발 간 등 록 번 호
11-1541000-001347-01

효소공학기법을 이용한 기능성 과실주 제조기술 개발 및 제품화

Development and Manufacturing of Functional Fruit Alcoholic Beverage Using Enzyme Engineering

인천대학교

농 림 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “효소공학기법을 이용한 기능성 과실주 제조기술 개발 및 제품화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 4월 9일

주관연구기관명 : 인천대학교
주관연구책임자 : 김 정 완
세부연구책임자 : 박 관 화
연 구 원 : 박 종 태
연 구 원 : 심 재 훈
협동연구기관명 : ㈜삼립식품
협동연구책임자 : 조 상 호
연 구 원 : 홍 성 율
연 구 원 : 안 재 범
위탁연구기과명 : 고려대학교
위탁연구책임자 : 이 성 준

요 약 문

Ⅰ. 제 목 : 효소공학기법을 이용한 기능성 과실주 제조기술 개발 및 제품화

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 급증하고 있는 포도주에 대한 관심과 소비와 관련하여 국내 농산물 자원을 활용하고 국민 건강을 보호하며 수입대체 및 수출을 목표로 서해안 일대에서 생산되는 우수한 품질의 국내산 쌀 및 포도, 버섯 등과 칡을 원료로 새로운 생물공학적 기법을 이용하여 항산화 및 숙취저감 활성이 부가된 기능성 과실주 제조기술을 개발하고 제품화함.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

다양한 탄수화물 분해효소들을 이용하여 전분당화 주생성물로 말토오스가 생산되게 함으로써 신규 분리된 효모주 혹은 개량된 효모의 지속적 발효능을 증진시켜 제품의 에탄올 함량을 조절하며, 동시에 당화과정에서 생성되는 덱스트린을 분지올리고당화하여 점도를 감소시키는 동시에 칡과 같은 식물추출물을 첨가하여 항산화작용 증진과 숙취현상 저하 등의 기능성을 부여함으로써 국산 농산물 자원 (곡류, 과일 및 식물)을 활용한 새로운 발효공법에 의한 기능성 과실주를 개발하여 제품화함.

Ⅳ. 연구개발결과

- 쌀 전분에 α-glucosidase 및 glucose isomerase를 가해 발효하고 켐벨얼리 및 머스캣 베일리A를 가하여 쌀포도주를 제조하였고 maltogenic amylase를 추가로 첨가하여 분지올리고당 (BOS)이 함유된 기능성 포도주를 제조하였음. 또한 칡분말을 첨가하여 인공가제인 메타중아황산칼륨을 대체하고 puerarin이 함유된 기능성 포도주를 제조하였음.
- 쌀포도주의 에탄올 함량은 12~13%였으며, 칡분말 포도주의 puerarin의 함량은 10 mg/100 mL이었음. 총산은 0.63%, pH는 3.85이었고, BOS가 함유된 포도주에서는 isomaltose가 측정되었음. 전자코를 이용하여 분석했을 때 쌀포도주가 일반 포도주에 비해 향기성분이 더 진했으며 전자혀로 비교한 결과 쌀포도주가 시판 와인에 비해 향미 성분이 많았고 짠맛과 쓴맛이 약간 강한 편이었음.
- 쌀포도주의 주모를 개발하기 위해서 각 종 시료에서 분리된 637개 효모 중 내당성 및 내알코올성이 높은 115개를 선별한 후 최종적으로 *S. cerevisiae* NK28을 선발하였음. 분리효모주는 최적생장조건 하에서 최대 에탄올 생성량이 98.96 g/L였고 발효저해제들에 대한 저항성도 좋아 산업균주인 *S. cerevisiae* D5A보다 발효특성이 우수하였음.

- *S. cerevisiae* NK28로 제조한 포도주는 상용효모로 제조한 포도주보다 숙취와 관련된 메탄올 함량이 낮았고, malic acid, tartaric acid, formic acid, acetic acid의 함량이 낮았으며 관능 특성은 NK28로 제조된 포도주가 향기, 목넘김, 후미 등에서 상용효모로 제조된 포도주보다 우수하여 포도주 발효 주모로서의 가능성이 높았음.
- 쌀포도주에 포함된 puerarin은 혈액 내 간기능 지표인 ASTL과 ALTL의 증가를 억제시키고 알코올에 의한 간 기능 손상을 억제하며 혈중 알코올 농도 감소에도 효과가 있음을 *in vivo* 실험을 통해 밝혔음.
- 또한 puerarin이 autophagy를 활성화시키고 간세포에 형성되는 콜레스테롤과 TG 등의 지질 생성물을 감소시키며, 에탄올에 의해 유래된 간비대증이나 지방간을 회복시키는 것으로 분석되어 본 연구에서 개발된 쌀포도주의 기능성을 설명할 수 있었음.
- 위의 쌀포도주 제조기술 개발을 토대로 ㈜인천바이오를 설립하였으며 제조 및 판매허가를 득하여 사업화하였음.

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

- 위의 연구를 통하여 특허등록 1건, 특허출원 1건, SCI논문 4건, 국내논문 1건 및 다수의 학술대회 포스터 발표의 성과를 거두었음.
- 또한 본 연구에서 개발된 기술을 토대로 ㈜인천바이오 설립으로 사업화하였음.
- 본 연구개발 내용 및 사업화에 대해 전국적인 주요 일간지에 다수 보도된 바 있음.
- 본 연구개발을 통해서 박사과정생 10명, 석사과정생 12명, 학부생 11명, 기타 4명 등 총 연인원 35명의 연구인력을 양성하였음.
- 향후, 본 연구에서 개발된 내용을 토대로 쌀포도주의 맛과 질 향상, 기능성 개선, 경제성 개선을 통하여 사업성을 높이고, 2014년 인천에서 개최되는 아시안게임에서 건배주로 사용될 수 있도록 노력할 것임.

SUMMARY

Ⅰ. Title : **Development of Manufacturing Techniques for Functional Fruit Alcohol Beverage Using Enzyme Engineering**

Ⅱ. Aims of Research and Development

Recently, interest on wine and its consumption has been increased drastically in Korea. As an effort not only to promote utilization of domestic agricultural resources industrially and well-being of Koreans, but also to replace imported wine with domestic wine, this study aims at development of techniques for manufacturing functional wine that contains more anti-oxidants and causes less hang-over. For the purpose, grapes and rice produced in Incheon area are to be fermented with the addition of kudzu by applying techniques of enzyme engineering.

Ⅲ. Contents and Scope of Research and Development

Rice starch is to be saccharified by various amylolytic enzymes such that the hydrolysate has maltose as the major product and modulate the amount of ethanol during extended fermentation using newly isolated yeast or strains modified by genetic engineering. Viscosity of the hydrolysate is to be reduced by converting dextrin to branched oligosaccharides using maltogenic amylase. Functionality of rice wine would be improved by the addition of kudzu with high amount of antioxidant and by lowering side effect of hang-over. The techniques developed and the results obtained in this study are to be applied to promote manufacture and commercialization of rice wine.

Ⅳ. Results of Research and Development

- Rice wine was fermented using rice starch treated with α-glucosidase and glucose isomerase and must of Campbell early and Muscat Bailey A. Branched oligosaccharides (BOS) were also produced in the wine by the addition of maltogenic amylase. Kudzu powder could substitute $K_2S_2O_5$, an artificial additive for wine fermentation, and provided puerarin, a functional ingredient when it as added to the wine must..
- Ethanol content of the rice wine was 12~13%, puerarin content 10 mg/100 mL, total amount of acids 0.63%, and pH 3.85. Isomaltose was detected in the rice wine containing BOS. E-nose analysis indicated that rice wine had more volatile compounds than regular wine. E-tongue analysis suggested that rice wine had more compounds

enhancing taste and was stronger in bitter and salty taste than commercial wine.

- As an effort to develop wine yeast with tolerance against high concentrations of glucose and alcohol, 115 yeast strains were selected among 637 yeast isolates and finally *S. cerevisiae* NK28 was selected. The selected isolate was not appropriate for genetic breeding but was superior to an industrial strain, *S. cerevisiae* D5A, in its fermentation properties. Under optimal growth conditions, it produced 98.96 g/L of ethanol in maximum and more resistant to fermentation inhibitors than commercial strains.
- Wine fermented with *S. cerevisiae* NK28 contained less methanol that causes hang-over and less malic acid, tartaric acid, formic acid, acetic acid than that fermented by commercial wine yeast. Sensory test indicated that wine fermented with NK28 was better in aroma, sharpness, and after taste than that fermented with commercial strain.
- *In vivo* assays showed that puerarin in the rice wine repressed increases in ASTL and ALTL, the indices of hepatic function and reduced alcohol concentration in blood.
- Puerarin also activated autophagy and reduced lipid synthesis including cholesterol as well as TG, thereby helping recover of lipid liver.
- Based on the results and techniques developed in this study, IncheonBio Co. was established and permission for manufacturing and trading wine were obtained.

Ⅴ. Accomplishments and Plan for Application

- Accomplishments made by the research and development are as follows:

- 1 patent registered, 1 patent in pending, 4 scientific articles published in SCI journal, and 1 in domestic journals
- establishment of IncheonBio Co.
- numerous reports in major newspapers and TV regarding the R&D and commercialization
- training graduate students in doctoral (10), master (12), undergraduate (11) programs and others (4) for 3 years
- In the future, overall quality of the rice wine such as taste, flavor as well as functionality, economic feasibility & efficiency are to be improved for further successful commercialization

CONTENTS

Chapter 1 Overview of Research and Development 7

Chapter 2 Current Status of Research and Development in Wine Making 13

Chapter 3 Contents and Results of Research and Development 22

Chapter 4 Achievement of Goals and Contributions 142

Chapter 5 Accomplishments and Plan for Application 147

Chapter 6 International Scientific Information Obtained during Reserch 159

Chapter 7 Reference 163

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 7

제 2 장 국내외 기술개발 현황 13

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 22

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 142

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획..... 147

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 159

제 7 장 참고문헌 163

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목표 및 내용

1) 연구개발의 최종목표 및 주요내용

국내산 전분 및 과일, 버섯 등을 원료로 새로운 생물공학적 기법을 개발하고 이를 이용하여 신개념의 고품질기능성 과실주 제조기술을 개발하고 제품화하여 국내 농산물 자원 특히 인천 인근의 서해안 및 도서에서 생산되는 우수한 품질의 곡류 및 과실을 활용하고 국민 건강을 보호하며 수입대체 및 수출을 목표로 함.

2) 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

제1세부과제 : 과실주 발효용 미생물의 선발 및 개량

● **목표 :** 서해안에서 생산되는 당도가 높은 포도의 발효에 적합한 효모균주들을 국내산 과실에서 분리하고, 그 특성을 분석하여 우수균주를 선발하며 생물공학적, 유전학적 기법을 이용하여 개량함으로써 발효공정의 효율성을 높이고자 함.

● **내용 :**

- 국내산 포도를 비롯한 각종 과실에서 효모균주 분리
- 분리된 효모 균주들의 동정
- 분리균주들의 특성분석 (전분분해효소 생산능, 당 및 알코올 내성 등)
- 분리균주들의 발효능 분석 (다양한 곡자에서의 알코올 생산능)
- 기능성 효소 display 효모개발 (MAase, debranching enzyme, pectinase)
- 분리균주들/display 효모간의 세포융합을 통한 효모의 개량
- 개량효모의 발효능 분석
- 개량효모의 전분 분해능, 말토오스 생성능 분석
- 제품화 공정에서의 개량효모의 기능 및 발효공정 최적화

제2세부과제 : 당화 및 탈분지효소 (debranching enzyme)를 이용한 새로운 과실주 발효공정 개발

● **목표 :** 쌀 등 국내산 농산물의 전분에 당화 및 탈분지효소를 가하여 말토오스가 주성분이며 덱스트린 함량이 감소되고 이소말토올리고당이 다량 함유된 부원료 (adjunt)를 생산하고자 함

● **내용 :**

- 효소의 정제 및 특성분석 (MAase, debranching enzyme)
- 원료전분의 액화/당화반응 조건

- 원료전분에 따른 말토오스 생성 조건 {DE/MAase, MAase, α-MAase (Novozyme)}
- 분지올리고당 생성조건 및 분석
- 효소반응 및 발효공정의 개발
- 말토오스 생성 및 에탄올발효 최적조건 확립
- 분지올리고당 생성 최적화 공정
- 분지올리고당 구조분석
- 제품화 공정에서의 효소반응 및 제조공정 최적화 : 효소처리 공정에 따른 비교평가
- 제품의 특성 : 기존제품과 비교평가 (분지올리고당 함량, 구조분석)

제3세부(협동)과제 : 과실주 발효용 전분원료 및 천연추출물 개발

● **목표** : 과실즙의 효모 에탄올 발효를 효과적으로 일으키게 할 뿐만 아니라 항산화 및 숙취를 저감하는 기능을 갖는 곡물, 작물, 버섯 등의 소재를 발굴하여 그 특성을 규명하고 (위탁) 효소를 이용하여 생성된 부원료액, 개량효모 등을 사용하는 포도즙 발효공정을 최적화하여 기능성을 갖는 제품을 제조함.

● **내용** :

- 전분 등 원료 선발 및 가공적성 분석 (쌀 또는 기타 곡류전분, 식물추출물, 버섯-*Tremella fuciformis*, *Sparassis crispa*)
- 기능성 소재의 생리활성 특성 분석 (위탁과제 참고)
- 원료과실의 선발 및 가공적성 분석 (서해안 포도; Campbell early 등)
- Pilot 공장 적용 (강화군 농업기술센터 생산시설 이용: 담당자 정해권 실장)
- 관능평가 (자문위원: 포도연구사업단 육철 박사)
- 제품화

제3세부(위탁)과제 : 과실주의 기능성 지표 측정 (위탁)

● **목표** : 숙취 기능성 물질의 알코올 대사 촉진효과, 숙취 예방 및 해소에 미치는 영향, 간 보호 기능에 대한 효과를 밝혀 기능성 식품 소재화 및 제품화 기반을 마련하고 항산화 작용을 규명하여 과실주 색소성분의 안정화 기능을 검증하는데 최종목표를 두고 있음.

● **내용** :

- 알코올분해 효소인 ADH, ALDH의 활성측정으로 기능성물질의 숙취해소효과 평가.
  :알코올을 분해하는데 직접적으로 관여하는 Alcohol dehydrogenase(ADH), Aldehyde dehyderogenase(ALDH)의 활성을 측정함. ADH의 경우 완충용액, 효소, NAD^+, sample과 기질이 되는 ethanol을 넣고 반응시켜 생성되는 NADH를 흡광도로 측정하여 효소활성의 지표로 사용함. ALDH의 경우 기질을 aldehyde로 사용하고 측정방법은 동일.
- 동물 모델을 이용하여 숙취 기능성 물질이 혈중 알코올 농도에 미치는 영향을 평가.
  : ethanol 투여 30분전에 숙취 기능성 물질을 미리 경구 투여 한 후 ethanol을 투여함. 투여

후 15분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 12시간 단위로 안와 채혈하여 시간에 따른 혈중 알코올 농도를 측정함으로써 과실주내 기능성 물질의 알코올 분해능 및 숙취 예방·해소 효과를 평가

- 쥐의 간 조직을 이용하여 알코올 대사효소 (ADH, ALDH)의 활성측정.

  : 실험동물은 4-6주령의 Sprague Dawley rat을 구입하여 일정기간 순화 시킨 후 실험에 사용. 동물 실험군은 다음과 같이 분류함.

  a) water 투여군

  b) ethanol/water 투여군

  c) ethanol/상업적 숙취해소 음료 투여군

  d) ethanol/기능성 과실주 투여군

  e) b, c, d군과 동일한 ethanol 함량의 기능성 과실주 투여군

  이 동물 실험군에 위와 같이 4주 동안 경구투여 후 실험 종료. 실험 종료 후 간 조직을 적출하고, 초고속 원심분리 하여 얻은 cytosol 분획을 통해 체내 알코올 대사 효소의 활성을 측정.

- 간 기능의 지표효소로 이용되는 ALT, AST의 활성을 측정함으로서 알코올 섭취 시 숙취 기능성 물질이 간 기능 보호에 미치는 영향 평가.

  : 위에서 분류한 실험군에 따라 실험을 진행한 후 2주, 4주차에 채혈하여 원심분리를 통해 혈청만 분리한 후 간 기능 지표효소인 ALT, AST의 활성을 측정.

- 알코올 대사에 관련하는 biomarker 측정으로 항숙취 기능성 물질의 숙취해소 작용기작 연구.

  : 위에서 분류한 실험군에 따라 실험을 진행한 후 실험 종료 시 간 조직을 적출하여 TRIZOL을 이용해 RNA를 분리함. 이 RNA를 통해 cDNA(complementary DNA)를 합성하고 RT-PCR(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)을 통해 기능성 과실주가 유전자 발현 수준에서 미치는 영향을 연구.

- 숙취 기능성 물질의 항산화 능력 평가 {DPPH 라디칼 소거작용, TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substance) assay}

  : DPPH의 경우 ethanol에 녹인 시료와 DPPH를 넣고 반응시킨 후에 흡광도를 측정 함으로서 기능성 과실주가 DPPH의 라디칼을 소거하는 능력을 평가. TBARS assay의 경우 동물 실험 후 적출한 간 조직에 SDS, acetic acid, TBA 시약을 넣고 반응시켜 기능성 과실주의 체내 항산화 능력을 평가.

- 과실주 색소성분 안정제 효과 평가

  : 기능성 과실주에서 용매를 이용 하여 과실주내 유용 색소 성분을 추출함. 온도에 따른 안정성을 확인하기 위해서는 시료를 0, 10, 20, 30, 40, 50℃에 보관한 후 일정 시간 마다 시료를 취하여 흡광도를 측정함으로써 색소의 안정성을 검증. 동일한 방법으로 변인을 달리하여 빛, 당류, 유기산, 금속이온에 대한 기능성 과실주의 색소 안정성을 평가.

2. 연구개발의 내용 및 범위

1) 1차년도 내용 및 범위

구분	연도	연구개발의 내용	연구개발의 범위
1차 년도	2009	1) 발효미생물의 탐색 및 선발	•국내산 과실에서의 효모 분리 - 분리효모주의 동정 (Microlog TM40 kit, ITS 부위 유전자 검색) • 분리효모주의 특성분석 - 아밀레이즈 생산능, 내산성, 펙티네이즈 생산능 등 - 당 및 알코올 내성, 항산화제 생산능 알코올 생성능, 생장속도
		2) 전분 액화/당화공정을 위한 최적효소 선발 및 반응조건 확립	• 효소의 정제 및 특성분석 - debranching enzyme 정제 및 특성 규명 - MAase의 정제 및 특성 규명 •원료전분의 액화/당화반응 조건 • 원료전분에 따른 말토오스 생성 조건 - debranching enzyme/MAase - MAase - α-MAase (Novozyme) •분지올리고당 생성조건 및 분석
		3) 발효원료 선발 및 가공 기능성 물질의 숙취해소 활성 평가 (*in vitro*)	•전분 등 원료 선발 - 쌀, 식물추출물, *Tremella fuciformis* *Sparassis crispa* •원료과실의 선발 및 가공적성 분석 - 서해안 포도 •기능성 물질의 숙취해소 활성 지표로 활용될 수 있는 ADH (Alcohol dehydrogenase), ALDH (Aldehyde dehydrogenase)의 활성 측정 (*in vitro*) • DPPH 라디칼 소거작용을 이용하여 기능성 물질의 항산화능 평가 • 간(liver)조직을 이용한 TBARS assay를 통해 숙취 기능성 물질의 체내 항산화 능력 평가

2) 2차년도의 내용 및 범위

구분	연도	연구개발의 내용	연구개발의 범위
2차 년도	2010	1) 효모균주의 개량	• MAase 유전자 등 효모에 cloning 효모표면의 MAase, pectinase 등 효소발현 분석 (pδYD1 벡터 이용) • 개량효모의 전분분해능, 포도즙 청징 활성 분석 • 분리된 우수균주와 효소 display 효모균주 간의 융합을 통한 균주개량 • 개량효모의 발효특성 분석 (산도, 알코올 농도 등) • 개량효모의 안정성 분석
		2) 효소의 반응조건 및 발효공정에의 적용	• 효소반응 및 발효공정의 개발 - 말토오스 생성 및 에탄올발효 최적조건 확립 - 분지올리고당 생성 최적화 공정 - 분지올리고당 구조분석
		3) 발효공정개발 과실주 품질평가 지표 탐색 지표물질을 이용한 품질 향상 기능성물질의 선발 및 특성 기능성 물질의 생체 내 숙취해소능 평가 (*in vivo*)	•공정 및 발효균주변화에 따른 지표물질의 변화 연구 •지표물질의 효율적 분석 방법 개발 •항산화 식물추출물 평가 및 추출공정 개발 •항숙취제 선발 및 추출공정 개발 • mouse을 이용하여 혈중 알코올 농도 및 아세트알데히드 농도 측정 •간(liver)조직 중 알코올 대사효소 (ADH, ALDH)의 활성측정.

3) 3차년도 내용 및 범위

구분	연도	연구개발의 내용	연구개발의 범위
3차 년도	2011	1) 미생물을 이용한 전분/과실 발효기술 및 제품화	•제품화 공정에서의 효모발효 및 제조공정 최적화 : 분리균주, 개량균주의 발효공정 적용 주모의 첨가량 결정

			발효 중 잡균의 생장제어 발효공정 중 효모균주의 안정성
		2) 효소처리공정 신기술 개발 및 제품화	•제품화 공정에서의 효소반응 및 제조 공정 최적화 : 부원료액과 포도즙의 혼합비율 결정 효소처리 공정에 따른 비교평가 •제품의 특성 : 기존제품과 비교평가 - 분지올리고당/덱스트린 함량 - 분지올리고당 구조분석 - 제품 내 기능성물질 함량 분석
		3) 제품화 및 규격화 과실주 품질 평가 지표 확립 및 규격화 관능평가를 통한 품질 개선 기능성물질에 의한 간 기능 변화 및 biomarker 측정	• Pilot 공장 적용 (인천대학교 포도주 생산시설 이용) • 제품화 • 품질 지표물질 분석을 통한 공정의 규격화 및 안정화 • 제품의 관능적 특성과 지표물질 함량과의 관계 확립 • 혈청 중 간(liver)기능 지표효소활성 측정(ALT, AST) • 알코올 대사에 관련된 유전자들의 발현정도를 측정 - ADH, ALDH, SOD (Superoxide dismutase), GPX5 (Glutathion peroxidase type 5), CAT (Catalase) • 기능성 물질에 의한 제품 내 색소성분의 안정성 평가 • 관능검사 - 소몰리에로 구성된 전문인을 대상으로 실시 - 색도 (빨강, 보라, 분홍, 자주, 오렌지색) - 향기성분 (포도, 알코올, 레몬, Oak, 꽃냄새, 효모, 사과, SO_2) - 맛 (신맛, 단맛, 쓴맛, 짠맛, 알코올맛 떫은 맛, 포도맛, 꽃맛 등)

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 특허, 논문, 제품(시장) 분석

1) 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외 (미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB (www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		**효소를 이용한 주류 제조**	**효모탐색 및 개량**	**기능성 추출물 개발**	**과실주 제조**
Keyword		당화효소, 아밀라제	효모, 당화효소	항산화물, 기능성 추출물	과실주, 효소
검색건수		295	402	5,052	473
유효특허건수		71	67	52	62
핵심특허 및 관련성	특허명	훈연곡류를 이용한 기능성 주류의 제조방법	야이이아속 효모에서 세포표면 단백질을 이용한 목적단백질의 세포표면 발현방법	약용버섯과 식물약재를 함께 이용한 건강 복분자주 및 그 제조 방법	포도 복분자 와인 제조방법
	보유국	대한민국	대한민국	대한민국	대한민국
	등록년도	2005	2007	2006	2005
	관련성 (%)	50	60	40	80
	유사점	효모와 당화효소 이용	세포표면에 목적단백질의 발현	식물추출물의 이용	주원료로 국내산 과실 이용
	차이점	본 연구는 당화효소로 말토제닉	본 연구에서는 효모표면에 말토	본 연구에서는 식물의 항산화	펙틴분해 효소 대신 당화효소

		아밀라제를 사용하여 당화 말토오스가 주생산물이며 효모가 이를 서서히 이용하게 하고자함.	제닉 아밀라제를 발현시켜 당화 및 에탄올 발효를 연계시켜 주류를 제조함.	및 숙취해소 기능물 질 추출액을 이용하며 과실주의 색상을 보존하고 숙취해소 기능을 가진 주류를 제조 함.	이용

개발기술명		이소말토올리고당	기능성 추출물 개발
Keyword		이소말토올리고당, BOS	숙취
검색건수		90	209
유효특허건수		10	199
핵심특허 및 관련성	특허명	Method for producing new isomaltooligosaccharide	두릅나무 추출물을 함유한 숙취방지용 조성물
	보유국	일본	대한민국
	등록년도	2004	2000
	관련성(%)	30	60
	유사점	새로운 말토올리고당 생성	천연물에서 숙취방지용 물질개발
	차이점	본 연구에서는 말토제닉 아밀레이즈를 이용하여 전분으로부터 말토스를 생성하고 당화공정에서 이소말토올리고당 생산하는 점이 다름	개발소재가 다르며, 숙취방지 외에 항산화제 등 다른 기능 동시에 함유, 제품에 적용

2) 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	Aureka DB, pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		효소를 이용한 주류 제조	효모탐색 및 개량
Keyword		Saccharification Maltogenic Amylase	CGTase Display Yeast
검색건수		20	62
유효논문건수		17	6
핵심논문 및 관련성	논문명	Enzymatic analysis of an amylolytic enzyme from the hyperthermophilic archeon *Pyrococcus furiosus* reveals its novel catalytic properties as both an alpha-amylase and a cyclodextrin -hydrolyzing enzyme.	Improved Bread-Baking Process Using *Saccharomyces cerevisiae* Displayed with Engineered Cyclodextrin Glucanotransferase
	학술지명	Appl. Environ. Microbiol.	J. Agric. Food Chem.
	저 자	Yang, S.J., Lee, H.S., Park, C.S., Kim, Y.R., Moon, T.W., and **Park, K.H.**	Shim, J.H., Seo, N.S., Roh, S.A., Kim, J.W., Cha, H., Park, K.H. (본 연구팀 논문)
	게재년도	2004	2007
	관련성(%)	60	80
	유사점	전분을 가수분해하여 당화시킬 수 있는 말토제닉 아밀레이즈를 클로닝 하고 그 효소 특성을 분석	분자 진화적 방법을 통하여 가수분해반응 특성이 개선된 CGTase를 효모 표면에 발현시켜 이용함.
	차이점	초 고온성 미생물로부터 분리된 효소로서 그 특성이 본 연구에서 사용하고자 하는 말토제닉 아밀레이즈와 차이를 보임	제빵 시 이용하는 효모의 표면에 효소를 발현하였으나 본 연구에서는 말토제닉 아밀레이즈를 발현시켜 에탄올 발효에 이용함

개발기술명		과실주 제조	기능성 추출물 개발
Keyword		Modified Fruit Wine	Modified Grape Wine Antioxidant
검색건수		8,740	1,790
유효논문건수		566	1,200
핵심논문 및 관련성	논문명	The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates	Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strains on wine total antioxidant capacity evaluated by photochemiluminescence

	학술지명	Yeast	World Journal of Microbiology and Biotechnology
	저 자	Lilly, M., Bauer, M.M., Lambrechts, M.G.,Swiegers, J.H., Cozzolino, D., Pretorius, I.S.	Brandolini, V., Fiore, C., Maietti, A., Tedeschi, P., Romano, P.
	게재년도	2006	2007
	관련성(%)	70	60
	유사점	과실주의 향기성분 생성에 중요한 영향을 미치는 효모의 특정 유전자를 변형하여 향기성분의 변화를 관찰	효모 균주에 따라 과실주의 전체 항산화물질 및 phenol compounds의 총량과 성분이 달라짐을 연구하여 항산화성과 효모 균주와의 밀접한 상관관계를 밝힘
	차이점	효모 탄소원의 당화에 관련된 유전자가 아니며 에탄올 생성량 변화 등에 대한 연구가 수행되지 않았음	특정 기능성 물질의 첨가 등에 의한 것이 아니라 미생물의 종류에 따른 항산화력 변화에 초점을 맞춤

3) 제품 및 시장 분석

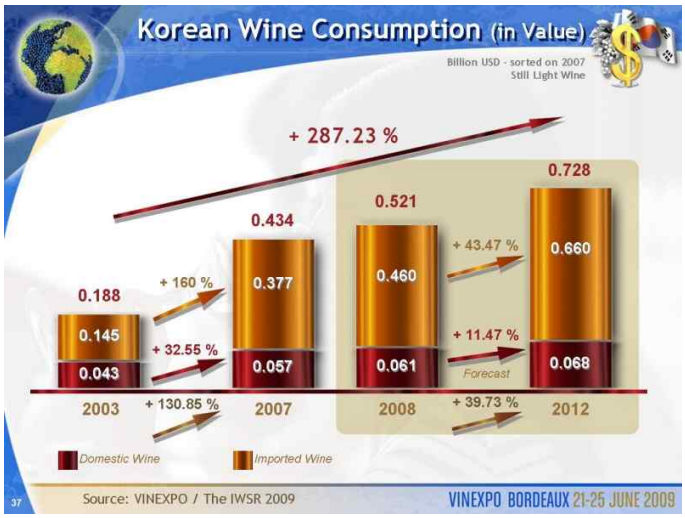
가. 생산 및 시장현황

(1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 폭발적인 성장세를 유지하는 포도주 소비 시장 :
  다른 과실주, 곡주 소비는 감소한 반면 포도주 소비는 88.4% 증가 (2002-2006)하였고 2006년부터 2011년까지 47.3% 더 성장할 것으로 예상됨. 그 중 레드 와인이 주종을 이룸 (83.2%, 2006년)

- 시장을 장악한 수입산 포도주 :
  우리나라 포도주 수입량은 2002년-2006년 사이 128.6% 성장하여 2011년에는 총 282,000 hL 즉 3760만 병으로 전체 포도주 소비량 중 81.5%의 비중을 차지할 것으로 예측됨.

- 포도주 소비량 증가속도보다 빠르게 성장하는 판매 매출액 :
  2006년 소매점 기준 판매 매출액 3억 1100만 달러로 2002년 대비 132.1% 증가, 2006년부터 2011년까지 매출은 46.6% 증가한 4억 5600만 달러가 될 것으로 예측됨.
  소비량 보다 매출액의 증가가 빠른 것은 5달러 이상의 고급 포도주의 소비가 늘어나고 있기 때문임.



- 국내산 포도주 생산과 소비의 열세:
  국내산 포도주의 경우, 주로 수입된 포도주를 블렌딩하여 생산하고 있으며, 2006년 일반 포도주 소비시장의 23.5%를 차지하였고, 이는 2002년보다 42.1% 증가한 것임. VINEXPO/IWSR 연구에 따르면 국산 포도주의 소비량은 2006년에서 2011년까지 18.5% 성장할 것으로 전망됨. (이상 VINEXPO/ The IWSR 2008년 연구자료)

- 국내산 포도생산 현황 :
  70% 이상을 차지하고 있는 캠벨은 당도가 13-14도 정도로 포도주 제조용으로는 부적당하며 (포도주용은 22-23도가 바람직), 포도주용 포도의 생산량은 극히 적음. 전체 포도 생산량은 40만톤으로 경북의 영동, 영천, 김천 등에서 전체의 약 30%가 생산되고 대부도 등 서해안에서 5% 정도 생산되고 있으며 이 중 약 5% 정도가 가공되고 있음 (포도연구사업단)

- 국내에서 제품화된 곡류와 과실 혼합 발효주 현황 :

주류명	제조회사	1단 담금	2단 담금	홍보
백세주	(주)국순당	쌀	오미자, 인삼 외 10가지	건강이미지
산사춘	(주)배상면주가	쌀	산사나무열매, 산수유	여성취향

(출처 : 중소기업기술혁신개발사업 보고서, 2004)

(2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 세계적인 주요 포도주 생산국 :
  프랑스 (2 billion gallons), 이태리, 스페인, 아르헨티나, 미국 (450 million gallons) 등. 세계적인 포도주 생산현황은 아래의 표와 같음 (주한 스페인 대사관 제공자료)

GLOBAL WINE PRODUCTION (000s hectoliters)					
	2004	2005	2006*	2007**	% of total world
France	57,386	52,004	52,276	45,400	17.0
Italy	53,000	50,556	53,462	45,900	17.2
Spain	*42,988*	*34,750*	*38,173*	*34,700*	*13.0*
Total EU- 25	**184,201**	**164,647**			
Total EU- 27			**178,362**	**161,772**	**66.9**
USA	20,110	22,888	19,621	20,000	7.5
Argentina		15,222	15,396	15,046	5.6
Chile	6,301	7,886	8,449	8,227	3.1
Australia	13,810	14,301	14,298	9,620	3.6
Total World	**300,000**	**282,800**	**286,600**	**266,700**	**100**

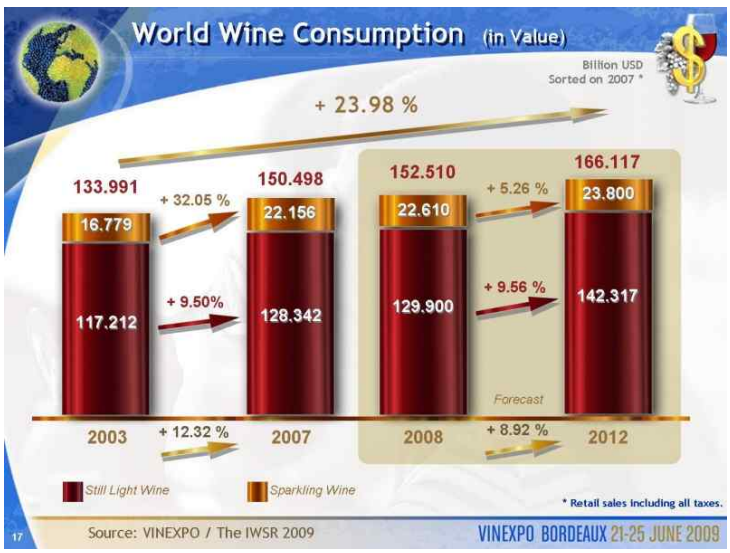
* Provisional
**Forecast

Source: OIV estimates based on different sources

- 전 세계적으로 포도주 소비는 증가 :
  2006년 2억 3012만 hL, 연간 307억 병 소비
  2006년-2011년 사이, 6.2% 성장하고, 향후 10년간 10.8% 증가할 것으로 예상됨.

- 세계 포도주 소비를 선도하는 국가 :
  미국은 2006년 포도주 시장 매출액이 200억 달러를 넘어 세계 1위를 차지하고 있음. 90년대 중반부터 꾸준히 증가하여 2011년에는 2,797만 hL, 37억 3천만 병에 달할 것임. 그 뒤를 이어 포도주 소비가 계속 감소 중인 프랑스와 이태리가 각각 2, 3위를 차지하고 있음.

  아시아에서는 2006년 800만 9천 hL, 10억 7만병이 소비되었는데, 이는 2002년 대비 21.1% 증가한 것임. 일본이 최대 수입국이며 중국과 러시아 시장도 폭발적으로 성장 중임 (2002년-2006년 사이 각각 36.5%, 40.9% 증가). 전체 아시아 지역도 동기간 9.2% 성장하여 전통적으로 과실주와 곡주의 소비가 많은 아시아에서 포도주의 소비가 증가하여 2006년에서 2011년 사이 48% 성장하고 2011년 전 세계 포도주 소비시장의 4.8%를 점유할 것으로 예상됨. 따라서 이러한 과도기에 전분을 첨가한 포도주가 아시아 지역에서 많이 소비될 수 있을 것으로 기대됨. (이상 VINEXPO/IWSR, 2008년 자료)



(3) 세계시장의 성격

☑ 안정성이 큼 ☑ 영속성이 있음 ☑ 성장성이 있음

2. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 효소를 전분/식물추출물 등에 가하여 당화속도 및 말토오스 농도를 조절하여 과실주의 품질과 알코올 농도를 조절하는 새로운 발효공정 기술 개발

2) 산업화를 통한 기대효과

- 과실주(포도주)의 수입 대체 : 1,000억원 (수입액 5,000억원의 20%; 2008년 기준)
- 고품질 과실주 제품의 수출 : 100억원
- 국산 농산물 활용 증대 : 100억원 (쌀, 포도, 버섯, 기타 식물)

(단위 : 백만원)

산업화 기준 / 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	계
직접 경제효과	50,000	100,000	110,000	260,000
경제적 파급효과	30,000	150,000	180,000	360,000
부가가치 창출액	100,000	200,000	300,000	600,000
합 계	180,000	450,000	590,000	1260,000

※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

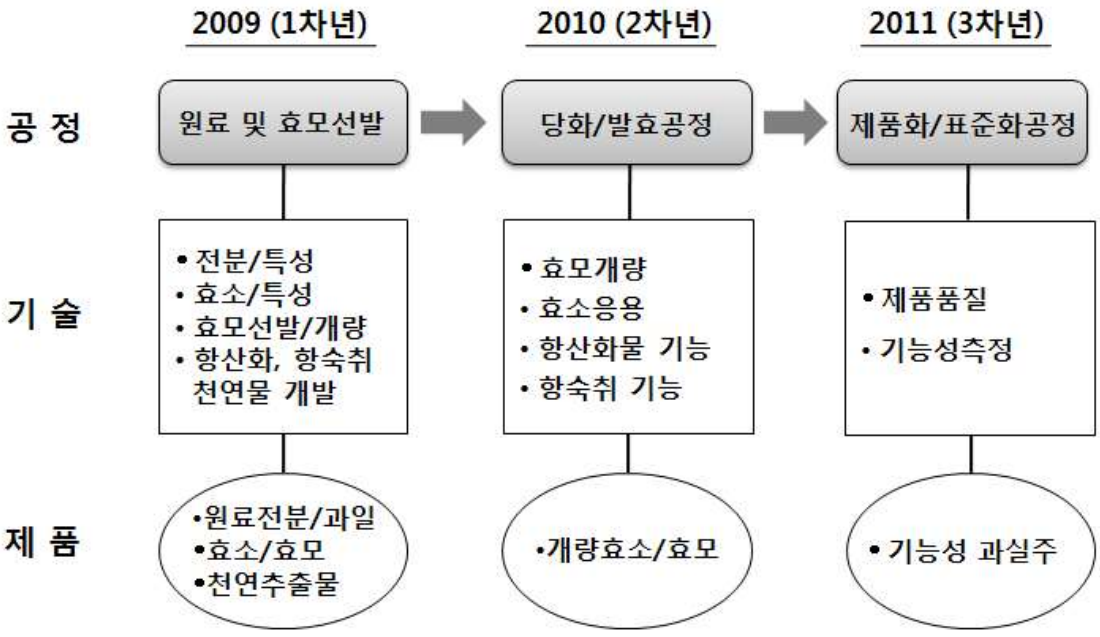
3) 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
효소를 이용한 주류제조	일본	80	80	100	본연구팀 효소 보유
효모탐색 및 개량	일본	60	80	100	관련특허 기술 없음
기능성 추출물 개발	일본	50	70	100	본연구팀 논문발표
과실주 제조	프랑스	60	60	100	
이소말토올리고당	일본	80	90	100	본연구팀 특허출원

※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
4) 부가설명이 필요한 경우 비고란에 작성

나. 분석결과 향후 연구방향



(1) 특허분석 측면

○ 기존 특허: 각 단계의 기술적인 문제를 다룬 특허는 출원되어 있으나 당화 및 발효 전공정에 대한 기술은 부족함. 따라서 본 연구과제에서는 당화 효소의 개발, 효모의 개발 방향으로 연구를 추진하며 '효소를 이용한 당화 및 발효속도의 조절과 에탄올 생성량에 관한 특허' 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임.

○ 과실주(포도주)의 항산화물을 이용한 색상 보존 등에 관한 특허는 전 세계적으로 다수 등록되어 있으나 항산화제 및 생리기능성이 동시에 포함된 특허는 보고된 적이 없음. 따라서 생리적인 기능성 (숙취해소)이 확인된 천연물의 첨가로 신규 기능성 과실주를 개발하고자 함.

(2) 논문분석 측면

○ 기존 논문은 각 단계별 기술에 해당되는 것으로 본 연구과제에서 목표로 하는 종합적인 주류제조에 관한 논문이 적고 특히 본 연구팀이 발표한 논문이 관련성이 높다고 사료됨. 따라서 본 연구 과제에서는 효소, 효모의 기초 및 응용연구를 통해 새로운 개념의 과실주 제조 방향으로 연구를 추진하여 효소의 특성 및 응용, 개량효모의 제조 및 응용, 기능성 생리활성물질 (항산화물, 숙취저감 물질)의 특성 및 효과 등에 관련된 논문들을 SCI급 국제학술지 등에 게재할 계획임

(3) 제품 및 시장분석 측면

○ 국내 및 국외시장 분석결과 전통적인 포도주 제품의 생산 및 판매가 전 세계적으로 이루어지고 있음. 현재 우리나라는 부적합한 원료 문제, 포도주 제조 경험 및 기술력의 부족 등으로 세계적인 과실주 (포도주)와의 경쟁력은 매우 부족한 편임. 따라서 본 연구과제에서는 새로운 발효공정 및 기능성이 보강된 새로운 개념의 우리나라 고유의 과실주를 개발하고 상품화하여 국내시장의 시판 뿐 만 아니라 세계시장에 수출하는 것이 세계시장을 개척하는 길이 될 것임

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 제1세부과제 : 과실주 발효용 미생물의 선발 및 개량

1) 1차년도

1차년도의 연구개발 목표는 발효용 미생물의 선발이며 포도 및 전분, 칡 등의 원재료 및 효소처리를 통한 과실주 발효에 적합한 효모균주를 다양한 포도 및 과실 등에서 분리하여 그 특성을 분석하였다.

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적・실험적 접근방법)	구체적인 내용
효모균주의 분리	야생시료에서의 효모균주 분리를 위하여 채취한 시료를 9 ml의 YPD 액체배지에 넣어 vortex한 다음 1.5 ml를 취하여 미세원심분리관에 넣어 12,000 rpm으로 원심분리하고, 침전물을 lysozyme으로 처리하여 세균을 제거하였다. 오염된 곰팡이 등 균류생장을 억제하기 위하여 10% dextrose를 첨가하고 세균생장을 억제하기 위하여 chloramphenicol (50 ㎍/㎖)를 가한 YPD 고체배지에 도말하여 30℃에서 2일간 배양하여 효모균주들을 분리하였음.	• YPD 고체배지에 형성된 균집락을 육안으로 관찰하여 효모로 보이는 균주들을 새로운 고체배지에 streaking하고 현미경으로 관찰하여 순수분리 여부와 효모균주 여부를 결정하였다. • 형태학적으로 효모로 확인된 균주들은 YPD 액체배지에 배양하여 -70℃에 저장하였다. 이렇게 분리된 균주는 총 637개 균주에 이른다.
분리효모균주의 특성분석	과실주 발효에 적합한 균주를 선발하기 위하여 분리된 균주들을 대상으로 다음과 같은 특성들을 분석하였음. -α-amylase 생산능 : 포도주에 부드러운 맛을 더하기 위하여 전분을 첨가하여 발효할 때 전분을 분해할 수 있은 효모균주를 분리하고자 함. -내당성 : 발효 시 당첨가로 인한 삼투압을 견디면서 활발히 생장할 수 있는 효모균주를 분리하고자 함. -내알코올성 : 발효 시 증가되는 알코올에도 사멸되지 않는 균주를 분리하고자 함. -말토오스 이용능 :전분을 분해하여	• α-amylase 생산능은 2% 전분을 포함하는 YP 고체배지에 48시간 배양한 다음 요오드 용액을 가했을 때 투명환의 형성여부로 판정하였음. • 내당성은 20%-50%의 포도당을 포함하는 배지에 24시간 배양하여 생장도를 육안으로 비교하여 1차 선발한 후 액체배양을 통해 생장도를 흡광도로 측정하였음. • 내알코올성은 0-25%의 다양한 농도의 알코올을 포함하는 YPD 배지에 48시간 배양하여 생장정도를 흡광도로 측정하여 판정하였음. • 말토오스 이용능은 탄소원으로 dextrose 대신 말토오스

	말토오스를 과량으로 생성시킨 뒤 이를 분해하여 알코올 발효를 일으키게 하기 위해서 말토오스 이용능이 우수한 균주를 분리하엿음.	(2%)를 포함하는 YP 고체배지(YPM)에 48시간 배양하여 생장도를 육안으로 비교하여 1차 선발한 후, 액체배양을 통해 생장도를 흡광도로 측정하였음.
우수효모균주 선발	위의 특성분석 결과를 토대로 각 특성에 대하여 우수한 균주들과 종합적인 특성이 우수한 균주들을 선발하였음.	모든 분리균주들의 특성들은 상용화되고 있는 효모균주를 대조군으로 하여 그 특성을 비교, 선발하였음.
우수효모균주 동정 및 최종선발	우수균주로 선발된 분리균주들의 유전적 정보를 이용하여 포도주 발효에 사용할 수 있는 *Saccharomyces cerevisiae* 균주들을 선별함.	우수효모균주로 선발된 분리균주들은 일부 동정이 완료되었고, 현재 나머지 균주들을 동정하였음.

(1) 시료의 채취

2009년 5월-9월 중 표1-1에서와 같이 국내외산 포도 혹은 다양한 과일 등 총 31종의 시료를 채취하여 효모 균주를 분리하였다.

<표1-1> 채취된 시료 목록

채취 날짜	장 소	원 산 지	품 종
09.05.08	인천대	국내	등나무
09.05.08	시장	국내	산딸기
09.05.08	마트	뉴질랜드	키위
09.05.08	마트	칠레	적포도
09.05.08	마트	칠레	톰슨시드리스
09.05.08	이마트	국내	산딸기
09.05.08	이마트	칠레	포도
09.05.08	이마트	뉴질랜드	키위
09.05.08	이마트	칠레	청포도
09.05.16	마트	국내	사과
09.05.16	시장	국내	사과
09.05.16	시장	국내	참외
09.05.23	마트	국내	청포도
09.05.23	시장	국내	델라웨어
09.05.23	시장	국내	참외
09.05.23	시장	국내	사과
09.05.26	마트	국내(하우스)	청포도
09.05.26	이마트	국내	백자메론
09.05.26	이마트	국내	켐벨얼리
09.05.26	이마트	국내	청포도
09.05.26	이마트	국내	살구

09.07.01	마트	국내(하우스)	청포도
09.07.01	마트	국내(하우스)	거봉
09.07.06	마트	국내(하우스)	캠벨얼리
09.07.06	마트	국내(전북완주)	캠벨얼리
09.07.21		베트남	칡가루
09.07.22	마트	국내(상주)	캠벨얼리
09.07.28	대부도(대남로)	대부도(하우스)	캠벨얼리
09.07.28	대부도(현지농원)	대부도(하우스)	캠벨얼리
09.07.28	대부도(북동)	대부도(하우스)	캠벨얼리
09.09.14	대부도	대부도(노지)	캠벨얼리

(2) 효모균주의 분리

시료는 9 ml의 YPD 액체배지 (yeast extract 1%, peptone 2%, dextrose 2%, pH 4.5)에 넣어 vortex한 다음 1.5 ml를 취하여 미세원심분리관에 넣어 12,000 rpm으로 원심분리하고, 침전물을 lysozyme (10 ㎍/㎖)에 녹여 5-10 분간 상온에서 방치하여 세균을 제거하였다. 시료액 (20 ㎕)를 곰팡이 등 균류의 생장을 억제하기 위하여 10% dextrose를 첨가하고 세균의 생장을 억제하기 위하여 chloramphenicol (50㎍/㎖)를 가한 YPD 고체배지에 도말하여 30℃에서 2일간 배양하였다. YPD 고체배지에 형성된 균집락을 육안으로 관찰하여 효모로 보이는 균주들을 새로운 고체배지에 streaking하고 (그림1-1) 현미경으로 관찰하여 순수분리 여부와 효모균주 여부를 결정하였다. 형태학적으로 효모로 확인된 균주들은 YPD 액체배지에 배양하여 -70℃에 저장하였다. 이렇게 분리된 균주는 총 637균주에 이른다.

그림1-1. 곰팡이와 효모가 섞여있는 배지(좌)와 분리 배양한 효모균주(우)

(3) 효모균주의 특성분석

과실주 발효에 적합한 균주를 선발하기 위하여 분리된 균주들을 대상으로 amylase 생산능, 내당성, 내알코올성, 말토오스 이용능 등에 대하여 특성분석을 하였다.

- α-Amylase 생성능

효모를 이용하여 포도를 발효시킬 때 전분을 첨가하면 부드러운 맛의 기능성 포도주를 제조

할 수 있는데, 이때 전분을 쉽게 분해 할 수 있는 발효 균주가 필요하다. 이러한 이유로 야생에서 분리한 효모가 전분분해효소인 amylase를 갖고 있는지 실험하였다. 전분은 요오드에 의해서 염색이 되나 전분이 분해되어 작은 단위로 전환되면 더 이상 요오드로 염색되지 않는 원리를 이용하여 분리균주들의 전분분해능을 시험하였다 (그림1-2). 전분이 포함된 YPS 배지에 효모를 배양한 후 요오드용액을 뿌려 균집락 주위에 투명한 환이 생기는지 관찰하였다. 637개의 분리균주 가운데 amylase를 생성하는 균주의 분포도는 매우 낮아서 5개의 균주에서 활성이 감지되었다. 이들의 amylase활성은 배양 2일 후부터 감지되기 시작하여 5일까지 증가하는 것으로 나타났다.

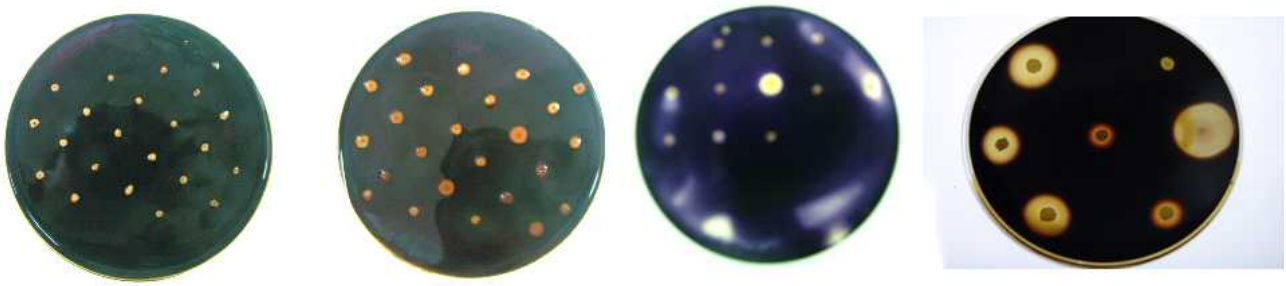
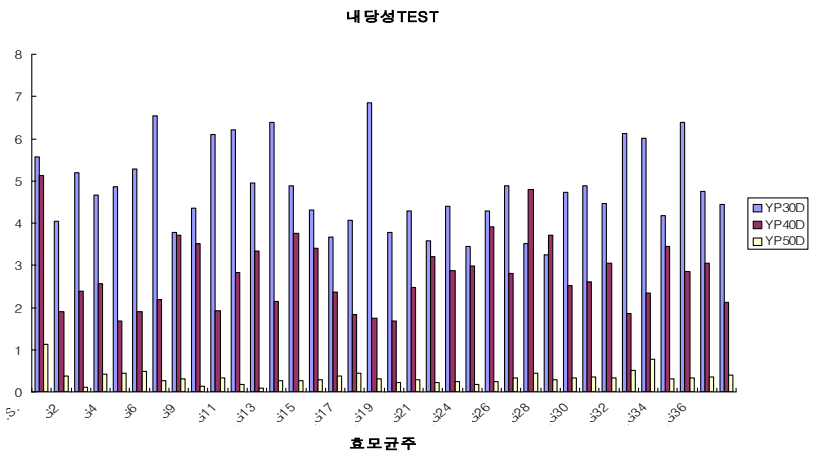


그림 1-2. 분리된 효모균주의 전분분해능

- 내당성

637개 분리균주 가운데 50%의 포도당을 포함하는 고체배지에서도 잘 생장하는 70개 효모균주들을 선발한 다음, 30, 40, 50%의 포도당을 포함하는 액체배지에 접종하여 30℃ 진탕배양기에서 24 시간 배양한 다음 (220rpm) 600 nm에서 흡광도를 측정하여 생장도를 정량적으로 비교하였다. 이들의 생장도를 상용화된 *S. cerevisiae* 효모균주의 생장도와 비교하였을 때 40% 이상의 포도당을 포함하는 배지에서는 상용화된 효모균주 (commercial strain; c.s.)가 가장 잘 생장하였으나, 포도주 발효 시 사용되는 당농도와 비슷한 조건인 30%의 포도당을 포함하는 배지에서는 RG6, 10, 11, 12, 18, 32, 33, 35, 42, 45, 46, 55, 56, 59, 61, 69, 71, 73 등 18개 균주가 상용균주보다 더 잘 생장하였다. 이들은 모두 Campbell Early 포도에서 분리되었다 (그림1-3).



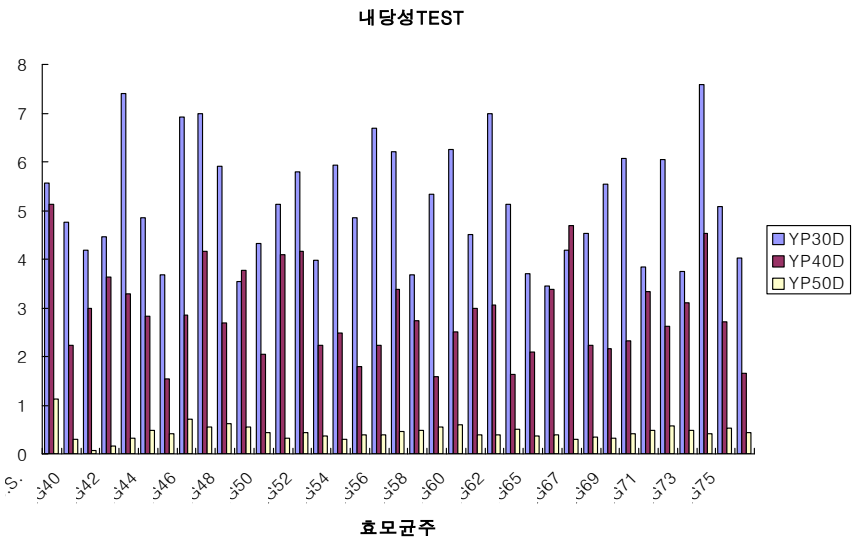
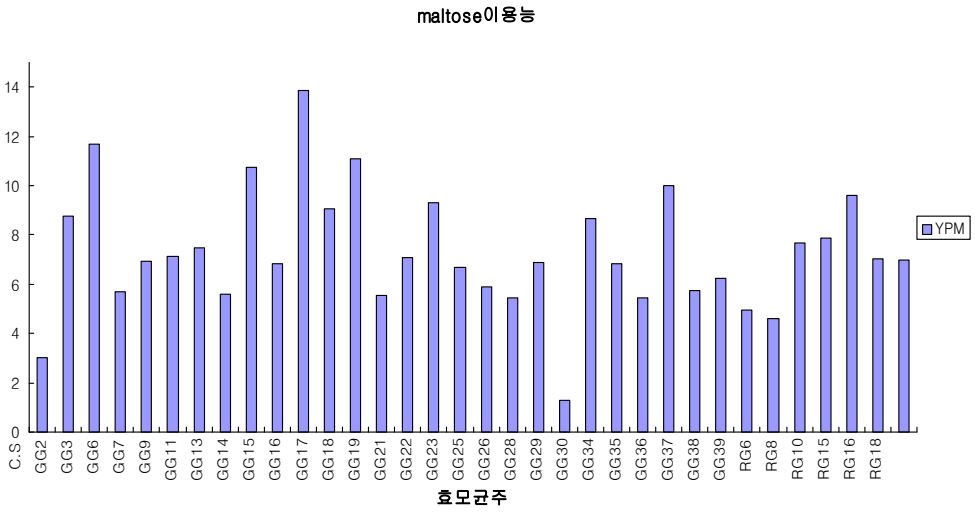


그림 1-3. 분리된 효모균주들의 내당성

- 말토오스 이용능

효모가 단당류인 포도당을 빠르게 사용하여 발효한 결과 급격히 생성되는 에탄올 때문에 사멸되는 것을 최소화하기 위하여 이탄당인 말토오수를 당원으로 사용하여 생장속도 및 에탄올 생성속도를 늦춰 오랫동안 생장하며 발효를 지속할 수 있는 효모를 탐색하고자 하였다. 이를 위하여 10%의 포도당 혹은 말토오스를 포함하는 고체배지에 배양하여 말토오스 배지에서 우수한 생장력을 보이는 123개 균주들을 1차로 선발한 다음, 2% 말토오스를 포함하는 액체배지에 접종하여 30℃ 진탕배양기에서 24 시간 배양한 다음 (220rpm) 600 nm에서 흡광도를 측정하여 생장도를 정량적으로 비교하였다. 상용화된 *S. cerevisiae*는 말토오스가 탄소원일 때 생장도가 매우 낮은데 비해 상당수의 분리균주들이 월등히 높은 생장도를 보였다. 2차로 65개 균주를 선발하여 재분석한 결과 GG2, 3, 7, 9, 11, 14, 16, 17, 18, 21, 22, 28, 30, 36, RG8, 10, 15, 16, 18, 27, 31, 34, 36, 37, 46, 55, 62, 67, 74 등 29개 균주들을 최종 선발하였는데 이들은 대부분 청포도나 적포도에서 분리된 균들이었다 (그림1-4).



