



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2016년 2월

박사학위 논문

전통항아리에서 발효한
발효현미슬러리와 흑초의
생리활성 및 분자유전학적 연구

조선대학교 대학원

보완대체의학과

곽 경 자

전통항아리에서 발효한
발효현미슬러리와 흑초의
생리활성 및 분자유전학적 연구

**Molecular genetics and physiological study on fermented
slurry and dark vinegar of unpolished rice fermented in
Korean traditional jar**

2016년 2월 25일

조선대학교 대학원

보완 대체 의학과

곽 경 자

전통항아리에서 발효한
발효현미슬러리와 흑초의
생리활성 및 분자유전학적 연구

지도교수 정 현 숙

이 논문을 보완대체의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2015년 10월

조선대학교 대학원

보완대체의학과

곽 경 자

곽경자의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 소금영 (인)

위원 조선대학교 교수 이미자 (인)

위원 전남대학교 교수 김응석 (인)

위원 조선대학교 교수 박윤경 (인)

위원 조선대학교 교수 정현숙 (인)

2015년 12 월

조선대학교 대학원

목 차

LIST OF TABLES	v
LIST OF FIGURES	vii
ABSTRACT	viii
I. 서론	1
A. 연구의 이론적 고찰	3
1. 프로바이오틱스	3
a. 정의	3
b. 프로바이오틱의 조건	6
(1) 안전성	6
(2) 기능성	6
(3) 항균성	6
(4) 작용기전	7
c. 프로바이오틱스의 효과	8
2. 모주	9
a. 정의	9
b. 시판되는 모주의 일반성분	10
3. 식초	11
a. 정의	11
b. 초산균(Acetic acid bacteria; AAB)	11
c. 유기산 구성	13
B. 연구의 목적	14
II. 발효현미슬러리	16
A. 서론	16
B. 실험재료 및 방법	17

1. 균주 및 배지	17
a. 발효현미슬러리의 제조	17
b. 사용 배지	19
2. 분자유전학적 동정	20
a. 균주의 스크리닝 및 동정	20
b. 유당 이용능	20
3. 생리활성 측정	22
a. 일반성분 분석	22
b. 유리 아미노산 분석	22
4. 항생제 감수성	23
a. 항균 spectrum	23
b. pH 및 유기산에 따른 항균활성 분석	24
5. 항산화 활성도	25
a. Free radical 소거 활성 측정을 통한 항산화능 분석	25
C. 실험 결과	26
1. 분자유전학적 동정	26
a. 균주의 스크리닝 및 동정	26
b. 유당 이용능	30
2. 생리활성 측정	32
a. 일반성분 분석	32
b. 유리 아미노산 분석	34
3. 항생제 감수성	36
a. 항균 spectrum	36
(1) 발효현미슬러리의 항균 활성	36
(2) 유기산의 항균 활성	40
(3) pH에 따른 FSUR 항균 활성	42
4. 항산화 활성도	44
a. Free radical 소거 활성 측정을 통한 항산화능 분석	44

D. 고찰 및 결론	46
III. 흑초	48
A. 서론	48
B. 실험재료 및 방법	49
1. 균주 및 배지	49
a. 사용균주의 제조	49
b. 사용 배지	51
2. 분자유전학적 동정	52
a. 균주의 스크리닝 및 동정	52
b. 유당 이용능	52
3. 생리활성 측정	53
a. 일반성분 분석	53
(1) 유리당 측정	53
(2) 유기산 함량	53
b. 유리 아미노산 분석	53
4. 항생제 감수성	55
5. 항산화 활성도	56
a. FDV의 배양기간에 따른 항산화 활성도	56
b. FDV와 Gagguida, Gagoshima 쿠로즈의 항산화능	56
C. 실험의 결과	58
1. 분자유전학적 동정	58
a. 균주의 스크리닝 및 동정	58
b. 유당 이용능	62
2. 생리활성 측정	64
a. 일반성분 분석	64
(1) pH 측정	64
(2) 유리당 측정	64
(3) 유기산 분석	64

b. 유리 아미노산 분석	66
3. 항생제 감수성	68
a. pH에 따른 항균 활성	68
b. 유기산의 항균 활성	70
c. FDV-3와 Gagguida, Gagoshima 쿠로즈의 항균력 분석	73
4. Free radical 소거 활성 측정을 통한 항산화능 분석	75
a. 항산화 활성도	75
b. FDV와 Gagguida, Gagoshima 쿠로즈의 항산화능 분석	77
D. 고찰 및 결론	78
IV. 결론	81
참고문헌	84

