-46	+	+	146	N57-52	+	+
56	N19-47	+	+	147	N57-53	+	+
57	N19-48	+	+	148	N57-54	+	+
58	N19-49	+	+	149	N57-55	+	+
59	N19-50	+	+	150	N57-56	+	+
60	N19-51	+	+	151	N57-57	+	+
61	N19-52	+	+	152	N57-58	+	+
62	N19-53	+	+	153	N57-59	+	+
63	N19-54	+	+	154	N57-60	+	+
64	N19-55	+	+	155	N57-61	+	+
65	N19-56	+	+	156	N57-62	+	+
66	N20-01	+	+	157	N57-63	+	+
67	N20-02	+	+	158	N57-64	+	+
68	N20-03	+	+	159	N57-65	+	+
69	N20-04	+	+	160	N57-66	+	+
70	N33-01	+	+	161	N57-67	+	+
71	N33-01-1	+	+	162	N57-68	+	+
72	N33-01-2	+	+	163	N57-69	+	+
73	N33-02	+	+	164	N57-70	+	+
74	N34-01	+	+	165	N57-71	+	+
75	N39-01	+	+	166	N57-72	+	+
76	N39-02	+	+	167	N57-73	+	+
77	N39-03	+	+	168	N57-74	+	+
78	N39-04	+	+	169	N57-75	+	+
79	N40-01	+	+	170	N57-76	+	+
80	N40-02	+	+	171	N57-77	+	+
81	N40-03	+	+	172	N57-78	+	+
82	N40-04	+	+	173	N57-79	+	+
83	N40-05	+	+	174	N57-80	+	+
84	N40-06	+	+	175	N57-81	+	+
85	N40-07	+	+	176	N57-82	+	+
86	N40-08	+	+	177	N57-83	+	+
87	N40-09	+	+	178	RL48-01	+	+
88	N40-10	+	+	179	RL48-02	+	+
89	N41-01	+	+	180	RL48-03	+	+
90	N41-02	+	+	181	RL48-10	+	+
91	N41-03	+	+				

○ 유산균 1차 선별


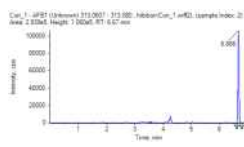
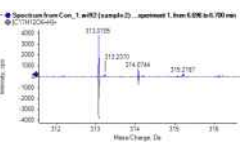
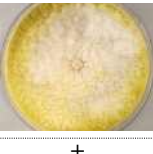
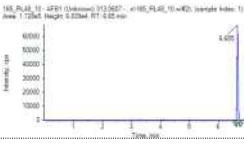
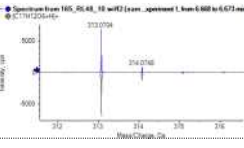

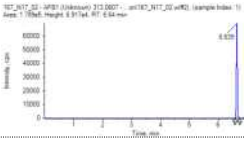
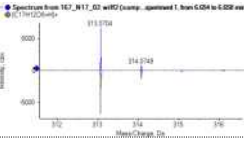
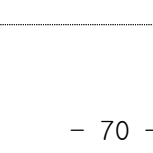
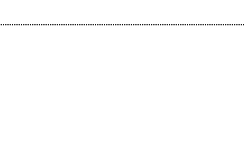
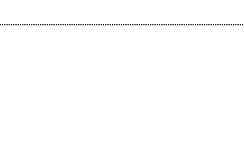
곰팡이 생육 억제력과 AF 생성 억제력을 기반으로 LAB 181개 균주를 5그룹으로 분류하여 아래 표에 제시하였다. 그룹1의 LAB 14개 균주는 곰팡이 생육과 AF B1의 생성을 억제하지 못하였다. 그룹2의 LAB 139개 균주는 곰팡이의 생육은 억제하지 못하지만 AF B1의 생성을 억제하였다. 그룹3의 LAB 14개 균주는 *A. oryzae*의 생육을 방해하지 않았고 *A. flavus*의 생육과 AF B1의 생성을 억제하였다. 그룹4의 LAB 13개 균주는 곰팡이의 생육과 AF B1의 생성을 모두 억제하였다. 그룹5의 LAB 1개 균주는 *A. oryzae*의 생육과 AF B1의 생성은 억제하지 않았고 *A. flavus*의 생육만 억제하였다. 본 연구의 목적에 부합한 그룹3의 LAB 14개 균주를 후속 실험의 대상으로 선별하였고, AF B1 생성 억제력이 상대적으로 우수하였던 그룹4의 *P. pentosaceus* N57-15와 AF 생성을 억제하지 못하였던 그룹5의 *P. pentosaceus* N19-37를 추가하였다.


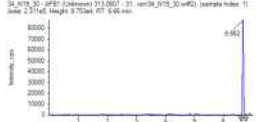
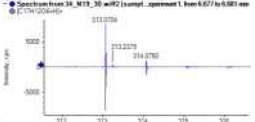

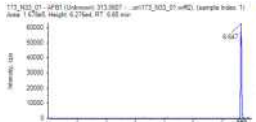
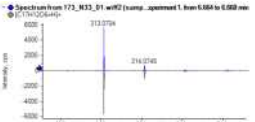


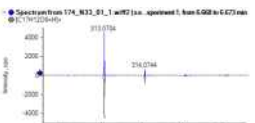


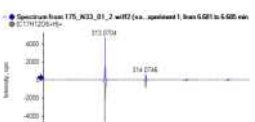





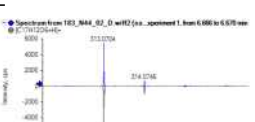








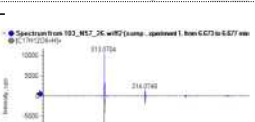





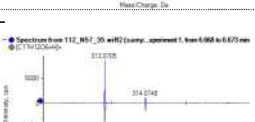
표 21. 곰팡이 생육 및 AF 생성 억제 결과에 따른 LAB의 분류

Group	Inhibition of fungal growth		Inhibition of AF production	LAB isolates
	<i>A. oryzae</i>	<i>A. flavus</i>		
1	-	-	-	14
2	-	-	+	139
3	-	+	+	14
4	+	+	+	13
5	-	+	-	1
Total				181

그룹3의 LAB 14개 균주는 *Weissella* 속 4개, *Staphylococcus* 속 4개, *Enterococcus* 속 3개, *Pediococcus* 속 2개, *Lactobacillus* 1개로 동정되었다. 이들의 동정명과 곰팡이 생육 및 아플라톡신 B1 생성 억제력을 아래 표에 제시하였다.

표 22. 그룹3 LAB의 곰팡이 생육 및 AF 생성 억제 결과

Isolate no.	Strains	Inhibition of fungal growth		Inhibition of AF B ₁ production		
		<i>A. oryzae</i>	<i>A. flavus</i>	EIC Chromatogram	Mass spectrum	
Control	<i>A. flavus</i> NRRL3357	no data				
RL48-10	<i>Lactobacillus crustorum</i>	-	+			
N17-02	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-	+			
N19-30	<i>Enterococcus lactis</i>	-	+			

N33-01	<i>Weissella paramesenteroides</i>	-	+			
N33-01-1	<i>Weissella paramesenteroides</i>	-	+			
N33-01-2	<i>Weissella paramesenteroides</i>	-	+			
N39-01	<i>Enterococcus lactis</i>	-	+			
N44-02	<i>Weissella paramesenteroides</i>	-	+			
N57-24	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-	+			
N57-25	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	+			
N57-26	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	+			
N57-28	<i>Enterococcus hirae</i>	-	+			
N57-35	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	+			
N57-43	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	+			

○ 유산균 2차 선별































1차 단계에서 선별된 LAB 16 균주의 곰팡이 생육 및 AF 생성 억제력을 2차로 확인하여 최종적으로 9균주를 선발하였다. 추가적으로 AF 분해력과 누룩에서 분리된 AF 생성 곰팡이 *Aspergillus* N40-E5-5의 균사체 생육 및 AF 생성 억제 여부를 확인하였다. 2차 선별 결과는 아래 표에 제시하였다.

표 23. LAB의 2차 선별 결과

Group	Label	Strain	Inhibition of fungal growth							Inhibition of AF production		AF B1 degradation	Score													
			A. oryzae			A. flavus				N40-E5-5			A. flavus	N40-E5-5	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	Total	
			①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨		①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩				
3	N57-26	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0.5	1	0.5	8
3	N57-24	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0.5	0.5	7	
3	N17-2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0.5	7	
3	N57-25	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0.5	7	
3	N57-43	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0.5	0.0	7	
3	N33-1	<i>Weissella paramesenteroides</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	6	
3	RL48-10	<i>Lactobacillus crustorum</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	1	1	1	1	0	0	0	0.5	1	0	6		
3	N33-1-1	<i>Weissella paramesenteroides</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	No data	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	no data	4	
3	N44-2	<i>Weissella paramesenteroides</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	4	
3	N33-1-2	<i>Weissella paramesenteroides</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
3	N39-01	<i>Enterococcus lactis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
3	N19-30	<i>Enterococcus lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
3	N57-28	<i>Enterococcus hirae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
3	N57-35	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
4	N57-15	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0.5	8	
5	N19-37	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0	1	1	1	1	1	1	1	0.5	0	0.5	7	

2차 결과는 1차 결과와 다소 차이가 있었다. 따라서 각 실험 항목 마다 1점을 부여하여 총점이 4점 이상인 LAB를 최종적으로 선별하였다. 최종 선별 LAB는 총 9 균주로 이들의 목록과 곰팡이 균사체 생육 억제 결과는 아래 표에 제시하였다.

표 24. 최종 선별된 LAB 목록

Group	Label	Strain	Inhibition of fungal growth						
			<i>A. oryzae</i>		<i>A. flavus</i>		N40-E5-5		
		Control							
3	N57-26	<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+	+
									
3	N57-24	<i>P. pentosaceus</i>	+	+	+	+	+	+	+
									
3	N17-2	<i>P. pentosaceus</i>	+	+	+	+	+	+	
									
3	N57-43	<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+	+
									
3	N33-1	<i>W. paramesenteroides</i>	-	+	+	+	+	-	-
									
3	RL48-10	<i>L. crustorum</i>	-	+	+	+	-	-	-
									
3	N44-2	<i>W. paramesenteroides</i>	-	+	+	+	-	-	-
									
4	N57-15	<i>P. pentosaceus</i>	-	+	+	+	+	+	+
									
5	N19-37	<i>P. pentosaceus</i>	+	+	+	+	+	+	+
									

○ *Weissella paramesenteroides* N44-2 전유전체

*A. flavus*의 생육과 AF 생성을 억제하는 *W. paramesenteroides* N44-2 (이하 N44-2)의 전체 염기서열을 분석하였다. N44-2는 하나의 원형 염색체와 두 개의 플라스미드를 포함하였다. N44-2의 유전체 지도는 아래 그림에 나타내었고 전유전체의 구체적 특징은 아래 표에 나타내었다.

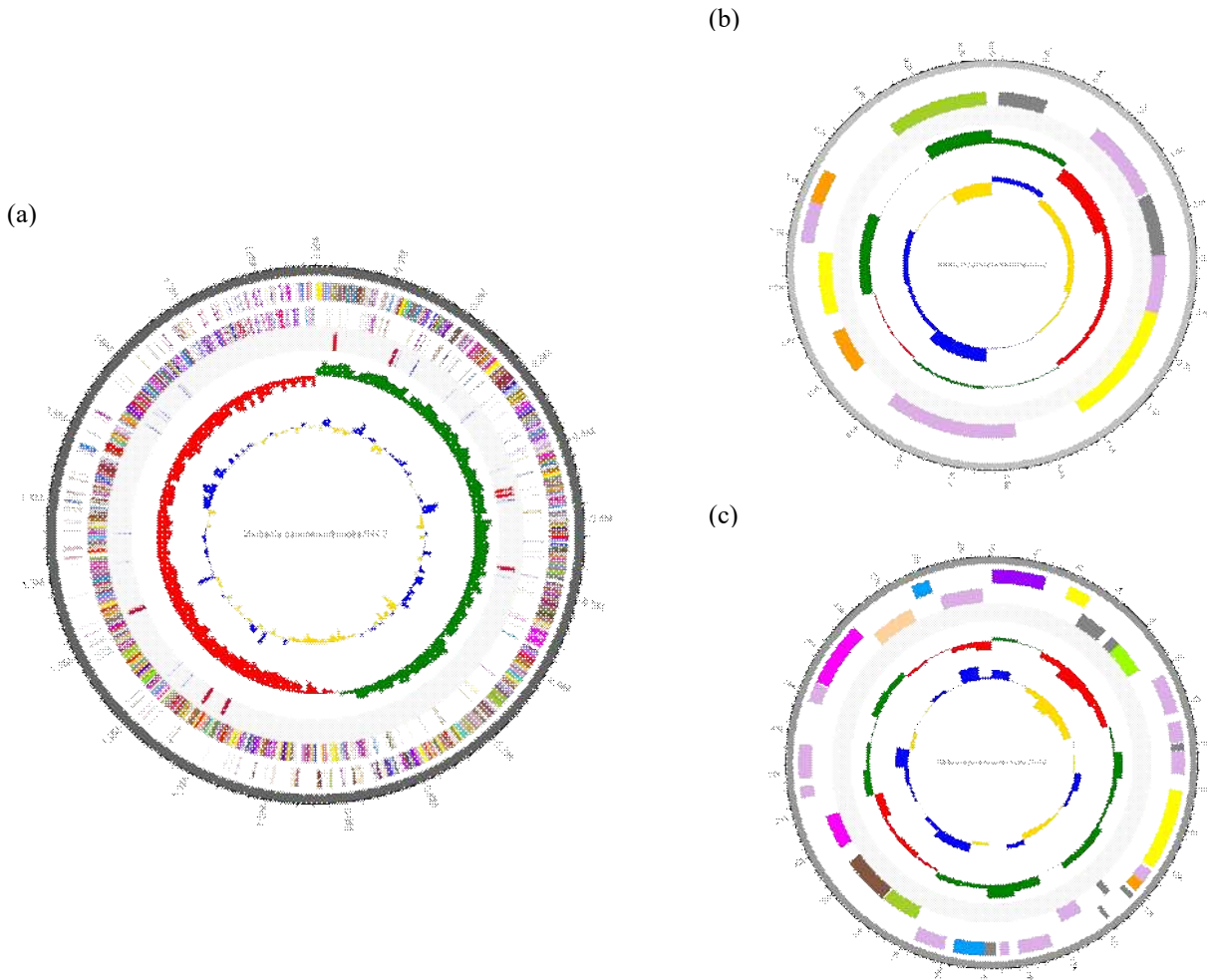


그림 23. *W. paramesenteroides* N44-2의 유전체 지도. contig 1 (a), 플라스미드 contig 2 (b)와 contig 3 (c). 1번 외곽: contigs 정보, 2번 외곽: forward strand의 CDS, 3번 외곽: reverse strand의 CDS 정보. 두 번째와 세 번째 외곽에 색깔별로 다른 기능의 COGs를 지정. 4번 외곽: 유전체에서 발견된 rRNA와 tRNA. 5번 외곽: GC skew, 복제위치 (replication loci)와 leading/lagging strands의 지표. Baseline: genomic mean GC-skew. 녹색: baseline보다 상대적으로 높은 값. 적색: 평균보다 낮은 값. 제일 안쪽의 내각: GC ratio. GC ratio는 genome 프로파일, isochores (an isochores is a large region of DNA (greater than 300 kb) with a high degree uniformity in G and C: G-C and C-G)확인 또는 다른 데이터와의 co-variations 관찰을 위해 사용. Baseline: 유전체 평균 GC ratio. 파란색: 평균보다 높은 값. 노란색: 평균보다 낮은 값. GC skew와 GC ratio의 간격: 10kb. Megabase 스케일 (예: 플라스미드) 이하: 1kb.

원형 염색체의 크기는 1,867,668 bp이고 플라스미드 2개의 크기는 각각 29,666 bp와 9,816 bp이다. 염색체의 G+C 함량은 38.21%이고 플라스미드 2개의 G+C 함량은 이보다 다소 낮은 36.2%와 34.6%였다. 단백질이 암호화되어 있는 영역 (coding sequence, CDS)은 전체

유전자수 1,866개 중에서 94.5%인 1,764개로 확인되었다. tRNA가 암호화된 유전자는 77개이고 rRNA가 암호화된 유전자는 25개이다. TrueBac ID를 통해 N44-2는 antibiotic resistances genes을 포함하지 않는 것으로 확인되었다.

표 25. *W. paramesenteroides* N44-2의 contigs 정보

No. of Contigs	Acession	Contig name	Size (bp)	G+C ration (%)
1	N44-2.00001	40870.N44-2.1	1,867,668	38.12
2	N44-2.00002	40870.N44-2.1	29,666	36.23
3	N44-2.00003	40870.N44-2.1	9,816	34.59

Clusters of Orthologous Group (COG)은 기능을 가진 homolog의 집합체이기에 진화적 관계를 연구하는데 유용하다. N44-2의 전체 유전자 중에서 COG로 확정된 유전자는 88.2%였으며 기능에 따라 20개 그룹으로 분류되었다. N44-2의 COG는 아래 그림에 제시하였다. 기능이 밝혀지지 않은 유전자 (S그룹, Function unknown) 447개를 제외하고 탄수화물 대사에 관련된 유전자 (G그룹, Carbohydrate transport and metabolism)와 전사에 관련된 유전자 (J그룹, Translation, ribosomal structure and biogenesis)가 각각 146개와 140개로 비율이 가장 높았다.

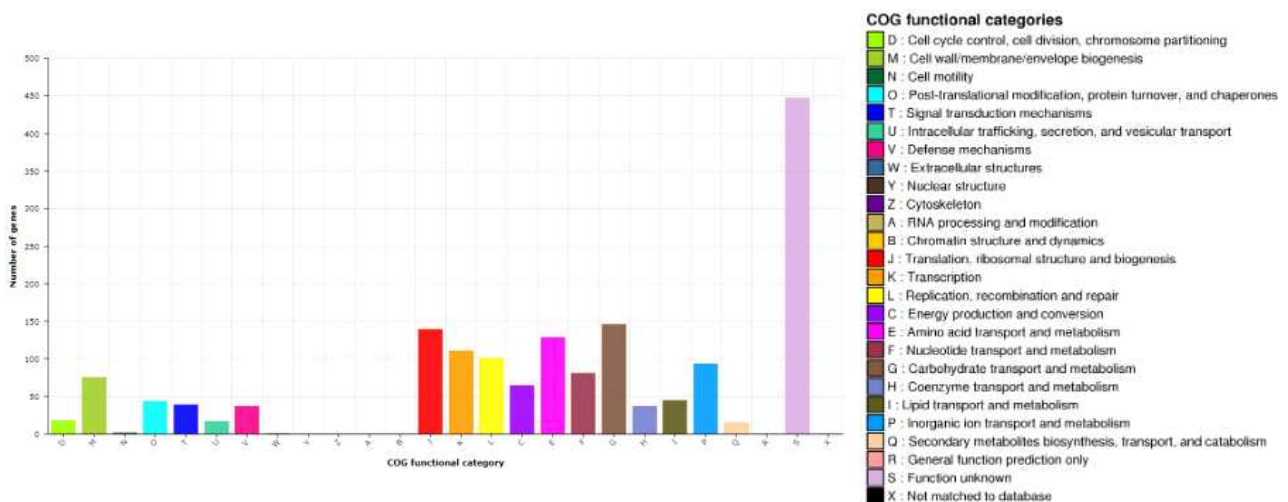


그림 24. *W. paramesenteroides* N44-2의 COG의 기능별 분류

N44-2와 유전적 유사성이 높은 4개의 균주와 유전체를 비교하였다. 아래 그림에 N44-2의 계통수를 제시하였다. N44-2와 유전적 거리가 가장 가까운 균주는 표준균주 *W. paramesenteroides* ATCC33313으로 NCBI에 전유전체가 등록된 유일한 *W. paramesenteroides*이다. 표준균주 ATCC33313 이외에 *W. thailandensis* KCTC3751, *W. jogaejeotgali* FOL01, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ATCC19254가 N44-2와 유사성이 높은 균주로 선택되었다.

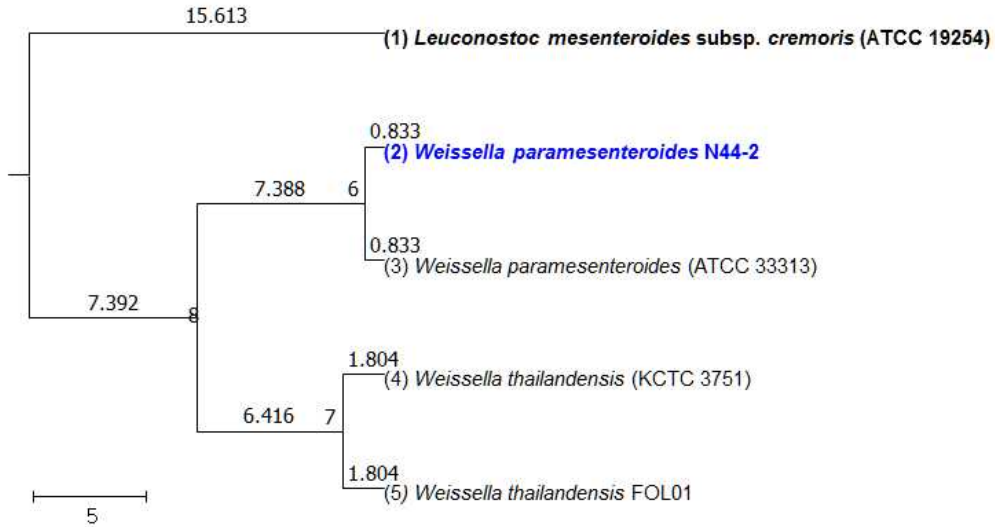


그림 25. *W. paramesenteroides* N44-2의 계통수 (OrthoANI Dendrogram)

아래 그림에 나타난 5균주의 벤다이어그램을 통해서도 N44-2가 ATCC33313과 유사성이 가장 높음을 알 수 있다. 두 균주가 공통으로 공유하는 POG는 1,598개이며 N44-2는 147개의 개별 POG를 갖는다.

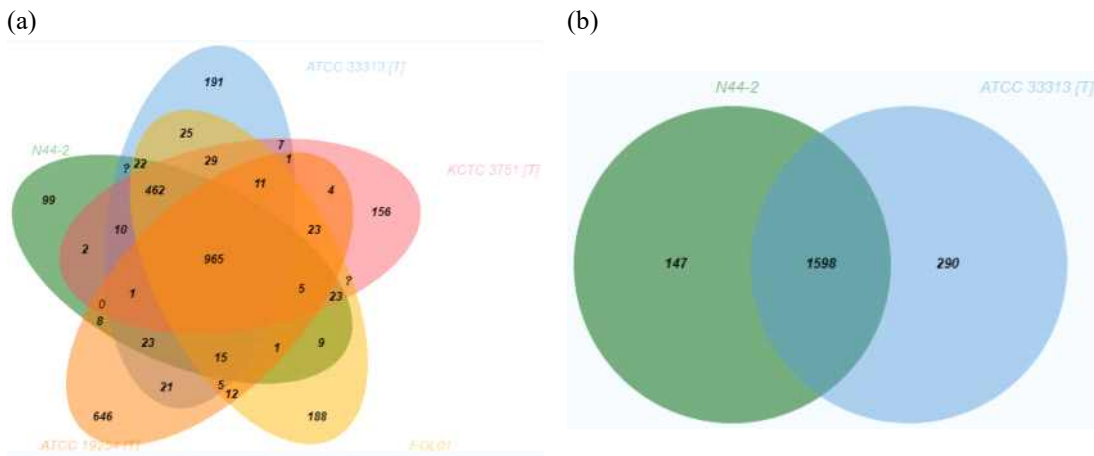


그림 26. *Weissella* 5균주 (a)와 N44-2와 ATCC33313의 벤다이어그램 (b)

아래 그림에 제시한 Pariwise Ortholog matrix를 통해 5균주의 CDS 차이를 확인하였다. 파란색에 가까울수록 상동성이 높으며 ($\geq 99\%$) 빨간색과 가까울수록 상동성이 낮다 (no hit). N44-2와 표준균주 ATCC33313의 CDS는 원형체에서는 거의 유사하였으나 두 개의 플라스미드에서는 차이를 보였다. 향후 N44-2와 4개 균주의 CDS 및 대사체 차이를 통해 *A. flavus* 균사체 생육 억제 및 AF 생성 억제에 기여하는 기능성 유전자 발굴 연구를 수행할 예정이다.



그림 27. *W. paramesenteroides* N44-2의 비교유전체 결과

AF은 발암성이 있는 곰팡이의 2차 대사물질로 특히 AF B1의 독성이 가장 강하다. 따라서 AF의 위험성 감소를 위해 경쟁 미생물로 원인균의 생육과 AF 생성을 억제하는 biocontrol 연구가 활발하게 진행되고 있다. 특히 안전성이 입증된 LAB를 이용한 연구가 다수이다. 식품과 사료 중 AF 오염사고는 주로 아열대 기후에서 발생하지만, 기후변화로 인해 AF의 위험성이 전 세계적으로 문제가 되고 있다. 따라서 본 연구는 전통누룩과 전통술의 안전성을 향상시키기 위하여 *A. flavus*의 생육과 AF 생성을 억제하는 유용 LAB를 누룩에서 분리하는 것을 목적하였다. 이를 위해 첫째, NGS 법으로 누룩의 세균 군집을 스크리닝하였다. 둘째, 선택배지 Raka-Ray와 BCP를 사용하여 누룩에서 LAB를 분리하였다. 셋째, disk diffusion technique과 agar spot assay를 조합하여 LAB의 곰팡이 균사체 생육 억제력을 확인하였다. 넷째, AF 생성 곰팡이와 LAB 혼합 배양물 중의 AF을 LC-MS QTOF로 정량하여 LAB의 AF 생성 억제 여부를 판단하였다. 다섯째, 일정 농도의 AF이 함유된 배지에 LAB를 접종하여 AF 감소 여부를 LC-MS QTOF로 확인하였다. 여섯째, *A. flavus*의 생육과 AF 생성을 억제하는 LAB N44-2의 전유전체를 NGS 기반으로 분석하여 유전적 유사성이 높은 4개 균주와 비교하였다.

메타지놈 결과, Cyanobacteria에 속하는 *Aerosakkonema*와 Proteobacteria에 속하는 *Kosakonia*의 비율이 높았다. LAB에서는 *Weissella* 속과 *Lactococcus* 속이 우점이었고 특히 *Weisslla* 속의 비율은 누룩 no. 33에서 28.42%로 가장 높았다.

1차 년도에서는 LAB 14균주를 전통누룩에서 분리하였다. 동정결과 *Pediococcus*가 5균주로 가장 많았고 이어서 *Weissella* 4균주 > *Enterococcus* 3균주 > *Lactobacillus* 2균주로 동정되었다. LAB 14 균주의 *A. flavus* NRRL3357 생육 억제 실험 결과, 9균주 (*P. pentosaceus* N17-2, *P. pentosaceus* N18-1, *P. pntosaceus* N20-1, *P. acidilactici* N19-2, *W. paramesenteroides* N33-1, *W. paramesenteroides* N33-2, *P. acidilactici* N41-1, *W. paramesenteroides* N44-1, *W. paramesenteroides* N44-2)의 *A. flavus* 생육 억제능력을 확인하였다. 이 중 clear zone이 확실한 *P. pentosaceus* N17-2 (KFCC11788P), *P. acidilactici* N41-1 (KFCC11789P), *W. paramesenteroides* N44-2 (KFCC11790P)를 한국미생물보존센터 (Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 기탁하였다. 아플라톡신 생성 억제능력은 LAB 14균주 중 2균주 N44-2 (*W. paramesenteroides*)와 N33-1 (*W. paramesenteroides*)에서 확인 되었다. 대조군 대비 두 실험군 N44-2와 N33-1의 AF B1과 B2의 EIC의 면적이 감소하였고

특히 N44-2 실험군의 아플라톡신 감소폭이 높았다. 반면 실험군 N33-1의 AF B1과 B2의 감소폭은 N44-2에 비해 적었지만 흥미롭게도 *A. flavus*의 생육을 감소시키지 않으면서 AF 생산량을 감소시켰다.

2차 년도에서는 161개의 LAB을 분리하였다. 1차 년도 분리 LAB 14균주와 기타 6균주를 포함한 총 181개 LAB 균주의 곰팡이 생육 억제 및 아플라톡신 생성억제력을 두 단계를 통해 최종적으로 확인하였다. 첫 번째 단계에서 곰팡이 생육 억제력과 AF 생성 억제력 결과를 기반으로 LAB 181균주를 5개 그룹으로 분류하였다. 그룹 3으로 분류된 14개 균주가 *A. oryzae*의 생육은 방해하지 않으면서 동시에 *A. flavus*의 생육과 AF 생성을 억제하였다. 따라서 그룹 3의 LAB 14 균주를 2차 실험 대상으로 선정하였고 AF 생성 억제력이 우수한 그룹4의 1개 균주와 AF 생성을 억제하지 못하는 그룹 5의 1개 균주를 비교군으로 추가하였다. 2차 단계에서 AF 분해력과 누룩 분리 aflatoxigenic *Aspergillus* 생육 억제 결과를 고려하여 최종적으로 9개의 LAB 균주를 선별하였다. 최종 선별된 LAB 9균주는 *S. epidermidis* N57-26, N57-43, *P. pentosaceus* N17-2, N19-37, N57-15, N57-24, *W. paramesenteroides* N33-1, N44-2, *L. crustorum* RL48-10이다. 1차 년도 연구에서 *A. flavus*의 생육 및 아플라톡신 생성 억제력이 우수하였던 *W. paramesenteroides* N44-2의 전체 염기서열을 분석한 결과, 전체 유전자수 1,866개 중에서 94.5%가 CDS로 확인되었고 88.2%가 COG로 확정되어 20개 기능으로 분류되었다. N44-2의 유전자는 기능이 확인되지 않은 유전자를 제외하고 탄수화물 대사와 전사에 관련된 유전자의 비율이 높았다. 비교유전체 분석 결과, N44-2는 표준균주 *W. paramesenteroides* ATCC33313과 유사성이 가장 높았다. 차후 심도 있는 비교연구를 통해 향후 *A. flavus* 균사체 생육 억제 및 AF 생성 억제에 기여하는 LAB의 기능성 유전자 발굴이 필요하다.

(9) 전통누룩 유래 고기능성 유산균 발굴

○ 전통누룩 유래 유산균 균주 분리 및 확보

전통누룩에서 분리한 유산균 중 고기능성 균주 선발을 위해 1차 스크리닝 후 확보된 유산균 균주는 34종으로 다음 표와 같다.

표 26. 전통누룩에서 분리, 1차 선별된 유산균 34종

N○	Nuruk	Nuruk name	Strian identification	Strain	Strain	Similarity (%)
1	3	오메기곡	<i>Pediococcus acidilactici</i>	RL3-2	FJ905315.2	99
2	3	오메기곡	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RL3-11	KJ810576.1	99
4	6	공병곡	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RL6-2	LC035128.1	99
5	6	공병곡	<i>Pediococcus acidilactici</i>	RL6-4	AB598949.1	99
10	11	여곡	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RL11-1	KJ810576.1	99
14	48	진주곡자(금강밀)	<i>Lactobacillus rossiae</i>	RL48-1	JN680708.1	100
15	48	진주곡자(금강밀)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	RL48-2	KR153313.1	99
16	48	진주곡자(금강밀)	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RL48-4	KJ810576.1	99
17	48	진주곡자(금강밀)	<i>Lactobacillus crustorum</i>	RL48-10	AM285453.1	99
21	54	금정산성누룩	<i>Pediococcus acidilactici</i>	RL54-1	KT982251.1	100
27	17	분곡	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N17-2	DSM20336(T)	-
28	18	병곡	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N18-1	SRCM100194	-
30	19	이화주곡	<i>Pediococcus acidilactici</i>	N19-2	BCC1	-
29	20	이화곡	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N20-1	SRCM100194	-
32	33	대주백타곡	<i>Weissella paramesenteroides</i>	N33-1	ATCC33313(T)	98.97
34	40	연화곡	<i>Lactobacillus curvatus</i>	LN40-E6-1	DSM20019	-

31	41	동양주곡	<i>Pediococcus acidilactici</i>	N41-1	DSM20284(T)	98.98
35	41	동양주곡	<i>Lactobacillus curvatus</i>	LN41-E6-1	DSM20019	-
33	44	신곡	<i>Weissellaparamesenteroides</i>	N44-1	NRIC 0140	99
13-2	22	향온곡	<i>Weissellacibaria</i>	L22-2	AB362617.1	99
22-2	57	이가수불누룩	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RL57-5	KP119819.1	99
24-3	58	송명섭누룩	<i>Pediococcus acidilactici</i>	L58-3	EF059987.1	99
25-4	59	제주붉은보리누룩	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RL59-13	HG328247.1	99
25-5	59	제주붉은보리누룩	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RL59-14	KJ810576.1	99

- MRS agar를 이용한 selective medium method로 유산균 colony를 분리하였다.
 - : 16S RNA sequencing을 실시하여 유산균 colony의 sepecies 확인하였다.
 - : 현재까지 *Pediococcus* sp. 16종, *Lactobacillus* sp. 5종, *Weissella* sp. 3종을 확보하였다. (추가 진행 중)

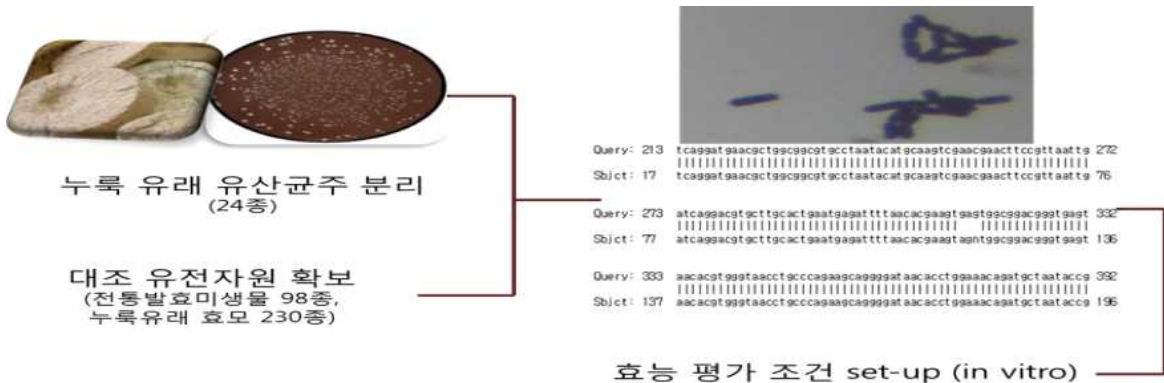
- 대조 유전자원(전통발효 균주 미생물) 확보

: 유효 기능성 유전정보를 확인하기위해 한국식품연구원에서 자체 분리·보관 중인 전통발효 유산균주 98종 (*Lactobacillus* sp. 47종, *Leuconostoc* sp. 19종, *Enterococcus* sp. 17종, *Pediococcus* sp. 12종 *Weissella* sp. 3종) 및 그에 대한 sequencing data 확보하였다.

: 전통 누룩으로부터 기 분리된 효모(*Saccharomyces cerevisiae*) 230종을 확보하였다.

- In vitro test (enzyme assay) 조건 set-up

: 각 균주의 ALDH 활성 스크리닝을 위한 96 well plate 활용 비색법에서의 acetaldehyde 적정 분해 조건(온도, 시간 등), 농도 및 유효한 검체 preparation 방법을 확인하였다.



나. 전통누룩 안전성 확보 연구

(10) 아플라톡신에 대한 전통누룩과 탁주의 안전성

아플라톡신 (aflatoxin, AF)은 인간과 가축에 심각한 공중보건 문제를 발생시키는 독성물질로 곰팡이가 생산하는 2차 대사물질이다. 주요 생성 곰팡이는 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus parasticus*로 토양에 존재하며 농작물, 특히 옥수수과 땅콩과 같은 곡류와 견과류를 감염시켜 아플라톡신을 생성한다. 식품에 존재하는 아플라톡신의 주요 형태는 B1, B2, G1, G2, M1으로, 특히 AFB1의 독성이 가장 강하여 국제암연구소 (International Agency for Research on Cancer, IARC)는 1993년에 아플라톡신 B1을 ‘1차적으로 인간에 대한 발암성이 확인된 1 군 (Group 1)’으로 분류하였다. 아플라톡신 B1은 간에서 AFM1 형태로 대사되어 모유를 통해 다음 세대로 전이되는 문제가 있으며, 아플라톡신 M1은 두 번째로 독성이 높은 형태로 성장 지연과 신경독성이 있는 것으로 알려졌다.

아플라톡신에 의한 식품과 사료의 안전은 주로 아프리카, 인도, 중국의 남부와 같은 아열대 기후를 갖는 지역에서 문제가 되었다. 그러나 기후 변화에 의하여 아플라톡신의 위험성은 전세계적으로 증가하였으며, 실제로 유럽연합은 2003~2004년 기온상승으로 심각한 작물 곰팡이오염 사건을 겪어 집행위원회 규칙 (Commission Regulation (EC)) NO 1881/2006에 의거하여 아플라톡신 B1과 총 아플라톡신의 최대허용량을 각각 2 µg/kg, 4 µg/kg으로 강화하였다.

식품에서는 경쟁미생물 이용하여 곰팡이독소를 제어하려는 연구가 많이 수행되었다. 특히 유산균 (lactic acid bacteria, LAB)은 고대부터 식품발효에 활용되었으며 미국 식품의약국 (Food and Drug Administration, FDA)의 ‘일반적으로 안전한 물질 (generally recognized as safe, GRAS)’에 등록될 정도로 안전성이 입증되었기에 이를 활용한 아플라톡신 억제 연구가 상당수 진행되었다. 항진균 활성을 보이는 유산균은 유제품, sourdough, 김치, 신선채소, 육제품 등 다양한 식품에서 분리되었다. 대부분 *Lactobacillus* 속이며 그 외에 *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus* 속 등으로 확인되었다. 유산균은 세포벽에 대한 아플라톡신의 결합, 아플라톡신 생합성 유전자의 발현 억제를 통해 아플라톡신을 식품 또는 특정 환경에서 제거하며, organic acids, phenolic compounds, peptidic compounds 등의 항진균 대사체를 생성하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구는 전통누룩의 아플라톡신에 대한 안전성을 향상하고자 누룩에 자생하는 항진균 유산균주를 확보하는 것을 목적하였다.

○ 누룩의 총 아플라톡신 함량

ELISA로 분석한 전통누룩 61종의 총 아플라톡신 함량은 표 15에 나타내었다. 식품의약품안전처 고시 기준인 ‘15 µg/kg’을 초과한 누룩은 14종으로 아플라톡신 고 함유 그룹 (high-AF group)으로 분류하였다. 아플라톡신 함량이 정량한계 (LOQ) 4 ppb 미만인 최하위 누룩 3종 (no. 33, 56, 12)을 아플라톡신 저 함유 그룹 (low-AF group)으로 분류하였다.

표 27. 전통누룩 61종의 총 아플라톡신 함량

Nuruk no.	Nuruk name	Total AF level (ng/g)	Group	Sample name
17	분곡	540.4 ± 89.0	High-AF	N01
18	병곡	356.1 ± 70.9	High-AF	N02
19	이화주곡	253.2 ± 38.8	High-AF	N03
20	이화곡	213.1 ± 94.5	High-AF	N04
39	정화곡	153.0 ± 43.5	High-AF	N05
41	동양주곡	108.5 ± 38.7	High-AF	N06

40	연화곡	37.7 ± 13.3	High-AF	N07
44	신곡	34.3 ± 6.9	High-AF	N08
25	내부비전곡	30.7 ± 12.8	High-AF	N09
29	미곡	26.8 ± 23.1	High-AF	N10
57	시판누룩11	26.2 ± 17.8	High-AF	N11
15	백곡	20.0 ± 4.3	High-AF	N12
13	연화곡	16.9 ± 2.4	High-AF	N13
34	백료곡	15.8 ± 10.6	High-AF	N14
46	하동신곡	14.7 ± 4.3		
4	죽곡	12.2 ± 6.9		
49	시판누룩3	11.8 ± 3.3		
7	곡	10.3 ± 3.8		
28	곡	10.0 ± 4.0		
43	신곡	9.7 ± 3.5		
31	곡	9.0 ± 0.9		
45	신곡3	8.5 ± 3.8		
1	주곡방문	8.4 ± 2.9		
37	백주곡2	8.1 ± 2.2		
55	시판누룩9	8.0 ± 3.7		
6	공병곡	8.0 ± 1.9		
11	여곡	7.7 ± 1.6		
32	요곡	7.5 ± 1.9		
35	양능곡	7.3 ± 2.1		
5	죽곡	7.1 ± 4.3		
51	시판누룩5	7.1 ± 4.1		
2	추모곡	6.9 ± 0.4		
58	시판누룩12	6.7 ± 2.9		
36	백주곡	6.6 ± 2.3		
59	시판누룩13	6.5 ± 0.6		
61	시판누룩15	6.2 ± 1.4		
47	시판누룩1	6.1 ± 3.0		
60	시판누룩14	5.9 ± 1.7		
3	오메기곡	5.9 ± 0.9		
48	시판누룩2	5.9 ± 2.1		
22	향온곡	5.8 ± 2.6		
24	백수환동주곡	5.8 ± 2.2		
10	진주춘주곡	5.6 ± 0.6		
23	향온곡	5.5 ± 1.0		
27	녹두곡	5.3 ± 1.1		
52	시판누룩6	4.8 ± 1.4		
54	시판누룩8	5.2 ± 1.9		
38	만전향주곡	5.0 ± 0.7		
26	논미주곡	4.9 ± 2.8		
9	신곡	4.9 ± 1.4		
42	미곡	4.8 ± 1.8		
50	시판누룩4	4.7 ± 1.3		
53	시판누룩7	4.7 ± 1.0		
30	면곡	4.5 ± 0.6		
21	조곡법	4.4 ± 0.7		
8	면곡	4.2 ± 1.7		
14	백곡	4.1 ± 0.6		
16	여곡	3.8 ± 1.0		
33	대주백타곡	3.8 ± 0.4	Low-AF	N15
56	시판누룩10	3.7 ± 2.2	Low-AF	N16
12	설향곡	3.3 ± 0.3	Low-AF	N17

¹⁾Data are mean ± S.D. (n=3).

²⁾Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) are 3 ppb and 4 ppb, respectively.

○ 전통누룩 및 탁주의 미생물 균집

전통누룩의 아플라톡신 생성 원인 균주와 미생물학적 특성을 탐색하기 위하여 ELISA 원리 기반 총 아플라톡신 실험에서 선별한 아플라톡신 고함유 누룩 14종과 저함유 누룩 3종의 진균과

세균의 군집을 분석하였다.

-진균 군집의 구조: 누룩과 술의 구성하는 진균의 속 (genus)을 그림 17에 제시하였다. 누룩은 아플라톡신 함량에 상관없이 *Aspergillus* 속과 *Rhizopus* 속이 각각 21.6%~77.3%와 7.4%~76.1%로 우점이었고, 술은 *Saccharomyces* 속이 전체 염기서열분석의 93.0%~99.50%로 우세하였다. 아플라톡신 고함유 누룩의 *Aspergillus* 속은 주로 *A. flavus* var. *oryzae*와 *A. tubingensis*로 구성되었고, *Rhizopus* 속은 *Rhizopus arrhizus* (= *R. oryzae*)와 *Rhizopus microsporus*로 구성되었다. *Saccharomyces* 속은 *Saccharomyces cerevisiae* 단일종으로 구성되었다.

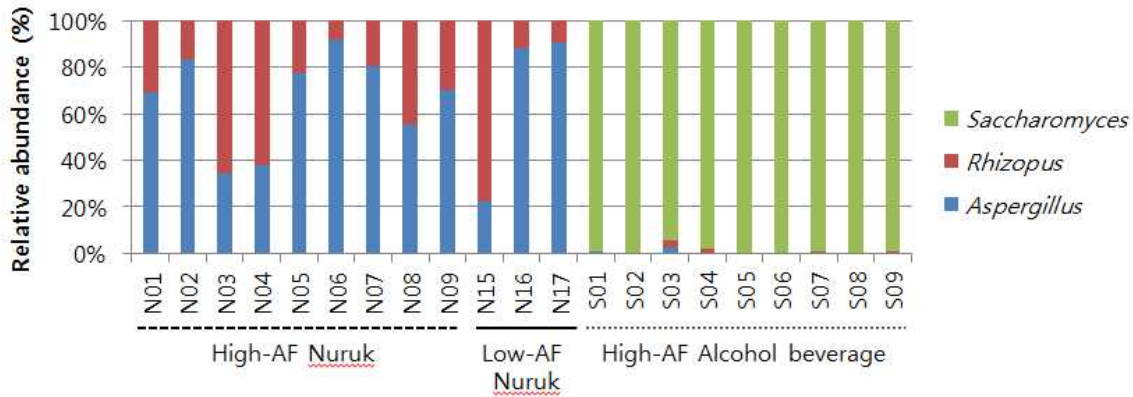


그림 28. 아플라톡신 고함유 및 저함유 누룩, 고함유 누룩으로 제조한 전통주에서 진균의 군집 구조

-세균 군집의 구조: 그림 4는 각 시료에서 세균의 군집을 속 수준으로 나타내었다. 누룩 33을 제외한 모든 누룩에서 Cyanobacteria 문의 *Aerosakkonema* 속과 Proteobacteria 문의 *Kosakonia* 속의 상대적 함량이 높았다. 유산균의 경우 *Weissella* 속은 no.33에서 28.42%로 가장 높았고 *Lactococcus* 속은 no.56에서 3.44%로 가장 높았다. 아플라톡신 고함유 누룩의 *Weissella* 속과 *Lactococcus* 속은 각각 *Weissella confusa*와 *Lactococcus raffinolactis*로 구성되었다. 아플라톡신 저함유 누룩에서도 *Weissella* 속과 *Lactococcus* 속은 종수준에서 *W. confusa*와 *L. raffinolactis*로 확인 되었다.