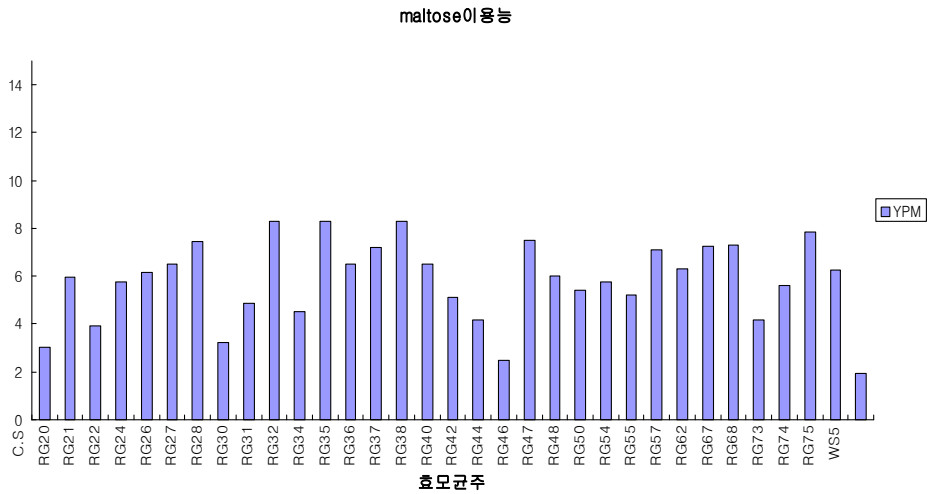


그림 1-4. 분리된 효모균주들의 말토오스 이용능

- 내알코올성

높은 도수의 술을 좋아하는 한국인의 기호에 맞는 포도주를 생산할 때 발효가 진행됨에 따라 증가하는 고농도의 알코올에 대해서 내성을 갖는 효모균주를 선발하고자 하였다. 15% 혹은 30% 알코올을 포함하는 고체배지에 접종하여 30℃에서 48시간 배양한 다음 형성되는 집락의 크기를 관찰하였다. 30% 알코올을 포함하는 배지에서는 효모균주들이 생장하지 못하였으며 15%에서 상용 *S. cerevisiae*와 비교될 만한 크기의 집락을 형성하는 균주 24개를 선발하였다.

이들을 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15%의 알코올을 포함하는 액체배지에 접종하여 30℃ 진탕배양기에서 24 시간 배양한 다음 (220rpm) 600 nm에서 흡광도를 측정하여 생장도를 정량적으로 비교하였다. 그 결과 상용균주가 내알코올성이 가장 큰 것으로 나타났으며, 분리균주들은 6%이상의 알코올을 포함하는 배지에서 잘 생장하지 못하는 것으로 나타났다. 이들 중 5-6% 알코올 배지에서 비교적 생장도가 높았고, 7%에서 다른 분리균주보다 내성이 높았던 RG1, 5, 11, 19, 21, 24, 29, 30, 32, 34, 35, 40, 45 균주들을 선발하였다 (그림1-5). 이들은 모두 적포도에서 분리된 균주들이었다.

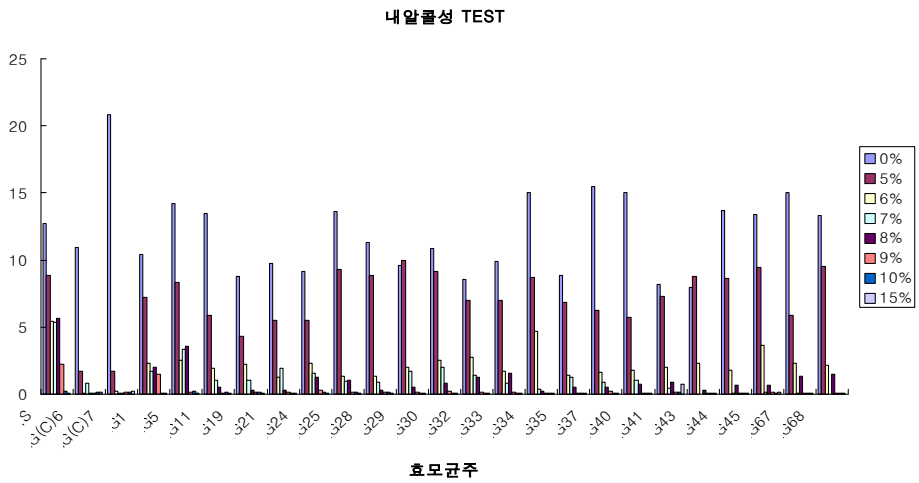


그림1-5. 분리된 효모균주들의 내알콜성

(4) 효모균주의 동정

내당성, 내알코올성, 말토오스 이용능 등 특성이 우수한 균주들을 선발하여 이들을 분자생물학적으로 동정하기 위하여 26S rDNA를 증폭할 수 있는 NL1(5′-GCATATCAATAAGCG GAGGAAAAG-3′)와 NL4(5′-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3′)의 두 primer를 합성하였다. Genomic DNA purification kit (Promega Co., USA)를 이용하여 염색체 DNA를 추출하여 위의 두 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하고 (94℃ 3분 예비변성; 94℃ 1분 변성, 58℃ 1분 annealing, 72℃ 1.5분 extention 36 cycles; 72℃ 5분 최종 extention; 그림1-6), PCR 산물을 NL1 primer를 이용하여 염기서열을 결정한 다음 National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA)의 database에 BLAST하여 26S rDNA 단편의 상동성을 비교함으로써 동정하였다. 중간보고 이전에 선발된 균주들 중 일부를 동정한 결과는 아래와 같았다.

증폭한 rRNA 부위의 560 bp DNA 단편의 염기서열을 비교한 결과 내당성이 높은 것으로 선발되었던 22개의 효모 균주는 표1-2에서 보인 바와 같이 총 5종 4속에 속하는 균주들임을 알 수 있었으며 (그림1-7), NK28은 상용화 되어있는 효모인 *S. cerevisiae*와 같은 종으로 나타났다. 선발된 균주들에 대한 동정실험이 현재 수행되고 있으며 이들 중 포도주 발효에 사용될 수 있는 *S. cerevisiae* 균주를 최종 선발하여 발효특성 분석과 균주개량 등 2차년도 연구수행에 사용하였다.

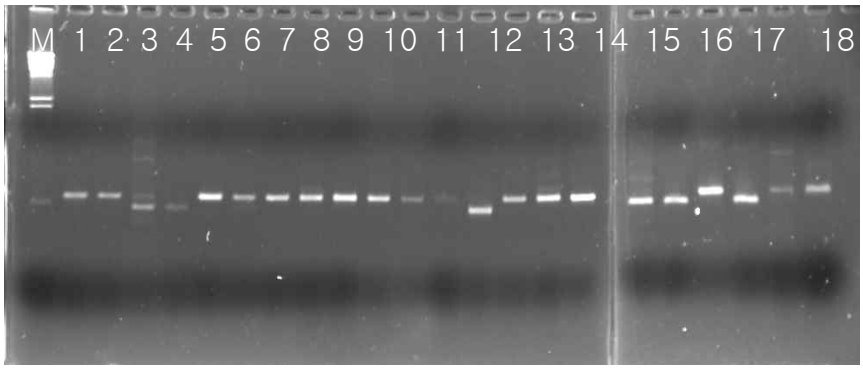


그림1-6. 분리 효모균주의 26S rRNA 부위 PCR 증폭

1. Positive 2. SG6 3. SG18 4. SG38 5. SG39 6. KG6 7. KG11
8. KG16 9. KG17 10. KG20 11. KG38 12. KG41 13. KG44 14. KG45
15. KG46 16. KG47 17. KG56 18. WS20 19. WS22 20. WS76 21. NK28
22. BG4

<표1-2> 선발균주 유전자 동정 결과

분 리 효 모	동 정 결 과	유 사 도
Positive	*Saccharomyces cerevisiae*	563/564 (99%)
KG6	*Pichia anomala*	565/566 (99%)

KG11,20	*Wickerhamomyces anomalus*	565/568 (99%)
KG16	*Wickerhamomyces anomalus*	567/568 (99%)
KG17	*Pichiaanomala*	562/566 (99%)
KG38,44	*Pichia anomala*	561/563 (99%)
KG41	*Wickerhamomyces anomalus*	561/563 (99%)
KG45	*Kodamaea ohmeri*	561/563 (99%)
KG46,47,56	*Pichia anomala*	561/563 (99%)
NK28	*Saccharomyces cerevisiae*	565/565 (100%)
SG18	*Pichia anomala*	562/565 (99%)
SG38	*Kodamaea ohmeri*	441/477 (92%)
SG39	*Kodamaea ohmeri*	486/488 (99%)
WS20	*Metschnikowia sp.*	487/496 (98%)
WS22	*Metschnikowia fructicola*	475/483 (98%)
WS76	*Metschnikowia fructicola*	471/483 (97%)

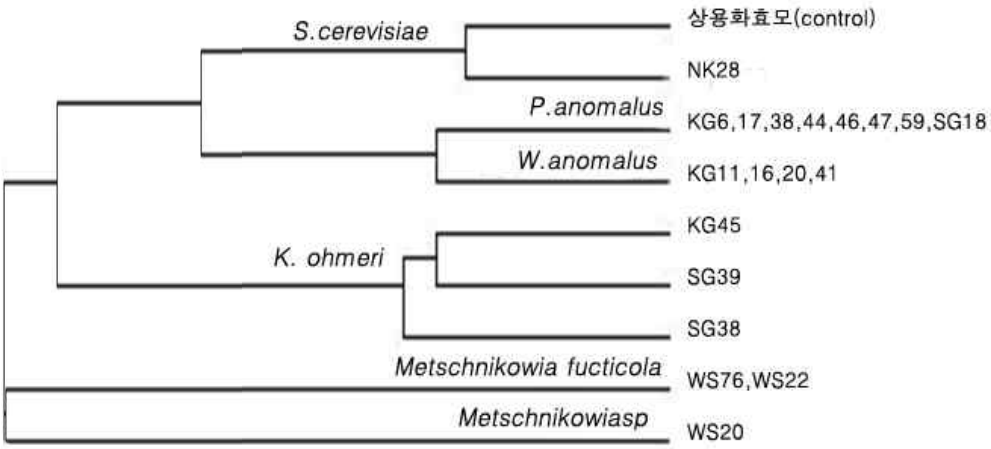


그림1-7. 선발된 균주와 상용화 균주들 간의 유연관계

2) 2차년도

2차년도의 연구개발 목표는 1차년도에서 분리된 발효용 미생물의 특성분석과 개량이며, 이를 위하여 최종 선발된 *S. cerevisiae* NK28의 내당성, 내알코올성, 말토오스 이용능, 알코올 생성능, 당 이용능 등과포도주 발효에서 나타나는 특성 등을 기존의 상용 효모인 *S. cerevisiae* Lv001과 *S. cerevisiae* La Parisienne의 특성과 비교분석하였고, NK28의 포도주 발효 특성을 개량하고자 탈분지효소를 유전자 재조합을 통해 효모세포 표면에 display 시키는 방법과 amylase를 생산하는 효모균주와의 세포융합을 시도하였음.

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적 · 실험적 접근방법)	구체적인 내용
최종선발된 분리효균주 (NK28)의 특성 분석	1차년도에서 분리되어 최종선발된 *S.cerevisiae* NK28균주의 발효관련 특성들을 다음과 같이 분석하였음. -내당성 : 발효 시 당첨가로 인한 삼투압을 견디면서 활발히 생장할 수 있는 능력을 상용화된 포도주 발효용 효모균주들과 비교하였음. -내알코올성 : 발효 시 증가되는 알코올 농도에도 사멸되지 않고 생장할 수 있는 능력을 상용화된 포도주 발효용 효모균주들과 비교하였음. -말토오스 이용능 : 포도주 발효 시 포도당의 첨가로 인한 급격한 알코올 발효로 인한 충격을 완충시키고자 말토오스를 사용하고자 하는 본 연구개발의 목적에 부합되도록 말토오스 이용능을 상용화된 포도주 발효용 효모균주들과 비교하였음. - 알코올 생성능 : NK28의 알코올 생성능을 상용화된 포도주 발효용 효모균주들과 비교하였음. - 당 이용능 : NK28의 19종의 다양한 당 이용능을 상용화된 포도주 발효용 효모균주들과 비교하였음.	- 30% 혹은 40%의 dextrose가 첨가된 YP broth (Yeast extract 1%, Peptone 2%)에 효모균주들을 접종하여 30℃에서 24시간 배양하여 OD_{600}을 측정하여 비교하였음. - 에탄올이 6, 7, 8, 9, 10% 첨가된 YP 액체배지에 효모균주들을 접종하여 30℃에서 48시간 배양하여 OD_{600}을 측정하여 비교하였음. - 2% 말토오스가 첨가된 YP 액체배지에 효모균주들을 접종하여 30℃에서 24시간 배양하여 OD_{600}을 측정하여 비교하였음. - 10% Dextrose가 포함된 YP배지에 각 균주를 접종한 후 30℃에서 72시간 혹은 96시간 정치배양한 다음 배양액을 HPLC로 분석하여 생성된 알코올을 정량분석하였음. - 19종의 당 이용능을 토대로 효모균주들을 동정할 수 있는 API 20C AUX kit를 사용하여 당 이용능을 판정하고 비교하였음.
분리효모주를 이용한 포도주 발효	- NK28의 포도즙 발효능 비교분석 - NK28의 쌀포도주 발효능 비교분석	- NK28과 Parisienne균주를 포도즙에 각가가 접종하여 3일간 발효시키고 알코올 생성을 HPLC로 분석하였음. - NK28과 Parisienne균주를 쌀전분용액에 Sumizyme, glucose iso- merase와 같이 접종하여 3일간 발효시킨 뒤 2차로 포도즙을 첨가하여 4일간 더 발효시키고 알코올 생성을 HPLC로 분석
효소가 Display된 분리효모균주 개량	- 전분을 첨가하여 포도주를 제조하는 본과제의 공정 특성에 따라 전분분해를 촉진할 수 있는 탈분지효소를 NK28 세포표면에 display 시켜 전분분해와 알코올 발효가 동시에 일어나도록 유도하고자 하였음.	- *B. subtilis*의 *amyX* 유전자를 PCR로 증폭하여 p6xHis119에 클로닝하고 탈분지효소를 정제하여 특성을 확인함. - PCR로 증폭된 *amyX* 유전자 단편을 *KpnI*과 *XhoI*으로 절단하여 pYD1에 클로닝하고 다시 pδ

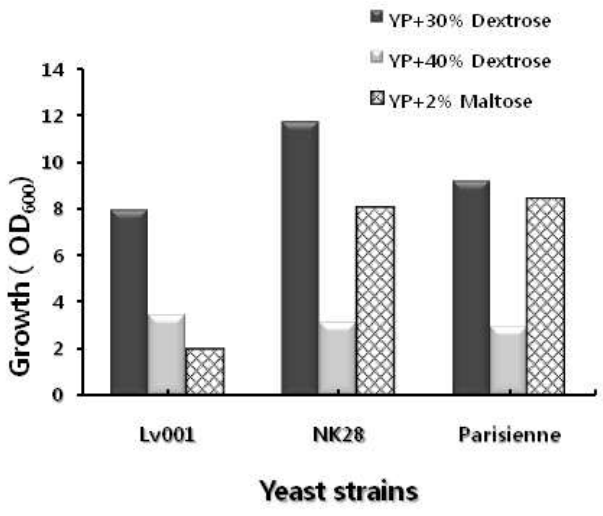
	- 이를 위하여 고초균 (*B. subtilis*)의 탈분지효소 유전자 (*amyX*)를 분리하여 효모의 염색체에 삽입될 수 있는 벡터에 결합시켜 NK28균주에 형질전환시키고자 하였음	neo vector에 옮겨 클로닝함. - 최종 제조된 pδAMYX를 선형화한 다음 NK28에 형질전환시켜 탈분지효소의 효모 내 발현을 확인함.
세포융합을 통한 분리효모균주 개량	- 자연시료에서 분리된 야생효모의 경우 형질전환 등 유전자 조작이 가능하지 않을 수도 있기 때문에 amylase를 생산하는 효모균주와의 세포융합을 통해 NK28을 개량하고자 하였음.	- NK28과 amylase 생산능이 우수한 *S. diastaticus* KCTC7955 균주들의 반수체 형성을 유도하여 배양한 다음 lyticase 처리로 원형질체를 형성시킨 다음 Poly-ethylene glycol 용액에서 융합을 유도함. - 융합체들을 회수하여 배양한 다음 amylase 생산능을 확인하고, 당이용능의 차이점을 이용하여 융합체 여부를 확인함.

(1) *S. cerevisiae* NK28 분리주의 특성분석

- NK28의 내당성 분석 :

YP (Yeast extract 1%, Peptone 2%) 액체배지에 각 30% 혹은 40% dextrose를 첨가하여 효모균주들을 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 다음 가라앉은 균주를 vortex해 균일하게 풀어준 뒤에 600nm에서 흡광도를 측정하여 생장도를 비교함으로써 내당성 및 삼투압 충격에 대한 저항성을 분석하였음.

그 결과 그림 1-8에서 보는 바와 같이 NK28 분리주는 상용되고 있는 효모균주들에 비하여 30%의 dextrose가 첨가된 환경에서 월등히 잘 생장하는 것으로 나타났고, 40%에서는 다른 균주들과 비슷한 생장도를 보였다. 50% dextrose를 포함하는 배지에서는 어느 균주도 생장을 보이지 않았음.



<그림 1-8> 최종선발균주의 내당성

- NK28의 말토오스 이용능 :

YPM broth (Yeast extract 1%, Peptone 2%, Maltose 2%)를 5 ml씩 시험관에 넣어 각 균주 (*S. cerevisiae* NK28, Lv001, Parisienne)를 접종한 다음, 30℃에 24시간 배양하여, 가라앉은 균주를 vortex해 균일하게 풀어준 뒤 600nm에서 흡광도를 측정하여 생장도를 비교하였음.

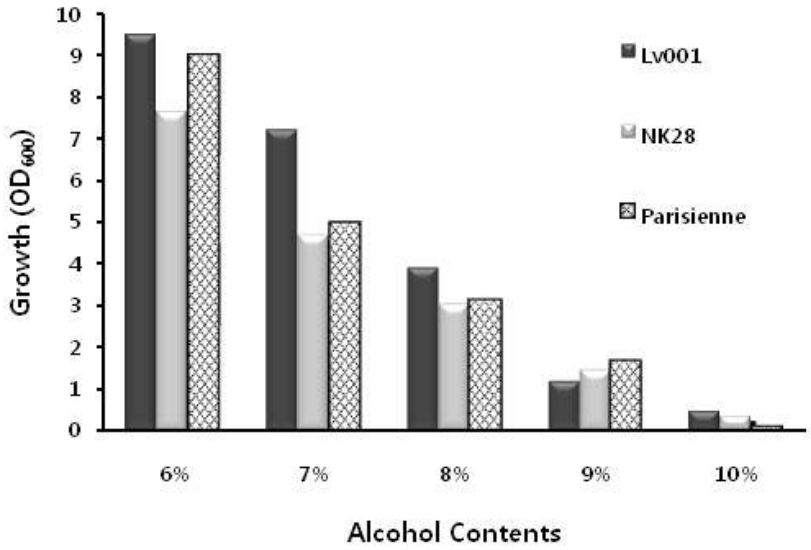
그림1-8에서 보는 바와 같이 NK28과 La Parisienne 균주가 *S. cerevisiae* Lv001에 비해 말토오스 이용능이 월등히 높은 것으로 나타났다. 그러나 효모에서 말토오스 이용에 관련된 유전자들은 포도당에 의해서 그 발현이 억제되는 것으로 알려져 있음 (catabolite repression). 따라서, 포도당 함량이 높은 포도즙에서 전분 분해에 따른 말토오스의 함량이 증가한다고 하더라도 포도당의 함량이 낮아지기 전에는 발토오스가 사용되지 않을 것으로 사료되어 이러한 특성이 실제 포도주 발효 중에 유용하지 않을 것으로 사료됨.

- NK28의 내알코올능 :

YPD broth (Yeast extract 1%, Peptone 2%, Dextrose 2%)에 에탄올을 6~10% 범위 내에서 1%씩 증가하도록 첨가하여 시험관에 넣고, 각 균주 (*S. cerevisiae* NK28, Lv001, Parisienne)를 접종하여 30℃에서 48시간 배양한 다음, 가라앉은 균주를 vortex해 균일하게 풀어준 뒤에

600nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였음 (그림 1-9).

알코올에 대한 저항성은 6, 7%의 알코올배지에서는 Lv001이 가장 높았으나 8% 이상에서는 세 균주가 서로 비슷한 정도를 보였고 9%에서는 Parisienne와 NK28이 다소 높은 것으로 나타났음.



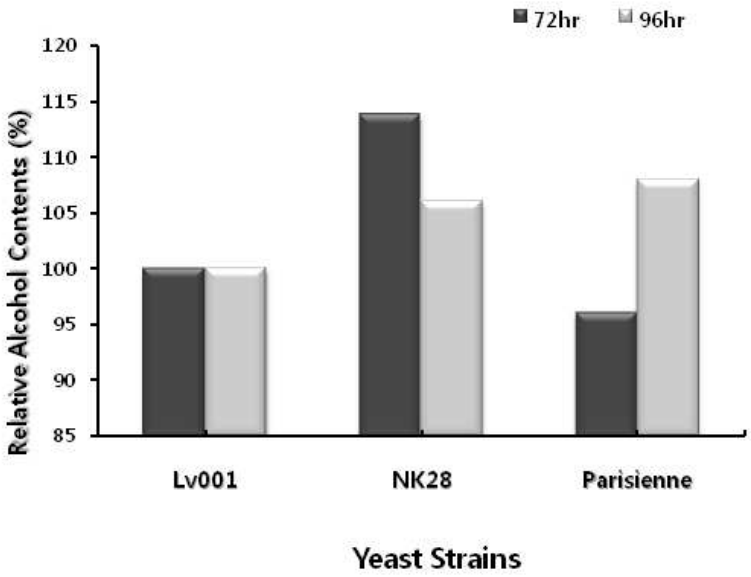
<그림 1-9> NK28의 알코올 저항성.

- NK28의 알코올 생산능 :

10% dextrose가 포함된 YP 액체배지에 각 균주를 접종한 후 30℃ 항온조에서 72 시간과

96 시간 정치배양 한 다음, 각 배양액을 원심분리 (10,000 rpm, 2 min)하여 상층액을 취해 0.2㎛ syringe filter로 여과하였음. HPLC (Waters 600S, Meadows Instrumentation Inc., 미국)로 10% 에탄올을 이용하여 blank를 잡고 각 시료들을 분석하였음. 이 때 컬럼은 Rezex ROA-Organic Acid H+(8%) (Phenomenex, USA)를 사용하였음.

HPLC 정량분석 결과 72시간의 발효 중 NK28이 알코올을 가장 많이 생성하였고, 96시간 후 에는 NK28과 Parisienne가 비슷한 양의 알코올을 생성하는 것으로 나타났음. 따라서 NK28이 알코올 생성 속도가 빠른 것을 알 수 있었음 (그림 1-10).



<그림 1-10> NK28의 알코올 생성능

- NK28의 다양한 당 이용능 :

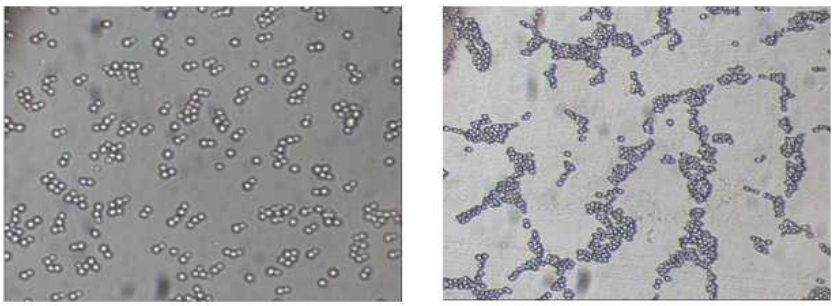
NK28 및 상용 효모들의 다양한 당 이용능을 API 20C AUX kit (**Biomerieux, France)를** 이용하여 비교분석하였음. 효모균주들을 YPD 평판배지 (Yeast extract 1%, Peptone 2%, Dextrose 2%, Agar 1.5%)에 streaking하여 30℃에서 48시간 배양한 다음, 0.85% NaCl 용액에 콜로니들을 풀어 600 nm에서 흡광도를 측정하였을 때 2 McFarland의 혼탁도가 되도록 준비하였음. API kit의 medium에 균용액 100㎕를 넣고 잘 섞어준 다음, 혼합액을 kit의 couple에 꽉 차도록 넣어주고 30℃에서 72시간 이상 배양하여 얻은 실험결과를 Biomerieux사에서 제공하는 database (V4.0)과 apiweb을 이용하여 분석하였음.

표1-3에서 보는 바와 같이 NK28과 Parisienne는 당 이용성 면에서 시험한 모든 당에 대해서 동일한 특성을 보였으며 Lv001은 글리세롤을 발효하는 반면 methyl-α-D-glucopyranoside를 발효하지 못하는 면에서 다른 것으로 나타났음. 글리세롤은 포도주의 풍미를 부드럽게하는 주요 성분으로 NK28과 Parisienne는 포도즙에 존재하거나 포도주 발효 중 생성되는 글리세롤을 발효하지 않아 풍미증진에 기여할 것으로 기대됨. NK28과 Parisienne는 당 이용성 뿐만 아니라 내당성, 말토오스 이용능, 알코올 저항성 및 생성능 등에 있어서 매우 비슷한 특성을 보였으나, 액체배양 중 세포들이 서로 응집되는 헌상에

서 다른 특성을 보였으므로 유전적으로 완전히 동일한 균이 아닌 것으로 판단됨 (그림 1-11).

<표1-3> NK28의 당 이용능 및 세포응집 특성

Sugar \ Strain	NK28	Lv001	Parisienne
None	x	x	x
D-Glucose	o	o	o
Glycerol	x	o	x
Calcium 2-keto-Gluconate	x	x	x
L-Arabinose	x	x	x
D-Xylose	x	x	x
Adonitol	x	x	x
Xylitol	x	x	x
D-Galactose	o	o	o
Inositol	x	x	x
D-Sorbitol	x	x	x
Methyl-α-D-Glucopyranoside	o	x	o
N-Acetyl-Glucosamine	x	x	x
D-Cellobiose	x	x	x
D-Lactose	x	x	x
D-Maltose	o	o	o
D-Saccharose	o	o	o
D-Trehalose	o	o	o
D-Melezitose	o	o	o
D-Raffinose	o	o	o
Flocculation (세포응집)	x	x	o

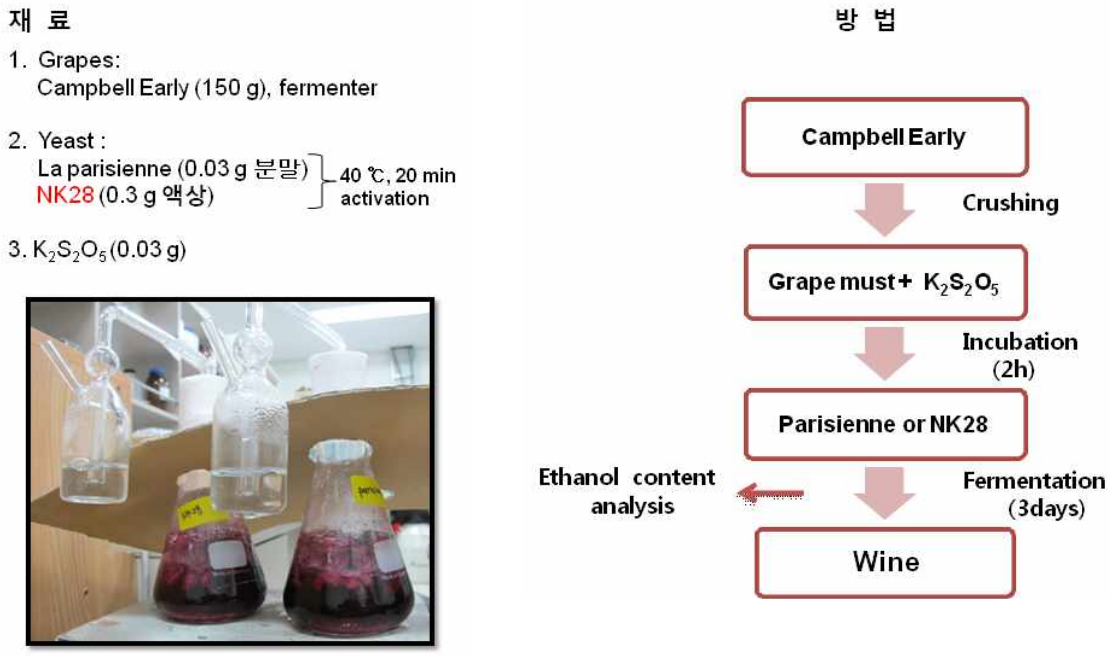


<그림1-11> 효모균주들의 세포관찰

(2) 분리효모주를 이용한 포도주 발효

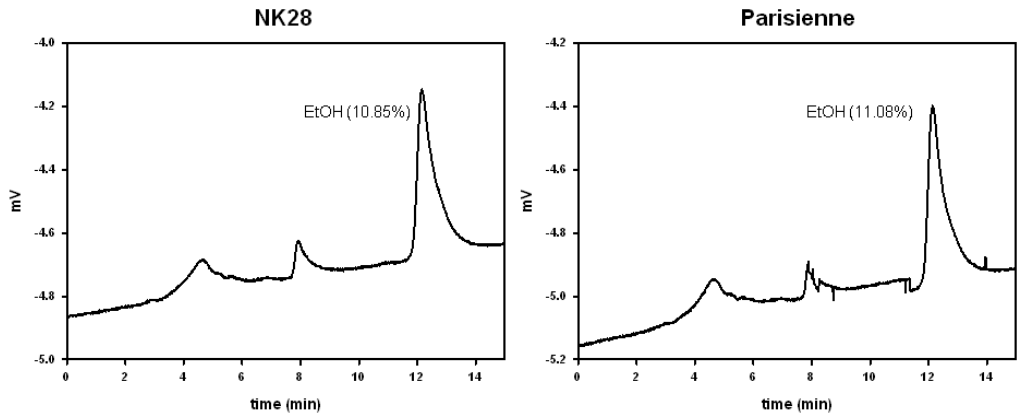
- NK28을 이용한 포도주 발효 :
본 연구에서 분리하여 최종선발한 효모균주 NK28을 이용하여 다음과 같은 방법으로

포도주를 발효하여 알코올이 생성능을 위에서 설명한 대로 HPLC로 분석하여 상용 효모 균주를 사용한 결과와 비교하였음 (그림 1-12).



<그림 1-12> NK28을 이용한 포도주 발효 재료 및 방법

- 그 결과 NK28은 상용 발효용 효모인 Parisienne와 비슷한 정도로 알코올을 생산할 수 있는 것으로 나타났으므로 NK28이 상용 효모로서의 가능성이 있음을 확인했음 (그림1-13).



<그림 1-13> NK28로 발효된 포도주의 알코올 함량

- 본 연구의 개발목표인 쌀 전분이 첨가된 포도주를 NK28 효모균주를 이용하여 그림 1-14와 같은 방법으로 제조하였음. 쌀 240 g을 물 360 ml에 넣어 Sumizyme 1g과 glucose isomerase (0.5 ml)를 가하고 NK28이나 Parisienne로 상온에서 3일 동안 발효한 다음 포도 1.2 kg (Campbell Early 500g, MBA 500g)을 첨가하고, $K_2S_2O_5$ 0.24 g을 넣어 4일간

더 발효시켰음. 발효가 끝나며 원심분리하여 발효잔여물을 제거하고 여과하여 HPLC로 알코올 함량을 측정하였음.

- 그 결과 NK28은 상용 발효용 효모인 Parisienne와 비슷한 정도로 알코올을 생산할 수 있는 것으로 나타났으므로 NK28이 상용 효모로서의 가능성이 있으며 본 연구 개발에도 적용할 수 있음을 확인했음 (그림 1-15).

1st fermentation (25 ℃)

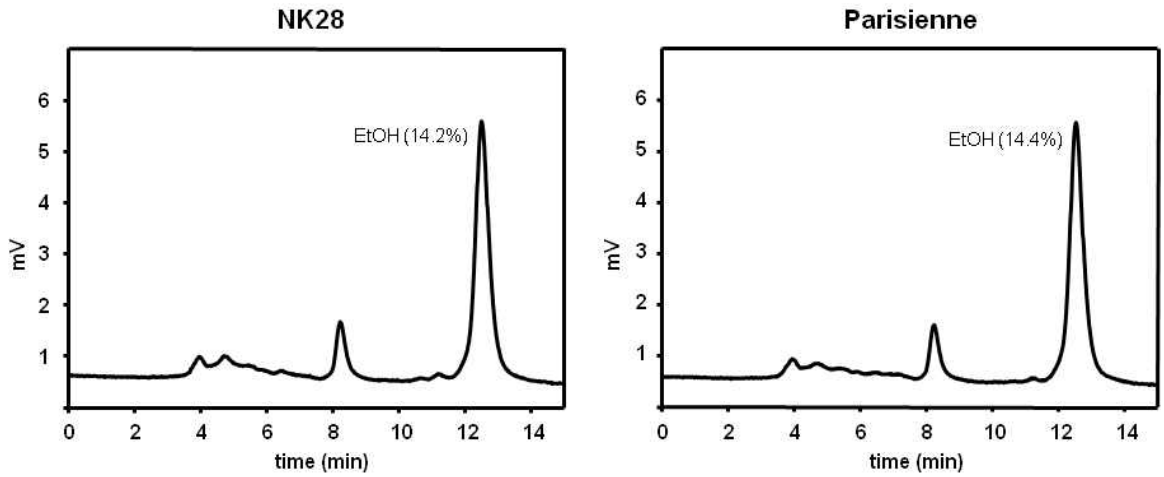
Batch	Material	Enzyme	Yeast
1	Rice	Sumizyme Isomerase	Parisienne
2			NK28

2nd fermentation (25 ℃)

Batch	Grape	Brix	Additives
1	Campbell+ MBA(50 %)	19	$K_2S_2O_5$
2			

Parissienne NK28

<그림 1-14> 쌀전분과 포도즙을 이용한 2단 발효



<그림 1-15> 쌀전분과 포도즙을 이용하여 발효된 포도주의 알코올 함량

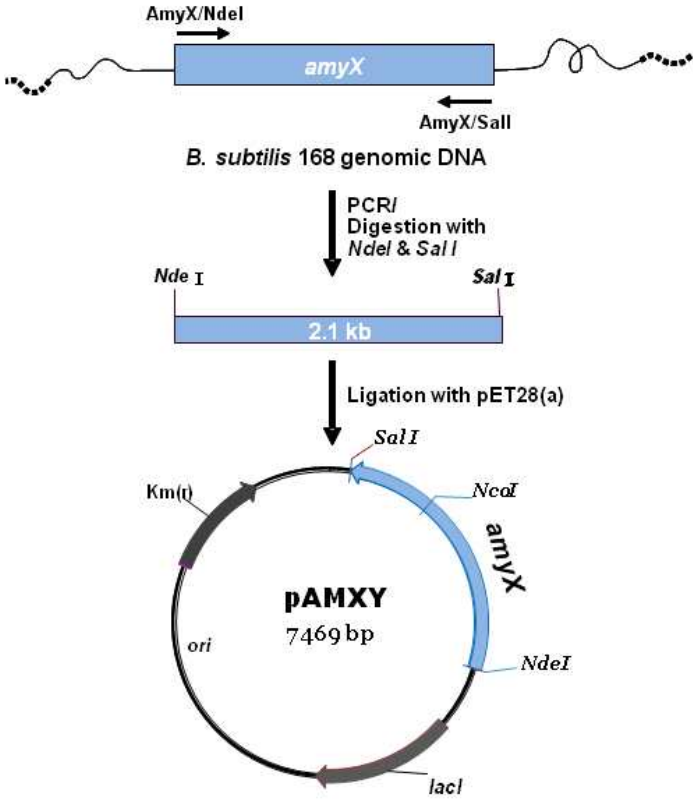
(3) 효소가 Display된 분리효모균주 개량

- 본 포도주 발효 공정에서는 쌀 전분을 효소로 처리하여 작은 분자로 분해시키며 효모로

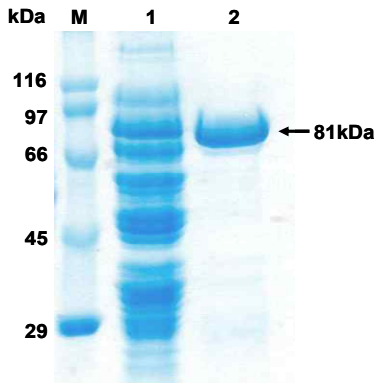
발효시킨 다음 포도즙을 첨가하여 포도주를 제조하는 2단 발효법을 사용하고 있음. 이러한 공정의 경제성 및 효율성을 증진시키고자 최종 선발된 분리균주인 NK28을 개량하고자 하였음.

NK28은 위에서 보고한 바와 같이 포도주 발효에 적절한 다양한 특성을 갖췄으나 전분 분해능은 갖고 있지 않는 것으로 확인된 바 있음. 따라서 본 연구에서는 탈분지 능력이 있고 pullulan을 분해하며, 전분과 글리코겐을 분해할 수 있는 것으로 알려진 *Bacillus subtilis*의 *amyX* 유전자를 분리하여 재조합 DNA를 제조하고 효모세포 표면에 display되도록 NK28에 도입시키고자 하였음. 이로써 AmyX가 display된 NK28은 전분의 분지결합 등을 분해하여 올리고당 생성을 촉진시키며 동시에 알코올 발효를 진행시킬 수 있을 것으로 기대됨.

- 먼저 이를 위하여 *B. subtilis amyX* 유전자를 그림 1-16과 같은 방법으로 클로닝하고 그 유전자 산물인 AmyX (pullulanase) 단백질을 정제하여 특성을 확인하였음. *amyX* 구조유전자는 2,154 bp 길이로 80,974 kDa 크기의 718 아미노산들로 된 단백질을 지정할 것으로 예측되었고 6xHis을 유전자에 융합시켜 Ni-NTA로 쉽게 정제할 수 있었음 (그림 1-17).



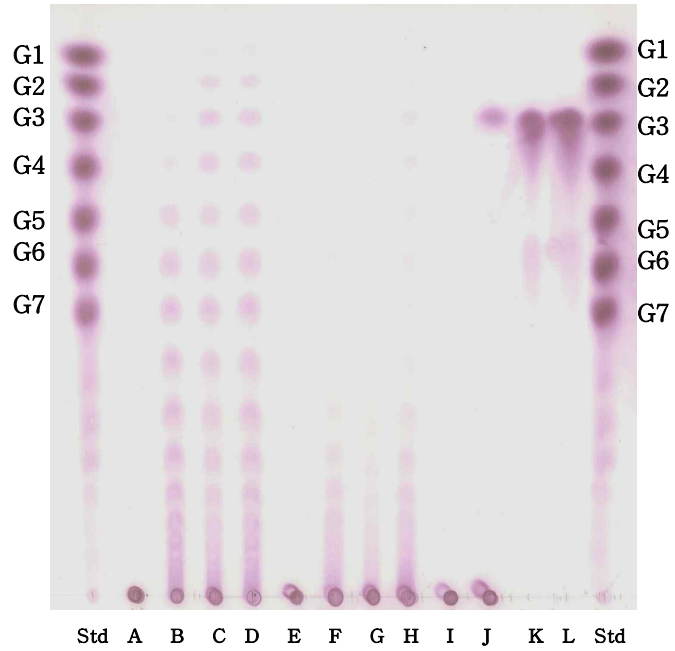
<그림 1-16 > *amyX* 유전자의 클로닝.



<그림 1-17> AmyX 단백질 정제

- *B. subtilis* AmyX는 pullulan과 글리코겐을 잘 분해하였고 가용성 전분과 아밀로펙틴도

가수분해 할 수 있는 것으로 분석되었음 (그림 1-18).



<그림 1-18> AmyX의 다양한 기질 분해능. 0.2% 농도의 각 기질들을 40℃에서 30분간 반응시킨 후 TLC로 분해물을 분석하였음. Std. mixture of G1-G7 (glucose to maltoheptaose): A, glycogen no enzyme; B, glycogen with enzyme; C, mlatodextrin no enzyme ; D, maltodextrin with enzyme; E, amylopectin no enzyme; F, amlyopectin with enzyme; G, soluble starch no enzyme; H, soluble starch with enzyme; I, pullulan no enzyme; J, pullulan with enzyme; K, β-CD no enzyme, L : β-CD with enzyme.

- 효모세포 표면 display를 위한 재조합 DNA 제조 :

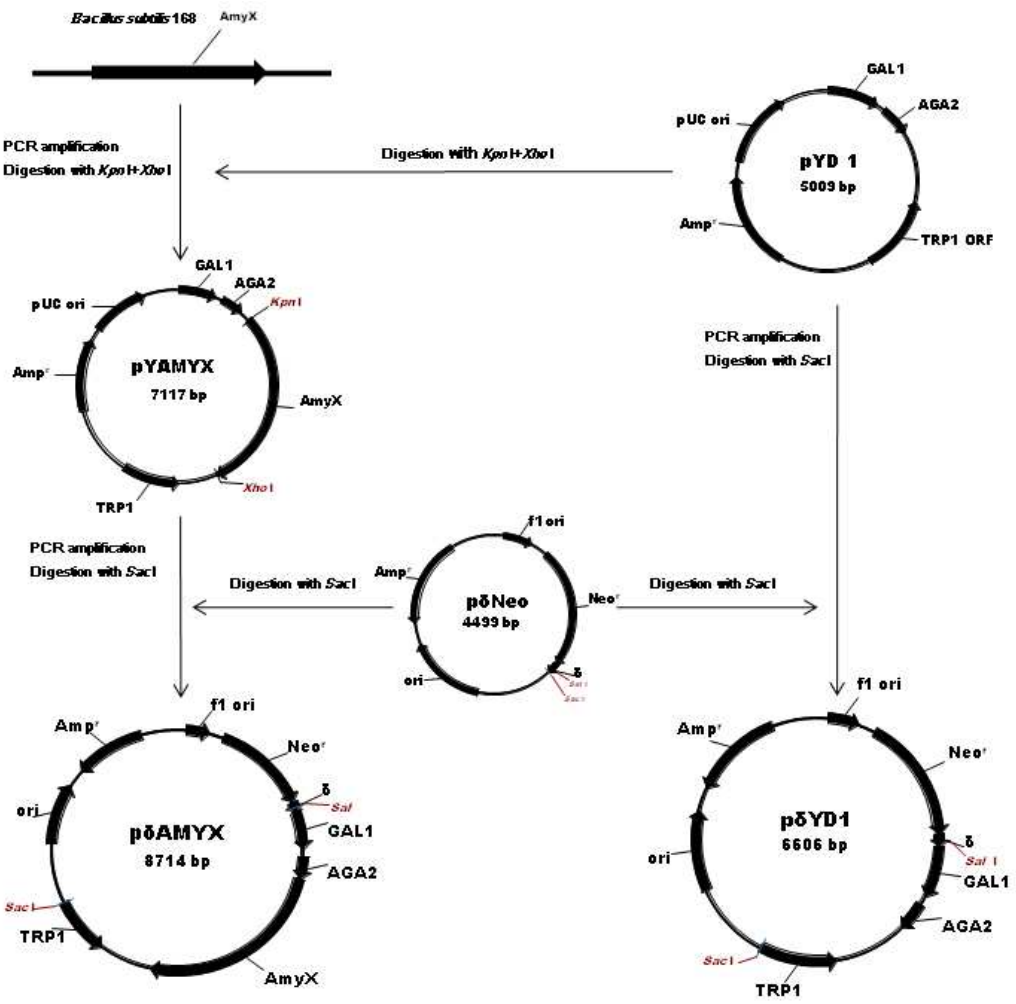
B. subtilis 168의 *amyX* 유전자를 증폭하여 pYD1 벡터에 클로닝하기 위해서 primer amyX-KpnI (5′-AAAGGTACCGATGGTCAGCATCCGCCGCAG-3′)과 amyX-XhoI (5′-AAAGCTCGAGAGCAAAACTCTTAAGATCTGATGC-3′)를 이용하여 *amyX* 유전자 단편을 증폭하고 그림 1-19와 같은 절차를 통해 재조합 pYAMYX을 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰음.

재조합 DNA, pYAMYX에 *SacI* 제한효소자리를 만들기 위해서 primer Int-F (5′-ACCCTCACTAAAGAGCTCAAAAGCTGGCTAGT-3′)와 Int-R (5′-GTGATTAAGCACACAGAGCTCGCTTGGAGTATG-3′)를 이용하여 PCR로 4.2 kb 단편을 증폭시켜 *SacI*으로 제한한 다음 pδNeo vector에 클로닝시켰음. 그 결과 제조합된 클론을 pδAMYX으로 명명하였음.

pδAMYX vector를 제한효소 *SalI*으로 선형화시킨 다음 효모세포 형질전환에 사용되는 alkali-cation kit (Bio101, 미국)를 이용해 NK28 균주에 형질전환시켰음. 대조군으로 *S. cerevisiae* EBY100 [*trp1, leu2Δ1, his3Δ200, pep4::HIS2, prbΔ1.6R an1, GAL*]에도 형질전환시켰음. EBY100 형질전환체는 YNB-GS 평판배지 (Yeast nitrogne base w/o amino acid

0.67%, Yeast synthetic drop-out medium supplement w/o tryptophan 0.19%, galactose 2%, starch 1%, agar 1.5%)를 사용하여 선발함. 대조군으로 pYD1 vector를 pδNeo vector와 결합시켜 pδYD1 재조합 DNA를 제조하여 비교함. 마지막으로 Iodine test를 하여 display가 잘된 것을 선별함. 이때 *amyX* 유전자가 display된 효모 형질전환체는 전분을 분해할 것이고 벡터만 형질전환된 경우에는 전분을 분해하지 못할 것임.

- NK28과 EBY100에 형질전환을 시도하였으나, NK28은 야생효모이기 때문에 형질전환이 되지 않았음. 또한, EBY100는 실험용 균주이기 때문에 포도주 발효에 사용될 수 없을 것으로 판단됨. 이외에도 외래유전자 발현에 사용된 프로모터가 galactose에 의해서 활성화되는 것이기 때문에 포도주 발효 시 프로모터가 활성화 될만큼 충분한 양의 galactose가 포도즙에 존재하는지 확인할 필요가 있음. 따라서 포도주 발효에 위의 방법으로 개량된 효모주를 사용할 수 있는 가능성은 매우 낮은 것으로 사료되어 연구목표 및 내용의 수정이 필요하다고 사료됨.



<그림1-19> 효모 표면 display를 위한 재조합 DNA 제조과정

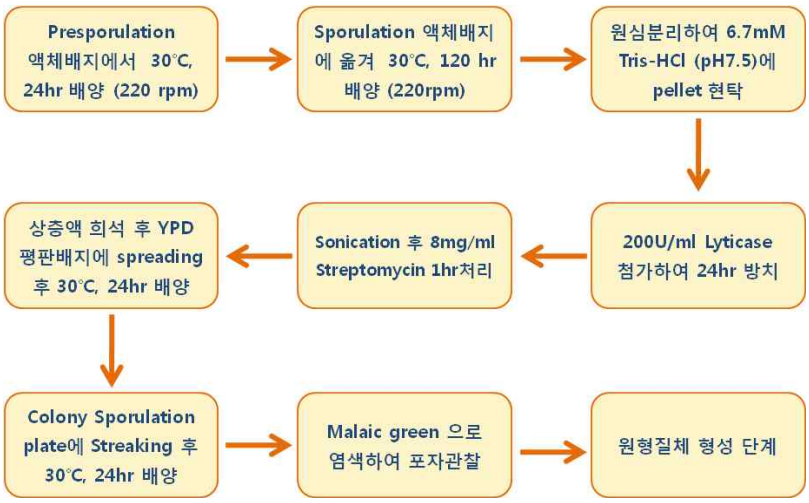
(4) 세포융합을 통한 분리효모균주 개량

- 유전자 재조합을 통한 효모균주를 개량할 때 재조합 DNA 형질전환체 선발과 숙주세포 내 재조합 DNA 유지를 위한 marker 유전자 사용, 그리고 재조합 DNA의 안정성이 문제가 되고 있음. 위에서 보고된 방법은 효모 내 marker 유전자로 트립토판 유전자를 사용하기 때문에 안전성에 있어서 문제가 되지 않고, 염색체 DNA로 삽입이 되기 때문에 안정성에도 큰 문제가 없을 것으로 사료됨. 그러나 대장균 내에서의 클로닝을 위해서 사용하는 ampicilin 저항성 유전자가 효모에서 사용되지는 않지만 존재하고 있기 때문에 포도주 발효시 안전성 문제가 야기될 수 있다고 사료됨. 또한 야생효모인 NK28는 형질전환 등 유전자 재조합이 어려운 것으로 현재 판단되고 있음.

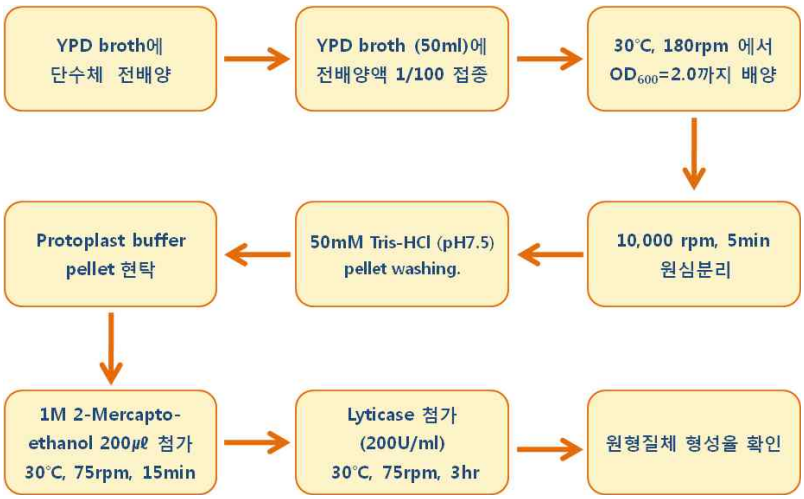
- 따라서 보다 성공 가능성이 높은 세포융합을 통해 NK28을 개량하고자 하였음. 이를 위하여 amylase를 생산하는 것으로 알려진 효모균주 *S. diastaticus* KCTC7955 (*leu2-3, leu2-1, 12his4, STA1, FLO8*)을 분양받아 amylase 생산균주와 NK28 및 상용 효모인 Lv001의 반수체를 유도하여 그림 1-20, 1-21, 1-22, 1-23과 같은 과정을 통해 amylase 생산능과 NK28의 특성을 갖춘 세포융합체를 얻고자 하였음.

- 아래의 과정을 따라 포자 (반수체) 형성을 유도하고, 포자가 형성되었는지를 포자염색을 통해 현미경으로 확인한 다음 원형질체 형성을 유도하였음.

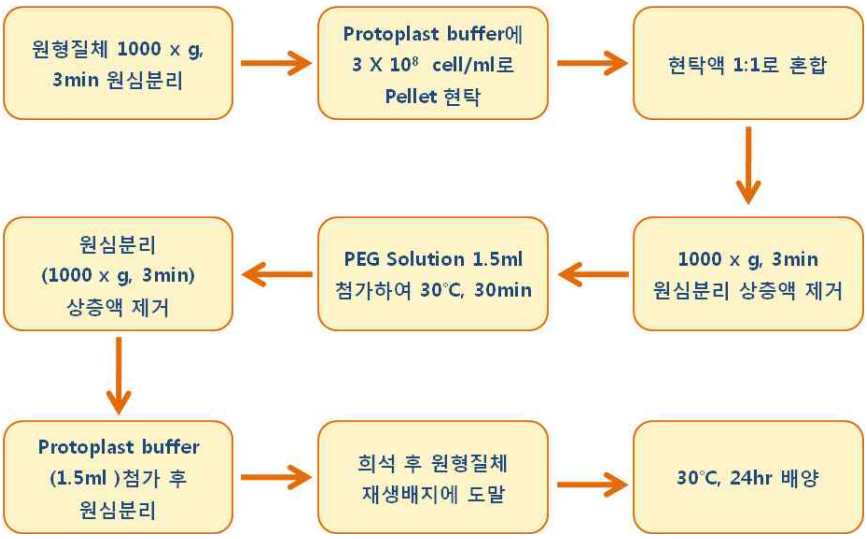
- 원형질체 형성율 (%)은 $A(t_0)-A(t)/A(t_0)$ x 100로 계산하였는데 이 때 $A(t_0)$는 초기 세포현탁액 흡광도 (A_{570})이고 A(t)는 원형질체 형성 후 흡광도 (A_{570})임. 원형질체 형성율이 70-90% 정도 될 때까지 lyticase로 처리한 다음 원형질체 형성율이 그 범위 내에 이른 실험균주 원형질체를 1:1의 비율로 섞어 융합을 유도하였음.



<그림 1-20> 반수체 유도과정



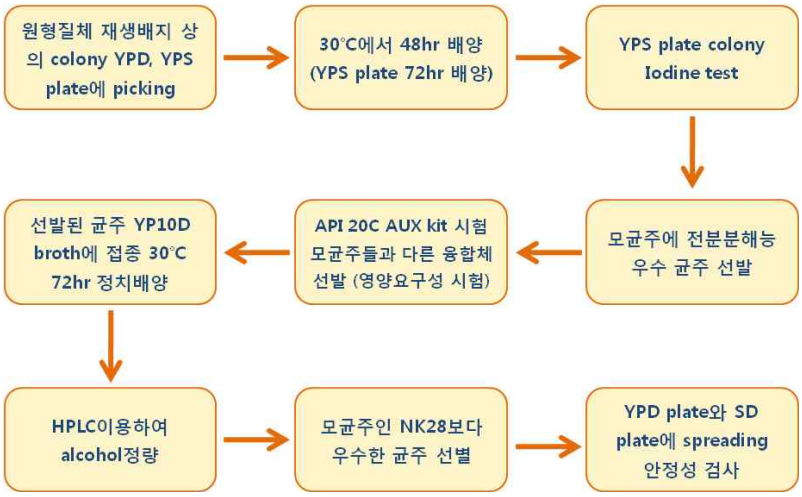
<그림 1-21> 원형질체 형성과정



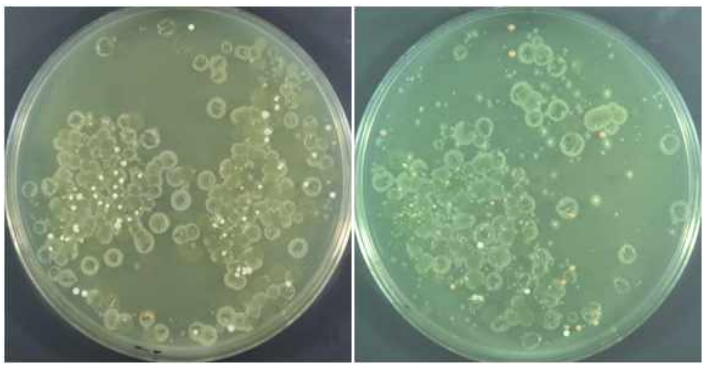
<그림 1-22> 세포융합 과정

- 융합된 원형질체들을 재생배지에 도말하여 그림 1-24에서 보는 바와 같이 균집락들을 얻었으며 이들 중 효모처럼 보이는 균집락들을 YPD 및 YPS 평판배지에 picking하여 배양한 다음 전분분해능을 iodine test로 확인하였음 (그림 1-25). 이들 중 전분분해능을 보이는 균체들에 대하여 Leucine에 대한 영양요구성, 혹은 API 20C kit 상에서의 당 이용능, 26S rDNA 유전자 분석 등을 통해 융합주임을 확인하고, 그 발효능을 분석할 예정임.
- 또한 융합주의 유전적 안정성을 YPD 액체배지에서 10세대 (1세대는 30℃, 150rpm에서 48hr 간 배양) 동안 배양한 다음, 10세대 배양액을 희석하여 YPD 평판배지와 SD 평판배지에 도말한 뒤, 각각의 평판배지에 형성된 colony수의 비율로 융합주의 안정성을 조사하여야 함.

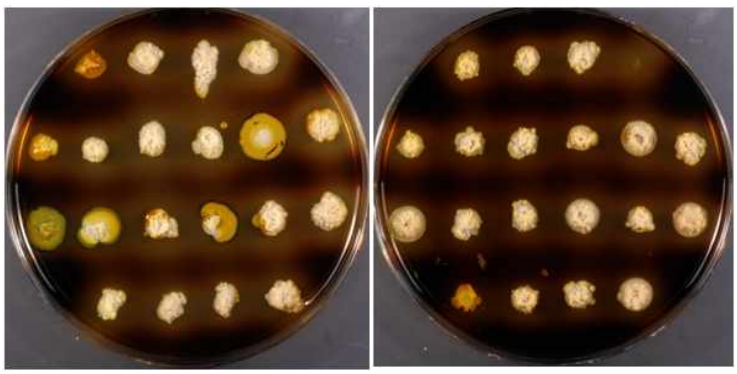
$$\text{유전적 안정성}(\%) = \frac{SD\,plate\text{에 나타난 }colony\text{수}}{YPD\,plate\text{에 나타난 }colony\text{수}} \times 100$$



<그림 1-23> 세포융합체 선별과정



<그림 1-24> NK28 x *S. diasticus* KCTC 7955



<그림 1-25> 세포융합체의 전분분해능

3) 3차년도

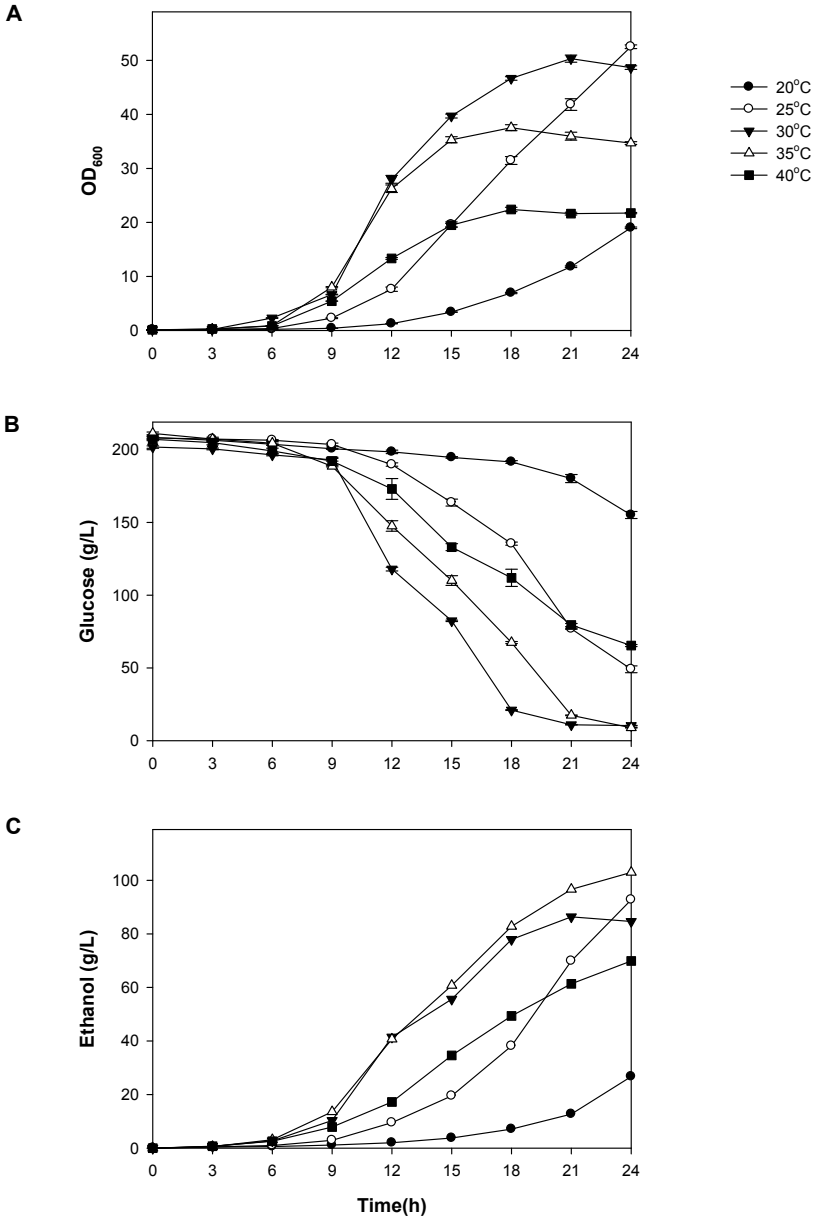
3차년도에서는 2차년도에서 최종선발된 *S. cerevisiae* NK28 균주의 발효특성을 분석하여 주모로서 사용할 수 있도록 대량배양하고, 포도주 발효에 주모로 사용할 수 있는지 그 안정성 및 안정성을 확인하며 이를 주모로 사용한 포도주의 성분분석 및 선호도 관능검사를 수행하였음.