List of tables

Table 1. 건강기능식품에 프로바이오틱스로 사용할 수 있는 균주	4
Table 2. Morphological characteristics of four microorganisms	27
Table 3. Biochemical characteristics of <i>Gluconacetobacter intermedius</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> and <i>Acetobacter peroxydans</i>	31
Table 4. Changes in alcohol, pH, and total soluble solid content during the fermentation of fermented slurry of unpolished rice (FSUR)	33
Table 5. Biochemical component analysis of FSUR	33
Table 6. Amino acid analysis of fermented slurry of unpolished rice (FSUR)	35
Table 7. Screening of fermented slurry of unpolished rice (FSUR) and a variety of other antibiotics and control substances for antimicrobial activity using a paper disc assay	37
Table 8. Screening for antimicrobial activity according to the acidity of 3-year fermented dark vinegar using paper disc assay	39
Table 9. 발효현미 슬러리에 포함된 유기산의 항균활성	41
Table 10. Screening for antimicrobial activity according to the acidity of fermented slurry of unpolished rice (FSUR) using the paper disc assay	43
Table 11. DPPH assay	57
Table 12. Morphological characteristics of 3 microorganisms	61
Table 13. Component analysis of Fermented Dark Vinegar (FDV)	63
Table 14. Amino acid analysis of fermented dark vinegar(FDV)	65
Table 15. Carbon source usage of three microorganisms isolated from fermented dark vinegar (FDV)	67
Table 16. Screening for antimicrobial activity due to the acidity at the 3year -	

FDV using paper disc assay 69

Table 17. Screening for antibacterial activity by paper disc assay 71

List of figures

Figure 1. Preparation of Fermented Slurry of Unpolished Rice (FSUR)	18
Figure 2. Phylogenetic tree based on 16s rRNA gene sequences of 4 isolates	28
Figure 3. PCR and electrophoresis using 16sRNA primer of four microorganism	29
Figure 4. Screening for antibacterial activity by paper disc assay	38
Figure 5. Screening for antibacterial activity by paper disc assay	38
Figure 6. Antioxidant activity of fermented slurry of unpolished rice (FSUR).	45
Figure 7. Preparation of fermented dark vinegar (FDV)	50
Figure 8. Phylogenetic tree based on 16s rRNA gene sequences of 3 isolated microorganisms from Fermented Dark Vinegar	59
Figure 9. PCR and electrophoresis using 16sRNA primer of four microorganism	60
Figure 10. Screening for antibacterial activity	72
Figure 11. Screening for antibacterial activities of FDV-3, Gagguida, Gagoshima by paper disc assay	74
Figure 12. Antioxidant activities of Fermented Dark Vinegar (FDV)	76
Figure 13. Comparison antioxidant activities of fermented dark vinegar and Gagoshima dark vinegar, Gagguida dark vinegar	77

ABSTRACT

Molecular genetics and physiological study on fermented slurry and dark vinegar of unpolished rice in Korean traditional jar

Gwak GyeongJa

Advisor : Prof. Cheong Hyeonsook, Ph.D.

Department of Complementary and alternative Medicine,
Graduate School of Chosun University

In this study, fermented slurry (FSUR) and vinegar (FDV) of unpolished rice was evaluated respect to its antimicrobial activity and biochemical content, including the amounts of sugar, total soluble sugar, organic acids, free amino acids, pH, and physiological activity.

Unpolished Rice (UR) is composed of external thin layers (bran) that enclose the embryo and endosperm. For this reason, UR has a higher nutritional quality than polished rice. Unpolished Rice is considered a healthy alternative to white rice in the fight against chronic diseases.

Recently, human and animal studies have shown that consumption of UR reduces the risk of type-2 diabetes, cardiovascular disease and cancer, and these protective health effects have been linked to the presence of bioactive compounds such as polyphenols, GABA, acylated sterol b-glucoside and c-oryzanol.