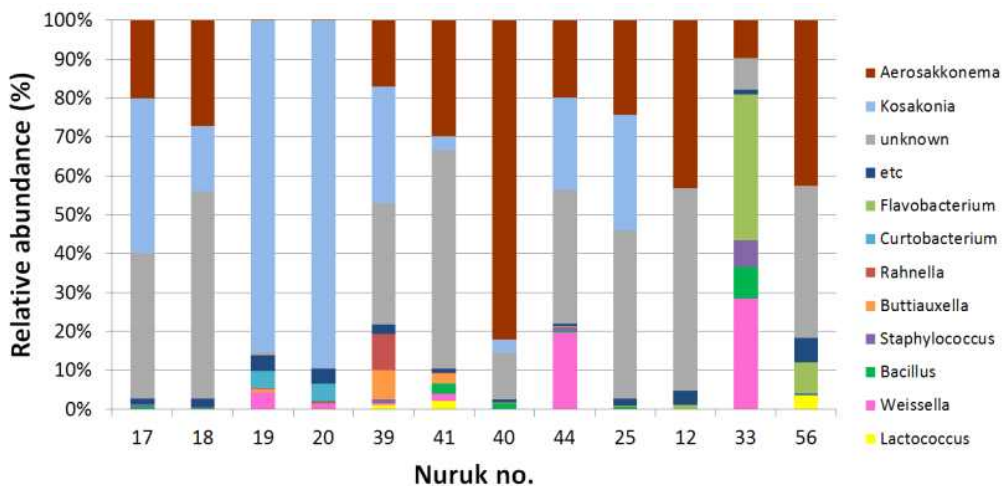


그림 29. 아플라톡신 고함유 및 저함유 누룩의 속 수준에서 세균의 군집 구조

○ 누룩 분리 진균과 아플라톡신 생성 균주

아플라톡신 고함유 및 저함유 누룩에서 분리한 94개의 진균 분리주를 표 16에 제시하였다. 곰팡이는 총 90개 균주로 *Aspergillus* 속이 46균주, *Rhizopus* 속이 18균주, *Lichtheimia* 속이 15균주, *Mucor* 속이 7균주, *Syncephalastrum* 속이 2균주, *Penicillium* 속이 2균주로 구성되었다. 종 수준에서 *Aspergillus* 속은 *A. oryzae* 30개, *A. flavus* 9개, *A. niger* 3개, *A. chevalieri* 2개, *A. amstelodami*, *A. sydowii* 1개로 구성되었다. 아플라톡신을 생성하는 곰팡이 중에서 유일하게 *A. flavus*가 분리되었으며 이를 누룩의 잠재적인 아플라톡신 생성 원인 균주로 간주하였다. *A. oryzae* 30개 균주와 *A. flavus* 9개 균주를 대상으로 아플라톡신 생성 능력을 확인하였고, chemotaxonomy를 기반으로 아플라톡신을 생성하지 않는 *Aspergillus* spp. 29주는 *A. oryzae*로, 아플라톡신을 생성하는 10주는 *A. flavus*로 재분리하였다 (표16).

누룩 분리 *A. flavus*는 아플라톡신 B1을 0.1~2.4 ng/mL의 매우 낮은 농도로 생산하였으며 아플라톡신 B2, G1, G2는 생산하지 않았다. 이는 표준균주 *A. flavus* NRRL3357의 아플라톡신 B1 생산량 1728.9 ng/mL에 비하여 현저하게 낮은 수치이었다. 따라서 누룩의 아플라톡신 생성 원인균주는 *A. flavus*이고 아플라톡신 B1을 주요한 유형으로 생성하는 것을 확인하였다.

표 28. 아플라톡신 고함유 및 저함유 누룩 17종에서 분리한 진균 94개의 분리주

Nuruk no.	Strain no.	Genomic taxonomy		Chemotaxonomy	
		Strains	Similarity (%)	Strains	AF production
12	1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	<i>A. flavus</i>	+
	2	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	99	N/A	N/A
	3	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	99	N/A	N/A
13	4	<i>Aspergillus flavus</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	5	<i>Rhizopus microsporus</i>	94	N/A	N/A
	6	<i>Lichtheimia ramosa</i>	100	N/A	N/A
	7	<i>Aspergillus niger</i>	100	N/A	N/A
15	8	<i>Mucor circinelloides</i>	100	N/A	N/A
	9	<i>Penicillium janthinellum</i>	100	N/A	N/A
	10	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	N/A	N/A
	11	<i>Rhizopus microsporus</i>	100	N/A	N/A
17	12	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. flavus</i>	+
	13	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	14	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	15	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	16	<i>Aspergillus flauvs</i>	100	<i>A. flavus</i>	+
	17	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. flavus</i>	+
	18	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	100	N/A	N/A
18	19	<i>Aspergillus flavus</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	20	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	N/A	N/A
	21	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	22	<i>Aspergillus sydowii</i>	100	N/A	N/A
	23	<i>Penicillium griseofulvum</i>	100	N/A	N/A
	24	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	N/A	N/A
	25	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	26	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	N/A	N/A
19	27	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	28	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	100	N/A	N/A
	29	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100	N/A	N/A
	30	<i>Trichosporon loubieri</i>	100	N/A	N/A
	31	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100	N/A	N/A
	32	<i>Lichtheimia ramosa</i>	100	N/A	N/A
20	33	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	N/A	N/A
	34	<i>Aspergillus flavus</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	35	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	N/A	N/A
	36	<i>Mucor circinelloides</i>	100	N/A	N/A

	37	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	N/A	N/A
	38	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	N/A	N/A
	39	<i>Aspergillus flavus</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	40	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
25	41	<i>Lichtheimia ramose</i>	100	N/A	N/A
	42	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	N/A	N/A
	43	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
29	44	<i>Lichtheimia ramose</i>	100	N/A	N/A
	45	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	100	N/A	N/A
33	46	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	N/A	N/A
	47	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. flavus</i>	+
	48	<i>Aspergillus flavus</i>	100	<i>A. flavus</i>	+
	49	<i>Lichtheimia ramose</i>	100	N/A	N/A
	50	<i>Aspergillus chevalieri</i>	100	N/A	N/A
	51	<i>Aspergillus amstelodami</i>	100	N/A	N/A
34	52	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	53	<i>Aspergillus niger</i>	100	N/A	N/A
39	54	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	55	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	56	<i>Lichtheimia ramose</i>	100	N/A	N/A
	57	<i>Aspergillus flavus</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	58	<i>Lichtheimia ramose</i>	100	N/A	N/A
40	59	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	N/A	N/A
	60	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	61	<i>Mucor circinelloides</i>	100	N/A	N/A
	62	<i>Mucor circinelloides</i>	100	N/A	N/A
	63	<i>Rhizopus microsporus</i>	100	N/A	N/A
	64	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	65	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	66	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	100	N/A	N/A
	67	<i>Rhizopus microsporus</i>	100	N/A	N/A
	68	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
41	69	<i>Mucor circinelloides</i>	100	N/A	N/A
	70	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	71	<i>Mucor circinelloides</i>	100	N/A	N/A
	72	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	N/A	N/A
	73	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	74	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	75	<i>Mucor circinelloides</i>	100	N/A	N/A
	76	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	77	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
44	78	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	79	<i>Lichtheimia ramose</i>	100	N/A	N/A
	80	<i>Rhizopus microsporus</i>	100	N/A	N/A
	81	<i>Lichtheimia ramose</i>	100	N/A	N/A
	82	<i>Aspergillus niger</i>	100	N/A	N/A
	83	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. flavus</i>	+
56	84	<i>Aspergillus flavus</i>	100	<i>A. flavus</i>	+
	85	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. flavus</i>	+
	86	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	87	<i>Lichtheimia ramose</i>	100	N/A	N/A
57	88	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	100	N/A	N/A
	89	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	90	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	N/A	N/A
	91	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. oryzae</i>	-
	92	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	N/A	N/A
	93	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	<i>A. flavus</i>	+
	94	<i>Aspergillus chevalieri</i>	100	N/A	N/A

+, AF; -, non-AF; N/A, not applicable

○ 전통누룩의 주요 아플라톡신 유형 및 탁주로의 이행 여부

LC-MS/MS로 분석한 전통누룩과 탁주의 아플라톡신 함량을 표 17에 제시하였다. 누룩 10종에서 총 아플라톡신 함량이 $0.5 \pm 0.8 \sim 76.6 \pm 51.0$ ng/g으로 검출되었고 8종의 누룩에서 아플라톡신 B1이 주요한 형태로 분석되었다. 예외적으로 누룩 19 (이화주곡)과 20 (이화곡)에서 아플라톡신 유형은 G1이 주요한 형태이었고 소량의 아플라톡신 G2도 검출되었다. 그러나 아플라톡신 G 유형을 생성하는 *A. parasiticus*는 누룩에서 분리되지 않았다. 총 아플라톡신 함량이 식품의약품안전처의 고시기준인 $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ 을 초과하는 누룩은 4종으로 ELISA로 선별한 14종보다 적었다. 이는 위양성과 매트릭스 효과로 인하여 ELISA 방법에서 누룩의 아플라톡신이 과측정된 것으로 간주되며, 따라서 LC-MS/MS가 누룩의 아플라톡신 분석에 적합한 것으로 사료하였다. 전통누룩 중의 아플라톡신은 술로 거의 이행되지 않았으나, 누룩 19 (이화주곡)와 20 (이화곡)의 아플라톡신 G1은 각각의 술 (S03, S04)로 이행하여 각각 $< 0.3 \pm 0.1 \sim 0.4$ ng/mL로 검출되었다.

표 29. LC-MS/MS로 분석한 전통누룩과 탁주의 아플라톡신 유형과 그 함량

Sample	Nuruk No.	Aflatoxin concentration (ppb)				Total
		B1	B2	G1	G2	
High-AF nuruk	17	63.6 ± 42.2	12.5 ± 8.1	nd*	nd	$76.1 \pm 51.0^{**}$
	18	32.1 ± 10.2	7.9 ± 2.3	nd	nd	40.0 ± 12.2
	19	11.6 ± 2.1	1.7 ± 0.2	23.1 ± 1.2	2.1 ± 0.8	38.4 ± 3.1
	20	11.3 ± 11.4	1.9 ± 1.2	24.6 ± 18.9	2.5 ± 2.3	40.2 ± 33.7
	39	3.3 ± 1.3	1.4 ± 0.3	nd	nd	4.6 ± 1.6
	41	7.7 ± 2.4	1.7 ± 0.6	nd	nd	9.4 ± 2.8
	40	0.1 ± 0.2	0.3 ± 0.3	nd	nd	0.6 ± 0.5
	44	1.8 ± 3.1	0.7 ± 0.8	nd	nd	2.4 ± 3.9
	25	0.2 ± 0.3	0.4 ± 0.4	nd	nd	0.6 ± 0.7
	29	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.4	nd	nd	0.5 ± 0.8
	57	nd	nd	nd	nd	nd
	15	nd	nd	nd	nd	nd
	13	nd	nd	nd	nd	nd
34	nd	nd	nd	nd	nd	
Low-AF nuruk	33	nd	nd	nd	nd	nd
	56	nd	nd	nd	nd	nd
	12	nd	nd	nd	nd	nd
Alcoholic beverage made with high-AF nuruk	Control	nd	nd	nd	nd	nd
	17	nd	nd	nd	nd	nd
	18	nd	nd	nd	nd	nd
	19	nd	nd	0.3 ± 0.1	nd	0.3 ± 0.1
	20	nd	nd	0.3 ± 0.4	nd	0.3 ± 0.4
	39	nd	nd	nd	nd	nd
	41	nd	nd	nd	nd	nd
	40	nd	nd	nd	nd	nd
	44	nd	nd	nd	nd	nd
	25	nd	nd	nd	nd	nd
	29	nd	nd	nd	nd	nd
	57	nd	nd	nd	nd	nd
	15	nd	nd	nd	nd	nd
13	nd	nd	nd	nd	nd	
34	nd	nd	nd	nd	nd	

*nd, not detected.

**Total AF concentration was sum of AFs B1, B2, G1 and G2.

결론적으로 아플라톡신에 대한 전통누룩의 오염정도와 누룩에서 탁주로의 아플라톡신 이행도는 낮으며, 누룩 분리 *Aspergillus* spp.의 대부분이 아플라톡신 생산 능력이 없거나 낮음을

확인하였다. 그러나 *A. flavus*의 아플라톡신 생성능력은 다양한 환경 변수에 영향을 받아 누룩제조 과정 중에 최적의 아플라톡신 생산 조건이 조성될 가능성이 있기 때문에 전통누룩과 탁주의 안전성을 향상시키고자 누룩 중 아플라톡신 함량을 저감하는 방법을 탐색하였다. 유산균은 탁주 제조에서도 산 생성을 통해 잡균의 생육을 억제하며 식품에서 아플라톡신 함량을 저감한다는 연구가 보고되었기에, 본 연구는 전통누룩 내생 유산균을 활용하여 누룩 중 아플라톡신 함량을 저감하는 방안을 시도하였다.

(11) 전통누룩 유래 유산균의 항진균 기작

○ 전통누룩 유래 항진균성 유산균 선별

누룩에서 잠재적 유산균 179개를 분리하여 세 가지 기준에 따라 5개 그룹으로 분류하였다 (표 18). 항진균성 유산균의 특성을 대사체학적 방법으로 확인하고자 그룹 1 (n=14), 그룹 3 (n=12), 그룹 4 (n=1), 그룹 5 (n=1)에 속하는 28개의 분리주를 1차적으로 선별하였다. 그룹 4와 그룹 5의 균주는 각각 아플라톡신 생성 억제력과 생육 억제력이 우수하여 선별하였다.

표 30. 곰팡이 생육 및 아플라톡신 생성 억제 능력에 따른 유산균의 분류

Group	Inhibition of fungal growth		Inhibition of AF production	Number of LAB isolates
	<i>A. oryzae</i>	<i>A. flavus</i>		
1	-	-	-	14
2	-	-	+	139
3	-	+	+	12
4	+	+	+	13
5	-	+	-	1
Total				179

-, no inhibition; +, inhibition.

1차 선별한 분리주는 16S rRNA 기반으로 동정을 하여 표 19에 나타내었다. 유산균이 아닌 *Bacillus subtilis*와 *Staphylococcus epidermidis*를 제외하였고, 최종적으로 총 23개의 유산균을 선별하여 항진균성 유산균의 대사체학적 특성 및 항진균 기작을 확인하였다.

표 31. 누룩 분리 유산균의 *Aspergillus flavus*에 대한 항진균력

Group	Isolate no.	Molecular identification	Group	Isolate no.	Molecular identification	
1 (n=14)	N17-03	<i>Enterococcus durans</i>	3 (n=12)	N44-02	<i>Weissella paramesenteroides</i>	
	N17-04	<i>Enterococcus lactis</i>		N17-02	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
	N17-05	<i>Enterococcus durans</i>		N19-30	<i>Enterococcus lactis</i>	
	N19-04	<i>Enterococcus durans</i>		N33-01	<i>Weissella paramesenteroides</i>	
	N19-05	<i>Enterococcus durans</i>		N39-01	<i>Enterococcus lactis</i>	
	N19-07	<i>Enterococcus durans</i>		N57-24	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
	N19-11	<i>Enterococcus durans</i>		N57-25	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	N19-13	<i>Enterococcus gallinarum</i>		N57-26	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	N19-14	<i>Enterococcus gallinarum</i>		N57-28	<i>Enterococcus hirae</i>	
	N19-15	<i>Enterococcus durans</i>		N57-35	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	N19-16	<i>Enterococcus durans</i>		N57-43	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	N19-32	<i>Lactococcus taiwanensis</i>		RL48-10	<i>Lactobacillus crustorum</i>	
	N19-39	<i>Enterococcus durans</i>		4 (n=13)	N57-15	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
	N57-47	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>			5 (n=1)	N19-37

○ 항진균 유산균의 특이적 대사물질 분석

유산균 단일 배양물과 *A. flavus*와 같이 배양한 공배양물의 대사체를 LC-MSTOF를 활용한 비표적 대사체학 방법으로 분석하였다. 주성분분석을 기반으로 유산균 균주의 분포를 확인하고

이상치를 제거하였으며, 계층적군집분석으로 유산균주를 재분류하였다. 이온화 모드에 따라 차이는 있지만 대체적으로 같은 종끼리 군집되는 경향을 보였다. 결과는 각각 표 20과 표 21에 제시하였다.

표 32. 양이온 이온화 모드에서 분석한 비표적 대사체 결과를 기반으로 한 유산균의 분류

LAB strains	SIMCA results		LAB strains	SIMCA results	
	PCA group	HCA group		PCA group	HCA group
Coculture with <i>A. flavus</i>			LAB single culture		
N17-02	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Antifungal	N17-02	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Antifungal
N19-37	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		N19-37	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
N33-01	<i>Weissella paramesenteroides</i>		N33-01	<i>Weissella paramesenteroides</i>	
N44-02	<i>Weissella paramesenteroides</i>		N44-02	<i>Weissella paramesenteroides</i>	
N48-10	<i>Lactobacillus crustorum</i>		N48-10	<i>Lactobacillus crustorum</i>	
N57-15	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		N57-15	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
N57-24	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		N57-24	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
N17-04	<i>Enterococcus lactis</i>	Non-antifungal	N17-04	<i>Enterococcus lactis</i>	Non-antifungal
N17-05	<i>Enterococcus durans</i>		N17-05	<i>Enterococcus durans</i>	
N19-04	<i>Enterococcus durans</i>		N19-04	<i>Enterococcus durans</i>	
N19-05	<i>Enterococcus durans</i>		N19-05	<i>Enterococcus durans</i>	
N19-07	<i>Enterococcus durans</i>		N19-07	<i>Enterococcus durans</i>	
N19-11	<i>Enterococcus durans</i>		N19-11	<i>Enterococcus durans</i>	
N19-13	<i>Enterococcus gallinarum</i>		N19-15	<i>Enterococcus durans</i>	
N19-14	<i>Enterococcus gallinarum</i>		N19-16	<i>Enterococcus durans</i>	
N19-15	<i>Enterococcus durans</i>		N19-30	<i>Enterococcus lactis</i>	
N19-16	<i>Enterococcus durans</i>		N19-32	<i>Lactococcus taiwanensis</i>	
N19-30	<i>Enterococcus lactis</i>		N19-39	<i>Enterococcus durans</i>	
N19-32	<i>Lactococcus taiwanensis</i>		N39-01	<i>Enterococcus lactis</i>	
N19-39	<i>Enterococcus durans</i>		N57-28	<i>Enterococcus hirae</i>	
N39-01	<i>Enterococcus lactis</i>		N17-03	<i>Enterococcus durans</i>	outlier
N57-28	<i>Enterococcus hirae</i>		N19-13	<i>Enterococcus gallinarum</i>	outlier
N17-03	<i>Enterococcus durans</i>	outlier	N19-14	<i>Enterococcus gallinarum</i>	outlier

표 33. 음이온 이온화 모드에서 분석한 비표적 대사체 결과를 기반으로 한 유산균의 분류

LAB strains	SIMCA results		LAB strains	SIMCA results	
	PCA group	HCA group		PCA group	HCA group
Coculture with <i>A. flavus</i>			LAB single culture		
N19-13	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Antifungal	N19-13	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Antifungal
N19-14	<i>Enterococcus gallinarum</i>		N19-14	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
N19-32	<i>Lactococcus taiwanensis</i>		N57-28	<i>Enterococcus hirae</i>	
N33-01	<i>Weissella paramesenteroides</i>		N19-32	<i>Lactococcus taiwanensis</i>	
N44-02	<i>Weissella paramesenteroides</i>		N17-02	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
N17-02	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		N19-37	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
N19-37	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		N57-15	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
N57-15	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		N57-24	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
N57-24	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		N33-01	<i>Weissella paramesenteroides</i>	
N19-15	<i>Enterococcus durans</i>	Non-antifungal	N44-02	<i>Weissella paramesenteroides</i>	
N57-28	<i>Enterococcus hirae</i>		N19-16	<i>Enterococcus durans</i>	Non-antifungal
N17-03	<i>Enterococcus durans</i>		N19-30	<i>Enterococcus lactis</i>	
N17-05	<i>Enterococcus durans</i>		N17-03	<i>Enterococcus durans</i>	
N19-04	<i>Enterococcus durans</i>		N17-05	<i>Enterococcus durans</i>	
N19-05	<i>Enterococcus durans</i>		N19-04	<i>Enterococcus durans</i>	
N19-07	<i>Enterococcus durans</i>		N19-05	<i>Enterococcus durans</i>	
N19-11	<i>Enterococcus durans</i>		N19-07	<i>Enterococcus durans</i>	
N19-16	<i>Enterococcus durans</i>		N19-11	<i>Enterococcus durans</i>	
N19-39	<i>Enterococcus durans</i>		N19-15	<i>Enterococcus durans</i>	
N17-04	<i>Enterococcus lactis</i>		N19-39	<i>Enterococcus durans</i>	
N19-30	<i>Enterococcus lactis</i>		N17-04	<i>Enterococcus lactis</i>	
N39-01	<i>Enterococcus lactis</i>		N39-01	<i>Enterococcus lactis</i>	
N48-10	<i>Lactobacillus crustorum</i>	outlier	N48-10	<i>Lactobacillus crustorum</i>	outlier

유산균의 항진균성 여부는 배양액에서의 *A. flavus* 균사체 무게와 아플라톡신 B1의 농도를 기준으로 판단하였다 (표 22). 항진균 그룹은 공통적으로 *W. paramesenteroides* 2 균주와 *P.*

pentosaceus 4 균주를 반드시 포함하였다. 대부분의 *Enterococcus* 속은 비항진균 그룹으로 분류되었으나 음이온 이온화 모드에서 일부 *Enterococcus* 속이 항진균 그룹으로 분류되었다. 이를 통해 대사체 프로파일은 종에 가장 큰 영향을 받으며, *W. paramesenteroides*와 *P. pentosaceus*의 배양액에 항진균성 물질이 있을 것으로 간주하였다. 따라서 유산균 균주를 항진균과 비항진균 그룹 2개로 지정하여 OPLS-DA를 진행하였고 OPLS-DA 모델의 타당성은 permutation test (n=200) 검증하였다.

표 34. 비표적 대사체와 항진균력을 기반으로 한 전통누룩 유래 유산균의 분류

Strain no.	Group	Hierarchical cluster analysis				Strain name	Mycelium weight (g)	AFB1 concentration (ng/mL)
		ESI(+) mode		ESI(-) mode				
		Single culture	Coculture	Single culture	Coculture			
N33-01	↑	antifungal	antifungal	antifungal	antifungal	<i>Weissella paramesenteroides</i>	0.0	6.6± 0.2 (2.4)
N44-02		antifungal	antifungal	antifungal	antifungal	<i>Weissella paramesenteroides</i>	0.0	5.0± 0.2 (3.8)
N17-02		antifungal	antifungal	antifungal	antifungal	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0.0	5.4± 0.8 (15.3)
N57-24	Antifungal	antifungal	antifungal	antifungal	antifungal	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0.0	2.5± 0.4 (14.7)
N57-15		antifungal	antifungal	antifungal	antifungal	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0.0	2.6± 0.3 (12.6)
N19-37		antifungal	antifungal	antifungal	antifungal	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0.0	10.8± 0.2 (2.3)
RL48-10	↓	antifungal	antifungal	outlier	outlier	<i>Lactobacillus crustorum</i>	0.0	2.2± 0.1 (3.3)
N19-32	↑			antifungal	antifungal	<i>Lactococcus taiwanensis</i>	2.56	2,038.7±31.4 (1.5)
N19-13		outlier		antifungal	antifungal	<i>Enterococcus gallinarum</i>	0.77	389.9±24.4 (6.3)
N19-14		outlier		antifungal	antifungal	<i>Enterococcus gallinarum</i>	0.51	1,050.1±64.2 (6.1)
N57-28				antifungal		<i>Enterococcus hirae</i>	0.03	17.3± 0.6 (3.4)
N39-01						<i>Enterococcus lactis</i>	0.19	202.2±14.2 (7.0)
N19-30						<i>Enterococcus lactis</i>	0.06	7.3± 0.3 (4.2)
N19-05	Non-					<i>Enterococcus durans</i>	0.03	8.2± 1.2 (14.6)
N17-03	antifungal	outlier	outlier			<i>Enterococcus durans</i>	0.04	7.6± 1.2 (15.3)
N19-04						<i>Enterococcus durans</i>	0.04	5.4± 0.4 (7.7)
N19-07						<i>Enterococcus durans</i>	0.15	62.6± 1.2 (2.0)
N17-04						<i>Enterococcus durans</i>	0.55	552.1±50.6 (9.2)
N17-05						<i>Enterococcus durans</i>	0.19	146.5± 4.9 (3.4)
N19-11						<i>Enterococcus durans</i>	0.20	249.8± 8.2 (3.3)
N19-16						<i>Enterococcus durans</i>	0.33	199.1± 0.1 (0.0)
N19-39						<i>Enterococcus durans</i>	0.36	258.6±26.0 (10.1)
N19-15	↓					<i>Enterococcus durans</i>	2.23	2,153.3±92.5 (4.3)

OPLS-DA의 loading plot, VIPpred, p(corr)를 고려하여 항진균 그룹의 특이적인 대사물질을 선택하였다 (표 23). 항진균 그룹에서 12개의 molecular feature가 선별되었고, National Institute of Technology (NIST) MS/MS 스펙트럼 라이브러리를 기반으로 15개 물질로 동정되었다. 표준물질을 구할 수 있는 13개 물질을 대상으로 유산균 단일 배양액과 *A. flavus*와의 공배양액에서의 존재를 확인하였다.

표 35. 항진균 유산균의 특이적 대사물질

No.	Molecular feature	No.	Library hit	Formula	분석방법
ESI (+) ion mode					
1	118.0860/0.65	1)	L-Valine	C5H11NO2	M1
		2)	3-Aminopentanoic acid	C5H11NO2	M1
		3)	Betaine	C5H11NO2	M1
2	123.0441 / 0.89	4)	4-Hydroxybenzaldehyde	C7H6O2	M4
3	136.0617/0.68	5)	Adenine	C5H5N5	M1
4	165.0548 / 0.89 [M+H] ⁺	6)	2,3-Dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-ol	C10H12O2	M1
		7)	trans-2-Hydroxycinnamic acid	C9H8O3	M2
5	182.0813 / 0.88 [M+NH4] ⁺	8)	L-Tyrosine	C9H11NO3	M1
6	330.0618 / 0.71	9)	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate	C10H12N5O6P	M1
		10)	Adenosine 2',3'-cyclic monophosphate	C10H12N5O6P	M1
7	419.3156 / 12.56 [M] ⁺	11)	Di(5-nonyl) phthalate*	C26H42O4	제외
ESI (-) ion mode					
8	132.0356 / 0.64	12)	Aspartic acid	C4H7NO4	M3
		13)	Iminodiacetic acid	C4H7NO4	M3
		14)	Thiazolidine-2-carboxylic acid *	C4H7NO2S	제외

9	180.0732 / 0.89	L-Tyrosine	C9H11NO3	M1
10	215.0403 / 0.64	15) DL-beta-Hydroxylauric acid	C12H24O3	M4
11	217.0373 / 0.64	No Match*		제외
12	367.1154 / 0.64	No Match*		제외

*분석에서 제외

○ 항진균 유산균의 대사체

-LC-MS 분석 조건: 대상물질의 분리도와 감도를 높이는 분석조건 (표 24, 표 25)을 사용하여 배양액에서의 함량을 분석하였고, 물질에 따른 분석 방법은 표 23에 표시하였다.

표 36. Quadrupole time of flight (QTOF) LC/MS 분석 조건

Method name		M1	M2			
HPLC						
Column	Waters ACQUITY BEH Amide (1.7µm, 2.1mm×100mm)		Agilent ZORBAX SB-Aq (4.6×150mm, 5µm)			
Oven temperature (°C)	35		30			
Flow rate (mL/min)	0.25		0.5			
Mobile phase A	95:5 water:acetonitrile with 2 mM ammonium acetate and 0.2% formic acid		Water with 0.1% formic acid			
Mobile phase B	90:10 acetonitrile:water with 2 mM ammonium acetate and 0.2% formic acid		Acetonitrile with 0.1% formic acid			
Gradient	RT (min)	A (%)	B (%)	RT (min)	A (%)	B (%)
	0	10	90	0	99	1
	0.5	10	90	0.5	99	1
	10	40	60	13	70	30
	11	95	5	14	99	1
	12	95	5			
	13	10	90			
Post time (min): 7			Post time (min): 5			
Source and Gas parameters						
Polarity	Positive			Negative		
Ion source gas 1 (psi)	50					
Ion source gas 2 (psi)	50					
Curtain gas	25					
CAD gas	7					
Temperature (°C)	550			450		
TOF MS parameters						
TOF mass range	100-1000					
Spray voltage (V)	5500			-4500		
DP	80			-80		
DP spread	0					
Collision energy (V)	10					
CE spread (V)	0					
IDA Criteria						
Small molecule						
Maximum candidate ions	20					
Intensity threshold exceeds (cps)	100					
TOF MS/MS parameters						
TOF mass range	50-1000					
DP (V)	40			-40		
DP spread	0					
Collision energy (V)	35			-35		
CE spread (V)	15					

표 37. Triple quadrupole (TQ) LC/MS 분석 조건

Method name		M3	M4
HPLC			
Column	Agilent Zorbax SB-Aq		InfinityLab Poroshell 120 EC-C18

	(4.6x150mm, 5 um)			(2.1 x 100mm, 2.7um)			
Oven temperature (°C)	30			30			
Flow rate (mL/min)	0.5			0.4			
Mobile phase A	Water with 0.1% formic acid			Water with 0.1% formic acid			
Mobile phase B	Acetonitrile with 0.1% formic acid			Acetonitrile with 0.1% formic acid			
Gradient	RT (min)	A (%)	B (%)	RT (min)	A (%)	B (%)	
	0	99	1	0	90	10	
	0.5	99	1	0.5	90	10	
	6	70	30	3	65	35	
	7	99	1	4	45	55	
				5	25	75	
				6	5	95	
				8	5	95	
				8.5	90	10	
	Post time (min): 5			Post time (min): 4.5			
Source and Gas parameters							
Polarity	Positive			Negative			
Ion source gas 1 (psi)				50			
Ion source gas 2 (psi)				50			
Curtain gas				30			
CAD gas				9			
Temperature (°C)				500			
MRM parameters							
Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Run time (min)	ID	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
4-Hydroxybenzaldehyde							
120.934	91.9	1.24	HBA 1	-60	-10	-32	-7
120.934	92.9	1.24	HBA 2	-60	-10	-28	-7
120.934	41.0	1.24	HBA 3	-60	-10	-50	-11
DL-beta-Hydroxylauric acid							
215.026	59.0	6.02	HLA 1	-75	-10	-18	-5
215.026	40.9	6.02	HLA 2	-75	-10	-58	-11
215.026	169.0	6.02	HLA 3	-75	-10	-22	-9
Aspartic acid							
133.999	74.0	3.050	Asp 1	21	10	21	4
133.999	88.0	3.050	Asp 2	21	10	15	8
133.999	116.0	3.050	Asp 3	21	10	11	8
Iminodiacetic acid							
133.984	60.1	3.177	IDA 1	41	10	21	4
133.984	42.1	3.177	IDA 2	41	10	37	12
133.984	73.0	3.177	IDA 3	41	10	25	8

-배양액에서 농도: 13개 물질 중 10개의 물질이 배양액에서 검출되었다 (표 26). Adenine, L-tyrosine, DL-β-hydroxylauric acid는 유산균 단일배양과 공배양시 항진균 그룹에서 함량이 높았고, 4-hydroxybenzaldehyde (4-HBA), adenosine 2',3'-cyclic monophosphate (2',3'-cAMP)는 *A. flavus*와 공배양시에 항진균 그룹에서 높았다. 이중 3-hydroxy fatty acids의 일종인 DL-β-hydroxylauric acid와 천마의 생리활성 물질로 알려진 4-HBA는 항진균력을 갖는 것으로 알려진 물질이다.

표 38. 유산균 배양액에서 동정 물질의 농도

Compound name	Library hit	Ionization mode	Precursor ion (m/z)	Retention time (min)	Concentration (ng/mL)			
					LAB single culture		Co-culture of LAB and <i>A. flavus</i>	
					Antifungal	Non-antifungal	Antifungal	Non-antifungal
118.0860 / 0.65	Betaine	[M+H] ⁺	118.0856	4.37	30,917.2±1,139.1	30,021.8±1,501.0	30,229.3±850.8	28,309.9±3,813.5
	L-Valine	[M+H] ⁺	118.0861	4.37	37,374.3±1,377.0	36,291.9±1,814.5	36,542.8±1,028.4	34,222.5±4,610.0
	3-Aminopentanoic acid	[M+H] ⁺	118.0858	4.36	55,966.7±2,088.3	54,325.1±2,751.8	54,705.7±1,559.7	51,186.8±6,991.3
123.0441 / 0.89	4-Hydroxybenzaldehyde	[M-H] ⁻	120.934	1.24	109.0±52.4	124.0±15.0	329.6±428.8*	63.4±22.7
132.0356 / 0.64	Aspartic acid	[M+H] ⁺	133.999	3.06	2079.7±106.7	2038.7±43.5	2161.5±125.8	2234.8±264.0
	Iminodiacetic acid	[M+H] ⁺	133.984	3.17	12.2±0.2	12.3±0.1	12.3±0.3*	12.8±0.6
136.0617 / 0.68	Adenine	[M+H] ⁺	136.0612	2.29	21,706.8±1,175.2*	16,021.5±2,547.8	21,010.2±906.2**	11,219.8± 3,615.2
182.0813 / 0.88	L-Tyrosine	[M+H] ⁺	182.0815	4.44	48,182.1±204.6*	3,386.5±11,896.9	46,666.4±5,807.4**	12,778.0±20,089.3
	[M+NH4] ⁺							
215.0403 / 0.64	DL-beta-Hydroxylauric	[M-H] ⁻	215.026	6.02	2.7±2.6*	0.5±0.3	1.1±1.1**	ND

acid							
330.0618 / 0.71	Adenosine 2',3'-cyclic monophosphate	[M+H] ⁺	330.0607 5.86	10,854.8±997.4	11,647.0±700.9	10,422.5±474.1**	2,342.1±3,818.0

Data are mean±SD.

ND, not detected.

* Significant according to t-test (p-value<0.05).

** Significant according to t-test (p-value<0.01).

유산균의 배양액에 proteinase K를 처리하여 유산균의 항진균력이 단백질성 물질에 기인하는 여부를 확인하였다. 이와 함께 유산균이 아플라톡신과 결합하는 능력이 있는지를 확인하였으며 결과는 표 27에 나타내었다.

표 39. 항진균 유산균의 *A. flavus*에 대한 항진균력

Strain name	Strain no.	Inhibition of AFB1 production (%)	inhibition of Mycelium growth (%)	AFB1 cell binding ability (%)
유산균 전배양액 (cell + supernatant)				
<i>Enterococcus gallinarum</i>	N19-13	40±24	3±5	8±3
<i>Enterococcus gallinarum</i>	N19-14	12±10	-	8±5
<i>Enterococcus hirae</i>	N57-28	48±7	-	7±3
<i>Lactobacillus crustorum</i>	RL48-10	66±13	-	12±2
<i>Lactococcus taiwanensis</i>	N19-32	22±10	-	14±3
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N17-02	79±6	9±1	8±2
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N19-37	84±2	14±1	11±3
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N57-15	72±0	13±4	11±3
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N57-24	74±7	24±3	9±3
<i>Weissella paramesenteroides</i>	N33-01	26±19	0±3	20±2
<i>Weissella paramesenteroides</i>	N44-02	41±3		18±2
Cell free supernatant (CFS) 군				
<i>Enterococcus gallinarum</i>	N19-13	44±37	15±34	-
<i>Enterococcus gallinarum</i>	N19-14			-
<i>Enterococcus hirae</i>	N57-28	63±15	33±22	-
<i>Lactobacillus crustorum</i>	RL48-10	61±1	2±17	-
<i>Lactococcus taiwanensis</i>	N19-32	-	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N17-02	38±10	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N19-37	34±7	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N57-15	34±7	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N57-24	15±21	-	-
<i>Weissella paramesenteroides</i>	N33-01	62±4	18±4	-
<i>Weissella paramesenteroides</i>	N44-02	46±3	8±3	-
Cell free supernatant (CFS) - Proteinase K 처리				
<i>Enterococcus gallinarum</i>	N19-13	42±5	34±4	-
<i>Enterococcus gallinarum</i>	N19-14	-	-	-
<i>Enterococcus hirae</i>	N57-28	14±6	-	-
<i>Lactobacillus crustorum</i>	RL48-10	23±9	-	-
<i>Lactococcus taiwanensis</i>	N19-32	13±5	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N17-02	9±9	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N19-37	13±15	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N57-15	-	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N57-24	-	-	-
<i>Weissella paramesenteroides</i>	N33-01	-	-	-
<i>Weissella paramesenteroides</i>	N44-02	29±16	-	-

Data are mean ± S.D. (CV, %) (n=5)

결론적으로 전통누룩 유래 항진균성 유산균은 아플라톡신 B1의 생성 억제, 균사체 생육 억제, 세포벽과 AFB1과의 결합을 통해 아플라톡신 함량을 감소하며, 균주에 따른 차이는 있지만 아플라톡신 B1 생성 억제력과 균사체 생육 억제력은 전반적으로 전배양 > CFS 군 > CFS-proteinase K 처리군 순으로 감소하였다. 또한 잠정적으로 DL-β-hydroxylauric acid와 4-hydroxybenzaldehyde, 기타 단백질성 항진균 대사체를 생성하는 것으로 간주하였다.

○ *Weissella paramesenteroides* N44-2 전장유전체

유산균의 항진균 기작은 균주에 따라 차이가 있으므로 전체 염기서열이 분석된 하나의 균주를 특징이여 *A. flavus*에 대한 항진균 활성을 분석하고자 하였다. 따라서 항진균 유산균 그룹 중 하나인 *W. paramesenteroides* N44-2 (이하 N44-2)를 선택하여 전장유전체를 분석하였다. N44-2는 하나의 원형 염색체와 두 개의 플라스미드를 포함하였다. N44-2의 유전체 지도는 그림 5에 나타내었다.

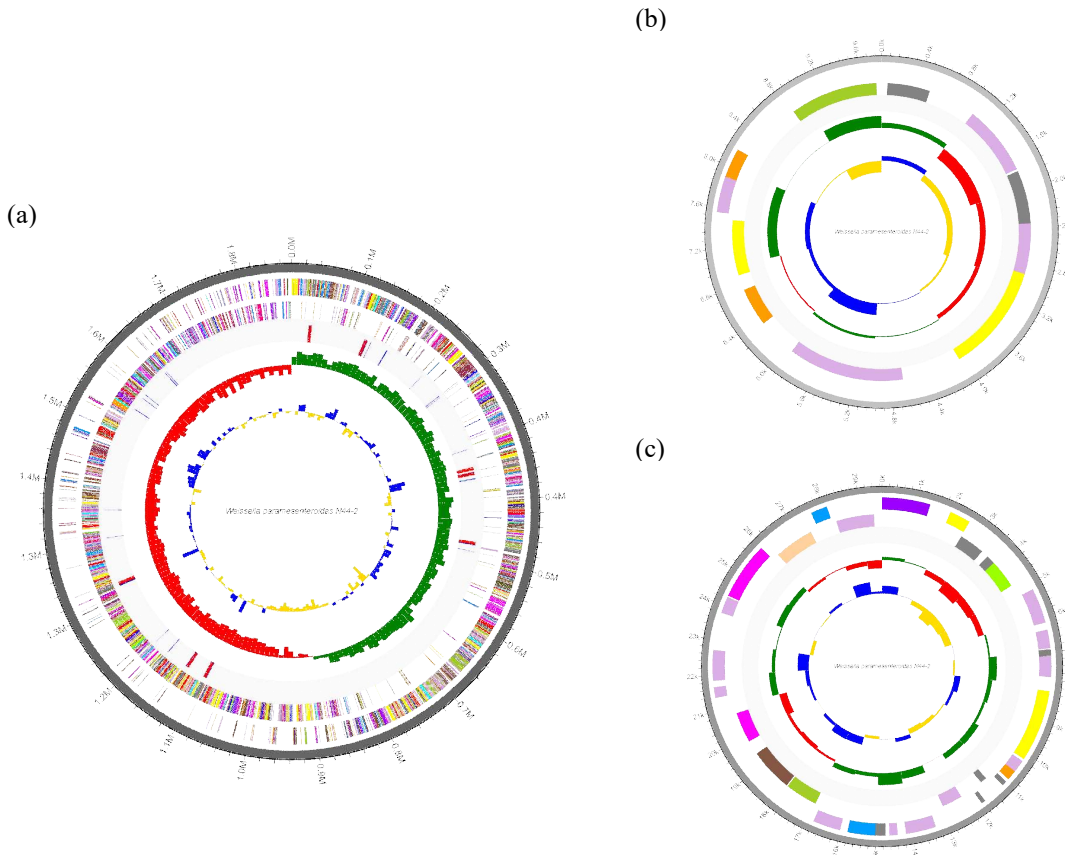


그림 30. *Weissella paramesenteroides* N44-2의 유전체 지도. contig 1 (a), 플라스미드 contig 2 (b)와 contig 3 (c).

원형 염색체의 크기는 1,867,668 bp이고 플라스미드 2개의 크기는 각각 29,666 bp와 9,816 bp이다. 염색체의 G+C 함량은 38.21%이고 플라스미드 2개의 G+C 함량은 이보다 다소 낮은 36.2%와 34.6%였다. 단백질이 암호화되어 있는 영역 (coding sequence, CDS)은 전체 유전자수 1,866개 중에서 94.5%인 1,764개로 확인되었다. tRNA가 암호화된 유전자는 77개이고 rRNA가 암호화된 유전자는 25개이다. TrueBac ID를 통해 N44-2는 antibiotic resistances genes을 포함하지 않는 것으로 확인되었다.

Clusters of Orthologous Group (COG)은 기능을 가진 homolog의 집합체이기에 진화적 관계를 연구하는데 유용하다. N44-2의 전체 유전자 중에서 COG로 확정된 유전자는 88.2%였으며 기능에 따라 20개 그룹으로 분류되었다. N44-2의 COG는 그림 6에 제시하였다. 기능이 밝혀지지 않은 유전자 (S그룹, Function unknown) 447개를 제외하고 탄수화물 대사에 관련된 유전자 (G그룹, Carbohydrate transport and metabolism)와 전사에 관련된 유전자 (J그룹, Translation, ribosomal structure and biogenesis)가 각각 146개와 140개로 비율이 가장 높았다.

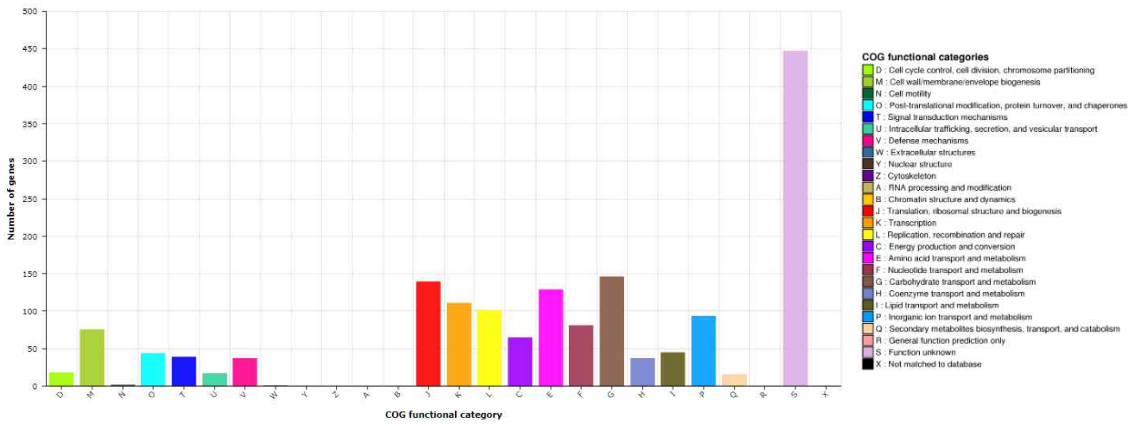


그림 31. *Weissella paramesenteroides* N44-2의 COG의 기능별 분류

N44-2와 유전적 유사성이 높은 4개의 균주와 유전체를 비교하였다. 그림 7에는 N44-2의 계통수를 제시하였다. N44-2와 유전적 거리가 가장 가까운 균주는 표준균주 *W. paramesenteroides* ATCC33313으로 NCBI에 전유전체가 등록된 유일한 *W. paramesenteroides*이다. 표준균주 ATCC33313 이외에 *W. thailandensis* KCTC3751, *W. jogaejeotgali* FOL01, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ATCC19254가 N44-2와 유사성이 높은 균주로 선택되었다.