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
●선발된 효모균주 NK28의 발효 특성 및 최적 발효조건 분석	- 2차년도에서 최종선발된 NK28 효모균주의 발효특성을 분석하여 포도주 제조에 주모로 사용할 수 있도록 대량생산하기 위하여 그 발효특성을 분석하고 최적조건을 결정하고자 하였음.	- NK28의 발효조건을 YEP 배지 (1% yeast extract, 2% peptone)와 다양한 포도당 농도 (2, 5, 10, 20, 30, 40%), 발효온도 (20, 25, 30, 35, 40℃), pH (3, 4, 5, 6, 7), 에탄올 (0, 5, 10, 20, 50, 70 g/l) 조건에서 24시간, 200 rpm으로 교반하면서 측정하였음. - 이때 산업용 효모균주로 널리 사용되고 있는 *S. cerevisiae* D5A (ATCC 200062) 및 *S. cerevisiae* BY4742를 함께 발효하여 NK28과 비교하였음. - 포도당 및 에탄올 함량은 HPLC {Rezex RPM monosaccharide Pb+2 (8%), Shimadzy}를 사용하여 결정하였음.
● 발효 중 NK28 효모균주의 안정성 분석	- 발효가 진행되면서 생산되는 각종 페놀류, 유기산 등의 물질에 의해 NK28균주의 생장이 어떤 영향을 받는지 확인하였음. - NK28 균주가 각종 항생제 및 항균물질에 대해 어떻게 반응하는지 검사하였음.	- Growth phenotype assay는 YEPD고체배지를 이용하여 페놀류 화합물, 초산 및 개미산 등 약산, furfural 등의 저해제를 사용하여 *S. cerevisiae* D5A (ATCC 200062) 및 *S. cerevisiae* BY4742에 미치는 영향과 비교하여 분석하였음. - 항생제 및 항균물질에 대한 저항성은 agar diffusion method로 분석하였고 EtOH, ampicillin, kanamycin, tetracycline, Zeocin, Chrolamphenicol 등을 사용하였음.
●포도주 주모로서 사용하기 위한 NK28의 대량 생산	- 상용 포도주 효모종과 성능 비교 연구를 통해 고품질 포도주 생산에 사용하기 위하여 *S. cerevisiae* NK28을 대량 배양하고 동결건조하여 분말상태로 제조하였음. (경기바이오텍 시설 사용하여 위탁생산)	*S. cerevisiae* NK28은 YPD배지 (Glucose, 20g/L; Bacto-peptone, 20g/L; yeast extract, 10g/L)를 사용하여 KGMP 환경 하에서 멸균된 UPW를 이용하여 배양하였다. 500ml YPD media에 NK28을 접종하여, 교반배양기에서 300 rpm, 12시간 동안 전배양 하여 75L Bioengineering LP351 발효기에 접종하였으며, 50L YPD배지를 사용하여 500rpm, 30°C로 회분식 배양을 수행하였음.

		-배양이 끝난 배양액은 연속원심분리기 HC-105 (한일 S.M.E(주), Korea)를 사용하여 15,000 rpm으로 상등액과 효모를 분리하여 균체만 회수하였음. -회수된 세포는 동결건조법을 사용하여 수분을 제거하였음 (동결건조기, 일신랩/ PVTFD30RSS). 분산매로 Dextrose-fresh 액체배지 (20% dextrose 용액 50%, Fresh liquid medium 50%)를 사용하였고, 회수한 균체와 혼합하여 vial에 3 ml씩 분주하였음.
●NK28 분리균주의 발효공정 적용 및 포도주 성분 분석	-포도주 발효에 사용하는 효모로서 *S. cerevisiae* NK28의 유효성을 확인하기 위하여 NK28을 이용하여 포도주를 제조하여 상용화되고 있는 효모주를 사용하여 제조한 포도주와 알코올 그 특성을 비교분석하였음.	- *S. cerevisiae* NK28로 포도주를 제조했을 때 포도주 내에 생성되는 알코올, 유기산 등 성분을 상용화되고 있는 Fermidin 균주로 제조된 포도주 성분과 비교하여 분석하였음. 이를 위하여 MBA 포도를 이용하여 통상적인 방법으로 포도주를 제조하였음. - 위의 두 포도주에 대한 선호도를 63명의 학생들을 대상으로 색, 향기, 단맛, 신맛, 쓴맛, 목넘김, 후미 등의 항목에 대한 관능검사를 통해 분석하였음.
●포도주 발효 중 잡균의 생장제어를 위한 천연물질 개발	- 포도주 발효 중 잡균의 생장을 억제하기 위하여 사용하는 메타중아황산칼륨이 인체에 유해할 뿐만 아니라 포도주의 풍미를 저하시키기 때문에 이를 대체할 수 있는 천연화합물을 개발하고자 하였음.	-감귤 추출물인 Phyollen-G, 오미자 등의 천연화합물을 다양한 농도로 배지에 첨가하여 여러 미생물들의 생장에 미치는 영향을 최소생장억제농도 (minimal inhibition concentration; MIC) 결정을 통하여 분석하였음.

(1) 선발된 효모균주 NK28의 발효 특성 및 최적 발효조건 분석

- 발효온도에 따른 NK28의 생장 및 에탄올 생산을 모니터링한 결과 (그림1-26), 35℃에서 에탄올이 효율적으로 가장 많이 생산되는 것으로 나타났고 그 다음은 25℃였음 (표1-4).

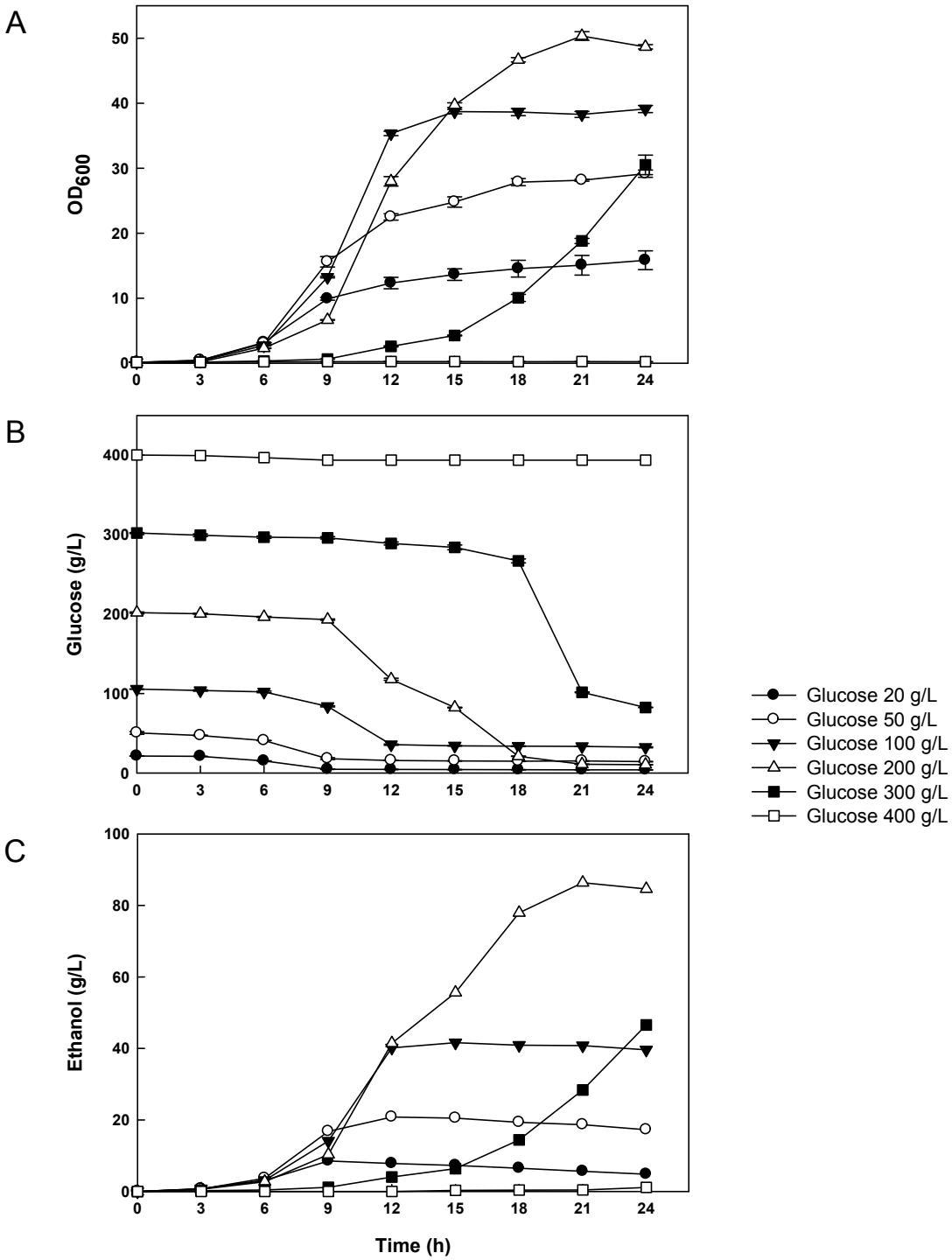


<그림 1-26> 발효온도에 따른 NK28의 생장(A), 포도당 사용량(B), 에탄올 생성량(C).

<표1-4> 발효온도에 따른 NK28의 에탄올 생산

Temp. (℃)	비성장속도 (h^{-1})	최종 균체농도 (g/l)	최대 에탄올 농도 (g/l)	에탄올 생산성 (g/l • hr)	에탄올 생산수율 (g/g)
20	0.31±0.01	6.46±0.09	25.31±2.0	1.05±0.08	0.49±0.05
25	0.47±0.01	17.86±0.20	89.37±4.8	3.72±0.20	0.57±0.03
30	0.53±0.00	16.55±0.20	83.08±2.19	3.46±0.09	0.44±0.01
35	**0.55±0.00**	**11.80±0.15**	**98.96±5.67**	**4.12±0.24**	**0.51±0.03**
40	0.45±0.01	7.39±0.07	68.93±1.37	2.87±0.06	0.49±0.01

- 포도당 농도에 따른 NK28의 에탄올 생산에 대해 20 g/L-400 g/L의 농도구간에서 발효를 통해 분석한 결과 (그림 1-27), 200 g/L 즉 20%일 때 에탄올을 가장 효율적으로 많이 생산하는 것으로 나타났음 (표1-5).



<그림1-27> 포도당 농도가 NK28의 생장(A), 포도당 이용(B), 에탄올 생산(C)에 미치는 영향.

<표1-5> 포도당 농도에 따른 NK28의 에탄올 생산.

Glucose (%)	비성장속도 (h^{-1})	최종 균체 농도 (g/l)	최대 에탄올 농도 (g/l)	에탄올 생산성 (g/l • hr)	에탄올 생산 수율 (g/g)
2	0.51±0.01	5.38±0.85	5.34±0.71	0.22±0.03	0.30±0.04
5	0.56±0.01	9.91±0.26	17.0±0.38	0.71±0.02	0.47±0.05
10	0.51±0.00	13.29±0.32	39.30±0.49	1.64±0.02	0.54±0.01
20	**0.53±0.00**	**16.55±0.20**	**83.08±2.19**	**3.46±0.09**	**0.43±0.01**
30	0.26±0.01	10.37±0.72	45.7±1.20	1.91±0.05	0.21±0.01
40	0.03±0.01	0.08±0.00	1.11±0.03	0.05±0.00	0.14±0.06

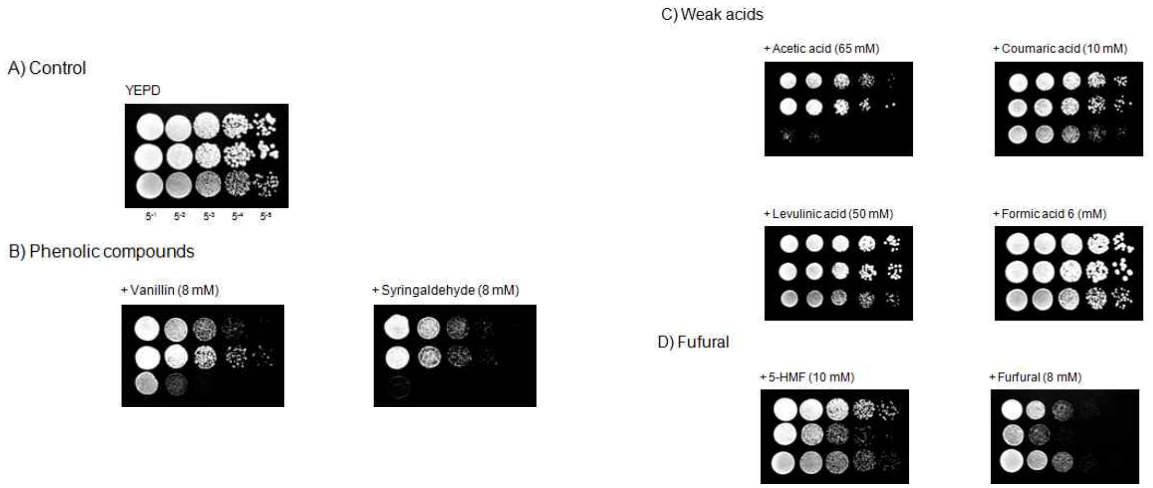
- 배지의 pH에 따라 NK28의 에탄올 생산성을 분석한 결과 pH 6에서 에탄올을 가장 효율적으로 많이 생산하는 것으로 나타났음 (표1-6)

<표1-6> pH에 따른 NK28의 에탄올 생산.

pH	비성장속도 (h^{-1})	최종 균체 농도 (g/l)	최대 에탄올 농도 (g/l)	에탄올 생산성 (g/l • hr)	에탄올 생산 수율 (g/g)
3	0.45±0.01	8.84±0.09	79.98±2.79	3.21±0.12	0.51±0.02
4	0.48±0.01	12.42±0.14	92.05±0.91	3.84±0.04	0.54±0.01
5	0.49±0.01	13.19±0.14	93.10±1.13	3.88±0.05	0.54±0.01
6	0.55±0.00	11.80±0.15	98.96±5.67	4.12±0.24	0.56±0.01
7	0.52±0.00	13.38±0.02	95.70±0.70	3.99±0.03	0.54±0.01

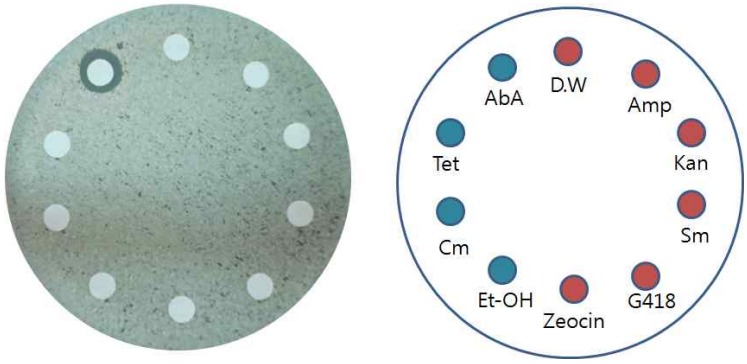
(2) 발효 중 NK28 효모 균주의 안정성 분석

- 다양한 inhibitor들이 NK28의 생장에 미치는 영향을 분석한 결과 NK28은 거의 대부분의 경우 산업용 효모균주들인 *S. cerevisiae* D5A (ATCC 200062) 및 *S. cerevisiae* BY4742 보다 저해제들에 의해 영향을 가장 적게 받는 것으로 나타났음 (그림1-28).



<그림1-28> Growth phenotype assay of *S. cerevisiae* NK28, D5A, and BY4742.

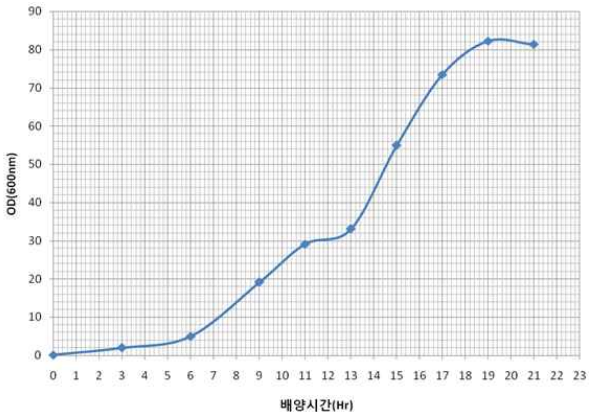
- 또한 NK28의 안전성을 확인하기 위하여 다양한 항생제 및 항균물질에 대한 감수성을 분석한 결과 *p*-aminobenzoic acid(AbA)에 대해서만 감수성이 있는 것으로 확인되어 (그림 1-29) 발효 중 접할 수 있는 항균물질에 의해 영향을 거의 받지 않을 것으로 판단되었음.



<그림 1-29> 다양한 항균물질에 대한 NK28의 감수성 분석.

(3) 포도주 주모로서 사용하기 위한 NK28의 대량 생산

- *S. cerevisiae* NK28을 경기바이오센터에 위탁하여 배양한 결과, 최대 OD_{600nm}는 82.2이었고, 원심분리하여 회수한 균체량은 1.04kg 이었다. 총 21시간 배양하는 동안, 11~13시간에 Diauxic shift가 일어남을 확인할 수 있었음 (그림 1-30)
- 이를 분산매와 균질하게 혼합하여 Vial에 3ml씩 분주하여, 동결건조를 수행한 후, 건조된 균체를 배지에 다시 배양해 본 결과, 다시 생육함을 확인하였음 (그림 1-31). 최종적으로, 500 vial (총 건조균체 약 200g)의 시제품을 생산하였음 .



<그림 1-30> *S. cerevisiae* NK28의 발효 중 생장곡선

<그림 1-31> 동결건조 상태로 생산된 NK28 및 재생장 확인.

(4) NK28 분리균주의 발효공정 적용 및 포도주 성분 분석

- 포도주 제조

상태가 양호한 포도(MBA)를 1.5kg 측정하여 알알이 따서 담은 후에 포도파쇄액 살균을 위해 메타중아황산칼륨 ($K_2S_2O_5$)을 200 ppm 되게 첨가하였음. 메타중아황산칼륨 첨가 후 효모를 접종할 경우 효모가 사멸될 수 있으므로 메타중아황산칼륨 첨가 후 정확히 2시간 이후에 효모를 접종하였음. 메타중아황산 첨가 후에 당도계로 당도를 측정하여 22Brix 이하 시 Sucrose를 투입하여 당보정을 하였음.

· 당 보정 공식

보충 sucrose (g) = 포도 파쇄량 (kg) × (목적당도 - 현재당도) × 10

본 실험에서의 측정당도 : 19 Brix, 보충한 sucrose: 45g

이후 당보정한 포도파쇄액에 효모 (Fermivin, NK28)를 포도파쇄액 1 kg당 1 g (생균중량)을 각각 첨가하였음.

항온수조를 이용하여 발효조 내부를 25℃를 유지한 후 발효통의 뚜껑에 vaccum grease를 도포하여 밀봉하여 발효를 진행하였음 (그림 1-32).

발효를 시작한 후 효모의 탄산가스가 생성되어 1분당 기포 배출 횟수가 초기 2일 동안 증가하다가 3일째부터 감소하기 시작하여 1분당 3회 이하로 기포가 생성될 시에 1차 발효를 종료하였음. 1차 발효 중 24시간 간격으로 100 ml의 발효액을 시료 채취관을 통하여 수득하여 알코올농도, 유기산, 잔당 분석 등을 실시하였음 (그림 1-32).

<그림1-32> 포도주 발효조

본 실험에서는 약 5일 동안 1차 발효를 수행하였고, 1차 발효 후 포도껍질, 알갱이 등을 제거하기 위하여 나일론 재질의 망을 이용하여 빠른 시간 내에 여과하고 발효액은 500 mL 씩 병입하여 2차 발효를 14일 간 진행하였음.

- 생효모 제조

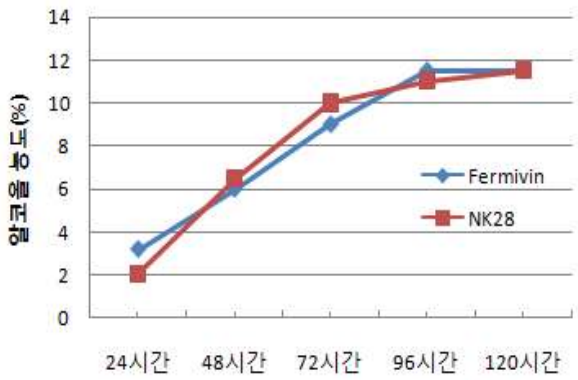
0.78% 식염수(Sodium Chrolide)를 멸균하여 이용하였다. 준비한 식염수 50 ml에

Fermivin 1g (건조효모)을 녹이고 40℃에서 30분 동안 활성화 시켰고, -70℃에 저장 중인 NK28 Stock을 상온에서 해동시켜 YPD Broth 200 ml에 각각의 효모를 접종한 후 30℃에서 24시간 진탕배양하여 대수기가 끝나기 전에 균체를 원심분리하여 수확하였다. 식염수를 이용하여 균체를 2번 씻어주어 불순물을 제거한 후 정량하여 이를 포도주 발효에 이용하였음.

- 포도주 증류 및 알코올농도 측정

옆의 그림 1-33과 같은 형태로 증류기를 설치하였다. 80 ml 포도주 시료를 삼각플라스크에 넣은 후에 증류수 20ml를 넣어 100 ml를 맞추었음. 펌프를 작동시켜 냉각수가 흐르는 것을 확인하고 알코올램프를 이용하여 가열하였음. 메스실린더에서 증류액이 80 ml이 되면 증류를 중지하고 증류수를 넣어 증류액 부피를 100 ml로 맞추었음. 주정계를 띄운 후 술 수면과 주정계의 눈금이 만나는 곳의 값을 읽어 알콜도수를 결정하였음. 증류액의 온도가 15℃일 때 읽은 값이 알코올 도수 이므로 15℃로 증류액을 맞춘 후 알코올 도수를 측정하였음.

<그림 1-33> 포도주의 알코올 측정



<그림 1-34> 포도주의 알코올 함량

상용화되고 있는 Fermivin이나 NK28균주 모두 120시간이 경과되었을 때 11.5% 정도의 알코올을 생산한 것으로 나타나 알코올 함량에 큰 차이가 없었음 (그림 1-34).

- 알코올조성 분석

에탄올 외 methanol, propanol 등 알콜의 조성은 증류액을 가스크로마토그래피를 이용하여 분석하고 표준물질과 비교정량하여 결정하였음. 감지기는 FID를 사용하였으며 시료는 필요에 따라 1-100배 가량 희석하여 분석을 진행하였음.

NK28로 발효된 포도주의 경우 숙취와 관련된 것으로 알려진 메탄올의 함량이 Fermivin으로 발효된 포도주 보다 1/4 수준으로 적은 것으로 나타났음 (표 1-7).

<표1-7> Fermivin 혹은 NK28로 발효된 포도주의 알코올 성분 정량분석

Alcohol	Fermivin				NK28			
	Ret.Time (min)	Area (pA*s)	Amount (mg/L)	ppm	Ret.Time (min)	Area (pA*s)	Amount (mg/L)	ppm
n-Propyl	3.36	4.54	32.34	32.34	3.36	5.59	39.80	39.80
Methanol	3.89	0.82	614.84	614.84	3.89	0.19	143.74	143.74
Isobutyl	3.97	10.14	52.43	52.43	3.97	11.55	59.74	59.74
Ethanol	4.44	146.28	123,099.57	123,099.57	4.43	139.74	117,575.50	117,575.50
n-Butyl	4.90	ND	ND	0.00	4.90	ND	ND	0.00
Isopentyl	6.29	57,29	228.54	228.54	6.30	73.58	293.51	293.51
Total				124,027.72				118,112.29

- 향기성분 분석

포도주의 향기성분은 포도주의 고형분 제거후 150℃에서 가열하여 증기를 모아 GC-MS (Clarus600/Clarus 600 T, PerkinElmer)를 사용하여 분석하였음. 그 결과 정량적인 비교분석은 할 수 없었으나 정성적인 면에서 큰 차이가 없는 것으로 나타났음 (표1-8).

<표1-8> Fermivin 혹은 NK28로 발효된 포도주의 향기성분 비교분석

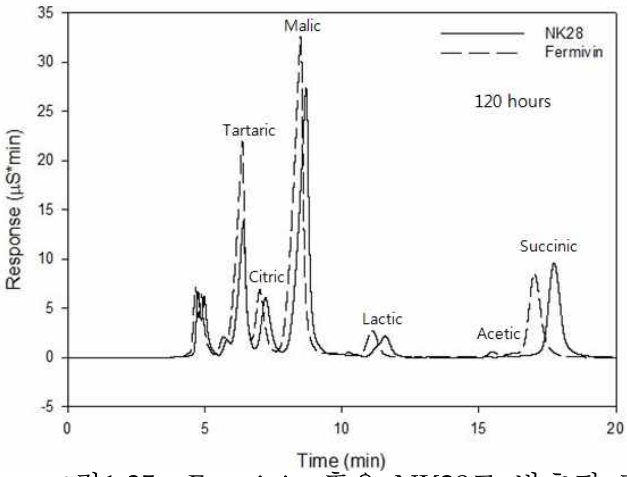
Fermivine	
Time (min)	Volatile compounds
5.24	1-Propanol
6.67	1-Propanol, 2-methyl-
9.29	1-Butanol, 3-methyl-
9.45	Hexanoic acid, ethyl ester
9.95	1-Butanol, 3-methyl-
11.96	2-Butanone, 3-hydroxy-
12.50	**1-Pentanol, 3-methyl-**
12.21	1-Pentanol, 4-methyl-
13.08	2-Hexanol
14.54	Octanoic acid, ethyl ester
15.57	Acetic acid
17.23	2,3-Butanediol
17.86	Propanoic acid, 2-methyl-
18.94	Decanoic acid, ethyl ester
19.06	Butanoic acid
19.83	Butanoic acid, 3-methyl-
20.69	1-Propanol, 3-(methylthio)-
22.29	Hexanoic acid
22.48	Acetic acid, 2-phenylethyl ester
22.80	Dodecanoic acid, ethyl ester
23.04	Hexanoic acid
24.20	Phenylethyl Alcohol
25.29	**???**
25.44	Acetic acid
26.60	Octanoic Acid
29.48	Hexadecanoic acid, ethyl ester
29.83	n-Decanoic acid
31.02	**Tetradecane**
34.05	**?????**
34.17	**Pentane, 3-methoxy-**

NK28	
Time (min)	Volatile compounds
5.24	1-Propanol
6.67	1-Propanol, 2-methyl-
6.75	1-Butanol, 3-methyl-
8.34	**1-Butanol**
9.29	1-Butanol, 3-methyl-
9.45	Hexanoic acid, ethyl ester
9.95	1-Butanol, 3-methyl-
11.96	2-Butanone, 3-hydroxy-
12.21	1-Pentanol, 4-methyl
12.49	**1-Hexanol**
13.07	2-Hexanol
14.55	Octanoic acid, ethyl ester
15.59	Acetic acid
17.22	2,3-Butanediol
17.87	Propanoic acid, 2-methyl-
17.96	2,3-Butanediol
18.95	Decanoic acid, ethyl ester
19.07	Butanoic acid
19.84	Butanoic acid, 3-methyl-
20.69	1-Propanol, 3-(methylthio)-
22.29	Hexanoic acid
22.48	Acetic acid, 2-phenylethyl ester
22.81	Dodecanoic acid, ethyl ester
23.04	Hexanoic acid
24.20	Phenylethyl Alcohol
26.61	Octanoic Acid
29.49	Hexadecanoic acid, ethyl ester
29.84	n-Decanoic acid
31.02	**Palmitic acid vinyl ester**

- 유기산 분석

시료를 채취 후 원심분리하여 고형분을 제거하고 분석 전까지 -20℃에 냉동하여 보관하였음. 시료를 5% trichloroacetic acid(TCA)로 적당히 희석한 후 원심분리하여 단백질 등을 제거하고 0.45 μm pore-size 필터로 필터링하여 분석을 수행하였음. 분석은 IonPac (ICE-AS6 Dionex, 미국)를 장착한 high-pressure anion-exchange chromatography (HPAEC)를 이용하여 수행하였으며 감도향상을 위하여 Suppressor(AMMS-ICE 300, Dionex, 미국)을 컬럼 뒤에 장착하였음. 감지기는 conductivity detector를 이용하였다. 정량을 위하여 99% 이상의 순도를 갖는 표준물질을 시료와 동일조건에서 분석하여 이용하였음.

포도주를 숙성시키면서 시간별로 유기산 조성 및 함량을 분석하였을 때 96시간 까지는 큰 차이가 없었으나 120시간이 되었을 때 NK28로 발효된 포도주의 경우 tartaric acid와 malic acid, formic acid, acetic acid의 함량이 Fermivin 포도주에 비해 낮은 것으로 나타났음 (그림 1-35; 표1-9). 따라서 NK28로 발효된 포도주의 풍미가 우수한 것으로 예측되었음.



<그림1-35> Fermivin 혹은 NK28로 발효된 포도주의 유기산 HPAEC 분석

<표1-9> Fermivin 혹은 NK28로 발효된 포도주의 유기산 정량분석

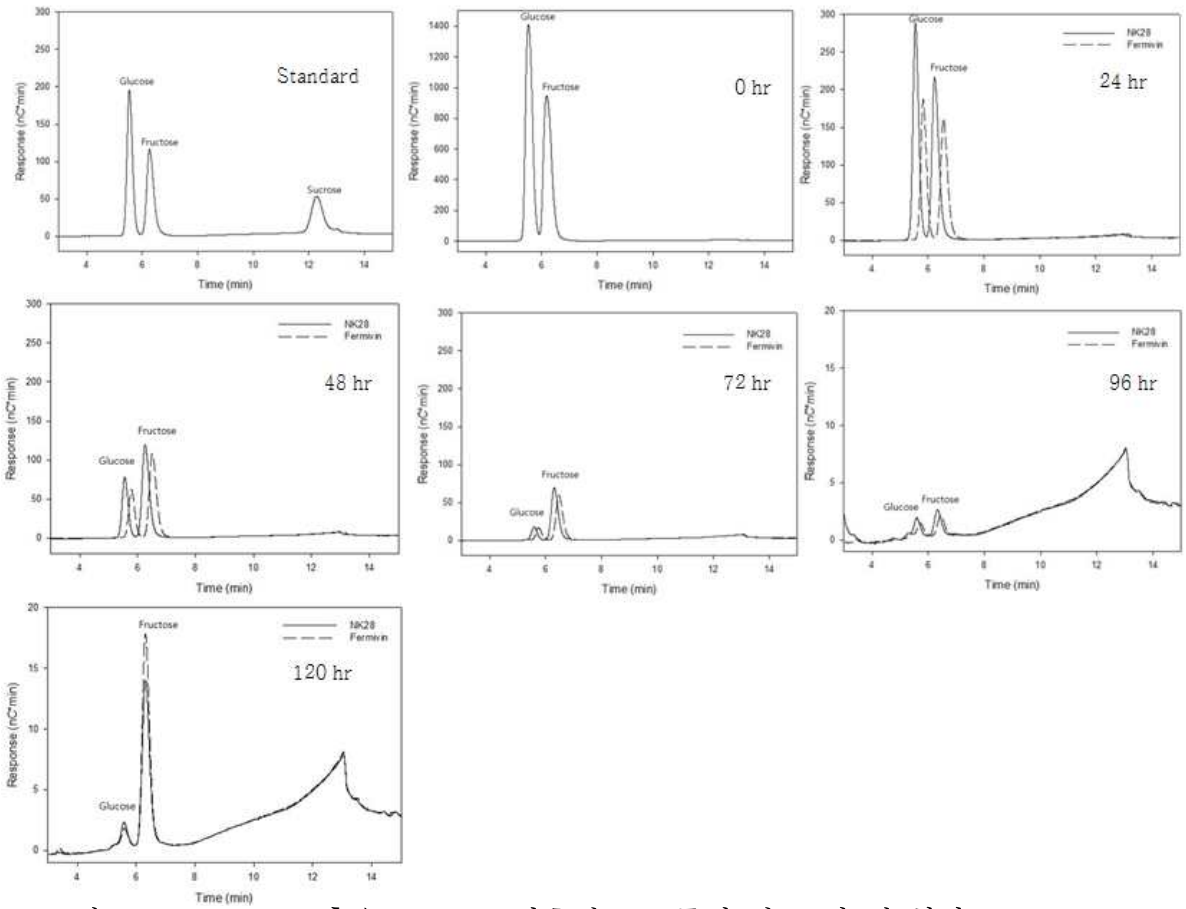
Fermivin 120 hours				
	Time(min)	Response(μS*min)	Con.(mg/ml)	ppm
Tartaric	6.36	7.8401	0.0030	3.0383
Citric	7.00	2.4083	0.0007	0.7263
Malic	8.48	13.8959	0.0049	4.8755
Formic	10.24	0.0669	0.0000	0.0169
Lactic	11.12	1.2042	0.0007	0.7228
Acetic	15.49	0.1399	0.0000	0.0491
Succinic	17.03	4.5413	0.0014	1.3556

NK28 120 hours				
	Time(min)	Response(μS*min)	Con.(mg/ml)	ppm
Tartaric	6.27	4.3513	0.0017	1.6863
Citric	7.06	2.2842	0.0007	0.6888
Malic	8.51	11.6635	0.0041	4.0922
Formic	10.33	0.0317	0.0000	0.0080
Lactic	11.35	1.1542	0.0007	0.6928
Acetic	15.74	0.0281	0.0000	0.0098
Succinic	17.46	5.2464	0.0016	1.5660

- 당 분석

유기산 분석 시료와 동일하게 시료를 준비하고 CarboPac-PA1(Dionex, 미국) 컬럼과 pulsed-amperometric-detector(PAD)를 장착한 HPAEC 시스템을 이용하여 분석하였음.

표준물질로는 glucose, fructose, sucrose를 이용하였음. (그림 1-36; 표1-10)
Fermivin의 당분해능이 NK28보다 더 빠른 것으로 나타났음.



<그림1-36> Fermivin 혹은 NK28로 발효된 포도주의 당 조성 및 함량

<표1-10 Fermivin 혹은 NK28로 발효된 포도주의 당 조성 및 함량>

	표준물질		포도파쇄액	
	Time (min)		Time (min)	ppm
Glucose	5.53	5	5.53	445148.799
Fructose	6.27	5	6.18	468778.307
Sucrose	12.28	5	-	-

	Fermivin (ppm)		**NK28 (ppm)**	
	Glucose	**Fructose**	**Glucose**	**Fructose**
24 hrs	50416.881	69662.914	76966.214	92210.652
48 hrs	17115.977	46460.226	21095.328	51345.889
72 hrs	4735.931	25730.086	4694.028	29128.138
96 hrs	515.393	714.443	604.694	909.488
120 hrs	370.082	7331.348	672.523	6107.146

- 관능검사

총 63명의 학생들을 대상으로 NK28로 발효된 포도주와 Fermivin으로 발효된 포도주에 대한 색, 향기, 단맛, 쓴맛, 목넘김, 후미 등 6가지 항목에 대한 기호도 관능검사를 실시했고, 평가 시 각 항목에 대해 1-5 중 선택하여 1은 최저점, 5는 최고점으로 숫자로 표시하여 평가하도록 하였음.

검사결과 NK28의 종합적 기호도는 2.904 Fermivin의 종합적 기호도는 1.778로 유의성 있는 평가로 나타났음 (표1-11). 특히 NK28로 제조된 포도주는 향기, 목넘김, 후미 등에서 Fermivin 포도주 보다 우수한 것으로 분석되었고 이는 위에서 분석한 유기산, 휘발성분, 알코올 조성 등의 차이에 따른 것으로 사료됨.

<표1-11> Fermivin 혹은 NK28로 발효된 포도주의 관능검사

				NK28								Fermivin							
나이	성별	음주습관	포도주 선호도	색	향기	단맛	신맛	쓴맛	목넘김	후미	종합적 기호도	색	향기	단맛	신맛	쓴맛	목넘김	후미	종합적 기호도
19.7	여	주1회	중	2	4	3	3	4	3	3	2	4	1	1	4	3	4	2	1
21.5	남	주1회	중	3	2	2	2	2	2	3	3	1	1	1	3	3	2	1	2
22.6	여	월2회	중	3	3	2	2	2	3	3	3	3	1	1	1	4	3	1	1
19.3	여	주1회	중	4	5	2	4	3	4	4	3	3	1	1	3	5	4	1	1
25.1	남	주1회	중	4	4	2	4	2	2	2	3	4	1	1	3	4	2	2	2
25	남	월1회	상	4	3	3	2	2	3	2	2	3	2	1	4	4	4	3	3
23.6	남	주2회	중	3	4	2	5	2	3	2	4	3	1	2	4	3	2	2	2
22.1	남	월1회	중	4	4	2	4	4	4	4	4	5	3	3	4	5	3	3	3
21.1	남	주2회	중	3	3	1	4	2	3	3	3	3	1	1	5	5	1	1	1
20.2	여	월4회	중	2	4	1	4	3	3	2	3	3	1	1	5	2	2	1	1
22.1	남	주1회	중	4	3	4	3	3	4	4	4	3	2	2	4	4	3	2	3
21.7	남	주1회	하	3	4	1	4	4	4	4	4	4	2	1	3	3	5	3	3
23.1	남	주1회	중	5	1	1	4	4	4	4	2	5	1	1	4	5	4	4	2
22.2	여	주3회	상	3	4	2	2	4	3	4	4	5	1	2	5	4	3	2	3
19.8	여	월1회	상	4	5	2	3	4	5	3	3	3	1	1	4	4	4	2	1
20.5	여	주1회	상	5	5	2	4	5	5	3	2	3	3	4	3	4	5	4	4
21.7	남	주1회	상	5	5	1	3	5	3	3	3	4	1	1	5	4	2	2	1
21.7	남	주2회	하	3	3	1	2	3	4	4	3	4	3	2	1	4	3	4	3
24.2	남	월3회	중	3	4	1	3	3	4	4	4	3	2	1	4	4	3	2	2
22.6	남	주1회	중	3	4	3	2	5	3	3	3	3	2	1	5	5	2	2	1
21.3	여	주1회	중	5	5	1	4	5	5	3	4	2	1	1	5	4	5	2	1
19.6	여	주1회	하	3	3	1	4	3	2	2	2	3	1	1	4	5	2	2	1
21.4	남	주1회	중	4	4	3	5	2	2	2	3	3	3	3	2	5	2	2	2
19.7	여	연10회	하	4	2	1	2	4	2	3	1	3	2	1	1	5	1	2	1
21.0	여	주1회	중	4	4	4	2	1	5	4	4	3	1	1	3	5	2	2	2
22.9	남	월1회	상	4	3	1	4	2	3	2	2	2	2	2	5	1	4	3	2
20.9	여	월2회	중	3	2	1	5	2	3	1	1	3	1	1	4	3	3	2	1
21.0	남	주1회	중	4	3	1	4	3	4	3	3	2	1	1	5	3	2	2	1
19.1	여	주1회	중	2	2	1	4	4	3	3	2	5	2	1	2	3	3	2	3
20.0	여	주1회	중	4	3	2	3	5	3	1	2	3	3	2	4	4	3	2	3
20.0	여	월1회	중	3	4	1	3	4	2	2	3	3	5	2	4	4	2	1	2
20.0	여	주2회	상	3	4	2	4	2	5	4	4	3	2	1	5	4	2	3	2
19.3	여	주1회	하	5	5	3	5	2	5	3	4	3	1	1	4	4	3	4	2
19.7	여	주1회	중	5	4	2	3	5	3	3	4	5	1	1	4	5	2	2	2
19.7	여	주1회	중	3	3	2	4	5	3	4	3	5	2	1	5	4	3	3	2
19.4	여	주2회	중	4	3	1	4	1	3	2	3	3	1	1	3	2	4	2	2
19.4	여	주3회	중	4	4	1	1	4	2	1	4	2	2	1	4	4	4	1	2
19.1	여	주1회	중	3	4	1	4	3	4	3	2	2	1	1	3	2	3	1	1
19.7	여	주1회	중	4	3	1	4	4	3	3	4	2	1	1	4	2	2	2	1
19.3	여	주1회	하	4	3	2	4	3	4	3	3	3	1	1	5	3	2	2	2
24.7	여	월2회	하	3	2	3	4	2	2	1	2	2	1	1	5	3	2	1	2

23.6	여	주1회	중	4	3	1	4	3	2	2	2	4	1	1	4	2	2	1	2
21.1	여	월2회	중	3	4	4	3	1	4	4	4	4	3	3	3	2	2	1	1
22.1	여	주1회	중	3	3	1	4	2	3	3	3	3	2	2	4	2	2	3	2
24.7	남	주2회	중	3	3	1	5	2	3	3	3	3	1	1	5	3	2	3	2
24.4	여	월1회	중	3	4	2	4	4	3	2	3	3	1	2	2	2	2	2	1
26.0	여	월2회	중	5	3	1	3	5	4	1	2	5	5	1	5	4	4	2	3
21.4	여	주1회	중	4	3	1	2	3	2	3	3	3	1	2	4	1	3	4	2
24.0	남	주2회	하	2	2	1	2	4	4	3	2	2	1	1	4	5	2	2	1
23.8	남	주1회	중	3	4	1	4	2	3	2	3	3	1	1	4	4	2	3	2
23.2	남	주1회	중	3	2	3	4	2	4	4	3	3	1	1	4	3	3	3	2
25.4	남	주1회	중	3	4	2	4	4	3	2	4	3	1	1	5	5	3	2	1
26.0	남	주1회	중	3	4	1	2	5	3	2	4	3	2	1	4	4	2	2	2
22.7	여	월2회	중	3	4	2	4	4	3	3	4	4	2	1	4	5	2	2	2
22.9	여	월2회	하	4	4	4	4	3	3	3	2	4	2	5	5	2	4	4	3
22.5	여	월2회	중	3	4	1	5	5	1	3	2	3	2	1	5	5	1	2	1
22.7	여	월2회	중	3	2	1	2	3	2	2	2	3	1	1	1	4	1	1	1
24.8	남	월2회	중	3	3	1	4	3	2	2	2	4	2	1	5	3	2	1	2
21.7	여	주1회	중	4	3	2	3	3	4	3	3	2	1	1	4	1	3	2	1
23.8	남	주3회	중	2	4	2	1	3	2	3	2	2	2	1	1	1	3	2	1
21.9	여	주2회	하	3	3	1	3	4	4	2	2	2	1	1	4	3	3	2	1
21.8	여	주1회	상	3	4	2	2	1	1	2	2	3	1	2	1	1	1	1	1
21.4	여	주1회	중	3	4	3	4	3	4	3	4	3	2	2	5	2	3	1	1
평균				3.460317	3.460317	1.761905	3.396825	3.190476	3.190476	2.761905	2.9047619	3.174603	1.619048	1.396825	3.777778	3.460317	2.68254	2.111111	1.7777778
										표준편차	0.8559900						표준편차	0.7713508
									T-test	*p* value	1.1592E-11								

(5) 포도주 발효 중 잡균의 생장제어를 위한 천연물질 개발

- 포도주 제주시 사용되는 메타중아황산칼륨은 식품가공과정에서 일반색소와 발색성 물질을 무색의 화합물로 변화시키고 식품의 보존 중 일어나는 갈변, 착색 등의 변화를 억제하기 위하여 사용되는 첨가물로 방부제, 항산화제, 환원표백제 등으로 주로 사용됨.

- Phyollen-G (에스엔틱사, 한국)의 원료는 청정지역에서 채취한 식용 도토리 화분에 특허 유산균주로 발효하여 생산된 천연물 제품임.
  100% 천연소재를 사용한 항균성 물질로서 물성(용해성 등)이 뛰어나며, 관능적 요인 (쓴맛, 신맛, 색상)이 우수하고, 식중독균에 대한 살균력이 우수하며 (MIC 100ppm이하), 열안정성(120℃,1hrs)이 뛰어나 가열공정이 있는 제품에서도 효능을 그대로 유지하며 pH에 따른 스펙트럼 (pH4~11)이 넓어, 생물제어를 위한 다양한 pH 조건의 제품군에도 적용이 가능하며 또한 육가공품의 선도유지와 유통기한 연장에 효과적임.
  파우치 제품등 가열 포장제품의 미생물 저해 능력이 있으며 유통기한이 짧은 fast food 등 즉석가공식품 품질보존에 도움이 되며 농산품 등 신선제품에 대한 세척제 기능, 작업장 등의 미생물 제어에 도움이 됨.

- 본 실험에서는 Phyollen-G를 이용하여 다양한 미생물에 대한 항균능력을 MIC 측정법을 통해 확인하였음 (표 1-). *B. subtilis* 및 *S. aureus* 등 그람음성균은 낮은 농도에서도 생

육억제가 가능하였으나 주요 토양균인 방선균에는 80-160 ppm 등 비교적 많은 양을 첨가했을 때 항균작용을 보였는데, 이 농도에서는 NK28과 같은 *S.cerevisiae*의 생육도 저해하기 때문에 포도파쇄액 내의 잡균억제에 효율적이지 않은 것으로 판단되었음 (표1-12).

<표1-12> Phyollen-G의 항균효과

Microorganisms	MIC (ppm)
Streptomyces lividans TK21	80
Streptomyces coelicolor M145	160
NK28	80
Pichia anomala	160
Candida spp.	160
Vibrio parahaemolyticus	80
Vibiro vulnificus	80
Pseudomonas aerrginosa	80
Bacillus subtilis	20
Staphylococcus aureus	20
Saccharomyces cerevisiae	80

- 오미자는 목련과(*Schzandraceae*)에 속한 낙엽활엽만목인 오미자 또는 개오미자의 과실을 건조한 것으로 다섯 가지의 맛을 가지고 있다고 알려져 있음. 즉 껍질과 과육의 맛은 시고 단맛, 과실의 인은 맵고 쓴맛, 전체적으로는 신맛이 있음.

- 옛날부터 우리나라 한의학에서 거담, 자양 및 강장제 등으로 이용되는 생약제로 약리기능이 다양하여 진정, 진해, 해열 등의 중추억제작용, 혈압강하작용 및 알코올 해독작용 등이 있음.

- 현재까지 알려진 오미자의 성분에 관한 연구로는 주로 약리기능을 나타내는 주요 성분으로 알려진 lignan화합물로 gomisin A, B, C, F, G와 deoxyschizandrin, schizandrin, wuweizisu A, B, C, angeloylgomisin H, Q, tigloylgomisin H, benzoylgimisin H 등이 알려져 있고, 유기산으로 citric acid, malic acid, succinic acid가 보고되었으며, 47종류의 휘발성 정유 성분이 확인된 바 있음.

- 최근 오미자를 이용한 과실주가 개발된 바 있어 포도주에도 항균물질로 첨가할 수 있는지 시험하고자 오미자 추출물이 미생물 생장저해능이 있는지 농도별로 분석하였음.

- 오미자 추출물의 경우 그람음성균의 생장은 낮은 농도에서 억제하였으나, 그람양성균은 조금 더 높은 농도에서 가능하였고 효모들의 경우는 5% 이상의 높은 농도에서 억제하는 것을 알 수 있었다. 따라서 오미자 추출물을 사용할 경우 효모의 생장에 영향을 미치지 않고 잡균제어가 가능할 것으로 사료되었으나 이러한 결과는 항균력을 갖은 성분 때문이라기 보다는 산도가 낮아짐으로 인한 효과라고 사료됨 (표1-13).

<표 1-13> 오미자 추출물의 항균효과

Microorganisms	MIC (%)
Bacillus subtilis	3
Staphylococcus aureus	4
Escherichia coli	3
Pseudomonas aeruginosa	2
Vibrio parahaemolyticus	2
Vibrio vulnificus	2
Candida SPP.	>5 (5%이상)
NK28	>5 (5%이상)
Pichia anomala	>5 (5%이상)
Saccharomyces cerevisiae	>5 (5%이상)

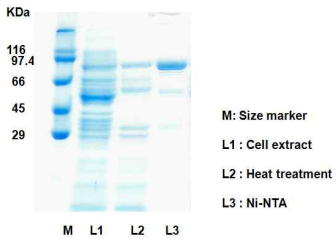
- 따라서 오미자 추출물을 첨가할 경우 포도주 풍미에 미치는 영향에 대해 향후 추가적으로 연구할 필요가 있다는 것으로 결론지었음.

2. 제2세부과제: 당화 및 탈분지효소를 이용한 새로운 과실주 발효공정 개발

1) 1차년도

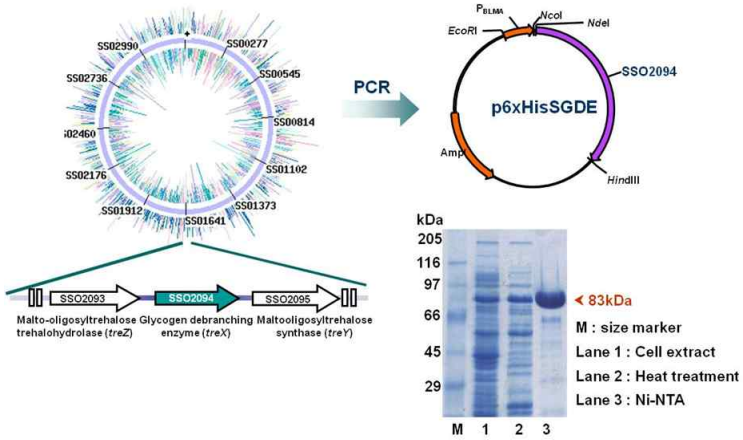
국내산 포도는 일반적으로 당도가 낮고 (15 brix 이하) 포도송이가 커서 포도주 제조에 부적합하다. 낮은 당도를 보완하기 위해 본 세부과제에서는 포도 출하시기에 잉여 공급이 주로 발생하는 쌀을 당화 원료로 이용하여 국내 포도의 낮은 당도를 보완하고, 포도주 양조 시 잡균제거 및 항산화제로 사용되는 메타중아황산염 대신 기능성 천연항산화물을 탐색하여 메타중아황산염 ($K_2S_2O_5$)의 호흡기 관련 부작용을 줄이고 포도주의 기능성을 높이고자 하였다.

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1) 효소정제	전분의 당화를 위해 탈분지효소 (TreX)와 말토제닉 아밀레이즈 (SMMA)를 클로닝하여 대량 발현 및 Ni-NTA affinity chromatography를 이용한 효소의 정제	*Staphylothermus marinus*에서 유래한 초내열성 말토제닉 아밀레이즈 (SMMA) 유전자를 클로닝하여 얻은 pTkNd 6×His 재조합 DNA를 이용하여 *E.coli*에서 대량 발현하였다. 70℃에서 20분간 열처리하고, Ni-NTA affinity chromatography로 고순도의 SMMA를 획득하였다. 정제된 SMMA는 염기서열에서 예상한 바와 동일하게 82kDa의 크기를 지니고 있었으며, 최적온도가 100℃이상이었다. 위와 유사한 방법으로 *S. solfataricus* P2에서 유래한



<그림2-1> SMMA의 발현및 정제과정

treX 유전자를 클로닝하여 p6XHis119 vector를 사용하여 대장균에서 대량 발현하였다.

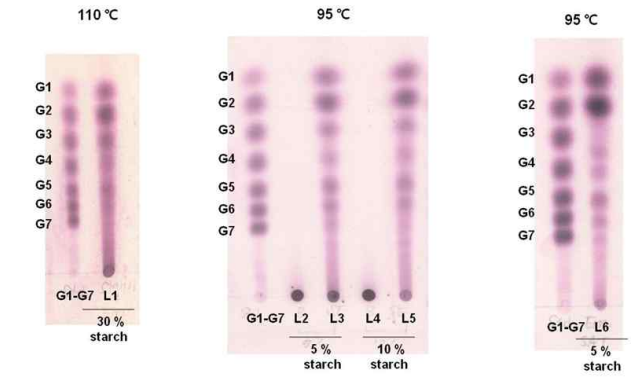


<그림2-2> TreX (디브랜칭효소)의 클로닝 및 발현

발현된 효소는 열처리와 Ni-NTA affinity chromatography를 이용하여 정제되었다.

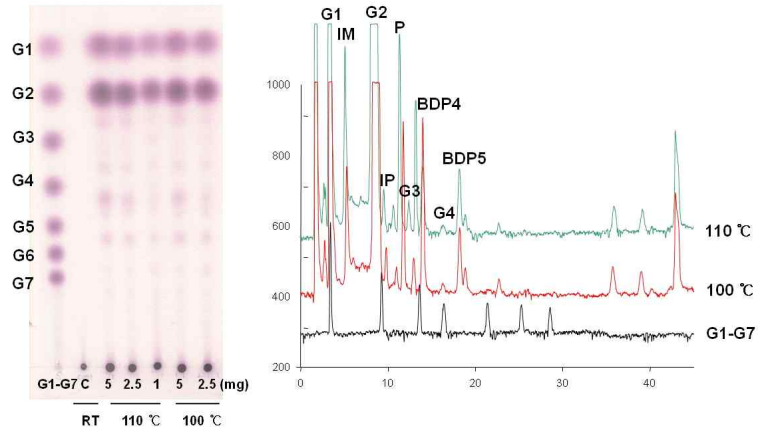
2) 전분의 액화/당화

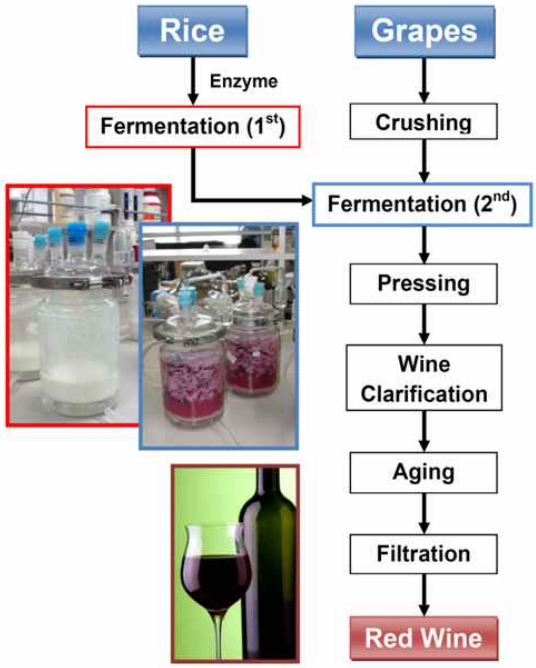
전분이 고온에서 액화되는 동안 TreX (탈분지효소)와 SMMA를 처리하여 기질 전분의 분해를 분석하였다. 최적의 조건을 알아보기 위하여 효소반응은 다양한 기질 농도와 온도에서 수행되었다.



L1: 30 % potato starch + Smar amylase (4.5 U) + α-amylase (4.5 U) + TreX (1.5 U)
L2: 5 % potato starch
L3: 5 % potato starch + Smar amylase (0.75 U) + α-amylase (0.75U) + TreX (0.25 U)
L4: 10% potato starch
L5: 10% potato starch + Smar amylase (1.5 U) + α-amylase (1.5 U) + TreX (0.5 U)
L6: 5 % potato starch + Smar amylase (1.5 U) + α-amylase (1.5U) + TreX (0.5 U)

<그림2-3> 온도와 기질의 변화에 따른 효소반응 결과

3) 말토오스 생산		다양한 기질에 대하여 SMMA의 역가를 살펴본 결과, 이 효소는 최종 산물로 말토오스와 글루코오스를 생산함을 확인하였다. SMMA는 높은 내열성을 지니고 있으므로 고온을 필요로 하는 전분의 액화/당화 공정에서 직접적으로 이용될 수 있다.  <그림2-4> 기질 전분의 고온처리 공정에서의 SMMA 반응결과 그림에서 보여지는 것과 같이 SMMA는 고온에서 기질 전분과 작용하여 말토오스를 생산하였으며, HPAEC 분석결과 panose, isopanose, BDP4 그리고 BDP5와 같은 분지올리고당도 생산하고 있음을 알 수 있다.
4) 포도주 제조	국내산 포도를 이용한 포도주 제조	국내산 포도는 일반적으로 당도가 낮고 (15 brix 이하) 포도송이가 커서 포도주 제조에 부적합하다. 낮은 당도를 보완하기 위해 본 세부과제에서는 포도 출하시기에 잉여 공급이 주로 발생하는 쌀을 당화 원료로 이용하여 국내산 포도의 낮은 당도를 보완하고자 한다. 또한, 포도주 양조시 잡균제거 및 항산화제로 사용되는 메타중아황산염 대신 기능성 천연항산화물을 탐색하여 메타중아황산염 ($K_2S_2O_5$) 의 부작용을 줄이고 포도주의 기능성을 높이고자 하였다.
	다양한 당류를 이용한 포도주제조	효소를 이용하여 쌀 전분을 분해하여 포도주를 제조하기에 앞서, 다양한 당류들이 양조효모에 미치는 영향을 알아보기 위하여 설탕, 엿당(maltose), 포도당, 포도당/과당 혼합물을 첨가하여 포도주를 제조해 보았다. 1kg 의 대부도산 포도를 파쇄한 후 100 g 의 당 (포도당/과당 혼합물의 경우 각각 50 g 씩)과 0.2 g 의 메타중아황산염을 첨가하였다.