In traditional Korean food, various fermentative products, including rice vinegar, Makgully, Toenjang, kimchi and chonggukchang, are consumed as health food products. Makgully is a traditional Koreans wine, produced from rice by prolonged (more than 15 days) fermentation in earthenware jars. The supernatant is Makgully, while the sediment is called Moju. Moju has been

reported to appetizer for cure a hangover at restaurant.

In this study, FSUR produced from unpolished rice by prolonged fermentation in earthenware jars in the same way Makgully is produced. The sediment, is called FSUR, contains large amounts of organic materials, minerals and probiotics. The effect of FSUR on antimicrobial activity against pathogenic bacteria strains possessed strong.

To evaluate the antioxidant activity of FSUR, we used the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay. FSUR had high antioxidant activity. FSUR was spread onto tryptic soy broth and yeast extract-peptone-dextrose agar media. The isolated microorganisms were characterized using physiological and biochemical analyses as well as by 16s rDNA sequencing and phylogenetic analysis. 16s ribosomal DNA sequence analysis showed that the isolated microorganisms had high similarity to *G. intermedius*, *Lactobacillus casei*.

FSUR exhibited strong antimicrobial activity against pathogenic bacteria strains and fermentation strains. these strains were *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*.

The fermentation strains were *Gluconacetobacter intermedius* and *lodderomyces elongisporus*. Antimicrobial activity was higher for FSUR than commercial antibiotics carbenicillin and tetracycline when put against *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogines*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Y. enterocolitica* and *L. elongisporus*.

Fermented Dark Vinegar (FDV), a Traditional Vinegar made from unpolished rice, exhibited the highest antioxidative activity. FDV is been matured and fermented for many years in earthenware jars and has attracted attention as a health food, for example it has been reported to ameliorate colitis in mice and to have an anti-oxidative effect.

In this study, as a first step to identify the active components, which contain large amounts of organic materials and minerals. Additionally, FDV is produced via a fermentation process carried out by several microorganisms including molds, yeasts, lactic acid, and acetic acid.

The antimicrobial efficiency of FDV was tested by agar diffusion method using the paper disc, and exhibited strong antimicrobial activity against the pathogenic bacteria and yeast strains that were tested.

The antioxidant activity of FDV was also evaluated with ascorbic acid and found to have the highest activity by the 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging method.

Based on 16S rDNA sequence phylogenetic analysis the isolated microorganisms were identified to be *Acetobacter papayae*, *Acetobacter pasteurianus* and *Acetobacter peroxidans* - close phylogenetic neighbors each other.

FDV even showed higher antimicrobial activity against *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *Y. enterocolitica* and *L. elongisporus* than carbenicillin (50ug/ml) or tetracyclin (50ug/ml) as commercial antibiotics.

FDV may be a potential candidate as a therapeutic agent.

I. 서론

헬레나 노르베리호지는 ‘오래된 미래’에서 “서부 히말라야 고원의 작은 지역 라다크의 빈약한 자원과 혹독한 기후에도 불구하고 생태적 지혜를 통해 천년이 넘도록 평화롭고 건강한 공동체를 유지해 온 라다크가 서구식 개발 속에서 환경이 파괴되고 사회적으로 분열되는 과정을 보여주며, 사회적, 생태적 재앙에 직면한 우리의 미래에 대한 구체적인 희망은 개발 이전의 라다크적인 삶의 방식이다”고 이야기한다. 노르베리호지의 외침이 우리 조상들의 3000년 동안 검증되어온 밥상에서 보완 대체의학적인 실마리가 있으리라는 확신으로 본 연구는 시작되었다.

우리나라의 경제 성장은 선진산업국의 300년 동안 이룩해온 성장을 40년 만에 성장시키는 눈부신 도약을 했다. 경제발전의 성장 모델은 유럽과 미국이다. 물질문명의 유입과 더불어 서구 성장모델의 생활양식, 사고방식의 급격한 유입으로 나타나기 시작한 성장 통은 민족정체성의 혼란, 전통문화의 실종 등 각 분야에서 심각한 그늘을 만들었다. 그 중에서도 본 연구의 단초인 식문화의 상실로 인한 육체적 정신적 피해를 들 수 있다.