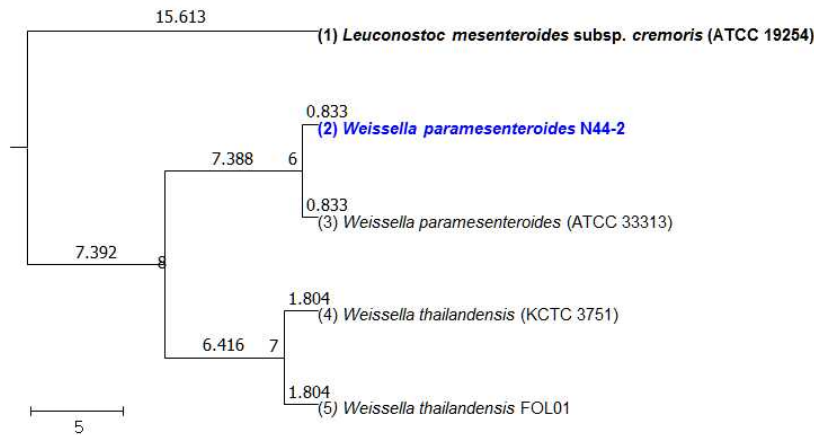


그림 32. *Weissella paramesenteroides* N44-2의 계통수 (OrthoANI Dendrogram)

그림 41에 나타난 5균주의 벤다이어그램을 통해서도 N44-2가 ATCC33313과 유사성이 가장 높음을 알 수 있다. 두 균주가 공통으로 공유하는 POG는 1,598개이며 N44-2는 147개의 개별 POG를 갖는다.

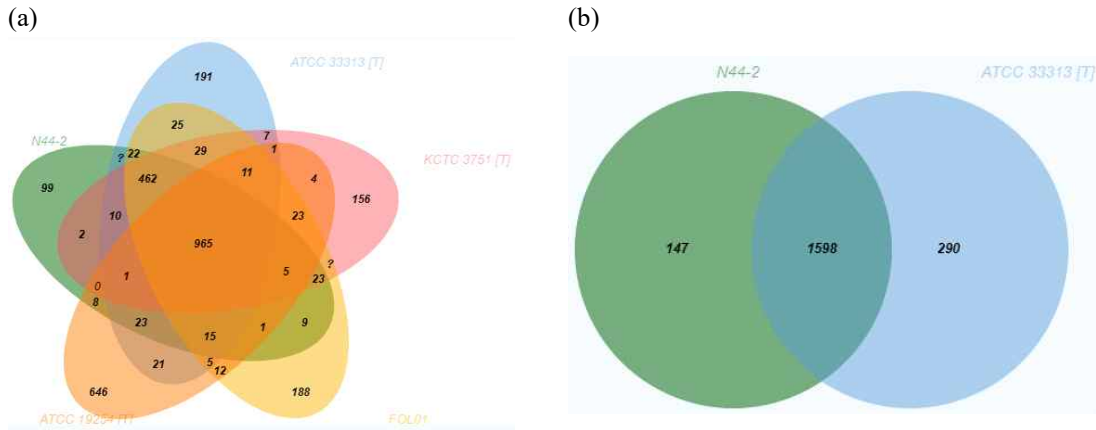


그림 33. *Weissella paramesenteroides* N44-2를 포함한 5균주 (a)와 N44-2와 ATCC33313의 벤다이어그램 (b)

그림 43에 제시한 Pariwise Ortholog matrix를 통해 5균주의 CDS 차이를 확인하였다. 파란색에 가까울수록 상동성이 높으며 ($\geq 99\%$) 빨간색과 가까울수록 상동성이 낮다 (no hit). N44-2와 표준균주 ATCC33313의 CDS는 원형체에서는 거의 유사하였으나 두 개의 플라스미드에서는 차이를 보였다. 향후 N44-2와 표준균주의 CDS 및 대사체 차이를 통해 *A. flavus* 균사체 생육 억제 및 아플라톡신 생성 억제에 기여하는 기능성 유전자 발굴 연구가 필요하다.

Contig #	COG/EggNog	Location	Gene	Product
1	L.COG9893	1, 1404		Chromosomal replication initiator protein DnaA
1	L.COG9892	1609, 2739	dnaN	DNA-directed DNA polymerase
1	S.COG2501	2937, 3170		uncharacterized protein
1	L.COG1195	3170, 4321		DNA replication and repair protein RecF
1	L.COG0197	4345, 6291	gyrB	DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing)
1	L.COG0198	6326, 8904	gyrA	DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing)
1		9020, 10435	pepDA, pepDB	Proteoblastic dipeptidase B
1	S.ENOG410XWV1	11133, 13903	fabG	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase
1		11954, 13036		Methionine import ATP-binding protein MetN
1		13026, 13700		Proteoblastic D-methionine transport system permease protein MetI
1		13747, 14610		D-methionine-binding lipoprotein MetQ
1	K.ENOG411201E	c(14672, 15175)		hypothetical protein
1	S.COG2409	15298, 17673		Membrane protein YtdJ
1	S.ENOG411HK7	17866, 19086		hypothetical protein
1		19252, 20220		hypothetical protein
1	S.ENOG41121PI	c(20298, 20744)	patB, malY	Cystathionine beta-lyase
1	M.COG1365	20867, 23074	ltaS	Phosphatidylglycerol-membrane-oligosaccharide glycerophosphotransferase
1	K.ENOG4111YEF	23295, 23765		hypothetical protein
1	L.COG1437	23836, 25201	mvaA	Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase
1	S.ENOG410YEQR	25218, 26166		hypothetical protein
1	K.COG0884	26178, 26879	npdA	NAD-dependent protein deacetylase
1	K.COG1848	c(32695, 33281)		Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YdgJ
1	J.COG30143	33517, 35520	MARS, metG	Methionine-RNA ligase
1		35614, 37563		Sodium, potassium, lithium and rubidium/H(+)-antiporter
1	L.COG0084	37731, 38540	tatD	3'-5' ssDNA/RNA exonuclease TatD
1	L.COG1855	38541, 39096	rnmV	Ribonuclease M5
1	J.COG30143	39098, 39994	ksgA	16S rRNA (adenine(1518)-N(6)/adenine(1519)-N(6))-dimethyltransferase
1		40045, 41421		UPF0053 protein
1		41513, 42871		UPF0053 protein YugS
1	S.COG4486	c(42627, 43160)		Protein Yag
1	F.COG4211	43497, 43960	comEB	dCMP deaminase
1	F.COG4201	43981, 44937	thyA, TYMS	Thymidylate synthase

그림 34. *Weissella paramesenteroides* N44-2의 비교유전체 결과

다. 숙취저감을 위한 아세트알데하이드 분해 고기능성 미생물균주 탐색 및 적응진화 기반 개량

(1) 고기능성 미생물 소재화를 위한 연구개발

전통누룩에서 분리한 유산균 중 고기능성 균주를 선발을 위하여 본 연구에서는 숙취 유발 물질 중에 하나인 아세트알데하이드를 저감화 가능성을 목표로하여 연구를 진행하였다. 체내 흡수되는 대부분의 알코올의 경우 간에서 해독되기 때문에 많은 간질환의 원인으로 알려져 있다. 1차적으로 알코올 대사에 관련하는 위에서는 alcohol dehydrogenase (ADH)의 활성이 낮다고 알려져 있으며 대부분 소장에서 알코올 흡수가 일어나게 된다. 소장환경에서 ADH의 경우 높은 알코올 농도에서 활성이 감소한다. 또한 acetaldehyde dehydrogenase (ALDH)의 활성 역시 높은 알코올 농도에서는 저해받는다고 알려져 있다. 특히 아세트알데하이드의 경우 환원력이 강하여 체내에서 독성물질로 작용한다.

아세트알데하이드의 간독성을 저감화하기 위해서 1차적으로 체내에서 흡수되는 곳인 위나 소장에서 아세트알데하이드의 산화를 통해 전환하여 독성을 줄이고자 하는 연구가 많이 이루어졌다. 효모에서 생산되는 글루타치온과 같은 항산화물질을 통해 알코올 대사에 도와주는 메커니즘으로 숙취해소제 제품이 개발되었다. 하지만 궁극적으로는 높은 알코올 조건에서 안정적으로 유지되는 ALDH의 활성이 중요하다. 외부에서 ALDH를 넣어주거나 recombinant ALDH를 생산하는 균주를 넣어 아세트알데하이드를 저감화하려는 시도들이 이루어졌지만 높은 가격과 GMO 이슈로 실제 적용되기 어렵다는 한계점들이 존재하였다.

본 연구에서는 알코올 및 아세트알데하이드가 존재하는 환경인 누룩에서 유산균을 확보하고 아세트알데하이드 분해 활성이 있는 균주를 선정하여 적응진화를 통해서 아세트알데하이드 분해능을 개량하여 고기능성 균주 확보 및 개량을 진행하였다 (그림 44).

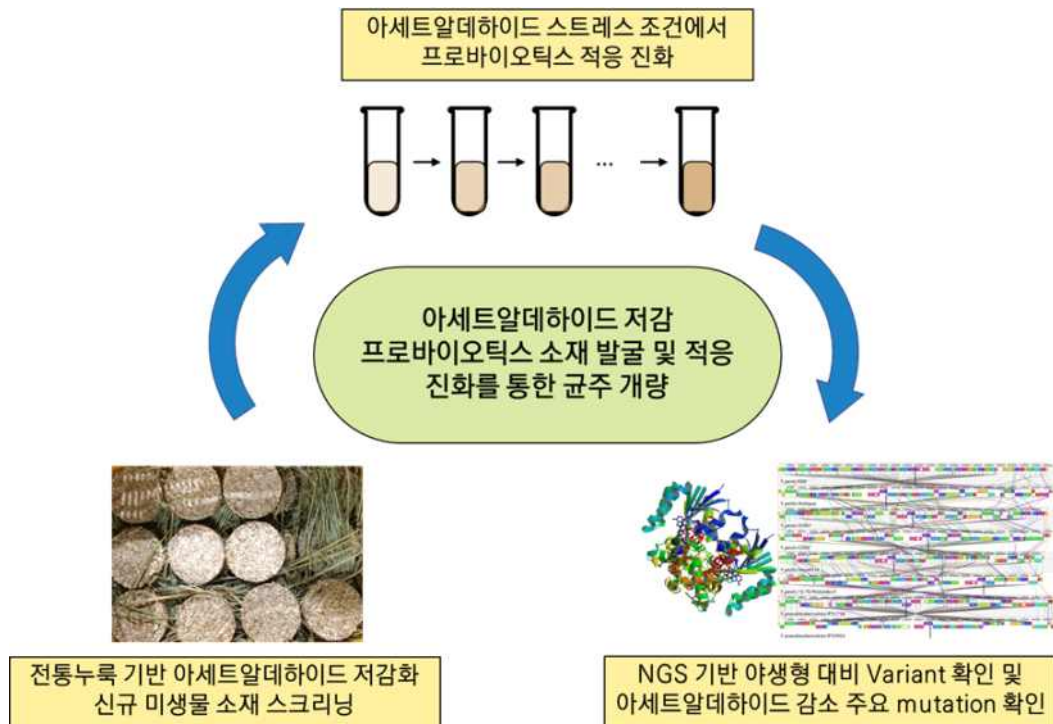


그림 35. 아세트알데하이드 저감 프로바이오틱스 개발 모식도

○ 전통누룩 유래 유산균 발굴

본 실험에서 1차 년도에 새롭게 발굴한 미생물 균주는 한국식품연구원에서 새롭게 누룩으로부터 분리한 균주를 사용 하였다. MRS agar를 이용하여 선택적으로 유산균만을 배양하였다. 누룩의 경우 오메기곡, 공병곡, 여곡 등을 포함한 17개의 누룩에서 24개의 유산균주를 확보하였다 (표 34).

표 40. 전통누룩에서 분리한 유산균 24 종

NO	Nuruk	Nuruk name	Strian identification	Strain	Strain	Similarity (%)
1	3	오메기곡	<i>Pediococcus acidilactici</i>	RL3-2	FJ905315.2	99
2	3	오메기곡	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RL3-11	KJ810576.1	99
4	6	공병곡	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RL6-2	LC035128.1	99
5	6	공병곡	<i>Pediococcus acidilactici</i>	RL6-4	AB598949.1	99
10	11	여곡	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RL11-1	KJ810576.1	99
14	48	진주곡자(금강밀)	<i>Lactobacillus rossiae</i>	RL48-1	JN680708.1	100
15	48	진주곡자(금강밀)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	RL48-2	KR153313.1	99
16	48	진주곡자(금강밀)	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RL48-4	KJ810576.1	99
17	48	진주곡자(금강밀)	<i>Lactobacillus crustorum</i>	RL48-10	AM285453.1	99
21	54	금정 산성누룩	<i>Pediococcus acidilactici</i>	RL54-1	KT982251.1	100
27	17	분곡	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N17-2	DSM20336(T)	-
28	18	병곡	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N18-1	SRCM100194	-
30	19	이화주곡	<i>Pediococcus acidilactici</i>	N19-2	BCC1	-
29	20	이화곡	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N20-1	SRCM100194	-
32	33	대주백타곡	<i>Weissella paramesenteroides</i>	N33-1	ATCC33313(T)	98.97
34	40	연화곡	<i>Lactobacillus curvatus</i>	LN40-E6-1	DSM20019	-
31	41	동양주곡	<i>Pediococcus acidilactici</i>	N41-1	DSM20284(T)	98.98
35	41	동양주곡	<i>Lactobacillus curvatus</i>	LN41-E6-1	DSM20019	-
33	44	신곡	<i>Weissella paramesenteroides</i>	N44-1	NRIC 0140	99
13-2	22	향온곡	<i>Weissella cibaria</i>	L22-2	AB362617.1	99
22-2	57	이가수불누룩	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RL57-5	KP119819.1	99
24-3	58	송명섭누룩	<i>Pediococcus acidilactici</i>	L58-3	EF059987.1	99
25-4	59	제주붉은보리누룩	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RL59-13	HG328247.1	99
25-5	59	제주붉은보리누룩	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	RL59-14	KJ810576.1	99

○ ALDH activity 활성 기반 아세트알데하이드 분해 능력 측정

아세트알데하이드의 분해능을 확인하기 위해 ALDH activity assay를 시행하였다. ALDH activity assay는 아세트알데하이드가 산화되면서 NAD⁺를 NADH로 환원하게 되는데 이 때 생성되는 NADH를 340nm 파장의 흡광도에서 측정하여 생성량을 확인하였다. 순수 분리한 유산균을 MRS broth 3 mL에 접종하여 37 °C에서 24시간 배양 후 새로운 MRS broth 배지 3 mL에 30 µL 씩 계대하여 24시간 배양을 진행하였다. 배양이 끝난 유산균의 경우 OD600에서 1이 되는 세포양을 취득하여 pH 7 Pophate buffered saline (PBS)에 2 회 세척한 뒤 aldehyde dehydrogenase activity assay kit (Cayman, USA)가 제공하는 분석법에 따라 진행하였다. 이 때 1 unit의 정의는 분당 37 °C에서 1nmol의 NADH를 생성할 때 효소의 양으로 정의 하였다.

총 24개의 미생물 중 분석결과 재현성 있게 배양되는 20개의 균주에 대해서 ALDH activity assay를 진행했으며 활성이 없는 균주와 0.1 Unit/mL의 활성을 나타내는 균주를 확인할 수 있었다.

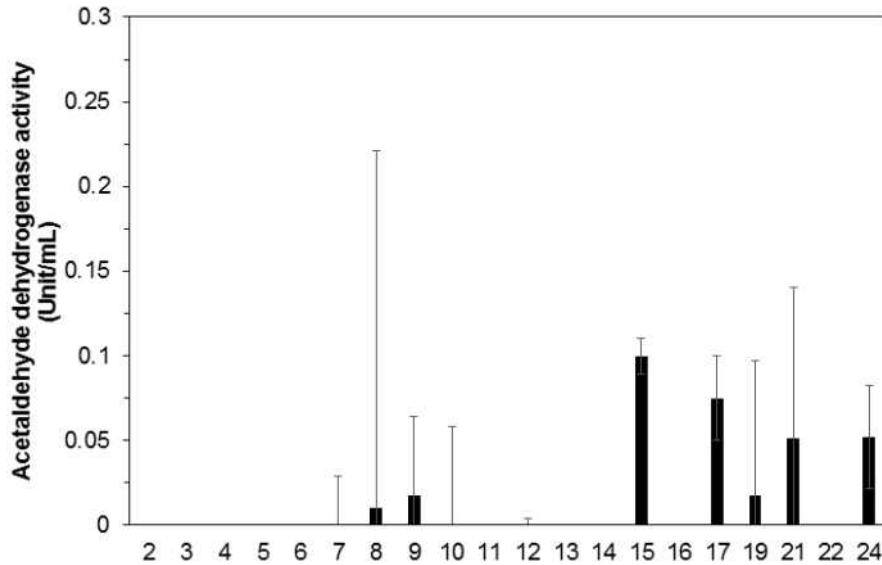


그림 36. 그림. 누룩에서 분리한 유산균의 Acetaldehyde dehydrogenase activity 활성 확인 결과

아세트알데하이드 분해 활성을 나타내는 균주 중 재현성있게 활성을 보여주는 유산균 중 2 균주인 RL6-4 (15), N19-2 (17) 균주를 선정하였다. 2 균주 모두 16S rRNA 시퀀싱 결과 *Pediococcus acidilactici*임을 확인하였다. *P. acidilactici*의 경우 50 °C의 높은 온도에서도 생존이 가능하다. 넓은 범위의 pH, 높은 농도의 염기 조건에서도 배양이 가능하기 때문에 장내 환경에서도 살아남는 프로바이오틱스 소재로 사용되고 있는 균주이다. 누룩을 비롯하여 전통발효 식품에서 발굴되는 유산균주 중에 하나이다.

○ 아세트알데하이드 배양조건에서 적응진화를 통한 균주개량

발굴한 유산균의 개량을 위해서 실험실 환경에서 적응진화 (Adaptive laboratory evolution)를 진행하였다. 실험실에서 장기간으로 아세트알데하이드가 존재하는 환경에 선발된 균주를 배양하였다. 이는 Non-GM 방식의 균주개량 방법으로 별도의 안전성심사를 받지 않고 원하는 Phenotype을 가질 수 있도록 유도할 수 있는 방법이다. 일반적인 Non-GM 방식의 균주개량은 다른 Chemical mutagenesis나 UV radiation 방법으로 library를 제작하여 아세트알데하이드를 전환하는 높은 활성의 미생물을 스크리닝하는 방식이다. 적응진화의 경우 일일이 colony를 배양하여 확인하는 일반적인 non-GM 방식보다 노동력이 적게 필요하기 때문에 유리하다. 최종 개량된 균주를 확보하였다 하더라도 Whole genome sequencing을 통해 특이적인 유전적인 변이가 기존 Non-GM 방식은 무작위적이기 때문에 규명하기 어렵지만 적응진화 방식의 균주 개량의 경우 일반적으로 무작위적인 library보다 더 적은 변이를 포함하기 때문에 중요한 유전적 변이를 효율적으로 확인할 수 있고 이를 기반으로 추후 균주개량에 적용할 수 있는 발판이 될 수 있다.

선발된 *P. acidilactici* 두 균주인 RL6-4, N19-2을 동시에 적응 진화를 시행하였다. 배양조건은 3 mL MRS broth 배지를 이용하여 37 °C에서 24시간 배양 후 새로운 MRS broth 배지에 계대배양을 진행하였다. 이때 아세트알데하이드 농도의 경우 세포 성장에 영향을 미치지 않는 조건인 3.3 mM에서 시작하여 세포 성장에 따라 단계적으로 아세트알데하이드 농도를 높여가면서 계대배양을 진행하였다. 140번째 계대배양을 진행한 뒤 Spot test를 통해 다양한 아세트알데하이드 농도에서 성장능력을 확인하였다 (그림 37).

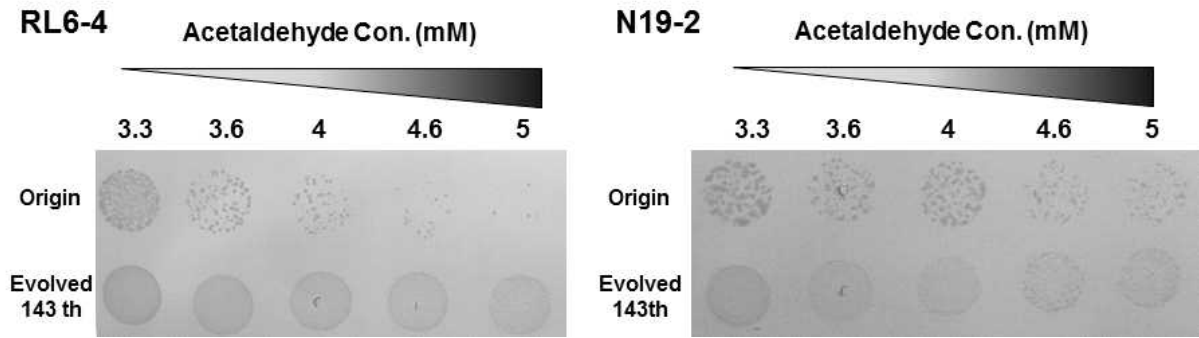


그림 37. 아세트알데하이드 농도에 따른 야생형과 적응진화된 균주의 Spot test

Spot test 결과에서 적응 진화된 두 균주 모두 시작한 Origin보다 아세트알데하이드에 대해서 증가된 저항력을 갖는 것을 확인하였다. 특히 RL6-4로부터 유래한 적응 진화된 균주는 야생형 대비 저항성이 더 크다는 것을 확인하였으며 N19-2 보다도 더 큰 성장능력을 확인할 수 있었다. 이후에 적응진화는 RL6-4 기반에서 진행하였다.

○ 적응 진화된 균주 확인

적응 진화 결과 총 200 번의 계대배양이 시행되었으며 이는 약 *P. acidilactici*의 약 6,000 Generation에 해당하는 수치이다. 이러한 장시간의 계대를 통해 RL6-4 균주의 아세트알데하이드의 분해능이 개량되는지를 확인하기 위하여 10 mM 의 아세트알데하이드 농도에서 각각 0, 20, 29, 56, 66, 86, 93, 146, 193, 200 계대에 해당하는 세포를 배양하였다. 실제 계대 배양동안 증가한 Biomass양을 확인한 결과 70회의 계대동안 세포 농도가 계속해서 증가했으며 그 이후 계대배양에서는 아세트알데하이드 10 mM 농도에서 크게 세포농도가 증가하지 않는 결과를 확인할 수 있었다 (그림 38). 하지만 최종 200th round에 해당하는 균주의 경우 50 mM 아세트알데하이드 농도에도 자랄 수 있는 것을 확인하였다.

숙취해소에 중요한 아세트알데하이드 전환능력도 확인한 결과 최종 계대를 한 샘플에서 가장 낮은 아세트 알데하이드 농도를 확인할 수 있었다.

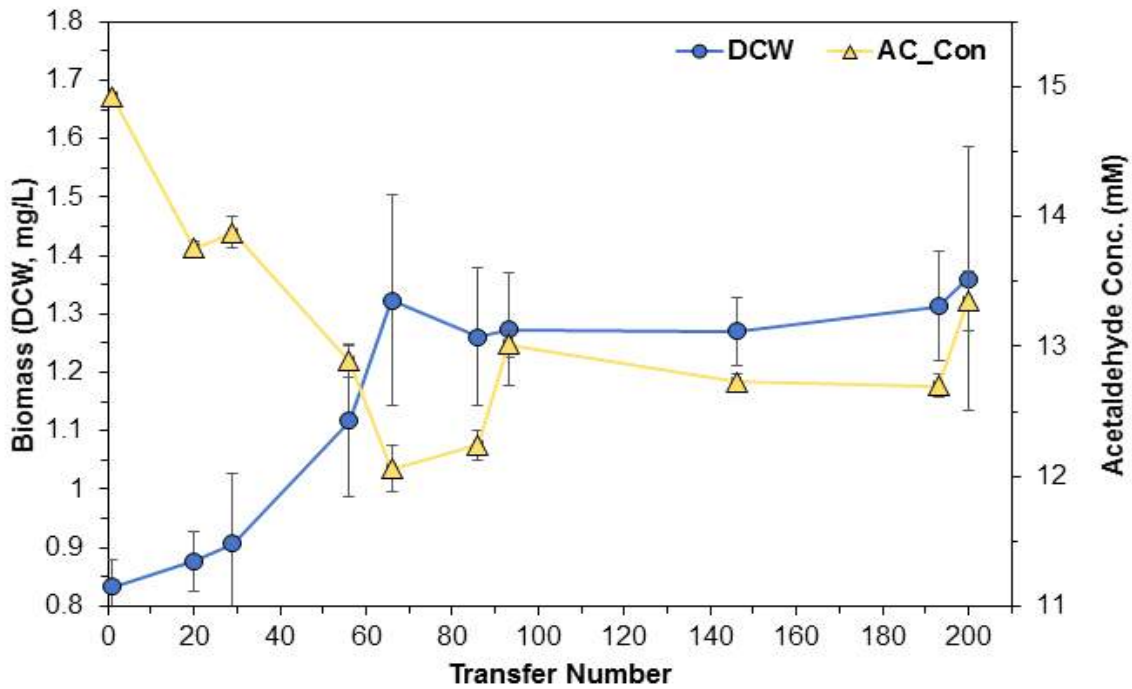


그림 38. 적응 진화 과정 동안 변화된 균주 바이오매스 양 및 아세트알데하이드 농도

계대를 통해 적응 진화한 균주 중 아세트알데하이드 조건에서 가장 높은 Biomass를 생산하는 균주인 ALE25를 최종균주로 선발하고 다양한 아세트알데하이드 농도에서 Biomass 양을 확인하였다 (그림 39).

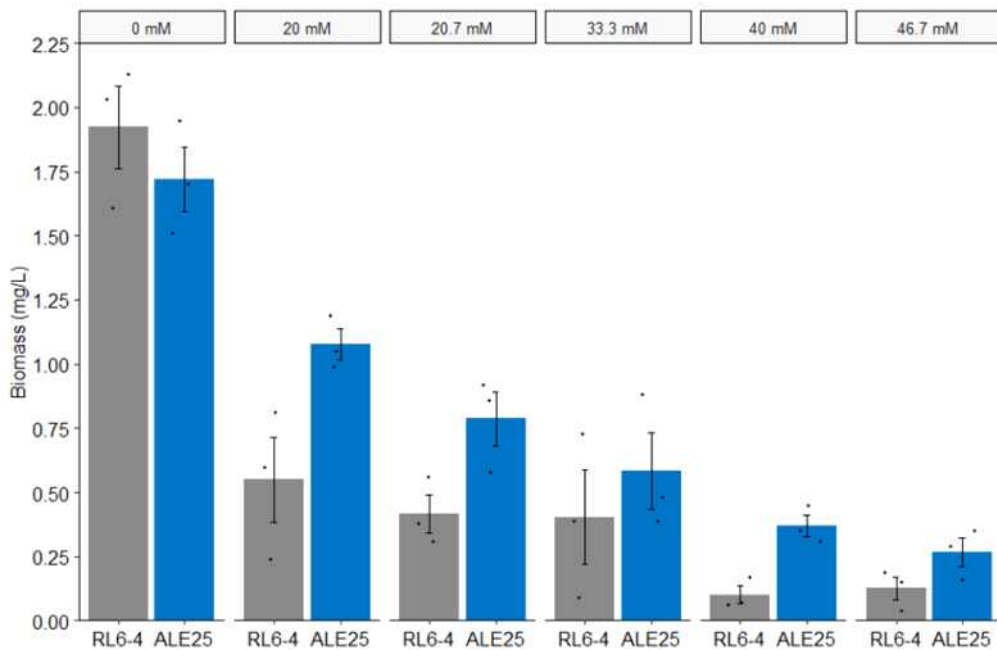


그림 39. 아세트알데하이드 농도에 따른 Origin (RL6-4)와 적응 진화된 ALE25 균주의 바이오매스 측정

특징으로는 아세트알데하이드가 없는 배양조건에서는 적응 진화 균주인 ALE25가 야생형 균주보다 약간 성장능력이 감소했지만 아세트알데하이드가 있는 조건에서는 성장능력이

높음을 확인할 수 있었다. 이는 적응 진화된 균주가 아세트알데하이드가 없는 환경에서는 야생형보다 Growth rate가 낮아 불리하지만 아세트알데하이드 있는 조건에서는 적응 진화에서 발생한 mutation이 growth에 유리하게 작용함을 유추할 수 있다.

실제로 아세트알데하이드를 감소하는 지를 확인하기 위하여 배양액에 남아있는 아세트알데하이드 양을 정확히 GC로 측정하였다. 그 결과 배양액에 있는 아세트알데하이드를 ALE25가 RL6-4 보다 더 많이 분해하는 것을 확인하였다.

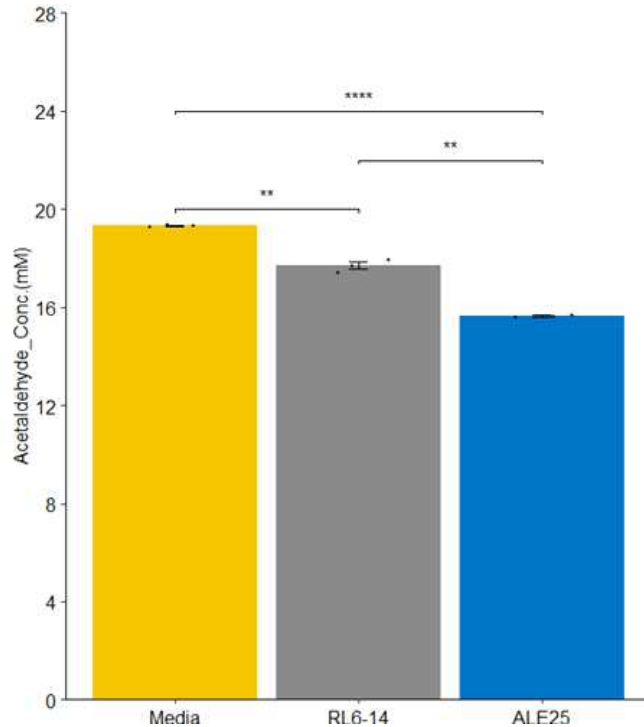


그림 40. 배양액에 존재하는 아세트알데하이드 양 측정

○ RL6-4와 ALE25의 Whole Genome Resequencing 분석

적응 진화된 균주와 RL6-4의 Genome 상에서의 variant를 확인하기 위하여 Whole Genome Resequencing을 진행하였다. Genome preparation 및 Raw data 생산은 테라젠이텍스에서 수행하였다. Reference genome data의 경우 NCBI에 등록되어 있는 *P. acidilactici* (NZ_CP015206.1, 1.98 Mb) 데이터를 이용하여 본 실험에서 생산한 NGS data를 mapping 하였다. RL6-4와 ALE25의 생산된 data는 각각 3.50 Gb, 2.96 Gb로 데이터 QC 이후 평균 Depth가 1293.76, 1121.57이 되는 결과였다.

Variant calling 결과 총 17 개의 variant를 확인하였고 이 중 단백질을 coding하고 있는 amino acid의 변화를 나타내는 것은 14개였다. 제일 주요하게 역할을 하는 것으로 예상되는 유전자는 총 3가지로 Transcription factor를 coding하는 A4V11_RS03705, SDR family oxidoreductase를 coding하는 A4V11_RS05970, Cell wall metabolism sensor histidine kinase Walk를 coding하는 A4V11_RS06570이다. 나머지 variant 위치에 대해서도 확인이 필요하겠지만 직접적으로 아세트알데하이드를 전환하는 산화환원 효소, 그리고 다양한 유전자들의 Transcription에 영향을 미치는 Transcription factor 및 signal transduction 단백질을 중점적으로 조사하였다.

POS	QUAL	DP	EFF[*].EFFECT	EFF[*].IMPACT	EFF[*].CODON	EFF[*].AA	Gene_Symbol	Protein_DESC
232329	38854.4 2	2000	missense_variant	MODERATE	c.299G>T	p.Gly100Val	A4V11_RS01105	thiamine diphosphokinase
271706	29307.4 2	1768	missense_variant	MODERATE	c.17T>C	p.Met6Thr	A4V11_RS01330	30S ribosomal protein S2
532994	12.66	2	synonymous_variant	LOW	c.555A>C	p.Ala185Ala	A4V11_RS02540	DUF1211 domain-containing protein
638536	30498.4 2	1802	stop_gained	HIGH	c.118C>T	p.Gln40*	A4V11_RS03065	S1 RNA-binding domain-containing protein
729836	37635.4 2	2000	missense_variant	MODERATE	c.150G>A	p.Met50Ile	A4V11_RS03505	methionine ABC transporter ATP-binding protein
767181	38254.4 2	2000	missense_variant	MODERATE	c.644A>G	p.Glu215Gly	A4V11_RS03705	response regulator transcription factor
911340	38752.4 2	2000	missense_variant	MODERATE	c.230C>A	p.Ala77Asp	A4V11_RS04470	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L18
920185	38671.4 2	2000	synonymous_variant	LOW	c.1380G>A	p.Leu460Leu	A4V11_RS04555	elongation factor G
951863	39062.4 2	2000	missense_variant	MODERATE	c.313C>A	p.Arg105Ser	A4V11_RS04705	hypothetical protein
982492	38334.4 2	2000	synonymous_variant	LOW	c.561C>A	p.Ile187Ile	A4V11_RS04860	class 1b ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta
1026554	38735.4 2	2000	missense_variant	MODERATE	c.1302C>A	p.Phe434Leu	A4V11_RS05090	peptide MFS transporter
1167886	37859.4 2	1991	missense_variant	MODERATE	c.488A>T	p.Asn163Ile	A4V11_RS05720	EamA family transporter
1219998	38382.4 2	2000	missense_variant	MODERATE	c.817A>C	p.Thr273Pro	A4V11_RS05970	SDR family oxidoreductase
1351259	38237.4 2	2000	missense_variant	MODERATE	c.1201G>A	p.Glu401Lys	A4V11_RS06570	cell wall metabolism sensor histidine kinase WalK
1397607	37595.4 2	2000	synonymous_variant	LOW	c.708C>T	p.Pro236Pro	A4V11_RS06805	purine permease
1418608	38939.4 2	2000	missense_variant	MODERATE	c.784G>A	p.Ala262Thr	A4V11_RS06900	DNA polymerase III subunit beta
1988017	289.43	742	missense_variant	MODERATE	c.926G>A	p.Gly309Glu		

표 41. Whole Genome resequencing 분석 결과

○ 구조 예측을 통한 SDR family oxidoreductase variant 확인

아세트알데하이드를 아세트산으로 전환하는 것은 산화환원 반응이다. 생명체에서 산화환원 반응은 필수적이기 때문에 Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR)은 다양한 효소가 존재하고 또한 유전학적으로 오래동안 보존된 효소이기도 하다. Cofactor로는 NAD+나 NADP+를 사용하여 알코올이나 알데하이드를 비롯한 다양한 물질을 산화하여 NADH, NADPH를 환원시키는 효소이다. P. acidilactici에도 ALDH를 비롯한 다양한 효소가 존재하지만 적응 진화의 결과로 확인된 변이는 A4V11_RS05970 SDR family oxidoreductase에 Thr273Pro 였다. A4V11_RS05970를 구조를 분석하기 위해서 SWISS-MODEL를 이용하여 protein modeling을 진행하였다.

SWISS-MODEL의 경우 단백질 서열이 유사도로 먼저 후보군을 선별하고 protein modeling을 통해 구조가 밝혀지지 않은 단백질 구조를 예측하는 프로그램이다. 선별결과 Citrobacter sp. strain KCTC 18061P에 존재하는 Triphenylmethane reductase와 유사하여 이를 기반으로 모델링을 진행하였다. N-terminal region은 NAD(P)H 결합에 관여하는 부분이고 C-terminal 부분은 Substrate binding에 역할을 한다고 알려져 있다 (그림). NADH binding 부분인 cofactor binding domain과 substrate binding domain 부분인 catalytic domain을 예측할 수 있었다.

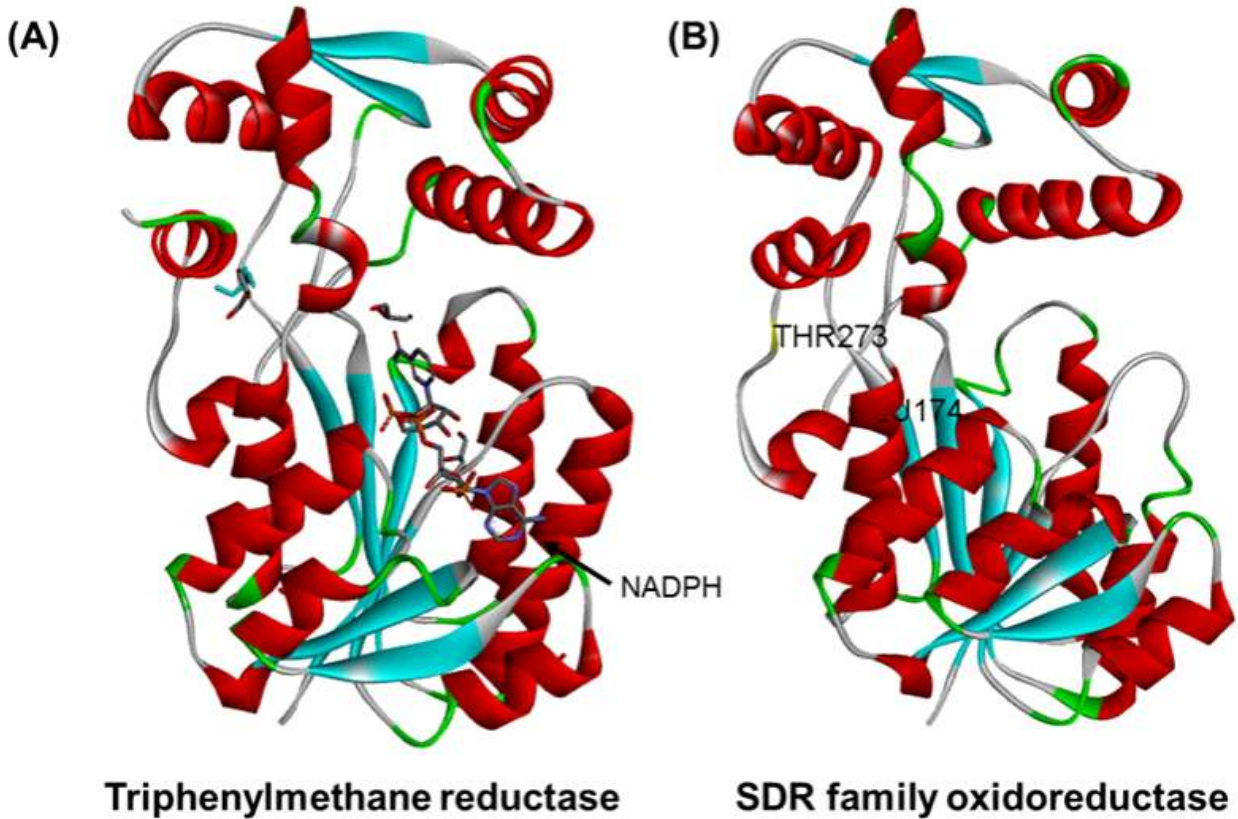


그림 41. 그림. SDR family oxidoreductase 구조 예측 결과 (A) SWISS-MODEL Template로 사용된 Triphenylmethane reductase (B) *P. acidilactici*의 SDR family oxidoreductase 구조예측 결과

Mutation 위치는 C-terminal 부분으로 Substrate 결합과 관련되어 영향을 준 것으로 예측할 수 있었다. Proline의 경우 일반적으로 단백질 구조에 큰 영향을 주는 아미노산으로 알려져 있다. 단백질의 rigidity에 영향을 주기 때문에 conformation 변화를 주게 된다. Proline으로 변화하였을 때 molecular dynamics를 확인하지 못하였지만 단순한 Substitution을 진행하였을 때도 단백질 구조에 주는 영향을 확인하였다 (그림 41).

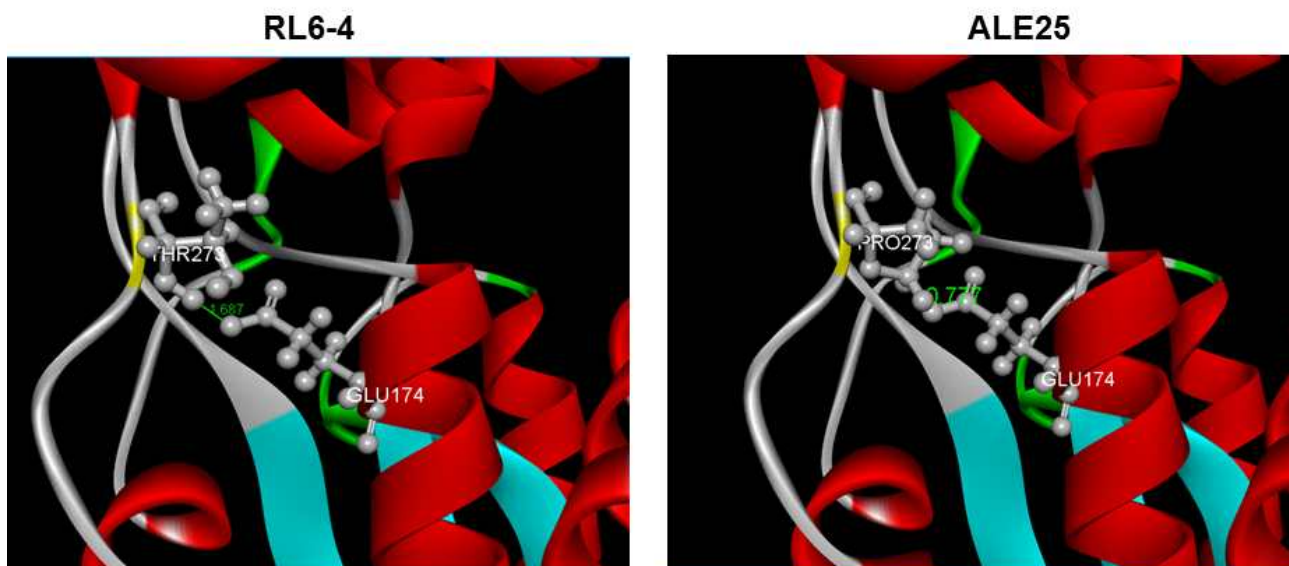


그림 42. 적응 진화의 결과로 A4V11_RS05970의 Mutation 확인

273위치의 아미노산과 가장 가까운 위치인 Glu174와 아미노산 간의 길이를 측정 한 결과 기존 1.687 Å에서 0.777 Å으로 변화가 되었다는 것을 확인할 수 있었다. 이로인하여 단백질 구조에 큰 영향을 주는 것으로 예상할 수 있었다. 이러한 Mutation이 실제로 아세트알데하이드에 대한 활성에 주는 영향을 확인하기 위해서는 forward mutation과 backward mutation를 통해 변화를 확인하고자 단백질 characterization을 진행하였다.

○ **재조합 oxidoreductase의 발현**

야생형의 RS05970과 개량형의 RS05970_T273P의 효소 활성을 비교하기 위하여 대장균에 유전자를 클로닝하여 발현을 시도하였다. *P. acidilactici* RL6-4와 *P. acidilactici* ALE25의 RS05970을 PCR을 통해 증폭하여 NdeI과 NotI의 제한효소를 이용하여 같은 제한효소로 처리한 pET21a 벡터에 삽입하여 재조합 DNA가 들어간 플라스미드를 완성하였다. 완성된 벡터를 야생형, 개량형 각각 pET21a_5970W, pET21a_5970M으로 명칭하고 BL21(DE3)에 형질전환을 시도하였다. 형질전환된 대장균을 LB 배지를 이용하여 37 oC 200 rpm 조건에서 배양 후 세포내 단백질을 확인하였다.