	대체 천연항산화제의 탐색	 <그림 2-5> 2단 발효를 이용한 포도주 제조과정 2시간 동안 상온에 보관한 후, 0.2 g 의 양조효모를 넣어 25℃에서 발효를 수행하였다. 발효 5일 경과 후, 발효조에서 생성되는 기포가 분당 5-10 회가 되는 시점에서 발효를 중지하고 각각의 포도주에서 HPLC (Rezex ROA-Organic Acid, phenomenex 컬럼)을 이용하여 알코올 농도를 측정하였다. 알코올 분석을 위하여 을 사용하였고 10%, 15% 그리고 20%의 에탄올을 기준으로 standard curve를 작성하였다. 설탕, 엿당, 포도당 그리고 포도당/과당 혼합물을 첨가한 포도주에서 각각 15.4%, 7.9%, 14.7%, 그리고 15.0%의 에탄올이 검출되었다. 이는 일반 포도주에 비하여 같거나 낮은 함량이며, 특히 엿당(maltose) 첨가군의 경우에는 알코올 함량이 매우 낮았으며, 발효 후에도 포도주에서 엿당이 많이 검출되었다. 이는 양조효모가 잘 이용하지 못하여 남아있게 된 것으로, maltose를 이용하는 효모의 선발이 필요하며 맥주용 효모를 사용하는 방법이 가능할 것으로 생각된다. 칡에는 천연항산화물인 이소플라본들을 많이 함유 하고 있으며 그중에서도 퓨라린의 함량이 높다. 이들 이소플라본은 항산화효능뿐만 아니라 에스트로겐과 그 구조가 유사하여 골다공증 및 유방암에도 그 효과가 있음이 보고된바 있다. 따라서 본 과제에서는 메타중아황산염과

		이의 대체제로서 멸균된 칡가루를 이용하여 실험해 보았다. 이전 당류 실험에서 얻은 결과를 토대로 쌀전분 200 g 에 300 ml 의 증류수를 넣은 후 당화효소인 글루코아밀레이즈(sumizyme; 600U)를 첨가하였다. 또한 생성된 당이 포도착즙액과 유사한 상태가 되도록 하기 위해 글루코오스 아이소머레이즈 (6800U)를 첨가하여 전분이 포도당과 과당으로 존재하게 하였다. 메타중아황산염의 대체제인 칡가루는 autoclave를 이용하여 섭씨 121도에서 30분간 살균하였고, 다시 30분간 섭씨 90도에서 건조하였다. 실험구와 대조구를 위하여 동일한 조건의 1단 담금을 2개 제조하였다. 48시간 1단 담금이 진행 되는 동안 메타중아황산염 0.2 g 또는 칡가루 20 g 을 각각 1 kg의 포도파쇄액에 넣고 2시간 동안 상온에서 방치하였다. 그 후 포도파쇄액을 1단 담금액에 넣고 섭씨 25에서 다시 발효하였다. 약 2~3일 후, 실험구와 대조구의 이산화탄소 가스 분출이 현저히 줄어들었을 때 (3-5회/분) 발효를 중지하였다. 포도주가 발효되는 동안 잡균의 서식 여부를 살펴보고자 실험구와 대조구의 포도주 용액을 다양한 농도 (10^{-1}~10^{-5}) 로 희석하여 각각 YPD 평판 배지에 접종하였다. 모든 배지에서 효모 특유의 집락(colony)만 관찰되었으며 다른 집락은 보이지 않았다. 쌀포도주의 색에 있어서도 칡가루 처리구와 아황산염 처리구 모두 동일하게 진한 붉은색을 띄었다.
	저온 숙성 및 주석산 제거	국내산 포도로 포도주를 만드는 경우에 문제가 되고 있는 신맛을 제거하기 위해 발효된 포도주를 4℃에서 1주일간 보관하였다. 침전된 주석산을 규조토를 이용하여 여과하였다. 주석산이 제거된 와인은 신맛이 현저히 줄어들었음을 확인하였다. 여과공정이 끝난 포도주는 풍미 증진을 위해 bottling하여 와인냉장고 (12℃)에서 숙성하고 있다.

1) 다양한 당류를 이용한 포도주 제조

효소를 이용하여 쌀 전분을 분해하여 포도주를 제조하기에 앞서, 다양한 당류들이 양조 효모에 미치는 영향을 알아보기 위하여 설탕, 엿당(maltose), 포도당, 포도당/과당 혼합물을 첨가하여 포도주를 제조하였다.

제조 방법은 다음과 같다. 1kg 의 대부도산 포도를 파쇄한 후 100 g 의 당 (포도당/과당 혼합물의 경우 각각 50 g 씩)과 0.2 g 의 메타중아황산염을 첨가하였다. 2시간 동안 상온에 보관한 후, 0.2 g 의 양조효모를 넣어 25℃에서 발효를 수행하였다. 발효 5일 경과 후, 발효조에서 생성되는 기포가 분당 5~10 회가 되는 시점에서 발효를 중지하고 각각의 포도주에서 HPLC를 이용하여 알코올 농도를 측정하였다.

알코올 분석을 위하여 'Rezex ROA-Organic Acid, phenomenex 컬럼을 사용하였고 10%, 15% 그리고 20%의 에탄올을 기준으로 standard curve를 작성하였다. 설탕, 엿당, 포도당 그리고 포도당/과당 혼합물을 첨가한 포도주에서 각각 15.4%, 7.9%, 14.7%, 그리고 15.0 %의 에탄올이 검출되었다 (그림 2-6). 이는 일반 포도주에 비하여 같거나 낮은 함량이며, 특히 엿당 (maltose) 첨가군의 경우에는 알코올 함량이 매우 낮았으며, 발효 후에도 포도주에서 엿당이 많이 검출되었다. 이는 양조효모가 잘 이용하지 못하여 남아있게 된 것으로 생각된다.

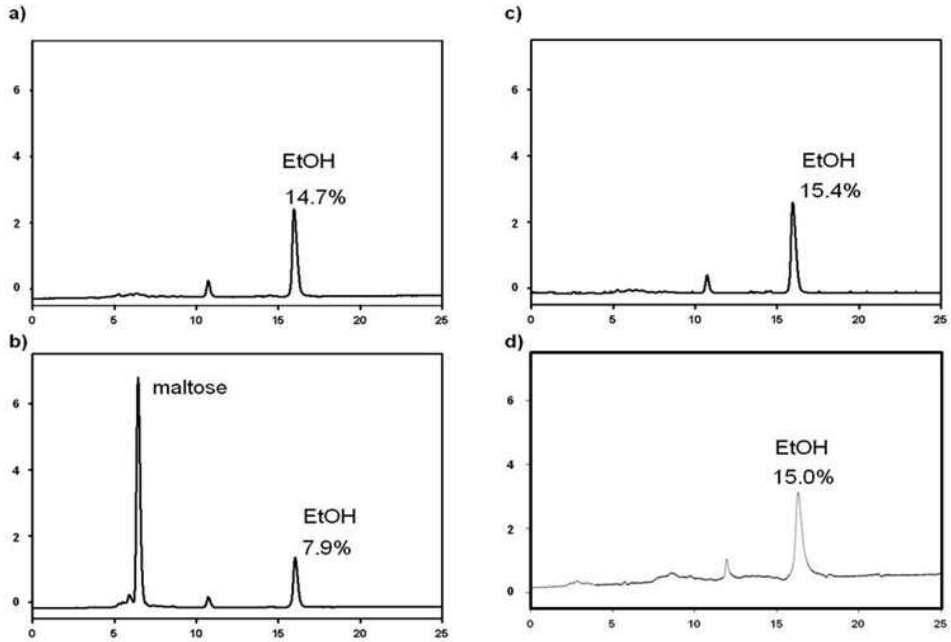


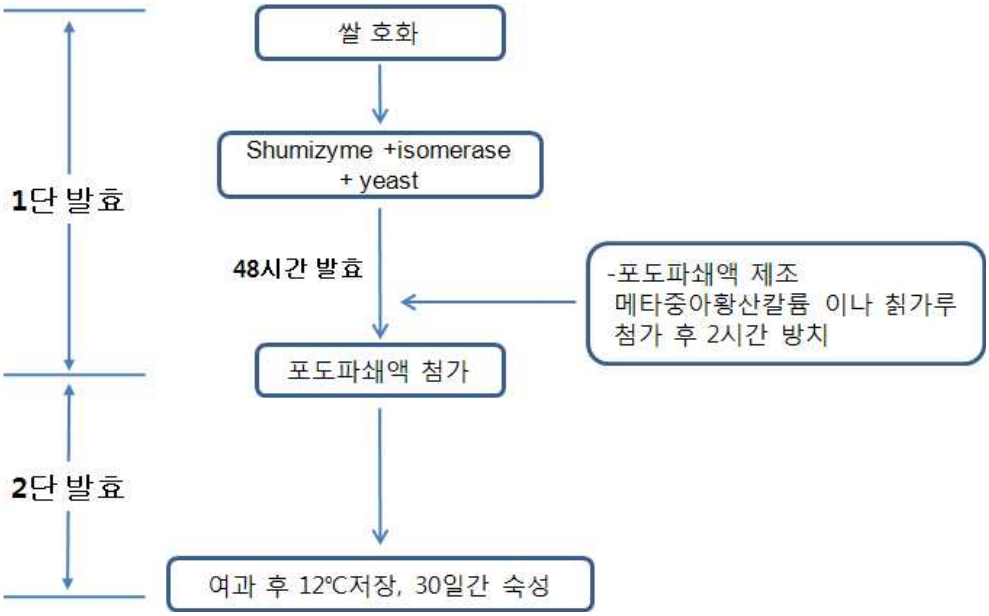
그림 2-6. 첨가 당원에 따른 포도주의 생성된 알코올 농도 측정. a) 포도당 첨가, b) 엿당 첨가, c) 설탕 첨가 d) 포도당과 과당의 1:1 (w:w) 혼합첨가.

이 실험을 통하여 쌀 전분 분해시 최종산물로 엿당은 적합하지 않음을 알 수 있었고, 최종 생산물로 설탕 혹은 포도에 많이 포함되어 있는 포도당과 과당의 혼합물이 바람직하리라 예상된다. 따라서 1단 발효시 쌀전분 당화 효소로 말토제닉 아밀레이즈나 베타 아밀레이즈 대신 글루코아밀레이즈와 글루코오스 아이소머레이즈를 선택하였다.

2) 대체 천연항산화제의 탐색

칡에는 천연항산화물인 이소플라본들을 많이 함유 하고 있으며 그중에서도 퓨라린의 함량이 높다. 이들 이소플라본은 항산화효능뿐만 아니라 에스트로겐과 그 구조가 유사하여 골다공증 및 유방암에도 그 효과가 있음이 보고된바 있다. 따라서 본 과제에서는 메타중

아황산 염과 이의 대체제로서 멸균된 칡가루를 이용하여 실험해 보았다.
이전 당류 실험에서 얻은 결과를 토대로 그림 2-7과 같이 쌀전분 200 g 에 300 ml 의 증류수를 넣은 후 당화효소인 글루코아밀레이즈(shumizyme; 600U)를 첨가하였다. 또한 생성된 당이 포도착즙액과 유사한 상태가 되도록 하기 위해 글루코오스 아이소머레이즈(6800U)를 첨가하여 전분이 포도당과 과당으로 존재하게 하였다. 메타중아황산염의 대체제인 칡가루는 autoclave를 이용하여 섭씨 121도에서 30분간 살균하였고, 다시 30분간 섭씨 90도에서 건조하였다. 실험구와 대조구를 위하여 동일한 조건의 1단 담금을 2개 제조하였다. 48시간 1단 담금이 진행 되는 동안 메타중아황산염 0.2 g 또는 칡가루 20 g 을 각각 1 kg의 포도파쇄액에 넣고 2시간 동안 상온에서 방치하였다. 그 후 포도파쇄액을 1단 담금액에 넣고 25℃에서 다시 발효하였다. 약 2~3일 후, 실험구와 대조구의 이산화탄소 가스 분출이 현저히 줄었으며 (10회/분) 이 때 발효를 중지하였다.



<그림 2-7> 2단 발효를 통한 쌀포도주의 제조

실험결과 1단 발효에서는 그림 2-8과 같이 두 발효용액 모두 10 % 가량의 에탄올이 생성되었으며 포도파쇄액 첨가 후 2단 발효가 종료된 시점에서는 메타중아황산염 처리구가 12.4% 그리고 칡가루 처리구가 14.8 %의 에탄올을 함유하고 있었다.

포도주가 발효되는 동안 잡균의 서식 여부를 살펴보고자 실험구와 대조구의 포도주 용액을 다양한 농도 (10^{-1}~10^{-5}) 로 희석하여 각각 YPD 평판 배지에 접종하였다. 모든 배지에서 효모 특유의 집락(colony)만 관찰되었으며 다른 집락은 보이지 않았다 (그림 2-9). 쌀포도주의 색에 있어서도 칡가루 처리구와 아황산염 처리구 모두 동일하게 진한 붉은색을 띄었으며 현재 저온 숙성을 하며 색 변화를 관찰하고 있다.

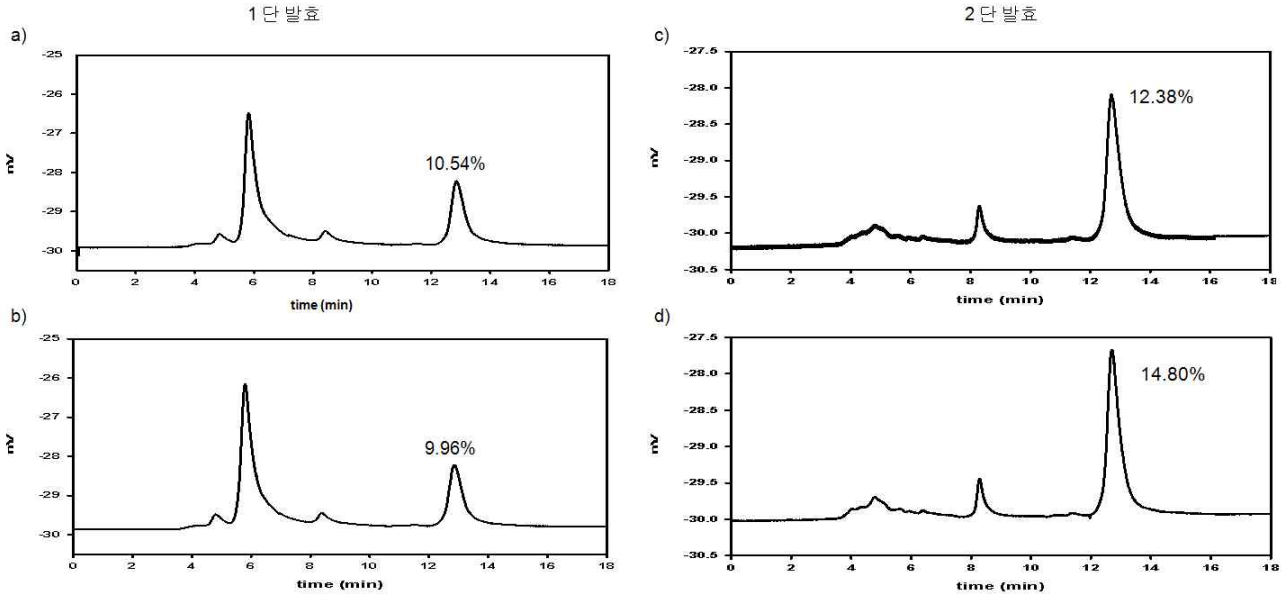


그림 2-8. 1단 발효 시료 (a, b) 및 2단 발효 후 메타중아황산염 처리 포도주(c)와 칡가루 처리 포도주 (d) 시료의 알코올 측정

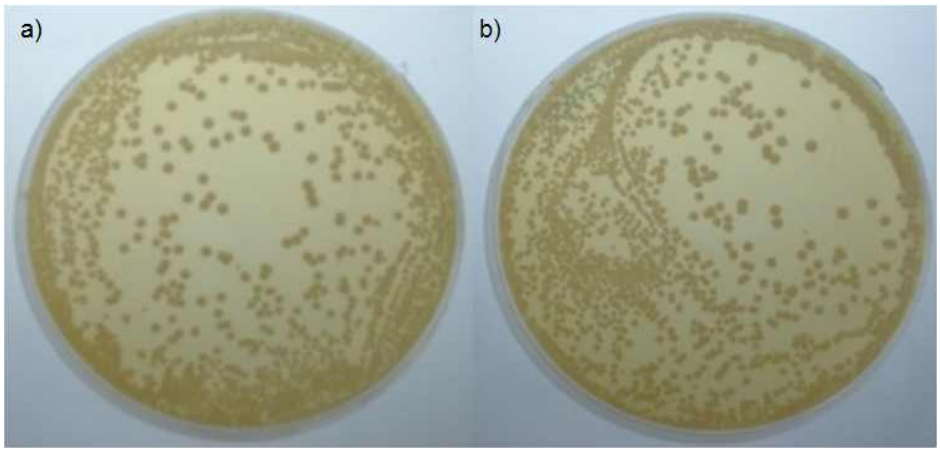


그림2-9. 쌀포도주 희석액 (10^{-3})을 이용한 균체배양. a) 메타중아황산염 처리군, b) 칡가루 처리군

2) 2차년도

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
당화(말토오스 생성) 및 에탄올 발효	● 말토제닉 아밀레이즈(SMMA) 또는 맥아베타아밀레이즈(BBA)를 이용하여 전분으로부터 말토오스가	-쌀전분에 Termamyl과 SMMA를 동시에 넣고 105℃에서 2시간 가압하(autoclave)에서 반응

	생성되게 한 후 맥주효모를 이용하여 저온-장시간 발효	시킨 후 맥주효모인 Pilsner Lager Yeast를 가하여 알코올 발효함. -쌀전분에 Termamyl을 넣고 105℃, 2시간 동안 전분을 액화시킨 후 BBA를 가하여 당화 반응시켜 말토오스가 생성되게 한 후 맥주 효모를 가하여 발효함.
분지올리고당 및 퓨라린 함유 기능성 과실주 제조	• 분지올리고당 함량이 풍부한 쌀포도주를 제조하기 위하여 원료쌀에 말토제닉 아밀레이즈(ThMA)를 가하여 분지올리고당이 생산	-쌀전분에 Termamyl을 가한 후 autoclave (121℃)에서 액화시킨 후 ThMA를 첨가하여 분지올리고 당이 생성되게 한 후 포도와 효모를 첨가하여 쌀포도주를 제조함.
	• 분지올리고당 및 퓨라린을 함유한 기능성 과실주 제조법	-쌀전분에 칡가루를 혼합한 후 Termamyl 및 ThMA를 가하여 당화, 당전이 작용 후 이용하여 퓨라린이 충분히 추출되게 함과 동시에 분지올리고당이 생성되게 한 후 포도를 첨가하여 발효하는 방법을 개발함.
	• 시판되고 있는 포도주의 분지올리고당 분석	-국내의 시장에 판매되고 있는 포도주에 함유된 분지올리고당 함량을 비교분석함.

1) 당화(말토오스 생성) 및 말토오스로부터 에탄올 발효: 초내열성 말토제닉 아밀레이즈 SMMA를 사용한 경우

전분으로부터 말토오스가 생성되도록 당화시킨 후 맥주효모를 이용하여 '저온-장시간 발효'를 시도하여 과실주의 저장성을 높이고 품질을 향상시키고자하였음.

(1) 발효원료와 액화/당화 효소

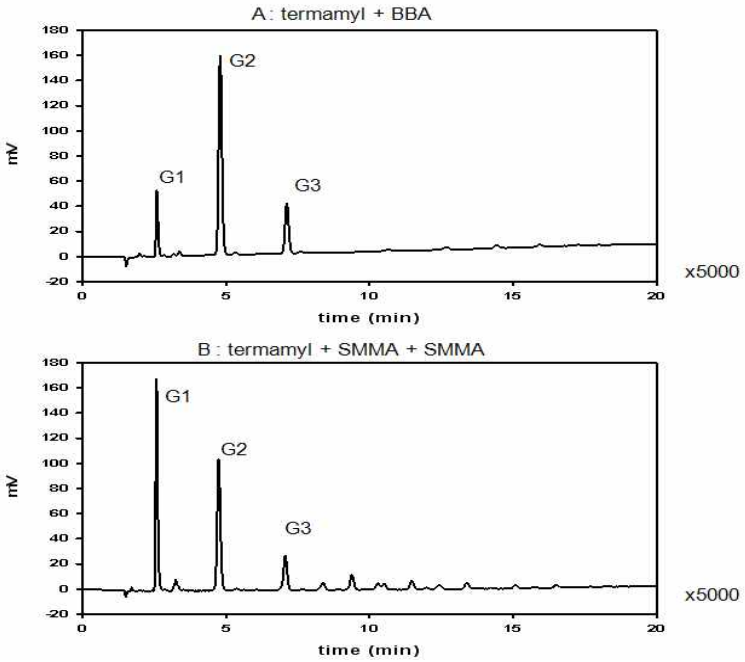
쌀은 협동과제에서 최종적으로 선별된 쌀을 30%도정하여 당화 및 발효 원료로 사용하였다. *Staphylothermus marinus*에서 유래한 초내열성 말토제닉 아밀레이즈 유전자를 클로닝하여 pTkNd6×His vector를 이용하여 *E.coli*에서 대량 발현하였다. 효소의 정제를 위해 우선 70℃에서 20분간 열처리를 수행하였으며, Ni-NTA affinity chromatography를 이용하여 고 순도의 SMMA를 획득하였다. 초내열성 α-amylase(Termamyl)은 노보자임 효소를 사용하였으며 맥아베타아밀레이즈는 GENENCOR의 효소(Optimalt BBA)를 사용하였다. 맥주 효모는 Pilsner Lager Yeast를 사용하였다.

(2) 초내열성 효소를 이용한 쌀 전분의 액화

A. 쌀 30 g에 초내열성 Termamyl을 가하고 105℃에서 2시간 동안 가압하(autoclave)에 반응 시켰다.
B. 쌀 30 g을 Termamyl과 초내열성 말토제닉 아밀레이즈(SMMA)를 동시에 처리하고 105℃에서 2시간 동안 가압하(autoclave)에 반응시켰다.

(3) 액화한 쌀 전분의 당화

Termamyl을 이용하여 액화시킨 쌀 전분용액에 베타 아밀레이즈(BBA)를 가하여 55℃에서 당화 반응시켰고, Termamyl과 SMMA를 이용하여 액화시킨 샘플에 SMMA를 한번 더 가하여 90℃에서 2시간 동안 당화 반응을 시킨 후 HPAEC를 이용하여 분석한 결과는 다음 그림 2-10과 같다. A 및 B처리구에서 말토오스가 생성되었음을 알 수 있다 (그림 2-10).

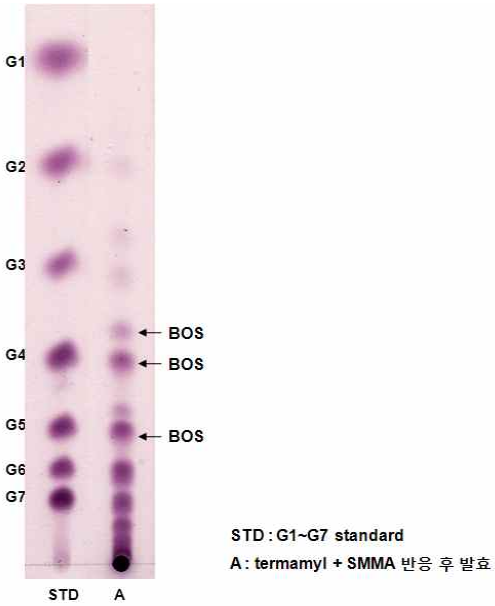


<그림 2-10>

(4) 말토오스 함유한 쌀 전분의 발효

당화한 샘플에 맥주 효모인 Pilsner Lager Yeast (2.5 ml)를 넣어 10℃에서 20일 동안 서서히 발효되도록 수행하였다. 발효는 발효조에서 생성되는 기포가 현저히 줄어드는 시점에서 중지시키고 알코올을 분석하였다.

각각의 샘플을 TLC를 이용하여 분석한 결과 BBA또는 SMMA를 넣은 후 맥주효모로 발효한 샘플에서는 효모에 의해 글루코스와 말토오스가 현저히 감소하였으나 분지올리고당 (BOS)은 발효되지 않고 남아있음을 알 수 있었다 (그림2-11).



<그림 2-11>

2) 분지올리고당 생성공정 및 분지올리고당 함유 과실주 제조 : 중온성 말토제닉 아밀레이즈, ThMA 및 글루코아밀레이즈 (sumizyme)을 동시에 사용한 경우

(1) 분지올리고당을 함유한 쌀포도주 제조

분말화한 쌀 100 g에 150 ml의 증류수를(쌀을 기준으로 150%적용하였다) 넣은 후, 초내열성 α-amylase (Termamyl)를 20 ml 첨가한 후 10분간 가열 하고 다시 121℃에서 autoclave하여 액화시켰다. 액화된 쌀 전분에 말토제닉 아밀레이즈 (ThMA)를 첨가하여 60℃에서 18시간 반응시켜 분지올리고당 (BOS)이 생성되게 하였다.

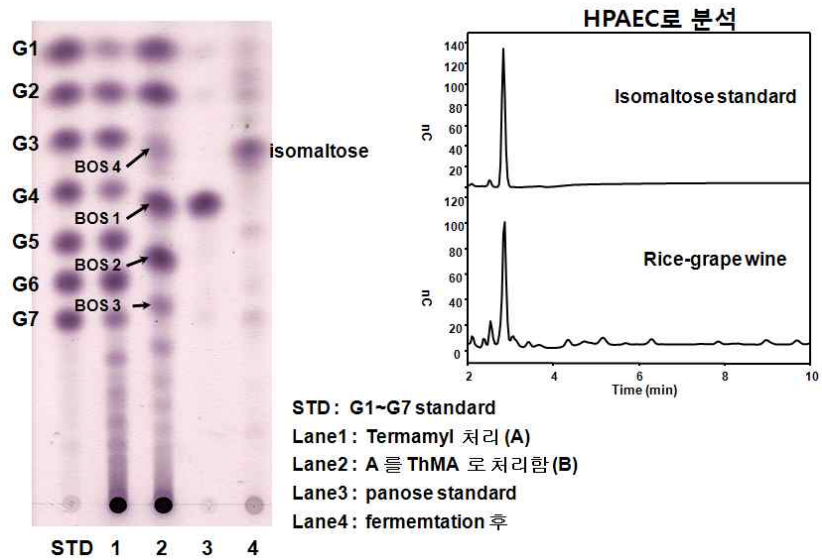
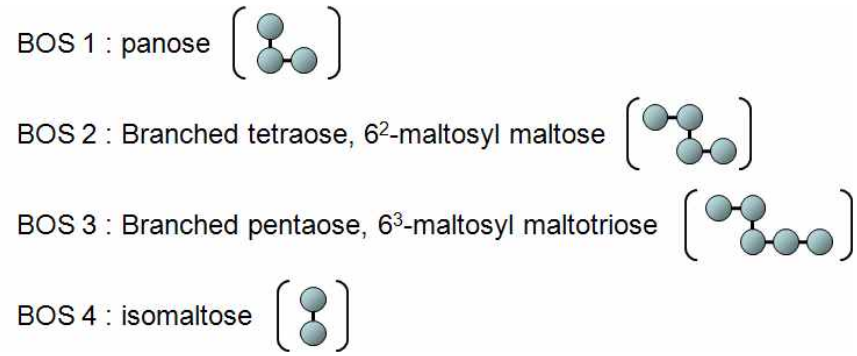


그림 2-12

효소 처리구에서 생성된 당 조성을 분석한 결과는 그림 2-12와 같았다. ThMA처리구(Lane2)에서 분지올리고당이 생성된 것을 알 수 있었으며, 구조는 아래와 같이 추정되었다(그림 2-13). 한편 포도첨가 후 효모발효에서는 BOS1,2 및 3가 분해되어 isomaltose (BOS4)가 다량으로 생성되었음을 알 수 있다.(그림 2-12, Lane 4)

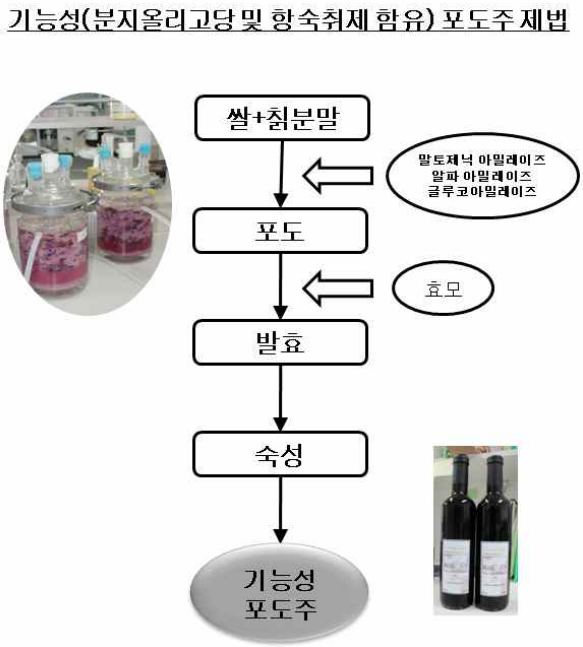


<그림 2-13> 포도주에서 검색된 분지올리고당의 구조

이상의 결과를 이용하여 칡가루(전분 15%함유)에 효소를 가하여 분지올리고당과 퓨라린이 동시에 함유된 포도주를 제조할 수 있다.

(2) 분지올리고당 및 퓨라린 함유 기능성 과실주(포도주) 제조

상기의 결과를 종합하여 분지올리고당 및 퓨라린이 함유된 기능성 포도주를 제조할 수 있는 방법은 그림 2-14에 제시하였다.



<그림 2-14>

3) 제품의 품질 및 성분 분석

(1) 포도주의 유기산 분석

제조한 포도과실주의 유기산 분석은 영동대학교 바이오지역혁신센터의 협조 하에 수행하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다 (그림 2-15, 16).

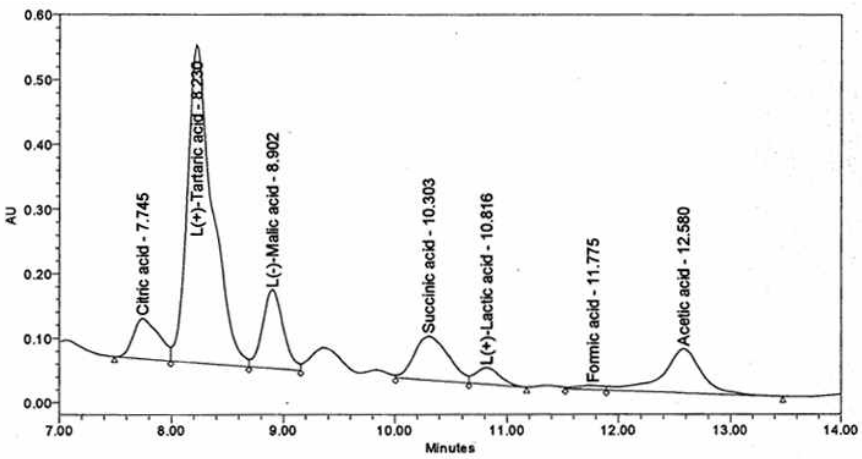
유기산 분석

***분석조건**

1. HPLC: waters 2695
   * 조건
   -유속 : 0.8ml/min
   -이동상 : 0.05% T.F.A
   -컬럼온도 : 35℃
   -injection : 20ul
   -분석시간 : 30분
2. Detector : 2996 Photodiode Array(PDA)
   PDA 조건 : 200~400nm
3. column
   Shodex(Japan) RSpak KC-811 8mmID*300mm

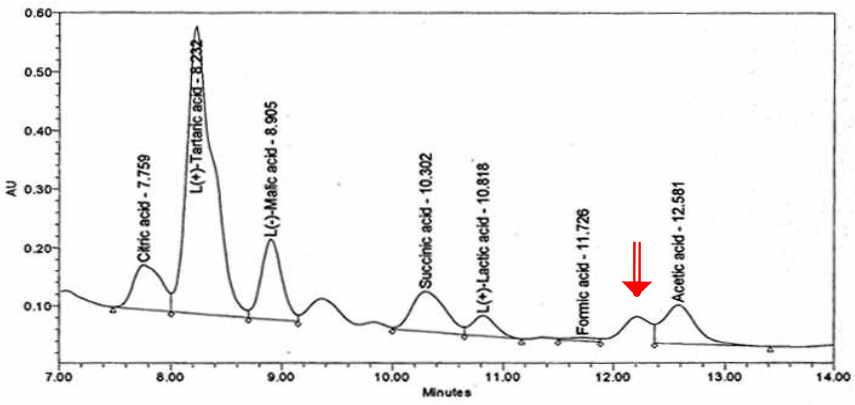
***표준물질**

1.Formic Acid (98%)-KANTO CHEMICAL
2.Acetic Acid (99.8%)-KANTO CHEMICAL
3.L(+)-Tartaric Acid (99%)-KANTO CHEMICAL
4.Citric Acid (99.5%)-SIGMA ALDRICH
5.Malonic Acid (99%)-SIGMA ALDRICH - 해당 컬럼으로 분석 불가
6.Succinic Acid (99%)-SIGMA ALDRICH
7.L(-)-Malic Acid-ALDRICH
8.L(+)-Lactic Acid(98%)-SIGMA



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units	Total Area
1	Citric acid	7.745	989768	7.18	62219	673.829	mg/L	13776715
2	L(+)-Tartaric acid	8.230	7653987	55.56	491616	3289.808	mg/L	13776715
3	L(-)-Malic acid	8.902	1563807	11.35	121487	652.261	mg/L	13776715
4	Succinic acid	10.303	1426668	10.36	67502	1822.381	mg/L	13776715
5	L(+)-Lactic acid	10.816	390822	2.84	26010	355.246	mg/L	13776715
6	Formic acid	11.775	102853	0.75	6193	85.234	mg/L	13776715
7	Acetic acid	12.580	1648811	11.97	68488	1604.394	mg/L	13776715

<그림 2-15> 포도주의 유기산분석 - 아황산($K_2S_2O_5$) 첨가구



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units	Total Area
1	Citric acid	7.759	1341560	9.21	76960	911.532	mg/L	14565729
2	L(+)-Tartaric acid	8.232	8073796	55.43	490035	3470.217	mg/L	14565729
3	L(-)-Malic acid	8.905	1759315	12.08	137993	733.682	mg/L	14565729
4	Succinic acid	10.302	1427697	9.80	67914	1823.691	mg/L	14565729
5	L(+)-Lactic acid	10.818	510647	3.51	34590	464.716	mg/L	14565729
6	Formic acid	11.726	102788	0.71	5581	85.183	mg/L	14565729
7	Acetic acid	12.581	1349927	9.27	66309	1316.983	mg/L	14565729

<그림 2-16> 포도주의 유기산분석 - Puerarin 첨가구

유기산 조성을 비교한 결과 아황산 첨가구와 칡가루(puerarin) 첨가구 사이에는 주요 유기산의 조성에 별 차이가 없었으나 칡가루(puerarin) 첨가구에서 화살표 표시된 동정되지 않은 산의 피크가 보였다.

(2) 포도주의 산도측정(주석산 함량분석)

포도주 총산 측정은 포도주 10ml를 비커에 넣고 0.1N-NaOH (시판하는 표준시약을 그대로 사용)로 pH 8.2까지 (pH meter를 사용) 중화 정적하였다.
발포성 포도주의 경우 샘플을 60℃의 물속에 몇 분간 두고, 가스를 제거한 후 냉각한 다음 적정하였다.

적정산도를 주석산으로 나타내면,

$$\text{주석산(g/100ml)} = \frac{(V)*(N)*(75)*(100)}{(1{,}000)*(v)}$$

V = 적정에 필요한 NaOH 용액의 양 (ml)
N = NaOH 용액의 규정도 (Factor값 주로 1.001)
v = 포도주의 양 (ml)
75는 주석산의 1g당 양

발효기간에 따른 포도주 및 쌀-포도주의 산도변화는 아래 표2-1 및 2-2와 같다

<표2-1> 포도주의 산도변화

Date	2010.10.12	$K_2S_2O_5$	300 g (200 ppm)
Sugar content	18 brix	TEMP.	18 °C
Quantity of grape	Camp -320 kg	Yeast	300 g
	MBA-1280 kg	$K_2S_2O_5$	300 g (200 ppm)

Date	TEMP.	pH	Brix	Acidity	Reducing sugar	alcohol	operation
10/12	18		18			0	15:00
10/13	18		18			0	No fermentation
10/14	18	3.69	18.6	0.615	1.501		
10/15	20	3.64	15.8	0.675	1.478	0.7	Circulation 5 times
10/16	25	3.60	10.6	0.690	1.833	4.8	4 times
10/17							3 times
10/18	26→25	3.76	6.5	0.60	0.866	9.6	5 times
10/19							10:00 almost finish
10/20	24	3.86	6.0	0.62	0.620	9.6	Removal of grape skin, seed
10/21	Tataric acid precipitation and removal, 40L aging tank (25+1/2)						

<표2-2> **쌀-포도주(2:5:5)의 산도변화**

Date	2010.10.12	$K_2S_2O_5$	200 g (200 ppm)
Sugar content	17.5 brix	TEMP.	18 °C
Quantity of grape	Camp -500 kg	Yeast	300 g
	MBA-500 kg	$K_2S_2O_5$	200 g (200 ppm)
Rice	200 kg	water	300 L

Date	TEMP.	pH	Brix	Acidity	Reducing sugar	alcohol	operation
10/12	18					0	
10/13	20	4.68	10.6	2.72	2.365	1.0	CO_2 bubble
10/14	24	3.39	11.5	5.32	2.144	8.6	
10/15	24	4.03	12.8	5.6	2.165	11.1	17:30 2nd fermentation
10/16	20	3.62	13.8	0.6	2.116	5.1	Circulation 4 times
10/17							3 times
10/18	30→28	3.84	6.0	0.64	2.137	11.6	5 times
10/19	26						10:00 almost finish
10/20	24	3.85	6.5	0.63	0.575	11.6	Removal of grape skin, seed
10/21	Tataric acid precipitation and removal, 40L aging tank (22+1/2)						

상기 표에서와 같이 포도주에서는 발효기간에 따라 초기산도와 별 변화가 없었으나 쌀-포도주의 경우에는 발효 4일 후 포도를 첨가했을 때 산도가 낮아지고 그 후 변화가 없었다.

(3) 포도주의 향기 성분 분석

각 처리 구에 따라 숙성 전 및 6개월 숙성 후 휘발성 향기 성분을 분석, 비교하였다.

- Solid phase microextraction(SPME)을 이용한 와인의 휘발성 향기성분 추출

와인의 휘발성 향기성분을 분석하기 위하여 SPME를 사용하여 추출하였다. SPME apparatus (Supelco Co., Bellefonte, PA, USA)는 SPME fiber와 SPME holder로 구성되어 있으며 50/30 ㎛ divinylbenzene/carboxen/ polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) 으로 coating된 fiber를 이용하였다. 와인 7 mL을 20 mL headspace vial에 넣고 teflon cap 으로 밀봉하였다. 50℃에서 30 min 간 방치하여 평형상태에 도달시켰다. 평형상태에 도달한 시료에 SPME fiber를 1 cm 노출시켜 30 min 간 향을 추출하였다. GC injection을 위해 200℃ injector port에서 fiber를 노출시켜 1 min 동안 탈착시켰다. GC-MS로 휘발성 향기 성분을 분리하고 동정하였다.

- Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

SPME를 이용하여 추출한 와인의 휘발성 향기성분 동정은 Agilent 6890N GC/Agilent 5973 network mass selective detector (MSD) (Agilent Co., Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. Column은 HP-1 (60 m length x 0.25 mm i.d. x 0.25 ㎛ film thickness : J & W Scientific, Folsom, CA, USA)을 사용하였고, oven 온도는 40℃에서 5 분간 유지한 후 200℃까지 5℃ /min의 속도로 승온시켜 20분간 유지하였다. Injector 온도는 200℃, detector 온도는 250℃였으며 carrier gas로는 helium을 사용하였고 유속은 1.0 mL/min 였다. Ionization voltage는 70 eV 그리고 분석할 분자량의 범위(m/z)는 33～350으로 하여 분석하였다 (표 2-3 및 그림 2-17).

<표 2-3> Volatile compounds of various wines

No	RI[1)]	Volatile compound	peak area			
			Kudzu-N[2)]	SO_2-N[3)]	Kudzu-W[4)]	SO_2-W[5)]
1	<600	ethanol	1047065681	859095495	837850902	962518355
2	<600	ethyl acetate	261912551	255936080	203329490	207199662
3	606	isobutyl alcohol	55809615	70042917	50869734	72597731
4	634	acetic acid	24696173	22589521	38454142	37811346
5	664	2,3,-pentanedione	1967513	1424948	1514576	2600729
6	712	2,4,5-trimethyl dioxolane	1850741	1572533	3717718	1594117
7	719	3-methyl butanal	308982609	275003810	226002988	251895117
8	722	2-methyl butanal	101866634	117003194	60431056	67570387
9	754	isobutyl acetate	7845639	10453552	4005292	6849719
10	769	2,3-butanediol	53305881	20051922	51525998	23829126
11	782	ethyl butanoate	3739863	5727785	4121974	2123833
12	822	ethyl-2-butenoate	1500024	1035419	2747928	2598975
13	852	1-hexanol	8794040	10437922	13558901	9926439
14	859	isoamyl acetate	197406006	223538739	88888167	137087901
15	861	2-methyl butyl acetate	46082677	60280004	16801388	26875329
16	872	styrene	37617234	76142917	56120044	91517286

17	915	ethyl-3-hydroxy butanoate	321441	554931	681549	601309
18	951	methionol	4950162	4407555	3280373	3210954
19	953	1-heptanol	1079294	753850	1099725	1453119
20	961	hexanoic acid	1507451	1185551	1510331	1342154
21	963	1-octen-3-ol	1285058	1065052	2238960	2193147
22	980	ethyl hexanoate	92156294	80186267	120331312	122527100
23	993	hexyl acetate	9850820	15648642	10127605	14071115
24	1013	2-ethyl hexanol	747757	313909	1073796	701151
25	1021	1,8-cineole	6960245	7334142	8838953	9608082
26	1035	acetophenone	962577	1320250	1470854	1400566
27	1054	1-octanol	1062981	938079	1578994	1572287
28	1081	ethyl heptanoate	3493276	3260315	5336266	5635889
29	1087	benzeneethanol	208764973	249040329	241628030	241559706
30	1100	undecane	2519852	2467813	1914480	1722346
31	1107	methyl octanoate	674274	492692	1374991	1214674
32	1135	octyl acetate	1327330	1336921	944462	1742225
33	1151	octanoic acid	434776	486676	1122606	1514554
34	1155	1-nonanol	5142583	5959957	7674152	9513507
35	1181	ethyl octanoate	226286308	237809183	389139349	384578129
36	1186	decanal	861826	885225	1052184	774032
37	1200	dodecane	1884448	3709506	2168212	2721071
38	1210	β-citronellol	676849	739042	963024	1113217
39	1227	2-phenylethyl acetate	18593951	27638271	21015817	28313254
40	1234	isoamyl octanoate	783414	813052	1212437	1011150
41	1247	1,3-bis(1,1-dimethylethyl)benzene	10331573	12045455	13104788	13386542
42	1275	ethyl-3-nonenoate	592775	1081390	1220334	334943
43	1279	ethyl nonanoate	2973342	2711588	10573518	5785196
44	1300	tridecane	1734006	3840963	2509341	2833379
45	1310	o-carbomethoxy aniline	278877	1242347	983658	1492015
46	1379	ethyl decanoate	46245943	53306147	148431901	144963861
47	1400	tetradecane	1110438	1357738	1835055	1220606
48	1500	pentadecane	712419	846894	2140660	934474
49	1578	ethyl dodecanoate	2934931	3674187	6720634	7196168
50	1600	hexadecane	562032	807996	3452926	1411614
51	1700	heptadecane	207838	235427	1105898	350098
52	1772	ethyl tetradecanoate	2203812	2193260	4350714	1929975

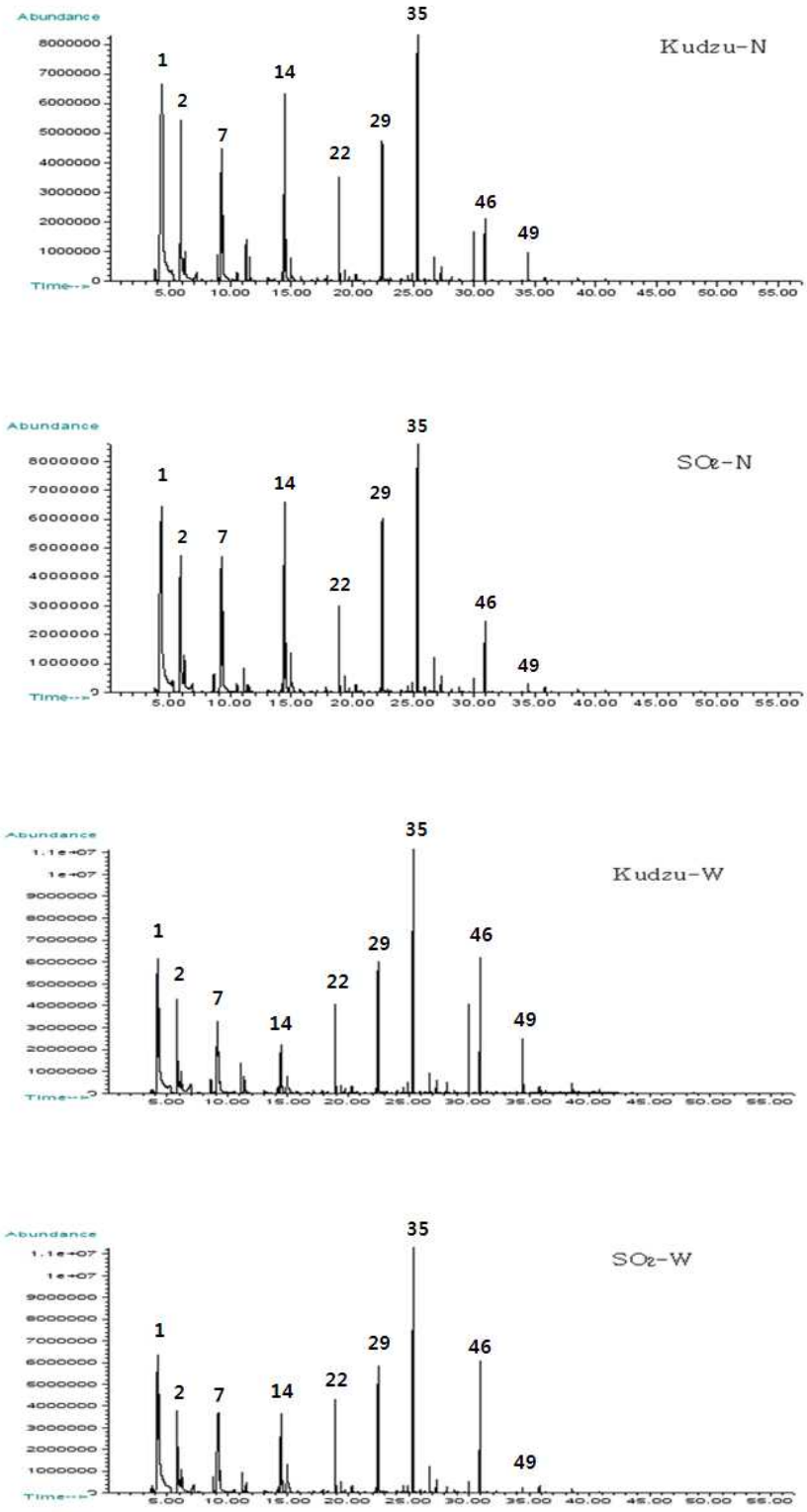
[1] Retention indices were determined using C_7~C_{22} as external reference.

[2] normal rice and kudzu

[3] normal rice and SO_2

[4] waxy rice and kudzu

[5] waxy rice and SO_2



<그림 2-17> 포도주의 향기성분 분석

원료 (멥쌀 및 찹쌀)를 달리한 쌀-포도주에서는 유의차가 없었고, 칡분말 첨가구 및 SO_2 첨가구에서도 차이가 없어 이는 칡분말을 사용하여 SO_2를 대체할 수 있는 가능성을 시사한다.

- 숙성 포도주의 향기 성분

휘발성 향기성분은 포도주에 메타중아황산칼륨 첨가구와 칡분말 첨가구, 찹쌀과 멥쌀을 발효하여 10°C에서 6개월 이상 숙성이 진행된 포도주를 Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)를 사용하여 분석한 결과 총 52개의 휘발성 향기성분이 검출되었으며, 그 중에 18개의 주요 성분을 선별하여 표 2-4에 나타내었다. 분석 결과 찹쌀과 멥쌀을 발효한 포도주에서는 유의적 차이가 없었다. 이는 두 종류의 쌀 모두 발효 전처리과정에서 30%의 도정을 통하여 쌀의 지질과 단백질의 제거에 인한 것으로 사료되며, 쌀의 도정도가 증가할수록 과일, 와인 향 특성을 나타내는 ester 화합물은 증가하는 경향을 보이고 향은 거의 없고 부드럽고 달콤한 oil 특성을 나타내는 성분은 감소하는 경향이 나타난다고 보고된 바 있다 (Kim et al., 2010). 칡분말 첨가구와 메타중아황산칼륨 첨가구 사이에서도 유의적인 차이가 나타나지 않아서 칡분말을 이용하여 메타중아황산칼륨을 대체할 수 있는 가능성을 시사하고 있었다. 그리고 숙성 전과 후를 비교한 결과로는 점차적으로 숙성이 진행되면서 달콤하고 신선한 과일향 특성을 나타나는 ester 화합물들의 성분의 증가가 나타났으며, 발효취가 나는 2-methyl-butanol, 3-methyl- butanol의 성분이 감소되어 숙성이 진행되면서 포도주의 품질이 향상되는 것을 알 수 있었다.

<표2-4> Volatile compounds of various wines. (before aging)

No	RI[1)]	Volatile compound	peak area			
			R-Kudzu[2)]	SR-Kudzu[3)]	R-SO_2[4)]	SR-SO_2[5)]
1	<600	ethyl acetate	2.6×10^8	2.0×10^8	2.6×10^8	2.1×10^8
2	606	isobutyl alcohol	5.6×10^7	5.1×10^7	7.0×10^7	7.3×10^7
3	634	acetic acid	2.5×10^7	3.8×10^7	2.3×10^7	3.8×10^7
4	719	3-methyl butanol	3.1×10^8	2.3×10^8	2.7×10^8	2.5×10^8
5	722	2-methyl butanol	1.0×10^8	6.0×10^7	1.2×10^8	6.8×10^7
6	782	ethyl butanoate	3.7×10^6	4.1×10^6	5.7×10^6	2.1×10^6
7	822	ethyl-2-butenoate	1.5×10^6	2.7×10^6	1.0×10^6	2.6×10^6
8	840	ethyl-3-methyl butanoate	9.4×10^5	-	4.4×10^5	-
9	859	isoamyl acetate	2.0×10^8	8.9×10^7	2.2×10^8	1.3×10^8
10	861	2-methyl butyl acetate	4.6×10^7	1.7×10^7	6.0×10^7	2.7×10^7
11	980	ethyl hexanoate	9.2×10^7	1.2×10^8	8.0×10^7	1.2×10^8
12	1021	1,8-cineole	7.0×10^6	8.8×10^6	7.3×10^6	9.6×10^6
13	1087	phenethyl alcohol	2.1×10^8	2.4×10^8	2.5×10^8	2.4×10^8
14	1148	diethyl butanedioate	6.3×10^5	3.9×10^5	4.8×10^5	4.9×10^5
15	1181	ethyl octanoate	2.3×10^8	3.9×10^8	2.4×10^8	3.8×10^8
16	1227	2-phenylethyl acetate	1.9×10^7	2.1×10^7	2.8×10^7	2.8×10^7
17	1310	methyl anthranilate	4.4×10^5	1.5×10^6	1.6×10^6	1.3×10^6
18	1360	β-damascenone	1.4×10^5	-	9.2×10^4	-

[1)] Retention indices were determined using $C_7 \sim C_{22}$ as external reference.

[2)] Normal rice and kudzu [3)] Sticky rice and kudzu

[4)] Normal rice and SO_2 [5)] Sticky rice and SO_2

<표2-4> Volatile compounds of various wines. (after aging)

No	RI[1)]	Volatile compound	peak area			
			R-Kudzu[2)]	SR-Kudzu[3)]	R-SO_2[4)]	SR-SO_2[5)]
1	<600	ethyl acetate	8.0×10^7	4.8×10^7	6.9×10^7	1.1×10^8
2	606	isobutyl alcohol	3.1×10^7	2.1×10^7	2.5×10^7	3.4×10^7
3	634	acetic acid	8.7×10^6	2.2×10^7	1.7×10^7	1.7×10^7
4	719	3-methyl butanol	1.7×10^8	1.5×10^8	1.4×10^8	1.3×10^8
5	722	2-methyl butanol	3.2×10^7	2.3×10^7	4.9×10^7	3.2×10^7
6	782	ethyl butanoate	3.0×10^6	6.1×10^6	3.8×10^6	5.4×10^6
7	822	ethyl-2-butenoate	2.3×10^6	4.1×10^6	3.8×10^6	4.2×10^6
8	840	ethyl-3-methyl butanoate	1.1×10^6	1.7×10^6	1.5×10^6	1.5×10^6
9	859	isoamyl acetate	5.4×10^7	4.4×10^7	6.3×10^7	4.8×10^7
10	861	2-methyl butyl acetate	5.8×10^6	6.8×10^6	9.8×10^6	6.6×10^6
11	980	ethyl hexanoate	3.6×10^7	4.5×10^7	3.6×10^7	5.4×10^7
12	1021	1,8-cineole	2.4×10^6	2.7×10^6	2.8×10^6	2.8×10^6
13	1087	phenethyl alcohol	2.4×10^8	2.5×10^8	2.5×10^8	2.3×10^8
14	1148	diethyl butanedioate	2.0×10^7	9.6×10^6	1.5×10^7	1.5×10^7
15	1181	ethyl octanoate	1.1×10^8	5.3×10^7	9.8×10^7	1.2×10^8
16	1227	2-phenylethyl acetate	3.0×10^7	3.3×10^7	3.2×10^7	2.6×10^7
17	1310	methyl anthranilate	2.2×10^6	2.3×10^6	1.7×10^6	5.7×10^5
18	1360	β-damascenone	6.6×10^5	6.8×10^5	5.7×10^5	5.7×10^5

[1)] Retention indices were determined using $C_7\sim C_{22}$ as external reference.
[2)] Normal rice and kudzu [3)] Sticky rice and kudzu
[4)] Normal rice and SO_2 [5)] Sticky rice and SO_2

(3) 포도주의 색도 분석

색도는 시료를 10,000rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리 후 분광색차계 (JS-555, Color Techno Japan System Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하여 L, a, b 값으로 나타내었으며 결과는 표 2-5에 보인 바와 같다.

<표 2-5> 포도주의 색도

포도주	L (밝기)	a (적색)	b (황색)
아황산 처리구	43.25	54.26	35.77
	43.31	54.23	35.65
	43.34	54.15	35.76
평균	43.30	54.21	35.73
칡 첨가구	43.48	50.88	43.42
	42.98	50.61	43.17
	43.55	50.79	43.52
평균	43.34	50.76	43.37

표2-5 에서와 같이 아황산 처리구에서 선명한 적색이 유지되었고 칡 첨가구는 엷은 적황색을 띄고 있었으며 고유한 색을 나타내고 있었다.

3) 3차년도

1) 포도주 전자코 분석

직접 제조한 6종의 포도주와 시판 포도주 1종을 전자코를 이용하여 분석하였다 (김성란, 1997). 각각의 시료 1 g을 10 mL vial에 넣은 다음 70℃에서 10분간 350 rpm으로 교반하고 90℃의 주입구 온도를 유지한 가운데 주입하였다. INDEx(Inside needle direct extration) system을 이용한 분석을 하였으며 INDEx syringe를 사용하여 20번 stroke하여 시료의 기체성분을 농축한 후 분석하였다. 시료는 자동시료채취기가 연결된 전자코(SMart Nose300, SMart Nose, Marin-Epagnier, Switzerland)로 분석하였다. 분석에 사용된 전자코는 질량분석기(Quadrupole Mass Spectrometer, Balzers Instruments, Masin-Epagniger, Switzerland)가 연결되어 있으며 휘발성 물질들은 70eV에서 이온화시켜 180초 동안 생성된 이온물질을 사중극자 (quadrupole) 질량 필터링을 거친 후 특정 질량 범위(10-200 amu)에 속하는 물질을 정수단위로 측정하여 channel수로 사용하였다. 실험분석 초기에 공기 시료를 대조구로 사용하였으며 각각의 시료는 3회 반복을 실시하였다.