현대인들의 바빠진 생활패턴에 맞춘 서구의 상품화된 밥상인 패스트푸드가 3,000여년 동안 검증된 전통 밥상을 점령했다. 쌀 소비량은 2014년 통계청발표에 의하면 1인당 하루 쌀 소비량이 1997년도에 280.6g에서 2013년도에는 184g으로 35% 줄었다. 이는 민족정체성의 정신적 기반인 쌀 생산의 위축과 더불어 심각하게 국민 건강을 위협하고 있음을 반증한다.

인류의 주식은 곡물이다. 우리민족은 그 많은 곡물 중에서 쌀을 기반으로 한 삶의 토대를 지켜왔으며 그러한 환경에 적응해서 우리의 몸은 자연 선택적으로 변화되어 왔으리라는 다윈의 이론에 동의 한다. 자연스럽게 주식인 쌀은 떡, 엿, 한과 그리고 건강지킴이 및 향미료인 식초와, 약주로 불려왔던 전통주와 막걸리 등 가장 많은 영역에서 발전되어온 것은 당연한 결과이다.

쌀의 영양은 도정도에 따라 다르다(송, 2013). 정백미는 현미에서 겨층과 씨눈이 거의 제거되어 무게비 92% 이내로 곱게 찻은 쌀이며, 7분도미는 씨눈이 70% 정도 남게 찻어 무게비 95% 찻은 쌀이다(Caceres *et al.*, 2014). 본 연구의 시료로 쓰이

는 현미는 5분도미로 씨눈이 대부분 남는 무게비 97%로 찢은 쌀이다. 쌀은 도정과정을 거쳐 백미로 될수록 각 영양소의 함량이 감소된다(이, 1988).

5분도미인 현미밥은 잘 씹어 먹어도 소화액이 겨층의 표피부위에 잘 침투되기 어렵고 침투되어도 표피에 의해 흡수가 잘 되지 않고 피질부의 섬유는 장관 점막을 자극해서 유동 운동을 자극하므로 장관내부 통과시간이 빨라서 흡수율이 낮아진다(Caceres *et al.*, 2014)는 문제점이 있다. 그러나 현미는 영양학적으로 볼 때 완전식품이다. 영양분 함량은 백미가 6%임에 비해 현미는 66%이며 현미의 씨눈에 들어있는 가바, 비타민, 미네랄, 감마오리자놀 등 중요 영양성분을 함유한다(이, 1993). 현미의 polyphenols, GABA, acylated steryl b-glucoside, 그리고 c-oryzanol이 심장병, 제2형당뇨, 암 등에 효과적이라는 연구가 계속 보고 되고 있다(Caceres *et al.*, 2014; Diana *et al.*, 2014; Goffman *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2012; Monks *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2010).

따라서 본 연구는 우리 민족의 몸이 쌀에 대한 자연 선택적 진화가 진행되어왔으며 민족의 건강을 위한 식이요법은 쌀로부터 찾아야 한다는데 있다. 쌀로 만든 건강 기능성 식품 중 현미의 문제점을 극복할 수 있는 발효식품에 대한 연구이다. 쌀의 대표적인 발효식품은 쌀식초, 약주, 막걸리, 전주모주, 전라도 단술, 제주도 신다리 등 이다. 본 연구는 맛에서 전주모주와 유사한 발효현미슬러리와 쌀 식초를 건강 기능적으로 발전시킨 현미식초를 제조하여 모주의 대표인 전주모주와 현미식초의 대표인 일본의 Gagguida, Gagoshima 쿠로즈와 비교 분석하여 전통방법으로 제조한 발효현미 슬러리와 현미식초의 보완대체의학적 조망을 하고자 했다.

현대인들이 건강상 위협에 직면하고 있는 항생제 과다복용과 항생제 내성 및 활성산소로 유발되는 질병을 주식인 쌀을 순수한 전통누룩만을 당화제 및 발효제로 이용하여 전통항아리에서 전통방법으로 제조한 발효현미슬러리와 전통현미식초가 어느 정도 극복해 줄 수 있는가의 치유적 가능성을 규명하기 위해 생리활성 및 분자유전학적 연구를 하였다.