배양액 500 mL을 13000 rpm 조건에서 원심 분리 한 뒤, 50 mL 칼럼 버퍼(50mM NaH₂PO₄, pH 8.0; 0.3M NaCl)에 현탁을 진행하였다. 현탁액을 초음파 파쇄기를 통해서 세포를 용해시켰다. 그 뒤 15 분 동안 13000 rpm에서 원심분리를 한 후에, 상등액을 1 mL Ni-NTA 중력 칼럼에 통과시켰다. 상기 칼럼은 중력으로 내려가게 하고 10 mL 세척 버퍼(50mM NaH₂PO₄, pH 8.0; 0.3 M NaCl; 20 mM Imidazole)을 이용하여 세척을 진행하였다. 그 뒤 2 mL 추출 버퍼(50mM NaH₂PO₄, pH 8.0; 0.3M NaCl; 250 mM Imidazole)을 이용해서 추출을 진행하였다. 각 단계에서 얻어진 분획은 12 % Tris-글라이신 젤을 사용한 SDS-PAGE를 통해 분석 되었고 단백질 농도는 Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 측정하였다.

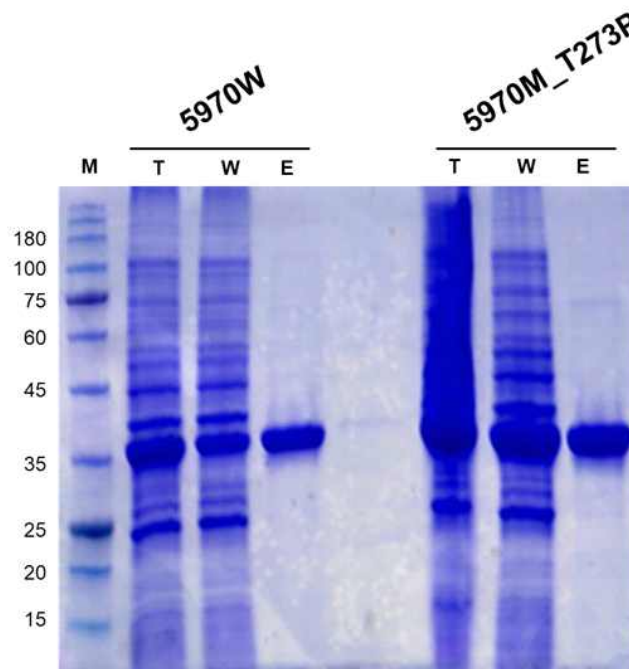


그림 43. 그림. SDR family oxidoreductase 발현 및 정제 결과 M: protein size marker, T: Total fraction, W: Wash fraction, E: Elution fraction

SDS-PAGE 분석 결과 원하는 단백질 크기인 (31 kDa)에 SDR-family oxidoreductase가

잘 정제됨을 확인 할 수 있었다. 정제한 단백질을 각각 2 mg/L 농도로 조절한 후 Acetaldehyde dehydrogenase activity를 측정하였다. NAD⁺를 Substrate로 사용하여 NADH가 생성되기 때문에 감소되는 NAD⁺의 농도를 340 nm에서 측정하는 방식으로 측정하였다. 아세트알데하이드는 0.25 mM부터 20 mM까지를 사용하였으며 버퍼는 50 mM pH 7.0 Tris-HCl를 사용하였다. 온도는 30 °C에서 반응하였다.

	K_m (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
5970W	2432 \pm 294	1.24 \pm 0.09	509.8684
5970W_T273P	1476 \pm 185	1.36 \pm 0.08	921.4092

효소 활성평가 결과 개량된 효소인 5970W_T273P가 기존 야생형인 5970W보다 catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) 값이 1.8 배 높아진 값을 보여주는 것을 확인할 수 있었다. 이는 ALE25 균주의 개선된 아세트알데하이드 분해능이 상기 효소의 영향으로 개선이 된 것으로 예상된다.

○ Transcription regulator variant의 영향

적응진화의 결과로 SDR family oxidoreductase 다음으로 주요한 variant로 고려할 수 있는 부분이 세포의 다양한 pathway의 transcription level을 조절하는 A4V11_RS03705와 A4V11_RS06570를 고려할 수 있다.

A4V11_RS03705의 경우 일반적으로 알려진 Transcription factor인 OmpR family에 속하는 단백질이다. OmpR의 경우 세포의 다양한 Stress와 관련된 단백질들을 activation한다고 알려진 단백질이다. 아세트알데하이드라는 스트레스 조건에서 생존에 유리하도록 변화된 OmpR에 생긴 missense 변이기 때문에 중요한 SNP라고 생각할 수 있다. A4V11_RS06570 역시 세포벽에 존재하는 histidine kinase 중에 하나로 다양한 유전자들을 activation을 하는 단백질로 보고되었기 때문에 아세트알데하이드에 대해서 다양한 유전자를 조절할 수 있기 때문에 생존에 유리하도록 역할 할 수 있을 것으로 예상된다.

라. 숙취저감을 위한 아세트알데하이드 분해 고기능성 효모균주 탐색 및 적응진화 기반 개량

○ 전통누룩 유래 아세트알데하이드 저감화 효모 균주 발굴

전통누룩에서 존재하는 미생물 자원 뿐 만아니라 다양한 효모자원이 존재하기 때문에 효모를 소재화기 위해 다양한 효모들의 아세트알데하이드 분해능을 측정하고 적응진화를 시도 하였다. 전통누룩 61종에서 누룩분말 1g을 0.85% 멸균 생리식염수에 넣어 완전히 혼합하였다. 실온에서 1시간 방치 후 106까지 연속적으로 10진 희석 하였다. YD 배지 (Difco, USA) 아가 평판 배지에 도말하여 25 °C에서 1 내지 2일간 배양하였고 나타난 콜로니에서 식용 및 양조에 적합한 사카로미세스 속 효모 236 종을 1차 선별하여 콜로니를 확보하였다. 상기 확보된 각 콜로니를 이용하여 아세트알데하이드 분해능을 확인하였다. 아세트알데하이드 분해능은 Aldehyde Dehydrogenase Activity assay kit (700800, Caymanchem, USA)를 이용하여 제조사 제공하는 분석 방법을 이용하여 측정하였다.

구체적으로, 100 μ L의 배양액을 원심분리기 13000 rpm 조건 에서 10분 동안 원심분리한 뒤 배양액을 HEPES 버퍼 (500 mM, pH 8.0) 1 mL에 현탁하였다. 96 Well plate에 150 μ L의 세포 현탁액을 넣었고 10 μ L NAD⁺를 넣어서 NADH로 환원될 수 있도록 37°C에서 15 분간 반응시켰다. 그 뒤 ALDH enzyme mixture를 넣고 585 nm에서 형광을 측정하였다.

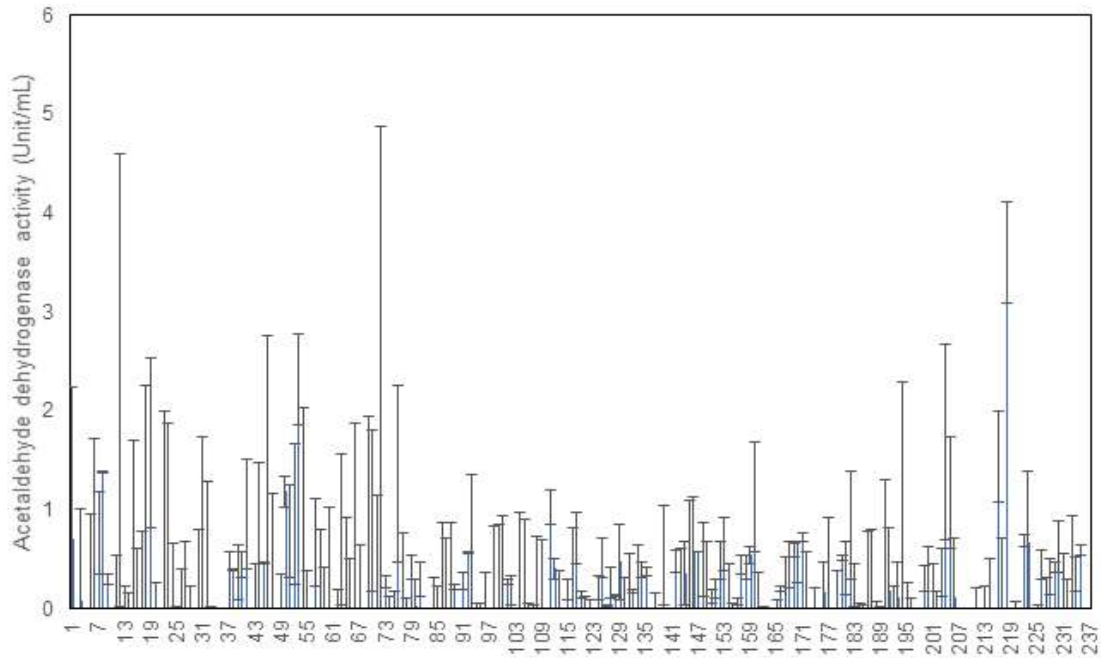


그림 44. 전통누룩 유래 236 종 효모의 Acetaldehyde dehydrogenase 활성측정

상기 결과는 사카로미세스 속 효모 236 종에 대하여, 아세트알데하이드 디하이드로게네이스 활성 측정 결과를 나타낸 결과이다. 도 1의 결과로부터 아세트알데하이드 효소 활성 측정법의 한계로 편차 큰 균주들을 제외하고 일정한 활성을 보여주는 균주 아세트알데하이드 분해능 1.5 U/mL 이상인 19번과 218번 균주 총 2 종의 사카로미세스속 균주를 선택하였다.

○ 아세트알데하이드에 대한 적응진화를 통한 변이주 제조

적응진화는 30 °C 조건에서 배양액 40 μL를 취하여 YPD media (BD, USA) 3 mL에 희석하고 2 mM 아세트알데하이드 농도가 되도록 하고 농도를 늘려가면서 200회까지 계대배양을 진행하였다.

아세트알데하이드가 존재하는 환경에서 가장 높은 활성을 보여주는 적응진화된 변이주를 확인하고자 YPD 액체 배지에 아세트알데하이드 농도가 20 mM이 되도록 첨가하고, 실험에 1에서 선별된 5종의 야생형 균주를 접종하여 30 °C에서 24 시간 배양 후, 건조 균체량 및 배양 후 감소된 아세트알데하이드 양을 측정하였다.

도 2에는 218번 균주인 야생형 ReY57-2 균주의 계대배양 횟수에 따른 건조 균체량 및 아세트알데하이드 농도 변화를 나타낸 그래프이다.

상기 적응진화가 진행되는 총 200번의 계대배양은 사카로미세스속 효모의 약 6,000세대에 해당하는 수치이다. 이러한 장기간의 계대배양을 통해 건조 균체량 및 아세트알데하이드 농도 변화를 확인한 결과 70 회의 계대동안 세포 농도가 증가하다가 그 이상에서는 균체량이 더 이상 증가하지 않았고, 아세트알데하이드 농도로 확인되는 아세트알데하이드의 저감 효과도 더 이상 증가하지 않았다.

따라서 야생형의 19번 및 218번 균주를 아세트알데하이드 함유 배지에서 약 160회 이상 계대배양하여 적응진화시킨 사카로미세스속 변이주를 각각 EVOY-2, EVOY-13, EVOY-17, EVOY-21, EVOY-38 및 EVOY-49 균주로 명명하였다.

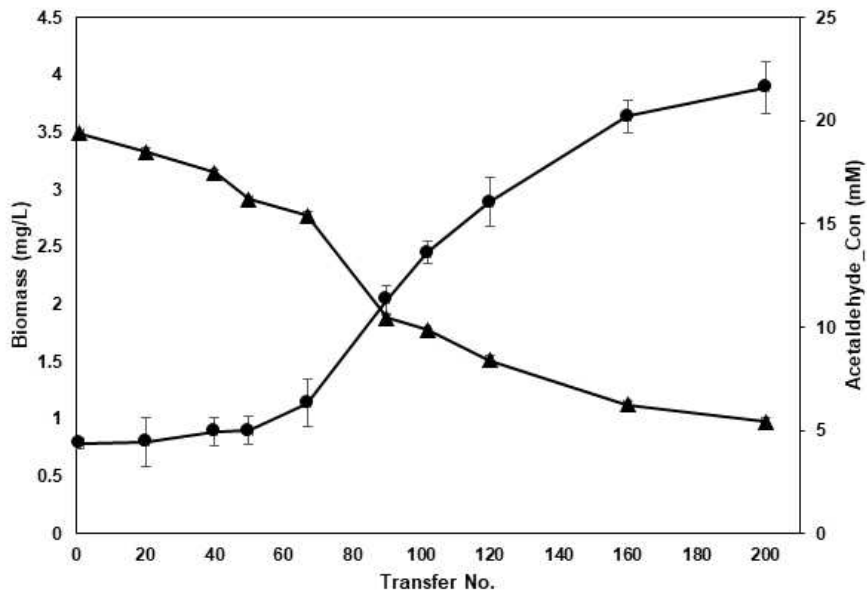


그림 45. 대배양하면서 건조 균체량 및 아세트알데하이드 농도 변화를 확인 결과

제조된 사카로미세스속 변이주인 EVOY-2, EVOY-13, EVOY-17, EVOY-21, EVOY-38 및 EVOY-49 균주, 상기 EVOY-38 균주의 야생형인 ReY57-2 균주를 대조군으로 아세트알데하이드 20 mM 함유 배지에서 30 °C에서 24 시간 배양 후 건조 균체량을 나타내었다.

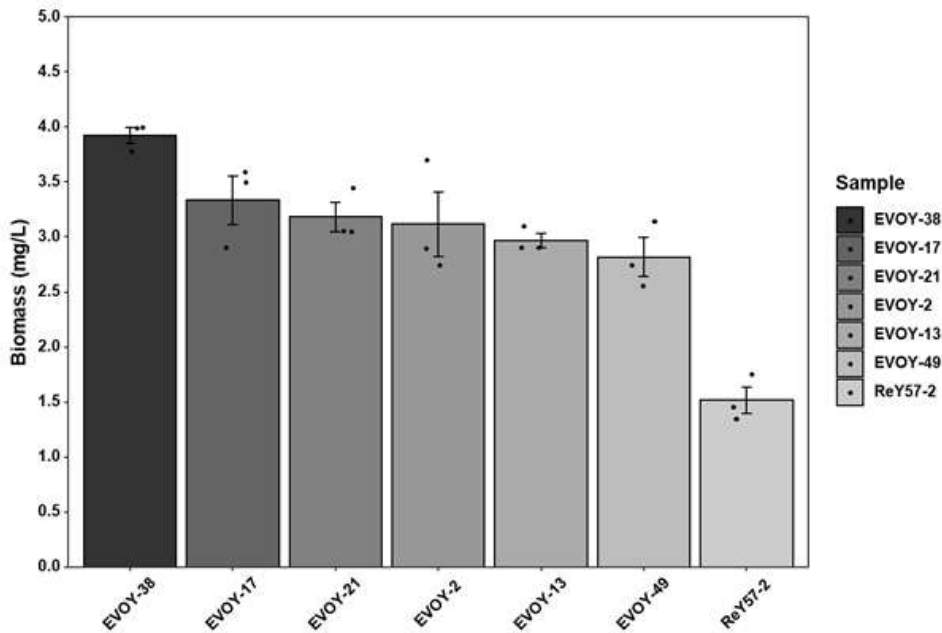


그림 46. 그림. 아세트알데하이드 함유 배지에서 적응진화시킨 변이주 6 종 및 야생형 1종에 대해서, 아세트알데하이드 20 mM 함유 배지에서의 배양한 후의 건조 균체량을 비교한 그래프

대조군으로 사용된 야생형의 ReY57-2 균주는 1.51 ± 0.21 mg/L를 보여 주었으나 적응진화된 변이주들은 EVOY-38은 2.85 내지 3.92 mg/L의 건조 균체량을 나타내어 적응진화된 변이주들은 바이오매스가 2 배 정도 증가함을 확인할 수 있었고, 특히 EVOY-38 균주는 3.92 ± 0.12 mg/L로서, 야생형의 ReY57-2 균주에 비해 바이오매스가 2.6배 증가하였다.

한편 아세트알데하이드를 분해하는 정도를 확인하기 위하여 20 mM의 아세트알데하이드 농도인 배지에 존재하는 아세트알데하이드 양을 측정하였다.

먼저, 저온냉동고에 보관되어있던 EVOY-2, EVOY-13, EVOY-17, EVOY-21, EVOY-38 및 EVOY-49 균주, 상기 EVOY-38 균주를 YPD media 5 mL 이 담겨있는 50 mL 코니컬튜브에 30 °C 200 rpm 진탕 배양기에서에서 24 시간 배양 후, 신선한 YPD media 20 mL 이 담겨진 50 mL 삼각플라스크에 1/100 농도가 되도록 계대를 진행하고 20 mM 아세트알데하이드 농도가 되도록 아세트알데하이드를 넣고, 30 °C 200 rpm shaking incubator에서 24 시간 배양을 진행하였다. 배양 이후, 상등액에 대하여 아세트알데하이드를 측정하기 위해서 식품공전 제8.6.7.1.2 메탄올 나. 가스크로마토그래프법 및 2013년에 발간된 식품의약품안전평가원 보고서 중 GC-FID 분석법을 응용하여 아세트알데하이드 기기분석을 진행하였다. GC column의 경우 HP-FFAP (30 m x 0.32 mm I.D., 0.25 µm)을 이용하였으며 Detector는 FID를 사용하였다.

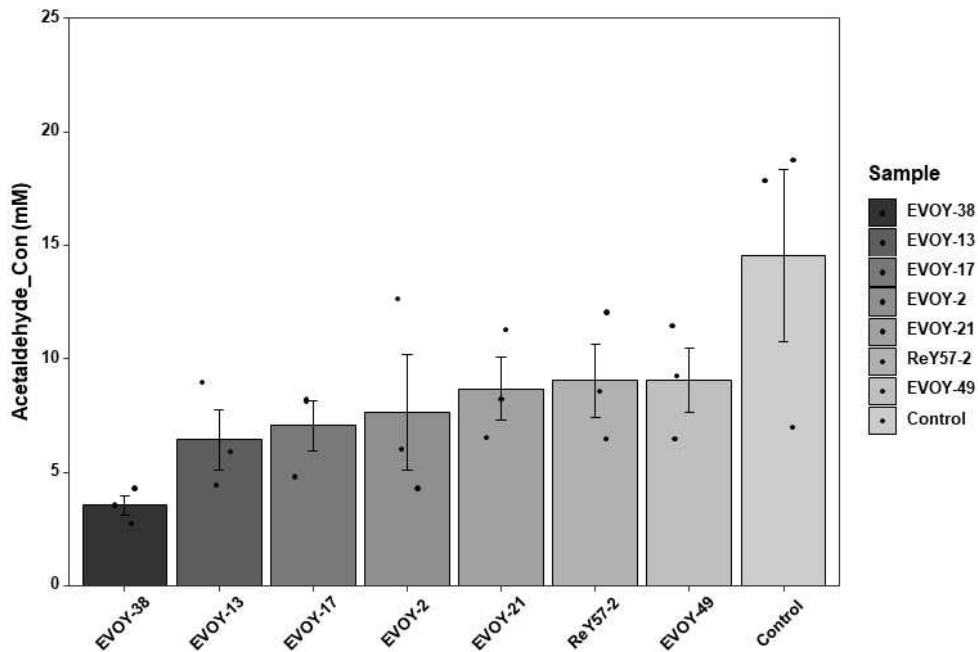


그림 47. 아세트알데하이드 함유 배지에서 적응진화시킨 변이주 6 종에 대해서, 아세트알데하이드 20 mM 함유 배지에서의 배양한 후의 아세트알데하이드 분해능을 비교한 그래프

대조군(Control)은 배지에 어떠한 효모 균주도 넣지 않은 샘플이며 자연적인 증발로 인하여 14.5 ± 6.6 mM 농도를 나타내었다. 반면, 야생형 ReY57-2 균주를 접종한 샘플에서는 아세트알데하이드 함량이 감소하여 9.04 ± 2.5 mM 이었다. 아세트알데하이드를 감소시키는 정도는 사카로미세스속 변이주에서 EVOY-38, EVOY-13, EVOY-17, EVOY-2, EVOY-21 균주 및 EVOY-49 순이었고, 특히 EVOY-38 균주의 경우 가장 많이 감소된 수치인 3.54 ± 0.78 mM을 기록하였다. 이는 대조군 대비 75.7 % 감소시킨 값으로 다른 변이주들에 비해서도 현저히 뛰어난 아세트알데하이드 분해 활성을 나타내었다.

○ 야생형 ReY57-2 균주와 변이주 EVOY-38 균주의 아세트알데하이드 농도에 따른 생육여부 비교

아세트알데하이드 함유 배지에서의 건조 균체량 및 아세트알데하이드 분해 활성이 우수했던 변이주 EVOY-38 균주 및 그 변이주의 야생형인 ReY57-2 균주가 고농도의 아세트알데하이드 농도에서 생육 가능한지를 아세트알데하이드 농도를 5, 10, 20 및 30 mM로 달리하여 스팟 어세이(Spot assay)로 확인하여 나타내었다.

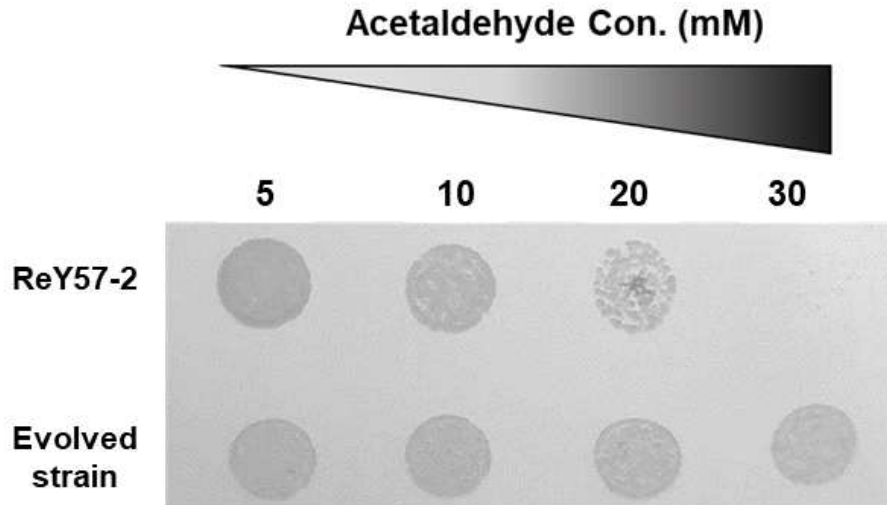


그림 48. 아세트알데하이드 함유 배지에서 적응진화시킨 변이주 EVOY-38 균주 및 그 변이주의 야생형 ReY57-2 균주의 배지의 아세트알데하이드 농도를 5, 10, 20 및 30 mM로 달리했을 때의 균주 생육 여부를 확인한 스팟 어세이(Spot assay) 결과

스팟 어세이는 - 70 °C 저온 냉동고에 보관되어 있는 Rey 57-2 균주 및 적응진화된 균주를 10 mL YPD 배지에 50 mL 코니컬튜브에 접종하여 30 °C에서 배양을 진행하였으며 24시간 배양 후 새로운 10 mL YPD 배지에 해당되는 농도가 되도록 아세트알데히드를 넣어준 뒤 24 시간 배양 후 배양액을 PBS(Phosphate buffered saline, BD)로 10-7이 되도록 희석하였다. 희석한 샘플을 Plain YPD 배지에 3 µL 씩 배양액을 떨어뜨려 Spot을 형성 한 뒤 배양하여 세포가 자라는 정도를 확인하였다. 그 결과 야생형 ReY57-2 균주는 20 mM 아세트알데하이드 농도까지는 생육하였으나, 30 mM 농도에서는 더 이상 생육하지 않음을 확인하였고, ReY57-2 균주로부터 적응진화된 변이주인 EVOY-38 균주는 30 mM 농도에서도 여전히 생육가능함을 확인하였다.

○ 야생형 ReY57-2 균주와 변이주 EVOY-38 균주의 글루타치온 생성량 측정

생체 내에서 아세트알데하이드의 독성을 낮추는데 중요한 요소인 효모 균주의 글루타치온 생성량을 측정하였다.

앞선 실시예에서 배양한 방법과 같은 방법으로 배양을 진행하였다. 1 mL를 취하여 4 °C에서 5분 동안 4000 rpm으로 원심분리 하였다. 상층부의 배지를 제거하고, 얻어진 펠릿의 배지성분을 cold PBS buffer를 이용하여 제거하였다. 균체 세척 과정은 한번 더 반복하였다. 얻어진 효모 펠릿에 cold 50% 메탄올 1 mL를 첨가하여 현탁하였고 유리 bead 가 있는 microtube로 이동하였다. 효모 현탁액을 cell homogenizer (Precellys, city, nation)를 이용하여 6500 rpm에서 10초 동안 3회 과격하게 진동하여 세포내 GSH를 추출하였다. 얻어진 효모 추출액을 4°C에서 5분 동안 14000rpm에서 원심분리 하였다. 분리된 상등액을 50% 메탄올로 희석하여 0.45 µm PVDF syringe filter로 여과한 다음 HPLC 분석 샘플로 사용하였다. GSH는 Agilent 6520 QTOF MS/MS (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA)가 장착된 Agilent HPLC 1200 infinity series로 분석하였다. 이온화원은 dual electrospray ionization (ESI) 방식이었다. 표준용액은 분석 직전에 50, 100, 250 ppb 농도로 만들어 사용하였다.

이동상은 0.1% formic acid를 함유한 물 (A)과 0.1% formic acid를 함유한 ACN 용매 (B)를 사용하였다. Gradient mode로 8분 동안 B 용매의 비율을 10% (0.0-0.5분), 40% (3.0분), 90%

(4.0–6.0분), 10% (8.0분)로 변화시켰다. 표준용액과 시료를 5 μ L 주입하여 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (4.650 mm, 2.7 μ m) (Agilent, USA)에서 0.4 mL/min 속도로 GSH를 분리하였다. Post time은 3분, autosampler 온도는 4°C, 컬럼오븐 온도는 30°C로 설정하였다. 질량분석은 positive 모드에서 scan으로 수행하였고 분석조건은 다음과 같다: Capillary voltage 2000 V, fragmentor voltage 175 V, drying gas의 온도와 유량 350°C와 10 L/min, nebulizer pressure 45 psig, mass range 200–400 m/z였다. Reference mass는 121.05087 m/z와 322.048121 m/z를 사용하였다. 데이터 분석은 탑재된 MassHunter Workstation software (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA)로 수행하였다.

대조군으로 일반적으로 실험실에서 사용되는 사카로미세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 288c를 양성 대조군으로 사용하였고, 야생형 ReY57-2 균주 및 적응진화된 변이주인 EVOY-38 균주의 글루타치온 생성량을 비교하여 도 6에 나타내었다.

288c 균주는 10.7 \pm 4.9 mg/L, 야생형 ReY57-2 균주는 15.1 \pm 5.3 mg/L, 변이주 EVOY-38 균주는 21.8 \pm 8.1 mg/L의 글루타치온을 생성하였음을 확인하였고, 이를 건조 균체량 당 글루타치온 생성량으로 환산할 경우 각각 4.86 \pm 3.4 (w/w)%, 5.35 \pm 1.1 (w/w)% 및 8.13 \pm 7.1 (w/w)%를 나타내어, 적응진화시킨 변이주 EVOY-38 균주는 글루타치온을 현저히 높은 수율로 생산할 수 있음을 확인하였다.

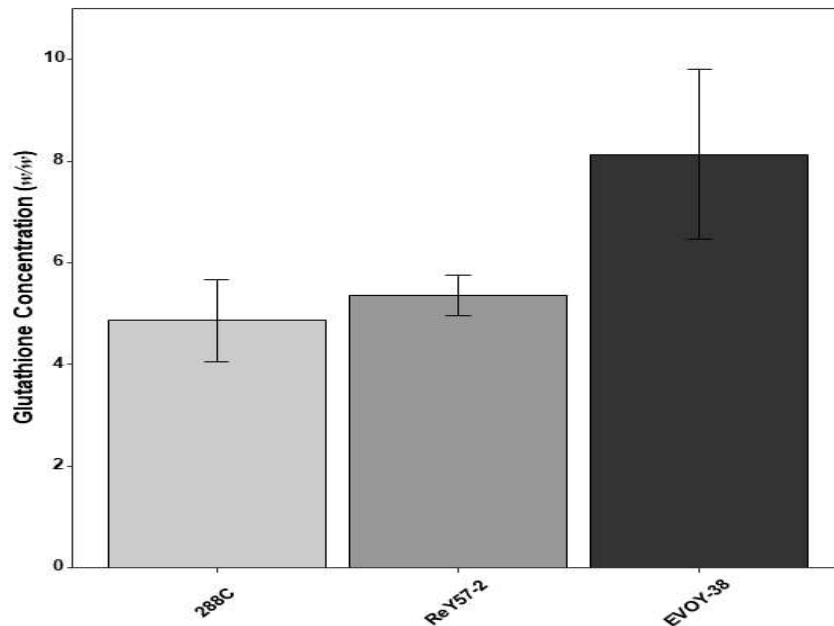


그림 49. 양성대조군인 사카로미세스 세리비지애 288C 균주, 적응진화시킨 변이주 EVOY-38 균주 및 그 변이주의 야생형 ReY57-2 균주의 균주 내 글루타치온 함량을 측정하여 비교한 그래프

마. 전통누룩 및 미생물 표준화 기술개발

(1) Reverse Genome Engineering을 통한 변이 유효성 확인

적응진화를 통해 확인한 균주 *P. acidilactici* ALE25에서 확인된 특이적인 SNP가 유효성이 있는지를 확인하고 다른 균주에도 적용할 수 있는 표준화기술이 되기 위해서 Forward & Reverse engineering을 통한 변이가 유효한지 확인이 필요하다. Forward Reverse engineering의 개념은 다음과 같다 (그림 59). 적응진화에서 확인된 SNP를 이미 변이를 다시 야생형의 유전자로 치환하는 것을 Forward Engineering, SNP를 야생형 균주에 도입하는 것을

Reverse Engineering으로 정의할 수 있다.

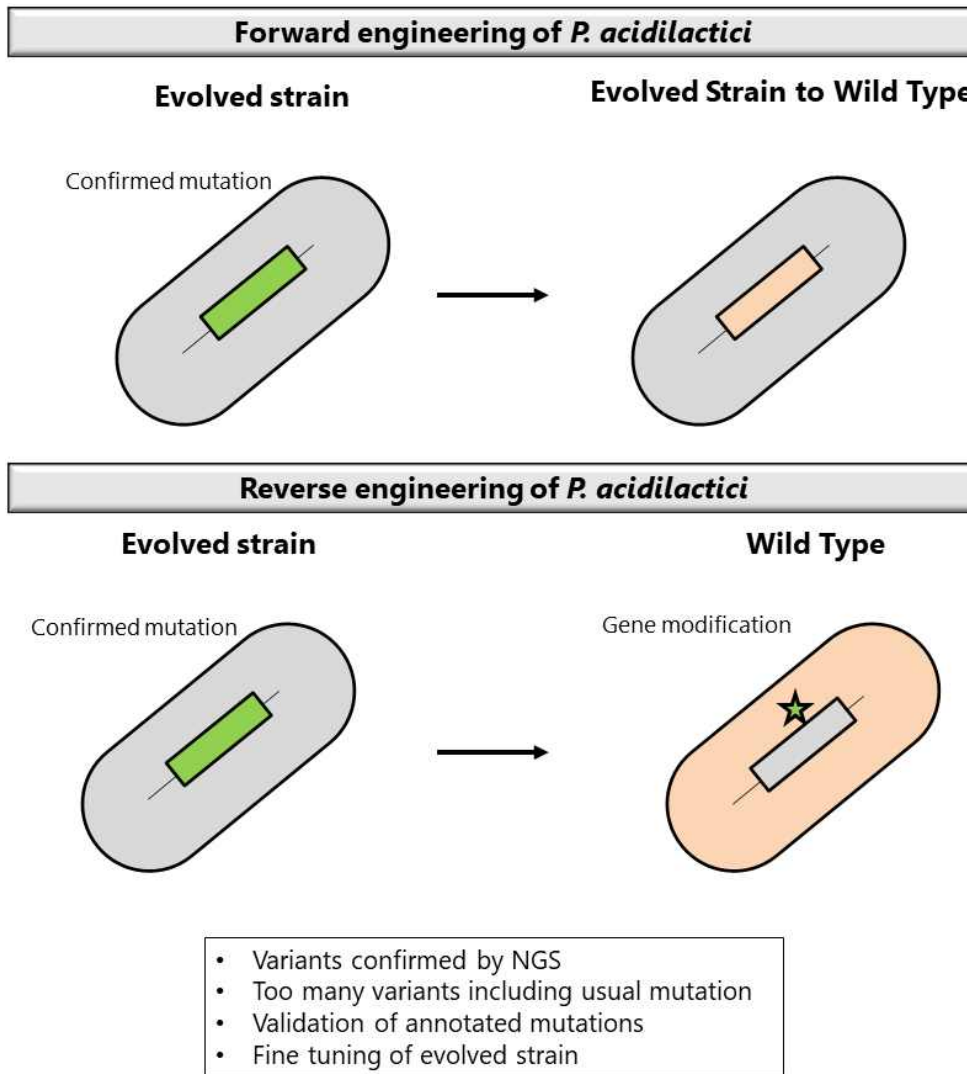


그림 50. Forward & Reverse Engineering 모식도

이러한 Genetic modification을 하기 위해서는 *P. acidilactici*의 Transformation 프로토콜 확립, Knock-out, Knock-in을 위한 Plasmid 시스템 확립이 필요하다. 본 연구에서는 이러한 기반기술을 확립부터 시작하였다.

○ *P. acidilactici* Transformation

Heat shock과 Electroporation을 이용한 Transformation을 둘 다 시도하여 가장 높은 효율을 나타낸 조건은 다음과 같았다. 12 시간 이상 MRS media에 *P. acidilactici*를 배양한 후 새로운 MRS media에 계대배양을 진행하고 이때 배지에는 세포막을 약화 시킬 수 있도록 20 mM DL-threonine을 넣었다. OD_{600nm}가 0.6인 시점에 세포를 수득하여 Washing buffer (Sucrose, 0.6 M; potassium phosphate, 7 mM; magnesium chloride, 1 mM; pH 7.5)를 이용하여 2 번 이상 Washing을 진행하였다. 그 뒤 10분의 1로 농축 후 Competent cell을 완성하였다. Electroporation을 진행하기 위해서 100 ng이상의 plasmid 10 μL와 Competent cell 200 μL를 넣고 10분 간 incubation 한 후에 0.2 cm inter-electrode gap을 가진 큐벳을 이용하여 2.5 kV, 25 μF and 200 Ω 조건 상에서 Electroporation을 진행하였다. Recovery media는 0.5 M sucrose가 함유된 MRS 배지를 이용하여 1 시간 이상 배양후 plasmid에 맞는 항생제 (5 μg mL⁻¹ erythromycin) plate에 spreading을 진행하고 24시간 이상 배양하였다.

○ Homologous recombination을 통한 SNP 도입

고온에서 Replication이 되지 않는 pSET4E plasmid를 이용하여 Double-crossover integration을 통해 Knock-out cassette를 도입하였다. 확인된 Transformants를 42 °C에 배양 후 다시 plaste에 spreading 하고 PCR을 통해 원하는 excision이 일어난 균주만을 확인하였다.

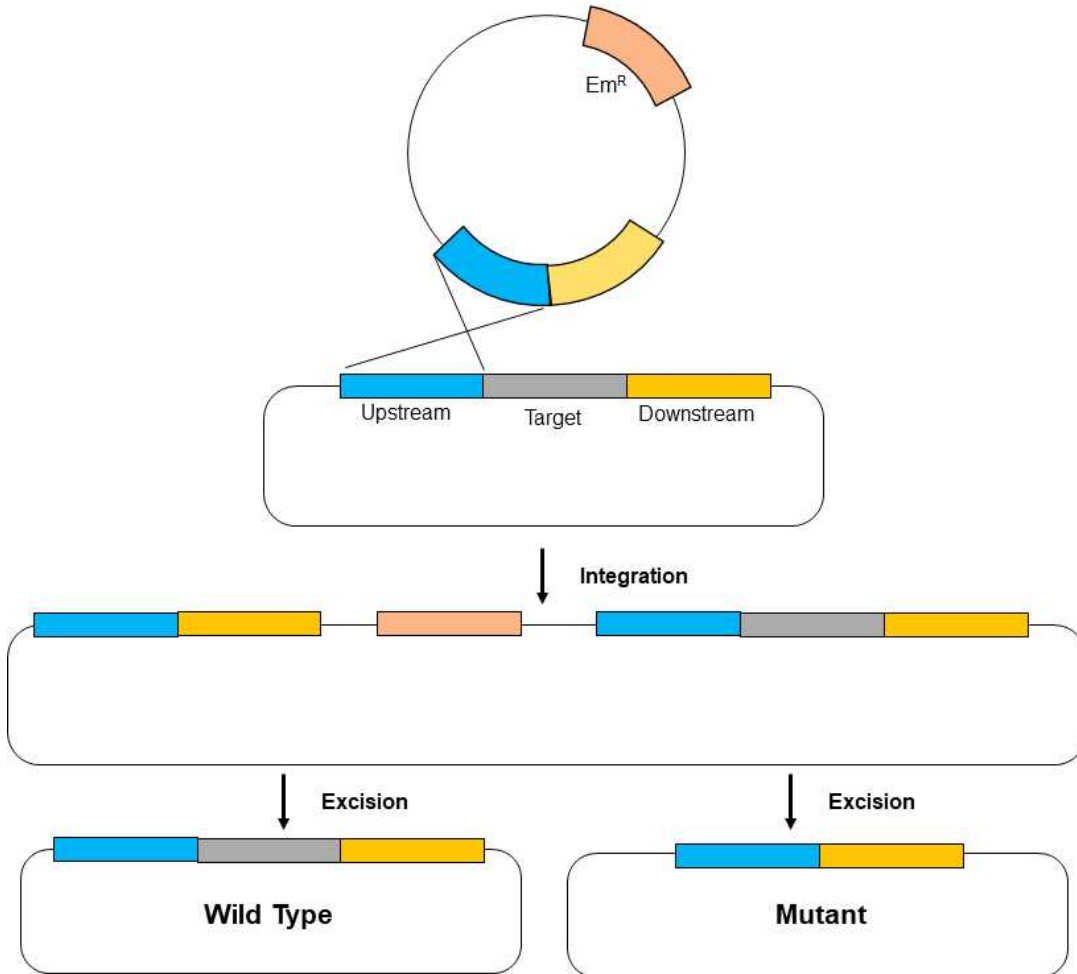


그림 51. Homologous recombination 모식도

○ SNP 유전형 도입 균주의 표현형 확인

야생형에 앞서 확인 SNP인 Oxidoreductase, membrane protein인 *walk*, MFS transporter, Eam A transporter 총 4 가지 유전자를 각각 도입한 균주와 동시에 2가지 mutation을 도입한 균주를 2가지 제작하여 아세트알데하이드 조건상에서 성장능력을 확인하였다. 그 결과 야생형 *P. acidilactici* RL6-14는 0.589 mg/L, ALE25는 1.18 mg/L를 기록하였다. 다양한 변이중 *in vitro* 실험을 통해서도 확인한 oxidoreductase 변이를 도입한 것 (0.987 mg/L)이 가장 높은 성장능력을 확인 할 수 있었다. 나머지 3개 변이에 대해서는 야생형 대비 유의성을 찾지 못했지만 oxidoreductase에 Eam A transporter (5720) 이나 MFS transporter (5090)을 도입한 균주가 유의적이지 않지만 oxidoreductase만 도입한 균주 대비 높은 성장능력을 확인 할 수 있었다 (그림 61).

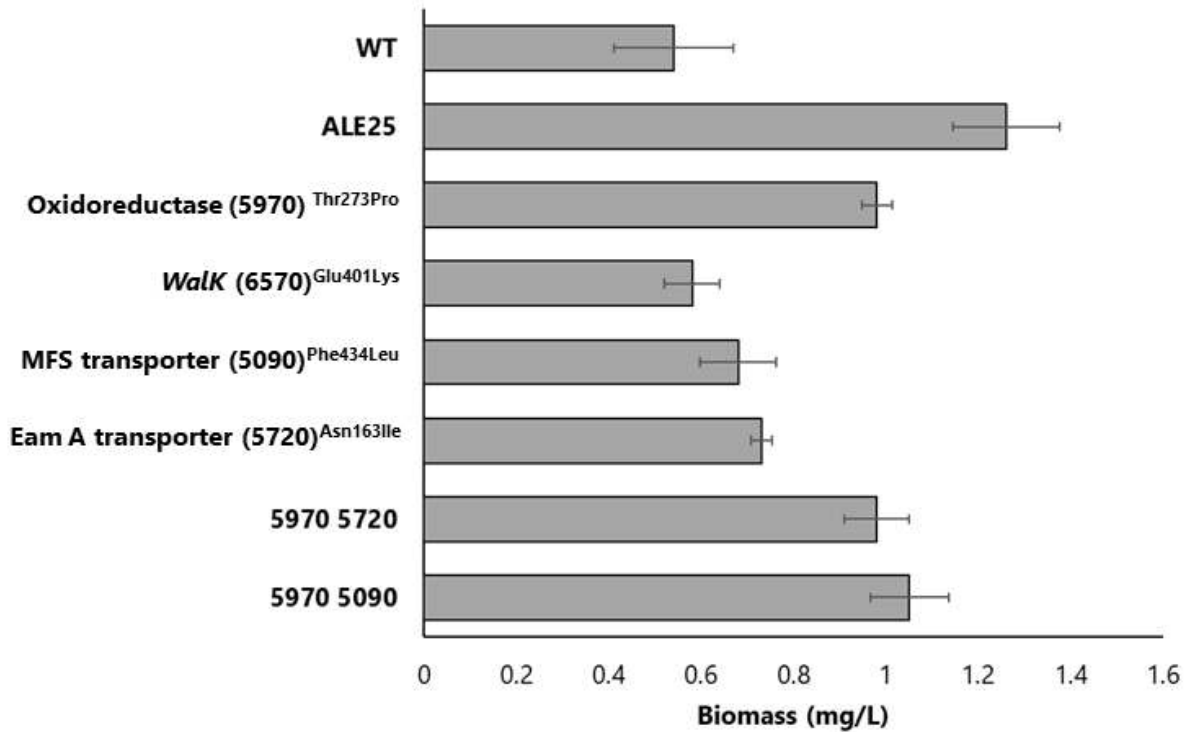


그림 52. Reverse Engineering을 통한 SNP 변이 확인

바. 전통누룩 유래 고기능성 유전자원 소재화 및 산업적활용

(1) 알코올을 유도한 동물모델에서 아세트알데하이드 저감화 기능성 확인

아세트알데하이드 저감화 균주가 *in vitro* 뿐만아니라 *in vivo*에서도 효과가 있는지 이를 통해 소재화 및 산업적 적용이 가능한 지를 확인을 위하여 동물실험을 진행하였음. 개량한 유산균 *P. acidilactici* ALE25, 효모 *S. cerevisiae* EVOY-38를 경구투여하여 확인하였음.

○ 동물실험 디자인

동물실험을 진행하기 위하여 (주) 오리엔트바이오로부터 공급받은 7주령 수컷 Rat를 일주일 동안 설치류 사육실에서 순화시켰다. 실험 전 마우스는 2주간 순화과정을 거쳤다. 마우스는 실험 내내 22±1℃ 온도 및 55%±10% 습도가 조절된 사육실에서 자유식으로 사육되었으며 명암 주기는 12시간 주기로 조절하였다. 모든 동물실험은 한국식품연구원 동물실험운영규정에 준하여 수행하였다. 대조군, 알코올 투여 대조군, 균주 투여군을 합쳐 총 6 그룹을 나누었고, 그룹별 개체 6 마리로 구성하여 실험을 진행하였다.

실험군	실험물질	투여용량	동물수
Negative	DW		6
EtOH	EtOH	20 % alcohol, 0.8 g/kg	6
ALE25_L	EtOH,ALE25	10 ⁸ CFU / 100g Body wt.	6
ALE25_H	EtOH,ALE25	10 ⁹ CFU / 100g Body wt.	6
EVOY38_L	EtOH,EVOY38	10 ⁸ CFU / 100g Body wt.	6
EVOY38_H	EtOH,EVOY38	10 ⁹ CFU / 100g Body wt.	6

○ 균주 투여

개발된 프로바이오틱스의 효능 평과를 위하여 무작위적으로 나눈 그룹 중 상기 표와 같이 그룹과 투여용량을 설정하였다. 균주는 총 2가지로 *P. acidilactici* ALE25와 *S. cerevisiae*

EVOY-38을 각각 10^8 , 10^9 CFU/100g Body wt.를 알코올 투여 일주일 전에 7일간 경구투여를 진행하였다. 그 후 주정 25 %를 이용하여 0.8 g/kg을 투여하고 1시간 4시간 에탄올 및 알코올 함량을 측정하고 4시간에 해부를 진행하였다.