판별함수분석(Discriminani Function Analysis; DFA)

DFA는 판별함수 분석으로서 휘발성 향기성분으로부터 생성되는 10에서 200 amu의 ion fragment 중 각 시료 간에 차별성이 높은 20-30여 개의 fragment(m/z)를 독립변수로 선택하였다. 선택된 독립변수의 해당 감응도 값을 이용하여 다음 식에 따라 판별함수분석(DFA)를 실시하였으며 종속변수에 영향을 주는 독립변수를 검정하였다.

$$DFA=B_0+B_1X_1+B_2X_2+B_3X_3\cdots\cdots\cdots\cdots+B_nX_n$$

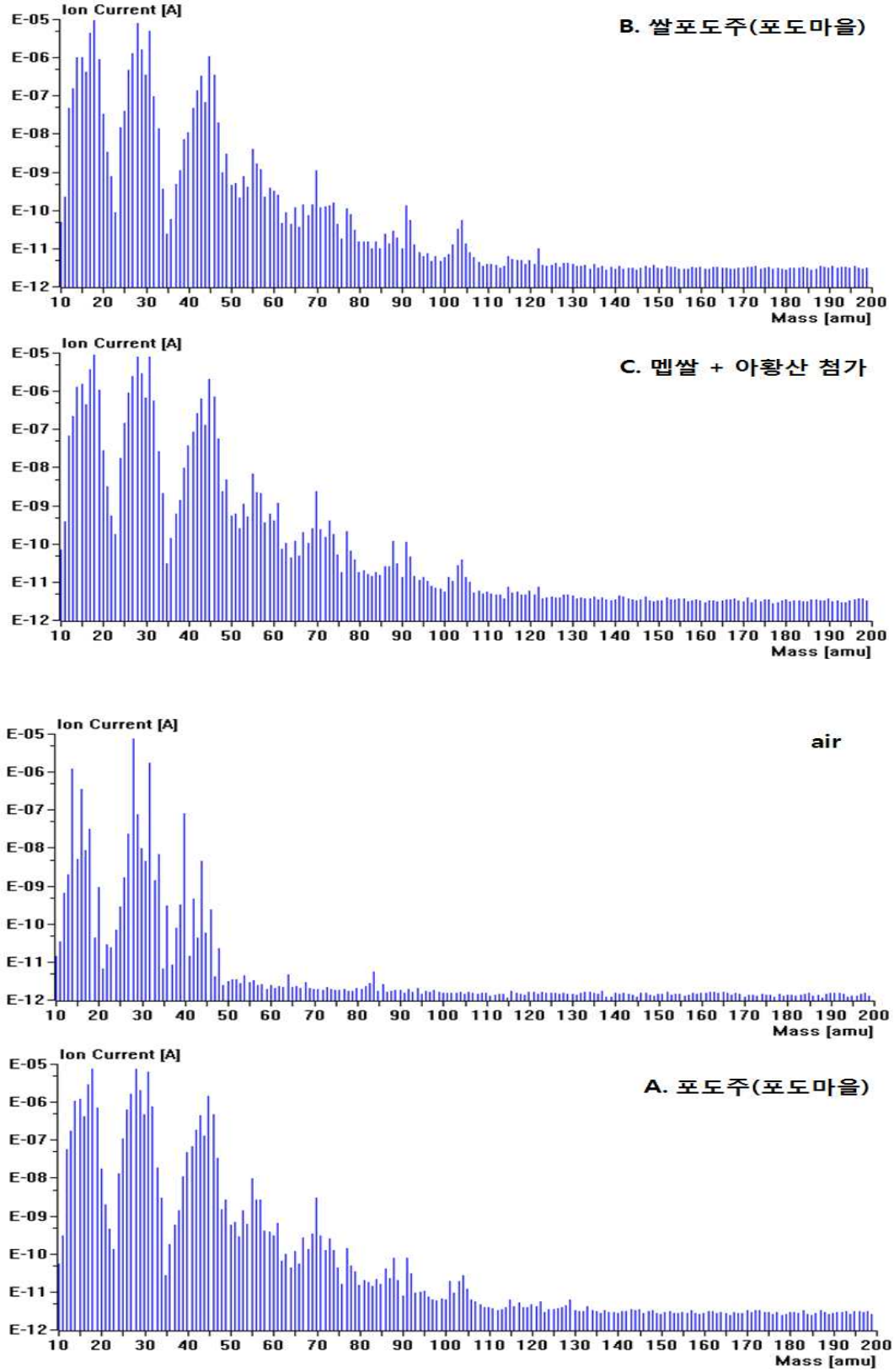
B_0는 constant값이고 B_1는 coefficients를, x는 각각의 amu값에서의 감응도를 나타낸다. 이들 독립변수 중에서 종속변수를 예측할 수 있는 판별함수 값은 DF1, DF2, DF3……DFn으로 나타냈다. 여러 독립변수들 중에서 종속변수에 영향력을 주는 순서를 기준으로 DF1과 DF2를 비교하여 각 시료간의 휘성분의 차이를 전체적인 패턴으로 나타내었다.

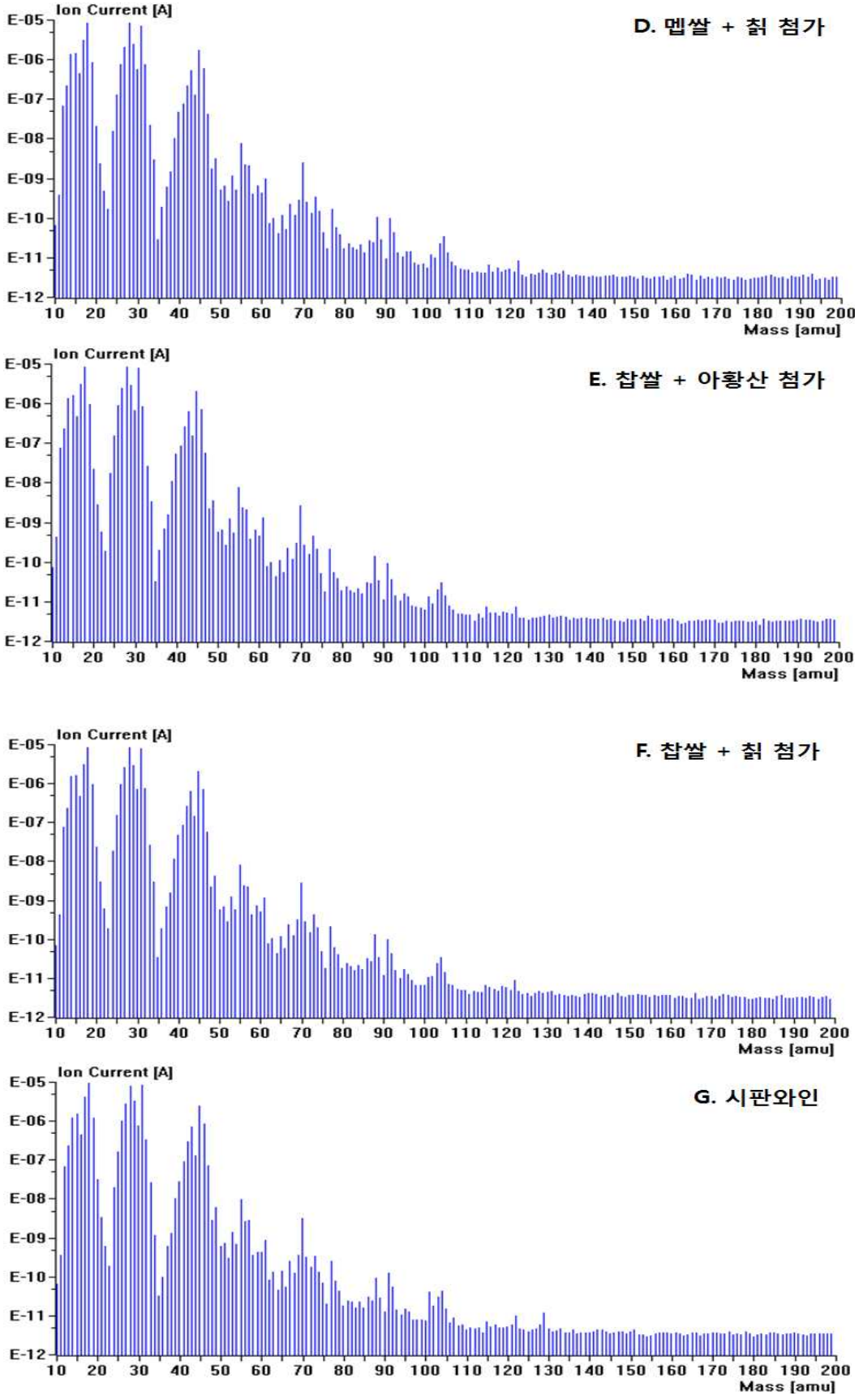
통계분석

각기 다른 channel의 감응도는 matrix형태로 기록되었으며 이온화되어 얻어진 분자들 중 차별성이 높은 분자량(m/z)을 갖는 variables 그룹을 20~30개 선정하여 판별함수분석을 실시하였다. 이때 사용된 소프트웨어는 SMart Nose statistical analysis software를 사용하였다.

(1) Mass spectrum of different types of wine

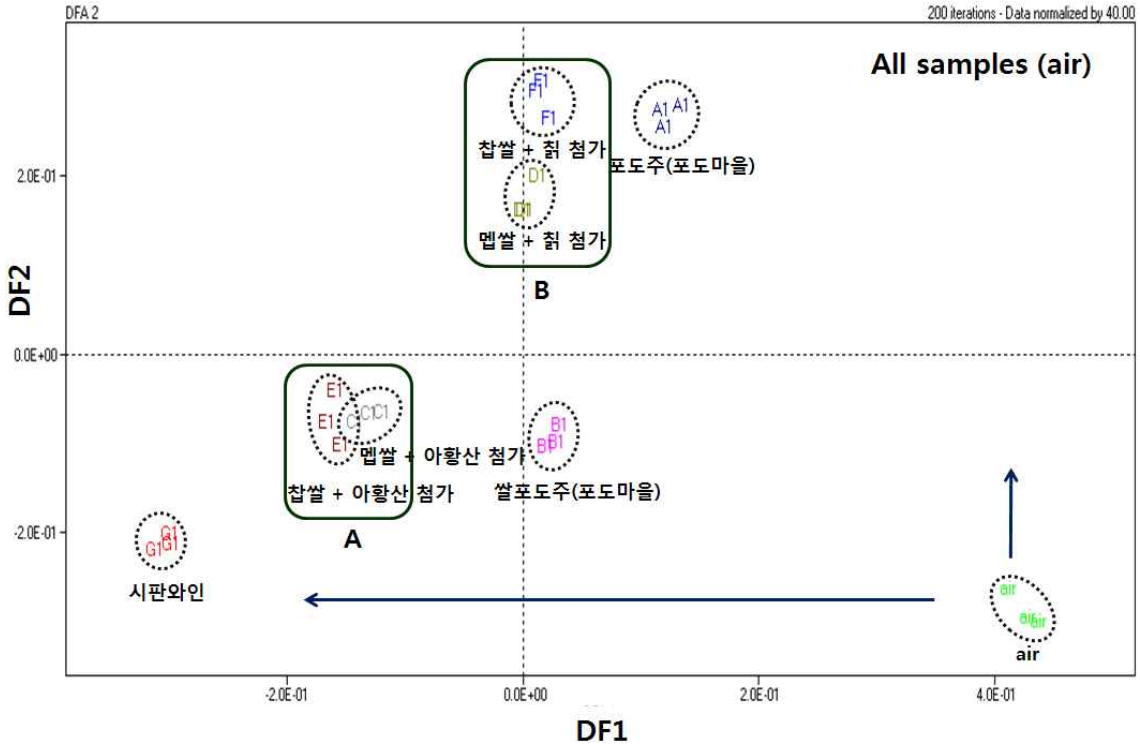
전자코에 연결된 질량분석기를 이용해 시료의 ion fragments(m/z)를 11-199 amu범위 내에서 mass spectrum으로 나타내었다 (그림 2-18).





<그림 2-18> Mass spectrums of the different types of soymilk analyzed by MS-electronic nose.

40 amu 이하에서 나타난 ion fragment는 대부분이 공기 중에 포함된 성분에 해당되는 것으로 41-199 amu 내에서 나타난 감응도 차이를 위주로 비교하였으며 그 결과 각 시료간의 차이가 mass spectrum 상에서 구분되어 나타났다. 40-120 amu 사이에서 시료간의 차이가 미세하게 나타났으며 이러한 결과를 토대로 통계처리(판별함수 분석)하여 각 시료간의 차이를 알아본 결과를 그림 2-19에 나타내었다.



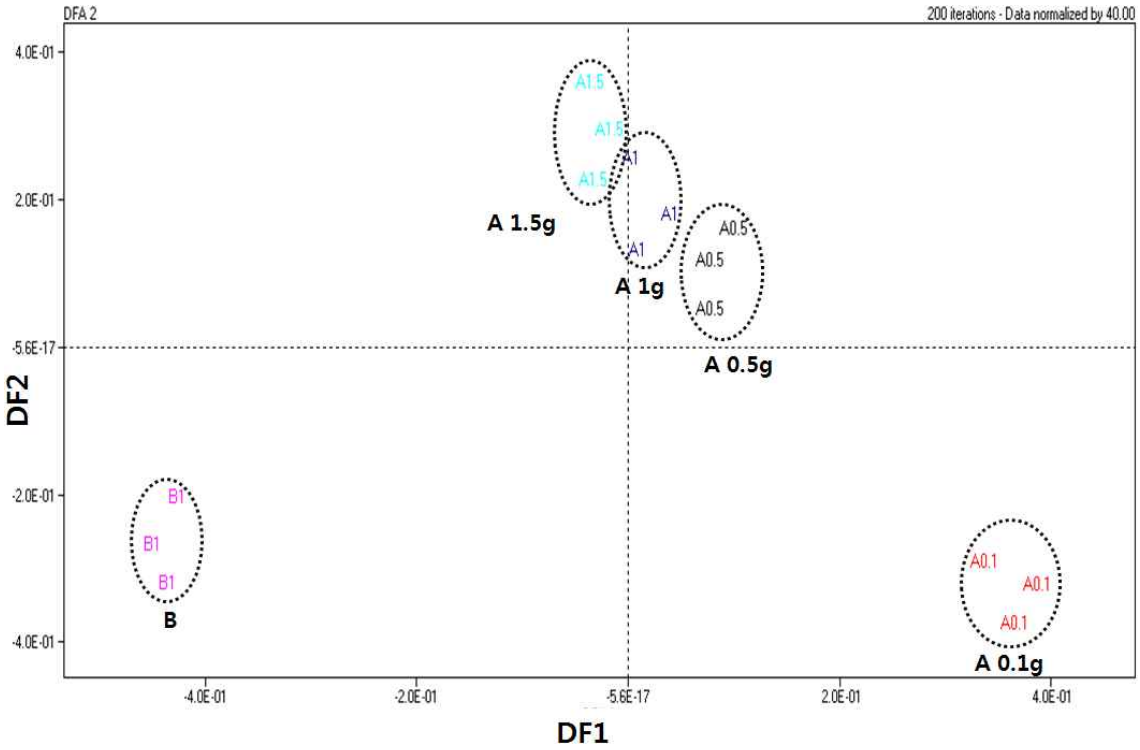
<그림 2-19> Discriminant function analysis of the electronic nose data for different types of wine samples (DF1: r^2=0.9988, F=1879.50, DF2: r^2=0.9945, F=411.62).

상기 분석에서 고유의 향이 없는 air를 기준으로 하여 다른 시료에서 휘발 성분이 어느 정도 생성되었는지 그 차이를 비교하였다. 상대적 대조구에 해당하는 공기는 DF1의 오른쪽에 위치하는 반면 휘발성분이 생성된 시료의 경우 DF1의 왼쪽 방향에 위치하고 있다. 이처럼 시료의 DF1 값이 양의 방향으로부터 음의 방향으로 이동할수록 휘발성분이 많이 생성된 것을 의미한다.

분석에 사용된 모든 시료를 토대로 판별함수 분석한 결과 샘플간의 차이를 나타내는 지표인 DF1과 DF2를 비교하여 볼 때, DF1의 F값은 1879.50이고 DF2의 F값은 411.62로 약 4배 차이나는 것으로 보아 주로 가로축에 해당하는 DF1에 의하여 구분되었다.
아황산 처리의 경우 아황산에 의한 영향이 커 찹쌀, 멥쌀 첨가에 따른 차이 구별이 제대로 이루어 지지 않았으나(A) 아황산을 첨가하지 않고 칡을 첨가한 경우(B) 멥쌀보다는 찹쌀 첨가구가 향이 더 나는 것으로 나타나 발효 시 휘발성분이 발생하는데 찹쌀첨가구가 더 영향을 미친 것으로 여겨진다.

전체적으로 보았을 때 DF1의 가장 왼쪽에 나타난 시판와인의 향기가 가장 강한 것으로 나타났으며 직접 담근 포도주의 향기패턴은 멥쌀과 찹쌀을 사용함에 따른 구분보다는 칡과 아황산 첨가에 따른 향기패턴이 구분되었다. 직접 담근 포도주 중에서 아황산 첨가구가 시판 와인과 가장 유사한 향기패턴을 보였다. 아마도 아황산의 향기 성분이 가미된 것으로 전체 향기성분에 영향을 미친 것으로 사료되었다.

- 포도주(A)와 쌀포도주(B)의 향기패턴 비교



<그림 2-20> Discriminant function analysis of the electronic nose data for wine and rice wine samples (DF1: r^2=0.9972, F=875.47, DF2: r^2=0.9657, F=70.37).

쌀포도주와 포도주의 경우 그림2-19에서 보면 DF1값이 쌀포도주가 포도주에 비하여 작게 나타나 상대적으로 휘발성분이 많은 것으로 나타났다. 그림 2-19의 경우 여러 가지 시료와의 차별성을 비교한 것으로 이를 두 시료간의 차이를 본 결과 그림 2-20과 같이 F인 쌀 포도주 향기성분이 진한 쪽에 나타남을 알 수 있다. A 시료에 대하여 농도별로 본 것이 왼쪽 방향으로 이동할수록 농도가 진한 것으로 미루어 B가 있는 음의 방향으로 이동할수록 향기성분이 만하는 것을 의미한다. y축에서 다소 차이가 있는 것으로 나타났으며 DF1, DF2의 F값을 비교해보면 10배나 되어 DF2의 방향에 따른 차이는 아주 적다고 볼 수 있다.

2) GC-MS 분석

직접 제조한 포도주를 GC-MS로 분석한 결과 총 64종의 물질의 휘발성 화합물이 감지되었다. 이를 바탕으로 분자량이 작고 (No.25 이하) CV%값이 50 이상인 휘발성 물질을 토대로 선정한 물질은 다음과 같고 해당 물질의 괄호에 휘발성분의 major peak를 표기하였다. 그 휘발성 물질은 Ethyl acetate(m/z: 43), Isobutyl alcohol(m/z: 41, 42, 43), Acetic acid(m/z: 43, 45, 60), Acetal(m/z: 120, 138), 1,3-butanediol(m/z: 43, 45), Ethyl butyrate (m/z: 43, 71), 2,3-butanediol(m/z: 45), Furfural(m/z: 95, 96), Ethyl-2-butenoate (m/z: 69), ethyl-3-methyl butanoate(m/z: 57, 85, 88), Methyl hexanoate(m/z: 74), Benz- aldehyde (m/z: 77, 105, 106) 이다.

표2-6은 GC-MS로 동정된 휘발성분을 대상으로 생성된 휘발성분의 감응도를 알아보았다. GC-MS에서 감지된 물질의 각 major peak를 회색 음영으로 표기하였으며 분석한 41-199 amu 중 전자코로 분석하였을 때 감응도가 $10X10^9$ 이하로 증가한 것은 그 생성양이 미미하였기 때문에 감응도가 $10X10^9$ 이상인 amu를 표 2-6에 나타내었다. 특히, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 amu에서 그 감응도가 큰 폭으로 증가한 것으로 보아 이에 해당하는 휘발성 물질의 포도주의 주요한 휘발성분의 amu이라 여겨진다. 또한 각 성분의 회색음영에 포함되지 않는 44, 46, 47, 48, 49, 55, 56, 70 amu의 경우 그 감응도가 증가하였으나 GC-MS에서는 어떠한 성분인지 감지되지 않았다. 이는 GC-MS의 전처리과정에서 손실된 성분으로 여겨지며 결과적으로 GC-MS에서 검출된 성분들 중에서 포도주의 주요한 휘발성 물질에 해당하는 것은 Ethyl acetate, Isobutyl alcohol, Acetic acid, 1,3-butanediol, Ethyl butyrate, 2,3-butanediol, ethyl-3-methyl butanoate이다.

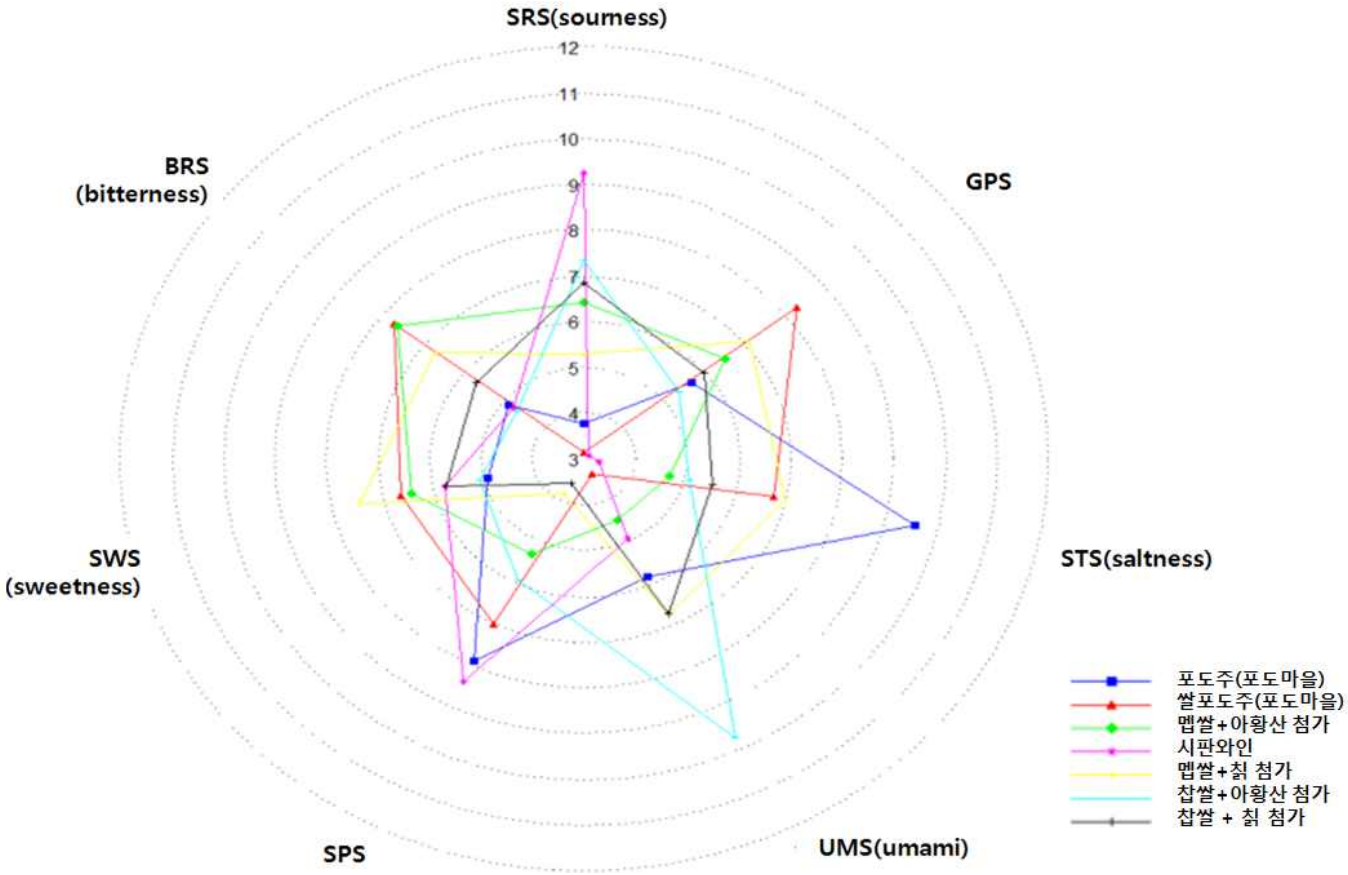
-포도주의 전자혀 분석

전자혀 분석한 결과를 판별함수 분석과 주성분 분석한 결과를 그림 2-21, 22, 23에 나타내었다. 두 통계분석 처리에서 포도주는 DF1 및 PC1에 의하여 구분되었으며 시판와인과 포도주(포도마을)은 PC1 및 DF1의 양의 방향과 음의방향에 위치하였으며 칡 및 아황산을 첨가한 첨가구는 시판와인과 포도마을에서 제조한 포도주의 사이에 나타났다.

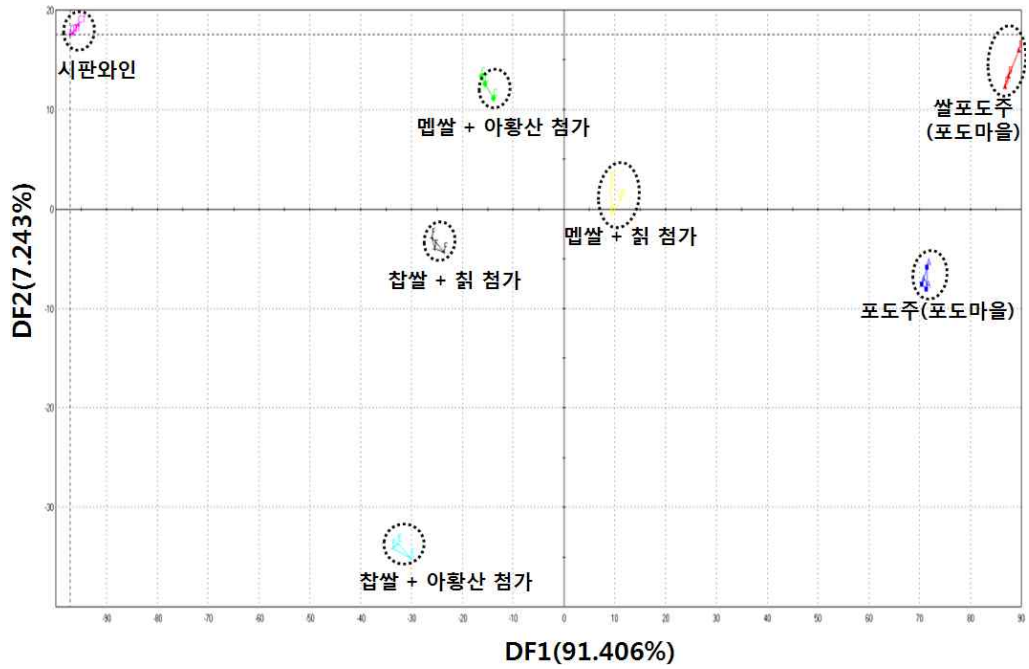
전자혀를 이용하여 포도주의 관능특성을 알아본 결과를 그림 2-21에 나타내었다. 전자혀는 7가지 센서를 가진 모듈을 사용하였으며 7가지 센서 중 SPS, GPS 이 2가지는 standard로서 보정용으로 사용된다 (Li & Beta, 2011). 나머지에 해당하는 5가지 센서는 SRS (신맛), STS (짠맛), UMS (감칠맛), SWS (단맛), BRS (쓴맛)을 나타낸다. 먼저 시판와인의 경우 신맛은 강한 반면 짠맛을 나타내는 센서의 감도가 낮은 것으로 나타났다. 이에 반해 시판와인을 제외한 6 가지 샘플의 경우 짠맛과 쓴맛이 비교적 강하였으며 이외의 센서에서는 샘플마다 각기 다른 특성을 나타내었다. 관능검사의 경우 참여하는 패널들에 따른 개인적 특성에 따라 맛을 감지하는 능력이 다른 단점을 가지고 있으나 전자혀 분석은 이를 보완하는 기술이라 할 수 있다. 그러나 센서의 경우 사람이 감지하지 못하는 정도의 차이를 인지하여 실제 관능검사의 결과와 일치하지 않을 수 있기 때문에 관능검사와 병행하여 상관관계를 파악하는 것이 바람직할 것이다.

<표 2-6> Response of volatile compounds different types of wine by Electronic nose

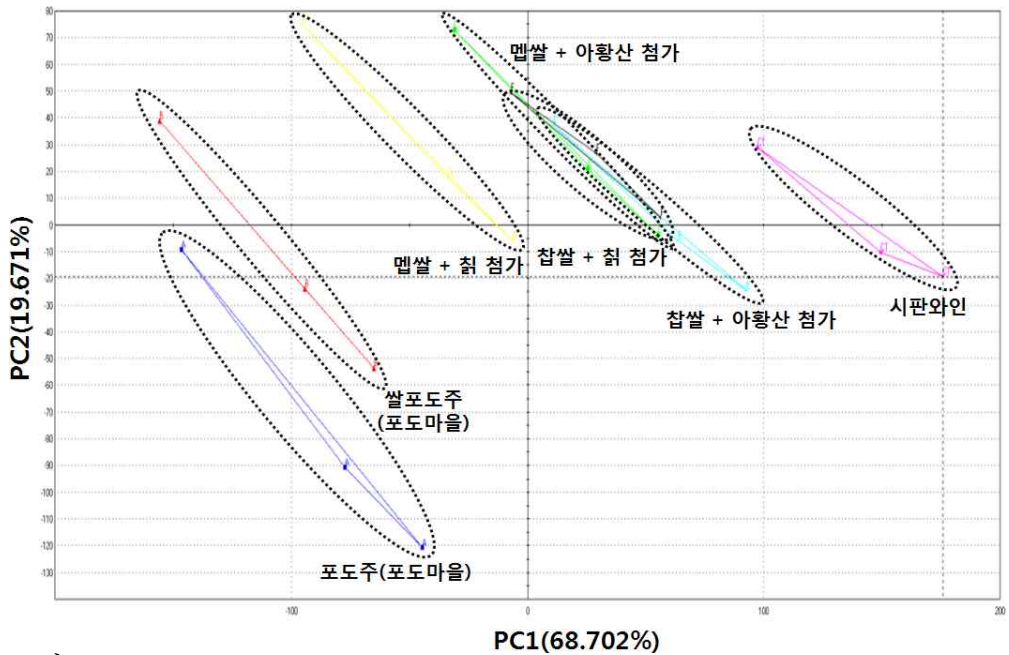
amu	Response of different types of wine(10^{x9})								Volatile compounds											
	air	A	B	C	D	E	F	G	Ethyl acetate	Isobutyl alcohol	Acetic acid	Acetaldehyde	1,3-butanediol	Ethyl butyrate	2,3-butanediol	Furfural	Ethyl-2-butenoate	ethyl-3-methyl butanoate	Methyl hexanoate	Benzaldehyde
41	0.22	364.56	400.44	417.33	394.66	447.34	475.34	471.43												
42	8.06	1005.27	1043.87	1215.80	1142.95	1329.80	1405.24	1412.48												
43	0.65	2460.79	2556.31	3040.26	2843.04	3333.26	3515.89	3523.84												
44	59.86	934.86	942.84	896.38	902.30	964.46	1024.39	966.27												
45	0.75	7817.86	8124.62	9674.05	9051.17	10659.05	11185.51	11354.35												
46	3.77	2639.25	2741.87	3269.66	3054.36	3598.33	3776.71	3832.71												
47	0.06	112.23	119.04	146.94	138.44	169.12	192.40	187.99												
48	0.29	6.85	7.19	8.60	8.04	9.51	10.24	10.38												
49	0.04	6.93	8.37	8.76	7.42	9.90	9.71	10.79												
55	0.05	55.03	48.74	40.28	42.33	37.03	44.43	55.63												
56	0.05	14.81	18.09	12.97	12.31	11.81	13.07	14.73												
57	0.04	13.14	13.28	10.67	10.63	9.38	11.05	13.87												
70	0.04	17.28	15.03	14.38	14.58	13.24	15.68	19.10												



<그림 2-21> Changes in organoleptic characteristics of different types of wine by Electronic tongue.

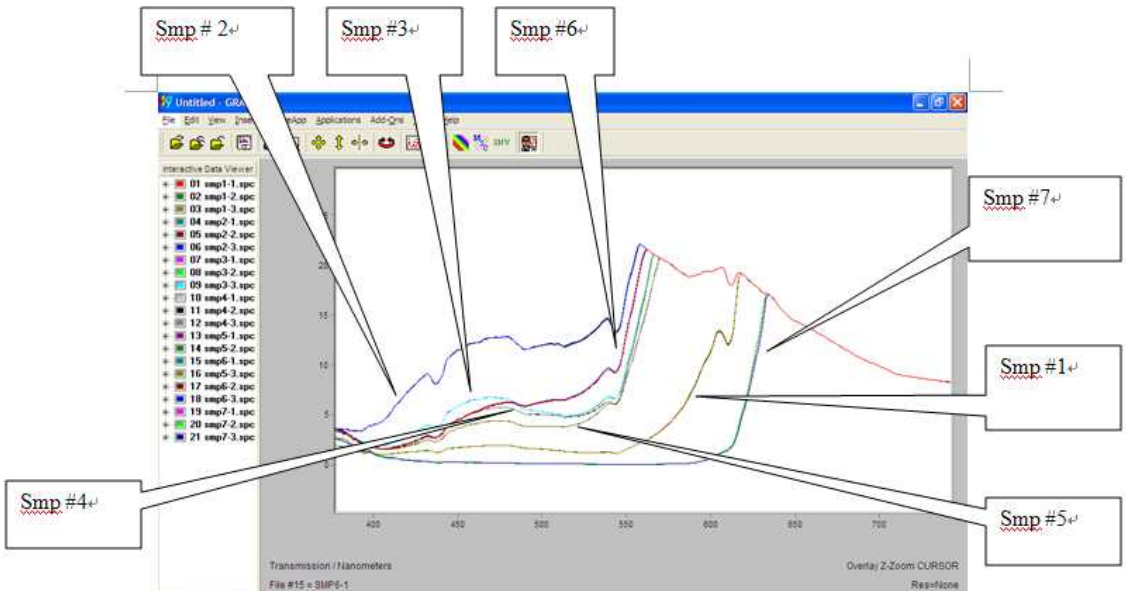


<그림 2-22> Changes in organoleptic characteristics of different types of wine by Electronic tongue.



<그림2-23> Changes in organoleptic characteristics of different types of wine by Electronic tongue

포도주를 비파괴적인 방법으로 VIS/NIR 영역 (400-250nm)의 투과광 분광특성을 이용하여 측정한 결과이다. 샘플 전체를 overlaid하여 그림 2-24에 나타내었다. 샘플 7이 시판와인을 나타내며 시판와인과 가장 유사한 것은 샘플 1로 포도주(포도마을)이 이에 해당한다. 포도주 샘플은 제조 방법 및 첨가물에 따라 400-650 nm 영역 대에서 차별성을 갖는 것으로 나타났다.



<그림 2-24> Visible/near infrared(VIS/NIR) absorbance spectra for different types of wine.

2) 포도주 공장 설립 및 시제품 생산

(1) 포도주 Pilot공장 설치

- 본 과제에서 습득한 포도주 발효기술을 활용하여 소규모 포도주 제조공장(=포도주 발효실험실)을 구축하여 학생 실습 및 향후 포도주를 생산하여 상품화 하고자 인천대학교 산학협력단의 재정적 지원으로 교내에 설치하였다.**(붙임 참조)**

위치 : 인천대학교 공동기기실 2층 (45평+5평)
설비 : 발효탱크, 자동 병입기 등 18종 (기자재 및 비품 : 약 2억원)
설비 및 설계 : 발효시설, 숙성 냉장실(10℃) 등 공장 Lay-out는 붙임과 같음**(붙임참조)**

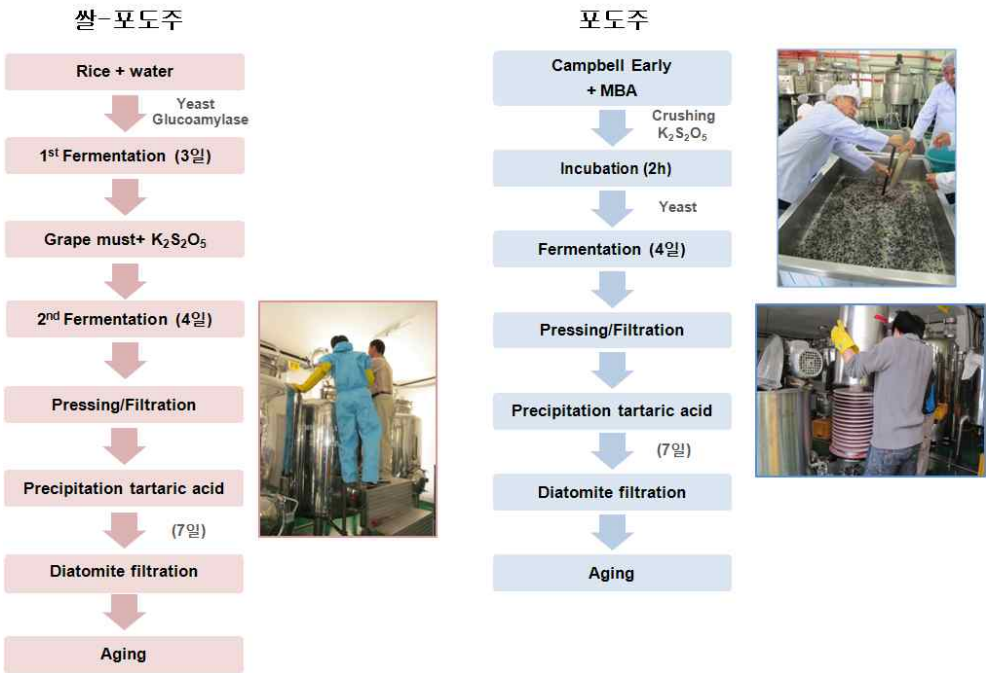
저온숙성 창고(2011년 2월 완공)

<그림 2-25> 인천대 내에 설치된 포도주 생산 시설

○ 시제품 생산

- 1차 시제품 생산 A회사의 포도주제조 시설 및 지원을 받아 그 종류의 시제품을 다음과 같은 공정으로 포도주 시제품(2010년 10월 12일)을 생산하였고 10℃에서 숙성 중임.
- 포도주 생산양 : 2000 L (750 ml x 2,000병)
- 2차 시제품 생산

  본 대학의 포도주 공장 시설을 이용하여 포도주 시제품 2,000L를 생산하고 10°C에서 숙성 중임 (2011년 3월 23일)



<그림 2-26> 포도주 생산에 사용된 공정

붙임1.

자연과학대학 포도주 발효 실험실 설치 (안)

자연과학대학 생명과학부 석좌교수 박관화교수의 기술을 활용하여 포도주 발효 실험실을 구축하고 학생들에게 실험실 습기회를 제공함과 동시에 향후 와인제조 준비를 하기위하여 실험실을 설치코자함.

□ 추진방향

○ 학생실습실 확보(와인 발효공정)

○ 기술지주회사 자회사 설립 준비

○ 와인 생산(인천시 공식 만찬주 목표)

○ 수익 창출

□ 실험실(가공공장)설치 개요

○ 위치

인천대학교 공동기기실 2층(45평)

○ 운용책임자

생명과학부 석좌교수 박관화

○ 시설 공사

- 배수가 가능한 트랜스 설치
- 실험실 설비가 설치될 수 있도록 배수, 배관, 환기장치 및 전기 인입
- 설계 및 시공 : 시설과
- 붙임1<실험실 설비 설치위치 평면도> 참조

○ 실험실 설비(기자재 및 비품)

- 곤도라등 19종 설치(붙임2<실험실 설비 시설 목록>참조)

❍ 실험실습재료 : 포도구입 1.5톤

□소요예산 : 347,000천원

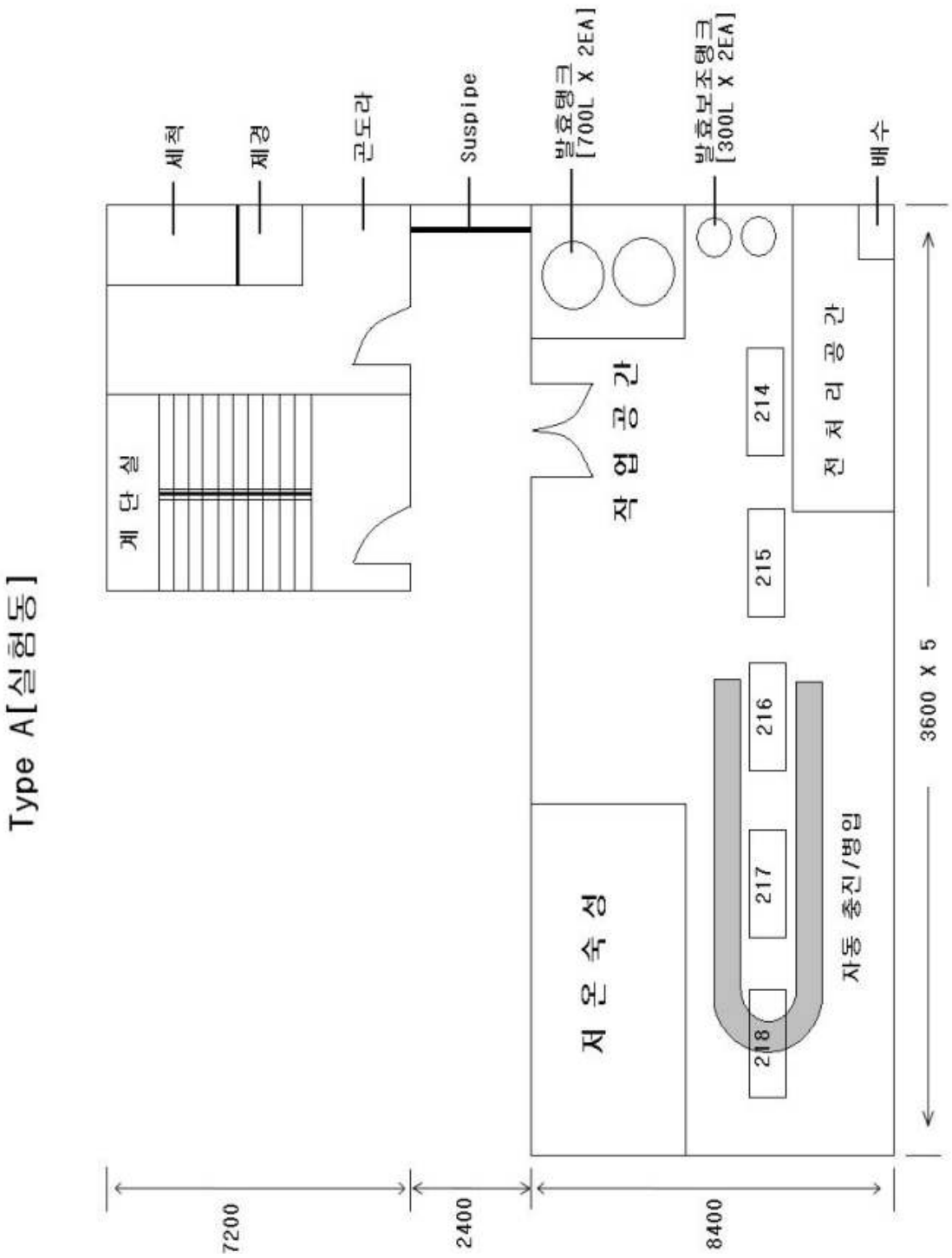
❍ 시설 공사비 : 140,000천원(시설 : 50,000천원, 기계·전기 : 90,000천원)
❍ 실험실 설비 : 200,000천원
❍ 포도구입비 : 7,000천원

□ 예산과목

❍ 실험실 시설비 : 대학예산에서 부담(시설과)시설비
❍ 실험실 설비(기계장치) : 기성회계)자산취득비)자산취득비
❍ 포도 구입비 : 기성회계)학교운영비)재료비

붙임2.

<실험실 설비 설치위치 평면도>



붙임3.

<실험실 설비 시설 목록>

(단위: 천원)

No.	품 목	규 격	수 량	단 가	금 액	비 고
1	곤도라	1100× 1100× 800	1	10,000	10,000	
2	자동3단 세척로	800× 1600	1	8,000	8,000	
3	제경기 (Destemmer)		1	10,000	10,000	이태리
4	발효T/K	700L	2	14,000	28,000	
5	냉온수순환기	300L	1	5,000	5,000	
6	발효보조 T/K	100L	2	500	1,000	
7	발효보조 T/K	50L	2	300	600	
8	순환pump	2HP	1	1,000	1,000	
9	제성 T/K	300L	2	10,000	20,000	
10	Oenoflow	300L	1	40,000	40,000	택 일
11	여과기	300L	1	20,000	20,000	
12	Labeller		1	6,000	6,000	
13	충진기		1	9,000	9,000	
14	Cork Sealer		1	10,000	10,000	
15	필름수축기		1	7,000	7,000	
16	Turn Table		1	5,000	5,000	
17	소형숙성 T/K	40L	20	300	6,000	
18	기타부대공사			30,000	30,000	
19	과일상자	10㎏	200	3	600	
		총 계			177,200 ~ 197,200	

붙임4.

chosun.com

전체기사 경제 정치 사회 국제 문화 InfoGraphics

최신기사 법원·검찰·경찰 교육 · 시험 국방 사건 · 사고 전국뉴스 날씨 환경 · 재해 교통·관광·항공 노동 · 복

AD LOCAL 서울 종로구

· [Groupon][신촌] 앱솔루트 셋트 34,500원 · 렌즈삽입술이기때문에 명동밝은세상안과

· 종로 양푼포차 무한리필 51%할인쿠폰 · [Groupon][신촌] 앱솔루트 셋트 34,500원

사회 ▾

전국뉴스

[인천·부천] 인천대, 쌀 혼합한 포도주 개발

이신영 기자 foryou@chosun.com ▸기자의 다른 기사보기

기사 100자평 (0)

입력 : 2010.07.22 03:02

인천대학교가 1년 반 동안의 연구를 거쳐 인천시 행사나 만찬 등에 쓰일 공식 포도주를 개발했다. 인천대 안경수 총장은 "학내 연구진만으로 인천 지역을 대표할 만한 포도주를 개발했다"고 21일 밝혔다.

인천대가 만든 포도주는 국내 최고 브랜드로 여겨지는 대부도 산 포도와 강화도의 찹쌀을 이용해 만든 것이다. 생명과학부 박관화 교수팀이 지난해 3월 개발을 시작했다. 박 교수는 "스페인이나 프랑스산 포도에 비해 대부도 포도의 당도가 부족해 제조과정에서 강화도 찹쌀을 발효시켜 당도를 보완했다"고 말했다.

포도에 쌀이 첨가된 특징을 살려 포도주의 이름은 '포도 미주(米酒)'(가칭)로 정했다. 포도주는 이르면 내년 5월부터 인천에 공급된다.

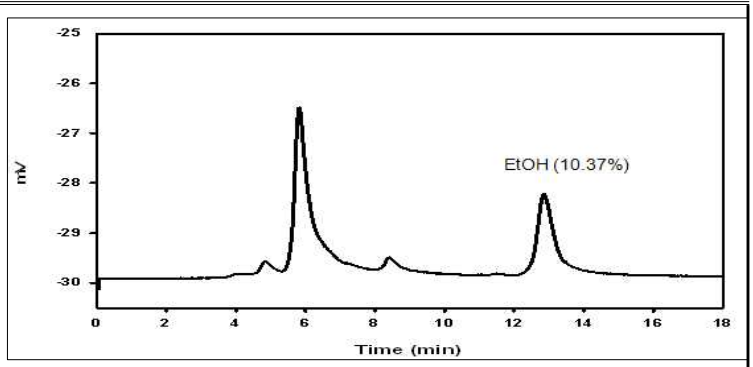
인천대가 이번에 개발한 술은 포도주를 포함해 총 3가지다. 포도주뿐만 아니라 100% 포도와 머루를 이용한 술과 알코올이 40% 이상 들어간 꼬냑(cognac) 등이다. 인천대는 "골다공증을 예방하고 항암효과와 숙취예방에 도움이 될 수 있는 천연 성분 등을 첨가해 40~50대 어른들도 선호할 수 있게 만들었다"고 말했다. 인천대는 내달 교내에 포도주 공장을 설립해 시제품을 생산한 뒤 정부로부터 특허 등록·판매 허가 등을 받을 계획이다.

3. 협동 및 위탁과제 :

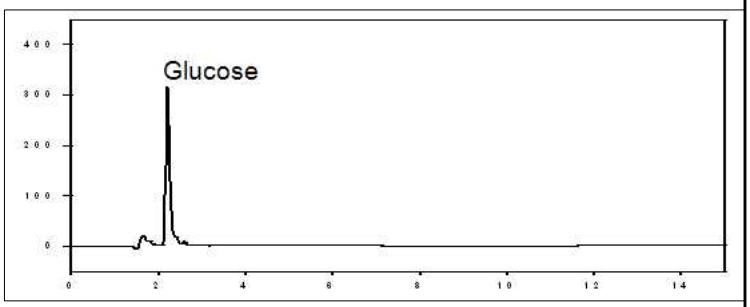
협동과제 : 과실주 발효용 전분원료 및 천연추출물 개발

1) 1차년도

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
전분원료의 선발		- 일차적으로 양조에 적합한 전분질 원료 선별 (양조벼, 대립벼, 고아미, 설갱미, 화선찰, 추청벼) - 선별된 원료 사용 일단발효 후 에탄올 함량 측정 및 가공적성 검사(2세부과제와 공동연구) <그림 3-1> - 최종적으로 '화선찰'을 선정하여 30% 도정하여 발효원료 완료 (1단발효시 선별원료들의 에탄올 함량은 비슷하였으나 발효시 불순물이 가장 적었으며 지역적 특색 및 접근성을 고려하여 원료를 선정하였으며 양조에 있어 이취나 품질 저하를 야기시킬 수 있는 단백질 및 지방의 함량을 고려하여 30%까지 도정실시)

<table>
<tr><td></td><td></td><td> 

<그림 3-2> 화선찰를 사용하여 일단 발효 후 HPLC분석(에탄올 정량)

<그림 3-3> 화선찰벼를 사용하여 일단 발효 후 HPAEC 분석(소당류)</td></tr>
<tr><td>원료과실의 선발</td><td></td><td>- 국내에서 재배되는 포도품종 선별
(캠벨얼리, 거봉, 다노레드, 마스캇)
- 선별된 포도의 당도 측정

<표 3-1>
<table><tr><td>포도 품종</td><td>° Brix</td></tr><tr><td>캠벨얼리(대부도산)</td><td>18</td></tr><tr><td>거봉</td><td>17</td></tr><tr><td>다노레드</td><td>16</td></tr><tr><td>마스캇</td><td>18</td></tr></table>- 국내 수급 및 지역적 특색을 고려하여 대부도산 캠벨얼리 선정</td></tr>
<tr><td>원료과실의 가공적성 분석</td><td></td><td>- 한철 과일인 포도수급에 계절적인 한계가 있어 선별된 포도를 -40°C 냉동고에 보관하여 이 동결된 원료를 사용하여 포도주 발효를 진행(제2세부과제와 공동연구)함.
- 동결 전후의 원료로 포도주를 제조하여 비교한 결과 큰 차이점은 없어 대부도산 캠벨얼리를 대량 구매(100 Kg)하여 냉동보관하여 추후 발효공정에 사용코자 함</td></tr>
</table>

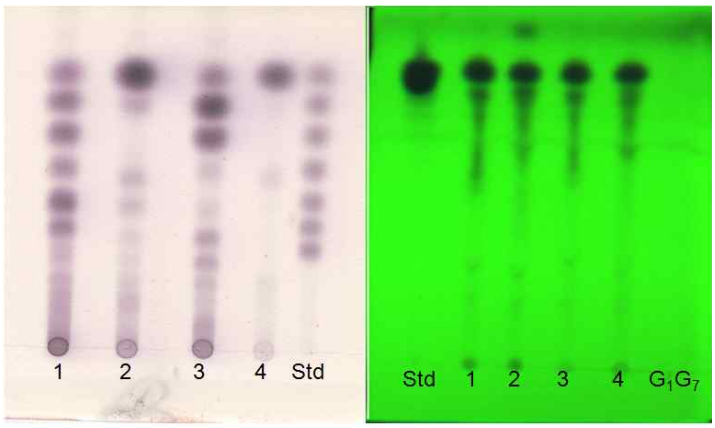
2) 2차년도

(1) 칡가루로부터 퓨라린의 추출

칡가루로부터 퓨라린을 추출할 때 효소를 이용한 방법과 용매로만으로 추출한 것을 비교하였다. 이 때 Termamyl, Termamyl + AMG, Termamyl + BBA, Termamyl + isomerase를 가하여 추출하였다. 용매로는 물, 100%메탄올, 80%메탄올, 100%에탄올, 50%에탄올을 사용하여 추출하였다. 그 결과 효소를 이용한 추출방법에서 1.5배~4배의 추출 효율상승을 보였다 (표 3-1; 그림 3-4).

<표 3-1> 효소를 이용한 퓨라린 추출수율 및 용매추출 수율

Enzyme	Puerarin concentration(g/100g)
TERMAMYL	0.6586
TERMAMYL+ AMG	0.71847
TERMAMYL+ beta-AMYLASE	0.64554
TERMAMYL+ ISOMERASE	0.703
WATER EXTRACT	0.26492
100% METHANOL EXTRACT	0.09494
80% METHANOL EXTRACT	0.4692
100% ETHANOL EXTRACT	0.02909
50% ETHANOL EXTRACT	0.34005



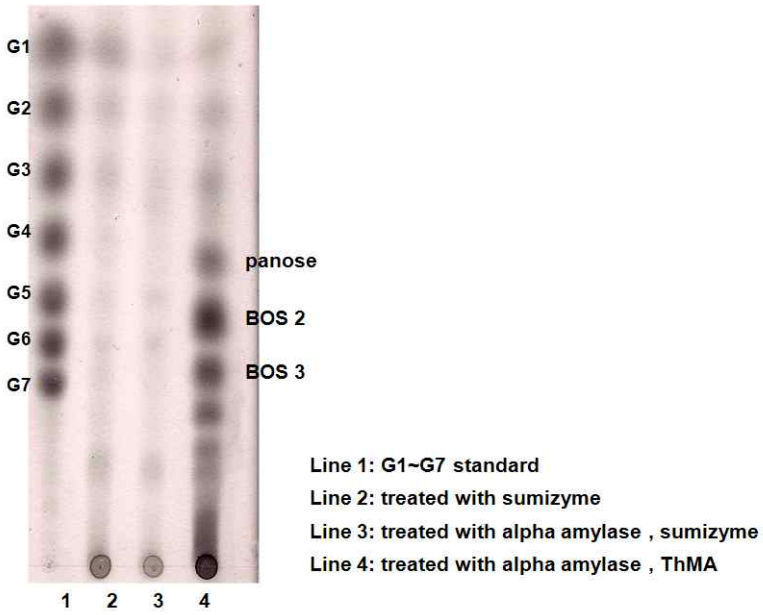
1. α-amylase
2. α-amylase+AMG
3. α-amylase+β-amylase
4. α-amylase+ AMG +isomerase

그림 3-4. TLC를 이용한 당과 퓨라린의 분석.

(2) 칡가루를 이용한 기능성 첨가물질 제조

- 효소를 이용한 퓨라린 및 분지올리고당 제조

칡가루(전분 15%함유)에 효소를 가하여 분지를 올리고당이 생성되게 하는 한편 퓨라린을 추출하여 분지올리고 당과 퓨라린이 동시에 함유된 포도주를 제조하였다. 이 때, 퓨라린 추출 수율을 높이기 위해 α-amylase와 분지올리고당 생성을 위해 말토제닉 아밀레이즈를 첨가하였다. 칡가루 30 g을 증류수 300 ml에 넣고 초 내열성 α-amylase (Termamyl)을 첨가한 후 90℃에서 1시간 autoclave 시킨 후 말토제닉 아밀레이즈 (ThMa)를 첨가하여 60℃~70℃에 반응시키고, yeast를 이용하여 포도주를 발효하였다. 퓨라린의 정량은 HPLC를 이용하여 측정하였고, 당 분석은 TLC를 사용하였다 (그림 3-5).

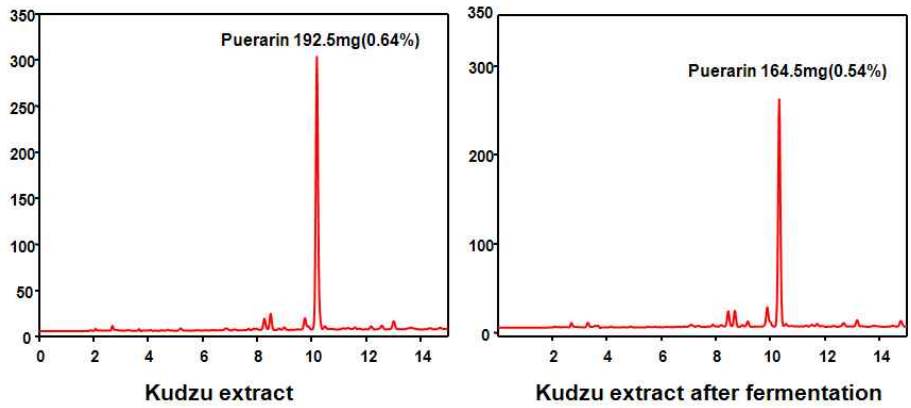


<그림 3-5> TLC를 이용한 효소 처리된 칡 추출물의 분지올리고당 분석

(2) 포도주 발효기간 중 지표물질 (퓨라린 및 분지올리고당)의 안정성

(1)에서 효소처리에 의해 제조한 용액에 효모를 첨가하여 5일간 25℃에서 알코올 발효 시킨 후 퓨라린 함량 및 분지올리고당 조성을 분석하였다. 그림 3-5에서와 같이 panose, BOS2, BOS3가 ThMA에 의해 생성되고 발효 후에도 잔존하고 있다. 퓨라린은 포도주 100 ml 당 10 mg이 포함된 것으로 분석되었다. 한편 그림 3-6에서와 같이 퓨라린 함량은 발효 후 약간 감소한 것으로 나타났다. 이는 발효가 완료된 포도주 용액으로부터 추출단계에서 손실이 발생한 것으로 생각된다. 이상의 결과로 포도주 발효과정에서는 퓨라린 및 분지올리고당이 매우 안정한 상태로 보존되고 있다고 생각할 수 있다. 분지올리고당은 이미 다양한 식품의 첨가제

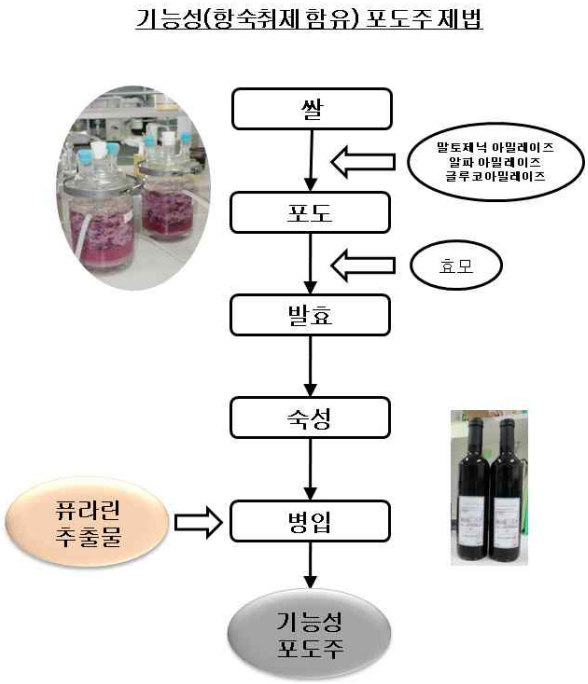
로 사용되고 있고 이소플라본계 화합물인 퓨라린도 식품첨가물로 인정되고 있으며 이소플라본의 1일 섭취량은 20 mg으로 권장되고 있다 (식품의약품안전청).