A. 연구의 이론적 고찰

1. 프로바이오틱스

a. 정의

프로바이오틱스(probiotics)의 의미는 ‘원생동물에 의하여 생성된 물질로 다른 원생동물의 성장을 촉진시키는 것이다’로 처음으로 정의를 내린 학자는 Lilly와 Stillwell이다(Lilly *et al.*, 1965; Havenaar *et al.*, 1992). 그 후 9년이 흐른 뒤 ‘숙주의 장내 균총에 영향을 주어 유익한 효과를 나타내는 동물용 사료 첨가제’로 정의(Parker, 1974)되었으며, 15년 후 Fuller는 ‘항생제와 미생물 촉진제를 제외한 숙주의 장내 미생물 균형을 개선하여 숙주동물에 이로운 영향을 주는 살아있는 미생물 사료첨가제’로 정의(Havenaar *et al.*, 1992)했고 뒤이어 ‘섭취 시 장내 미생물의 성질을 개선해 숙주에게 유익한 영향을 주는 살아 있는 미생물의 단독 또는 복합 균주’로 정의(Havenaar *et al.*, 1992; Huis *et al.*, 1997; Huis *et al.*, 1991)하였으며 가장 최근의 가설은 생균제의 범위에 살아 있는 미생물과 구성 성분까지 포함하며 단일 또는 복합균형태의 미생물과 그 미생물들의 2차 대사 산물 및 사균제까지 포함하여 생균제 범주에 포함하는 정의를 내리고 있다(Sanders *et al.*, 2003; Yoshitaka *et al.*, 2006).

최근 이러한 유산균의 다양한 기능 중 면역 조절에 관련된 임상 의학적 연구 결과 등을 통해 유산균이 인체의 특이 및 비 특이적인 면역체계의 향상에 관련이 있으며, 이에 따라 선천적 면역계(innate immunity)와 후천성 면역계(adaptive immunity)에 깊은 관련이 있는 것으로 확인되고 있다(Sheih *et al.*, 2001).

국내 건강기능식품에 프로바이오틱스로 사용 할 수 있는 균주를 Table 1에 나타내었다.

Table 1. 건강기능식품에 프로바이오틱스로 사용할 수 있는 균주

구분	대표적 균주	특성
Lactobacillus	<i>L. lactis</i>	. 생육 최적온도 40~43°C . 치즈의 생산에 이용
	<i>L. bulgaricus</i> <i>delbrueckii ssp</i>	. 생육 최적온도 40°C . 요구르트 치즈 등 생산에 이용
	<i>L. helveticus</i>	. 생육 최적온도 40~42°C . 치즈의 생산에 이용
	<i>L. acidophilus</i>	. 생육 최적온도 35~38°C . kefir 등의 생산에 이용
	<i>L. casei</i>	. 생육 최적온도 30°C . 요구르트 치즈 등 생산에 이용
	<i>L. plantarum</i>	. 생육 최적온도 30~35°C . 치즈의 숙성에 이용
	<i>L. fermentum</i>	. 생육 최적온도 41~42°C . 생산에 이용
	<i>L. rhamnosus</i>	. 생육 최적온도 41~42°C . 생산에 이용
	<i>L. paracasei</i>	. 생육 최적온도 40~43°C . 생산에 이용
Lactococcus	<i>Lc. lactis</i>	. 생육 최적온도 40~43°C . 발효유, 치즈 등 생산에 이용
	<i>Lc. thermophilus</i>	. 생육 최적온도 40~50°C . 요구르트 치즈 등 생산에 이용
	<i>Lc. faecalis</i>	. 생육 최적온도 37°C . 치즈의 숙성 촉진에 이용
	<i>Lc. lactis spp.</i> <i>diocetylactis</i>	. 생육 최적온도 30°C . 치즈, 버터 등 생산에 이용
	<i>Lc. parvulus</i>	. 생육 최적온도 37°C . 우유를 견고하게 산응고 시킴
	<i>Lc. pleomorphus</i>	. 생육 최적온도 37°C, 45°C
	<i>Lc. morbillorum</i>	. 생육 최적온도 35~37°C
	<i>Lc. cremoris</i>	. 생육 최적온도 30°C . 다양한 치즈의 생산에 사용