○ 에탄올 및 아세트알데하이드 저감 효능 분석

알코올을 투여한 대조군 대비 프로바이오틱스를 투여한 군의 상대적인 잔여 에탄올과 아세트알데하이드 농도로 표현하였다. 각 시간별 안와체혈을 진행하였고 냉장 1시간 이상 보관이후 4 °C, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 채취한 혈청에 존재하는 에탄올과 아세트알데하이드 농도는 측정용 assay kit (Megazyme, IL, USA)를 이용하여 에탄올이나 아세트알데하이드의 효소반응을 통해 NAD⁺가 NADH로 변화하는 것을 측정하였다. Photassium phosphate buffer(pH 9)와 NAD⁺를 혼합한 후 혈액 상등액 샘플을 첨가 하여 20°C에서 5분간 반응 시킨 후 micro reader를 이용 하여 340nm에서 흡광도를 측정하였다(A1). 또한 혼합액의 ADH와 ALDH 50 μ l를 첨가하여 20°C에서 5분간 반응시킨 후 340nm에서 흡광도를 측정하였다(A2). 이를 바탕으로 시간별 혈중 알코올의 농도는 하기의 [계산식 1]에 대입하여 정량하였으며, 혈중 아세트알데하이드의 농도는 하기의 [계산식 2]에 대입하여 정량하였다.

[계산식 1]

$$\text{Concentration} = 0.7259/3.6 \times \Delta A$$

$$\Delta A = \text{sample}(A2-A1) - \text{blank}(A2-A1)$$

[계산식 2]

$$\text{Concentration} = 0.7158/3.6 \times \Delta A$$

$$\Delta A = \text{sample}(A2-A1) - \text{blank}(A2-A1)$$

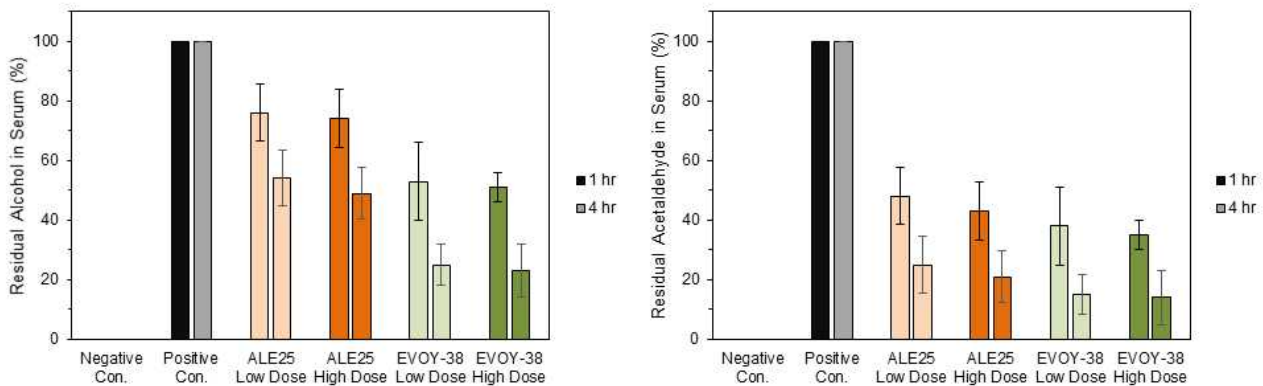


그림 53. 혈중 에탄올 및 아세트알데하이드 농도

측정 결과 대조군 대비 알코올 아세트알데하이드를 유의미하게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 균주 수에 대해서 유의미하게 감소하는 정도는 없었지만 효모균주인 EVOY-38이 유산균 ALE25 보다 더 높은 감소능을 보여주었다.

○ 간독성 확인

혈청샘플에 있는 간 손상과 관련된 생화학적 요인들의 변화를 평가하고자 간 독성 바이오마커인 ALP(alkaline phosphatase)과 AST(aspartate aminotransferase)을 측정하였다. 간세포 손상 후 간으로부터 나오는 바이오마커이기 때문에 간손상의 지표가 된다. 알코올을 투여한 대조군 대비 낮아진 손상지표를 확인할 수 있었다.

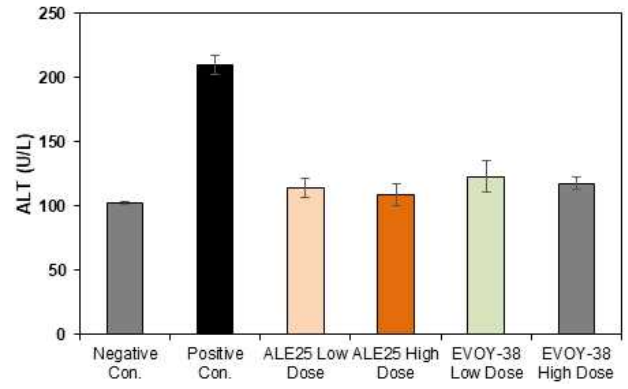
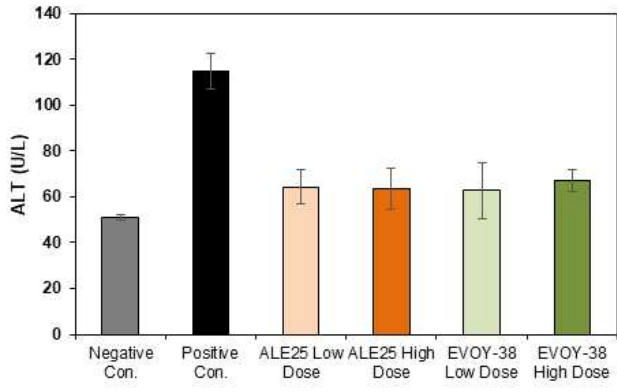


그림 54. 간 손상지표 확인

사. 지역기반 전통누룩 양조 및 효소학적 특성 분석

(1) 지역기반 전통누룩 제조를 위한 경기도 성남 및 강원도 횡성(둔내면) 지역의 발효 환경 분석

- 횡성군은 강원도의 영서지방에 위치한 군으로 동쪽은 평창군, 서쪽은 양평군, 남쪽은 원주시와 영월군, 북쪽은 홍천군과 각각 접하고 있다. 동경 124.46' ~ 128.20', 북위 37.32 ~ 37.41에 위치한다. 기후는 내륙산간에 위치하여 해양의 영향을 전혀 받지 못하기 때문에 기온의 교차가 심한 대륙성 기후를 나타낸다. 또한 여름철에는 핀(Fohn)의 바람받이 지대로서 한발(旱魃)이 심한 편이다. 연평균 기온은 10.7℃, 1월 평균기온 -6.3℃, 8월 평균기온 25.5℃, 연평균 강수량은 1,140mm이다.

- 강원도 횡성 지역의 월평균값자료(30년)은 횡성과 인접한 원주 기상 관측대 자료를 참고하였다. 이 관측값에 의하면 월평균 기온이 20℃ 이상인 구간과 평균습도 70% 이상인 구간은 6월에서 8월 사이로 나타났다(표 1).

표 42. 강원 원주 지역 월평균 기후 관측 자료(기상청)

항목	1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월
평균기온(℃)	-4.3	-1.2	4.7	11.8	17.3	21.8	24.6	24.8	19.5	12.6	5.2	-1.4
최고기온(℃)	1.7	5.0	11.1	19.0	23.9	27.6	29.3	30.0	25.7	19.8	11.5	4.4
최저기온(℃)	-9.5	-6.6	-1.1	4.8	11.1	16.5	20.8	20.9	14.7	6.9	0.0	-6.2
강수량(mm)	22.0	26.3	51.6	66.7	93.5	140.1	362.2	290.1	173.4	50.1	43.5	24.1
평균습도(%)	66.9	64.2	61.6	58.4	64.1	70.3	78.5	78.1	76.0	73.2	70.9	69.2

- 성남은 경기도 중부, 서울의 남쪽에 위치한 시로 동쪽은 광주시, 서쪽은 서울시 서초구·강남구, 과천시·의왕시, 남쪽은 용인시, 북쪽은 송파구, 하남시와 접하고 있다. 동경 127.01' ~ 127.11', 북위 37.19' ~ 37.23'에 위치한다. 기온은 대륙성 기후의 특징을 나타내고 있는데 연평균 기온은 11.2℃, 1월 평균 기온은 -5.4℃, 8월 평균 기온은 24.5℃이며, 연강수량은 1,200mm 내외이다.

- 경기 성남 지역의 월평균값자료(30년)은 인접한 수원 기상 관측대 자료를 참고하였다. 이 관측값에 의하면 월평균 기온이 20℃ 이상인 구간과 평균습도 70% 이상인 구간은 6월에서 9월 사이로 나타났다(표 2).

표 43. 경기 수원 지역 월평균 기후 관측 자료(기상청)

항목	1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월
평균기온(°C)	-2.9	-0.3	5.0	11.6	17.2	21.7	24.8	25.6	20.8	14.0	6.6	0.0
최고기온(°C)	2.1	5.0	10.6	17.9	23.0	26.8	28.8	29.8	25.9	20.0	12.0	5.0
최저기온(°C)	-7.4	-5.0	0.0	5.9	12.0	17.4	21.7	22.1	16.4	8.8	1.8	-4.4
강수량(mm)	22.4	24.2	47.9	61.3	97.8	129.2	351.1	299.8	153.9	53.1	49.7	21.8
평균습도(%)	65.1	64.3	64.2	62.5	67.6	72.3	80.1	78.3	74.5	71.0	68.6	66.4

- 전통누룩 제조에 있어 온도와 습도는 중요한 요소 중에 하나이다. 특히, 누룩을 제조할 경우 온도도 중요하지만 습도가 더욱 중요하다. 습도 50% 이하가 되면 누룩이 너무 빨리 말라버리고 습도가 70% 이상이 되면 수분이 많은 상태로 오래 지속되어 고초균과 같은 Bacillus sp. 계열 세균류 번식이 유리하여 누룩에서 된장과 같은 냄새가 나게 된다. 또한 습도가 높으면 누룩 표면에 수분이 오래 지속되어 곰팡이가 누룩 안쪽까지 들어가지 않고 겉에만 피는 경우(돌파정) 등이 생기게 된다. 이에 지역 기반에 따른 전통누룩 제조는 6월에서 8월 기간에 실시하였다.

(2) 전통누룩 제조 및 발효

- 전통누룩은 해당 지역의 자연적 특성(온도와 습도, 미생물의 군집 등)의 영향을 크게 받아 그 지역 고유의 특성이 반영된 전통주 제조에 핵심적 역할을 한다. 지역 환경 기반에 따른 전통누룩의 특성을 살펴보고자 경기(성남, 국순당 부설연구소) 및 강원(횡성, 국순당 생산본부 횡성공장) 지역에서 전통누룩을 각각 제조 및 발효하였다(그림 50).

- 전통누룩 성형은 밀을 원료로 하여 선별 및 거칠게 분쇄 후 원료량의 30%(v/w)의 농도로 물을 넣어 반죽하여 직경 20cm에 두께 3cm 크기의 원형으로 성형하였다.

- 현재 상업적으로 전통누룩을 제조하는 업체는 3곳인데 그 중 2곳은 반자동 내지는 자동성형기를 사용하고 있으며 다른 1곳은 수작업으로 성형하고 있다. 본 과제는 누룩 성형은 제조의 균일화, 대량화 및 제조 기술 표준화 마련을 위해 누룩 성형기를 제작하여 사용하였다.

- 성형된 전통누룩의 발효는 30°C, 상대습도 70~80% 조건이 되도록 가습기를 운영하여 진행하였으며 바닥에 짚을 펴 주고 그 위에 성형된 누룩을 올리는데 누룩과 누룩 사이를 띄어 준 다음 수분 증발이 빨리 되지 않도록 천으로 덮어주었다. 1일 1회 전체적으로 뒤집어 주웠으며 위, 아래가 고르게 균이 퍼질 수 있도록 하였다. 약 7일간 누룩 발효를 진행한 뒤 가습하지 않고 7일 동안 후발효 후 약 4등분으로 쪼개어 그늘에서 천천히 건조시켜 수분 함량 10~15% 내외가 되도록 하였다.



(1) 강원 횡성



(2) 경기 성남

그림 55. 지역별 전통누룩 발효실 모습

- 30℃ 온도 조건의 발효실에서 경기 지역 전통누룩의 품온은 약 24시간 경과부터 균사가 나타나기 시작하면서 서서히 증가하여 96시간에 이르러 최고 43℃까지 상승하였으며 그 후 서서히 떨어지기 시작하였다. 강원 지역 전통누룩의 품온 또한 약 24시간 경과부터 균사가 나타나기 시작하면서 그 후 증가하여 84시간에 이르러 최고 45℃까지 상승 후 조금씩 떨어지기 시작하였다(그림 51).

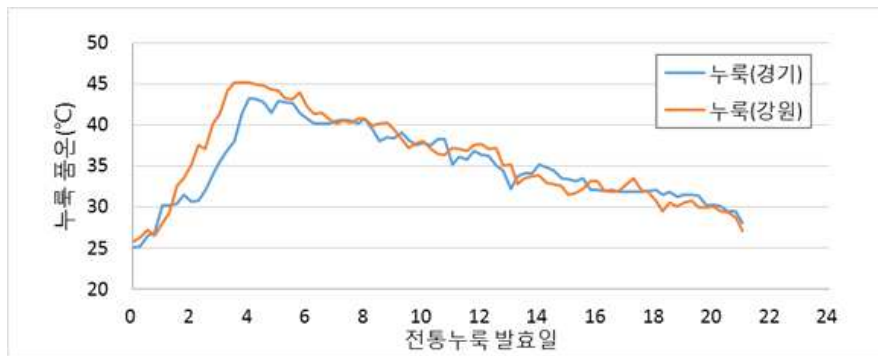


그림 56. 지역에 따른 전통누룩 발효 시 품온 변화

(3) 제조된 지역 기반 전통누룩의 효소학적 특성 분석

- 제조된 전통누룩의 효소학적 특성 분석은 국세청주류분석규정에 따른 방법으로 측정하였다. 성형된 누룩 적당량을 80~100mesh 정도가 되도록 분쇄하여 5g을 취한 다음 500mL 삼각플라스크에 넣고 멸균수 100mL를 넣어 shaking incubator에서 30℃, 150rpm, 1hr 조건으로 추출한 다음 여과하여 이를 효소용액으로 사용하였다.

- 당화력(Saccharogenic power, SP)은 2% soluble starch 용액(0.1M Acetate buffer, pH 5.0)을 기질로 하여 55℃에서 1시간 효소 반응시킨 다음, 생성된 포도당의 양을 Lane-Eynone법으로 측정하여 기질의 당화율이 15% 되는 범위에서의 당화율에 희석배수를 곱하여 산출하였다. 당화력의 단위는 누룩 1g 당의 효소활성으로 표시하였다.

- 생전분 분해력은 2% 소맥전분 현탁액 1mL에 0.1M Acetate buffer(pH 5.0) 1mL을 첨가하여 30℃에서 5분간 예열한 후, 효소액 0.2mL를 첨가하여 30℃에서 5hr 반응시켰다. 0.1N NaOH 용액으로 반응을 정지시킨 다음, 생성된 포도당의 양을 상기와 같은 Lane-Eynone법으로 측정하여 아래 식에 의해 효소활성도를 산출하였다.

- Raw Starch Glucoamylase activity(생전분 분해력, units)
 = 생성된 포도당량(mg) x 1/5(반응시간) x 1/0.2(효소량) x 100/10(추출율) x 2(효소기질반응액량)

- Acidic protease의 활성은 Folin 법으로 측정하였다. 0.6% Casein 용액(0.1N Lactic acid buffer, pH 3.0) 1.5mL에 효소액 0.5mL를 넣은 다음 38°C에서 60분간 반응시킨 후 0.4M TCA 용액 3mL를 넣고 침전시킨 다음 여과하여 얻은 여과액 1mL에 0.1N Na₂CO₃ 5mL를 넣고 여기에 Folin 시약 1mL을 넣고 잘 흔든 후 37°C water bath에서 20분간 발색 시킨 후 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 뒤 공시험에서 얻은 흡광도를 뺀 값을 이용하여 Tyrosine양을 측정하였다. 역가 단위는 시험조건에서 1분간 tyrosine 1 μ g에 대응하는 비단백성의 Folin 정색 물질을 생성하는 힘을 1 PU로 표현하였다.

$$PU = \frac{D-D_0}{D_s} \times \frac{50 \times 4}{10} \times \text{희석배수}$$

D : 시료의 Abs. D₀ : Blank의 Abs. D_s : Standard의 Abs.

- 제조된 전통누룩의 효소활성을 측정한 결과 강원(횡성) 지역에서 제조한 전통누룩의 당화력은 350sp/g을 경기(성남) 지역 295sp/g 보다 약 18.6% 높았고 산성 단백질분해력은 강원 지역 전통누룩이 120units/g, 경기 지역 전통누룩이 150unit/g 이었다. 전통누룩 제조 시 주로 통밀을 사용하는 점에서 생전분 분해력 또한 중요할 것이라 판단되어 생전분 분해력을 측정한 결과 경기 지역 전통누룩은 25.9rsp/g, 강원 지역 전통누룩은 31.9rsp/g로 당화력과 비례하는 경향을 나타내었다. 동일 원료, 제법으로 성형하더라도 발효 환경에 따라 효소활성이 다를 수 있었다(표 38).

표 44. 지역 기반 전통누룩의 효소학적 특성 분석 결과

발효 지역	당화력 (sp/g)	생전분 분해력 (rsp/g)	산성 단백질분해력 (units/g)
경기 성남	295	25.9	120
강원 횡성	350	31.9	150

(4) 지역 기반 전통누룩의 미생물학적 특성 분석

- 전통누룩 내 미생물은 효소력 측정 시 누룩 추출액을 0.85% NaCl을 포함하는 멸균 식염수를 사용하여 plate 당 20~200 colony가 되도록 적당히 희석하여 측정하였다. 유산균의 경우 MRS broth에 항진균제로 0.02% cycloheximide와 0.002% BPB(Bromophenol blue)가 포함된 배지에 희석된 샘플을 도말하여 anaerobic jar와 GasPak을 이용하여 혐기성 조건에서 30°C, 48시간 배양하였으며 형성된 colony를 육안으로 선별하여 계수하였다. 유산균을 제외한 세균류는 Nutrient broth agar에 0.02% cycloheximide를 넣어 30°C에서 48시간 배양하여 colony를 육안으로 선별하여 계수하였다. 효모의 경우는 0.02% chloramphenicol이 포함된 YPD

agar 배지에 도말한 후 30℃에서 48시간 배양하여 측정하였다.

- 제조된 지역 기반 전통누룩 내 미생물을 분석한 결과 경기 지역 전통누룩이 강원 지역 전통누룩에 비해 미생물의 농도가 전반적으로 높게 나타났다. 전통누룩 발효 환경에 따라 전통누룩 내 미생물 분포 또한 차이를 알 수 있었다(표 39).

표 45. 지역 기반 전통누룩 내 미생물 분석 결과

(단위, cfu/g)

	곰팡이류	효모류	유산균류	세균류
경기 성남	1.20E+03	2.53E+05	5.25E+06	3.74E+05
강원 횡성	1.31E+03	5.82E+04	4.50E+06	3.61E+05

(5) 지역 기반 전통누룩의 양조학적 특성 및 관능 분석

- 제조된 전통누룩의 양조 발효 특성을 알아보려고 직접 술을 빚어 평가하였다. 레시피는 조선시대 ‘술 만드는 법(酒作法, 작자 미상의 1800년도 말엽의 한글 필사본)’에 나와 있는 사시통음주를 기반으로 빚었다. 밀술은 멥쌀을 범벅으로 가공하여 전통누룩과 함께 빚은 후 25℃에서 4일간 발효한 뒤 멥쌀을 백설기 형태로 가공하여 소맥분(박력분)과 소량의 물로 덧술한 뒤 25℃에서 발효하여 총 10일간 발효하여 평가하였다(표 49).

표 46. 전통누룩 양조학적 특성 평가를 위한 술 담금 레시피

원료(가공방법)	밀술	덧술
멥쌀(범벅)	990g	-
멥쌀(설기떡)	-	1,980g
박력분	-	30g
전통누룩	600g	-
물	3,465mL	446mL

- 지역 기반 전통누룩으로 빚어 양조 특성을 평가한 결과 밀술 발효 시 발효 3일차까지 산도가 급격히 증가하는 경향을 동일하게 보였으며 경기 지역 누룩은 최고 10.5, 강원 지역 누룩은 최고 9.5로 나타났다. 알코올 농도는 미묘하게 증가하다가 덧술 전 알코올 농도는 각각 7.81%, 8.32%로 나타났다. 덧술 담금 후 산도의 증가폭은 크지 않았으며 알코올의 증가폭은 높아져서 최종 발효 시점 알코올 농도는 경기 지역 누룩이 18.32%, 강원 지역 누룩이 18.86%로 나타났다. 동일한 원료와 제법으로 빚은 전통누룩이라도 지역 환경에 따라 양조 특성은 비슷하나 알코올, 산도, 환원당 등 최종 발효 산물의 농도는 차이가 남을 알 수 있었다(표 41, 42).

표 47. 경기 지역 전통누룩으로 빚은 술 발효 분석 결과

발효시간 (일)	Alcohol (%, v/v)	Acidity	pH	환원당 (g/L)	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)
1	-	1.4	5.01	92.0	1.5E+03	5.5E+07
2	1.20	7.2	3.79	77.0	2.5E+04	1.8E+08
3	3.53	8.8	3.62	6.4	3.7E+07	7.1E+08
4	7.81	10.5	3.89	44.8	7.1E+07	9.1E+08
5	10.52	5.4	3.89	24.0	2.3E+08	1.7E+08
6	13.71	6.1	4.06	17.2	3.3E+08	1.5E+08
7	15.94	6.5	3.96	13.0	3.1E+08	7.1E+07
8	16.55	6.7	4.11	9.8	1.2E+08	5.0E+07
9	17.71	6.5	4.09	7.2	8.0E+07	4.0E+07
10	18.32	7.0	4.13	9.4	6.5E+06	3.1E+07

표 48. 강원 지역 전통누룩으로 빚은 술 발효 분석 결과

발효시간 (일)	Alcohol (%, v/v)	Acidity	pH	환원당 (g/L)	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)
1	-	1.8	4.41	89.6	1.2E+03	6.3E+07
2	2.57	6.5	3.52	43.6	1.5E+04	1.1E+08
3	7.05	7.4	3.48	3.6	1.2E+08	6.6E+08
4	8.32	9.5	3.75	2.1	2.3E+08	8.3E+08
5	10.96	5.4	3.69	50.0	3.5E+08	1.2E+08
6	13.23	6.1	3.72	34.0	3.7E+08	1.1E+08
7	15.23	7.0	3.78	19.6	2.8E+08	1.2E+08
8	16.57	7.1	3.88	10.0	2.1E+08	9.1E+07
9	18.68	7.0	3.89	5.6	1.2E+08	4.3E+07
10	18.86	7.3	3.91	2.2	1.3E+07	1.2E+07

- 공통적으로 은은한 사과 계열의 과실향이 있고 맛 조화도가 양호하나 경기 지역 전통누룩으로 빚은 술이 관능 기호도가 약간 높았다(표 8).

표 49. 지역 기반 전통누룩으로 빚은 술덧 관능 평가

전통누룩 발효 지역	관능점수(9점 척도 ¹⁾)	관능묘사
경기 성남	7.1	은은한 과실향, 맛 조화도 양호함, 후미 깔끔한 편
강원 횡성	6.9	은은한 과실향, 맛 조화도 양호하나 약간 쓴맛 있음

1) 9점 척도법 : 0점(아주 나쁨) - 3점(나쁨) - 5점(보통) - 7점(좋음) - 9점(아주 좋음)

(6) 밀을 원료로 한 전통누룩 제조 시 성형 두께에 따른 미생물 및 효소학적 분석과 양조 특성 평가

- 전통누룩 성형 제조 시 가장 중요한 부분은 누룩의 두께이다. 보통은 3~4cm 정도 되지만

지역에 따라 2cm 전후가 있고 어떤 곳은 5cm가 넘는 누룩도 있다. 누룩의 두께가 다른 이유는 다양한 원인이 있겠지만 그 지역의 습도가 누룩의 두께에 가장 큰 영향을 준다. 따라서 동일 환경에서 누룩 두께에 따른 전통누룩의 품질을 살펴보고자 성형 두께별로 전통누룩을 제조하고 평가하였다.

(7) 성형 두께 별 다른 전통누룩 제조

- 전통누룩 성형은 누룩 성형기를 이용하여 제조하였고 두께는 각각 3cm, 5cm, 8cm로 하여 제조하였다(그림3, 표9). 성형된 누룩은 (주)국순당 생산본부(강원 횡성)에 마련된 누룩 배양실에서 2주 동안은 발효 온도 30℃, 습도 60~70% 조건으로 발효하였고, 3주차부터는 가습 없이 온도만 유지하면서 후발효 및 건조시켰다.



(1) 3cm 두께 성형

(2) 5cm 두께 성형

(3) 8cm 두께 성형



(4) 두께별로 성형된 전통누룩 발효 모습

그림 57. 성형 두께별 전통누룩 성형 및 발효

표 50. 성형 두께별 전통누룩 제조 시 크기 상세 내역

구분	누룩 크기 (지름 x 두께, cm)	통밀 원료 함량	가수량
누룩1	20 x 3	800g	240mL
누룩2	20 x 5	1,000g	300mL
누룩3	20 x 8	1,200g	360mL

- 전통누룩 발효 시 품온 변화는 그림 5와 같다. 누룩의 두께가 두꺼울수록 발열 기간이 길었으며 최고 품온도 높게 나타났다. 누룩 두께가 3cm와 5cm는 발효 기간 및 품미가 큰 차이가 나지 않았으나 8cm의 경우 온도 변화가 크지 않아 후발효 및 건조 시간이 다소 오래 걸렸으며 이로 인해 누룩취가 약간 강하게 평가되었다.

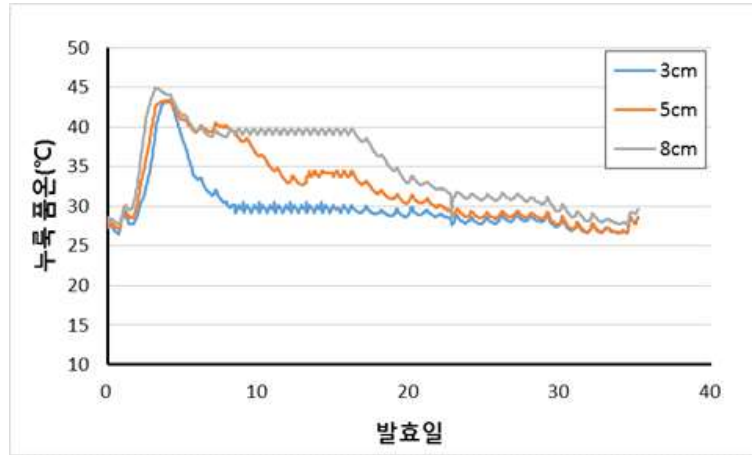


그림 58. 누룩 두께에 따른 품온 변화

(8) 제조된 성형 두께별 전통누룩의 효소 및 미생물학적 특성 분석

- 발효가 완료된 누룩을 쪄개어 법제 후 효소 및 미생물학적 특성을 분석하였다. 누룩의 두께가 두꺼울수록 당화력은 낮게 나타났다(표 45).

표 51. 누룩 두께별 당화력 비교

누룩 크기 (지름x두께, cm)	당화력(sp/g)
20 x 3	930 ± 15
20 x 5	830 ± 14
20 x 8	695 ± 15

- 성형 두께별 전통누룩 내 미생물을 분석한 결과 누룩의 두께가 두꺼울수록 미생물 균체수가 많았다(표 46). 이는 누룩 발효 과정 중 품온이 높았고, 내부 수분 변화가 적어 미생물 다양성과 생육에 영향을 주지 않았을까 생각되었다.

표 52. 누룩 두께별 전통누룩 내 미생물 분석 결과

누룩 크기 (지름x두께, cm)	효모류 (cfu/g)	유산균류 (cfu/g)	일반세균류 (cfu/g)
20 x 3	4.3E+04	3.5E+05	5.3E+04
20 x 5	5.6E+05	3.1E+05	4.7E+04
20 x 8	3.7E+06	1.2E+06	1.5E+06

(9) 제조된 성형 두께별 전통누룩의 양조학적 특성 분석

- 양조학적 특성을 살펴보고자 멥쌀을 주원료로 한 “사시통음주” 레시피(표 5)로 빚어 양조 발효 특성을 평가하였다. 멥쌀을 주원료로 하여 범벅을 제조하고 전통누룩을 넣어 혼합할 때 누룩 두께가 작을수록 액화되는 속도가 다소 빨랐는데 이는 당화력 차이에 기인한 것으로 판단된다.

- 알코올 발효 속도는 5cm, 8cm, 3cm 순서로 높게 나타났고 발효 산도는 3cm, 5cm, 8cm 순서로 높았다(표 47~49). 발효 술덧 내 환원당은 두께가 얇을수록 높게 유지되었는데 당화력 차이에 기인한 것으로 판단된다. 동일 원료 및 환경에서 제조되더라도 성형 두께에 따라 효소 및 미생물 차이가 발생되고 이로 인해 양조 발효 시 차이가 남을 알 수 있었다. 이를 바탕으로 구현하고자 하는 주질에 따라 적합한 누룩 성형 두께 조절을 통해 가능하리라 판단된다.

표 53. 성형 두께 3cm 전통누룩으로 빚은 술 발효 분석 결과

발효시간 (일)	Alcohol (%, v/v)	Acidity	pH	환원당 (g/L)	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)
4	5.41%	16.0	3.59	49.5	5.3E+07	1.4E+09
5	10.81%	10.6	3.74	40.0	1.5E+08	2.5E+08
6	13.51%	11.3	3.92	30.0	2.5E+08	3.4E+08
7	15.52%	11.4	3.85	25.2	3.1E+08	5.1E+08
8	16.78%	11.5	3.88	10.8	2.4E+08	8.7E+07
9	17.52%	11.3	3.98	15.5	5.8E+07	5.3E+07
10	18.01%	11.1	4.02	19.1	4.5E+06	6.5E+06

표 54. 성형 두께 5cm 전통누룩으로 빻은 술 발효 분석 결과

발효시간 (일)	Alcohol (%, v/v)	Acidity	pH	환원당 (g/L)	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)
4	8.64%	12.5	3.78	27.2	8.2E+07	8.7E+08
5	12.27%	7.8	3.95	67.0	1.5E+08	1.5E+09
6	15.22%	8.2	4.02	48.0	3.7E+08	7.5E+08
7	16.81%	8.3	4.05	25.7	2.5E+08	6.8E+08
8	17.86%	8.1	4.02	11.0	2.6E+08	5.3E+07
9	18.20%	8.1	4.03	12.5	3.8E+07	1.2E+07
10	18.53%	8.0	4.10	10.5	9.5E+06	1.3E+06

표 55. 성형 두께 8cm 전통누룩으로 빻은 술 발효 분석 결과

발효시간 (일)	Alcohol (%, v/v)	Acidity	pH	환원당 (g/L)	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)
4	8.42%	12.3	3.72	12.4	5.44E+08	1.6E+08
5	12.59%	8.2	3.72	73.0	2.3E+08	2.5E+08
6	14.47%	8.2	4.03	55.0	3.5E+08	5.5E+08
7	16.21%	8.1	4.02	33.5	2.5E+08	2.3E+08
8	17.05%	8.0	4.01	15.3	6.5E+07	1.5E+08
9	17.98%	7.9	3.98	10.1	1.5E+07	1.3E+07
10	18.22%	8.0	4.03	10.3	7.8E+06	4.5E+06

아. 밀을 원료로 한 전통누룩 제조 시 통밀 분쇄도에 따른 미생물 및 효소학적 분석과 양조 특성 평가

(1) 전통누룩 성형 시 통밀 분쇄도에 따른 수분함량 평가

- 전통누룩 제조함에 있어 통밀의 분쇄도 즉, 입자 크기에 따라 성형 정도 및 발효 시 통기에 영향을 줌에 따라 전통누룩 내 미생물의 생육에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단되었다. 이에 통밀 분쇄도에 따른 성형 시 적정 수분함량을 평가하였다.

- 통밀의 분쇄는 Roll mill(성창기계, 한국) 기기로 진행하였으며 분쇄 정도는 Roll 간격을 통해 조절하였으며 일정 분쇄물을 얻고자 2-3번 반복하여 분쇄하였다. 통밀의 분쇄도가 높을수록 글루텐 성분이 많이 나와 밝은 색상을 띄었다(그림 54).



통밀

굵은 분쇄

중간 분쇄

고운 분쇄

그림 59. 통밀 분쇄도에 따른 형상

- 위의 분쇄도에 따른 통밀 가루를 원료로 하여 누룩 성형 시 적정 수분함량을 평가하였다. 적정 수분 함량 평가는 성형 시 압착되는 정도와 성형 후 모양을 유지할 수 있는 정도로 평가하였다. 전통누룩 성형 시 통밀 분쇄도에 따른 적정 수분함량은 굵게 분쇄된 통밀가루는

20~23%, 중간 분쇄 23~25%, 고운 분쇄는 28~30%의 수분을 첨가해야 성형이 양호하였다. 이 차이는 곱게 분쇄될수록 빠져나온 글루텐 성분이 수분 흡수율이 높아 성형 시 수분을 더 필요로 하기 때문인 것으로 판단된다.

(2) 통밀 분쇄도에 따라 성형된 전통누룩 발효 및 평가

- 분쇄도에 따라 성형된 전통누룩을 35℃로 셋팅된 발효실에서 21일간 발효하였다(그림 7). 실내온도 및 누룩 품온의 변화는 그림 8과 같다. 고운 분쇄 누룩의 경우 누룩 품온이 빠르게 올라가 발효 24시간 무렵 최고 온도 48℃까지 올라갔다가 하강한 뒤 96시간에 45℃로 다시 상승 후 실내온도와 유사하게 유지되었다. 중간 분쇄 누룩의 경우 24시간에 40℃까지 상승되었다가 하강한 뒤 96시간에 47℃로 상승한 뒤 하강하여 실내온도와 유사하게 유지되었다. 거친 분쇄 누룩의 경우 앞선 누룩과 달리 발효 초반 품온이 지속적으로 상승 유지되어 96시간에 51℃로 최고점을 찍은 후 서서히 하강하여 실내온도와 유사하게 유지되었다. 이는 통밀 입자에 따른 통기 정도에 따라 누룩 발효 시 생성되는 발열과 연계가 있지 않을까 판단된다.

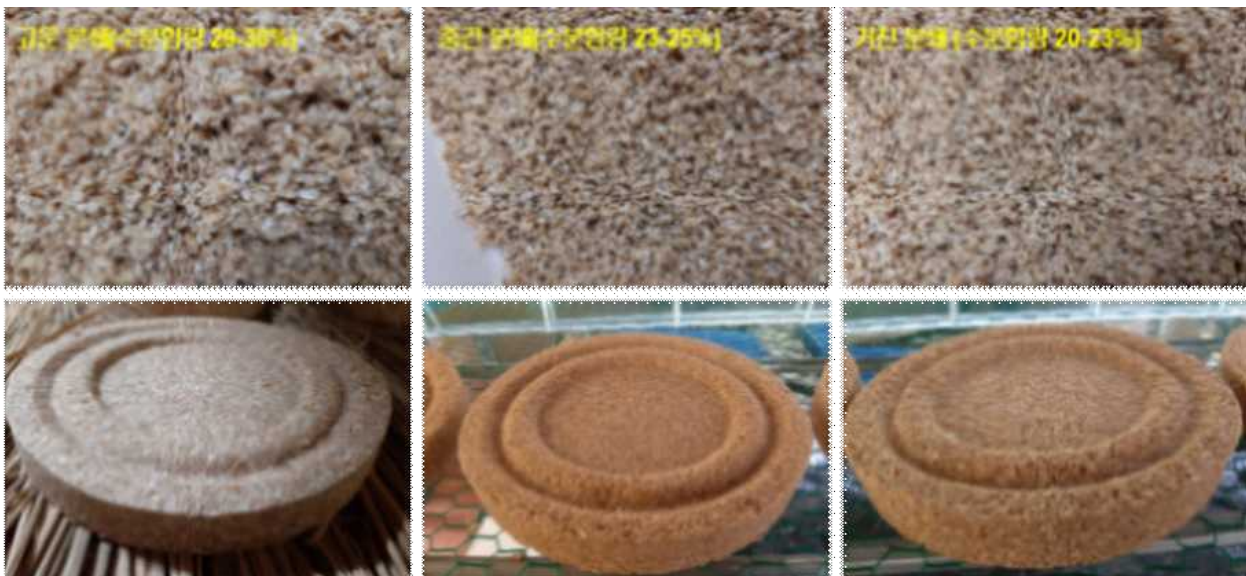


그림 60. 통밀 분쇄도에 따른 전통누룩 성형

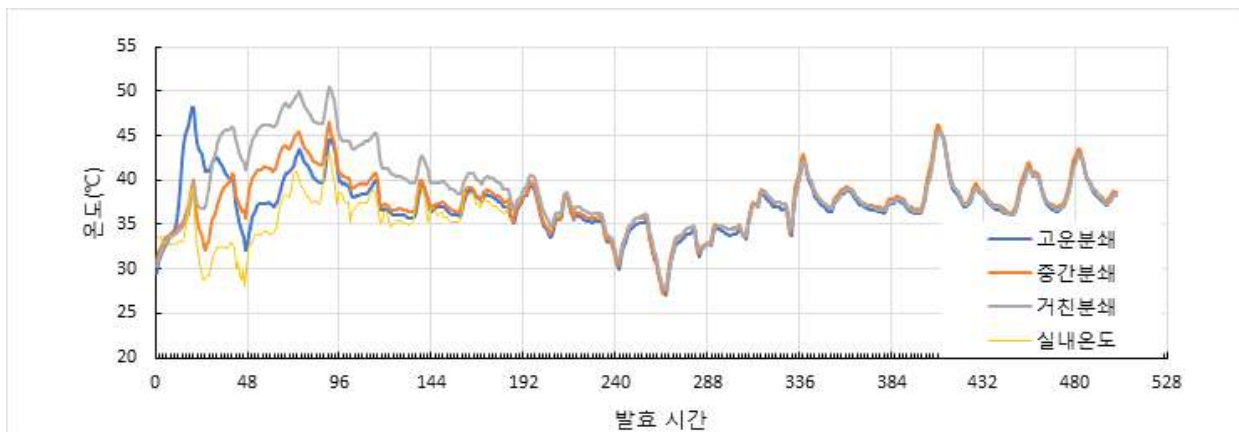


그림 61. 통밀 분쇄도에 따른 전통누룩 발효 시 품온 변화

(3) 통밀 분쇄도에 따라 성형된 전통누룩 분석 및 평가

- 제조된 전통누룩의 효소활성을 측정한 결과 중간 분쇄의 전통누룩이 760sp/g으로 가장 높았고 고운 분쇄 전통누룩이 550 sp/g으로 가장 낮았다. 산성 단백질 분해력은 고운 분쇄 전통누룩이 320 units/g으로 가장 높았고, 거친 분쇄 전통누룩이 240units/g으로 가장 낮았다. 동일 원료로 제조하더라도 통밀의 분쇄도에 따라 효소 활성이 다를 수 있었다(표 50).

표 56. 통밀 분쇄도에 따른 전통누룩의 효소학적 특성 분석 결과

	당화력 (sp/g)	생전분 분해력 (rsp/g)	산성 단백질 분해력 (units/g)
통밀	56	ND	ND
거친분쇄 전통누룩	630	69.3	240
중간분쇄 전통누룩	760	79.8	300
고운분쇄 전통누룩	550	46.8	320

- 제조된 전통누룩 내 미생물을 분석한 결과 분쇄도에 따라 미생물의 유의적인 차이가 크게 보이지 않았다(표 51). 다만 제조된 누룩 풍미를 평가하였을 때 고운 분쇄 전통누룩에서 장류 냄새와 같은 이취가 지속적으로 감지되었는데 *Bacillus* sp. 계열의 세균류는 상대적으로 높지 않았다.

표 57. 통밀 분쇄도에 따른 전통누룩의 미생물학적 특성 분석 결과

(단위, cfu/g)

	곰팡이류	효모류	유산균류	세균류
통밀	1.2E+03	1.8E+04	2.4E+03	7.0E+07
거친분쇄 전통누룩	2.5E+04	2.8E+03	4.4E+03	1.4E+08
중간분쇄 전통누룩	3.1E+03	2.0E+05	6.0E+05	1.0E+07
고운분쇄 전통누룩	9.5E+02	1.2E+04	2.0E+02	1.0E+08

(4) 통밀 분쇄도에 따라 성형된 전통누룩의 양조 발효 특성 확인

- 제조된 전통누룩을 발효제로 사용하여 양조 발효 특성을 평가하였다. 레시피는 표 5을 기반으로 하였다. 밀술은 멥쌀을 범벅으로 가공하여 전통누룩과 함께 빚은 후 25℃에서 4일간 발효한 뒤 멥쌀을 백설기 형태로 가공하여 밀가루(박력분)과 소량의 물로 덧담금 한 뒤 25℃에서 총 10일간 발효하였다.

- 발효 결과 모든 평가구에서 밀술 발효 4일차까지 산도가 급격히 증가하는 경향을 동일하게 보였으며 고운 분쇄 누룩이 12로 제일 높았으며 거친 분쇄 누룩이 11로 제일 낮았다(표 18, 19, 20). 알코올 농도는 미묘하게 증가하다가 덧담금 전 알코올 농도는 중간 분쇄 누룩이 8.12%로 제일 높았으며 거친 분쇄 누룩이 6.81%로 제일 낮았다. 10일 발효 후 술덧에 대한 풍미를 평가한 결과 장류 냄새가 난 고운 분쇄 누룩으로 빚은 술덧에서 장류 계열의 향이 미세하게 감지되었고 관능 시 부정적 영향을 끼치는 것으로 판단되었다. 분쇄도에 따라 양조 발효 패턴은 유사하나 관능적 측면에서 고운 분쇄 누룩이 부정적으로 평가되어 현 발효온도 및 성형조건에서 지역 기반 전통누룩 제조 시 중간 분쇄 이상으로 분쇄하여 제조할 수 있도록 설정하였다.

표 58. 거친 분쇄 전통누룩으로 빚은 술 발효 분석 결과

발효시간 (일)	Alcohol (%, v/v)	Acidity	pH	환원당 (g/L)	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)
1	-	2.1	4.12	85.2	3.5E+03	3.5E+07
2	2.10	6.5	3.83	71.0	5.8E+04	2.8E+08
3	3.12	9.2	3.73	52.3	6.2E+07	6.1E+08
4	6.81	11.0	3.72	12.5	1.8E+08	5.8E+08
5	9.52	5.8	3.89	25.7	1.9E+08	1.5E+08
6	12.88	6.2	4.01	18.3	2.1E+08	2.1E+08
7	14.85	6.9	4.00	12.0	1.5E+08	9.8E+07
8	16.21	7.0	4.08	10.1	9.0E+07	6.8E+07
9	17.13	6.8	4.09	9.1	7.6E+07	7.4E+07
10	18.17	6.9	4.13	8.5	5.8E+07	5.2E+07

표 59. 중간 분쇄 전통누룩으로 빚은 술 발효 분석 결과

발효시간 (일)	Alcohol (%, v/v)	Acidity	pH	환원당 (g/L)	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)
1	-	2.5	4.05	93.0	3.5E+03	3.5E+07
2	2.50	7.8	3.81	69.2	6.1E+04	2.3E+08
3	4.53	9.8	3.75	10.5	8.5E+07	3.1E+08
4	8.12	12.0	3.63	9.5	1.8E+08	6.5E+08
5	11.53	5.8	3.95	21.3	1.5E+08	1.2E+08
6	13.98	6.3	4.05	15.1	2.6E+08	1.1E+08
7	16.12	6.5	4.06	11.0	1.8E+08	8.3E+07
8	17.55	6.8	4.08	7.2	7.9E+07	7.2E+07
9	18.02	6.6	4.11	6.5	5.3E+07	5.1E+07
10	18.56	6.5	4.15	5.1	4.6E+06	3.2E+07

표 60. 고운 분쇄 전통누룩으로 빚은 술 발효 분석 결과

발효시간 (일)	Alcohol (%, v/v)	Acidity	pH	환원당 (g/L)	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)
1	-	1.4	4.52	85.0	3.5E+03	5.5E+07
2	1.81	8.2	3.80	67.0	8.5E+04	1.8E+08
3	2.57	9.5	3.64	32.5	6.7E+07	7.1E+08
4	6.85	12.5	3.93	12.5	1.2E+08	9.1E+08
5	10.58	6.4	3.95	28.0	1.5E+08	1.7E+08
6	13.63	7.1	4.03	18.2	9.8E+07	1.5E+08
7	15.87	7.5	4.05	12.5	7.1E+07	7.1E+07
8	16.58	7.7	4.05	10.2	5.3E+07	5.0E+07
9	17.23	7.8	4.06	11.3	1.2E+07	4.0E+07
10	17.93	7.5	4.03	10.8	3.5E+06	3.1E+07

(5) 지역 기반 맞춤형 전통누룩 제조 표준화 및 매뉴얼화

- 원료 가공 : Roll mill을 통해 거칠게 분쇄하여 분쇄 입자가 2~3mm가 되도록 한다.
- 원료 반죽 : 반죽 후 손으로 움켜쥐어 모양이 잘 나오도록 원료 총량 대비 23~26% 비율로

가수하여 반죽한다.