<그림 3-6> 추출 후 와 발효 후의 퓨라린을 HPLC로 측정

(3) 분지올리고당 및 퓨라린 함유 기능성 과실주(포도주) 제조

상기 (1), (2)의 결과를 종합 분지올리고당 및 퓨라린이 함유된 추출물을 병입단계에 첨가하여 기능성 포도주를 제조할 수 있는 방법을 그림3-7에 제시하였다.



<그림 3-7> 기능성 쌀포도주의 제조공정

(4) 제품의 품질 평가

- 포도주의 관능평가
  20명의 훈련된 패널들이 제시된 시료에 대하여 색, 향, 맛 그리고 전체적 기호도에 대하여 1점에서 5점까지 점수를 주어 평가하였다. 관능검사 결과 쌀-포도주는 포도주와 유의차가 없었다.

<표 3-2> 쌀포도주의 관능평가 결과

시료	칡	아황산
색	2.79±0.70	3.86±0.77
향	3.36±0.74	3.29±0.73
맛	2.79±0.70	2.86±0.86
전체적 기호도	3.00±0.78	3.29±0.83

전반적으로 '보통' 정도의 품질을 보이고 있었으며 위의 평가는 숙성 전의 값으로 숙성후의 값에 비하여 상대적으로 낮은 점수를 보이고 있다. 따라서 6개월 이상 숙성 후 관능평가를 실시할 계획이다.

<그림 3-8> 영동대 방문 : 관능검사 및 세미나 개최

3) 3차년도

(1) 포도주 Pilot공장 설립

- 시제품 생산 (제 2세부와 공동으로 추진함)

제 2세부와 A회사의 포도주제조 시설 및 지원을 받아 포도주 시제품 (2010년 10월 12일)으로 일반포도주와 쌀포도주를 생산하여 10℃에서 숙성시키는 중임.

표 3-3.

* 시제품의 품질 분석

	포도주	쌀-포도주
산도	0.62	0.63
pH	3.86	3.85
당도(Bx)	6.0	6.5
환원당	0.62	0.58
알코올(%)	9.6	11.6

- 포도주 생산양 : 2000 L (750 ml x 2,000병)

제조일 : 2010년 10월 12일,
숙성 : 40L 들이 숙성탱크(10℃)에 숙성중

<그림 3-9> 숙성과정 중의 쌀포도주

위탁과제 : 과실주의 기능성 분석

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차 연도	과실주의 기능성 지표 측정 *(in vitro)*	기능성 물질의 항산화 능력 평가.	• 과실주의 원료로 사용될 기능성 물질을 DPPH와 함께 반응시켜 라디칼 소거능력을 측정함. • TBA시약을 사용하여 기능성물질의 지방산화 억제 능력을 평가함(TBARS assya).
		기능성물질의 숙취해소효과 평가.	• 과실주의 원료로 사용될 기능성 물질을 알코올 대사효소인 ADH, ALDH에 에탄올과 함께 처리하여 효소의 알코올 분해 활성 측정함.
2차 연도	과실주의 기능성 물질의 숙취 관련 효과 평가 (*in virto & in vivo*)	간 세포를 이용한 기능성 물질의 간세포의 생존률에 대한 효과 측정	• MTT 실험을 통해서 기능성 물질과 기능성 물질을 함유한 전통주의 세포 생존률에 대한 효과 평가함.
		마우스를 이용한 급성 알콜 투여를 통해 혈중 알코올 농도 측정, 간(liver)조직 중 알코올 대사효소 (ADH)의 활성측정.	• 기능성 물질을 마우스에 알코올과 기능성물질(puerarin), 투여하여 시간대 별로 혈중 알코올 농도를 측정함.
			• 마우스(mouse)를 이용하여 기능성 물질과 알코올을 경구 투여 후, 특정 시간이 지난 후 알코올 대사효소(ADH) 의 활성 측정함.
		마우스를 이용한 만성 에탄올 투여를 통해 간 기능 지표(AST, ALT)의 측정, 지방간 개선 관련 지표 측정 (Autophagy activity)	• 마우스(mouse)를 이용하여 4주동안 기능성 물질과 알코올의 경구 투여 후, 혈액을 채취하여 혈액 내의 간기능 지표(AST, ALT)의 측정, 평가함.
			• 마우스(mouse)를 이용하여 4주동안 기능성 물질과 알코올의 경구 투여 후,

			western blot 방법을 이용하여 간에서 지방 대사를 조절하는 Autophagy activity의 활성 측정의 지표인 LC3 의 활성 측정.
		간 세포를(HepG2) 이용하여 지방간 개선 지표의 측정 (Autophagy)	• 기능성 물질인 puerarin이 간에서 지방 대사를 조절하는 Autophge의 활성에 어떠한 영향을 미치는지 Immunohistochemistry 실험을 통한 LC3의 발현 측정을 통해서 평가함.
3차 연도	과실주의 기능성 지표 측정 *(in vitro)*	알코올성 지방간 모델확립을 통한 지방간 예방효능 탐색	• MTT 실험을 통해 기능성 물질인 puerarin의 세포 생존률에 대한 효과를 확인
		Puerarin의 알콜성 지방간의 개선 및 억제능력 평가	• 간세포에 ethanol을 처리해 지방간을 유도하고 puerarin으로 세포내 cholesterol과 triglyceride의 변화를 확인
		간세포를 이용한 기능성 물질의 기전연구	• Autophagy 활성 마커인 LC3 단백질을 이용하여 ethanol로 유도된 지방간세포에서의 autophagy의 활성능 측정
			• Autophagy의 활성 경로 파악을 위하여 AMPK의 활성능 측정
			• 간기능의 회복이 autophagy에 의한 것인지 autophagy의 주요 경로인 mTOR의 활성을 4E-BP1과 S6를 통해 확인
			• mTOR의 억제를 통하여 autophagy가 활성이 되었는지를 APG7, Beclin-1, PIST, LAMP1, LAMP2 단백질을 통해서 확인

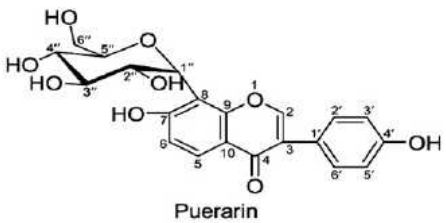
1) 1차년도

(1) 기능성 과실주의 후보물질의 선정

- 칡 (*Pueraria thunbergiana*)은 우리나라의 한방과 민간요법에서 약재로 널리 쓰이는 두과 식물로서 우리나라를 비롯한 동남아 각지에서 자생함.

- 예로부터 칡의 성분 중에는 해열, 숙취해소 해독 등과 같은 간장병에 관련된 약리 작용과 항산화 작용이 있는 것으로 보고됨.

- 특히, 칡에는 이소플라본의 일종인 puerarin (그림 3-10)이라는 생리활성 물질이 함유되어 있으며, 이 puerarin은 항산화 효능이 뛰어난 물질로 심근 손상을 막아 심장을 보호하고, 혈중 LDL-콜레스테롤의 수치를 낮추는 등 각종 이로운 효능을 가지고 있음.



<그림 3-10> Puerarin의 구조

- 항산화제로서의 조건은 수소를 제공할 수 있는 -OH 기를 가지고 있어야 하는데 그림 3-10에서 보인 바와 같이 puerarin은 많은 -OH 기를 가지고 있으며, 항산화효능에 대한 연구결과가 보고되어 있음.

- 특히, puerarin은 숙취해소 효능도 있는 것으로 알려져 기능성 과실주에 숙취해소 와 항산화 효능을 부여할 수 있는 최적의 후보물질로 판단됨.

- DPPH 와 TBARS assay를 통해 puerarin 의 항산화 효능을 규명하기 위해 칡에서 puerarin을 분리 및 정제 하였으며, 본 연구에 필요한 puerarin을 확보하였음.

(2) 항산화 관련 연구방법의 선정

- 본 연구진은 사전 실험을 통해 TBARS assay 및 DPPH 라디칼 소거작용 원리를 이용한 항산화측정의 연구기반을 마련하였으며, 이를 본 실험에 적용하였음.

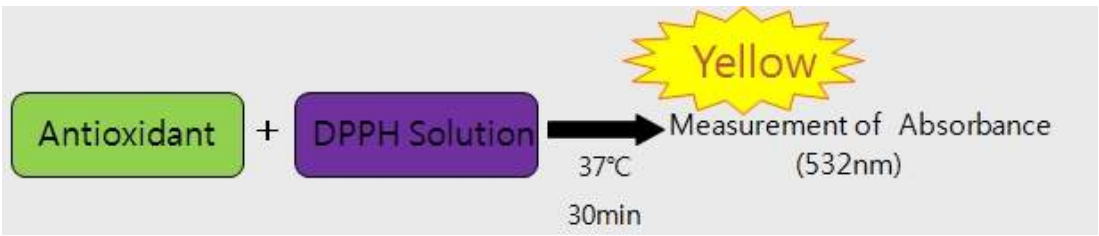
- DPPH 라디칼 소거능 측정

• DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 는 화학적으로 안정된 프리라디칼을 가지고 있는 물질로 그림 3-11과 같이 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 수소를 받아들이면서 라디칼이 소멸되고 환원되어 색깔이 변함.
• DPPH는 여러 종의 항산화 성분이 내재된 추출물, 음료와 오일, 페놀화합물 등의 항산화 효과를 분석 할 수 있음.

<그림 3-11> DPPH와 항산화제의 상호 작용 원리

• 본 연구에서는 DPPH 방법을 이용하여 puerarin 이 항산화제로서 작용하는지 여부를 측정하여, 기능성 과실주의 항산화제로서 이용하고자 함.

• Puerarin의 라디칼 소거능을 측정하기 위하여 <그림 3-12>와 같이 puerarin을 물에 용해시킨 후에 DPPH 시약과 37℃에서 30분간 반응시켜 532 nm에서 흡광도를 측정 함.

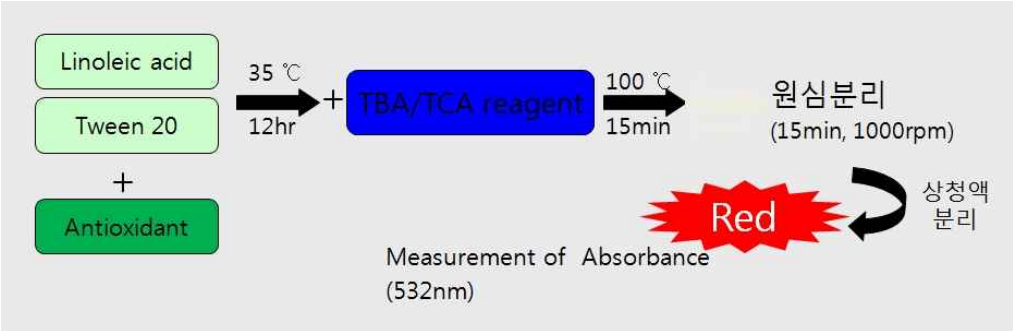


<그림3-12> DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능 측정방법

• 이렇게 얻어진 흡광도를 통해 항산화제로서의 puerarin의 효능을 측정할 수 있고, 기능성 과실주에 대한 적용 유무를 판가름 할 수 있을 것으로 사료됨.

- TBARS (Thiobarbituric acid reacitve substances) assay

• 자유라디칼은 lipid membrane을 공격하여 lipid peroxide를 생성함.
• 이러한 자유라디칼의 공격으로 lipid peroxidation이 일어나게 되면 malon-dialdehyde가 생성되고, 이 생성물을 지방산화의 마커로 활용하여 TBA 시약으로 측정할 수 있음.
• 본 연구에서는 puerarin이 malondialdehyde 생성을 억제할 수 있는지 여부를 측정하여, 기능성 과실주의 항산화제로서 이용하고자 함.
• Puerarin의 항산화 효능을 측정하기 위하여 그림 3-13과 같이 linoleic acid와 Tween-20을 혼합하여 emulsion을 만든 후 다시 puerarin과 혼합하여 35℃에서 12 시간 반응시킴.
• 반응이 끝나면 TBA/TCA 시약과 혼합하여 다시 100℃에서 15분간 반응시킨 후, 1,000rpm으로 15분 동안 원심 분리함. 상청액을 분리하여 532 nm에서 흡광도를 측정함.



<그림 3-13> TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substance) 측정 방법

(3) 항산화능력 평가실험 결과

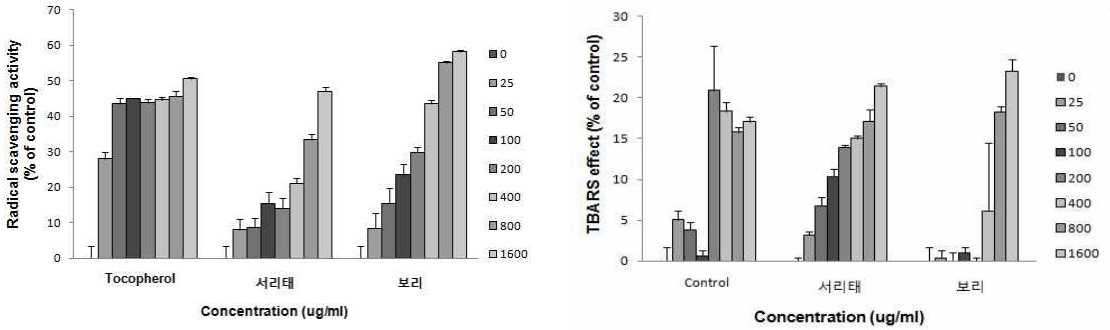
- 항산화 효능을 가진 기능성 과실주 개발을 위하여, DPPH 와 TBARS assay를 통해 기능성 과실주 후보물질의 항산화 능력을 평가하였음.

- 국내산 곡류(서리태, 보리) 및 칡에서 제조한 추출물을 이용하여 항산화 실험을 수행하였음.

① 서리태, 보리의 항산화 평가결과

- 그림 3-14은 국내산 곡류 추출물의 항산화평가 결과임.

(A) (B)



<그림 3-14> 항산화 활성측정법 최적화를 위한 기초예비실험. (A) DPPH를 사용한 농도별 토코페롤, 서리태, 보리의 항산화능력. (B) TBAR assay를 이용한 농도별 control, 서리태, 보리의 항산화능력.

- 대조군으로는 항산화 능력을 가진 것으로 알려진 토코페롤을 사용하였음.

- DPPH 실험결과, 서리태 및 보리는 농도가 증가함에 따라 항산화능력도 함께 증가하는 양상을 보임. 특히, 고농도에서는 토코페롤과 유사한 정도까지 라디칼을 제거하는 것으로 보여짐.

- 본 실험으로 최적화 된 방법과 결과를 바탕으로 기능성과실주에 첨가될 물질로 선정된 puerarin에 대한 항산화능력을 비교분석하고자 함.

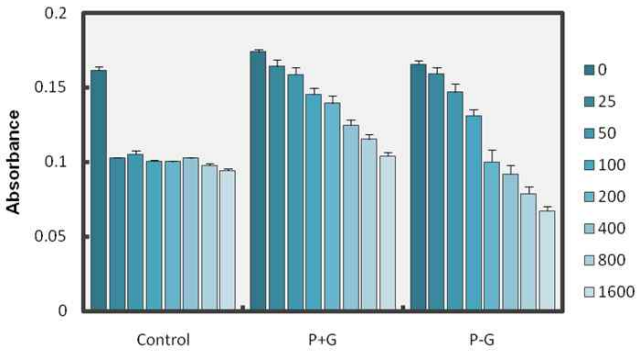
② Puerarin에 대한 항산화 능력 평가결과

- Puerarin의 DPPH radical 소거작용 평가 실험에서는 대조군으로 비타민C를 사용하고, 실험군으로 두가지 형태의 puerarin을 사용함.

- 'P+G'는 puerarin과 당이 결합된 형태로, 자연계에 존재하고 있는 일반적인 형태가 이에 속함. 반면 'P-G'는 효소공학기술을 이용하여 puerarin의 당을 전이시킨 형태로 puerarin의 단점인 낮은 수용성을 최대 178배까지 개선시킨 형태임.

- 실험결과, 항산화제로 알려진 비타민 C는 낮은 농도(25μg/mL)에서도 강력한 항산화능력을 보임 (그림 3-15). 단, 각 농도 사이의 항산화 정도의 차이는 본 실험범위에서는 나타나지 않음. 농도를 더 낮춰 실험 할 경우 차이가 나타날 것으로 예상됨.

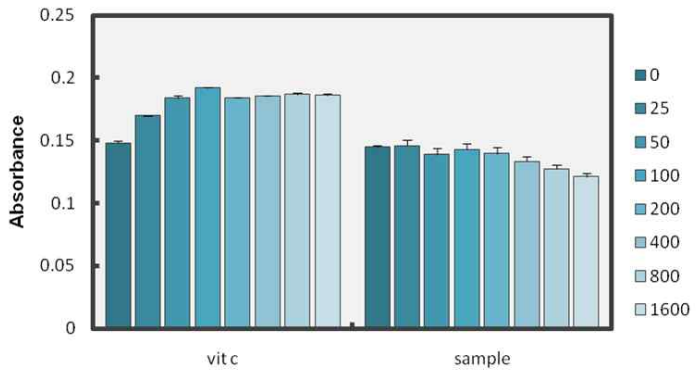
- 실험군의 경우, 두 그룹 모두 농도증가에 따른 라디칼제거 능력의 향상이 관찰됨. 특히, P-G군의 경우 농도 200μg/mL 이상에서는 대조군 이상의 효과를 보임.



<그림 3-15> DPPH radical 소거작용 평가

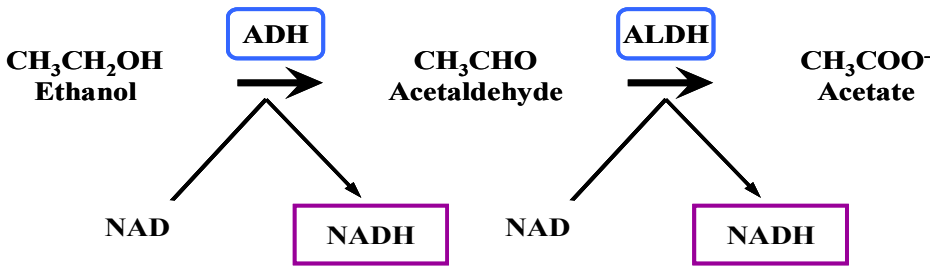
- 지방산화 억제효능 평가는 TBARS assay를 따랐으며 대조군으로 비타민C와 실험군으로 puerarin을 사용하였음.

- 그림-3-16에서와 같이 8가지 농도에서 실험을 하였으나, 효과가 뚜렷하게 나타나지는 않음. 인큐베이션 시간의 문제로 판단되어, 현재 본 성분(puerarin)에 적합한 실험조건을 확립하여 연구를 수행 할 예정임.



<그림3-16> TBARS assay

(4) 알코올 분해 효소인 ADH, ALDH의 활성 측정 방법의 선정



<그림3-17> ADH 와 ALDH에 의한 알코올의 대사기작

- 그림3-17과 같이 알코올을 섭취하면 체내에서 Alcohol dehydrogenase (ADH)에 의해 acetaldehyde로 분해되고, 다시 Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 에 의해 acetate로 분해됨.

- 이와 같이, 알코올을 분해하는데 직접적으로 관여하는 ADH와 ALDH의 활성을 측정함으로써 puerarin의 알코올 분해능 및 숙취해소효과를 평가할 수 있음.

- 본 연구에서는 알코올 대사과정에서 조효소인 NAD^+가 NADH로 생성되는 것을 흡광도를 측정하여 효소활성의 지표로 사용함.

- 산화된 형태의 NAD^+는 260nm, 환원형의 NADH는 340nm의 파장에서 흡수극대를 가지므로 UV 파장영역인 340nm에서 흡광도를 측정하므로 흡광도 측정 값의 차이로 인한 효소의 활성 정도를 평가할 수 있음.

- ADH, ALDH이 활성이 상승 할수록 알코올의 분해가 빠르게 진행 되어 숙취해소 능력이 향상되므로, puerarin 의 효소활성을 측정하여 숙취기능성 물질로의 이용여부를 판별함.

- ADH는 기질을 ethanol로 사용하였으며, ALDH의 경우 기질을 aldehyde로 사용하여 실험하였음.

(5) 구체적인 알코올 분해능력 실험 수행 방법

① ADH 활성평가

- ADH (Alcohol dehydrogenase) 의 활성도는 340nm에서 형성되는 NADH의 흡광도를 측정하여 나타냄.
  - *Saccharomyces cerevisiae* 로부터얻은 ADH는 ≥300units/mg protein의 단위를 지니며 D.W.에 용해시켜 농도 0.1mg/mL로 본 실험에 사용하였음.

- ADH는 수용액 상태에서는 쉽게 산화되며 정확한 효소활성 측정을 위해서 단시간 내에 측정 하는 것이 요구됨.

- β-Nicotinamide adenine dimucleotide 또한 수용액 상태에서는 빛에 민감하게 반응하여 쉽게 산화되므로 빛에 노출되지 않도록 주의가 필요함.

- 효소의 활성에 영향을 미치는 주요 요인으로서 온도와 pH를 적절하게 유지해야 하므로 pH8.8의 1.0M tris-HCl buffer가 필요하며 효소를 첨가하기 전 단계에서

incubation이 요구됨.

- 흡광도를 측정하기 전 효소, 기질, puerarin 혼합물을 효소의 적정 활성온도인 30℃에서 5~7분간 반응시킴.

- 실험군의 경우 당 전이가 이루어지지 않은 형태의 Puerarin을 ethanol에 용해시켜 0.1mg/mL, 0.005mg/mL, 0.002mg/mL, 0.001mg/mL의 농도 범위를 지정하여 각각 효소 활성의 차이를 판별.

- 대조군으로는 Puerarin이 포함되지 않은 순수 ethanol을 사용하고, 효소의 활성 여부를 판단하고자 효소가 포함되지 않은 또 다른 대조군을 지정함.

- 반응물 조성은 다음과 같으며 최종 부피는 1 mL로 설정하여 흡광도를 측정함.

Reagent	Volume (㎕)
1.0M Tris HCl Buffer (pH8.8)	250
Ethanol(99%)	100
Enzyme(0.1g/mL)	50

- 본 연구에서는 효소를 제외한 나머지 반응물을 넣고 30℃에서 5~8 min 동안 반응시킨 후 효소를 넣고 바로 340nm에서 흡광도를 측정하여 초기 반응부터의 효소 활성을 측정하고 본 연구는 최소 3반복 이상의 흡광도 측정 시행.

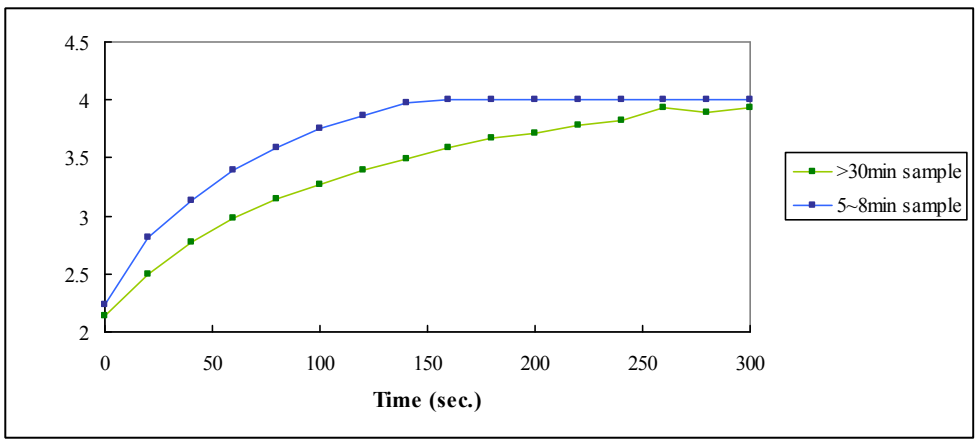
② ALDH 활성평가

- ALDH 효소 활성 측정 실험법은 ADH의 측정법과 마찬가지로 340nm에서 흡광도를 측정.

- 사용된 반응물의 비율은 다음 표에 제시되어있음.

Reagent	Volume (㎕)
D.W.	700
1.0M Tris HCl Buffer (pH8.0)	100
20mM NAD^+	33
1.0M Acetaldehyde	33
3.0M KCl	33
0.33M 2-Mercaptoethanol	33
Sample	33
Enzyme(0.1g/mL)	33

- ALDH의 경우 증류수에 효소를 용해시키고 난 후 효소 활성이 ADH에 비해 급격히 떨어지는 경향을 보임. 따라서 효소를 제외한 다른 반응물의 30℃에서의 반응 시간이 10분 이상 지속되지 않도록 주의가 요구됨.



<그림3-18> Incubation 시간에 따른 효소 활성 비교

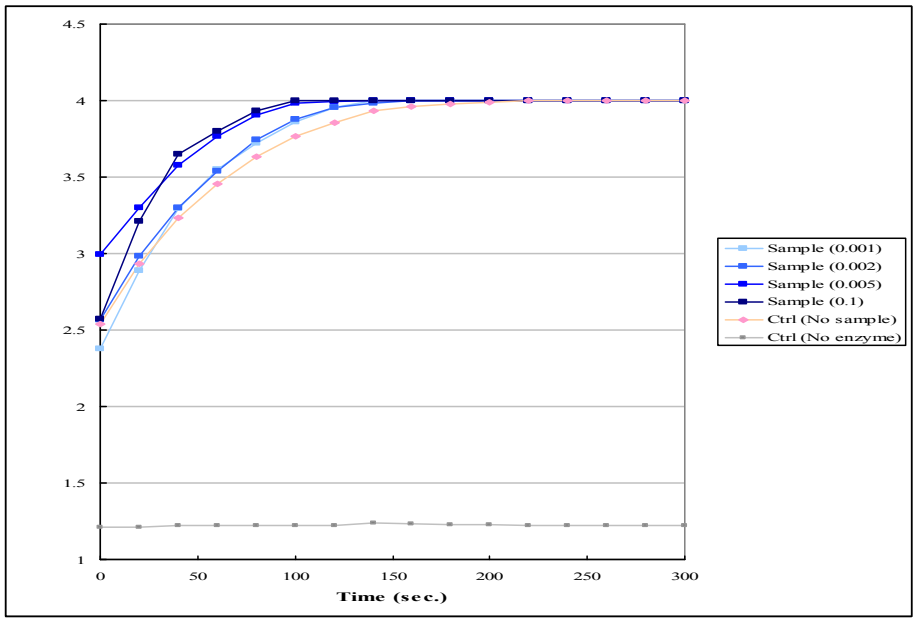
- 그림3-18는 0.001 mg/mL 농도의 Puerarin이 포함된 실험군으로 한 그래프는 30 분 이상 30℃에서 반응 시킨 경우이고, 다른 한 그래프는 같은 농도 범위의 실험군을 5-8 분 정도 30℃에서 반응 시킨 경우로 효소에 대한 반응 정도가 현저히 저하되어있음을 보여줌.

(6) Puerarin의 ADH, ALDH 활성 효능 평가 결과

① ADH 활성평가 결과

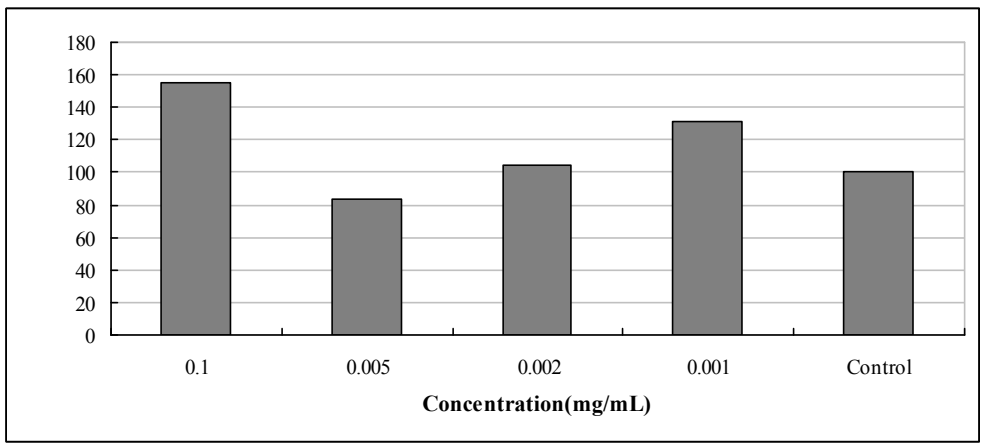
- 그림3-19에서 나타나 있듯이 puerarin이 포함된 실험군의 경우 최종 반응에 도달하는 시간이 대조군과 비교하여 짧음을 알 수 있음.

- 초기 반응속도가 빠른 것은 NADH가 빠르게 생성되었다는 것을 의미하며, 이는 puerarin에 의해 ADH의 활성이 증가해, 반응속도 역시 증가하였음을 의미함.



<그림3-19> ADH 흡광도 측정 결과

- 그림 3-20은 초기반응의 구간을 비교하여 시간에 따른 흡광도의 변화량을 비교한 그래프임. 초기 40 초까지의 반응을 대조군을 100%로 놓고 비교하였음. 대부분의 농도에서 puerarin이 첨가된 실험군이 대조군에 비해 높은 값을 나타내며 이는 효소의 활성이 증가하였음을 의미함.



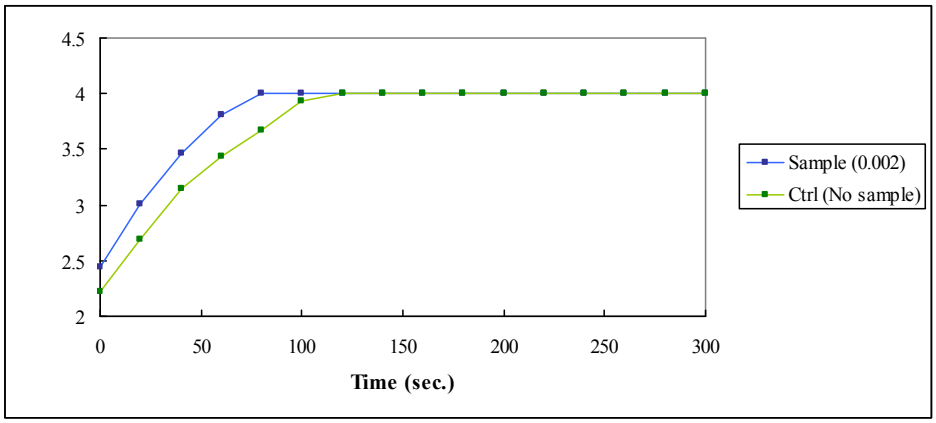
<그림3-20> 농도별 ADH의 초기반응속도 비교 결과

- puerain의 농도가 0.1과 0.001일 때 효소의 활성이 가장 효율적으로 증가한 것으로 나타남.

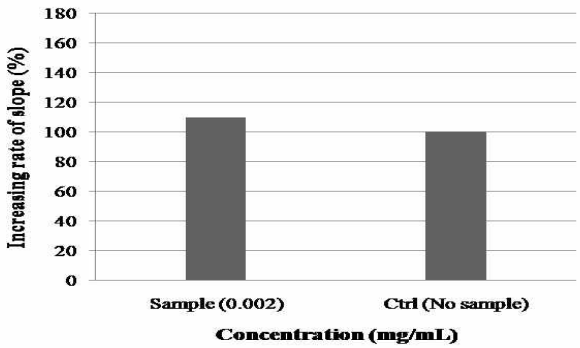
- 차년도 동물실험에서는 본 실험결과를 바탕으로 적정 농도(0.1 혹은 0.001 mg/mL)를 선별하여 마우스와 렛에 경구투여 할 계획임.

② ALDH 활성평가 결과

- 현재까지의 실험결과에서는 ADH실험과 같이 puerarin이 첨가된 그룹의 경우 NADH가 생성되는 속도가 대조군에 비해 빠른 것으로 나타났으며 이는 puerarin이 ADH뿐만 아니라 ALDH의 활성에도 영향을 미치는 것으로 분석됨 (그림3-21 및 그림3-22).



<그림3-21> ALDH 흡광도 측정 결과



<그림3-22> ALDH의 초기 반응속도 비교

- 기타 농도에 대한 ALDH 의 활성 효능 평가로 차년도 동물실험에 적합한 농도를 선별하는데 사용할 예정임.

(7) 최종결론

- 본 연구진은 *in vitro* 상에서 기능성 과실주 후보 물질에 대한 항산화 능력평가 실험 기반을 확립하였음.

- 항산화 능력평가 실험 결과, puerain은 농도가 상승함에 따라 라디컬 제거능력도 함께 상승하는 경향을 보였으며, 자연계에 존재하는 puerain보다 효소공법으로 당을 제거한 puerain의 경우 그 효능이 더 뛰어나 농도 200μg/mL 이상에서는 비타민C에 준하는 효과를 보임.

- 본 연구진은 *in vitro* 기능성 과실주 후보 물질에 대한 숙취 해소능력 평가 실험 기반을 확립하였음.

- 숙취 해소능력 평가 실험결과, puerarin을 첨가한 결과 그렇지 않은 경우에 비해 농도별 차이는 있었으나, 전체적으로 ADH 효소 활성이 증가하여 기능성 과실주의 원료로서의 조건을 갖춘 것으로 판단됨.

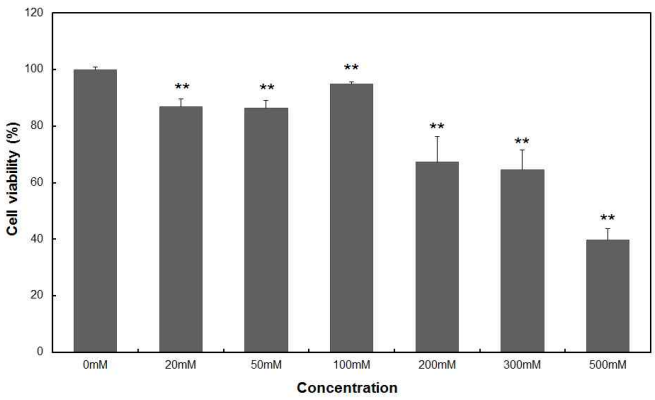
- 차년도에는 본 실험결과를 반영하여 적정 농도를 선별, *in vivo* 실험으로 puerain의 숙취해소능력을 평가하고자 함.

2) 2차년도

(1) 기능성 과실주의 기능 물질인 퓨라린 (puerarin)이 간세포 (H4IIE)의 알코올 (Ethanol)에 대한 세포의 생존률 향상 효과 측정.

- 과실주의 기능성 물질로 선정된 퓨라린이 에탄올 처리한 간조직 세포에서 세포의 생존률에 영향을 미치는 지를 측정하기 위해서 MTT assay를 통한 세포의 생존률을 측정함.

- H4IIE 세포에서 에탄올 처리농도에 따른 생존률을 알아보기 위해 에탄올 농도가 각각 0 mM (Control), 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM 일 때의 세포의 수를 control에 대한 상대적인 비로 나타내어 생존률 측정 결과를 분석함 (그림 3-23).



<그림3-23> Ethanol 농도에 따른 H4IIE 세포의 생존률

- 위의 결과와 같이 200 mM 이상의 Ethanol 농도에서 세포의 생존률이 급격하게 감소하였고 본 실험 조건에서 100 mM 처리까지는 커다란 생존률 변화를 보이지 않았다.

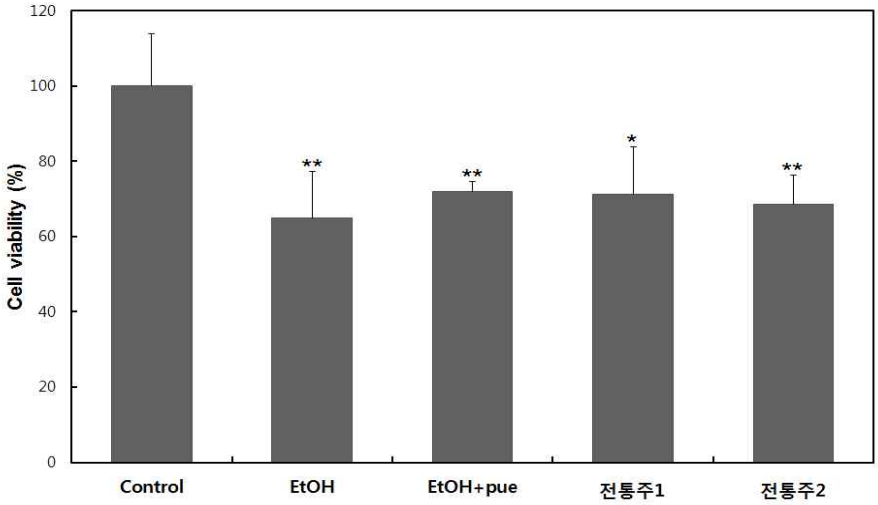
- 따라서 200 mM 의 Ethanol 농도일 때 세포의 생장이 저해를 받는다는 가정 하에, 200 mM의 Ethanol과 Puerarin, puerarin을 함유한 전통주, puerarin을 함유하지 않은 전통주Ⅱ를 함께 첨가 하여 각각의 성분들이 세포의 생존률에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하였음.

- 실험 수행 시 각각의 전통주 시료는 전통주를 동결 건조하여 획득한 분말을 사용하여 실험을 수행하였다.

- 실험 수행 시 첨가된 Puerarin의 농도는 200 ug/well 로 처리하였음. 본 실험실에서 이전에 실험한 결과에 의하면 이 농도에서 간조직 세포의 생존률이 변화하지 않았음. 각각의 sample의 농도에 따른 variation을 줄이기 위해서 전통주Ⅰ,Ⅱ 건조 분말의 농도도 동일하게 처리하였다.

- 결과: 무처리 양성 대조군과 에탄올 처리한 음성대조군에 대한 상대적인 생존률을 측정한 결과 아래 표와 같이 에탄올 처리 후 각 물질을 처리한 경우, 양성대조군>puerarin >전통주>전통주Ⅱ>EtOH group의 순서로 생존률이 높게 나타남. 즉 에탄올 처리군에 비해 전통주를 추가로 처리했을 때 세포 생존률이 다소 증가하는 결과를 보였다 (그림 3-24).

- 통계적으로 유의성을 보이진 않았지만, EtOH 처리 그룹에 대하여 각각 Puerarin 그룹 11%, 전통주Ⅰ그룹 10%, 전통주Ⅱ 6%정도의 생존률 향상의 모습을 보였다.



<그림 3-24> Puerarin과 전통주 처리한 H4IIE cell의 ethanol에 대한 생존률

- 위의 결과를 참고로 Puerarin이 세포의 생존률을 유의적으로 향상 시키며 puerarin이 첨가된 전통주 또한 세포의 생존률에 긍정적인 작용을 한다는 것을 알 수 있음. 그리고 puerarin이 첨가 되지 않은 전통주 또한 세포의 생존률에 긍정적인 효과를 보인다는 사실을 확인하였음.

- 위의 실험 결과들을 토대로, 퓨라린과 전통주1이 EtOH에 의한 cell의 생존률의 감소를 다소 억제하는 효과를 보여주었음 전통주2 또한 puerarin보다는 약하지만 EtOH에 대한 Cell의 생존률 감소를 다소 완화 시켜주었음.

(2) Mouse를 이용한 혈중 Ethanol농도와 간 조직의 ADH활성 측정 실험
(Acute alcohol consumption)

- 실험 개요: 과실주의 기능성 성분이 함유된 고형분과 Puerarin의 숙취 관련 기능을 알아 보기 위해서 마우스를 3개의 Group으로 나누어 각각의 마우스 군에 Ethanol과 각각의 과실주 기능성분 및 퓨라린을 경구 투여한 후, 혈중 Ethanol농도와 간조직의 알코올 분해 효소 (ADH)의 활성을 측정함.

※ 실험 방법:

- 6 ~ 8 주령의 C57BL/6 마우스를 아래의 표와 같이 3개의 group으로 나누어 실험 수행

<표 3-4> 단회 에탄올 투여에 의한 급성 에탄올 대사 실험을 위한 그룹 분류

Group	마리수(n)
EtOH (5g/kg BW)	4
EtOH (5g/kg BW)+ Puerarin (200mg/kg BW)	3
EtoH (5g/kg BW) + 전통주 I (200mg/kg BW)	4

- 각각의 실험에 사용된 Ethanol 투여 농도는 각 물질이 *in vivo* 에서 활성을 나타 낼 수 있는 농도를 기 발표된 논문자료를 검토하여 선정하였음.

- 선정된 투여 농도에 따라 에탄올 경구 투여 시 Puerarin 및 간세포 보호효과가 더 좋았던 전통주 I 의 추출물도 각각 함께 경구 투여하였음
- 시간에 따른 혈중 알코올 농도를 측정하기 위해 경구 투여 후, Avertin으로 마취 시킨 상태에서 안구 채혈을 통하여 경구 투여 2, 5 시간 후 혈액 채취 하였다. 채혈한 혈액은 600 g에서 15분간 원심 분리 하여 혈청을 분리 하여 Ethanol농도 측정과 혈중 간 기능 지표 (AST, ALT) 측정에 사용.

- 실험동물은 일중 변동을 고려하여 알코올 투여 후 24시간째에 희생 시켰고, 간 조직을 적출 하여 표면에 묻은 이물질 제거 후 알코올 대사효소 (ADH) 측정을 위해서 -80°C 에서 냉동고에 보관 하였다.

① 혈액 중 알코올 농도 측정
- 혈중 알코올 농도는 원심 분리 하여 얻은 혈청을 이용하여, Ethanol assay kit를 통하여 혈중 알코올 농도를 측정하였다.

② 간 조직 중 알코올 대사효소 활성 측정
- 적출한 간 조직은 4°C 하에서 절편으로 만들고 그 중에 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 20% (w/v) 마쇄 균질액을 만들었다. 이 균질액을 원심 분리 하여 cytosol 분획을 얻었다.

- 간 조직중 alcohol dehydrogenase (ADH) 활성도는 기질인 알코올과 조효소인 NAD^+ 로부터 5분간 생성되는 NADH의 흡광도를 340 nm에서 측정하였다.

- Cytosol을 넣지 않은 그룹과, 알코올을 넣지 않은 그룹을 각각 대조군으로 설정 하였다.

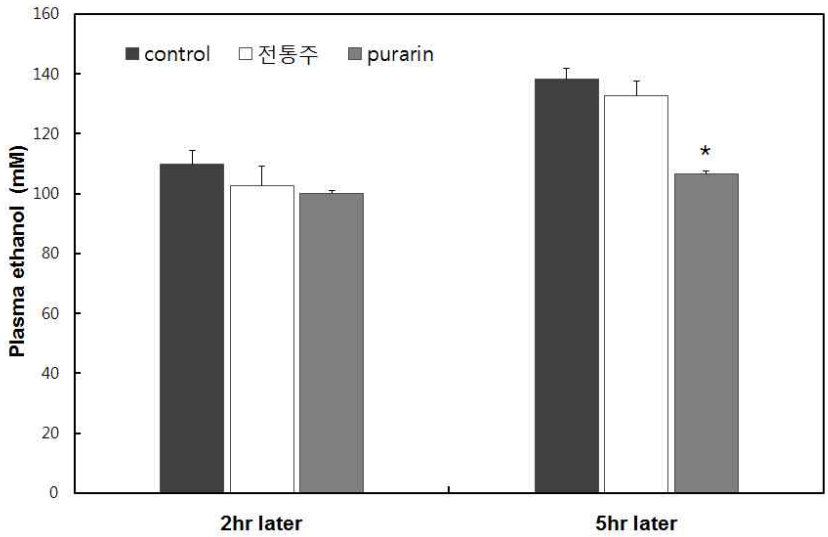
③ 혈청 중의 간 기능 지표효소 활성의 측정
- 혈정 alanine aminotransferase (ALT), aspertate aminotransferase (AST)의 활성은 Cobas

C111 자동분석기를 사용하여 흡광도 측정을 통한 방법을 이용하여 측정.

※ 실험결과

① 혈중 알코올 농도

- 알코올과 각각의 성분 경구 투여 각각 2 시간, 5 시간 후의 Ethanol 농도를 측정한 결과 <그림 3-25> 같은 결과를 보였다.



<그림 3-25> 경구 투여 시간에 따른 혈중 알콜 농도

- 실험 결과, puerarin과 전통주 I 성분을 함께 투여한 그룹들이 에탄올 섭취한 그룹에 비해 혈중 알코올 농도가 에탄올 섭취 2시간 경과 후에는 puerarin 그룹이 9%, 전통주 투여 그룹이 5% 낮게 나타났으며, 5시간 경과 후에는 puerarin 그룹이 23%, 전통주 투여 그룹이 7% 낮게 나타났다.

- 이러한 결과들을 통해서 puerarin과 puerarin을 함유한 전통주가 혈중 알코올 농도를 감소시키는 효과를 가지고 있다고 할 수 있다.

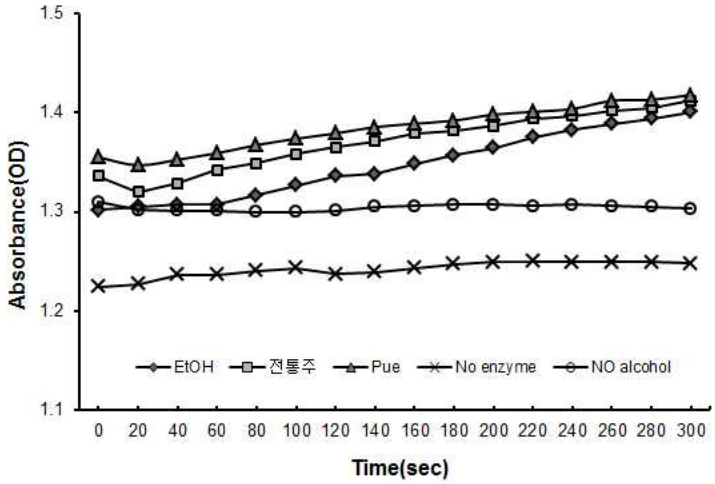
② 각 조직중의 알코올 분해효소의 활성에 미치는 영향

- 최종 흡광도가 높을수록 많은 양의 NADH가 생성되었다는 것을 뜻하고, 이는 ADH의 활성이 증가해, 반응 속도 또한 증가하였음을 나타낸다.

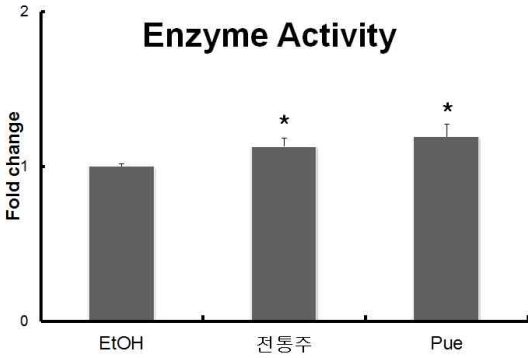
- 그림 3-26에서와 같이 puerarin과 전통주 I 이 포함된 실험군의 경우 최종 흡광

도가 EtOH만을 처리한 그룹에 비해서 높게 나타나기 때문에, ADH의 활성도가 EtOH group에 비해서 더 높다는 것을 나타낸다.

- 그림 3-27과 같이 ADH의 최종 흡광도와 대조군의 흡광도 차이를 이용하여 효소의 활성을 측정 해 본 결과, EtOH 그룹보다 퓨라린과 전통주 I 처리 그룹의 효소 활성이 유의적으로 크게 나타났다. 따라서, 퓨라린과 전통주 I 성분이 간 조직에서의 알콜 분해 관련 효소의 활성을 증가 시킨다는 결론을 내릴 수 있다.



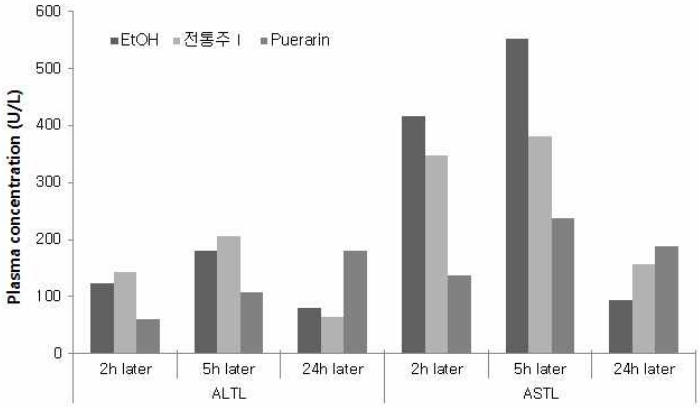
<그림3-26> ADH 흡광도 변화 곡선. 전통주는 전통주1을 의미함. Pue는 퓨라린 투여군, EtOH, No enzyme, No alcohol은 각각 에탄올만 처리한 군, ADH효소를 첨가하지 않고 측정한 대조군, 에탄올을 투여하지 않은 군을 나타냄.



<그림3-27> 각 그룹의 ADH의 최종 흡광도와 대조군(No enzyme)의 비교를 통한 효소의 활성. EtOH 그룹에 비해 전통주 I 과 퓨라린 처리 그룹의 ADH 활성도가 유의적으로 높게 나타났다.

③ 혈액 중 AST와 ALT의 활성의 변화

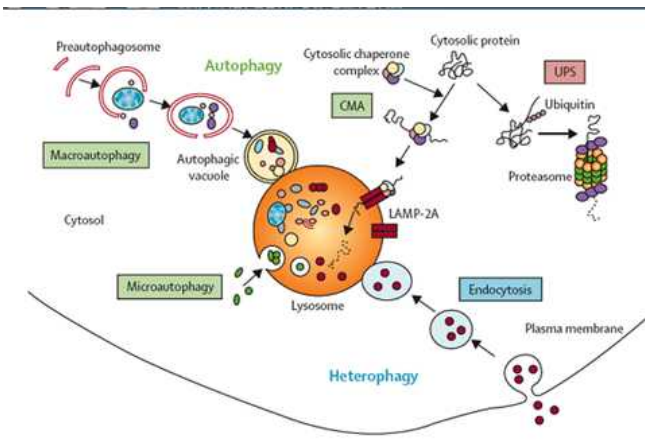
- 본 실험에서 Puerarin과 전통주 I 추출물을 단회 투여후 AST 및 ALT의 활성에 큰 차이는 없었다 (그림 3-28). 기타의 기 발표된 다른 논문들 에서도 1회 투여만으로 AST와 ALT의 유의적인 변화는 관찰 되지 않은 것으로 나타나 있다. 따라서, Puerarin과 전통주 I 의 AST와 ALT에 대한 효과는 장기적인 Ethanol과 기능성 성분의 투여를 통해서 연구를 진행 할 것이다.



<그림3-28> 급성 알콜 경구투여에 따른 시간별 간 기능지표 (AST, ALT)

(3) 간 세포 (HepG2 cell)를 이용한 Autophagy activity 측정

※ Autophagy: Autophagy 는 세포 생물학적 용어로써 autophagocytosis라고도 불린다. 이것은 lysosomal 메커니즘을 통해서 세포 자신의 성분의 분해를 포함하는 catabolic 작용이다. 이것은 세포의 생성물의 합성, 분해, 그 후에 일어나는 세포 생성물의 재활용의 유지를 돕기 위해서 세포의 성장, 발전, 항상성을 엄격하게 조절하는 과정이다 (그림3-29).



<그림 3-29> Autophagy network

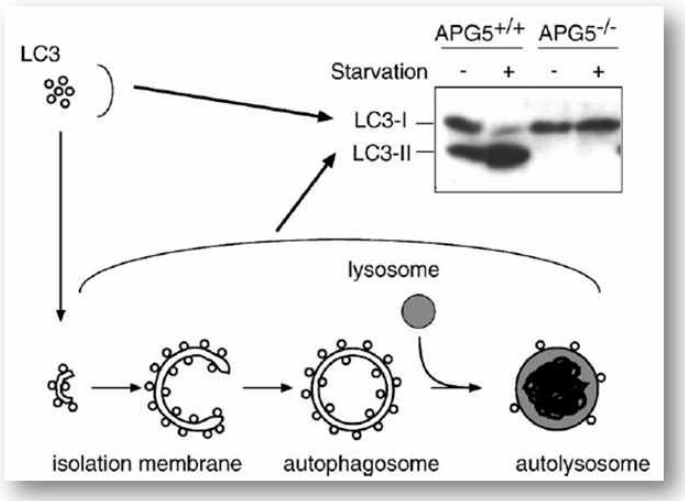
- Autohagy의 주요 기작은 굶주린 세포에서 불필요한 영양소를 영양소가 필요한 부분으로 재분배하는 것으로 다양한 종류와 다양한 기능을 하지만, 가장 보편적인 기능은 그림 3-29과 같이 lysosomal activity를 통한 세포내의 구성물질의 분해이다.

- 최근 autophagy가 지방대사를 조절한다고 하는 연구 결과가 발표되었으며 장기적인 알콜 투여, 고지혈증, 비만 등으로 손상된 간 조직에서는 autophagy 활성이 저해되며 약물, 식이요법, 기능성물질 투여에 의해 autophage 기능을 회복하는 것이 간 기능을 회복하는데 중요한 방법임이 제시되었음 (Singh et al., 2009, Nature 458).

- 따라서, 우리는 에탄올 투여로 인해 손상된 간 조직에서 autophagy의 활성이 저해되며 퓨라린 및 전통주 기능성물질의 투여로 autophage 활성이 회복되는 것이 간 기능 개선과 상관관계를 보일 것이라는 가정 하에 실험을 수행하였음 .

- ATG5는 autophagy의 합성과 관련된 단백질로써, ATG12와 결합하며, Autophagy의 활성화 형태인 Aophagosome의 형성에 관여한다. ATG12-ATG5결합체는 세포막 분리단계에서 세포막에 부착 되었다가 Autophagosome의 합성에 관여하여 Autophagosome의 합성이 완성된 직후나 직전에 세포막에서 분리된다. 따라서 ATG5는 Autophagy의 활성에 필수적인 역할을 한다고 할 수 있다.

- 이러한 Autophagy의 활성을 측정하기 위해서 광범위하게 사용되고 있는 LC3 단백질을 autophagy 활성의 생물지표로 선정하고 western blot 과 Immunohistochemistry 실험을 통해서 에탄올 및 퓨라린/전통주 기능성물질 투여 시 간세포에서 LC3의 발현을 측정하였음 (그림 3-30).



<그림3-30> Autophagy의 marker LC3

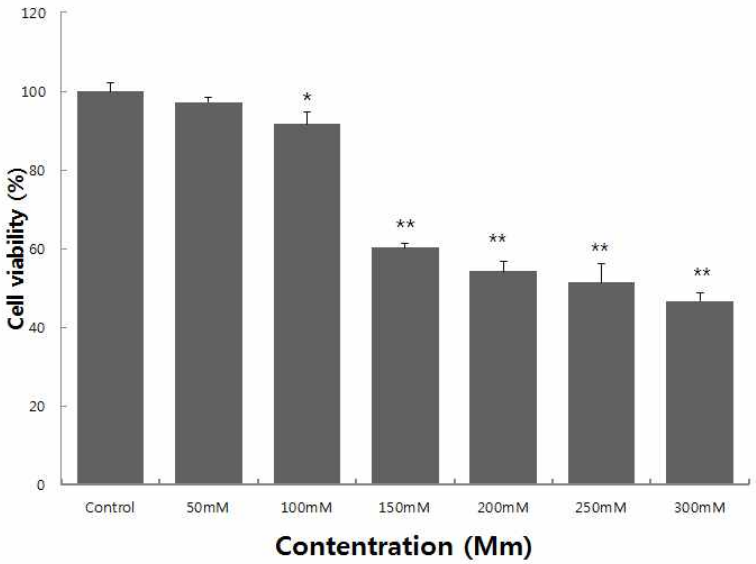
- LC3는 Autophagy의 활성화 상태인 autophagosome의 membrane에 존재하는 단백질로, autophagy의 활성이 높을수록 LC3의 발현은 증가 한다.

- Ethanol 투여 시 일반 적으로 cell에서의 autopahgy activity는 감소하는 경향을 보인다. 이것은 ethanol이 cell에서 autophagy activity를 활성화 시키는 단계를 억제 시키는 효과를 나타내기 때문인 것으로 보고되고 있음.

- 이 실험의 목적은 puerarin이 Ethanol에 의해서 감소된 autophagy의 activity에 어떠한 영향을 미치는 가를 관찰하고, 최종적으로는 puerarin이 autophagy activity 활성화의 어떠한 단계에 영향을 미치는지를 확인 하는 것 이다.

※ 실험 방법:

- 우선 HepG2 cell의 생존률에 영향을 미칠 수 있는 Ethanol의 농도를 알아보기 위해서 배지에 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM의 Ethanol을 첨가하여 MTT를 수행하여 HepG2 cell의 생존률이 ethanol 농도가 150 mM 일 때 급격히 감소함을 확인하고 세포주에서 에탄올 처리 농도를 선정하였음.



<그림3-31> Ethanol 농도에 따른 HepG2 cell의 생존률 변화

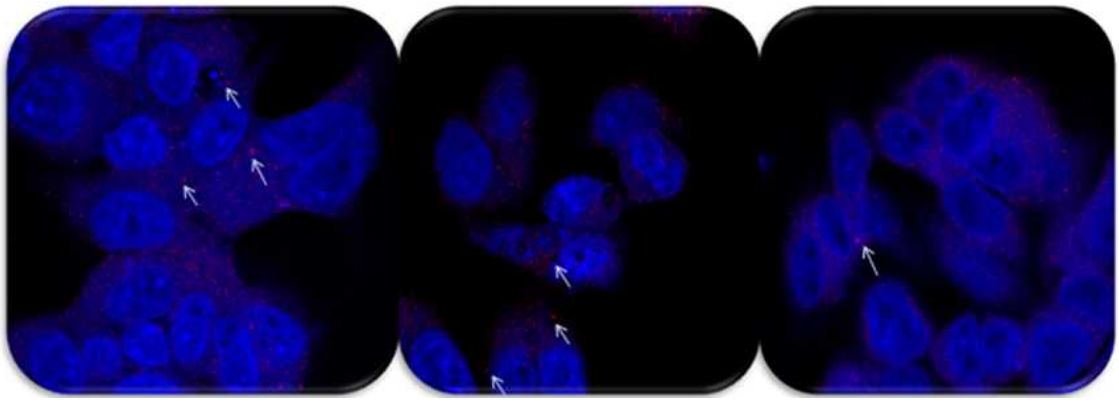
- 따라서 cell에 처리 하는 ethanol의 농도를 150 mM으로 정하였고, 6 well의 각 well당 처리하는 puerarin의 농도는 본 실험실의 연구결과에 따라 200 ug/well로 하였다.
간략한 실험방법은 다음과 같았음.