<i>Pediococcus</i>	<i>P. soyae</i>	. 생육 최적온도 식염 20°C 이상 . 간장, 된장 속성에 이용
	<i>P. pentosaceus</i>	. 생육 최적온도 식염 20°C 이상 . 김치 속성에 이용
	<i>P. halophilus</i>	. 생육 최적온도 식염 20°C 이상 . 간장, 된장 속성에 이용
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>	. 생육 최적온도 40°C 이상 . 간장, 된장 속성에 이용
	<i>S. lactis</i>	. 치즈나 요구르트 스타터로 사용
	<i>S. faecalis</i>	. 정장제로 이용
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum,</i> <i>B. breve,</i> <i>B. longum,</i> <i>B. animalis ssp.</i> <i>lactis</i>	. 생육 최적온도 40~43°C
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. kimchii</i>	. 김치 토종유산균으로 김치의 새콤과 시원한 맛

b. 프로바이오틱스의 조건

(1) 안전성(Safety aspects)

건강한 숙주에서 유래되거나 사람이 원래부터 이용해 온 것이 선발된 probiotics 균주이며, 무엇보다 돌연변이성, enterotoxin 불생성, 암 유발성 등의 없어야 하고 (Pfaller *et al.*, 1994), 다른 균주들에게 전이되지 않도록 하는 항생제에 대한 저항성 유전자를 보유하지 않아야 한다는 것 등의 중요한 특이성을 지녀야 한다(Pfaller *et al.*, 1994; Hoa *et al.*, 2001).

(2) 기능성(Functional aspects)

섭취한 probiotics 균주가 장내의 소화기관인 위와 십이지장, 회장, 간에서 분비된 염산, 소화 효소, 장액, 담즙산 등과 긴밀한 교류를 할 때 숙주에 유익한 효과를 가져 올 수 있어 위산과 담즙산에 대한 강한 저항성을 갖고 살아남아야 한다(Hoa *et al.*, 2001; Pfaller *et al.*, 1994).

두 번째로 probiotics 균주는 장내 부착성과 정착성(colonization)이 있어야 장벽에 부착할 수 있으며 다른 배설물에 섞여 몸 밖으로 배출되지 않아야 한다(Pfaller *et al.*, 1994).

세 번째로 항균 물질의 생성으로 *Helicobacter pylori*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* 등의 병원균에 대한 항균력 및 억제능을 가지고 있어 면역 반응을 조절 할 수 있어야 한다(Hong *et al.*, 2005; Pfaller *et al.*, 1994).

(3) 항균성(Antibacterial aspects)

Probiotics의 균주는 균주에서 분비한 항균물질이 위장관내의 병원성 균을 억제할 수 있어야 한다(Hong *et al.*, 2005).

Bacteriocin은 생산 균주와 가까운 species에 항균력을 갖고 있고, Bacteriocin-like Inhibitory substances는 항균력에 대한 넓은 범주를 갖고 있으며, 일부 단백질 분해 효소에 내성을 나타내는 등 차이를 보인다(Entian *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 2002).

antibiotics(항생제)는 non-ribosomal synthesis에 의해서 합성되는 항균 물질로 D-amino acids나 hydroxy amino acids와 같은 비단백질성 acids를 갖고 있어서 단백질분해 효소에 안정하며, 광범위하게 항균 활성을 나타낸다(Pristovsek *et al.*, 1999; van *et al.*, 2002).

(4) 작용기전(Mechanism of Action)

probiotics는 내장 기관 내에서 함께 서식하는 세균들과의 경쟁을 통해 평형을 조절하고, 유해한 병원균이 내장 상피세포와 점막에 부착되는 것을 막아야 하며, 내장기관 내의 제한된 영양소와 수용체를 병원균과 경쟁하여 섭취하거나 받아들이는 과정에서 병원균의 성장을 억제시킨다(Kekkonen *et al.*, 2008; Kuisma *et al.*, 2003, ; Salminen *et al.*, 1999; Siigur *et al.*, 1996).