- 누룩 성형 : 압착기를 사용하여 지름 20cm, 두께 3cm가 크기가 되도록 단단하게 성형한다.
- 누룩 전발효 : 실내온도 38~40℃가 되도록 온도를 조절하고 7일간 발효한다. 이때 누룩 품온이 45℃가 넘지 않도록 한다. 습도는 발효 3일까지 60~70%가 되도록 관리하고 그 뒤 별도 습도 조절은 하지 않는다. 매일 1회씩 전체적으로 뒤집어 준다.
- 누룩 후발효 : 실내온도 35~38℃가 되도록 온도를 조절하고 7일간 발효한다. 별도 습도 조절은 하지 않는다.
- 누룩 건조 : 실내온도가 40℃~42℃가 되도록 온도를 조절하고 서서히 건조시킨다.
- 누룩 법제
- 누룩 분쇄 후 포장

자. 전통누룩의 과학적 해석 및 제조기술 표준화 마련

(1) 전통누룩 유래 곰팡이 배양 최적화

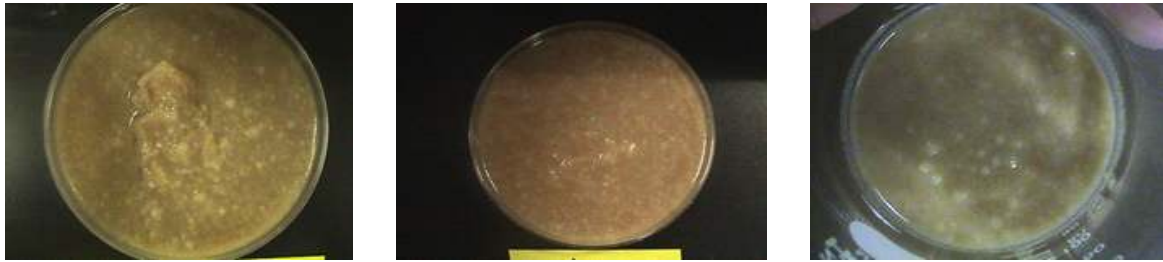
- 전통누룩 내 곰팡이는 Czapek agar, Potato dextrose agar, Malt extract agar, Yeast-malt extract agar에 각각 평판 배양하여 colony의 균체수와 성장형태, 균사, 포자 색깔 등의 변화 등을 관찰하고 동정은 “The Genus *Aspergillus*(1965)”, “An Introduction to Industrial Mycology(1969)”, “Illustrated Genera of Imperfect Fungi(1972)”, “Textbook of Fungi(1989)“, “A Manual of the Aspergilli(1945)“를 참고로 하여 우점하고 있는 곰팡이 3종을 동정하였다. 선별된 누룩곰팡이 3종은 각각 *Aspergillus usamii* K1, *Aspergillus oryzae* K2, *Rhizopus oryzae* K4로 명명하였다.

- 선별된 누룩곰팡이를 이용하여 개량누룩을 제조하고자 배양 최적화를 진행하였다. 개량누룩 제조 시 Seed로 사용되기 위하여 10% 밀기울 배양액에서 초기 최적 배양 pH를 설정하고자 테스트를 진행하였다. 실험은 10% 밀기울 배지를 제조하여 0.1% 구연산 수용액으로 pH를 조절하고 멸균한 뒤, 각 누룩곰팡이를 접종하여 30℃, 150rpm 조건으로 24시간 배양한 후 pH를 측정하였으며 배양 후 성상을 관찰하였다(표 55)

표 61. 각 누룩곰팡이별 액체배양 시 초기 배지 pH에 따른 최종 배양액 pH

초기 배지 pH \ 누룩곰팡이	5.00	4.50	4.00	3.50	3.00	2.50
<i>Aspergillus usamii</i> K1	3.58	3.64	3.15	3.01	2.83	2.43
<i>Aspergillus oryzae</i> K2	3.52	3.57	3.21	3.23	2.95	2.35
<i>Rhizopus oryzae</i> K4	2.95	2.85	2.81	2.75	2.65	2.51

- 각 누룩곰팡이를 액체 배양하였을 때 초기 pH가 높을수록 pellet 형태가 무수히 많이 관찰되었으며 pH가 낮을수록 적었다. *Aspergillus usamii* K1 배양액 풍미는 약간 비릿하면서 쿼퀴한 냄새가 났으나 *Aspergillus oryzae* K2와 *Rhizopus oryzae* K4은 사과향 계열의 은은한 과실향이 났다(그림 57).



(1) pH 3.0

(2) pH 4.0

(3) pH 5.0

그림 62. 액체 배양 초기 pH에 따른 배양액 성장(Rhizopus oryzae K4)

- 상기 배양된 각 누룩곰팡이를 Seed로 하여 멸균된 밀기울에 접종한 후 30℃, 3일 간 고체배양 하였다. 배양 후 출곡하여 40℃에서 1일 건조한 뒤 당화력을 평가한 결과 *Aspergillus usamii* K1와 *Aspergillus oryzae* K2는 pH 3.0에서 *Rhizopus oryzae* K4는 pH 3.5에서 가장 높은 당화력을 보였다. 따라서 개량누룩 제조를 위한 액체 배양 seed 제조 시 초기 pH는 *Aspergillus usamii* K1와 *Aspergillus oryzae* K2는 3.0, *Rhizopus oryzae* K4는 3.5로 각각 선별하였다(표 56, 57, 58).

표 62. *Aspergillus usamii* K1의 액체 seed 배양 초기 pH 별 증자역가(당화력, sp/g)

배양액 pH	5.00	4.50	4.00	3.50	3.00	2.50
당화력	3,980	4,150	4,200	4,800	5,300	2,500

표 63. *Aspergillus oryzae* K2의 액체 seed 배양 초기 pH 별 증자역가(당화력, sp/g)

배양액 pH	5.00	4.50	4.00	3.50	3.00	2.50
당화력	1,800	2,400	2,300	2,200	2,600	1,260

표 64. *Rhizopus oryzae* K4의 액체 seed 배양 초기 pH 별 증자역가(당화력, sp/g)

배양액 pH	5.00	4.50	4.00	3.50	3.00	2.50
당화력	3,800	4,100	4,120	4,500	4,320	4,200

- 각 누룩곰팡이별 밀기울 고체배양 시 최적 배양 기간을 선정하기 위한 연구를 수행하였다. 고체배양은 멸균된 밀기울이 들어있는 삼각플라스크에 누룩곰팡이 배양액을 seed로 하여 1:1로 접종하여 혼합한 후 30℃에서 5일간 배양하되 1일 간격으로 출곡, 건조한 뒤 증자역가를 측정하여 평가하였다.

- *Aspergillus usamii* K1는 배양 2일차까지 당화력이 급격히 증가하다 그 뒤 증가폭이 다소 줄어드는 경향을 보였다. 배양 2일차부터 옅은 갈색 포자가 생성되기 시작하면서 3일차부터는 갈색이 다소 짙어지면서 포자가 많이 생겼고, 출곡 시 포자가 날렸다. 생산성 및 포자 생성에 따른 누룩 배양실 오염도를 감안하여 적정 고체배양은 2일로 설정하였다.

표 65. *Aspergillus usarii* K1의 고체배양 기간 별 증자역가(당화력, sp/g)

고체배양일	1일	2일	3일	4일	5일
당화력	1,260	4,320	4,560	4,620	4,600

- *Aspergillus oryzae* K2는 배양 2일차까지 당화력이 급격히 증가하다 그 뒤 증가폭이 다소 줄어드는 경향을 보였다. 배양 2일차부터 열은 녹색 포자가 생성되기 시작하면서 3일차부터는 녹색이 다소 짙어지면서 포자가 많이 생겼고, 출곡 시 포자가 많이 날렸다. 생산성 및 포자 생성에 따른 누룩 배양실 오염도를 감안하여 적정 고체배양은 2일로 설정하였다.

표 66. *Aspergillus usarii* K1의 고체배양 기간 별 증자역가(당화력, sp/g)

고체배양일	1일	2일	3일	4일	5일
당화력	890	1,850	2,120	2,320	2,200

- *Rhizopus oryzae* K4는 배양 3일차까지 당화력이 급격히 증가하다 그 뒤 증가폭이 다소 줄어드는 경향을 보였다. *Aspergillus* sp.와 달리 포자 생성이 다소 느렸으며 3일차까지 흰색 균사만 보이다가 바깥부터 검은색 포자가 보이기 시작하더니 4일차부터 검은색 포자로 덮였으나 출곡 시 포자는 날리지 않았다. 생산성을 감안하여 적정 고체배양은 3일로 설정하였다.

표 67. *Rhizopus oryzae* K4의 고체배양 기간 별 증자역가(당화력, sp/g)

고체배양일	1일	2일	3일	4일	5일
당화력	1,350	2,800	4,620	4,780	4,600

(2) 전통누룩 유래 곰팡이를 이용한 개량누룩 제조

- 전통누룩은 외부 환경에 의존성이 커 품질이 불균일하고 곰팡이독소 등 안정성에서 문제점이 있는 만큼 이를 해결하기 위해 전통누룩에 우점종으로 존재하고 있는 누룩곰팡이를 종균으로 하여 개량누룩으로 제조하고자 하였다.

- 상기 마련된 조건을 바탕으로 (주)국순당 횡성공장에 있는 생산 설비를 이용하여 개량누룩을 시험 생산하였으며 생산 공정은 아래와 같다.



(1) 누룩곰팡이 Seed 배양



(2) 증자된 밀기울과 Seed 혼합



(3) 고체 배양



(4) 고체 배양



(5) 출곡 및 열풍건조

그림 63. ㈜국순당 생산 설비를 이용한 개량누룩 제조 공정

- 개량누룩 제조에 사용되는 누룩곰팡이 seed 배양은 Jacket type 미생물 배양기(300L, 1,500L)를 사용하였으며 0.1% 구연산 용액으로 pH를 조절한 10% 밀기울 용액을 넣어 멸균한 뒤 접종하여 30℃, 100rpm, aeration 1vvm 조건으로 24시간 배양하여 사용하였다.

표 68. 누룩곰팡이별 액체 seed 배양 분석 결과

누룩곰팡이	배양 전	배양 후	
	pH	pH	산도
<i>Aspergillus usamii</i> K1	3.0	2.90	36
<i>Aspergillus oryzae</i> K2	3.0	3.11	28
<i>Rhizopus oryzae</i> K4	3.5	2.75	75

- 개량누룩 제조는 증기로 고압·멸균한 밀기울을 원료로 사용하였으며, 누룩곰팡이 seed 배양액과 1:1 비율로 혼합하여 수분함량이 55~65%가 되도록 한 다음 직사각형의 알미늄 상자(vat)에 깊이 1.5~2.0cm의 두께가 되도록 고루 펴서 넣은 뒤 뚜껑을 닫고 누룩 배양실에 넣어 습도 85~90%, 배양실 내부 온도 30℃로 setting 한 다음 2~3일간 배양하였다. 고체 배양 시 내부 품온 조절은 vat 위에서 cooling water를 직접 분사하는 방식인 수냉식 방법으로 조절하였다.

- *Aspergillus usamii* K1을 종균으로 하여 개량누룩을 제조하였다. 접종 3시간 후부터 온도가 상승되기 시작하였고 6시간부터 cooling water를 가동하여 품온을 조절하였다(그림 71). 12시간부터 균사가 피어나기 시작하였으며 30시간부터 포자가 열게 생성되었다(그림 72). 48시간 배양 종료 후 출곡한 뒤 40℃ 열풍 건조하였다.

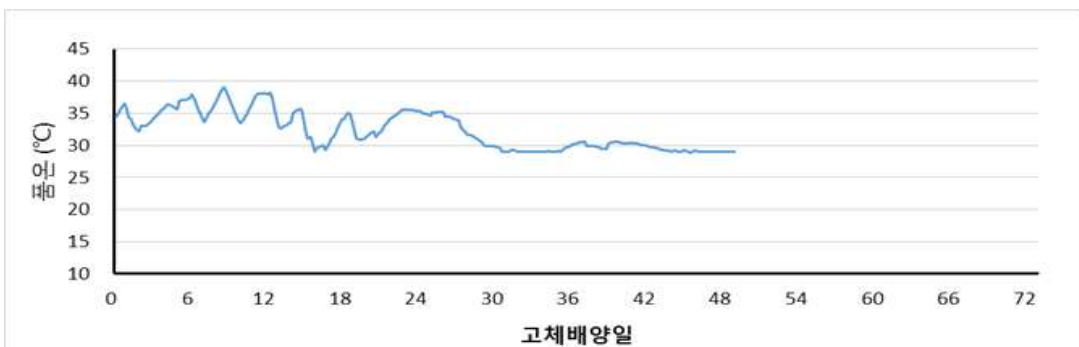


그림 64. *Aspergillus usamii* K1, 밀기울 고체배양 시 시간에 따른 품온 변화



그림 65. *Aspergillus usamii* K1 고체 배양(48시간) 후 출곡 전 모습

- *Aspergillus oryzae* K2를 종균으로 하여 개량누룩을 제조하였다. 배양 초기 품온 상승 속도는 *Aspergillus usamii* K1에 비해 다소 느렸으며 배양 10시간부터 35℃를 넘기 시작하여 cooling water를 가동하여 품온을 조절하였다. 18시간부터 30시간까지 37~38℃ 품온이 유지되다가 30시간부터 서서히 떨어지기 시작하였다(그림 73). 포자 생성은 다른 누룩곰팡이에 비해 다소 빠르게 생성되었다(그림 74). 48시간 배양 종료 후 출곡한 뒤 40℃ 열풍 건조하였다.

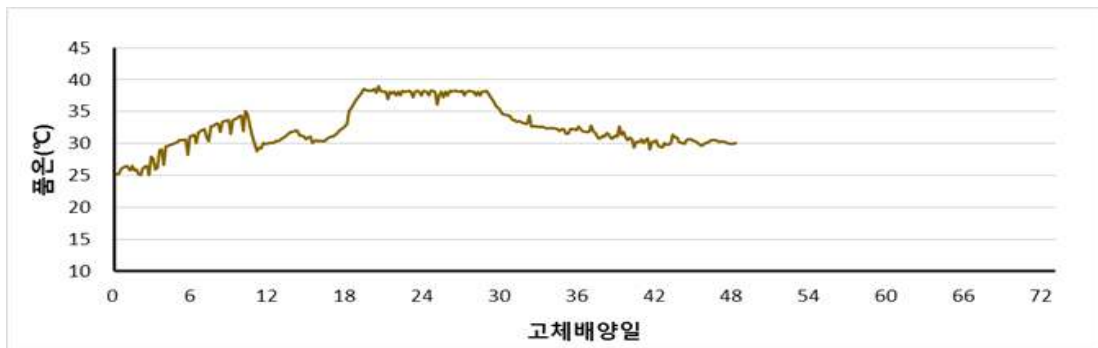


그림 66. *Aspergillus oryzae* K2, 밀기울 고체배양 시 시간에 따른 품온 변화



(1) 배양 12시간

(2) 배양 24시간

(3) 배양 48시간

그림 67. *Aspergillus oryzae* K2 고체 배양 시간에 따른 모습

- *Rhizopus oryzae* K4를 종균으로 하여 개량누룩을 제조하였다. 초기 품온은 다소 낮았으나 지속적으로 증가하는 경향을 보였으며 배양 6시간부터 cooling water를 가동하여 품온 조절을 하였다. 품온 조절 시작 후 30℃로 유지되다가 12시간부터 급격히 상승하여 최고 온도 40℃까지 올라갔다가 그 후 서서히 감소하였다(그림 75). *Aspergillus* sp.에 비해 포자 생성속도는 매우 느렸으며 길고 흰 균사가 촘촘히 생성되었다. 72시간 배양 종료 후 출곡한 뒤 40℃ 열풍 건조하였다.

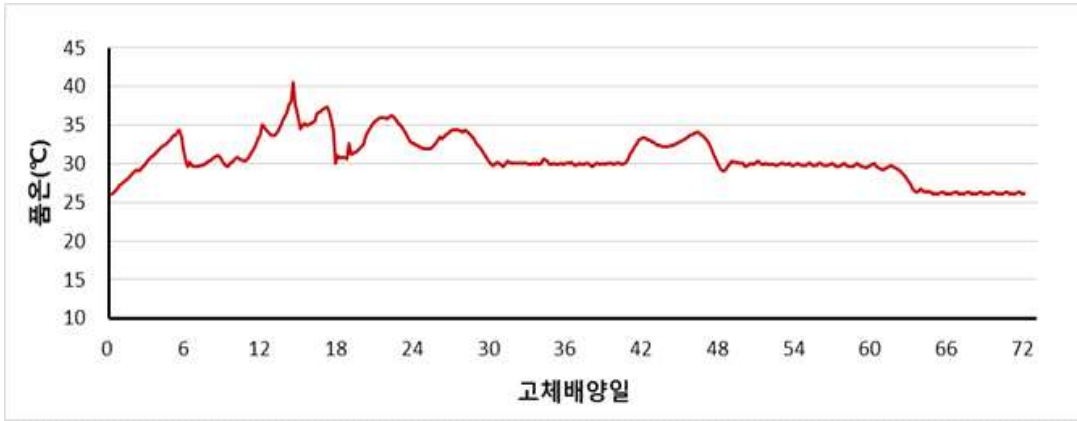


그림 68. *Rhizopus oryzae* K4, 밀기울 고체배양 시 시간에 따른 품온 변화

(3) 제조된 개량누룩의 미생물 및 효소학적 특성 평가

- 각 누룩곰팡이를 종균으로 제조한 개량누룩의 효소학적 특성 평가를 진행하였다. 당화력은 *Aspergillus usarii* K1가 4,800sp로 가장 높았으며 *Aspergillus oryzae* K2는 850sp으로 전통누룩에 비해서는 높았으나 다른 개량누룩에 비해서는 가장 낮은 결과를 보였다. 생전분분해력은 *Rhizopus oryzae* K4가 420sp로 가장 높았으며 *Aspergillus usarii* K1와 *Aspergillus oryzae* K2가 각각 120sp, 20sp로 측정되었다(표 81).

표 69. 누룩곰팡이 별 제조된 개량누룩의 효소학적 분석 결과

	수분함량	당화력 (sp/g)	생전분분해력 (rsp/g)	Acidic protease (units/g)
<i>Aspergillus usarii</i> K1	4.85%	4,800	120	3,100
<i>Aspergillus oryzae</i> K2	7.86%	850	20	250
<i>Rhizopus oryzae</i> K4	5.12%	4,500	420	5,620

- 제조된 개량누룩 내 미생물을 분석하였다. 미생물 배지 및 agar plate 상 colony 형태를 통해 선별 및 개체수를 평가한 결과 제조된 개량누룩 내 효모류, 유산균류 및 일반세균류가 다양하게 존재하였다. 제조된 개량누룩 중 *Aspergillus oryzae* K2의 경우 다른 개량누룩에 비해 미생물 농도가 10~10,000배 정도 높은 것으로 나타났다. 이는 발효 중 누룩곰팡이의 번식이 원활하지 못하였고 고체배양 중 외부 환경으로부터 유입되어 번식되어진 것으로 생각된다(표 82).

표 70. 누룩곰팡이 별 제조된 개량누룩 내 미생물학적 분석 결과 (단위, cfu/g)

	효모류	유산균류	일반세균류
<i>Aspergillus usarii</i> K1	2.5E+03	7.0E+03	3.5E+03
<i>Aspergillus oryzae</i> K2	5.5E+07	6.0E+07	3.2E+04
<i>Rhizopus oryzae</i> K4	5.6E+04	3.4E+04	1.5E+02

(4) 복합 개량누룩 제조

- 단일 누룩곰팡이를 종균으로 한 개량누룩에 전통누룩과 같이 다양성을 부여하고자 제조된 개량누룩을 혼합하여 복합 개량누룩을 제조하였다. 제조된 각 개량누룩을 분쇄한 뒤 1 : 1 : 1 비율로 혼합 하였다. 최종 당화력이 1,200sp이 되도록 밀가루(박력분)을 혼합한 뒤 총 원료량 대비 40%로 멸균수를 가하여 반죽 후 압축성형기로 성형 후 40℃에서 2시간 열풍 건조하여 제조하였다.

- 제조된 복합 개량누룩과 시판 중인 개량누룩(K사, 한국 화성시)와 비교 분석하였다(표 31). 제조된 복합 개량누룩은 시판 개량누룩에 비해 누룩취가 덜 하였으며, 장류 유래 쿼퀴한 이취도 적었다. 시판 개량누룩에 비해 당화력 및 단백분해력은 다소 낮았으나 이는 제조 시 최종 당화력 조절로 충분히 높일 수 있을 것으로 판단된다. 개량누룩 내 미생물은 시판 개량누룩과 같이 다양한 미생물이 존재하였으며 효모 및 유산균 수는 동등 내지는 1/10 수준으로 존재하였으며 풍미에 부정적 영향을 미치는 고초균류(*Bacillus* sp.)의 경우 약 1/1,000 수준으로 낮게 존재하였다.

표 71. 제조된 복합 개량누룩과 시판 중인 개량누룩과의 비교 결과

종류	수분 함량 (%)	효소		미생물			
		당화력 (sp/g)	단백분해력 (units/g)	효모류 (cfu/g)	곰팡이류 (cfu/g)	유산균류 (cfu/g)	고초균류 (cfu/g)
복합 개량누룩	2.30	1,656	1,800	2.00E+02	2.00E+03	3.86E+05	2.80E+04
시판 개량누룩	4.71	2,652	2,900	6.00E+03	2.00E+03	4.00E+06	7.00E+07

(5) 제조된 복합 개량누룩을 이용한 양조 및 관능 특성 평가

- 제조된 복합개량누룩을 이용하여 표 32의 레시피로 술을 빚은 후 양조 및 관능 특성 평가를 진행하였다. 대조구로 시판 중인 개량누룩(K사)을 사용하였다. 개량누룩 사용량은 총 전분질 원료 대비 6% (w/w) 사용하였으며 1단 담금 시 전량 사용하여 25℃에서 4일간 발효 후 2단 담금한 후 25℃에서 총 10일 간 발효하였다.

표 72. 개량누룩 양조 특성 평가를 위한 술 담금 레시피

	1단 담금	2단 담금
멥쌀_고두밥	300g	2,700g
개량누룩	180g	-
효모	-	28.5g
물	999 mL	3,240 mL

- 1단 발효 시 개량누룩 내 존재하는 유산균에 의해 발효 산도가 급격히 증가하는 경향을 보였으며 발효가 진행될수록 알코올이 서서히 증가하는 경향을 보였다. 발효 4일차 산도는 복합 개량누룩이 20.8, 시판 개량누룩이 27.2로 시판 개량누룩 산도가 다소 높았다. 알코올 균일 발효를 이끌기 위해 1단 발효 후 2단 담금 시 멥쌀과 시판 효모를 투입하여 발효를 진행하였다. 최종 발효 결과 복합 개량누룩은 알코올 18.09%, 산도 9.6이었으며, 시판 개량누룩은 알코올 18.52%에 산도가 9.7로 분석되어 상호 비슷한 발효 패턴을 나타냈다(표 85, 86).

표 73. 복합 개량누룩으로 빚은 술덧 발효 분석 결과

발효시간 (일)	Alcohol (%, v/v)	Acidity	pH	환원당 (g/L)	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)
1	-	3.1	5.89	65.2	1.50E+07	8.20E+07
2	-	10.8	3.95	42.1	2.15E+07	6.50E+08
3	-	15.9	3.93	21.8	1.20E+08	7.25E+08
4	3.85%	20.8	3.79	32.1	1.37E+08	3.64E+09
5	11.07%	9.6	4.03	24.7	2.39E+08	7.30E+08
6	13.52%	9.7	4.05	28.2	2.10E+08	5.50E+07
7	15.74%	9.8	4.07	35.0	1.87E+08	8.00E+06
8	16.48%	9.9	4.19	32.6	1.60E+08	1.00E+06
9	17.58%	9.7	4.20	33.5	1.10E+08	1.20E+06
10	18.09%	9.6	4.22	35.9	7.80E+07	2.12E+06

표 74. 시판 개량누룩으로 빚은 술덧 발효 분석 결과

발효시간 (일)	Alcohol (%, v/v)	Acidity	pH	환원당 (g/L)	Yeast (cfu/mL)	LAB (cfu/mL)
1	-	3.5	5.20	110.5	3.50E+07	6.12E+07
2	-	19.5	3.89	120.0	1.20E+08	8.50E+08
3	3.29%	23.6	3.72	104.0	1.50E+08	3.91E+09
4	7.81%	27.2	3.83	26.0	2.10E+08	1.75E+09
5	10.33%	9.4	3.98	18.0	2.15E+08	8.25E+08
6	11.95%	9.8	4.00	24.0	1.50E+08	7.30E+08
7	12.75%	10.1	4.06	33.4	1.20E+08	5.08E+08
8	14.72%	10.1	4.08	32.5	1.00E+08	8.50E+07
9	16.82%	10.0	4.10	35.4	9.70E+08	5.50E+07
10	18.52%	9.7	4.16	38.6	5.50E+07	5.50E+06

- 술 발효비율 평가 결과 복합 개량누룩 78.27%, 시판 개량누룩 80.13%로 시판 개량누룩이 약 2% 정도 높았으며 원료 이용률은 복합 개량누룩이 86.04%, 시판 개량누룩이 88.48%으로 나타났다(표 87).

표 75. 각 개량누룩으로 빚은 술덧 효율성 평가

	발효비율	원료이용률
복합 개량누룩	78.27%	86.04%
시판 개량누룩	80.13%	88.48%

- 발효 술덧에 대한 관능검사를 진행한 결과 복합 개량누룩으로 빚은 전반적으로 풍미가

약하지만 은은한 사과 계열의 과실향이 있으면서 부드럽고 깔끔한 것이 특징이었다. 시판 개량누룩으로 빚은 술덧은 복합 개량누룩과 유사한 계열의 풍미가 약간 강한 편이었으나 누룩취가 약간 더 강한 것이 특징적이었다(표 88).

표 76. 지역 기반 전통누룩으로 빚은 술덧 관능 평가

종류	관능점수 (9점 척도 ¹)	관능묘사
복합 개량누룩	8.5	은은한 과실향, 풍미 다소 약하나 조화로움, 깔끔함
시판 개량누룩	7.5	은은한 과실향, 풍미와 누룩취가 다소 강함

1) 9점 척도법 : 0점(아주 나쁨) - 3점(나쁨) - 5점(보통) - 7점(좋음) - 9점(아주 좋음)

- 시험 생산한 복합 개량누룩은 전통누룩에 비해 우수한 역가 및 양조 특성을 보여주어 향후 기능적으로 우수한 전통주 개발에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

차. 전통누룩 유래 효모 특성 규명 및 추가 선별

(1) 알코올 내성 평가

- 일반적으로 일정 농도 이상의 알코올 농도에서 효모의 생육이 저해되기 때문에 알코올 내성이 약할 경우 양조 발효 시 부정적인 영향을 준다. 따라서 알코올 내성을 갖는 것이 양조효모로서 적합하다.

- 전통누룩으로부터 분리한 효모 48종에 대한 알코올 내성을 평가하였다. 먼저 배양된 대수 증식기의 효모를 알코올이 각각 1, 10, 15%(v/v)의 농도로 함유된 YPD Broth 30mL에 초기 균수 $1.0E+05$ cells/mL의 농도로 접종한 후, 30°C, 150rpm 조건으로 24시간 배양한 뒤 배양액을 취하여 희석한 후 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 1단계에서 선별된 2종 외 신규 분리 효모 48종 중 알코올 내성이 높은 것으로 평가되는 상위 3종에 대한 결과는 표 37과 같다. 평가 결과 알코올 5%일 때 알코올에 대한 내성은 기 선별 균주인 KSD-YC가 다른 효모에 비해 최대 0.4배 더 높았으며, 알코올 10%일 때 알코올에 대한 내성은 기 선별 균주인 KSD-BH가 다른 효모에 비해 최대 3.5배 더 높았다. 신규 분리된 균주는 기 선별 균주보다 알코올 내성은 약하였으나 국내 시판 효모와 동등하거나 약간 높은 경향을 가진 것으로 평가되었다.

표 77. 자사 지역기반 전통누룩 유래 분리 효모에 대한 알코올 내성 평가

	Alcohol Tolerance (OD ₆₀₀)				비고
	Alc.1%	Alc.5%	Alc.10%	Alc.15%	
KSD-YC	4.03	8.40	0.23	0.03	기 선별 균주
KSD-BH	3.34	8.03	0.42	0.01	기 선별 균주
KSD-IY-21	3.12	7.15	0.14	0.00	신규 분리 균주
KSD-JP-36	3.13	7.51	0.15	0.00	신규 분리 균주
KSD-CH-41	2.99	7.13	0.12	0.00	신규 분리 균주
Yeast C_Wet	2.58	6.85	0.10	0.00	시판 효모
Yeast F_Dry	3.00	7.11	0.13	0.00	시판 효모

(2) 나. 당 내성 평가

- 양조효모는 고농도의 당에서 생육하면서 알코올 발효를 할 수 있어야 발효비율 측면에서 유리하다. 그러므로 신규 분리 효모에 대한 당 내성을 평가하였다. 먼저 배양된 대수기의 효모를 포도당 농도가 각각 2, 10, 20, 30, 40%(w/v)로 조절된 YPD Broth 배지에 초기 균수 1.0E+05 cells/mL의 농도로 각각 접종한 후 30℃, 150rpm 조건에서 배양하였다. 배양 48시간 경과 후 배양액을 취하여 적당히 희석한 후 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 대부분의 효모들이 포도당 농도 20%에서 가장 높은 생육을 보였으며 특히, KSD-YC는 다른 균주에 비해 최대 2배 높은 내당성을 보였다(표 38).

표 78. 자사 지역기반 전통누룩 유래 분리 효모에 대한 당 내성 평가

	Glucose Tolerance (OD ₆₀₀)					비고
	2%	10%	20%	30%	40%	
KSD-YC	5.86	12.77	14.12	12.11	9.19	기 선별 균주
KSD-BH	4.91	11.57	13.61	11.02	8.14	기 선별 균주
KSD-IY-21	3.86	10.58	12.56	10.19	5.66	신규 분리 균주
KSD-JP-36	3.75	10.11	11.25	9.87	6.01	신규 분리 균주
KSD-CH-41	3.91	9.88	10.01	8.51	5.15	신규 분리 균주
Yeast C_Wet	3.12	10.15	12.78	10.53	4.58	시판 효모
Yeast F_Dry	4.12	10.95	12.58	9.12	5.55	시판 효모

(3) 온도별 양조발효 특성 평가

- 신규 분리 효모 3종에 대한 양조학적 특성을 평가하기 위해 쌀을 주원료로 하여 담금 후 온도별로 발효를 진행하였다. 쌀은 증자하지 않고 무증자로 진행하였으며 쌀 900g, 물 1,350mL, 개량누룩 8.6g(당사)에 1단 담금 직후 술덧 mL 당 6.5E+07 cells/mL의 농도가 되게끔 배양된 효모를 각각 혼합한 뒤 15℃, 20℃ 및 25℃ 조건에서 1일간 발효하였다. 발효 후 쌀 2,100g, 물 3,150mL 및 개량누룩 20.1g을 추가로 첨가하여 2단 담금을 진행하고 각 15℃, 20℃ 및 25℃ 조건으로 2단 발효를 진행하였다. 1단과 2단 발효 온도는 동일하게 하였다. 발효 온도에 따른 이화학적 분석을 진행하였으며, 분석 항목은 알코올 농도, 산도, 환원당 및 발효 비율을 평가하였다. 발효 비율은 아래의 식에 의거하여 계산하였다.

$$\text{발효 비율 (\%)} = \frac{\text{실제 알코올 생성량 (L)}}{\text{이론 알코올 생성량 (L)}} \times 100$$

$$= \frac{\text{숙성 술덧량(L)} \times \text{실제 발효 알코올 농도(\%)}}{\text{쌀 사용량(kg)} \times \text{쌀 알코올 환산계수(0.715)} \times \text{쌀 전분가(78)}} \times 100$$

- 모든 효모에서 발효 온도가 낮을수록 발효비율은 높아지는 것으로 나타났다. 자사 지역기반 전통누룩에서 분리된 효모 중 기 선별된 KSD-YC가 발효 비율이 전 발효 온도 구간에서 높았으며 발효 산도가 낮아 부드럽고 깔끔한 주질 구현에 적합할 것으로 판단되었다. 신규 분리된 KSD-IY-21 효모의 경우 25℃에서 알코올 발효능은 양호한 편이나 20℃ 이하 저온발효 시 알코올 발효능이 낮아 저온발효에는 적합하지 않는 것으로 판단된다(표 91,92,93)

표 79. 15℃에서 16일 발효 시 효모별 양조 발효 특성 평가

효모 종류	알코올(% v/v)	총산(% w/v)	환원당(mg/mL)	발효비율(%)
KSD-YC	20.1	0.15	9.8	90.2
KSD-BH	19.8	0.22	5.3	88.7
KSD-IY-21	13.5	0.31	10.5	56.9
KSD-JP-36	18.6	0.23	13.7	78.4
KSD-CH-41	18.9	0.22	17.2	79.6

표 80. 20℃에서 8일 발효 시 효모별 양조 발효 특성 평가

효모 종류	알코올(% v/v)	총산(% w/v)	환원당(mg/mL)	발효비율(%)
KSD-YC	19.6	0.17	13.2	87.7
KSD-BH	20.0	0.23	10.7	89.4
KSD-IY-21	15.3	0.21	20.5	64.5
KSD-JP-36	18.2	0.25	31.3	76.7
KSD-CH-41	18.0	0.23	23.9	75.9

표 81. 25℃에서 7일 발효 시 효모별 양조 발효 특성 평가

효모 종류	알코올(% v/v)	총산(% w/v)	환원당(mg/mL)	발효비율(%)
KSD-YC	18.6	0.17	25.6	78.4%
KSD-BH	20.0	0.22	4.8	84.3%
KSD-IY-21	16.8	0.20	30.4	70.6%
KSD-JP-36	16.9	0.27	40.0	71.2%
KSD-CH-41	16.8	0.31	38.4	70.6%

(4) 라. 관능 평가

- 쌀을 주원료로 하여 20℃에서 발효 및 제조된 양조효모별 최종 발효 술덧을 이용하여 관능 검사를 실시하였다. 먼저 훈련된 검사 연구원 10명을 선발하고 9점 척도법(1-좋지 않다, 3-좋지 않은 편이다, 5-보통이다, 7-좋은 편이다, 9-좋다)을 통해 맛과 향 및 전체적인 선호도를 조사하였다(표 42). KSD-YC의 경우 향, 맛 및 기호도 측면에서 관능적으로 우월한 것으로 평가되었으며 은은한 과일향과 부드러움, 깔끔함이 특징인 것으로 묘사되었다. KSD-BH의 경우 복숭아 계열의 과일향과 적절한 감산미, 담백한 것이 특징적인 것으로 나타났다. KSD-IY-21는 부드러우면서 묵직한 바디감이 특징적이었으나 미세 신향이 부정적인 것으로 나타났다. 전통누룩에서 분리한 효모의 양조 및 관능 특성을 바탕으로 주류 제품 개발 시 부여하고자 하는 주질에 적합한 효모를 사용될 수 있도록 pool을 마련할 예정이다.

표 82. 전통누룩 유래 양조효모 별 20℃ 최종 발효 술덧에 대한 관능검사 결과

	KSD-YC	KSD-BH	KSD-IY-21	KSD-JP-36	KSD-CH-41
맛	7.5	7.1	6.5	5.7	6.2
향	7.8	7.5	4.0	6.2	5.7
기호도	7.6	7.0	5.5	6.2	6.5
관능묘사	은은한 과일향, 깔끔함	복숭아 향, 담백함	신향, 부드러움, 묵직함	알콜취, 누룩향, 묵직함, 부드러움	알콜취, 누룩향, 부드러움

카. 전통누룩 유래 유산균의 특성 탐색 및 Probiotics 효과 확인

- 1단계 과정에서 선별되어 '1000억 유산균 막걸리' 제품에 적용된 *Lactobacillus plantarum* KL-4과 신규 분리한 *Lactobacillus plantarum* KM-7, *Lactobacillus* KSD-KJ-3에 대하여 전통주 양조 적합성과 probiotics로서의 가치를 평가하기 위해 기본적 특성을 탐색하였다.

(1) 알코올 함유 배지에서의 고농도 배양 평가

- 전통누룩 유래 유산균이 probiotics로서의 역할을 기대하기 위해 고농도 배양 여부가 가능한지 살펴보고자 알코올 농도가 각각 3% 및 5%를 함유한 MRS broth 배지에 접종하여 37°C에서 시간별 농도를 평가하였다(표 43, 44). 평가 결과 알코올 농도 5%보다 3% 일 때 높은 균체수를 보였으며, *Lb. plantarum* KL4 유산균이 다른 유산균보다 고농도로 배양되었다. *Lb. brevis* KSD-KJ-2가 가장 낮은 농도로 배양됨에 따라 알코올에 대한 내성이 적은 것으로 판단된다.

- 주류 제품에 기 활용된 *Lb. plantarum* KL4 유산균과 추가적으로 probiotics 활용 가능한 고부가가치 주류 제품에 활용할 유산균으로 *Lb. plantarum* KM7과 *Lb. brevis* KSD-KJ-3을 선정하였다.

표 83. 알코올 3%를 함유한 MRS broth에서 시간별 각 유산균 배양 농도 결과

Strains Time	<i>Lb. plantarum</i> KL4	<i>Lb. plantarum</i> KM7	<i>Lb. brevis</i> KSD-KJ-1	<i>Lb. brevis</i> KSD-KJ-2	<i>Lb. brevis</i> KSD-KJ-3
0hr	2.0E+07	2.3E+07	1.9E+07	1.5E+07	2.1E+07
12hr	5.0E+08	3.5E+08	1.2E+08	2.1E+08	4.5E+08
24hr	1.9E+09	8.5E+08	4.2E+08	3.6E+08	8.8E+08
36hr	3.6E+09	1.0E+09	7.8E+08	6.5E+08	9.5E+08

표 84. 알코올 5%를 함유한 MRS broth에서 시간별 각 유산균 배양 농도 결과

Strains Time	<i>Lb. plantarum</i> KL4	<i>Lb. plantarum</i> KM7	<i>Lb. brevis</i> KSD-KJ-1	<i>Lb. brevis</i> KSD-KJ-2	<i>Lb. brevis</i> KSD-KJ-3
0hr	2.0E+07	2.3E+07	1.9E+07	1.5E+07	2.1E+07
12hr	4.5E+08	2.1E+08	1.0E+08	1.5E+08	3.3E+08
24hr	1.0E+09	7.7E+08	3.8E+08	2.8E+08	7.2E+08
36hr	2.5E+09	8.9E+08	5.8E+08	3.5E+08	8.1E+08

(2) 알코올 내성 평가

- 선별된 유산균의 알코올 내성 한계를 확인하기 위해 알코올 농도(0~15%)를 달리한 MRS broth 배지에서 30°C에서 48시간 정치 배양시킨 다음 단계별 희석한 뒤 MRS agar plates에 도말하여 생균수를 측정하였다.

- 전통누룩 유래 선별 유산균 모두 알코올 농도가 증가함에 따라 균체수가 감소하는 경향을 나타냈는데 *Lb. brevis* KSD-KJ-3가 *Lb. plantarum* KL-4가 *Lb. plantarum* KM-7에 비해 감소폭이 더 컸다(그림 14). 특히 알코올 농도 9%에서부터 *Lb. plantarum* KL-4와 *Lb. brevis* KSD-KJ-3는 급격히 낮은 생존율을 보였다. 이러한 결과는 막걸리에서 분리했던 *Lb. casei*의 경우 알코올 6%로 첨가된 배지에서 정상적으로 증식이 이루어졌으나 알코올 농도 10% 이상에서는 증식이 거의 이루어지지 않았다는 보고와 유사하였다. *Lb. plantarum* KM-7 유산균이 다른 유산균에 비해 알코올에 대한 내성이 높은 것으로 평가하였으며 선별된 유산균은 에탄올 농도 9% 시점부터 크게 저해 받는 것으로 평가되었다.

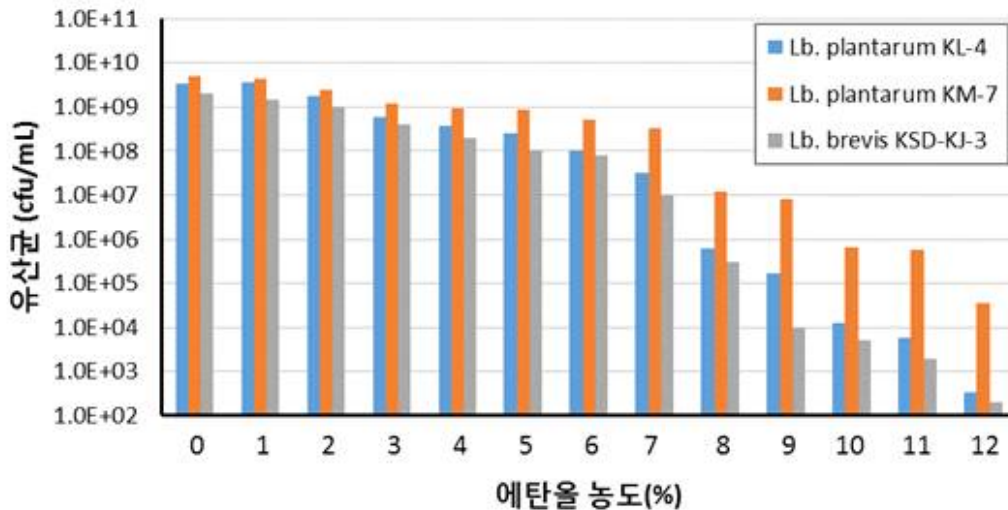


그림 69. 전통누룩 유래 유산균의 알코올 내성 평가

(3) Probiotics 능 평가를 위한 내산성 및 내담즙성 평가

- 유산균이 Probiotics로서의 기능을 발휘하기 위해서는 소화관 내 조건에서 생존해야 한다. 구강을 통해 섭취된 유산균은 위액과 각종 효소가 존재하는 위를 통과하고, 담즙이 존재하는 십이지장을 거쳐 최종 목적 부위인 장에 도달해야 기능적인 효과를 나타낼 수 있다. 유산균이 위에서 위산과 같은 낮은 pH에서 생존하기 위해서는 위산에 대한 내성을 나타내야 하며, 담즙성에 대한 내성을 지니는 것이 probiotics의 기본 특성이다. 유산균 중 *Lactobacillus plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. brevis*, *Pediococcus pentosaceus*가 높은 내산성을 나타내는 균주가 보고된 바 있다.

- 위는 위액으로 인해 pH가 2.0으로 대부분의 미생물은 죽게 된다. 그러나 음식물을 소화할 때 위의 pH는 2~3시간동안 2.0 이상으로 상승한다. 따라서 내산성은 probiotics 균주로서의 기본적인 조건이다.

- 내산성 평가 방법은 다음과 같다. 유산균을 MRS broth에서 30°C, 24시간 배양한 후 10mL를 취하여 같은 조건으로 2차 배양한 뒤, 원심분리(13,000 x g, 20min, 4°C)하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체를 2mL PBS buffer(pH 7.2)로 2번 세척한 뒤 1 mL PBS buffer로 재현탁하여 실험에 사용하였다. 재현탁한 유산균을 MRS agar 배지에 단계별로 희석하여 초기 균체수를 측정하였고, 5M HCl로 pH 2.5와 pH 3.0으로 조절된 PBS buffer 2mL에 각각 현탁액 100 μ L를 접종하여 30°C에서 4시간 배양한 뒤 MRS agar 배지에서 생존된 균체수의 농도를

측정하였다. 생존율은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{Survival rate(\%)} = (\text{Number of LAB after 4hr of acid challenge} / \text{Initial number of LAB}) \times 100$$

- 내담즙성은 0.3% oxgall를 첨가하여 pH 8.0으로 조절한 MRS 배지에 재현탁한 유산균을 접종하여 30℃에서 4시간 배양한 뒤 내산성 측정할 때와 동일한 방법으로 생균수의 농도를 측정하였다. 생존율은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{Survival rate(\%)} = (\text{Number of LAB after 4hr of oxgall challenge} / \text{Initial number of LAB}) \times 100$$

- 상기 균주에 대한 내산성 평가 결과 pH가 낮을수록 생존율은 낮아졌으며 *Lb. brevis* KSD-KJ-3, *Lb. plantarum* KM-7, *Lb. plantarum* KL-4 순서로 내산성이 높은 것으로 평가되었다(표 97).

표 85. pH 2.5와 3.0에서의 내산성 평가

Strains	pH	균체수 (cfu/mL)		생존율(%)
		0 hr	4 hr	
<i>Lb. plantarum</i> KL-4	6.5	5.0E+09	4.8E+09	96.00
	3.0	5.3E+09	4.8E+08	9.43
	2.5	4.8E+09	1.5E+02	0.00
<i>Lb. plantarum</i> KM-7	6.5	2.5E+10	3.1E+10	124.00
	3.0	2.5E+10	7.4E+09	29.60
	2.5	2.5E+10	3.5E+07	0.14
<i>Lb. brevis</i> KSD-KJ-3	6.5	2.3E+09	1.9E+09	82.61
	3.0	2.3E+09	8.5E+08	36.96
	2.5	2.3E+09	6.3E+07	2.74

- 상기 균주에 대한 내담즙성 평가 결과 pH 8.0에서 3종의 유산균은 생존에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 평가되었다(표 98).