- HepG2 Cell을 6well 위의 slide cover glass 에 배양한 후, Cell에 150mM의 Ethanol을 함유한 배지로 처리한다. 처리 후, 4% paraformaldehyde로 세포를 고정한 후, LC3 primary antibody에 incubation 시킨다. 세포를 완충용액으로 세척한 후, 붉은색 파장의 빛을 나타내는 형광 Alexa fluor® 633 secondary andibody에 incubation 시킨다. 세포 내 핵을 DAPI 염색시약으로 염색함.

- 커버글라스를 slide에 부착하여 슬라이드 제작을 완료한 후, confocal 현미경으로 염색된 세포를 관찰하였다.

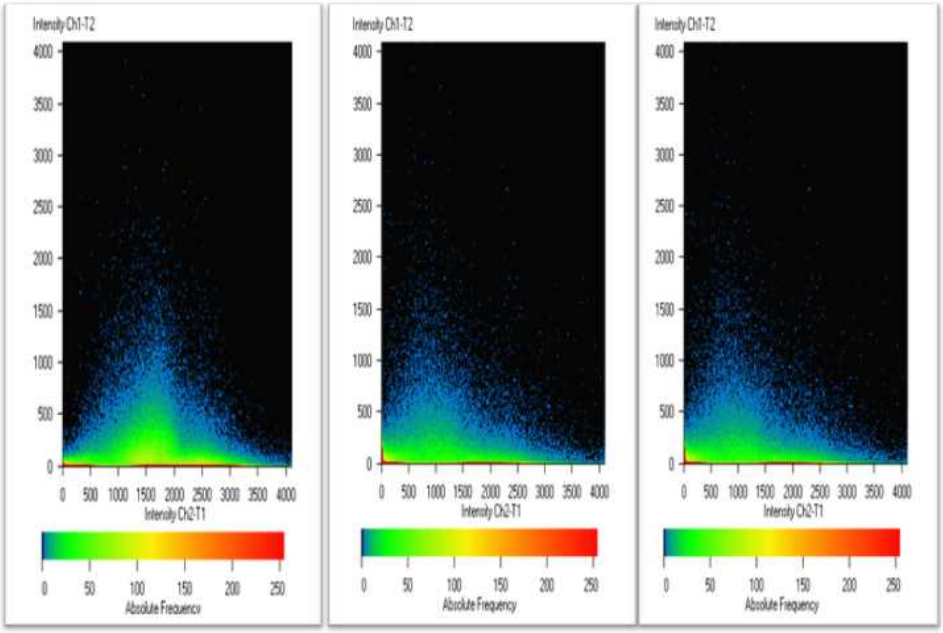
- 현미경 관찰을 통해 얻은 이미지는 이미비분석 프로그램을 통해서 2D 와 3D 형태로 분석 하여 염색 대상 단백질인 LC3 및 핵의 염색정도를 분석하였다.

※ 결과:



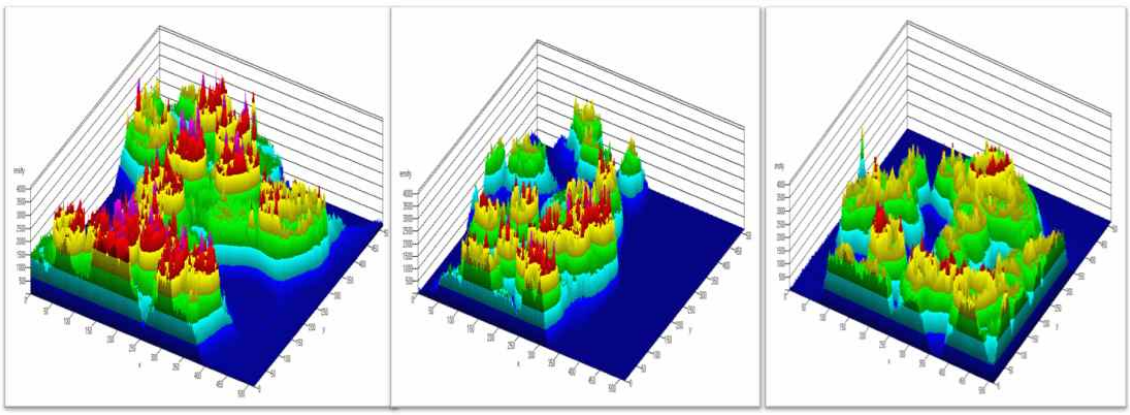
<Control group> <Puerarin group> <EtOH group>

<그림 3-32> LC3 antibody와 DAPI 염색을 통한 세포의 IHC 이미지. Control은 무처리군, 퓨라린은 에탄올 처리 후 퓨라린을 처리한 군, EtOH는 에탄올 처리만 한 군을 나타냄. 파란색은 DAPI에 의해 염색된 핵이며 붉은색으로 나타난 작은 점(화살표 표시된 부분)이 LC3 단백질의 위치를 볼 수 있음. 붉은색 출현 빈도는 간조직 세포주 내에 발현된 LC3 단백질량을 나타냄.



<Control group> <Puerarin group> <EtOH group>

<그림 3-33> 간조직 세포 중 LC3 단백질 발현의 2D분석. 왼쪽부터 오른쪽으로 각각 대조군, Puerarin, EtOH 그룹 순으로 나타내었음. Control은 무처리군, 퓨라린은 에탄올 처리 후 퓨라린을 처리한 군, EtOH는 에탄올 처리만 한 군을 나타냄



<Control group> <Puerarin group> <EtOH group>

<그림3-34> 간조직 세포중 LC3 단백질 발현의 3D 분석. 왼쪽부터 오른쪽으로 각각 대조군, Puerarin, EtOH 그룹 순으로 나타내었음. Control은 무처리군, 퓨라린은 에탄올 처리 후 퓨라린을 처리한 군, EtOH는 에탄올 처리만 한 군을 나타냄.

- 본 3D image 분석결과에 따르면 각 그룹사이의 붉은 색의 발현 차이를 확인 할 수

있다. 파란색은 DAPI에 의해 염색된 핵을 나타내고, 붉은 색 점은 Alexa fluor 633® 에 의해 염색된 LC3 단백질을 나타낸다.

- 붉은색 점의 빈도가 높을수록 LC3 단백질이 많이 존재하고 이것은 Autophagy의 activity가 높다는 것을 의미한다.

- 무처리 대조군의 경우 autophagy 활성지표인 LC3 발현이 정상수준임을 볼 수 있으며 에탄올 처리군의 경구 LC3의 발현이 확연히 감소하는 것을 확인할 수 있음.

- LC3 단백질의 발현이 control > puerarin > EtOH 그룹 순으로 감소하는 것을 알 수 있으며, 이는 간조직 세포내에서 autophagy 활성을 나타냄.

- 위 실험의 결과로 에탄올이 간세포에서의 autophagy의 활성을 감소시키며, 퓨라린이 에탄올에 의한 autophagy 활성 감소를 완화 시킨다는 것을 알 수 있으며 이를통해 퓨라린이 간조직 활성개선에 도움을 줄 수 있음을 확인함.

- 즉, 에탄올 처리 후 퓨라린을 처리한 경우 정상군의 수준에는 미치지 못하지만 에탄올 처리군에 비해 LC3 발현정도가 증가하는 것을 볼 수 있음. 따라서 알콜과 퓨라린 처리를 병행할 경우 에탄올에 의한 autphage 활성저해를 완화시켜 퓨라린이 간기능 정상화에 기여할 수 있다는 사실을 확인하였음.

- 이미지 분석결과의 통계처리를 위해서 분석 프로그램을 통한 수치적 정량화를 진행중이며 2차년도 종료시까지 완료할 계획임. 한편 western blot을 통한 LC3 단백질의 발현과 비교함으로써 위의 이미지의 유효성을 확인하는 중임.

(4) Mouse를 이용한 기능성 물질의 혈액 내 의 간 기능 지표(AST, ALT)에 대한 효과와 지방간 개선 지표(autophagy activity) 개선 효과 관찰 실험
(Chronic ethanol consumption)

※ 실험 개요:

- 단회 에탄올 투여실험에서 관찰 하지 못한 퓨라린과 전통주Ⅰ,Ⅱ의 혈액 내 간 기능 지표인 AST와 ALT에 대한 효과 관찰.

- HepG2 Cell을 이용한 IHC를 통해서 퓨라린이 에탄올에 의한 간세포의 autophagy 활성의 감소 효과를 완화 시킨다는 사실을 발견하였다. 따라서 이번 실험은 퓨라린과 전통주 기능성분들이 장기적으로 알콜을 투여한 마우스에서 간기능 개선에 어떠한 효과를 지니는지를 연구하였다.

- Autophagy 활성은 Autophagy 형성 단백질인 LC3의 발현을 Immnnohistochemistry와 western blot을 통해서 측정하였음.

※ 실험 방법

- 각각 25~30g의 체중을 가진 C57BL/6 일반 마우스를 아래의 표와 같이 4개의 그룹으로 나눈다. 각각의 에탄올과 각 물질을 경구투여 하였음 경구투여 농도는 기 발표된 논문을 참고하여 선정 하였다.

- 실험동물들은 경구 투여를 통하여 4주 (11.29 ~ 12.25)에 걸쳐서 에탄올과 각 물질을 투여하였다. 실험 방법이나 과정에 대한 개요는 그림 3-35에서 간략히 나타내었다.

<표 3-5> 에탄올 반복투여 실험에 적용된 마우스 그룹

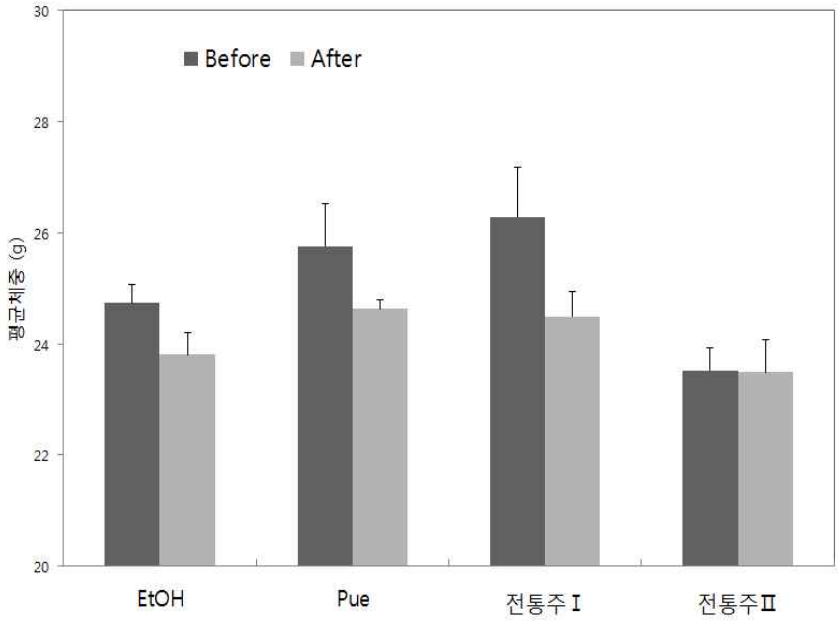
Group	마리(n)
EtOH (4g/kg BW)	4
EtOH (4g/kg BW) + puerarin (200mg/kg BW)	4
EtOH (4g/kg BW) + 전통주Ⅰ (200mg/kgBW)	4
EtOH (4g/kg BW) + 전통주Ⅱ (200mg/kgBW)	4

- 실험동물은 4주 실험 후, 처치 전 12시간 동안 절식 시킨 후, Avertin으로 가볍게 마취된 상태에서 심장 채혈을 통해 채혈 한 후, 원심 분리한 다음 분리된 혈청을 ALT, AST의 활성 측정에 사용하였다 (그림 3-35).

- 혈액 채취 후 즉시 간을 적출하여 남아있던 혈액 및 기타 부착물질을 제거 후, 일부는 Immunohistochemistry (IHC)와 지방간의 Histology 관찰을 위해 4% paraformaldehyde에 고정 후, OCT compound 와 paraffin을 이용해 블럭을 만들었으며, 나머지 일부는 Western blot을 위해 급속 동결 후 -80°C에서 보관하였다.

- 실험 전후의 평균 체중 변화는 그림 3-36과 같으며, 알콜의 섭취에 의해서 모든 그룹에서 일정량의 체중 감소를 보였지만, 그룹 내의 체중감소에서 유의적인 차이를 나타내지는 않았다.

<그림 3-35> Chronic ethanol 실험 과정



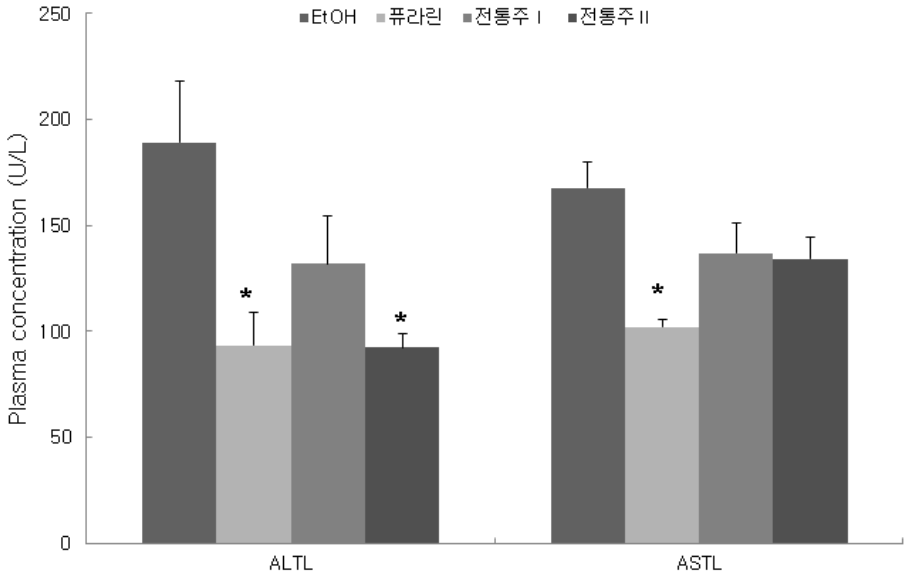
<그림 3-36> Ethanol feeding 전 후의 그룹 간 평균 체중의 변화

- AST와 ALT 함량은 급성 알콜투여 실험과 같은 방법으로 측정 키트를 사용하여 Cobas C111 자동분석기를 용하여 측정 하였다.

※실험 결과

① 간 기능지표 (AST, ALT) 측정 실험

- AST와 ALT를 측정한 결과는 그림 3-37과 같다.



<그림 3-37> 4주간의 Ethanol feeding 후 측정한 mouse의 혈액 내 간 기능지표 (ASTL, ALTL)의 값

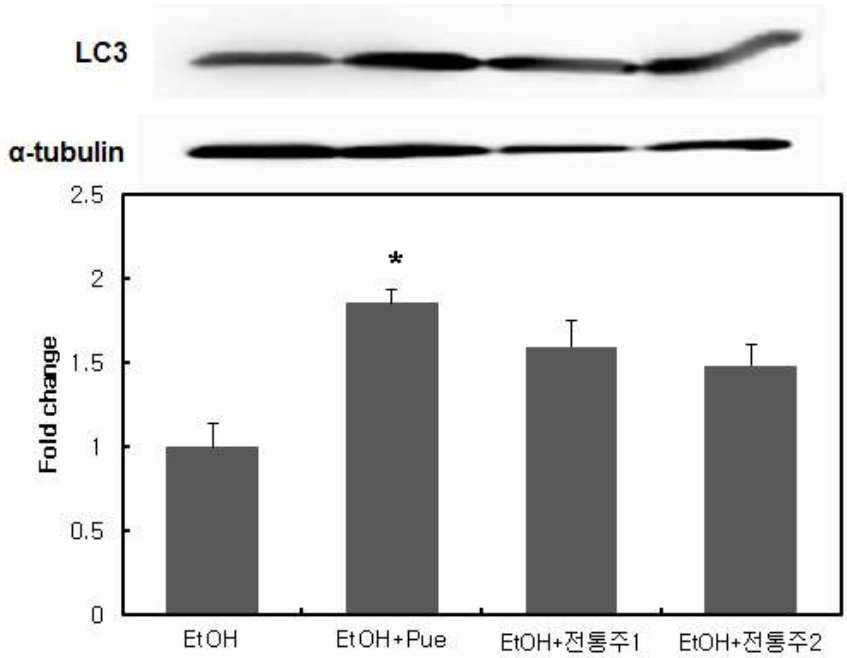
- 관찰 결과 Puerarin성분을 투여한 군의 평균 간수치 (AST와 ALT 농도) 가 EtOH 투여 그룹에 비해 ALTL은 50% ASTL은 40% 정도의 수준으로 유의성 있게 감소하였다. 그리고 전통주 Ⅰ과 전통주Ⅱ의 성분을 함께 투여한 그룹의 평균 간수치도 (AST와 ALT 농도) 또한 EtOH 만을 섭취한 그룹에 비해 더 낮게 났지만 전통주Ⅱ의 ALTL함량 외에는 유의성을 보이지는 않았다.

- **이 결과로 보아 4주간 에탄올을 투여하면서 퓨라린 혹은 전통주 기능성분을 함께 섭취하게 되면 장기적인 알콜 섭취에 의한 간 기능의 손상을 억제 시키는 효과를 가지고 있다고 생각됨**. 장기적인 알콜 섭취 시, 전통주 성분들은 알콜에 의한 간의 손상을 완화 시키는 역할을 한다고 생각됨.

* Autophage 활성지표의 측정

- 퓨라린과 전통주 기능성분의 간기능 개선은 추가적으로 Western blot 실험을 통하여 LC3 단백질 발현을 측정하여 확인하였음 (그림3-38).

- Western blot 결과



<그림3-38> Western blot 결과. 상단 그림은 immunoblotting이미지. 하단 그림은 alpha-tubulin에 대한 LC3의 단백질의 발현의 비율을 정량한 그래프.

- 각 그룹간의 간 조직의 단백질 추출을 통해서 Western blot 결과 그림-16과 같은 결과를 나타내었다.

- 그룹간의 LC3 발현을 비교해 본 결과 Ethanol 투여 그룹에 비해서 퓨라린 그룹 86%, 전통주Ⅰ 그룹 65%, 전통주Ⅱ 그룹 48% 증가하였다.

- 퓨라린> 전통주Ⅰ > 전통주Ⅱ > EtOH 군의 순으로 LC3의 발현 즉 Autophagy 활성이 나타났으며, 퓨라린 처리 그룹에서는 LC3의 발현이 유의적으로 증가하였다. 이는 퓨라린과 전통주 성분이 Autophagy의 활성을 증가시킨다는 것을 나타낸다.

- 따라서 위의 HepG2 cell에서 결론 내린 것 과 같이, 퓨라린과 전통주Ⅰ은 알콜성 지방간의 개선과 억제에 효과가 있다는 것을 확인 할 수 있으며, 전통주Ⅱ 역시 지방간의 개선에 어느 정도는 효과가 있다고 할 수 있다.

② 알콜성 지방간 효과

- 일반적으로 마우스에서 에탄올에 의한 지방간 유도는 에탄올 경구투여법 보다는 액체

식이를 통한 실험법이 많이 사용되고 있음. 본 실험에서 4주간 에탄올 실험 후, 간조직 histology 관찰을 통해 지방간 축적 유무를 조사하였으나 포름알데히드로 조직을 고정하여 H&E staining을 수행하여 얻은 조직 분석에서 뚜렷한 지방간 생성을 확인하지 못하였음.

- 에탄올에 의한 지방간 개선 효과는 차년도에 조건을 정립하여 반복 실험할 계획임.

(4) 최종결론

- 당 해 년도 실험을 통해, 퓨라린과 전통주 기능성분이 간세포의 보호에 효과가 있다는 것을 확인하였으며, 에탄올 단회투여실험에서 혈중 알콜농도 감소에도 효과가 있다는 것을 확인하였다.

- 전통주I이 전통주Ⅱ 보다는 다소 효과가 좋았으며 단리물질인 퓨라린이 가장 높은 효과를 보였다.

- *In vivo* 실험을 통해서 퓨라린과 전통주I이 전통주Ⅱ가 혈액 내 간 기능 지표인 ASTL과 ALTL의 증가를 억제 시키는 것을 확인함으로써, 퓨라린과 전통주의 성분들이 알콜에 의한 간 기능 손상 억제에 효과가 있다는 것을 확인 하였다.

- *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통하여 퓨라린과 전통주 기능성분들이 알콜투여에 의한 autophage 기능저해를 완화시킴으로써 간기능 회복에 도움을 줄 수 있다는 가능성을 확인하였으며 3차년도의 실험에서 알콜투여에 의한 지방간 유도 동물모델 실험을 통해서 확인 할 예정이다.

3) 3차년도

(1) Puerarin에 의한 간기능 회복 능력 탐색

- 음주로 인한 간의 질환은 세계적인 문제이다. 이러한 간 질환은 알코올로 인한 간의 지방 축적이 원인임

- 간의 지방 축적은 과도한 음주를 통해 간에 lipid가 몰려 지방 산화가 억제되기 때문임

- 또한 과도한 음주는 간에 mitochondria에 damage를 주고, oxidative stress와 세포 사멸을 유도한다. 더하여 간에서의 단백질 형성을 억제하여 오래된 단백질

의 분해 능력이 떨어져 단백질의 간 축적과 간의 비대화를 초래함

- 이러한 현상들은 ethanol에 의한 autophagy pathway의 손상에 의함

- 따라서 우리는 그림 3-39에서 보여주는 과정을 통하여 ethanol이 autophagy 발현에 미치는 영향과 puerarin이 손상된 autophagy pathway에 어떠한 긍정적인 영향을 미칠 수 있는지를 확인함

<그림3-39> Puerarin에 의한 autophagy 활성 실험 개요

(가) 기능성 물질인 puerarin이 ethanol로 처리한 H4IIE 세포의 생존률에 미치는 영향

- 퓨라린이 에탄올을 처리한 Rat hepatoma cell H4IIE의 생존율에 어떠한 영향을 주는지를 측정하기 위하여 MTT를 통해 세포의 생존률을 측정함

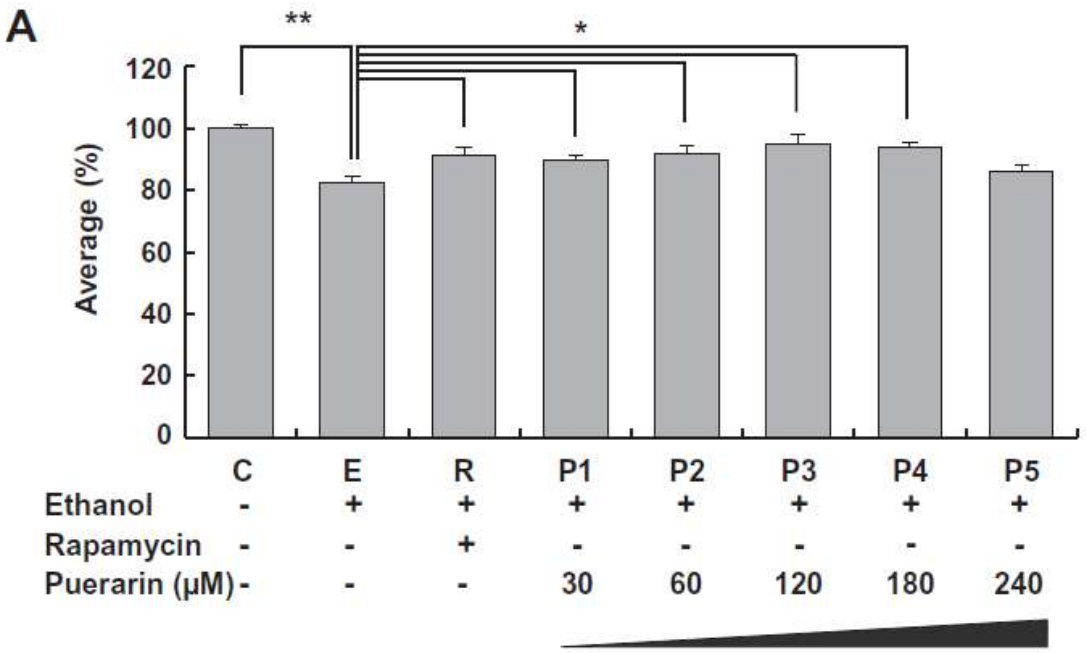
- Puerarin의 농도별 세포의 생존률을 확인하고 생존률이 향상되는 구간의 저농도와 고농도를 선택하여 이후의 실험을 진행함

- 실험에서 ehtanol은 100mM의 농도로 처리하였고 puerarin은 30uM, 60uM, 120uM, 180uM, 240uM의 농도로 처리하여 세포의 생존률을 확인

- 실험에 사용된 positive control은 rapamycin으로 mammalian target of rapamycin(mTOR)을 억제하여 autophagy의 활성을 높여줌

- 실험 결과 그림 3-40A의 그래프에서 ethanol 그룹에서 세포의 생존률이 control에 비해 약 20% 감소하는 것을 확인함

- Ethanol 그룹에 비하여 positive control인 rapamycin 그룹에서 유의적인 세포의 생존률 향상을 확인 가능함



<그림 3-40A> Ethanol이 처리된 H4IIE cell에서 puerarin의 농도에 따른 세포 생존

- Puerarin 그룹 역시 puerain 처리 농도에 따라 세포 생존률 증가 확인

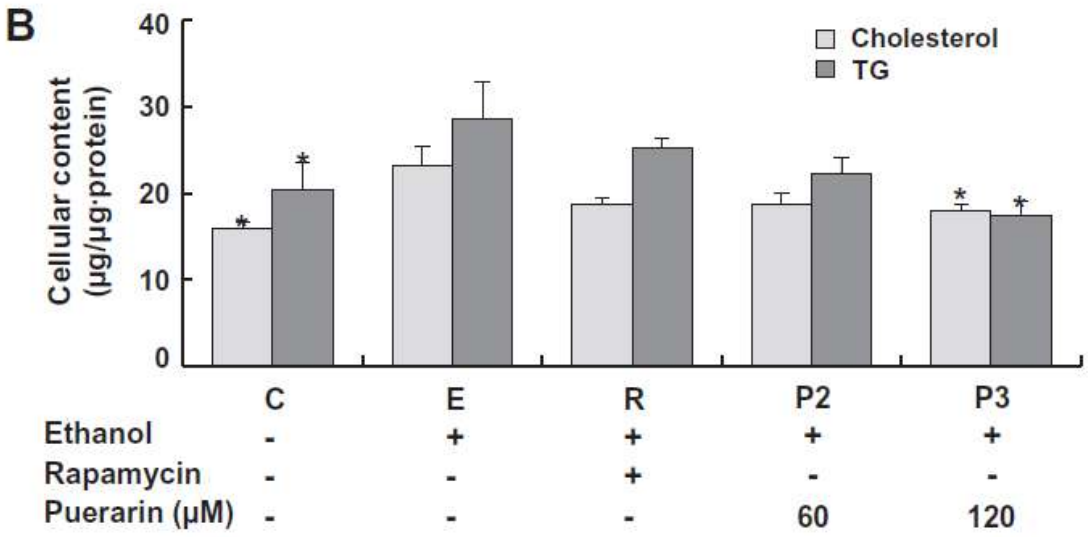
- Puerarin 그룹 중에서 독성을 보이지 않고 여러 실험을 통해 biological function 이 입증된 P2 (60uM)와 P3 (120uM) 그룹을 선정하여 다음 실험에 사용함
-
- 실험결과 콜레스테롤과 TG가 ethanol을 처리하지 않은 control 그룹에 비해 각각 40%, 20%씩 증가함

- 이를 통해 ethanol이 지방간을 유도할 수 있다는 것을 확인

- Rapamycin 그룹에서 ethanol 그룹에 비하여 지질의 양이 유의적으로 감소함을 확인

- P3 그룹에서 콜레스테롤과 TG가 ethanol 그룹에 비하여 현저하게 감소하였음

- 이를 통해 rapamycin 뿐 아니라 puerarin 역시 간세포에서 ethanol에 의해 감소된 세포 생존률과 증가된 콜레스테롤과 TG의 농도를 회복시키는 능력이 있음을 확인함

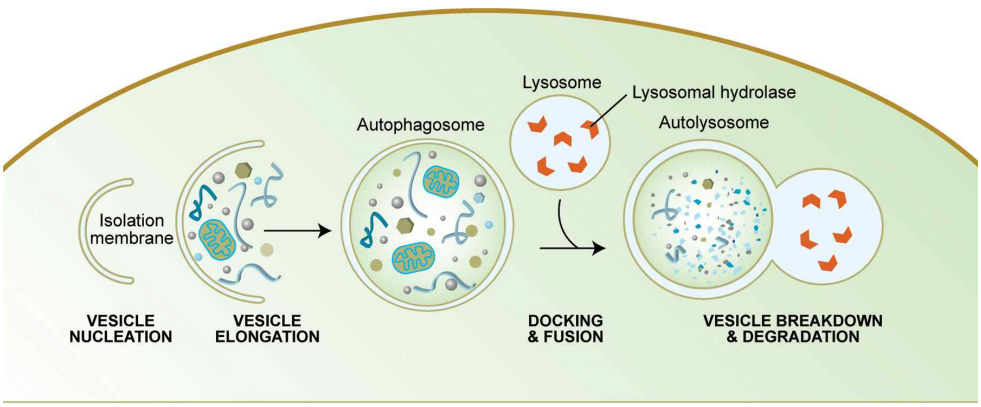


<그림 3-40B> Ethanol과 puerarin 처리에 의한 cholesterol과 TG의 농도 변화

(나) Immunohistochemistry와 western blotting을 통한 Autophagy activity 측정

- Autophagy는 autophagocytosis라고도 불리며, 세포의 성장과 항상성 유지를 위해 lysosomal 경로를 통해 long-lived protein이나 자신의 세포 소기관 등을 자가 분해하여 대사산물들을 재활용하기 위한 catabolic 작용임 (그림 3-41)

- Autophagy의 가장 중요한 기능은 lysosomal activity를 통한 세포내 구성물질의 분해를 통한 metabolites의 재분배임



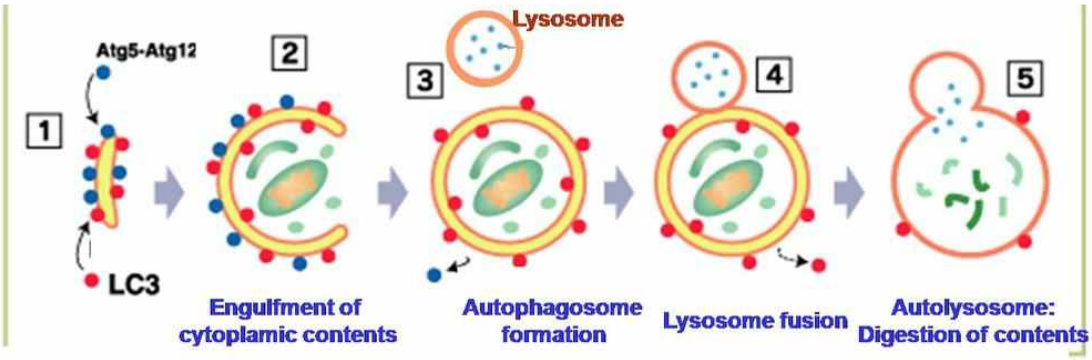
<그림 3-41> Autophagy의 진행 과정 (A Meléndez et al.)

- Autophagy의 형성은 phagophore를 형성하거나 membrane으로부터 분리됨으로써 시작됨.

- Phagophore가 길어지고 불특정한 cytoplasm이나 특정 target을 만입시키면서 autophagosome을 형성함.

- Autophagosome이 lysosome과 결합하고 autophagolysosome을 형성함.

- 마지막으로 autophagolyosome 내의 소기관 및 불특정 물질들이 분해되고 재활용됨.



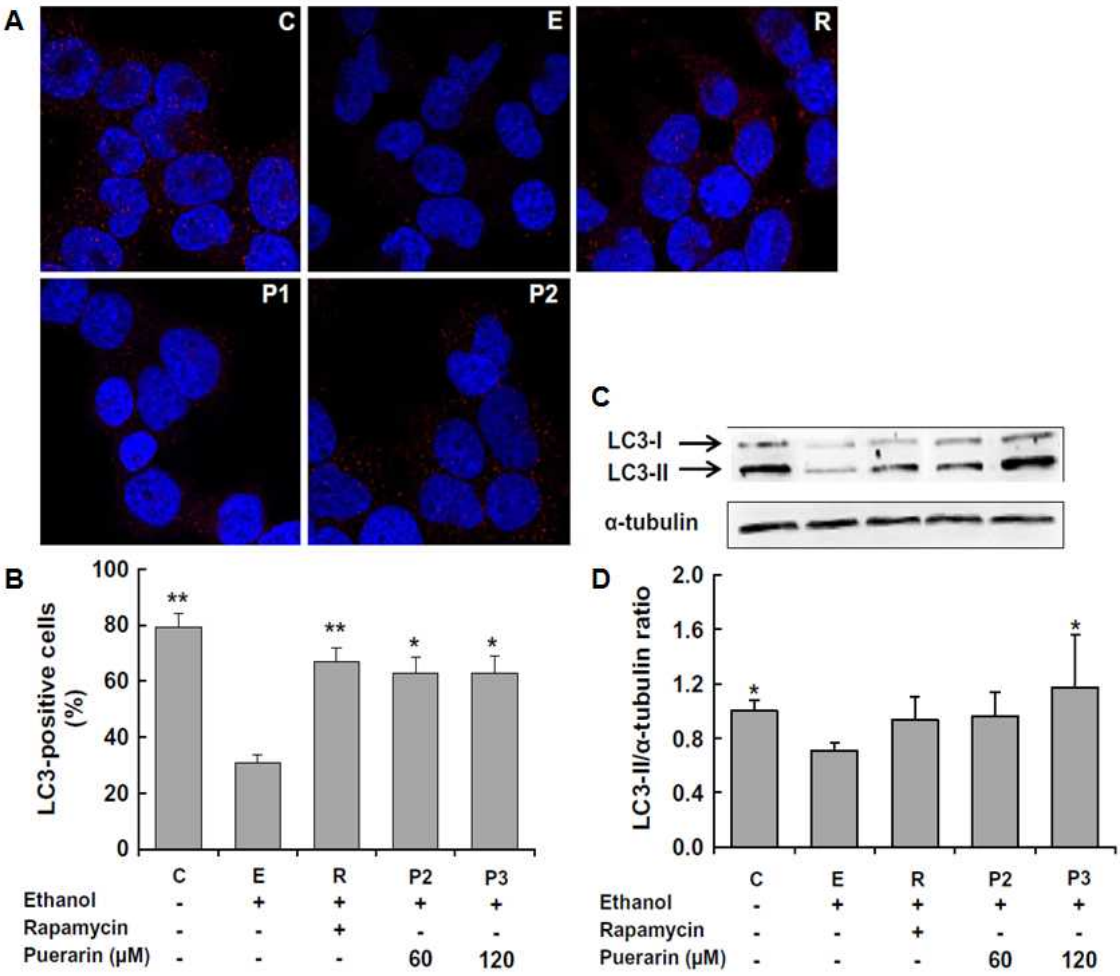
<그림 3-42> Autophagy의 marker LC3의 기작 (출처 : http://www.biosite.se)

- LC3는 autophagosome의 membrane에 존재하는 단백질로 autophagy의 활성에 따라 발현이 증가함

- 일반적으로 ethanol을 투여했을 경우 autophagy의 활성은 감소하는 경향성을 나타낸다. 이는 ethanol이 autophagy pathway중 어떠한 단계에 영향을 주기 때문인 것으로 보고되고 있음

- 그림 3-43A의 Immunohistochemistry는 LC3 primary antibody와 DAPI staining을 통해 관찰하였음

- 붉은색으로 관찰되는 것은 primary antibody에 형광 Alexa fluor® 633 secondary antibody로 incubation시킨 LC3이고 파란색으로 관찰되는 것은 DAPI로 염색된 세포의 핵임



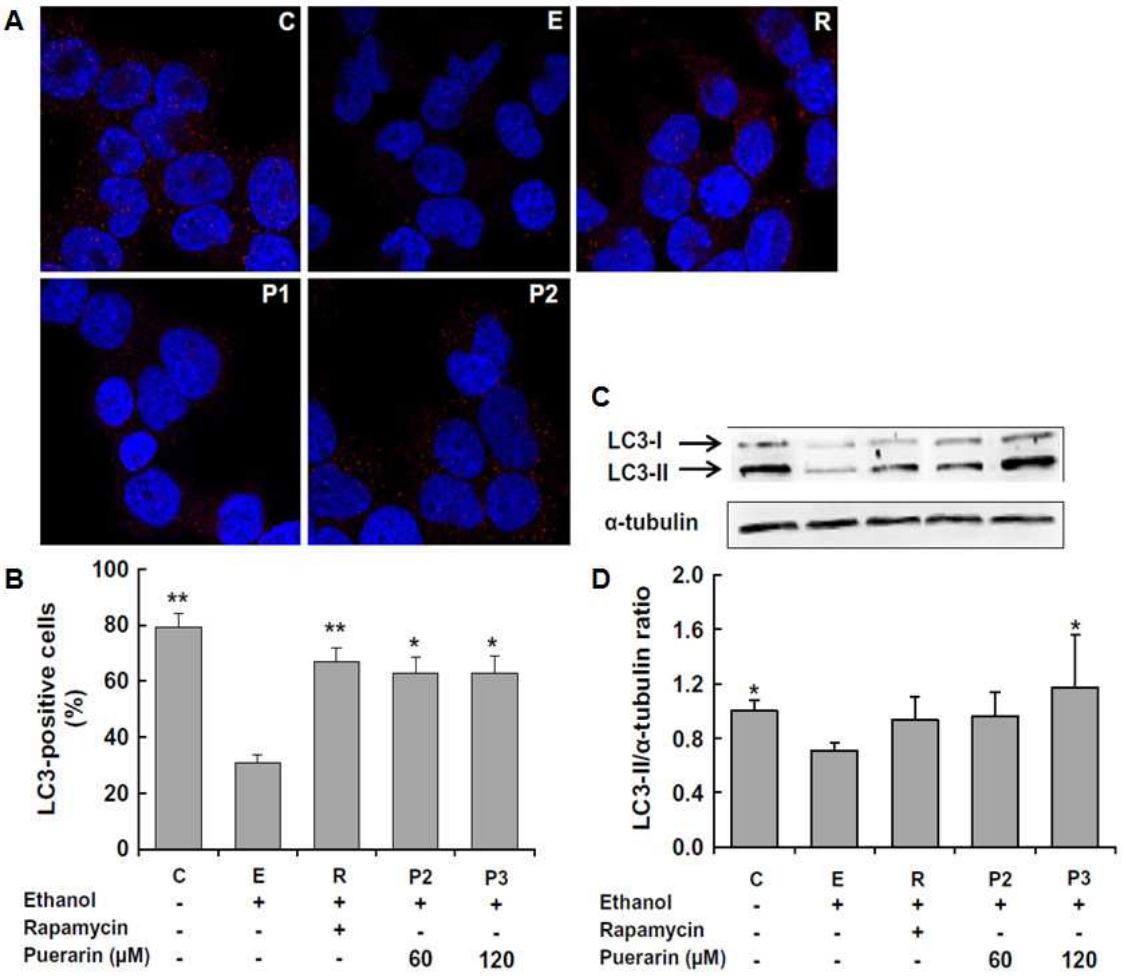
<그림 3-43> Immunohistochemistry와 western blot을 통한 LC3 측정

- Control과 비교하여 ethanol을 투여했을 경우 LC3의 발현이 줄어들었음을 사진을 통해 확인할 수 있음.

- 또한 Ethanol과 rapamycin 또는 puerarin을 투여한 그룹(R, P1, P2)에서는 ethanol 그룹과 비교하여 LC3의 발현이 증가됨.

- 그림 3-43B는 immunohistochemistry를 정량한 그래프로, 이를 통해 ethanol 그룹에서 50% 이상 LC3의 발현이 감소됨.

- Ethanol과 rapamycin 또는 puerarin을 넣은 그룹에서는 LC3의 발현이 control과 비슷한 수준으로 회복되었음



<그림 3-44> Immunohistochemistry와 western blot을 통한 LC3 측정

- 그림 3-44C에서는 western blot을 통하여 LC3-I과 LC3-II subtype을 확인함

- LC3-I은 cytoplasmic form으로 autophagy가 진행되는 동안 autophagosome으로 이동하여 autophagosomic form인 LC3-II로 전환됨

- LC3-II는 cellular autophagy의 biomarker로서 사용될 수 있음

- 그림 3-44D는 그림 3-44C를 정량한 그래프로 ethanol그룹에서 control에 비하여 LC3-II의 발현이 현저히 감소함을 확인함

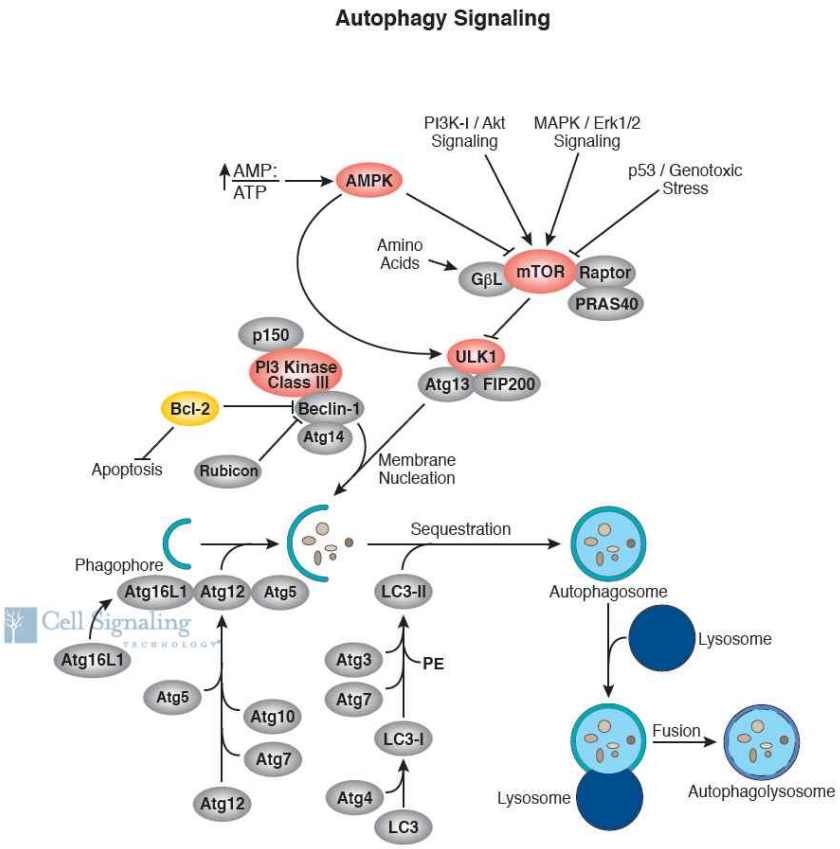
- Ethanol 처리 그룹 중 rapamycin과 puerarin으로 처리된 실험 그룹에서 LC3-II의 발현량이 ethanol이 처리되지 않은 control과 같이 회복되는 경향을 보여줌

(다) AMPK에 의한 mTOR의 활성 측정

- Autophagy signaling에서 가장 중요한 요소는 mTOR의 조절이고 이를 위한 기작은 기존 연구들로 잘 알려져 있음

- AMPK는 AMP/ATP의 비율이 높아질 때 활성화되고 autophagy는 AMPK의 활성을 통해 증가됨.

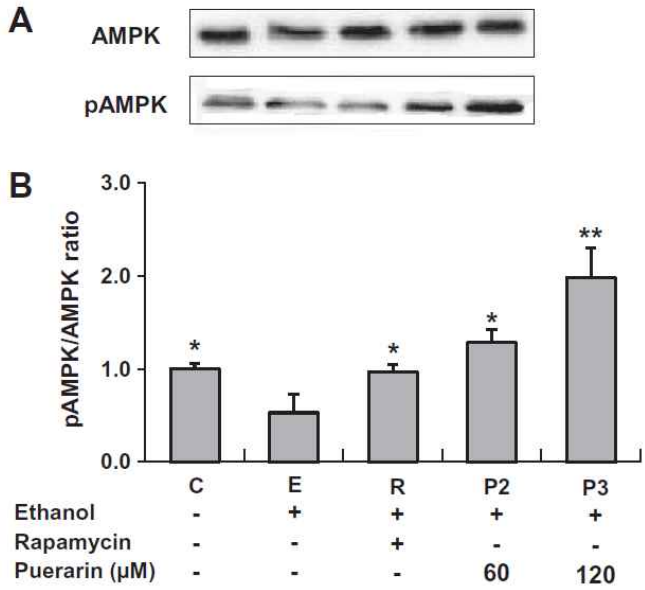
- AMPK는 에너지의 항상성을 조절하는 단백질로 hepatic fatty acid oxidation을 활성화 시키고, cholesterol, lipid, TG의 합성을 저해함.



<그림 3-45> Autophagy Signaling
(출처: http://www.cellsignal.com)

- AMPK이 activation 되면 TSC2를 phosphorylation 시키고 pTSC2 pTSC2는 Rheb에 대한 GTPase의 활성을 증가시켜 GTP-bound interactive Rheb를 형성하고 최종적으로 mTOR을 저해시킴.

- mTOR이 억제되면 pS6는 dephosphorylation되고 4E-BP1은 phosphorylation 되어 autophagy protein의 translation과 activity가 떨어짐.
-
  - 그림 3-46에서 ethanol을 처리한 대조군에서 AMPK phosphorylation이 감소한 반면, rapamycin과 puerarin 처리군에서는 AMPK phosphorylation 능력이 향상되는 것을 측정함.



<그림3-46> Puerarin의 AMPK 인산화 능력

- 이를 통해 puerarin이 AMPK phosphorylation 자극하여 autophagy를 활성화시키고 있음을 확인함

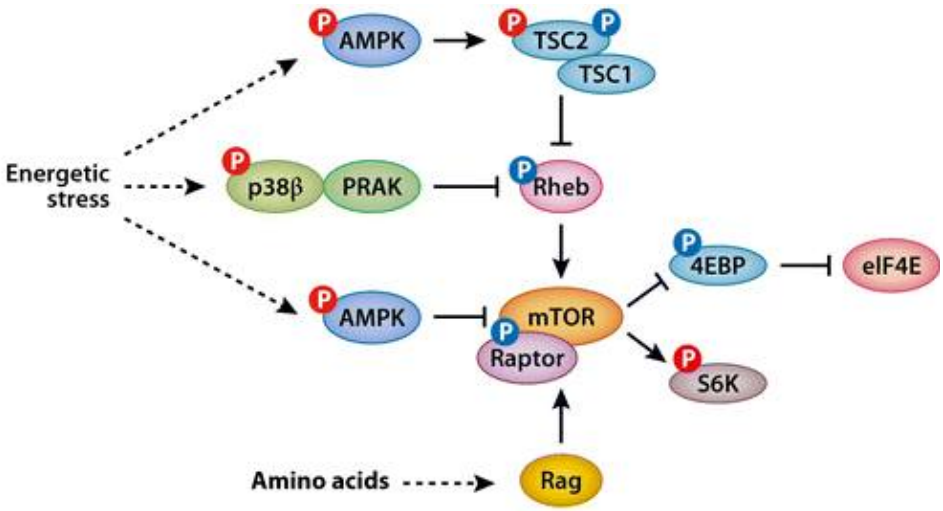
(라) 4E-BP1과 S6를 통하여 AMPK의 mTOR 활성 유무 확인

- Puerarin에 의한 AMPK의 활성화가 mTOR의 kinase activity를 직접적으로 조절하는지를 확인하기 위하여 다음 실험을 진행함 (그림 3-47)

- mTOR의 발현을 확인하기 위하여 anti 4E-BP1, p4E-BP1, S6, pS6 primary antibody를 사용하여 각 protein의 발현을 western blot으로 측정함
- pS6와 p4E-BP1를 각각 S6와 4E-BP1으로 나누어 인산화 비율을 확인함

- 그림 9의 A와 C에서 western blot의 발현을 확인가능

- mTOR이 억제될 경우 4E-BP1은 phosphorylation되어 p4E-BP1이 증가하고, pS6는 dephosphorylation되어 S6로 전환됨



<그림 3-47> mTOR signaling과 AMPK의 관계 (Inoki et al. 2012)

- 그림 3-48B에서 ethanol만 처리한 그룹에서 p4E-BP1/4E-BP1 비율이 현저히 감소하였고, rapamycin과 puerarin을 처리한 그룹에서 phosphorylation이 증가함

- 그림 3-48D에서 ethanol만 처리한 그룹에서는 pS6/S6 비율이 control과 비교하여 매우 높아졌고 rapamycin과 puerarin에서는 다시 낮아지면서 control과 비슷한 수준으로 회복됨

- 이 두 결과를 통해 puerarin이 ethanol 처리된 hepatocyte에서 AMPK를 인산화시켜 mTOR을 억제하고 autophagy를 활성화 시킨다는 사실을 확인함

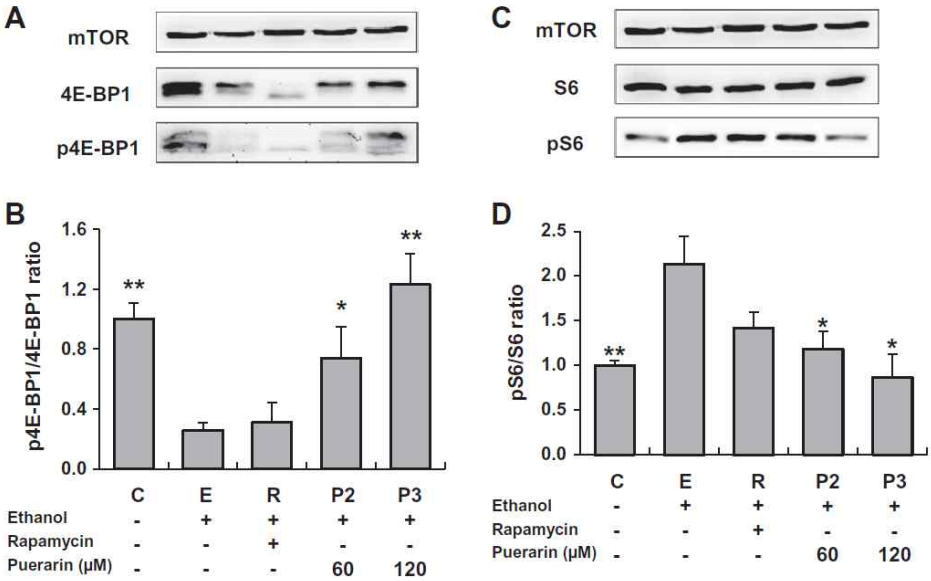
- 위의 실험 결과들은 puerarin이 AMPK를 활성화시켜 ethanol에 의해 저해되어 있는 autophagy의 활성을 회복시키는 것을 보여줌

- Puerarin의 autophagy의 활성을 확인하기 위하여 rat의 hepatoma cell인 H4IIE를 사용하여 autophagy 활성을 western blot을 통하여 확인함

- 이 실험에 사용된 Ethanol은 100 mM의 농도로 처리되었고 Puerarin은 각각 60 uM과 120 uM에서 처리됨

- Rapamycin은 autophagy signaling에서 매우 중요한 역할을 하는 mammalian

targets of rapamycin (mTOR)를 저해하여 autophagy의 활성을 증가시킴



<그림 3-48> 4E-BP1과 S6의 phosphorylation 비율의 변화

(마) Autophagy 활성지표의 측정

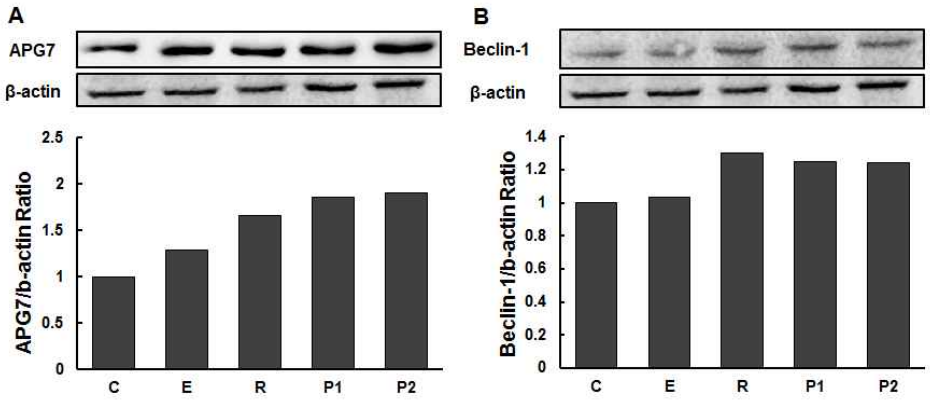
- 따라서 rapamycin은 autophagy 활성을 측정하기 위한 positive Control로 사용되었음

- 기존 진행한 실험에 더하여 autophagy의 expression을 확인하기 위하여 ProSci에서 Autophagy Protein Detection Set (#PSI-1813)을 구입하여 APG7, Beclin-1, PIST, LAMP1, LAMP2 primary antibody를 사용함

- APG7은 atg conjugation system의 필수 구성요소이며 autophagy 형성에 매우 중요한 역할을 수행한다. 또한 기아 상태의 mice에서 proteins와 organelles의 bulk degradation역시 atg7에 영향을 받음(Komatsu et al.)

- 그림 3-49A 그래프를 보면 rapamycin에 의해 mTOR이 활성화 되면서 APG7의 발현이 66.2%가량 증가하는 것을 확인 가능함

- Puerarin 그룹에서 역시 APG7의 발현이 각각 85.6%, 90.6% 증가하여 puerarin이 autophagy를 활성화 시키는 atg conjugation system에 긍정적인 영향을 주는 것으로 보여짐.



<그림 3-49> β-actin을 사용한 APG7과 Beclin-1 정량

- Beclin-1은 coiled-coil structure를 가진 protein으로 Bcl-2와 interaction을 통해 autophagy의 활성에 관여하는 단백질임 (Liang XH et al.)

- 그림 3-49B를 보면 control그룹과 비교하여 ethanol에서는 beclin-1의 큰 변화를 관찰하기 힘듬

- Rapamycin을 처리한 그룹에서는 beclin-1의 발현이 control에 비하여 30.1% 증가하였고, puerarin 또한 각 농도에 따라 25.0%, 24.3%씩 증가함

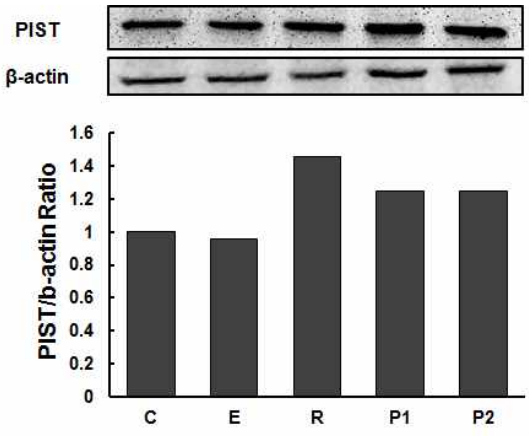
- Beclin-1 단백질의 발현으로 atg14와 PI3K의 binding이 많아져 autophagosome의 형성을 활성화시킴

- PIST는 Beclin-1의 coiled-coil domain과의 interaction을 통해 beclin-1의 활성을 조절할 수 있는 단백질임 (Kametaka S. et al.)