표 86. pH 8.0에서 내담즙성 평가

Strains	pH	균체수 (cfu/mL)		생존율(%)
		0 hr	4 hr	
<i>Lb. plantarum</i> KL-4	8.0	5.3E+09	4.2E+09	79.25%
<i>Lb. plantarum</i> KM-7	8.0	2.5E+09	3.9E+09	156.00%
<i>Lb. brevis</i> KSD-KJ-3	8.0	2.3E+09	2.5E+09	108.70%

- 위 결과들을 종합하여 볼 때 지역기반 전통누룩에서 분리된 *Lb. plantarum* KL-4와 *Lb. plantarum* KM-7, *Lb. brevis* KSD-KJ-3은 내산성 및 내담즙성이 높은 것으로 나타나 Probiotics 능이 높을 것으로 판단되었다.

타. 전통누룩 유래 미생물 유전자원 맞춤형 pool 구축

- 1단계에서 발굴한 미생물 유전자원과 자사 지역기반 전통누룩에서 분리한 신규 효모 및 유산균에 대한 양조 및 관능 특성 결과를 바탕으로 주류 등 고부가가치 기능성 제품에 활용하고자 pool을 마련하였다(그림 77, 78)

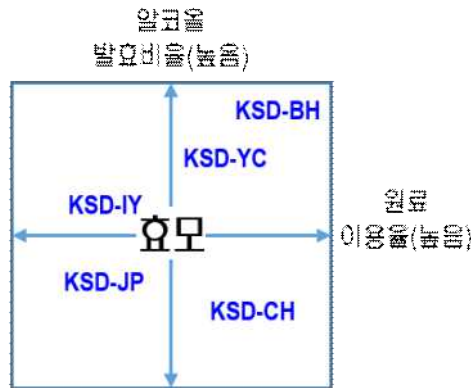


그림 70. 전통누룩 유래 양조효모 발효특성에 따른 분류

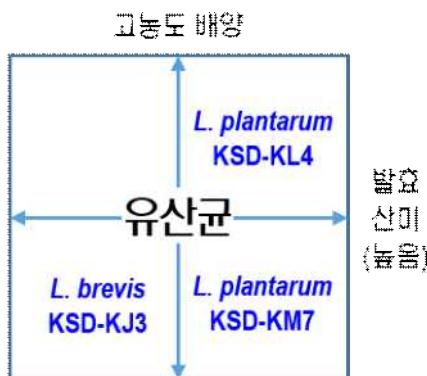


그림 71. 전통누룩 유래 유산균 고농도 배양 및 관능 특성에 따른 분류
 파. Probiotics 검증된 유산균의 종균화 및 제재화

(1) 고농도 배양 가능 유산균 배지 선정

- 현재 산업화에 이용되고 있는 유산균 배양의 경우 다음의 2가지 목적성을 가지고 있다.

(1) 고농도 배양 배지

(2) 기능과 관능 향상을 위한 유산균 발효 배지

고농도 유산균을 얻기 위한 배지 조성의 경우 유산균 증식을 목적으로 하기 때문에 일반적으로 배양액은 관능적으로 적합하지 않으며 원심분리 공정 후 제거가 된다. 식음료를 전제로 한 발효액의 경우 관능적으로 적합할 수 있으나 유산균의 농도가 고농도 배양 보다 낮다.

- 이에 본 연구에서는 유산균을 대량으로 배양할 수 있음과 동시에 배양액을 식음료로 직접 적용할 수 있도록 개발하고자 하였고 더 나아가 동결건조 방법을 통해 제재의 형태를 갖출 수 있도록 하였다. 이와 같은 목적에 의해 개발된 배지를 이하 '주박 배지'라 칭하였다.

(2) 주박 배지의 조성 및 배양 조건 최적화

- 유산균 배지 조성 중 공통적으로 사용되는 핵심 요소들은 당류, 펩톤류, 효모 추출물 등이 있다. 하지만 펩톤과 효모추출물을 사용할 경우 관능적으로 식음에 적합하지 않다. 따라서 이를 대체하기 위해 막걸리 발효 과정에서 생성되는 부산물인 주박(=막걸리박, 술지게미)을 유산균의 주된 영양원으로 활용하였다. 주박은 강원도 횡성(국순당 횡성공장)에서 공급받아 사용하였다.

- 유산균의 종균화 및 제재화는 전통누룩에서 분리하고 Probiotics 검증된 유산균인 *Lactobacillus plantarum* KSD-KM7을 사용하였다.

- 주박 배지의 조성은 주박 20%, 포도당 0.5%, 물 79.5%로 배합하였으며 배지는 121℃에서 15분 조건으로 멸균하여 주박 내 존재하는 효모 등 미생물의 오염을 방지하였다.

- 유산균은 배양은 총 3단계로 진행하였다. 즉, 1차 배양(Seed 단계), 2차 배양(Scale-up 단계), 3차 배양(본 배양 단계)으로 구성되며, 각 단계에서의 접종량은 2%로 진행하였다.



그림 72. 유산균 배양 단계

- 배양 조건은 37℃, 120 rpm으로 하였으며 초기 pH는 5.0~6.0 범위로 실시간 보정하였으며 보정액은 1N NaOH(식품첨가물용) 용액을 사용하였다. *Lactobacillus plantarum* KSD-KM7는 통성혐기성으로 본 배양에서는 질소 purging 방법을 적용하여 15시간 배양하였다.

(3) 배양된 유산균의 농도와 관능 평가

- 배양된 유산균의 농도를 측정하기 위해 멸균된 0.85% NaCl 용액을 희석액으로 사용하였으며 10진 희석법으로 plate 당 20~200개의 숫자로 콜로니가 형성되게끔 배양액을

적당한 농도로 희석한 뒤 균기 전 상태인 MRS broth agar에 접종한 뒤 균한 후 37℃에서 48시간 배양하였다. 이와 같은 방법으로 3반복 진행하였다. 이후 형성된 콜로니의 수가 10% 이하의 오차범위임을 확인하였고 주박으로부터의 교차 오염을 확인하고자 0.02% chloramphenicol이 포함된 YPD agar 배지를 사용하여 효모 생육 여부를 평가하였다. YPD agar 배양은 30℃에서 48시간 진행하였으며, 효모는 검출되지 않았다.

- 이와 같은 방법으로 본 배양 기준 접종 후 4시간이 지난 시점부터 20시간까지 2시간 단위로 유산균 농도와 오염 검사를 3반복으로 진행하여 생육 곡선(growth curve)을 분석하였다(그림 80).

- 생육 곡선에서 나타난 바와 같이 접종 후 약 15시간 시점이 정지기(stational phase)의 시작점이 되는 부분으로 판단되었으며, 이는 주박 배지에서 *Lb. plantarum* KSD-Km7의 최적 배양 시간으로 설정하였다.

- 사용된 식품첨가물인 NaOH 용액을 완전히 중화시키기 위해 15시간 배양 후 pH 보정을 중단하여 pH가 4.5에 도달하도록 유도하였다. 이후 배양액을 시음한 결과 향과 맛은 쌀 당화음료(예, 식혜)와 유사하였으며, 맛에 있어서는 시큼한 신맛과 함께 느껴졌다. 전통음료인 식혜를 연상시킨다는 점에서 한국인에게 익숙한 형태의 제품으로 활용이 가능하리라 판단된다(표 99).

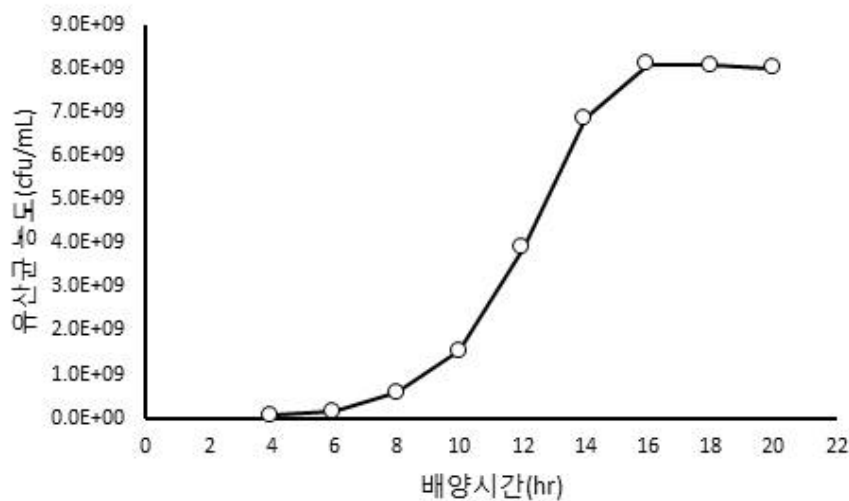


그림 73. 주박 배지를 활용 *Lb. plantarum* KSD-KM7 유산균 배양 균체 농도 곡선(단위, cfu/mL)

표 87. *Lb. plantarum* KSD-KM7 유산균 배양액 관능평가

시음 sample	pH	관능묘사
유산균 발효액	4.5	식혜를 연상시키는 향, 알코올 특유의 쓴맛이 약간 있음, 유산균 특유의 시큼함이 약간 있음.

(4) 유산균의 제재화

- 유산균의 제재화는 균주의 pellet을 코팅 처리 후 동결 건조하는 방식으로 진행하였다. 기업 및 대학 등에서 기존에 보고된 유산균 코팅제 성분으로는 당류, 펩톤류, 검류, 유제품 성분 등이 있으며 가장 많이 사용되고 있는 것은 skim milk라 할 수 있다. 본 연구에서는 배양 후에도 고형분으로 존재하는 배지의 주박을 활용하였다.

- 코팅제는 Trehalose 5%, Sucrose 3%, Alginate 0.1%, Soy lecithin 0.05%를 함유한 용액을 제조하여 121 °C에서 15분간 멸균 후 냉각하였다.

- 주박 배지에서 유산균을 대량 배양한 후 원심분리를 진행하여 침전된 유산균과 주박을 수거하였다. 수거된 유산균과 주박의 총량 대비 1:1로 코팅제를 혼합하여 유산균을 코팅하였다. 이후 선반형 동결건조기를 이용하여 유산균 건조물을 만들어 제재화 하였다(그림 81, 표 100)

그림 74. 유산균 제재화 공정도

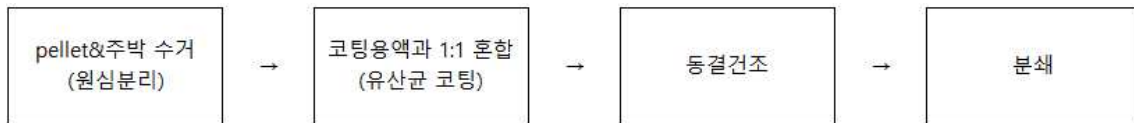


표 88. 동결건조 사이클 조건

동결건조 cycle								
-45°C	-15°C	-15°C	0°C	0°C	10°C	10°C	25°C	25°C
180min	120min	180min	120min	240min	120min	300min	120min	240min

- 건조된 유산균 제재와 0.85% NaCl 용액을 1:9 비율로 희석하였고, 균질기인 BagMixer를 통해 유산균이 죽지 않도록 균질화 하였다. 이후 10진 희석법을 통해 제재의 농도(cfu/g)값과 오염 검사를 3반복으로 측정하였다. 분석 결과 건조된 유산균 제재 내 유산균은 g당 1.0E+11 cfu 농도로 있음을 확인하였고 콜로니의 유전자를 분석한 결과 *Lb. plantarum*으로 확인되었다. 제재 내 효모는 검출되지 않았다(표 101)

표 89. 주박 배지를 활용한 *Lb. plantarum* KSD-KM7 제재 분석 결과

시료명	Yeast	LAB Conc.(cfu/g)	16S rRNA 분석결과
<i>Lb. plantarum</i> KSD-KM7	ND	1.0E+11	<i>Lactobacillus plantarum</i>

하. Probiotics 적용 기능성 시제품 레시피 개발

(1) Prebiotics 적용 기능성 주류 레시피 개발

- 유산균은 살아있어야만 생리활성이 있다는 생각은 2000년대에 이루어진 다양한 유산균 사균체의 연구에 의하여 학계와 산업계에서 퇴출되어지고 있다. 2009년, Nutrition Review의

‘Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial?’에서 “Probiotics 안전한 이용을 위해 될 수 있으면 사균체(microbial carcasses)를 이용할 것”을 제안하면서, Probiotics는 관습적으로 살아있는 균에만 국한되고 있다고 지적하고 probiotics의 영역을 사균체와 미생물 유래물질까지 확대시켰다 (Kataria J, et al. Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial? Nutr Rev 2009;67(9): 546–550)

- 유산균 사균체의 주요활성으로는 항염작용, 감염억제작용, 항암작용, 면역조절(Immuno-modulation) 작용 등을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 살아있는 유산균은 장에 정착하고 개체 수를 늘리고 유해균과 경쟁하여 장내균총을 정상화한다고 알려져 있다. 사균은 장내에 존재하던 유익균의 먹이가 되어 유익균에 대하여 prebiotics의 역할도 할 수 있다 (Wan-Jae Kim, Understanding of Killed Lactic Acid Bacteria as a Probiotics, 대한약국학회지, Nov.2018(4) N-2, 115-122)

- 자사 지역기반 전통누룩에서 우점종으로 존재하는 유산균(*Lactobacillus plantarum* KSD-KM7)을 고농도가 되도록 레시피 및 공정을 개발하고 제품 경쟁력을 확보하고자 생막걸리에 비해 유통기한 연장 가능한 살균 막걸리로 제품화를 진행하였다.

- *Lactobacillus plantarum* KSD-KM7 유산균 고농도 발효 레시피 및 공정 개발
 - 고농도 유산균 발효를 위해 쌀을 주원료로 하고 자사 지역기반 전통누룩 및 양조용수를 이용하여 담금을 진행하고 37℃에서 발효를 진행하였다. 평가 결과 발효 5일 만에 1.65E+09 cfu/mL의 농도로 고농도 유산균 발효가 가능하였다

표 90. 자사 지역기반 전통누룩 내 우점종 유산균을 활용한 고농도 발효 결과

발효일수	유산균 (cfu/mL)	총산(% w/v)	pH
0일차	2.63E+06	0.15	4.50
1일차	2.40E+07	0.18	3.28
2일차	2.11E+08	0.25	3.21
3일차	4.10E+08	0.27	3.20
4일차	5.30E+08	0.35	3.18
5일차	1.65E+09	0.41	3.15

- Pilot scale에서의 시제품 생산 및 제조 공정 확립
 - 자사 지역기반 전통누룩을 활용하여 누룩 내 우점종으로 존재하는 *Lb. plantarum* KSD-KM7 유산균이 살균 전 최종 제품 내에서 고농도로 존재할 수 있도록 멥쌀과 밀가루(박력분)를 주원료로 하여 최적 레시피를 마련하였고 pilot scale 양조 및 저온살균 설비를 통하여 제조 공정 확립 및 시제품을 생산하였다.

- 주입된 시제품은 저온살균 전후로 나눠 제품 내 사균체 및 생균체에 대한 농도를 비교 분석하였다. 제품 내 사균체는 *Lb. plantarum* Real-time PCR kit를 활용하여 RT-PCR 분석으로 사균체 농도를 측정하였고 생균체는 MRS agar 배지를 활용하여 측정하였다. 분석 결과 저온살균을 통해 유산균은 사멸되었으나 유산균 사균체는 고농도로 존재하고 있음을 확인하였다(표 103).

표 91. 저온살균 전후 제품 내 미생물 분석 결과

(단위, cfu/mL)

저온살균 전			저온살균 후		
유산균		효모	유산균		효모
RT-PCR	MRS agar	YPD agar	RT-PCR	MRS agar	YPD agar
1.12E+09	3.80E+08	6.8E+05	1.15E+09	ND	ND

- 최종 제품 spec. : 알코올 5%(v/v), 총산 0.23%(w/v), 프락토올리고당 0.24%, 유산균 사균체 1.0E+08 cell/mL 이상

- 제품 안정성 및 유통기한 평가

• 살균탁주의 유통 안정성 평가 및 유통기한을 설정하기 위해 (주)국순당 횡성공장에서 생산된 시제품을 15℃, 25℃, 35℃ 항온항습기에 저장하면서 저장 기간 중 6회 분석 및 평가를 실시하였다. 평가 결과 품질지표 중 결정계수가 가장 높은 관능검사 0차 반응식으로 국내 연간 변화를 고려하여 14.5개월의 유통기한을 산출하였고, 유통 과정 중 안전을 고려하고자 안전계수 0.63을 적용하여 상온보관 유통기한을 9개월로 설정하였다(표 104, 105, 106)

표 92. 15℃ 저장성 평가 결과

저장기간	알코올(% v/v)	총산(% w/v)	진균류(cfu/mL)	관능(9점 척도)
0일	5.00	0.25	음성	9.0
28일	5.01	0.25	음성	9.0
61일	5.00	0.25	음성	9.0
88일	5.00	0.25	음성	9.0
115일	5.03	0.25	음성	9.0
145일	5.00	0.25	음성	8.5

표 93. 25℃ 저장성 평가 결과

저장기간	알코올(% v/v)	총산(% w/v)	진균류(cfu/mL)	관능(9점 척도)
0일	5.00	0.25	음성	9.0
28일	5.00	0.25	음성	9.0
61일	5.01	0.25	음성	9.0
88일	5.02	0.25	음성	9.0
115일	5.01	0.25	음성	8.7
145일	5.00	0.25	음성	8.2

표 94. 35℃ 저장성 평가 결과

저장기간	알코올(% v/v)	총산(% w/v)	진균류(cfu/mL)	관능(9점 척도)
0일	5.00	0.25	음성	9.0
28일	5.01	0.25	음성	9.0
61일	5.01	0.25	음성	9.0
88일	5.02	0.25	음성	8.8
115일	5.01	0.25	음성	8.5
145일	5.00	0.25	음성	7.8

- 소비자 관능 평가 및 조사

• 생산된 시제품을 이용하여 백세주마을 내방 고객을 대상으로 맛과 향, 기호도에 대한 관능 평가를 진행하였다. 관능 평가에 참여한 평가자는 총 48명으로 20대에서 50대까지의 남녀를 대상으로 하였으며, 응답자의 성별은 남성과 여성이 각각 69%, 31%였으며, 연령은 20대가 12%, 30대가 38%, 40대가 35%, 50대 이상이 15였다. 관능 조사 결과는 그림 20과 같다. 맛에 대한 평가에서 단맛과 신맛이 특징적이라는 응답이 많았으며 향에서는 과일향과 산뜻한 향, 요구르트 향을 특징적이라고 평가하였다. 기호도에 대한 평가는 매우 좋음이 25%, 좋음이 60%를 차지하였다.

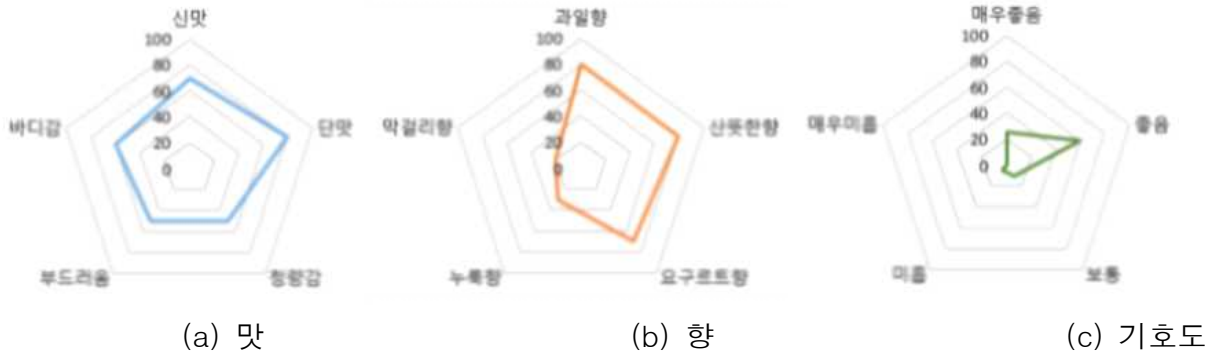


그림 75. *Lb. plantarum* KSD-KM7을 이용한 시제품 관능 평가 결과

- 제조방법신고(주류면허지원센터)

• *Lb. plantarum* KSD-KM7을 이용한 시제품에 대하여 주류면허지원센터에 제조방법신청하여 제조를 허여 받았으며 출시를 위한 제반 사항을 진행 중에 있다.

(2) Probiotics 적용 기능성 무알코올 유산균 막걸리 레시피 개발

- 주박 배지의 배양액을 통해 고농도의 유산균과 식음에 적합한 용도로 음용 제품화에 적용이 가능하다. 이에 본 연구에서 알코올 함량 1% 미만인 무알코올 유산균 막걸리를 개발하고자 하였다.

- 주박에 존재하는 알코올로 인해, 주박 배지를 사용할 경우 2~3%의 농도로 알코올이 존재하게 된다. 따라서 무알코올 개념을 적용하기 위해 알코올 함량 기준을 1% 미만으로 되게끔 주박 사용량을 33% 미만으로 조정하였다. 또한 막걸리의 풍미를 갖추기 위해 배양하지 않은 순수 주박을 알코올 함량 1% 미만으로 가수하여 혼합 원료로 사용하였다.

- 효모가 생존해 있는 주박 희석액과 쌀 당화액은 제조과정에서 HTST 공정을 통해 살균공정으로 사멸시켜 이후의 알코올 생성을 억제하도록 하였다(그림 83).

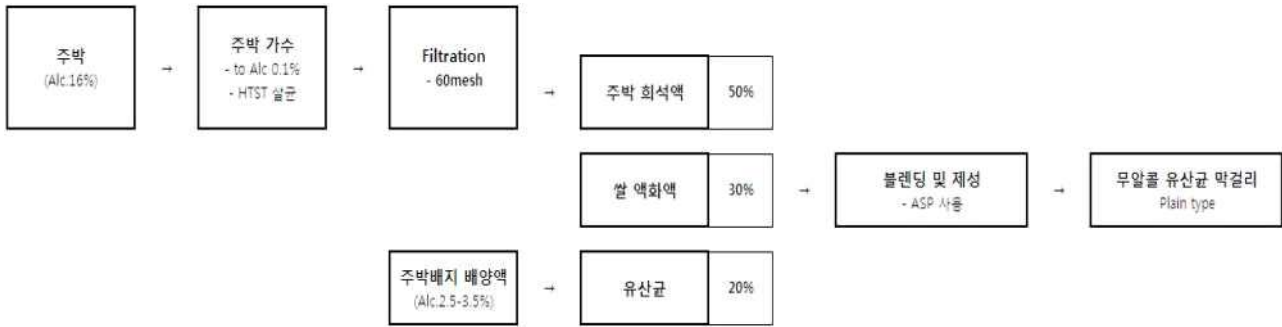


그림 76. 무알코올 유산균 막걸리 제조 공정도

- 바디감을 부여하기 위해 쌀 당화액을 혼합 원료로 사용하였다. 무알코올 유산균 막걸리의 모든 핵심 원료는 쌀 유래의 제품이라 할 수 있다. 새콤한 맛과 관능 기호성을 부여하기 위해 유산균 배양 후 pH 보정을 하지 않도록 하고 pH 4.5가 되도록 하였다. 달콤한 맛은 각 원료들의 혼합 과정에서 아스파탐을 사용하여 막걸리 특유의 새콤달콤한 맛과 바디감 그리고 1,000억 이상의 유산균이 존재하는 무알코올 유산균 막걸리 시제품을 제작하였다(사진 1).



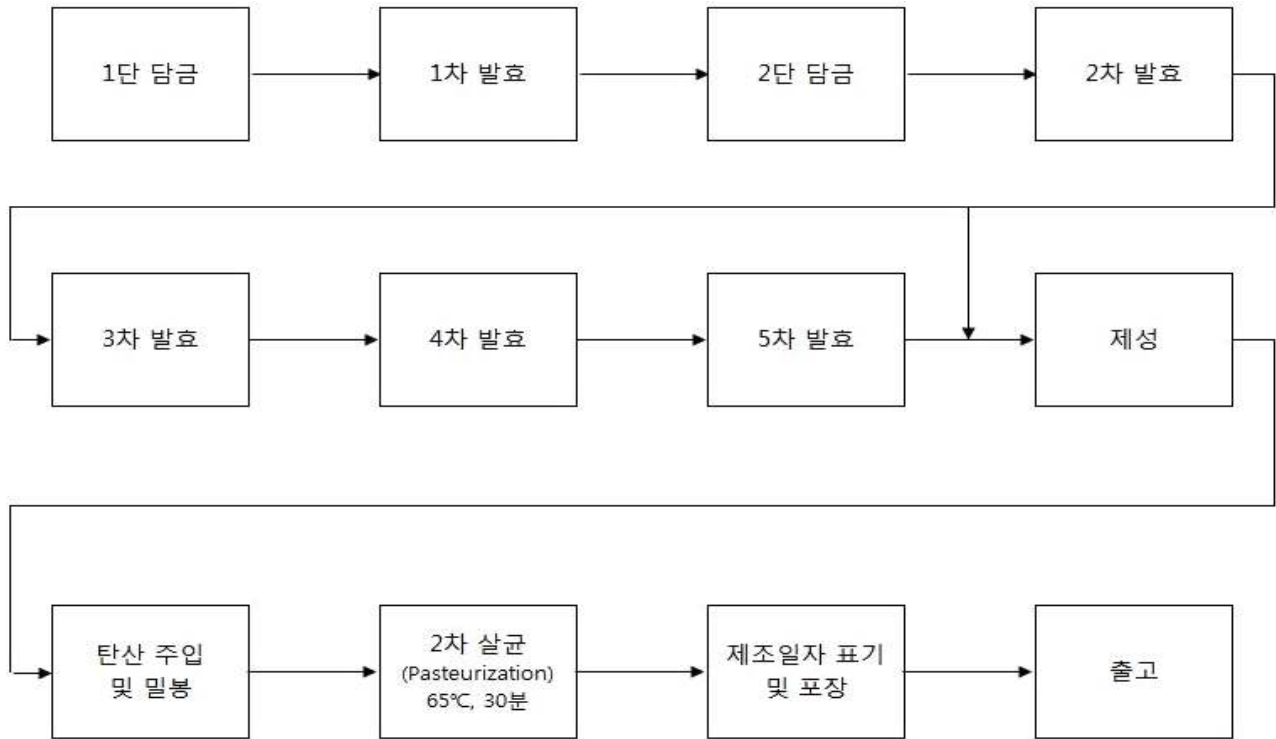
그림 77. 무알코올 유산균 막걸리 시제품

거. 유산균 사균체 활용 프리바이오 출시

(1) 프리바이오 병 & 캔 제품 출시

- 자가 제조 전통누룩에서 우점종으로 존재하는 *Lb. plantarum* KSD-KM7을 고농도가 되도록 개발한 발효 공정을 통해, 열처리된 유산균의 농도가 1000억 개/병이 되는 제품의 레시피를 개발할 수 있었다.

그림 78. 프리바이오의 제품 공정과정



- Pilot scale 설비를 통해 제조 공정 확립 후 2020년 1월 출시하였다. 750ml 병과 350ml 캔 2가지 제품으로 출시하였고(그림 81) 10개월 누적 총 매출액은 967,511,072원을 달성하고 있다. 그림 2. 1000억 프리바이오 막걸리 제품 출시



그림 79. 프리바이오 막걸리 제품

(2) *Lb. plantrum* KSD-KM7 활용한 1000억 막걸리(수출용) 제품 출시

- 2020년 3차년도 고농도 유산균 저산도 배양 기술을 활용한 수출용 프리바이오 저칼로리 제품을 개발하였다. 미국 수출을 위해 당 함량이 낮은 저칼로리 제품 개발이 필요하였고 기존 1000억 막걸리의 유산균 배양 산도를 낮춰 신맛을 감소시키고 제성할 때 필요한 당 함량을 감소시켜 제품을 개발하였다.

그림 80. *Lb. plantrum* KSD-KM7 활용한 1000억 막걸리(수출용) 품목제조보고서

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명	장년필립		
	배상민	1981년 08월 27일		
	주소	전화번호		
	강원도 횡성군 둔내면 강변로 975	휴대전화		
영업소	명칭(상호)	한국순당		
	소재지	강원도 횡성군 둔내면 현천리 81-3(강변로 975)		
제품정보	식품의 유형	막주	영양등록번호	20060015020
	제품명	1000억 막걸리(수출용)		
	유통기한	PET-제조일로부터 9개월, CAN-제조일로부터 12개월		
	품질유지기능			
	원재료 조도(성분명, 첨가물명)	맛장에 기재		
	병도 용법	맛장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	상온보관, 직사광선을 피하고 서늘한 곳에 보관 PET, 알루미늄		
	포장방법 및 포장단위	일병포장, PET-750mL, CAN-350mL		
	성상	고유의 색택과 향미를 가지고 있고 이더, 이취가 없음		
	고열량·저영양 식품 해당 여부	[]에 []아니오 [O] 해당 있음		
기타	발코올 농도 5%, 프락토올리고당 1g 함유(750mL PET 기준)			

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2020년 11월 20일
보고인 배상민

서울지방식품의약품안전청장 귀하

품목보고번호	20060015020104	처리부서		처리자성명		처리일자	
--------	----------------	------	--	-------	--	------	--



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

그림 81. *Lb. plantum* KSD-KM7 활용한 1000억 막걸리(수출용) 제품



너. 고농도 유산균 저산도 배양 기술을 통한 수출용 프리바이오 저칼로리 개발

(1) 고농도 유산균 저산도 배양의 필요성

- 미국의 경우 당류에 대한 하루 권장 섭취량은 50g 이나, 내수용 1000억 프리바이오 제품의 경우 신맛의 보정을 위해 57g 당을 사용하고 있다. 이에 대한 개선이 필요했다.

(2) 고농도 유산균 저산도 배양 기술을 활용한 저칼로리 유산균막걸리 개발

- 고농도 유산균을 저산도로 배양하기 위해서는 유산균 배양을 촉진하는 주박 배지의 최적화와 식품첨가물 수산화나트륨으로 pH 보정이 필요했고 최종적으로 7.0E+09 CFU/ml과 Acidity 1.0 이하의 ‘고농도 유산균 저산도 배양’ 기술을 확립하였다.

- 개선된 배양법을 통해 해외 수출용 저칼로리의 유산균 막걸리 레시피를 개발하였다.

배양법	기존 배양법	고농도 유산균 저산도 배양법
최종 Spec		
발효 일수	5days	2days
유산균 CFU/ml	1.65E+08	7.0E+09
총산 (%, w/v)	0.41	0.03
pH	3.15	5.9

표 95. 배양 방법에 따른 Spec

제품명	프리바이오 막걸리	저칼로리 프리바이오 막걸리
제품기준		
Alc	5%	5%
열처리 유산균 cell/bottle	1.05E+11	1.05E+11
총산 (%, w/v)	0.258	0.198
kcal	508	360

표 96. 두 막걸리의 제품 기준 비교

(3) 현장 Scale-up 시험 생산

- 300L의 pilot scale의 고농도 유산균 저산도 배양은 (주)국순당 황성공장에서 진행하였다. 총 3단계의 배양과정을 통해 진행되었고 반복된 배양결과 유산균의 농도는 7.0E+09/ml을 표준화하였다. 표 109과 같은 결과를 제품 공정의 기준으로 적용하여 시제품의 품질을 일정하게 표준화 할 수 있었다.

300L 배양			
배양시간	Acidity	pH	LAB/ml
48hr	0.5이하	5.5 ~ 6.0	7.0E+09

표 97. 고농도 유산균 저산도 배양의 기준

(4) 제품의 기호성 및 안정성 평가

- 기존 내수형 프리바이오 막걸리의 특성과 유사성 혹은 이격성을 확인하기 위해 숙련된 전문 패널 총 30인을 통하여 맛, 향, 기호도를 평가하였다.

	맛	향	기호도	관능 묘사
기존 프리바이오 막걸리	7.0	7.5	7.5	신맛이 강하고, 단맛도 강함.
저칼로리 프리바이오 막걸리	8.0	8.0	8.0	적절한 감산미와 산뜻함. 부드럽고 향긋함.

표 98. 두 막걸리의 관능비교 결과 (9점 만점)

- 살균 탁주로서의 유통 안정성 평가 및 유통기한을 설정하기 위해 (주)국순당 횡성공장에서 생산된 시제품을 15℃, 25℃, 35℃ 황온 항습기에 저장하면서 저장 기간 중 6회 분석 및 평가를 실시하였다. 평가 결과 품질지표 중 결정계수가 가장 높은 관능검사 0차 반응식으로 국내 연간 변화를 고려하여 15.4개월의 유통기한을 산출하였고, 유통 과정 중 안전을 고려하고자 안전계수 0.8을 적용하여 상온보관 유통기한을 12개월로 설정하였다.

저장기간	알코올(% v/v)	총산(% w/v)	진균류(cfu/mL)	관능(9점 척도)
0일	5.00	0.18	음성	9.0
28일	5.01	0.18	음성	9.0
61일	5.00	0.18	음성	9.0
88일	5.00	0.18	음성	9.0
115일	5.03	0.18	음성	9.0
145일	5.00	0.18	음성	8.5

표 99. 15℃ 저장성 평가 결과

저장기간	알코올(% v/v)	총산(% w/v)	진균류(cfu/mL)	관능(9점 척도)
0일	5.00	0.18	음성	9.0
28일	5.00	0.18	음성	9.0
61일	5.01	0.18	음성	9.0
88일	5.02	0.18	음성	9.0
115일	5.01	0.18	음성	8.7
145일	5.00	0.18	음성	8.2

표 100. 25℃ 저장성 평가 결과

저장기간	알코올(% v/v)	총산(% w/v)	진균류(cfu/mL)	관능(9점 척도)
0일	5.00	0.18	음성	9.0
28일	5.00	0.18	음성	9.0
61일	5.01	0.18	음성	9.0
88일	5.02	0.18	음성	9.0
115일	5.01	0.18	음성	8.7
145일	5.00	0.18	음성	8.2

표 101. 35℃ 저장성 평가 결과

더. “술덧 효모 대량 배양 기술” 확립 및 이를 통한 국생막 Renewal

(1) 술덧 효모 대량 배양 기술 필요성

- 우리나라에서 주류 맞춤형 효모를 생산하는 업체는 2 곳에 불과하며, 이마저도 품질 유지에 어려움이 있어 고품질 주류 제조에 장애물이 되고 있다. 또한 각 특성에 맞는 효모 개발 및 종균화 연구는 매우 미흡한 실정이다. 전통주에서 막걸리가 90% 이상 높은 비율을 차지함에도 불구하고 막걸리에 사용되는 효모는 대부분 빵 발효에 사용되는 효모를 종균으로 사용하고 있다. 1차년도 과제를 통해 주류 맞춤형 효모가 몇 종 개발되었으나 제니코 등 효모 생산 전문 업체의 위탁시 MOQ(minimum order quality)를 가지고 있어 주종별로 다양한 맞춤형 효모 생산이 어렵다. 이를 위하여 맞춤형 효모 대량 배양 기술을 자체적으로 확립하는 것이 매우 중요하다.

(2) 맞춤형 술덧 효모 대량 배양 기술 연구

- 연양주모 개념을 응용하여, 효모 활성이 우수한 발효 1일차 술덧을 희석하여 seed로 사용하고 효모 증식에 필요한 산소 및 영양분 등을 최적 조건으로 공급하여 목적에 맞는 맞춤형 효모를 대량 배양하는 기술이다. 이 기술을 이용하면 별도의 효모 구입 없이 자체적으로 목적에 맞는 효모를 손쉽게 대량 배양하여, 주종별로 적합한 효모를 맞춤형으로 생산할 수 있다.

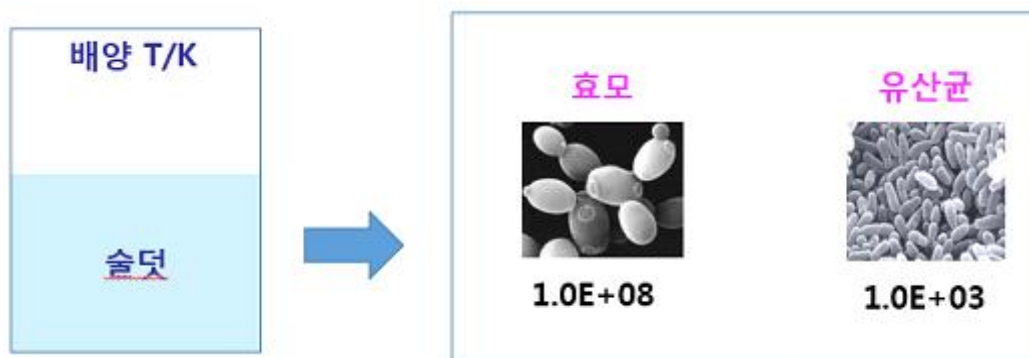


그림 82. 발효 술덧 미생물 및 개체수

- 효모 대량 배양을 위한 배지 조성
 - ▷ 산소(air 공급) : 0.1vvm 이상
 - ▷ 배양 온도 : 30℃
 - ▷ 탄소원 : 포도당 10%(w/v)
 - ▷ 질소원 : 국순당 밀누룩 5%(w/v)

(3) Pilot scale 용량별 효모 배양 생산 결과

- 5L / 30L / 2,000L pilot scale 용량별 효모 배양 결과, 희석된 슬럿을 이용하여 효모 개체수 $2.6E+08 \sim 3.00E+08$ 배양되었다.

5L 배양							
시간	Alc.	Acid	Δ acid	pH	R/S	Yeast/ml	LAB/ml
0hr	-	5.4	0.0	3.45	65	1.00E+06	3.00E+01
24hr	3.30	6.8	1.4	3.04	4	2.60E+08	1.50E+01

30L 배양							
시간	Alc.	Acid	Δ acid	pH	R/S	Yeast/ml	LAB/ml
0hr	-	5.2	0.0	3.42	90	1.63E+06	5.00E+01
16hr	4.77	7.2	2.0	3.01	10	2.80E+08	2.50E+01

2,000L 배양							
시간	Alc.	Acid	Δ acid	pH	R/S	Yeast/ml	LAB/ml
0hr	-	4.6	0.0	3.27	91	1.63E+06	5.00E+01
14hr	4.77	6.5	1.9	2.91	6.6	3.00E+08	1.00E+01

표 102. 5L / 30L / 2,000L 용량별 테스트 결과



표 103. Pilot scale 용량별 효모 배양

(4) 슬럿 효모 대량 배양을 통한 양조 발효 및 주질 특성 평가

- 과제를 통해 기 선별된 효모의 슬럿 배양 기술을 이용하여 막걸리 발효 진행하였다. 쌀은 증자하지 않고 무증자로 진행하였고 쌀 900g, 물 1,350ml, 자사 밀누룩 8.6g과 슬럿으로 배양된 효모를 투입하고 각각 혼합한 뒤 25°C 1일간 발효하였다. 발효 후 쌀 2,100g, 물 3,50ml 및 개량누룩 20.1g 추가로 첨가하여 2단 담금 진행하고 25°C 6일간 발효하였다. 발효 온도에 따른 이화학적 분석을 진행하였으며, 분석 항목은 알코올, 산도, 환원당 및 발효 비율을 평가하였다. 발효 비율은 아래의 식에 의거하여 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{발효 비율 (\%)} &= \frac{\text{실제 알코올 생성량 (L)}}{\text{이론 알코올 생성량 (L)}} \times 100 \\ &= \frac{\text{숙성 술덧량(L)} \times \text{실제 발효 알코올 농도(\%)}}{\text{쌀 사용량(kg)} \times \text{쌀 알코올 환산계수(0.715)} \times \text{쌀 전분가(78)}} \times 100 \end{aligned}$$

자사 지역기반 전통누룩에서 분리된 효모 중 기 선별된 KSD-YC 가 발효 비율 높고 산도가 낮아 부드럽고 막걸리 특유의 텁텁한 맛이 약하고 깔끔한 주질이 구현되었다.

효모 종류	알코올(% v/v)	총산(% w/v)	환원당(mg/mL)	발효비율(%)
건조 효모(S사)	16.5	0.20	32.0	69.6%
압착 효모(J사)	17.0	0.19	29.4	71.3%
자가 배양 효모 (KSD-YC)	18.6	0.17	24.2	78.4%

표 104. 효모 종류별 발효 분석 결과 비교

	맛	향	기호도	관능 묘사
건조 효모(S사)	7.0	7.1	6.5	과일향, 신향, 담백함
압착 효모(J사)	6.8	7.0	5.4	누룩향, 과일향, 텁텁함
자가 배양 효모 (KSD-YC)	7.5	7.8	7.6	과일향 풍부, 부드럽고 깔끔함

표 105. 효모 종류별 관능 검사 결과(9점 만점)

	맛	향	기호도	관능 묘사
건조 효모(S사)	7.0	7.1	6.5	과일향, 신향, 담백함
압착 효모(J사)	6.8	7.0	5.4	누룩향, 과일향, 텁텁함
자가 배양 효모 (KSD-YC)	7.5	7.8	7.6	과일향 풍부, 부드럽고 깔끔함

표 106. 효모 종류별 관능 검사 결과(9점 만점)

(5) 술덧 효모 대량 배양을 통한 제품 안정성 및 유통기한 평가

- 생막걸리 유통 안정성 평가 및 유통기한을 설정하기 위해 (주) 국순당 횡성공장에서 생산된 시제품을 5℃, 10℃, 25℃ 항온항습기에 저장하면서 3개월동안 분석 및 평가를 실시하였다. 평가 결과 품질 지표 중 결정계수가 가장 높은 관능 검사 0차 반응식으로 생막걸리 냉장 10℃ 조건에서 90일(3개월)의 유통기한을 산출하였고 유통 과정 중 안전을 고려하여 안전계수 0.5를 적용하여 유통기한 45일로 설정하였다.

저장기간(일)	알코올 (%, v/v)	총산 (%, w/v)	진균류 (cfu/mL)	세균류 (cfu/mL)	관능 (점)
0	6.01	0.19	3.60E+07	2.0E+03	8.91
4	6.01	0.18	3.80E+07	3.8E+03	8.70
7	6.02	0.18	3.25E+07	5.1E+03	9.00
11	6.01	0.17	1.85E+07	3.0E+04	8.46
14	6.03	0.17	1.10E+07	7.0E+04	8.40
20	6.05	0.17	1.80E+07	2.2E+04	8.40
28	6.06	0.17	3.05E+06	1.1E+05	8.40
41	6.06	0.17	8.50E+05	3.3E+05	8.25
61	6.07	0.17	7.50E+04	1.7E+05	7.50
71	6.08	0.17	8.50E+04	4.3E+04	7.30
90	6.09	0.17	9.50E+04	1.9E+04	7.20

표 107. ‘국순당 생막걸리’의 5℃ 저장 결과

저장기간(일)	알코올 (%, v/v)	총산 (%, w/v)	진균류 (cfu/mL)	세균류 (cfu/mL)	관능 (점)
0	6.01	0.19	3.60E+07	2.0E+03	8.91
4	6.02	0.17	6.50E+07	2.0E+04	8.46
7	6.03	0.17	3.20E+07	5.2E+04	8.76
11	6.12	0.17	7.95E+06	5.5E+04	8.40
14	6.15	0.16	5.70E+06	1.4E+05	8.40
20	6.23	0.15	2.00E+06	3.8E+05	8.40
28	6.35	0.15	7.50E+05	2.6E+05	8.60
41	6.38	0.15	1.60E+05	1.7E+06	7.00
61	6.35	0.15	9.00E+03	1.0E+06	7.00
71	6.37	0.15	5.80E+04	4.7E+05	6.50
90	6.39	0.15	1.00E+04	1.3E+05	6.00

표 108. ‘국순당 생막걸리’의 10℃ 저장 결과

저장기간(일)	알코올 (%, v/v)	총산 (%, w/v)	진균류 (cfu/mL)	세균류 (cfu/mL)	관능 (점)
0	6.01	0.19	3.60E+07	2.0E+03	8.91
1	6.22	0.18	5.40E+08	1.0E+04	8.55
4	6.35	0.20	9.25E+06	7.7E+05	7.50
7	6.55	0.21	1.10E+06	4.3E+07	5.00
11	6.54	0.22	5.00E+04	1.0E+07	4.50
20	6.65	0.23	5.50E+03	3.1E+08	4.00
28	6.61	0.26	7.00E+01	1.5E+08	3.50

표 109. ‘국순당 생막걸리’의 25℃ 저장 결과

(6) 효모 배양을 통한 소비자 관능 평가 및 조사

- 생산된 시제품을 이용하여 백세주 마을 내방 고객을 대상으로 맛과 향, 기호도에 대한 관능 평가를 진행하였다. 관능 평가에 참여한 평가자는 총 42명으로 20대에서 60대까지의 남녀를 대상으로 하였으며, 응답자의 성별은 남성과 여성이 각각 72%, 28% 였으며, 연령은 20대가 8%, 30대가 27%, 40대가 42%, 50대 이상이 23%였다. 관능 조사 결과는 그림3과 같다. 맛에 대한 평가에서 청량감, 부드러움, 깔끔하다는 응답이 많았으며, 향은 과일향, 산뜻한 향이

특징적이라고 평하였다. 기호도에 대한 평가는 매우 좋음 20%, 좋음이 68%를 차지하였다.



그림 83. KSD-YC 효모 배양을 적용한 시제품 관능 평가 결과

(7) 술덧 효모 대량 배양 기술을 통한 제품 적용

- 전통 누룩에서 분리한 KSD-YC의 술덧 효모 대량 배양 기술을 확립하였고 이를 통해 국순당 생막걸리 Renewal 출시하였다. 2020년 6월에 Renewal 되어 10월 누적 총매출액 1,561,937,256원 달성하고 있다.



그림 84. 국순당 생막걸리 Renewal 제품

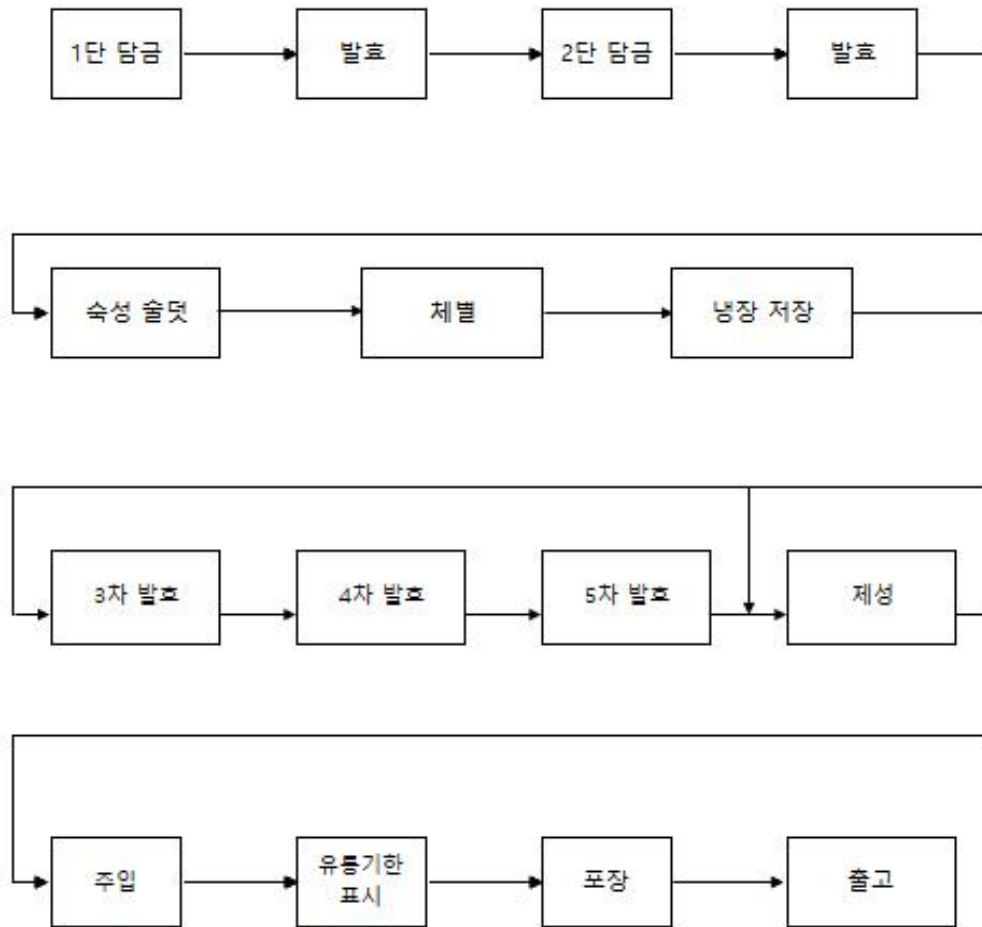
러. 전통누룩 유래 효모와 유산균을 활용한 기능성 주류 개발

(1) 국순당 생막걸리 리뉴얼 제품 출시

- 전통 누룩에서 유래한 *S. cerevisiae* KSD-YC 효모 균주를 이용하여 두 번의 쌀 발효와 *Lb. plantrum* KSD-KM7 균주로 세 번의 유산균 발효를 더해 향과 맛이 우수한 기능성

주류를 개발 할 수 있었다.

그림 85. *S. cerevisiae* KSD-YC, *Lb. plantrum* KSD-KM7 활용한 국순당 생막걸리 제조 과정

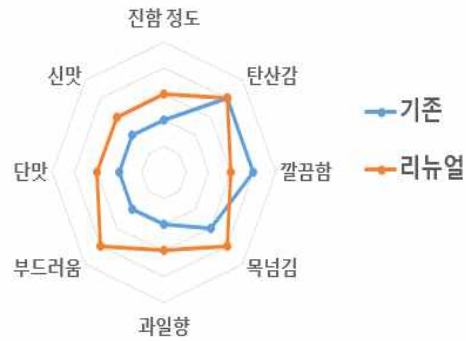


- 전통 누룩에서 유래한 *S. cerevisiae* KSD-YC 효모는 발효 비율이 높고 산도가 낮으며, 부드럽고 막걸리 특유의 텁텁한 맛이 약하여 깔끔한 주질을 구현할 수 있었다.
- 전통 누룩에서 유래한 *Lb. plantrum* KSD-KM7 유산균의 발효를 통해 부드러운 신맛과 감칠맛이 생성되어 기존 제품 대비 관능 품질이 우수하고 소비자 조사 결과, 기호도가 높게 나타났다.

표 110. 국순당 생막걸리 기존/리뉴얼 기호도 조사(5점 기준)

5점 만점	향	맛	기호도	관능
기존	3.0	3.4	3.3	청량감, 깔끔함, 텁텁함
리뉴얼	4.1	4.0	4.1	과일향, 부드러움, 풍부함

그림 86. 국순당 생막걸리 기존/리뉴얼 관능 평가



- 2021년 5월 출시하여 21년 총 매출액 5,191,000,000원 달성하여 2020년 제품 매출액 대비 38% 성장한 것으로 나타났다.

그림 87. *S. cerevisiae* KSD-YC, *Lb. plantrum* KSD-KM7 활용한 국순당 생막걸리 제품



며. 유산균을 이용한 원료 쌀 전처리 기술 적용된 고급 쌀소주 개발

(1) 고알콜 고급 쌀소주 개발 필요성

- 세계적으로 대접받는 최고급술은 부드럽고 향미가 우수한 고알콜 증류주가 많다. 그 이유는 그들 나뉠의 역사성과 전통성외에도 증류주로 풍부한 향을 만들려면 상대적으로 잡미를 줄여야 하고 잡미를 줄이다 보면 밋밋해지기에 그만큼 어렵기 때문이기도 할 것이다. 독특한 고체발효와 장기간의 숙성을 특징으로 하는 중국술이나, 고도 도정으로 음양향을 증류주에 녹여내는 일본술

모두 나름의 전통성과 품질로 인정받고 있다. 그러나 우리의 경우 고려시대부터 내려온 오랜 전통은 자랑스럽지만, 세계에 내세울 만한 고품질의 증류주가 없는 것 또한 사실이다. 이에 고문헌에 들어있는 우리 고유의 제법을 활용하고, 우리 미생물의 효소 특성을 이용하여 고품질의 고알콜 쌀소주를 개발하고자 한다.

(2) 고알콜 고급 쌀소주 개발 공정

- 유산균을 이용한 원료 쌀 전처리 기술 개발

원료 쌀 전처리 과정에서 *Lb. plantarum* KSD-KM7을 접종하면, 효소 분해를 통해 쌀 단백질이 제거되고 유산균 풍미가 쌀의 이미, 이취를 제거하여 발효 향미가 양호하다. 사케는 물리적인 도정을 통해 쌀 단백질을 제거하는 반면, 이 방법은 효소 분해를 통해 자연스럽게 쌀 단백질을 제거하여 술에서 쓴맛이 적고 부드럽게 느껴진다. 뿐만 아니라 발효시 생성되는 다양한 향기 성분 외 유산균 풍미가 추가되어 더 복합적인 발효 풍미를 가질 수 있다.

(3) Pilot scale 용량별 제품 생산 결과

- 원료 쌀 전처리에 이용되는 유산균은 자사 누룩으로부터 분리된 *Lb. plantarum* KSD-KM7 배양하여 사용하였다. 유산균 *Lb. plantarum* KSD-KM7 배양 조건은 37°C, 100rpm 현탁하여 배양하였으며, 배지 조성은 막걸리 원주 20%, 주박 1%, 포도당 2%, 물 77% 배합하여 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 5L / 30L / 3,000L pilot scale 용량별로 쌀 전처리시 유산균 농도 및 온도를 최적화하였고 최종적으로 3,000L 고알콜 고급 쌀소주 생산 매뉴얼을 확립하였다.

용량	유산균 접종 농도 (쌀 1g 기준)	쌀 전처리 온도
5L	1.0E+06 ~ 3.0E+06	25°C ~ 30°C
30L	3.0E+06 ~ 5.0E+06	25°C ~ 30°C
3,000L	1.0E+07 ~ 2.0E+07	25°C ~ 30°C

표 111. 용량별 쌀 전처리 유산균 접종 농도 및 온도

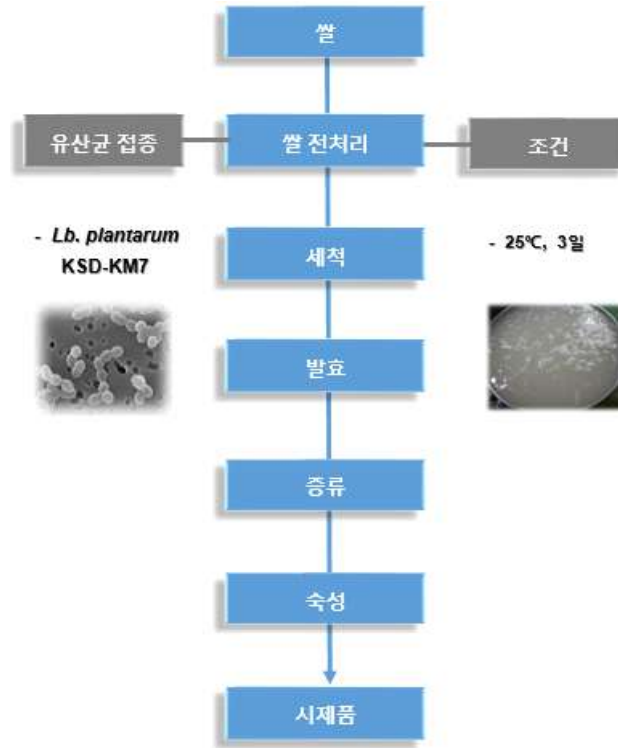


그림 88. 유산균을 이용한 쌀 전처리 방법(공정도)

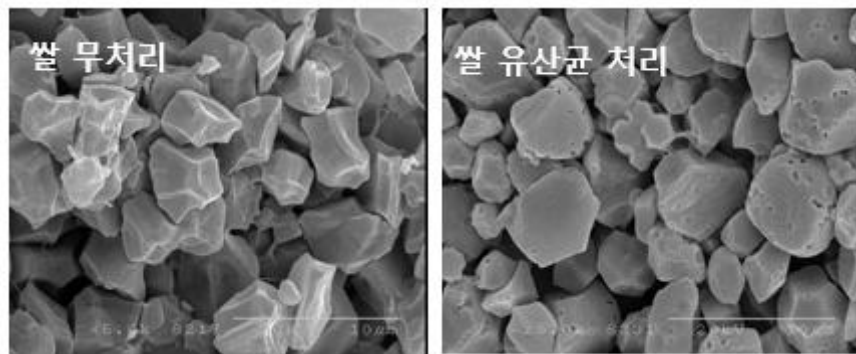


그림 89. 유산균 처리 유무에 따른 쌀 입자 현미경 사진_SEM(x 5,000)



그림 90. 쌀 전처리 세척 및 증자 과정(현장 3,000L 시생산)

(4) 고알콜 고급 쌀소주 발효 및 주질 특성 평가

- 유산균을 이용하여 원료 쌀 전처리 후, 표 8 레시피로 술을 빚어 발효하고 표 10의 증류 조건으로 감압 증류하였다. 최종 제품으로 알코올 52% 쌀소주를 제조하여 1개월 이상 옹기 숙성하여 관능 특성 평가를 진행하였다. 알코올 도수가 52% 지만 소주 특유의 날카로운 쓴맛이 약하고 목넘김이 부드러웠다. 유산균 원료 쌀 전처리로 쌀의 단백질이 낮아지고 쓴맛에 관여하는 무기염류를 감소시켜 주질을 한 층 더 부드럽게 만들 수 있었다고 생각된다.

	1단 담금	2단 담금
멥쌀_고두밥	450 kg	900 kg
자가 밀누룩	4.3 kg	8.6 kg
효모	0.05 kg	
물	450 L	900 L

표 112. 고알콜 고급 쌀소주 제조를 위한 술 담금 레시피(3,000L)

발효시간(일)	Alcohol(% v/v)	Acidity	pH	환원당(g/L)
1	8.24%	3.8	4.23	12.2
2	7.45%	4.3	4.11	15.3
3	11.63%	5.4	4.01	8.9
4	13.94%	5.8	4.03	6.7
5	15.81%	6.0	4.04	13.4
6	17.24%	6.2	4.11	16.9
7	18.02%	6.2	4.13	19.2

표 113. 고알콜 고급 쌀소주용 술덧 발효 분석 결과

배양 조건	고급 쌀소주
증류 방법	감압증류
진공도(감압도)	700mmHg
술덧 온도	36 ~ 43℃
냉각수 온도	5℃
탈기	7일
숙성 용기	용기
숙성	1개월 이상

표 114. 고알콜 고급 쌀소주용 증류 및 숙성 방법

(5) 고급 쌀소주 기호성 평가 및 시제품화

- 고급 쌀소주 기호성 및 숙성 주질 평가를 위해 숙련된 전문 패널 총 30인을 통하여 맛, 향, 기호도를 평가하였다. 또한 제품의 경쟁력을 확보하기 위해 시판 제품과 비교하였는데, 시판 제품은 6개월 이상 숙성된 제품을 이용하였고 시생산된 고급 쌀소주는 1개월 숙성 제품으로 비교하였다. 고급 쌀소주는 1개월 숙성 제품임에도 불구하고 시판 제품 대비 향, 맛, 기호도에서 우수한 평가를 받았다. 숙성에 따른 주질 안정성은 지속하여 확인할 예정이다.

- 고급 쌀소주를 2021년 제품 출시를 목표로 제조방법신고(주류면허지원센터) 준비중이다.

	향	맛	기호도	관능
A 제품(A사)	4	5	5.5	곡물향 은은하고 묵직함
B 제품(H사)	6	7	6.7	꽃향 은은하고 깔끔함
C 제품(J사)	5	7	6.0	과일향 은은하나 거침
고급 쌀소주	7	8	7.8	꽃향 풍부하고 부드러움

표 115. 고급 쌀소주 숙성 주질 비교(1개월)_9점 기준



그림 91. 고급 쌀소주 시제품

버. *Lb. plantrum* KSD-KM7 유산균을 이용한 고급 쌀소주 개발

(1) *Lb. plantrum* KSD-KM7 유산균을 이용한 원료 쌀 전처리 기술 개발

- 원료 쌀 전처리 과정에서 *Lb. plantrum* KSD-KM7을 접종하면, 젖산이 생성되어 침미시 잡균 오염이 방지되고 유산균이 생성하는 효소에 의해 쌀 단백질이 제거되어 쓴맛이 적고 발효시 생성되는 다양한 향기 성분이 추가되어 더 복합적인 발효 풍미를 가진다.

(2) 고알콜 고급 쌀소주 개발

- 유산균을 이용한 쌀 전처리 기술 적용하여 고알콜 고급 쌀소주를 현장에서 시생산 및 본생산 3,000L를 3회 진행하였고 12개월 이상 숙성하여 “백세고” 제품명으로 제조방법 신청 및 품목제조보고를 완료하였으며 2022년 1월 국순당 50주년 기념주로 출시하였다.

그림 92. *Lb. plantrum* KSD-KM7 활용한 백세고 품목제조보고서

발급번호 : MAMB-ADDA-WOHT-NMRW-JFB

식품 · 식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명	배상민	생년월일	1981년 08월 27일
	주소	경원도 황성군 둔내면 현천리 81-3(광번호 975)	전화번호	휴대전화
명주소	영칭(상호)	영인등록번호	20060015020	
	소재지	경원도 황성군 둔내면 현천리 81-3(광번호 975)		
	식품의 유형	일반중류주	품목제조보고번호	20060015020105
제품정보	제품명	백세고		
	유통기한			
	품질유지기한			
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	원장에 기재		
	용도 용법	원장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	원장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	원장에 기재		
	성상	고유의 색택과 향미를 가지며 이미, 이취가 없음		
	품목의 특성	■ 고열량·저영양 식품 해당 여부 []에 []아니오 [] 해당 있음 ■ 영 유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 []에 []아니오 ■ 알균·열균 저항의 해당 여부 []비알균 []알균 []알균		
	기타	에탄올 함량 51.4%		

「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2021년 03월 30일
보고인 배상민

서울지방식품의약품안전청장 귀하

품목보고번호 : 20060015020105

처리부서	식품의약품안전청 서울지방식품의약품안전청 식품안전과	처리자성명	최유경	처리일자	
------	-----------------------------	-------	-----	------	--

(3) 백세고 숙성 주질 평가

- 백세고 기호성 및 숙성 주질 평가를 위해 숙련된 전문 패널 총 30인을 통하여 맛, 향, 기호도를 평가하였다. 또한 제품 경쟁력 확보를 위해 시판 제품과 블라인드 테스트 진행하였다. 그 결과 맛, 향, 기호도 모두 시판 제품 대비 우수한 평가를 받았다. 2020년 3차년도 숙성 1개월 제품(기호도 7.8)보다 12개월 숙성시 꽃향과 과일향이 더 풍부해지고 맛이 부드러워진 것으로 나타났다.

표 116. 백세고 숙성 주질 비교(12개월)_ 9점 기준

	향	맛	기호도	관능
A 제품(A사)	5	6	6.0	곡물향 맛이 거침
B 제품(H사)	6	7	7.0	과일향 은은하고 깔끔함
C 제품(J사)	6	7	6.5	쌀향 은은하고 부드러움
백세고	7	8	8.2	꽃, 과일향 풍부하고 부드러움

그림 93. *Lb. plantrum* KSD-KM7 활용한 백세고 제품 사진



서. 기능성 유산균 이용한 한국형 sour-beer 레시피 개발

(1) 한국형 sour-beer 개발 필요성

- 최근 유행하고 있는 수제맥주에 한국적 요소를 가미한 한국형 수제맥주를 개발하고자 하였다. 수제맥주는 소비자의 다양한 욕구를 즉각적으로 반영하여 다채로운 술맛이 특징인데, 최근 그 다양성도 한계에 다다르고, 차별화가 어려울 지경이 되었다. 이에 한국의 대표술인 막걸리와 유산균을 접목하여 한국적인 맛과 향 그리고 유산균의 기능성까지 부여한 새로운 개념의 수제맥주를 탄생시켜 새로운 시장을 창출해보고자 한다.

(2) 한국형 sour-beer 개발 공정

- 쌀, 누룩, 물로 담금하여 누룩에서 분리된 *Lb. plantarum* KSD-KM7 배양액을 접종하여 37°C, 3일동안 발효한다. 이렇게 발효된 술덧을 맥주 발효 과정 중, 자비 공정에 투입하여 발효 술덧의 활성화된 유산균을 살균한다. 이 과정을 통해 유산균의 맛과 향 그리고 신맛은 유지하되, 보존성을 위해 유산균의 활성은 제거한다.

(3) 다. 한국형 sour-beer 발효 및 주질 특성 평가

- 한국형 sour-beer 의 발효는 그림 와 같고 관능 특징은 상큼한 신맛과 쓴맛이 조화롭고 기존 sour-beer에 비해 부드러웠다. 또한 유산균을 통해 풍미가 차별화되어 특색이 있었다.

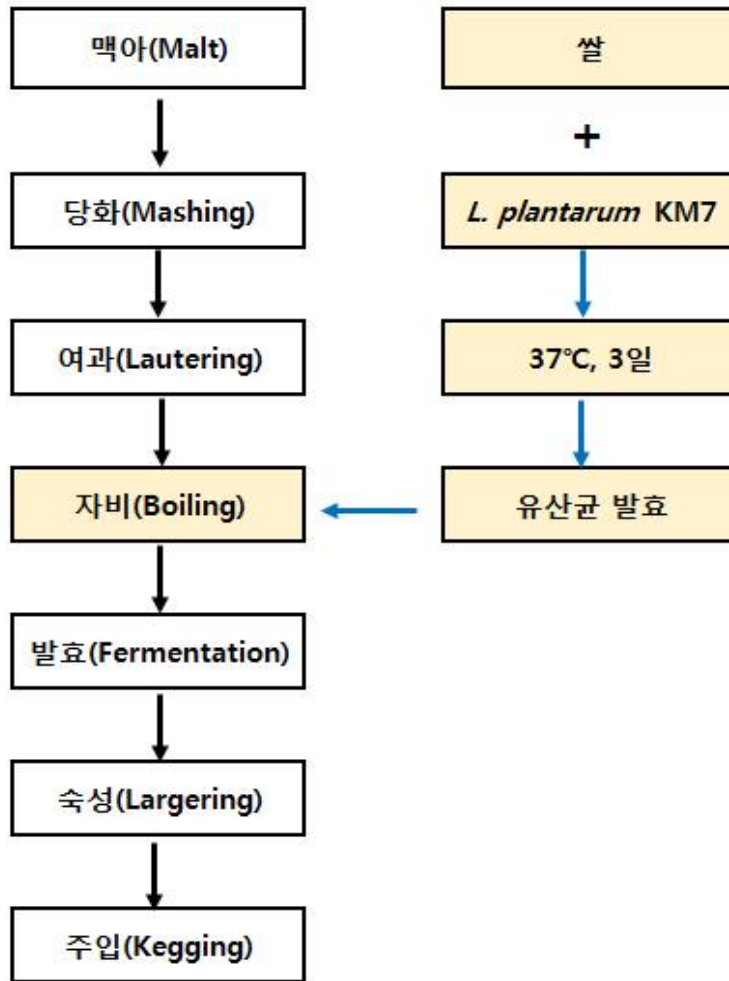


그림 94. 한국형 Sour beer 제조과정

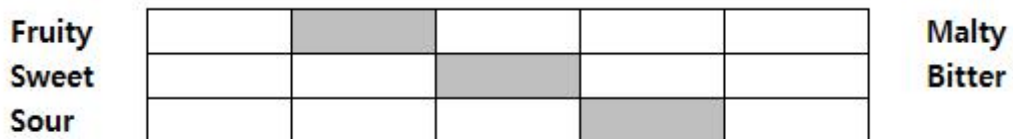


그림 95. 제조한 한국형 sour-beer 관능

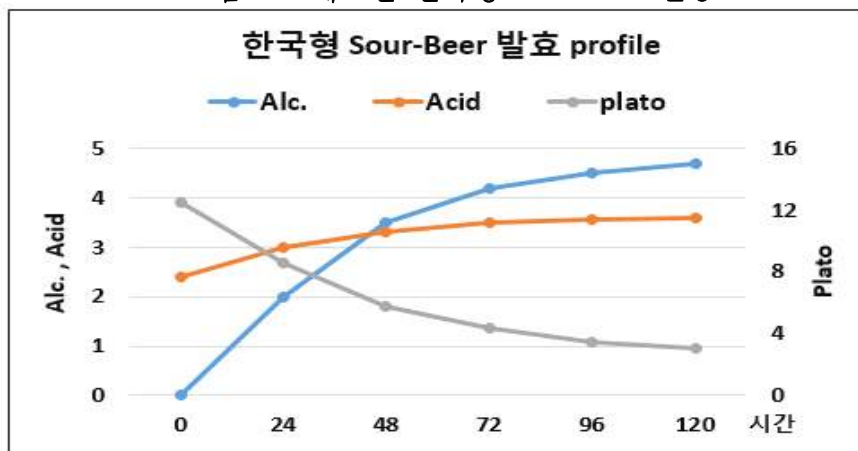


그림 96. 한국형 Sour beer 발효 분석 결과

(4) 한국형 sour-beer 기호성 및 시제품화

- 한국형 sour-beer 기호성 평가를 위해 숙련된 전문 패널 총 20인을 통하여 맛, 향, 기호도를 평가하였다. 또한 제품의 경쟁력 확보를 위해 시판 sour-beer 2종과 블라인드로 테스트하였

다. 그 결과 정통 sour-beer 벨기에(Oude gueze vieille) 제품 대비 기호도가 높게 나타났으며 향후 전문 패널 외에 일반인 대상으로 소비자 조사를 계획하고 있다. 현재 22년 제품 출시 가능하도록 안정성 및 주질 보안을 진행하고 있다.

표 117. 한국형 sour-beer 기호성 평가

9점	향	맛	기호도	관능
벨기에 (Oude gueze vieille)	6.5	5.0	5.5	신맛과 상쾌한 맛, 쿼퀴한 향미 가 복합적으로 어우러짐
설레임(국내 제품)	6.0	5.5	5.0	벨기에 제품 대비 쿼퀴한 향미 없이 깔끔하고 상큼함
K-sour beer	7.0	6.5	6.2	벨기에 제품 대비 쿼퀴한 향미 없이 향긋하고 신맛이 경쾌함

그림 97. 국순당 횡성공장_ sour-beer 제조 설비



그림 98. 한국형 sour-beer 시제품 사진



3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

• 본 연구과제는 전통누룩에 존재하는 미생물의 종균화 및 고부가가치 기능성 제품개발을 목적으로 연구를 진행하여 4년 동안 당초 목표로 했던 연구내용을 충실하게 달성하였음.

1) 전통누룩 유래 고기능성 효모 및 곰팡이 균주 발굴

• 전통누룩에서 230여종 콜로니 분리 후 저온내성, 아황산내성 확인 및 글루타치온 고생산 고기능성 효모 발굴

• 100여종 곰팡이를 분리하여 발효력 및 관능특성 우수 황국 균주개발

○ 효모의 프로바이오틱스 특성확인 및 우수 효모 균주 개발

• 내산성, 내담즙성, 당이용성, 장부착능 등의 다양한 측정을 통해 프로바이오틱스화 가능한 효모 *S. cerevisiae* Boulardii-02를 비롯한 2가지 균주를 발굴하고, 유전체 분석 및 동물실험을 통해 우수성 확보

○ 누룩 유해물질 저감을 위한 발효조건 및 유산균 자원 확보

• 곰팡이에 의해 발생하는 유해물질인 아플라톡신을 저감화를 목표로, 생성 억제 유산균 스크리닝 (*W. paramesenteroides*, *P. pentosaceus* 등) 및 유전체 분석, 기능 유전자, 작용기작 확인

○ 아세트알데하이드 저감화 생물자원 발굴 및 적응진화 기반 개량

• 숙취 유발물질 중에 하나인 아세트알데하이드를 분해할 수 있는 프로바이오틱스 균주(*P. acidilactici*, *S. cerevisiae*)를 전통누룩에서 발굴하여, Non-GMO 방식인 아세트알데하이드에 200 세대 이상 적응 진화를 진행하여 균주개량 및 유전체 분석, 동물실험을 진행하여 유효성 확보

2) 전통누룩 유래 고기능성 미생물 자원을 활용한 고부가가치 제품 개발

○ 지역기반 전통누룩 양조 및 효소특성 분석

• 경기도, 강원도에 존재하는 전통누룩을 복원 및 다양한 특성 분석을 진행하여 지역기반 맞춤형 전통누룩제조 표준화 및 SOP 작성

○ 전통누룩의 과학적 해석 및 제조기술 표준화

• 전통누룩에 존재하는 우점 곰팡이를 선정하여 누룩제조 및 술 발효 공정을 통한 특성평가, 관능평가를 거쳐 개량누룩 개발

○ 전통누룩 유래 Probiotics 제재 및 효모를 통한 고부가가치 제품 개발

• 양조에 적합한 유산균 및 효모를 선별 및 발효조건 최적화를 통하여 신규 Probiotics 막걸리 개발 및 기존 제품 Renewal, 발굴한 유산균을 고급 쌀소주 시제품에 적용하여 고부가가치 제품 개발

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

○ 가. 미생물 유전체사업의 성과목표

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표	4	2		4		2			
1차 목표				1					

년도	실적				1									
2차 년도	목표	1	1		1					1				
	실적	2	1		1					2				
3차 년도	목표	1			1									
	실적	1												
4차 년도	목표	2	1		1					1				
	실적				2									
계	목표	4	2		4					2				
	실적	3	1		4					2				

○ 나. 기타 성과목표

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍 보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	10		15	15		10		10				5	5			5	10	5	
최종목 표	3	2		2	100	4	1,4 00		3			3	1	2.0	4	8		1	4	2
1 차 년 도	목 표			1	50		100		1						1	2			1	
	실 적		1	0	0				1						1	2				
2 차 년 도	목 표	1				1	200					1		2.5	1	2			1	1
	실 적	3	1		1	40	0					2		1.7	3	2			2	
3 차 년 도	목 표	1	1		1	50	1	200					1		1	2		1	1	1
	실 적	1				0	2	2,5 29				1		2.5		2			2	
4 차 년 도	목 표	1	1				2	300				2		1.5	1	2			1	
	실 적	0	2		1		2	5,19 1	\$156				1		1	1			1	
소 계	목 표	3	2		2	100	4	1,40 0		3		3	1	2.0	4	8		1	4	2
	실 적	4	4		2	40	4	7,8 07		1		3	1	2.0	5	6		0	5	0
종료 1차년도																				
종료 2차년도																				

종료 3차년도																				
종료 4차년도																				
종료 5차년도																				
소 계																				
합 계																				

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[미생물유전체사업 성과]

□ 전략미생물 해독

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 28-7	whole genome sequencing	2019.10.31	igem-0000807	12
2	<i>Pediococcus acidilactici</i> RL6-4	whole genome sequencing	2019.11.24	igem-0001399	3.1
3	<i>Pediococcus acidilactici</i> ALE25	whole genome analysis	2020.10.24	igem-0001979	6.6

□ 유용 유전자원 확보

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Weissella paramesenteroides</i> N44-2	whole genome sequencing	2019.10.29	igem-0000808	1.7 G

□ 표준유전체 해독

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

□ 메타유전체 분석

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	전통누룩 및 술덧	microbial community	2019-11-22	igem-0001179	5.2
2	전통누룩 기반 전통주	microbial community	2019-06-28	igem-0000370	6
3	전통누룩, 산성누룩의 미생물 군집분석	microbial community	2021-12-20	igem-0002405	0.326
4	독두를 함유한 전통누룩, 향온곡의 미생물 군집분석	microbial community	2021-12-21	igem-0002404	0.321

□ 유전체 분석기술 개발

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일시	등록번호	생산량 (GB)

□ NABIC 등록

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 28-7	whole genome sequencing	2019.10.31		12
2	<i>Weisella paramesenteroides</i> N44-2	whole genome sequencing	2019.10.31		0.1

병원성미생물진단마커 개발

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

병원성미생물 정보 완성

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

미생물 병발생 기작 규명

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Surface Film Formation in Static-Fermented Rice Vinegar: A Case Study	Mycobiology	JH Yun JH Kim JE Lee	47(2) 250-255	Korea	Taylor & Francis	SCI	2019.3.1	1229-8093	100
2	Volatile components and sensory properties of jujube wine as affected by material preprocessing alcoholic beverage	International journal of food properties	JH Yun JE Lee	21(1) 2052-2061	USA	IFT	SCI	2019.12	1094-2912	100
3	Influence of aflatoxin in Nuruk on the safety of starchbased alcoholic beverage	Journal of Food Science	JH Yun JH Kim JE Lee	85(3) 762-770	USA	IFT	SCI	2020.01	0022-1147	100
4	전통누룩에서 분리한 Saccharomyces cerevisiae var. Boulardii-03 효모의 Probiotic 특성 연구	한국식품영양학회지	EJ Lee JH Kim JE Lee	50(12) 1392-1398	대한민국	한국식품영양학회	비SCIE	2021.11	1226-3311	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	질량분석학회 정기학술대회	이장은	2018.8.23	창원	대한민국
2	2019 KMB Glocal Conference	이장은	2019.8.22	여수	대한민국
3	농식품연구회 심포지엄	이장은	2019.8.27	순창	대한민국
4	전통주 활성화를 위한 누룩과 발효의 발전방안 세미나	이장은	2019.10.17	공주	대한민국
5	6th mBiome International Conference	김재호	2021.12.10	서울	대한민국

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호
----	--------	-----	-------

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
----	------------------------	----------	----------	-------

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	아플라톡신 생성 균주의 생육억제 및 아플라톡신 생성 억제 활성을 갖는 신규한 와이젤라 파라메센테로이데스 균주 및 이의 용도	대한민국	김재호 이장은 윤정현 외	2019.5. 22	10-2019-0060132	김재호 이장은 윤정현 외	2020.05.19	10-2114663	100%	
2	프로바이오틱 활성을 갖는 사카로마이세스 세레비지에 보울라디-03 신규주 및 이의 용도	대한민국	이장은 이은정 김재호 외	2019.10.16	10-2019-0128594	이장은 이은정 김재호 외	2021.07.02	10-2275115	100%	
3	신규 효모인 사카로마이세스 세레비지에 KSD-YC	대한민국				신우창, 박선영, 백상훈	2019.08.30	10-2018536	100%	
4	락토바실러스 플란타룸 KSD-KM7 및 그 배양물	대한민국	신우창 외	2019.11	10-2019-0174531				100%	
5	아세트알데하이드를 분해능 및 글루타치온 생성능을 가지는 적응진화된 효모, 이의 제조방법 및 이의 용도	대한민국	최재웅 김재호 이영경 이장은 외	2020.06.08	10-2020-0068998	최재웅 김재호 이영경 이장은 외	2021.07.12	10-2278292	100%	

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
----	-----	----	------	------	------	-------	------	------	----	----

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율
----	------	-----	------	-----	-------	-------	-----

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호
----	----	-----	-----	-------	-------

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)]

(22쪽 중 8쪽)

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	통상실시권	프로바이오틱 활성을 갖는 사카로마이세스 세레비지에 보올라디-03 신규주 및 이의 용도 외 1건	서울장수막걸리	2020	40,000,000	
2	통상실시권	Aspergillus oryzae Singok 균주 및 이를 활용한 입국 제조 노하우	안동발효	2021	입국 생산량의 1 kg 당 100원을 경산기술료	

- * 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	기존제품개선	국내	전통누룩 유래 고기능성 미생물을 활용한 고부가가치 제품 개발_국생막 Renewal	“솔뎃 대량 배양 기술” 확립 및 이를 통한 국생막 Renewal	국순당	1,561,937		2020	
2	자기실시	신제품개발	국내	전통누룩 유래 고기능성 미생물을 활용한 고부가가치 제품 개발_유산균 사균체 활용 프리바이오투	1000억 프리바이오투 막걸리	국순당	967,511		2020	
3	자기실시	기존제품개선	국내	전통누룩 유래 고기능성 미생물을 활용한 고부가가치 제품 개발_국생막 Renewal	효모 및 유산균 배양을 통한 국생막 Renewal	국순당	5,191,985		2021	
4	자기실시	신제품개발	국내	전통누룩 유래 고기능성 미생물을 활용한 고부가가치 제품 개발_유산균 사균체 활용 프리바이오투_수출	1000억 프리바이오투 막걸리_수출용	국순당		156,853	2021	

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
전통누룩 유래 고기능성 미생물을 활용한 고부가가치 제품 개발_국생막 Renewal	2020	1,561,937		1,561,937	회사내 회계
전통누룩 유래 고기능성 미생물을 활용한 고부가가치 제품 개발_유산균 사균체 활용 프리바이오투	2020	967,511		967,511	회사내 회계
전통누룩 유래 고기능성 미생물을 활용한 고부가가치 제품 개발_국생막 Renewal	2021	5,191,985		5,191,985	회사내 회계
전통누룩 유래 고기능성 미생물을 활용한 고부가가치 제품 개발_유산균 사균체 활용 프리바이오투_수출	2021		156,853	18,806 (원화)	회사내 회계
합계		7,721,433	156,853	7,740,239	

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
국외					
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2018년	2021년	
1	전통누룩 유래 고기능성 미생물 자원을 활용한 고부가가치 제품 개발	국순당	1	1	1
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력		
		생산인력		
	개발 후	연구인력		
		생산인력		

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황															
			학위별				성별		지역별									
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타					

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	기타	2018우리술대축제	2018우리술대축제	2018-11-23
2	기타	2018푸드위크	2018푸드위크	2018-11-28
3	기타	전통주 산업발전을 위한 춘천 술 포럼	전통주 산업발전을 위한 춘천 술 포럼	2019-10-11
4	기타	2019 국제농업박람회	2019 국제농업박람회	2019-10-17
5	기타	서울국제식품산업전	서울국제식품산업전	2021-11-24

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 종질지(80g/m²)
(22쪽 중 11쪽)]

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

--

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

--

2) 목표 달성 수준

추진목표	달성내용	달성도 (%)
전통누룩 유래 미생물 자원의 고기능성 특성 발굴 및 기 개발 균주의 유전체 분석 및 핵심유전자 발현 최적화 조건 설정	<ul style="list-style-type: none"> 고기능성 미생물 균주 탐색 및 확보를 진행하기 위하여 글루타치온 고생성 효모 선발 및 양조적성 평가를 진행하여 <i>S. cerevisiae</i> 89-3-1 균주 확보함 우수 곰팡이 균주를 활용한 황국 제조공정 확립함 	100
유해물질 저감 누룩 발효조건 연구	<ul style="list-style-type: none"> 아플라톡신 고,저생성 누룩의 메타지놈 분석 및 누룩 유래 곰팡이의 아플라톡신 생성확인, <i>A. flavus</i> 생육억제 균주 탐색 이를 통해 <i>A. flavus</i> 생장 억제 유산균주 2종 이상 확보함 	100
유산균의 발효에의 영향 분석	<ul style="list-style-type: none"> 전통누룩 확보 및 유산균주 24종, 효모 230종, 분석용 전통발효식품 유래 유산균 98종 확보함 유산균 122종의 partial sequencing data 확보함 	100
지역기반 전통누룩 양조 및 효소학적 특성 분석, 미생물학적 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> 경기, 강원 지역기반 전통누룩 제조 및 효소학적 특성 분석 (당화력, 단백질분해력 등) 지역기반에 따른 전통누룩의 양조 발효 특성확인 함 	100

전통누룩의 과학적 해석 및 제조기술 표준화 마련	<ul style="list-style-type: none"> 표준화 항목 설정(두께) 및 성형 두께에 따른 특성 규명 및 평가를 진행하였음 분리 누룩곰팡이 이용 개량누룩 시험 생산 및 특성 양조 특성 평가함 	100
전통누룩 유래 미생물 생리기능성 발굴	<ul style="list-style-type: none"> 전통누룩 유래 프로바이오틱스 활성을 갖는 효모 발굴을 진행하여 고기능성 프로바이오 특성을 갖는 균주를 발굴하였음 	100
아세트알데하이드 저감화를 위한 전통누룩 유래 미생물 자원 확보 및 종균 개량	<ul style="list-style-type: none"> 기 선별한 유산균 자원에서 아세트알데하이드 분해능을 측정하여 우수 유산균 및 효모자원 4종 확보 및 적응진화를 통한 개량 	100
지역 기반 맞춤형 누룩의 메타지놈 분석	<ul style="list-style-type: none"> 성형 및 발효조건에 따른 전통누룩 특성 구명 및 제조표준화 마련함 	100
기선별된 전통누룩 유래 유산균 특성 탐색 및 신규 유전자원 확보	<ul style="list-style-type: none"> 전통누룩 유래 유산균 중 신규 유산균 3종 및 기 선별 유산균 1종을 내산성, 내알코올성, 주류음료 적합성 평가를 통해 우수 양조 유산균을 선별함 	100
Probiotics 검증된 유산균의 종균화, 제제화 및 적용 기능성 시제품 레시피 개발	<ul style="list-style-type: none"> 고농도 배양조건을 설정하여 유산균을 활용한 시제품 레시피 개발 및 공정을 설립하였음 	100
전통누룩 안정성을 위한 아플라톡신 저감 유산균 연구	<ul style="list-style-type: none"> 전통누룩 유래 유산균의 antifungal 후보물질 선별 및 동정하여 2가지 유산균 <i>W. paramesenteroides</i>와 <i>P. pentosaceus</i> 발굴 및 antifungal 후보물질 12 종 분석 	100
아세트알데하이드 분해 유산균의 특성 연구	<ul style="list-style-type: none"> 아세트알데하이드 분해능이 개선된 유산균의 유전적 및 효소적 특성확인 하여 유전적 특성인 Oxidoreductase를 확인하였음 	100
숙취저감화 효모균주의 발굴 및 개량	<ul style="list-style-type: none"> 숙취요소 제거를 위한 아세트알데하이드 분해 효모 개발 및 Glutathione 생산량 증가 확인 	100
오믹스기반 고기능성 미생물 균주 및 종균의 발효 최적화 연구	<ul style="list-style-type: none"> 시판 누룩에 존재하는 아플라톡신을 대사체 분석하고 함유하고 있는 진균의 군집구조 및 세균의 16S rRNA 분석을 통한 메타지놈 분석, 항진균 유산균의 유전체 분석을 진행하였음. 	100
전통누룩 유래 고기능성 미생물 표준화 기술 개발 및 소재화 활용	<ul style="list-style-type: none"> 개량 균주를 Forward, Backward Engineering을 통해 균주개량 표준화 기술 개발 및 동물실험을 통해 소재화 및 산업화 가능성 확보 	100
전통누룩 유래 우수 균주 활용제품 개발 및 양조특성, 기능성 구명	<ul style="list-style-type: none"> 유산균을 이용한 원료 쌀 전처리 기술 개발 및 Sour-beer 시제품 개발 	100
복합종균을 통한 고품질 전통주 개발	<ul style="list-style-type: none"> 대량 생산시 Lot별 제품 표준화, 균일 생산 매뉴얼 구축 및 시제품의 기호도, 기능성, 안전성 및 안정성 평가 	100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

해당사항 없음

2) 자체 보완활동

해당사항 없음

3) 연구개발 과정의 성실성

해당사항 없음

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

기존 전통누룩 연구 한계를 극복

- 선행 전통 누룩 관련 연구는 16S rRNA 분석을 통하여 누룩에 존재하는 미생물 Pool을 조사하는 수준에서 연구가 마무리되었다. 본 연구는 수집한 지역별 누룩에 있는 미생물을 분류하여 230 여종이 넘는 콜로니를 확인하여 높은 기능성을 갖는 균주를 발굴하여 고부가가치 제품화를 진행하였다.

특이적인 기능성 미생물의 종균화

- 발굴한 기능성 또한 프로바이오틱스 특성인 내산성, 내담즙성, 당이용성, 장부착능 등의 다양한 특성을 통해 프로바이오틱스화 가능한 효모 *S. cerevisiae Boulardii-03*을 증명하였는데 효모는 이러한 연구사례가 적었다는 점에서 본 연구의 중요성을 설명할 수 있다.
- 아플라톡신 생산 진균 저해 유산균 및 적응진화를 통해 아세트알데하이드 저감화 기능성 증대된 유산균의 경우 역시 그 기능성 연구가 적은 사례이기 때문에 추가적인 연구를 통해 본 연구가 해당 기능성을 연구하는 플랫폼기술이 될 수 있을 것으로 기대된다.

연구결과가 실제 매출까지 연결된 사례

- 본 연구에서 파생되어 나온 미생물자원의 제품화로 실제 70 억원 이상의 매출을 달성할 수 있었다. 이는 연구결과가 경제적인 성과를 얻은 사례이다. 앞으로도 산업적으로 유의미한 성과를 얻을 수 있을 것으로, 일회성 연구가 아닌 지속가능한 연구결과가 될 것으로 예상된다.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 실험실에서 개념이 확인된 프로바이오틱스 효모, 아플라톡신 생산 저해 유산균, 아세트알데하이드 저감화 유산균의 경우 산업적인 Large scale 발효가 가능할 수 있도록 발효최적화 연구를 진행하고자 한다. 이러한 연구는 추가연구를 통해 충분히 가능한 목표로 예상된다.
- 본 연구에서 이미 제품화에 성공한 ‘국순당 생막걸리’, ‘1000억 유산균 막걸리’ 외에도 추가적인 고품질 제품 쌀소주, Sour 맥주 등 제품화를 통해서 본 연구성과를 이용하고 있음.
- 추후 연구에서는 현재 확보한 전통누룩 유래 라이브러리를 이용하여 추가적인 기능성 미생물자원을 스크리닝하고자 한다.

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈다부처 유전체사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈다부처 유전체사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.