- 그림 3-50에서 PIST를 β-actin으로 정량한 결과 ethanol에서는 control에 비하여 PIST의 발현이 4.1% 줄어들었고, 반대로 rapamycin에서는 45.3%, puerarin에서는 각각 24.7%, 25%씩 증가함

- 이 결과를 통해 PIST가 beclin-1의 발현에 영향을 주었고, autophagy의 활성화에 기여했을 것으로 추정함

- LAMP-1 (Lysozyme-associated membrane protein-1)과 LAMP-2 (Lysozyme-associated membrane protein-2)는 homologous로 lysozyme의 기능(protection, maintenance, adhesion)과 관련있는 membrane glycoprotein으로서 Ligand의 역할도 수행한다는 연구 결과가 있음

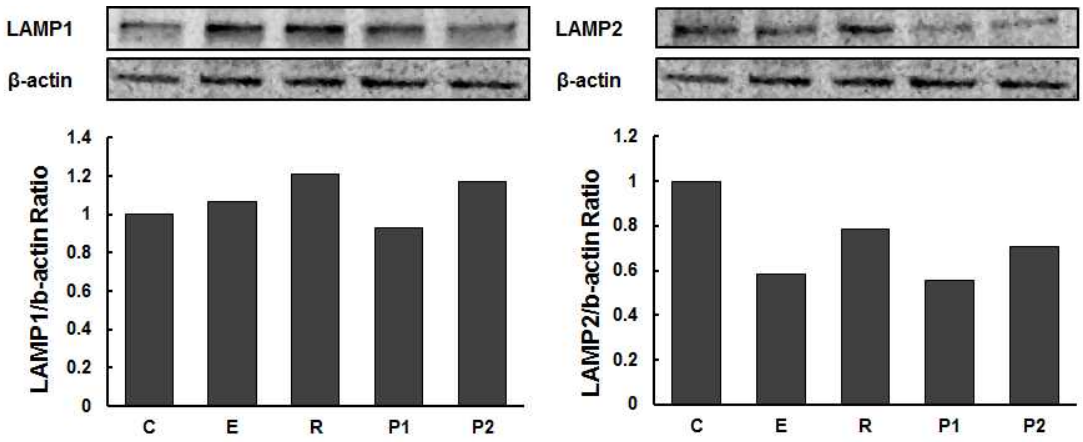


<그림 3-50> PIST를 β-actin 으로 정량한 그래프

- 두 단백질은 많은 부분에서 유사성을 가지지만 그 molecular, antigenic 특성에서 차이점을 가진다. LAMP2의 경우 macrophagy의 항원으로 작용하는 MAC-3와 매우 유사한 구조를 갖는다고 알려져 있음

- 기존의 연구에서 LAMP-2가 결손된 mice에서 autophagy가 간, 췌장, 비장, 신장, 골격근과 심근 등에서 대규모로 축적되어 있는 것이 발견되었고 long-lived protein의 degradation에 문제가 생긴 것을 확인하였다. 따라서 LAMP-2가 autophagy를 통한 protein degradation에 매우 중요한 역할을 수행함을 알 수 있음

- LAMP-1은 LAMP-2의 translational regulation에 영향을 준다고 알려져 있음.
-



<그림 3-51> LAMP1과 LAMP2를 b-actin으로 정량한 그래프

- 이러한 기작들로 인해 autophagy가 puerarin에 의해 activation 되었음을 확인하기 위하여 LAMP1과 LAMP2 단백질이 사용될 수 있음
- LAMP-1의 경우 control과 비교하여 ethanol에 의한 변화는 거의 없지만 rapamycin의 경우 20.8%가 증가하고 고농도의 puerarin에서도 LAMP-1의 발현이 활성화 되었음

- 반면, LAMP-2의 경우 ethanol의 영향으로 단백질의 발현이 41.5% 감소하는데 이는 ethanol의 autophagy 억제 효과로 인한 것으로 보여짐

- Ethanol 처리군과 비교하여 rapamycin 그룹에서는 LAMP-2 단백질의 활성이 20% 더 높게 나타났고 고농도의 puerarin 그룹 역시 ethanol과 비교하여 12.2% 높은 활성을 보여줌

- 이 두 결과를 통하여 LAMP-2가 ehtanol에 의해 직접적으로 저해되었고 LAMP-1의 활성이 LAMP-2의 발현에 영향을 주어 autophagy의 활성화에 기여할 것으로 추정됨

- 또한 APG7, Beclin-1, PIST, LAMP-1/2 등 autophagy 활성 marker의 확인을 통해 puerarin이 AMPK를 활성화시켜 mTOR을 억제하고 그로인해 autophagy가 활성화 되었다는 결론을 도출함

4) 최종 결론

- 기존에 알려진 autophagy 활성 물질인 rapamycin을 positive control로서 사용하여 puerarin에 의한 autophagy의 활성을 확인함

- 기능성 물질인 puerarin이 autophagy를 활성화 시킨다는 것을 확인하였고, 간세포에 형성되는 cholesterol과 TG등 lipid 생성물을 감소시키는 효과가 있다는 것을 확인하였고, ethanol에 의해 간이 손상을 입고 간비대나 지방간이 유래될 수 있음을 확인하였고, puerarin이 이를 회복시킬 수 있다는 근거를 얻음

- Ethanol에 의해 억제된 AMPK의 활성이 puerarin에 의해 회복되었고, autophagy pathway를 경유하여 mTOR을 억제시켜 autophagy의 발현을 조절함을 확인함

- 3차년도 연구로 전통주의 기능성분 중 하나인 puerarin이 ethanol 투여에 의한 간기능 손상에 의한 autophagy 기능 저하를 회복시켜 줄 수 있음을 확인함

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 1차년도

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
<제1세부과제> 과실주 발효용 미생물의 선발 및 개량	국내산 과실에서의 효모균 분리	100	국내산 과실 등에서의 637개의 효모균 순수분리
	분리효모균의 특성분석	100	각 효모균의 아밀레이즈 생산성, 내당성, 말토오스 이용능, 내알코올성 등 특성분석
	우수효모균 선발	100	위의 각 특성이 우수한 균주 및 종합적 특성이 우수한 균주 선발
	우수효모균의 동정 및 최종선발	100	분리균주들의 26S rRNA 유전자 부위 정보를 이용한 균주 동정
<제2세부과제> 당화 및 탈분지효소를 이용한 새로운 과실주 발효 공정 개발	탈분지효소의 정제 및 특성분석	100	debranching enzyme (TreX) 정제 및 특성 규명
	전분분해 효소의 정제 및 특성분석	100	MAase의 정제 및 특성 규명 (SMMA)
	원료 전분의 액화/당화 반응 조건	100	쌀전분(주정용 쌀 및 강화찹쌀)의 당화 및 이성화
	말토오스 및 분자올리고당 생성조건	100	sumizyme 및 SMMA를 이용함
<협동 및 위탁과제> 과실주 발효용 전분원료 및 천연추출물 개발	• 전분 원료의 선발	100	-양조에 적합한 전분원료 중 가공적성과 지역적 특색과 수급의 원활성을 고려하여 '화선찰'을 선정
	• 원료 과실의 선발	100	- 국내에서 재배되는 포도품종인 캠벨얼리, 거봉, 다노레드, 마스캇 등의 품종에 대한 당도와 지역적 특성을 고려하여 최종적으로 캠벨얼리 품종 선발
	• 원료과실의 가공적성 분석	100	- 한철 과일인 포도는 수급에 계절적 한계가 있으므로 선별된 포도를 -40°C 냉동고에 보관하여 이후 실험을 진행하여 냉동 전후의 가공적성을 비교·분석
	(위탁) 과실주의 기능성 지표 측정 *(in vitro)*	100	기능성물질의 항산화 능력 평가: • 과실주의 원료로 사용될 기능성 물질을 DPPH와 함께 반응시켜 라디칼 소거

			능력을 측정. • TBA시약을 사용하여 기능성물질의 지방산화 억제 능력을 평가함 (TBARS assay). 기능성물질의 숙취해소효과 평가: • 과실주의 원료로 사용될 기능성 물질을 알코올 대사효소인 ADH, ALDH에 에탄올과 함께 처리하여 효소의 알코올 분해 활성 측정함.

2. 2차년도

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
<제1세부과제> 과실주 발효용 미생물의 선발 및 개량	최종선발된 분리효모 균주 (NK28)의 특성 분석	100	▪ NK28균주의 내당성, 알코올 저항성, 말토스 이용능, 알코올 생산능 등을 상업용 효모 주들과 비교분석 ▪ NK28균주의 당이용능 분석
	분리효모주를 이용한 포도주 발효	100	▪ NK28의 포도즙 발효능 비교 분석 ▪ NK28의 쌀포도주 발효능 비교 분석
	효소가 Display된 분리 효모균주 개량	95	▪ *B. subtilis*의 전분탈분지효소의 클로닝, 특성분석 ▪ 전분탈분지효소의 NK28균주 표면 display
	세포융합을 통한 분리 효모균주 개량	95	▪ NK28과 amylase를 생산하는 *S. diastaticus* KCTC7955 종간의 세포융합을 통한 amylase 양성 NK28 제조
<제2세부과제> 당화 및 탈분지효소를 이용한 새로운 과실주 발효공정 개발	분지올리고당 및 퓨라린 함유 기능성 과실주 (포도주) 개발	100	▪ 효소반응에 의한 분지올리고당 생산 최적화 및 효율적 퓨라린 추출
	제조한 포도주의 품질 평가	100	▪ 향기성분 분석 ▪ 유기산/색도 분석 ▪ 관능평가

	Pilot 공장 설치 및 시제품 생산	200	▪ 포도주 공장의 설계, 시설 및 장비 제작 ▪ 포도주 시제품 생산 (2000L)
<협동 및 위탁과제> 과실주 발효용 전분원료 및 천연추출물 개발	발효공정개발	100	▪ 지표물질의 효율적 분석방법 개발 ▪ 공정에 따른 지표물질 (퓨라린 및 분지올리고당) 분석
	과실주(포도주)의 품질평가	100	▪ 생리활성 물질인 퓨라린의 추출 공정개선
			▪ 과실주(포도주)의 관능검사
	시제품 생산공정 개발 (제2세부과제팀과 공동연구)	100	▪ 포도주 공장설계 및 시제품 생산 설비 계획
	간 세포를 이용한 기능성 물질의 간세포의 생존률에 대한 효과 측정	100	▪ MTT 실험을 통해서 기능성 물질과 기능성 물질을 함유한 전통주의 세포 생존률에 대한 효과 평가함.
	마우스를 이용한 급성 알콜 투여를 통해 혈중 알코올 농도 측정, 간(liver)조직 중 알코올 대사효소 (ADH)의 활성 측정.	100	▪ 기능성 물질을 마우스에 알코올과 기능성물질(puerarin), 투여하여 시간대 별로 혈중 알코올 농도를 측정함.
		100	▪ 마우스(mouse)를 이용하여 기능성 물질과 알코올을 경구 투여 후, 특정 시간이 지난 후 알코올 대사효소(ADH)의 활성 측정함.
	마우스를 이용한 만성 에탄올 투여를 통해 간기능 지표(AST, ALT)의 측정, 지방간 개선 관련 지표 측정 (Autophagy activity)	100	▪ 마우스(mouse)를 이용하여 4주동안 기능성 물질과 알코올의 경구 투여 후, 혈액을 채취하여 혈액 내의 간기능 지표 (AST, ALT)의 측정, 평가함.
		100	▪ 마우스(mouse)를 이용하여 4주동안 기능성 물질과 알코올의 경구 투여 후, western blot 방법을 이용하여 간에서 지방 대사를 조절하는 Autophagy activity의 활성 측정의 지표인 LC3 의 활성 측정.

	간 세포를(HepG2) 이용한 지방간 개선 지표 측정 (Autophagy)	100	▪ 기능성 물질인 퓨라린이 간에서 지방대사를 조절하는 Autophge 활성에 미치는 영향을 Immunohistochemistry 실험을 통한 LC3의 발현측정으로 평가.

3. 3차년도

세부과제명	세부연구내용	달성도 (%)	연구범위
<제1세부과제> 과실주 발효용 미생물의 선발 및 개량	분리효모균주의 발효특성 규명	100	· 최종선발하여 특허출원한 NK28균주의 발효특성 분석 · 알코올 생산성 및 생장도를 중심으로 최적 온도, pH, 당농도 등 결정 · 산업용 효모균주의 특성과 비교 분석
	분리효모균주의 대량배양	100	· 쌀포도주 제조에 사용할 NK28균주 대량 배양 및 저장
	제품화 공정에서 효모발효 및 제조 공정 최적화 :	100	· 쌀포도주 발효에 사용할 주모의 첨가량 결정 · 상용 주모와 비교분석, · 발효속도, 알코올 조성 및 함량, 유기산, 향기성분, 당 조성 및 함량 등 분석 · 분리균주를 이용한 쌀포도주 시제품 제작 · 관능평가
	발효 중 잡균의 생장제어	100	· 메타중아황산칼륨을 대체할 수 있는 천연 물질 탐색 : 식물추출물 등
	발효공정 중 효모균주의 안정성	100	· 발효공정 중 분리균주의 생장도 분석 및 발효저해제에 대한 안정성 분석
<제2세부과제> 당화 및	-제품화 공정에서의 효소반응 및 제조	100	· 쌀포도주 제조 시 글루코아밀레이즈 및 이성화 효소를 동

탈분지효소를 이용한 새로운 과실주 발효공정 개발	공정 최적화		시에 첨가하여 쌀 전분의 당화공정을 개발하고 생성된 glucose와 fructose가 발효되는 속도 측정
	- 쌀 전분의 당화공정 및 퓨라린 추출 최적화	100	· 쌀전분의 전처리, 분지올리고당생성 퓨라린 추출 및 포도품질에 미치는 영향 분석 및 최적화 · 포도품종별 최적배합비율을 결정하고 숙성기간 중 품질변화 측정
	-포도주 pilot 공장설립 및 시제품 생산 -포도주 pilot 공장 장비 및 설비 완공 및 세제품 생산	100	· 포도주 pilot공장 설비 및 장비를 완공 · 시제품 생산
<협동 및 위탁과제> 과실주 발효용 전분원료 및 천연추출물 개발	-발효 공정 및 기능성 제조공정 최적화 -발효공정 중 퓨라린 추출 최적화 (제2세부과제와 협동)	100	· 퓨라린 추출 조건이 포도 품질에 미치는 영향 분석 및 최적화 · 포도품종별 최적배합비율을 결정하고 숙성 기간 중 품질변화 측정
	포도주 시제품 생산 (제2세부와 공동 추진)	100	· 포도주 pilot공장 설비 및 장비를 완공하여 시제품 생산
	- 알코올성 지방간 모델확립을 통한 지방간 예방효능 검색	100	· liquid diet를 통한 에탄올 투여법 확립 · H&E staining을 통한 지방간 유도 확인
	- 퓨라린의 알콜성 지방간의 개선 및 억제능력 평가	100	· *in vivo* 실험을 통한 지방간 개선 지표 측정
	- 간세포를 이용한 기전연구	100	· 지방간이 유도된 마우스의 간조직을 이용 IHC와 Western blot을 통해서 퓨라린의 지방간 예방효능평가 · *in virto* 실험 추가 기전연구

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발 성과

1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		특허		논문		기타
		출원	등록	SCI	비SCI	
1차년도	목표			1		
	달성			2		
2차년도	목표	1	0	2	1	
	달성	1	1	2	1	
3차년도	목표	1		2	1	준비중
	달성					
계	목표	2	0	5	2	총 9건
	달성	1	1	4	1	총 6건

2) 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신 저자	공동 저자				
2010	Transglycosylation properties of maltodextrin glucosidase (MalZ) from *Escherichia coli* and its application for synthesis of a nigerose containing oligosaccharide	Kyung-Mo Song	Kwan-Hwa Park	Winfried Boss etc	BBRC	397 : 87-92	국외	SCI
2010	Efficient constitutive expression of thermostable 4-alpha-glucano	Hee-Kwon Kang	Young-Wan Kim	Kwan-Hwa Park et al.	World J.l Microbiol. Biotechn.	26: 1915-1918	국외	SCI

	transferase in *Bacillus subtilis* using dual promoters							
2010	Enzymatic synthesis of glycosylated puerarin using maltogenic amylase from *B.stearothemophilus* expressed in *B. subtilis*	Chung-Hyo Choi	Kwan-Hwa Park	Seung-Hee Kim et al.	J. Sci Food Agric.	90: 1179-1184	국외	SCI
2011	Effect of high-dose vitamin C on mouse liver transcriptome: A nutritional genomics study.	전희진	이성준	S. Kim etc.,	J. Med. Food	14(3-4): 1-14	국내	SCI
2011	Diversity of Wild Yeast Strains with Appropriate Properties for Alcohol Fermentation in Various Fruits	이연주	김정완	최유리 이소영 심재훈 박종태 박관화	Mycology	39(1): 33-39	국내	비SCI
2011	Restoration of autophagy by puerarin in ethanol-treated hepatocytes via the activation of AMP-activated protein kinase	노병규	이성준	Jung Kyu Lee etc.	BBRC	414, 361-366	국외	SCI

<증빙자료>

Biochemical and Biophysical Research Communications 397 (2010) 87–92

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Transglycosylation properties of maltodextrin glucosidase (MalZ) from *Escherichia coli* and its application for synthesis of a nigerose-containing oligosaccharide

Kyung-Mo Song [a,1], Jae-Hoon Shim [b,1], Jong-Tae Park [a], Sung-Hee Kim [a], Young-Wan Kim [c], Winfried Boos [d], Kwan-Hwa Park [b,*]

[a] Center for Agricultural Biomaterials and Department of Food Science and Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-921, Republic of Korea
[b] Department of Biology, University of Incheon, Incheon 406-772, Republic of Korea
[c] Department of Food and Biotechnology, Korea University, Jochiwon 339-700, Republic of Korea
[d] Department of Biology, University of Konstanz, Konstanz 78457, Germany

World J Microbiol Biotechnol (2010) 26:1915–1918
DOI 10.1007/s11274-010-0351-5

SHORT COMMUNICATION

Efficient constitutive expression of thermostable 4-α-glucanotransferase in *Bacillus subtilis* using dual promoters

Hee-Kwon Kang · Jun-Hyuck Jang · Jae-Hoon Shim · Jong-Tae Park · Young-Wan Kim · Kwan-Hwa Park

Received: 17 November 2009 / Accepted: 10 February 2010 / Published online: 21 February 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract 4-α-Glucanotransferases possess strong transglycosylation activity which has been used in various carbohydrate chemistry fields. Due to safety issues of the recombinant enzymes we chose *Bacillus subtilis* as an

Introduction

4-α-Glucanotransferases (EC 2.4.1.25), also known as amylomaltases, catalyze both inter- and intramolecular

Research Article

Received: 9 September 2009 Revised: 29 December 2009 Accepted: 7 February 2010 Published online in Wiley Interscience: 23 March 2010

(www.interscience.wiley.com) DOI 10.1002/jsfa.3945

Enzymatic synthesis of glycosylated puerarin using maltogenic amylase from *Bacillus stearothermophilus* expressed in *Bacillus subtilis*

Chung-Hyo Choi,[a] Seung-Hee Kim,[a] Jun-Hyuck Jang,[b] Jong-Tae Park,[a] Jae-Hoon Shim,[a,c] Young-Wan Kim[b]* and Kwan-Hwa Park[a,c]

Abstract

BACKGROUND: The maltogenic amylase from *Bacillus stearothermophilus* (BSMA) is a valuable biocatalyst that has been used to transglycosylate natural glycosides to improve solubility. To ensure safety, BSMA was produced in *Bacillus subtilis*, using new shuttle vector-based expression vectors. The transglycosylation of puerarin was also conducted with crude BSMA and analyzed.

JOURNAL OF MEDICINAL FOOD
J Med Food 14 (3) 2011, 1–14
© Mary Ann Liebert, Inc. and Korean Society of Food Science and Nutrition
DOI: 10.1089/jmf.2010.1087

Effects of Acute Oral Administration of Vitamin C on the Mouse Liver Transcriptome

Hee-Jin Jun,[1] Sukyung Kim,[1] Kevin Dawson,[2] Dal-Woong Choi,[3] Jong-Sang Kim,[4] Raymond L. Rodriguez,[2] and Sung-Joon Lee[1]

[1]Division of Food Bioscience and Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, and [3]Department of Environment and Public Health, College of Health Science, Korea University, Seoul; [4]Major in Life and Food Sciences, School of Applied Bioscience, Kyungpook National University, Daegu, Republic of Korea; and [2]Laboratory for High Performance Computing and Informatics, University of California, Davis, Davis, California, USA

ABSTRACT Vitamin C is a strong antioxidant that alters gene expression in cells, and its effects can be modified by cellular oxidative stress. We investigated the genome-wide effects of vitamin C on the *in vivo* transcriptome in the liver, which synthesizes various enzymes and proteins to defend against cellular oxidative stress. We fed mice vitamin C (0.056 mg/g of body weight) for 1 week and performed DNA microarray analysis with hepatic mRNA in fasting and refeeding states to mimic physiological conditions of oxidative stress. Significance analysis of microarray data identified approximately 6,000 genes differentially expressed in both fasting and refeeding states. In the fasting state, vitamin C induced overall energy metabolism as well as radical scavenging pathways. These were ameliorated in the refeeding state. These findings suggest that vitamin C has profound and immediate global effects on hepatic gene expression, which may help prevent oxidative stress, and that long-term treatment with vitamin C might reduce the risk of chronic disease.

KEY WORDS: • *antioxidant activity* • *liver* • *microarray* • *nutrigenomics* • *real-time polymerase chain reaction* • *vitamin C*

Mycobiology 39(1) : - (2011)
© The Korean Society of Mycology
DOI:10.4489/MYCO.2011.39.1.000

Screening Wild Yeast Strains for Alcohol Fermentation from Various Fruits

Yeon-Ju Lee[1], Yu-Ri Choi[1], So-Young Lee[1], Jong-Tae Park[2], Jae-Hoon Shim[3], Kwan-Hwa Park[1] and Jung-Wan Kim[1]*

[1]Division of Life Sciences, University of Incheon, Incheon 406-772, Korea
[2]Department of Food Sciences and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
[3]Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

(Received , 2010. Accepted , 2010)

Wild yeasts on the surface of various fruits including grapes were surveyed to obtain yeast strains suitable for fermenting a novel wine with higher alcohol content and supplemented with rice starch. We considered selected characteristics, such as tolerance to alcohol and osmotic pressure, capability of utilizing maltose, and starch hydrolysis. Among 637 putative yeast isolates, 115 strains exhibiting better growth in yeast-peptone-dextrose broth containing 30% dextrose, 7% alcohol, or 2% maltose were selected, as well as five α-amylase producers. Nucleotide sequence analysis of the 26S rDNA gene classified the strains into 13 species belonging to five genera; *Pichia anomala* was the most prevalent (41.7%), followed by *Wickerhamomyces anomalus* (19.2%), *P. guilliermondii* (15%), *Candida* spp. (5.8%), *Kodamaea ohmeri* (2.5%), and *Metschnikowia* spp. (2.5%). All of the α-amylase producers were *Aureobasidium pullulans*. Only one isolate (NK28) was identified as *Saccharomyces cerevisiae*. NK28 had all of the desired properties for the purpose of this study, except α-amylase production, and fermented alcohol better than commercial wine yeasts.

Biochemical and Biophysical Research Communications 414 (2011) 361–366

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Restoration of autophagy by puerarin in ethanol-treated hepatocytes via the activation of AMP-activated protein kinase

Byung-Kyu Noh [a], Jung Kyu Lee [a], Hee-jin Jun [a], Ji Hae Lee [a], Yaoyao Jia [a], Minh-Hien Hoang [a], Jung-Wan Kim [b], Kwan-Hwa Park [c], Sung-Joon Lee [a,*]

[a] Division of Food Bioscience and Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-713, Republic of Korea
[b] Department of Biology, University of Incheon, Incheon 402-749, Republic of Korea
[c] Department of Foodservice Management and Nutrition, Sangmyung University, Seoul 110-743, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 September 2011
Available online 21 September 2011

Keywords:
Puerarin
Autophagy
AMPK
mTOR
Alcoholic liver damage

ABSTRACT

We investigated the effects of puerarin, the major isoflavone in Kudzu roots, on the regulation of autophagy in ethanol-treated hepatocytes. Incubation in ethanol (100 mM) for 24 h reduced cell viability by 20% and increased the cellular concentrations of cholesterol and triglycerides by 40% and 20%, respectively. Puerarin stimulation significantly recovered cell viability and reduced cellular lipid accumulation to a level comparable to that in untreated control cells. Ethanol incubation reduced autophagy significantly as assessed by microtubule-associated protein1 light chain 3 (LC3) expression using immunohistochemistry and immunoblot analysis. The reduced expression of LC3 was restored by puerarin in a dose-dependent manner in ethanol-treated cells. The effect of puerarin on mammalian targets of rapamycin (mTOR), a key regulator of autophagy, was examined in ethanol-treated hepatocytes. Immunoblotting revealed that puerarin significantly induced the phosphorylation of 5′AMP-activated protein kinase (AMPK), thereby suppressing the mTOR target proteins S6 ribosomal protein and 4E-binding protein 1. These data suggest that puerarin restored the viability of cells and reduced lipid accumulation in ethanol-treated hepatocytes by activating autophagy via AMPK/mTOR-mediated signaling.
© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

3) 특허 성과 :

가) 특허등록

등록연도	특허명	등록인 (발명인)	등록국	등록번호
2011	복합탈분지효소를 이용하여 전분으로부터 포도당을 제조하는 방법	인천대 산학협력단 (박관화 등)	대한민국	10-1014802

나) 균주특허출원:

국립농업과학원 농업유전자원센터에 특허미생물 기탁완료.

특허기탁 균주명 : *S. cerevisiae* NK28 (보존번호 :KACC93117P)

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2011	신균주 사카로마이세스 세레비지애 ＮＫ28 및 이를 이용한 포도주 제조 방법	김정완 등	대한민국	10-2011-0025326

다) 사업화 현황 (붙임 5-8 참고)

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해연도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화 형태			
법인설립	과실주제조 및 판매	인천 바이오	이태수	3	주			

붙임5

사 업 자 등 록 증

(법인사업자)

등록번호 : 131-86-30802

법인명(단체명) : 농업회사법인 주식회사 인천바이오

대 표 자 : 이태수

개 업 년 월 일 : 2011년 09월 05일 법인등록번호 : 120111-0580226

사업장 소재지 : 인천광역시 연수구 아카데미로 119
(송도동 ,11,12 인천대학교공동실험실습관 2 층)

본 점 소 재 지 : 인천광역시 연수구 아카데미로 119
(송도동 ,11,12 인천대학교공동실험실습관 2 층)

사 업 의 종 류 : 업태 도소매 종목 농수산물
도매 농수산물 수출입
전문 , 과학 및 연구개발업

교 부 사 유 : 재발급

사업자단위과세 적용사업자 여부: 여( ) 부(v)

2011 년 12 월 19 일

남인천 세 무 서 장 (인)

국세청

붙임6

【주세사무처리규정 제24호 서식】

제 1 호

과 실 주 제 조 면 허 증

근 거 : 주세법시행령 제6조 및 제7조

신청자	성 명(대표자)	이 태 수	사업자등록번호	131-86-30802
	상 호(법인명)	농업회사법인 주식회사 인천 바이오		
	주 소(본점소재지)	인천 연수 송도 12-1 인천대학교 공동실험실습관 2층		
제 조 장 위 치		인천 연수 송도 12-1 인천대학교 공동실험실습관 2층		
제조할 주류의 종류		과실주(포도주)		
지 정 조 건		① 제조할 주류만을 허가받은 장소에서 제조하여야 한다. ② 주세법 제13조[주류제조면허의 취소]에 해당하는 때에는 면허를 취소합니다.		
당초면허년월일		2011.11.24	면허번호	131-1-00001

2011년 11월 25일자 과실주 제조면허신청에 대하여 주세법 제 6 조의 규정에 의하여 위와 같이 면허함

2011 년 11 월 24 일

남 인 천세 무 서 장

210㎜×297㎜(신문용지54g/㎡)

붙임7

평가서번호	306459 - 2011111
평가용도외 사용금지	

기 술 평 가 서

Technology Evaluation Report
- for Assessment, Valuation & Appraisal of Technology

평가기술	복합 탈분지 효소를 이용하여 전분으로부터 포도당을 제조하는 방법
평가용도	현물출자용 기술가치평가

KIBO 기술보증기금

서울중앙기술평가원장 (인)

1. 본 평가서는 평가용도 외로 사용할 수 없으며, 기술평가기관은 본 평가서를 기초로 한 행위결과에 대하여 어떠한 책임도 부담하지 아니합니다.
2. 본 평가서에서 사용된 가정들은 향후 사업환경의 변화 및 신청기술을 적용하는 경영진이나 기술인력 등의 능력에 따라 영향을 받으며, 이에 따라 그 평가결과가 변동될 수 있습니다.

붙임8 : ㈜인천바이오 공장 및 농장 전경

마. 인력활용/양성 성과

	지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
		박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
1차년도	12	3	3	3	3	5	7	12		
2차년도	11	1	3	6	1	4	7	11		
3차년도	12	6	6	2	0	5	7	12		
연인원	35	10	12	11	4	14	21	35		

2. 연구성과 활용 계획

1) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시 (이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용 건수	목표	1	1	0	0	0	
	달성	1	1 (준비중)	1	0	2	
	비고	인천바이오 설립/기술 이전		인천시의회에 제품 홍보 및 사업화 건의		조선일보, 인천일보 등에 기사 (붙임자료 9 참고)	한국식품과학회, 한국미생물연합 국제학술대회 등에서 포스터 발표

나. 사업화 계획

- 현재 위의 붙임 5-8 자료와 같이 인천대학교 기술지주회사 산하 ㈜인천바이오를 설립하여 과실주 생산 및 판매 사업이 시작되었으며, 향후 포도 농민과의 협력을 통한 농법 혹은 품종개량, 특허 효모주 사용, 동결건조법 등을 통한 당도개선, 머루포도 적용 등을 통해 포도주의 질을 높여 사업성을 향상시키고 2014년 아시안 게임의 건배주로 사용하는데 부족함이 없도록 노력할 것임.

- 과실주 외에도 과실즙, 과실잼 등의 제품 생산으로 사업범위를 넓힐 예정임.

붙임9

朝鮮日報 2010년 07월 22일 31E면 (지역)

인천대, 쌀 혼합한 포도주 개발

인천대학교가 1년 반 동안의 연구를 거쳐 인천시 행사나 만찬 등에 쓰일 공식 포도주를 개발했다. 인천대 안경수 총장은 "학내 연구진만으로 인천 지역을 대표할 만한 포도주를 개발했다"고 21일 밝혔다.

인천대가 만든 포도주는 국내 최고 브랜드로 여겨지는 대부도산 포도와 강화도의 찹쌀을 이용해 만든 것이다. 생명과학부 박관화 교수팀이 지난해 3월 개발을 시작했다. 박 교수는 "스페인이나 프랑스산 포도에 비해 대부도 포도의 당도가 부족해 제조과정에서 강화도 찹쌀을 발효시켜 당도를 보완했다"고 말했다.

포도에 쌀이 첨가된 특징을 살려 포도주의 이름은 '포도 미주(米酒)'(가칭)로 정했다. 포도주는 이르면 내년 5월부터 인천에 공급된다.

인천대가 이번에 개발한 술은 포도주를 포함해 총 3가지다. 포도주뿐만 아니라 100% 포도와 머루를 이용한 술과 알코올이 40% 이상 들어간 꼬냑(cognac) 등이다. 인천대는 "골다공증을 예방하고 항암효과와 숙취예방에 도움이 될 수 있는 천연 성분 등을 첨가해 40~50대 어른들도 선호할 수 있게 만들었다"고 말했다. 인천대는 내달 교내에 포도주 공장을 설립해 시제품을 생산한 뒤 정부로부터 특허 등록·판매 허가 등을 받을 계획이다.

이신영 기자

[인천/경기]무의도 섬포도주 개발… 인천대, 어제부터 시판

기사입력 2012-03-14 03:00:00 | 기사수정 2012-03-14 03:00:00

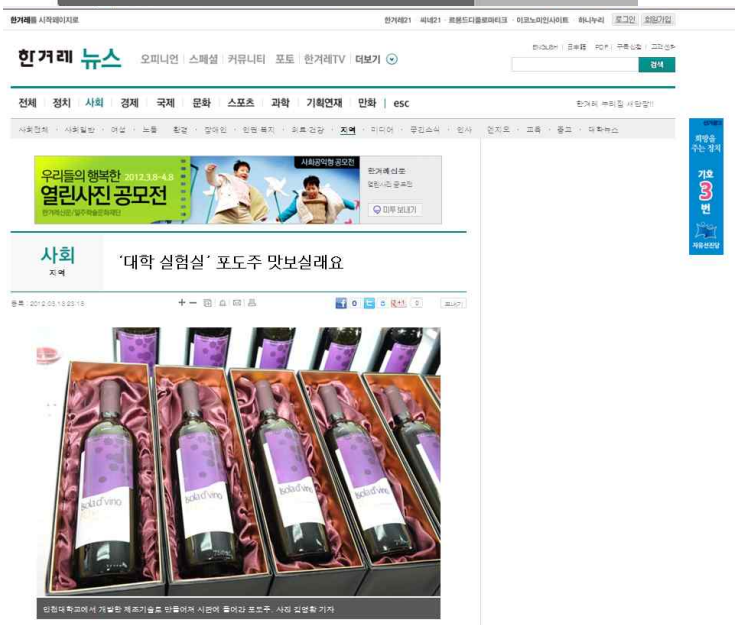
좋아요 Tweet 0 미투 기사보내기 폰트

인천대는 13일 산하 농업회사법인인 ㈜인천바이오가 자체 발효기술 특허로 포도주를 생산해 시판에 들어갔다고 밝혔다.

인천대는 '이솔라데 비노 이체'란 이름의 이 포도주가 인천 중구 무의도에서 재배한 품질 좋은 포도를 재료로 고유의 발효기술로 만들어 향이 좋고 맛이 뛰어나다고 설명했다. 포도주명은 스페인어로 '몸에 좋은 섬 포도주, 인천대에서 만든 섬 포도주'란 뜻을 담고 있다. 이 회사는 지난해 11월 국세청에서 포도주 제조 허가를 받은 데 이어 올해 1월 상표등록과 출고가격 신고를 마쳤다.

이에 앞서 지난해 2월 대학 공동실험실습관에 제조공장을 만들고 발효기술에 대한 특허를 받아 포도주 개발에 착수해 인천바이오를 8월에 설립했다. 특허기술은 설탕을 전혀 섞지 않고도 당도를 유지하며 발효 시간과 온도를 조절해 포도 껍질에서 타닌 성분이 많이 나오도록 한 것이 특징이다. 032-835-8943

차준호 기자 run-juno@donga.com



국내 대학으로는 처음으로 포도주 제조 기술을 개발해 시판한다고 인천대가 밝혔다.

인천대는 13일 산하 농업회사법인인 ㈜인천바이오가 자체 발효기술로 생산한 포도주 시음행사를 하고 시판에 들어갔다고 밝혔다. '이슬라데 비노 이체'로 이름을 붙인 포도주는 인천앞 바다의 무의도에서 재배한 우수한 품질의 포도를 대학이 개발한 발효기술로 만들었다. 포도주 이름은 스페인어로 '몸에 좋은 섬 포도주', '인천대에서 만든 섬 포도주'란 의미를 담고 있다.

인천대는 지난해 11월 국세청으로부터 포도주 제조허가를 받은 데 이어 올 1월 상표등록과 출고가격 신고를 마쳤다. 인천대는 지난해 2월 대학 공동실험실습관에 제조공장을 차리고 발효기술에 특허를 받아 포도주 개발에 착수했으며 같은해 8월에 ㈜인천바이오를 설립했다. 인천대는 설탕을 전혀 쓰지 않고도 당도를 유지하며 발효시간과 온도를 조절해 포도껍질에서 탄닌 성분이 많이 나오도록 한 발효기술을 개발해 특허를 받았다.

인천대 관계자는 "2014 인천아시안게임 등 주요 국제 행사 등에서 건배술로 사용할 수 있도록 하기 위해 포도주 개발에 나섰다"고 말했다. (032-835-8943).

김영환 기자 ywkim@hani.co.kr

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 발효용 효모균주의 개량

1) 알코올음료 생산을 위한 전분분해 효모균주 육종에 관한 연구

알코올 음료 제조에 적용할 목적으로 Schizosaccharomyces pombe와 Monascus anka의 융합체를 성공적으로 만들었음 (Cheng et al., 2011). 형성된 융합체는 다양한 탄소원으로 효율적으로 사용할 수 있었고 α-amylase, glucoamylase 및 산성 단백질 분해효소를 모균주보다 월등히 더 많이 생산할 수 있었다. 따라서 쌀 발효물에 가하는 glucoamylase 양을 약 반 정도로 줄일 수 있었다. 또한 발효 후 생성되는 발효취가 모균주를 사용했을 때 보다 개선되어 술 제조에 사용될 수 있을 것으로 사료되었다.

2) mannoprotein을 과량으로 생산하는 효모균주를 분리하는 새로운 기법

효모의 mannoprotein들은 고도로 당화된 단백질들로 효모 세포벽에 존재하는 β-1,3-글루칸에 공유결합으로 연결되어 있으며 단백질로 인한 혼탁도 문제, 떫은 맛 감소, 향기성분 보존, 유산균 성장 촉진 등 포도주 질 개선에 영향을 미친다. 유전자 재조합 기법을 이용하지 않고 mannoprotein을 과량으로 생산하는 효모균주를 분리하기 위하여 *Williopsis saturnus*가 생산하는 killer 9 toxin에 대한 저항성을 보이는 균주들을 탐색하는 기법을 고안되었는데 이러한 표현형은 효모 세포벽 생합성이 타 균주들과 다르게 변형되었음을 의미하기 때문에 가능하였다 (Quiros et al., 2010)

2. 인공감각센서인 전자코와 전자혀를 이용한 포도주 성분 및 관능평가

1) 전자코(Electronic Nose)에 의한 식품의 향미 분석

식품의 향은 원재료에서부터 최종 제품까지 매우 중요한 품질요소로서 이 향을 측정하기 위해 관능검사와 GC/MS 분석법 등이 사용되어져 왔다.(김성란 et al.) 훈련된 관능검사 패널은 미미한 향의 강도, 배합의 차이를 감지할 수 있으나 제

한점 등이 크고, GC/MS와 GC/O(GC linked to olfactometry) 등에 의한 기기분석 방법은 향에 관여하는 여러 성분의 종류와 농도를 밝힐 수는 있으나 식품 내에서의 각 성분들의 상호 작용에 의한 향 특성을 표현해 낼 수 없는 단점이 크다. 이러한 단점 때문에 사람의 코처럼 미묘하고 복잡한 향기와 냄새성분을 감지할 수 있는 보다 객관적이고 자동화된 기기에 대한 필요 욕구가 커져 사람의 후각 인지체계를 모방한 전자코 장치가 개발되었다.

전자코 시스템은 코의 후각세포에 해당하는 가스센서와 뇌의 후각정보 처리 방식을 모방한 패턴인식 소프트웨어를 이용해 냄새를 감별하는 전자처리 장치이다. 전자코 시스템은 음료, 주류 등 각종 식품의 향미성분 분석, 과실 등의 선도와 등급 결정은 물론 생산공정 감시, 공정제어 및 자동화 분야, 제품의 품질 평가 및 관리 등 식품산업의 여러 분야에서 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

패널들에 의한 분석에서, 고농도 데이터에서 서로 다른 농도로 인해 혼란이 일어났고, diacetyl과 4-vinyl guaiacol에서는 4배 이상, decalactone, 3-methyl butanol, butyric acid에서는 10배 이상의 농도 차이만을 구분해 내었다. Whiskeylactone과 nonalactone은 최대 농도에서도 구분해내지 못하였다. 그러나 전자코는 백포도주의 purge extration과 trap extraction의 양적 측정에서 성공률 100%를 보였다. 반면, decalactone에서는 좋지 않은 반응성을 보였다.

Damascenone의 경우 임계점의 10배 농도이긴 했으나 패널들에 의해서 확인되었고, 전자코는 낮은 농도에도 불구하고 양과 질 측정 모두 가능했다. Ethanol과 물에 의한 간섭에도 불구하고 전자코는 headspace sampling method를 이용한 실험에서 좋은 성능을 나타내었다.

- 전자코가 화합물들의 농도를 정하는데 훈련받은 전문가 패널보다 유리하다고 결론내릴수 있다 (José Pedro Santos et al.).

- 전자코는 과실주 제조 과정 중 발생하는 효과들을 측정하는데 유용하게 이용될 수 있다.(Necla Demir et al.)

2) 전자혀를 이용한 관능평가

- 스페인의 대표적 스파클링 와인인 카바가 지닌 여러 유형의 향미들을 파악할 수 있는 전자 혀에 대해서 연구를 진행하고 있다. 디캔터 2011년 8월 1일 온라인판에 따르면 이 장치는 바르셀로나 오토노마 대학교(Universitat Autònoma de Barcelona)에서 개발되었다. 사람의 미각 시스템을 그대로 모방하여 만들어진 이 장치는 화학적인 측정 수단과 진보적인 소프트웨어 기술을 활용하여 작동된다. 이 장치는 소믈리에와 비슷하게 와인 맛을 구별하는 세부적인 기준을 갖고 있으며 카바 와인의 생산 과정에 우선적으로 활용될 예정이다.

본질적으로 이 장치는 카바 와인의 생산과정 중 이차 발효과정 후에 생성되는 당분의 양을 측정할 수 있다. 이 같은 능력은 당분이 낮은 브뤼(1리터당 당분 3그램 이하) 에서부터 당분이 많은 스위트(1리터당 당분 50그램 이상)에 이르기까지 와인의 당분을 정량할 수 있다. 이번 연구를 주도한 Manel del Valle 박사는 이 장치는 와인 생산 공정에 활용될 수 있으며 식품 혹은 음료 회사들이 활용하고 있는 시음평가단을 대체할 수 있을 것으로 평가했다. 그러나 전자 혀는 와인 생산 과정 중 자동 테스트 공정에는 적합하지만 와인 맛의 섬세한 뉘앙스까지 구별해 줄 수 없어 소믈리에의 존재를 대신할 수는 없을 것으로 예측된다 (Wine21.com)

- 전자 혀를 이용한 쌀포도주의 숙성도 평가

중국식 쌀포도주의 숙성도를 평가할 수 있도록 6개의 전극으로 이루어진 전자 혀가 개발되었다. 주요성분 분석과 클러스터 분석을 통하여 1년, 3년 5년간 숙성된 쌀포도주를 구별할 수 있었으며 back-error propagation-artificial neural network과 partial least squares 기법을 이용하여 예측모델을 개발하였다 (Wei et al., 2011)

3. 포도주 관련 해외과학기술

- 알코올이 함유된 음료는 심혈관 질환을 방지하는 효과가 있지만 혈액 내의 TG와 TG/HDL-cholesterol의 비율을 높인다. 이는 심혈관 질환의 위험을 높이는데 관련이 있다.

- Red wine으로 14일간 실험 진행 결과, red wine은 TG와 TG/HDL ratio를 증가시켰다. 다변수 회귀분석을 통해 과도한 BMI를 지닌 사람에서만 혈중 TG와 TG/HDL ratio의 증가에 의한 위험이 심각한 것으로 나타났다 (Fernando Henpin Yue Cesena et al.).

- 포도주에 함유된 resveratrol는 기능성 물질로 염증을 약화시키고 잠재적인 health benefit을 지닌다.

- Resveratrol은 phytochemical로 red grape의 껍질에 존재하고 포도주와 포도쥬스에서 높은 농도로 발견된다. Resveratrol은 연령에 따른 징병의 방지와 치료에 가능성을 보였고, 많은 회사에서 약이나 기능성 식품으로 개발하고 있다.

- Resveratrol는 French paradox를 개선시킬수 있다는 연구결과가 있는데 포도주,

포도쥬스, 그 외 포도제품들과 물리적인 요소에 의해 심혈관 질환의 위험이 줄어들 수 있다 (Gerard E. Mullin. et al.).

- 제공된 식사와 물을 함께 섭취한 그룹은 혈중의 lipid hydroperoxides와 cholesterol oxidation product 농도를 현저하게 증가하였고, Wine을 섭취한 그룹에서는 lipid hydroperoxides와 cholesterol oxidation product의 농도의 증가가 대부분 억제되었다.

- 이 실험은 와인과 함께 식사하는 것이 식후의 혈중 cholesterol oxidation product의 증가를 억제할 수 있다는 증거이다 (F. Natella et al.).

4. 칡(pueraria lobata) 관련 해외과학기술

- 칡뿌리는 isoflavone인 O-, C-glycoside가 풍부하다. O-glycoside는 분자적 level에서 잘 정립되어 있지만 식물유래 C-glycosyltransferase genes은 추출된 바 없다.

- 칡의 isoflavonoid의 합성을 설명하기 위해 cDNA library를 구성하여 expressed sequence tags (ESTs)을 확보했고, 칡의 isoflavone 생합성과 glycosylation에 관계되는 유전자의 확인을 통해 생리활성물질인 kudzu isoflavone의 metabolic engineering을 위한 새로운 resource를 제공할 수 있다 (XianZhi He et al.).

- puerarin은 신경계를 보호하고 항산화, 항암효과 및 항염증 (TNF-α억제)효과가 있다. 또한 lipopolysaccharide에 의한 nitric oxide의 과발현과 세포내 활성산소의 형성이 puerarin에 의해 감소되었다.

- mitogen-activated protein kinase (MAPK)와 nuclear factor κB (NF-κB) signaling pathway의 인산화를 증가시킨다. 또한 p38, JNK, ERK1/2에서 LPS에 의해 증가된 인산화를 억제시키는 기능도 한다 (Zheng GM et al.).

- 그러나 구강섭취를 통한 이용가능성이 떨어지기 때문에 acetylation을 이용해 tetraacetyl puerarin(4AC)를 합성하여 생체 내에서의 이용 가능성을 측정한 결과 현저하게 SOD의 활성을 높였고 MDA의 level을 낮추는 결과를 in vitro와 in vivo에서 보여주었다.

- 또한 *in vivo*에서 GSH-PX와 총 항산화능력을 향상시켰고 TNF-α의 level도 줄여주었다 (Cheng XiaO rt al.).

제 7 장 참고문헌

Andrejewski N, EL Punnonen, G Guhde et al. (1999) Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. J Biol Chem 274: 12692-701.

Attfield PV. (1997) Stress tolerance. The key to effective strains of industrial baker's yeast. Nat Biotech 15: 1351-1357.

Bae SD, SM Bae, JS Kim. (2004) Fermentation characteristics of Rice-Grape Wine Fermented with Rice and Grape. Korean J Food 36: 616-623.

Bergheim I, LP Guo, MA Davis, JC Lambert, JI Beier, I Duveau, JP Luyendyk, RA Roth, GE Arteel. (2006) Metformin prevents alcohol-induced liver injury in the mouse: critical role of plasminogen activator inhibitor-1, Gastroentero 130: 2099–2112.

Biasoto ACT, RR Catharino, GB Sanvido, MN Eberlin, MAAP da Silva. (2010) Flavour characterization of red wines by dexdriptive analysis and ESI mass spectrometry. Food Qua Prefern 21: 755-762.

Brossaud F, C Veronique, AC Noble. (2001) Bitterness and astringency of grape and wind polyphenol. Aus J Grape Wine Res 7: 33-39.

Chen JW, TL Murphy, MC Willingham et al. (1985) Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. J Cell Biol 101: 85-95.

Cheng MC, RC Chang, DF Dent, PC Hsieh. (2011) Breeding an Amylolytic Yeast Strain for Alcoholic Beverage Production. Appl Biochem Biotechnol 163: 693-706

Choi CH, JW Kim, CS Park, KH Park, MK Kyung, JT Park, CK Lee, YW Kim, JH Lee, SH Park, JH Shim, XH Li. (2010) Biocat Biotransform 28: 209-214.

Choi CH, SH Kim, JH Jang, JT Park, JH Shim, YW Kim, and KH Park. (2010) Enzymatic synthesis of glycosylated puerarin using maltogenic amylase from *Bacillus stearothemophilus* expressed in *Bacillus subtilis*. J Sci Food Agric 90: 117901184.

Cletus PK, JR Christie. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie van Leeuwenhoke 73: 331-371.

Daniel H, M Moons. (2011) *Wickerhamomyces anomalus* in the sour dough microbial ecosystem. Antonie van Leeuwenhoek. 99: 63-73.

Das D, R Vimala, N Das. (2010) Functional foods of natural origin-An overview. Mol Nutri Food Res 54: 353–363.

Demir N, AC O Ferraz, SA Sargent, M O Balaban. (2011) Classification of

impacted blueberries during storage using an electronic nose. J Sci Food Agri 91: 1722–1727.

Donohu, TM, RK Zetterman, DJ Tuma. (1989) Effect of chronic ethanol administration on protein catabolism in rat-liver. Alcohol Clin Exp Res 13: 49–57.

Feng Z, H Zhang, AJ Levine, S Jin. (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. Pro. Natl Acad Sci USA 102: 8204–8209.

Fleet GH, GM Heard. (1993) Yeast: growth during fermentation. In: Fleet GH, Editor. Wine Microbiology and Biotechnology. Netherlands: Harwood Academic Publishers. p. 27–54.

Fleet GH. (2003) Yeast interactions and wine flavor. Intl J Food Microbiol 86: 11-22.

Francis IL, JL Newton. (2005) Determining wine aroma from compositional data. Aus J Grape Wine Res 11: 114-116.

Fugelsang KC, CG Edwards. (2009) Microbial Ecology during Vinification. In: Wine Microbiology. Practical Applications and Procedures. Amsterdam: Springer; p. 84-85.

Gamp AC, Y Tanaka, R Lullmann-Rauch et al. (2003) LIMP-2/LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness, and peripheral neuropathy in mice. Hum Mol Geneti. 12: 631-46.

Gozuacik D, A Kimchi. (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. Oncogene 23: 2891-906.

Han P., J. Li, W.J. Li, Z.L. Yu, Q. Wang, D.S. Wu. (2005) [Potential antiviral drug Pueraria crude extract and puerarin protect against ethanol-induced cytotoxicity in embryonic mouse hippocampal cultures], Zhonghua shi yan he lin chuang bing du xue za zhi = Zhonghua shiyan he linchuang bingduxue zazhi. Chin J Exp Clin Virol 19: 244–247.

Hibi T, K Tomita, G Tamiya, S Ando, N Kitamura, H Koizumi, S Kato, Y Horie, T Kaneko, T Azuma, H Nagata, H Ishii. (2005) AICAR, an AMPK activator, has protective effects on alcohol-induced fatty liver in rats. Alcohol Clin Exp Res 29: 240–245.

Hien TT, HG Kim, EH Han, KW Kang, HG Jeong. (2010) Molecular mechanism of suppression of MDR1 by puerarin from Pueraria lobata via NF-kappaB pathway and cAMP-responsive element transcriptional activity-dependent up-regulation of AMP-activated protein kinase in breast cancer MCF-7/adr cells. Mol Nutr Food Res 54: 918–928.

Hockney RC, RF Freeman. (1980) Gratuitous Catabolite Repression by

Glucosamine of Maltose Utilization in *Saccharomycescerevisiae*. J Gen Microbiol 121: 479-482.

Hostinova E. (2002) Amylolytic enzymes produced by the yeast *Saccharomy copsisfibuligera*. Biologia 57: suppl.11:247-251.

Hozumi Y, M Kawano, VC Jordan. (2000) In vitro study of the effect of raloxifene on lipid metabolism compared with tamoxifen. Eur J Endocrinol 143: 427–430.

Hurst RD, RW Wells, SM Hurst, TK McGhie, JM Cooney, DJ Jensen. (2010) Blueberry fruit polyphenolics suppress oxidative stress-induced skeletal muscle cell damage *in vitro*. Mol Nutri Food Res 54: 353–363.

Hwang SW, HD Park. (2009) Characteristics of Red Wine Fermentation of Freeze-Concentrated Campbell Early Grape Juice Using Various Wine Yeasts. Kor J Food Preserv. 16: 977-984.

Inoki K, J Kim, et al. (2012) AMPK and mTOR in Cellular Energy Homeostasis and Drug Targets. Ann Rev Pharm Toxicol 52(1): 381-400.

Isselbac KJ. (1966) Interrelationship of alcohol and lipid metabolism in liver. Psychosom Med 28:424.

Ju MN, SW Hong, KT Kim, SK Yum, GW Kim, KS Chung. (2008) Breeding of Yeast Strain with Starch Utilizing and Alcohol Fermenting Ability by Protoplast Fusion. Kor J Microbiol. 36: 158-164.

Jung HK, CD Park, DH Bae, JH Hong. (2008) Isolation of Alcohol-tolerant Amylolytic *Saccharomycescerevisiae* and Its Application to Alcohol Fermentation. Food Sci Biotechnol 17: 1160-1164.

Kametaka S., T Okano, M Ohsumi et al. (1998) Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 273: 22284-91.

Kang T, G Oh, K Kim. (2000) Isolation and Identification of Yeast Strains Producing High Concentration of Ethanol with High Viability. Kor J Appl Microbiol Biotechnol 28: 309-315.

Kim EJ, YH Kim, JW Kim, HH Lee, YJ Ko, MH Park, JO Lee, YS Kim, YL Ha , CH Ryu. (2007) Optimization of Fermentation Process and Quality Properties of Wild Grape Wine. J Korean Sco Food Sci Nutr 36: 366-370.

Kim DH, YA Hong, HD Park. (2008) Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. Biotech Lett 30: 1633-1638.

Kim OM, S Woo, Y Park, K Park, Y Jeong. (2006) Alcohol Fermentation Characteristics of the Korean Native Mulberry (Morus spp.). J Food Sci Nutr.

11: 166-170.

Kisen GO, L Tessitore, P Costelli et al. (1993) Reduced autophagic activity in primary rat hepatocellular carcinoma and ascites hepatoma cells. Carcinogen 14: 2501-2505.

Klionsky DJ, SD Emr. (2000) Cell biology – Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. Science 290: 1717–1721.

Komatsu M, S Waguri, T Ueno et al. (2005) Impairment of starvation-induced and constitutively autophagy in Atg7-deficient mice. J Cell Biol 169: 425-434.

Kurtzman CP. (2011) Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. Antonie van Leeuwenhoek. 99: 13-23.

Laluce C, MC Bertolini, JR Ernandes, AV Martini, A Martini. (1988) New Amylolytic Yeast Strains for Starch and Dextrin Fermentation. Appl Environ Microbiol 54: 2447-2451.

Lambrechts MG. (2000) Pretorius IS. Yeast and its importance to wine aroma-A review. S African J Enol Vit 21: 97-129.

Lee JK, JS Kim. (2006) Study on the Deacidification of Wine Made from Campbell Early. Korean J Food Sci Tech 38: 408-413.

Lee SJ, JE Lee, HW Kim, SS Kim, KH Koh. (2006) Development of Korean red wines using *Vitis labrusca* varieties: instrumental and sensory characterization. Food Chem 94: 385-393.

Lee SJ, MJ Chung, NJ Sung, CS Park, DK Kweon, A Mantovani, TW Moon, KH Park. (2008) Antioxidative and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cells and in C57BL/6J mice. Eur J Pharmacol 578: 159–170.

Lee YJ, DC Yang. (2010) Induction of Callus from Ricinus communis and Physiological Activity of Callus Extract. Bull Nat Sci 12: 67-76.

Li D, JT Park, X Li, S Kim, S Lee, JH Shim, SH Park, J Cha, BH Lee, JW Kim, KH Park. (2010) Overexpression and characterization of an extremely thermostale maltogenic amylase, with an optimal temperature of 100℃, from the hyperthermophilic archaeon *Staphylothermus marinus*. New Biotech 27: 300-307

Li W, T Beta. (2011) Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of anthograin liqueur. Food Chem 127: 968–975.

Liang X.H, L.K. Kleeman, H. H. Jiang et al. (1998) Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by Beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. J Virol 72: 8586-96.]

Liang XH, S Jackson, M Seaman et al. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. Nature 402: 672-6.

McCullough AJ, RS O'Shea, S Dasarathy (2010) A.A.S.L. Dis, A.C. Gastro-enterology, Alcoholic liver disease. Hepatology 51:307–328.

Meijer AJ, D Meley, C Bauvy, JHPM Houben-Weerts, PF Dubbelhuis, MTJ Helmond, P Codogno. (2006) AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. J Biol Chem 281: 34870–34879.

Melendez A, B Levine. (2009) Autophagy in C. elegans. WormBook: 1-26.

Mussatto, SI, EM Machado, LM Carneiro, JA Teixeira. (2012) Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. Appl Energ 92: 763-768.

Nguyen VD, Min B, Kyung M, Park J, Lee BH, Choi C, Seo N, Kim Y, Ahn Lee, DU, C Park, J Kim, K Park. (2009) Identification of a naturally-occurring 8-[α-D-Glucopyranosyl-(1,6)-β-D-glucopyranosyl]daidzein from cultivated kudzu root. Phytochem Anal 20: 450-455.

Moreno-Arribas MV, MC Polo. (2005) Winemaking Biochemistry and Microbiology : Current Knowledge and Future Trends. Crc Rev Food Sci Nutri 45: 265-286.

Osho A. (2005) Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermenting cashew apple juice. Arf J Biotech 4: 660-662.

Quiros M, D Gonzalez-Ramos, L Tabera, R. Conzalez. (2010) A new methodology to obtain wine yeast strains overproducing mannoproteins. Internat J Food Micobiol 139: 9-14.

Rabinowitz JD, E White. (2010) Autophagy and metabolism. Science 330 1344–1348.

Randall G, NS Heaton. (2010) Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. Cell. Host Microbe. 8: 422–432.

Rojas V, JV Gil, F Pinaga, P Manzanares. (2003) Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. Int J food Microbiol. 86:181-188.

Romano P, C Fiore, M Paraggoio, M Caruso, A Capece. (2003) Function of yeast species and strains in wine flavor. Intl J Food Microbiol 86: 169-180.

Rubin E, CS Lieber. (1974) Fatty liver, alcoholic hepatitis and cirrhosis produced by alcohol in primates. N Engl J Med 290: 128–135.

Sankh SN, PS Deshpande, AU Arvindekar. (2011) Improvement of ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* by enhancement of biomass and nutrient supplementation. Appl Biochem Biotechnol 164: 1237-1245.

Santos JP, J Lozano, M Aleixandre, T Arroyo, JM Cabellos, M Gil, MC Horrillo.

(2010) Threshold detection of aromatic compounds in wine with an electronic nose and a human sensory panel. Talanta 80: 1899–1906.

Schmelzle T., MN Hall. (2000) TOR, a central controller of cell growth. Cell 103: 253–262.

Soden A, IL Francis, H Oakey, PA Henschke. (2000) Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. Aus J Grape Wine Res 6: 21-30.

Stromhaug PE, DJ Klionsky. (2001) Approaching the molecular mechanism of autophagy. Traffic 2:524–531.

Tanaka Y, G Guhde, A Suter, et al. (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiopathy in LAMP-2-deficient mice. Nature 403:902-6.

Towantakavanit K, Park YK, Park YS. (2010) Quality Changes in 'Hayward' Kiwifruit Wine Fermented by Different Yeast Strains. Korean J Food Preserv 17: 174-181.

Ugliano M, Henschke PA. (2009) Yeasts and Wine Flavour. In: Moreno-arribas MV, Polo MC, editors. Wine Chemistry and Biochemistry. Amsterdam: Springer, p. 366-371.

Wei Z, J Wang, L Ye. (2011) Classification and prediction of rice wines with different marked ages by using a voltammetric electronic tongus. Biosens Bioelectron 15: 4767-4763.

Yin XM, WX Ding, WT Gao. (2008) Autophagy in the liver. Hepatology 47: 1773–1785.

You M. (2004) AMP-activated protein kinase as a new target of ethanol action in the liver. Alcohol. Clin. Exp. Res. 28: 190a.

You M, M Matsumoto, CM Pacold, WK Cho, DW Crabb. (2004) The role of AMPactivated protein kinase in the action of ethanol in the liver. Gastroenterology 127: 1798–1808.

Zhang Q., Y. Fu, Y. Wang, J. Han, J. Lv, S. Wang (2011) Improved ethanol prodution of a newly isolated themotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain after high-energy-pulse-electron beam. J Appl Microbiol 112: 280-288.

Zhang Y, J Gao, J Ntoni, MF Begonia, KS Lee, HM Hwang. (2008) Enhancing ethanol fermentability of an artificial acid hydrolyzate with anion exchange resin treatment. Prep Biochem Biotechnol 38: 191-200.

Zhao M., YQ Du, L Yuan, NN Wang. (2010) Protective effect of puerarin on acute alcoholic liver injury. Am J Chin Med 38: 241–249.

Zuzuarregui A, del Olmo M. (2004) Analysis of Stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection.

Antonie van Leewenhoek 85: 271-280.
김경환, 한기동. (2011) 효모의 종류를 달리한 캠벨 얼리 포도 발효주의 제조. Kor J Microbiol Biotech 39: 43-48.
김성란. (1997) 전자코(Electronic Nose)에 의한 식품의 향미 분석. 식품과학과 산업 30: 126-133.
김현구, 나경민, 예수향, 한호석. (2004) 오미자 추출물의 추출특성 및 항산화 효과. Korean J. Food Culture, 19(5): 484~490.
이신호, 임용숙. (1998) 오미자(*Schizandra chinensis*)의 병원성 미생물에 대한 항균효과. 한국식품영양과학회지. 27(2): 239~243
이주연, 민용규, 김희연. (2001) 오미자로부터 향균활성 물질의 분리 및 항균효과, 한국식품과학회지. 33 (3): 389~394.
http://www.biosite.se/
http://www.cellsignal.com/

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림수산식품 연구개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림수산식품 연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.