박테리오신, 과산화수소, 유기산 등과 같은 다양한 항균물질을 생산하여 유해한 병원균의 성장과 점유율의 균형을 유지하며, 상피세포의 재생, 세포 간 강한 결합 유도, 병원균의 투과성 감소 등으로 내장 점막의 방어벽 기능을 강화하고, 장 점액 물질의 분비를 자극하여 내장 기관의 건강에 영향을 준다(Servin *et al.*, 2004).

c. 프로바이오틱스의 효과

프로바이오틱스의 효과는 프로바이오틱스와 장내 유해균 간의 상호 점유 및 억제 그리고 영양물질 섭취경쟁 활동의 결과로 숙주의 건강이 보호되는 작용이다.

프로바이오틱스의 건강 기능의 향상은 그람양성 세균의 세포벽에 리피톨인산으로 구성된 테이코산, 세포막에는 글리세롤인산의 중합체인 세포막 테이코산을 갖는 세포벽의 Lipoteichoic acid의 구조가 균주마다 다르다는 것이 요인으로 생각할 수도 있다(Suzukil, 2011). 숙주의 면역기능이나 생리기능에 직접 또는 간접적으로 작용하여 발병 원인인 병원균에 대한 숙주의 방어능을 향진시키는 효과(백, 2012)로 Probiotics의 구강투입 시 일어나는 Macrophage의 탐식활성, 일산화질소나 cytokine 생산의 향진, Helper T세포의 특정한 Subclass (Th1이나 Th17)의 유도, 장관점막에서의 IgA 분비촉진 그리고 Probiotics가 장내대사활동에서 만들어내는 초산, 유산, 낙산 등 단쇄지방산이 숙주의 장관 연동운동이나 점액분비를 촉진하여 숙주소화관의 Barrier 보호 효과를 향진시킨다고 보고했다(백, 2012).

2. 모주

a. 정의

모주의 유래는 여러 가지 설이 있다. 대표적인 유래는 ‘대동야승’의 기록으로 ‘조선조 광해군 5년(1613)에 연산부원군 김재남의 사화로 인목대비가 서궁에 유폐당하고 부부인 노씨는 제주도로 유배당해 살아갈 길이 막막해진 그의 시녀가 생계유지를 위해 양반들이 맑은 술을 뜨고 남은 차조술 술지거미를 마시기 좋은 술로 가미해서 팔기 시작했다’는 유래와 술에 취해 저녁 늦게 들어온 아들의 건강을 염려한 어머니가 막걸리에 온갖 한약재를 넣고 저녁내 달여 아침에 아들에게 마시게 해 속을 달래주었다고 해 어머니의 술, 즉 모주라 이름이 붙여졌다는 유래, 그리고 마지막으로 날이 저물고 어스름할 때 몸을 따뜻하게 하고 추위를 달래기 위해 마시는 술이라 하여 저물 모(暮)자를 사용하여 모주라고 불리어졌다는 유래가 있다 (Jo, 1999).

전라북도 전주에서는 해장국집에서부터 해장술로 한 잔씩 내놓았던 것이 인기를 얻으면서, 전주문화재단이 2007년 막걸리 붐을 타기 시작하자 전라북도 완주에 막걸리 박물관을 짓고 막걸리를 문화적으로 복원하기 시작하면서 실시 한 ‘전주 신(新) 팔미(味)조사’에서 막걸리, 이강주 그리고 모주가 ‘전주 신(新) 3술’에 뽑히자 전북정책사업의 하나로 완주 소재 1곳에 제조시설을 만들어 국내외적인 많은 홍보로 전국적으로 모주라는 이름이 전주 해장국집 모주가 모주의 대명사처럼 불리기 시작했다.

전라북도 전주지역에서 만들어 홍보하고 판매하는 모주는 시중 막걸리에 인삼, 칩, 감초, 계피, 대추, 생강 등 생약제와 흑설탕을 넣고 일정시간 교반 가열한 후 여과해서 만드는(Kwon *et al.*, 2009) 해장술 개념으로 만들어지기 때문에 술지게미도 아닌 막걸리의 변용이라 할 수 있다. 전주 시내 식당을 중심으로 소규모로 시중 막걸리를 사들여서 자체적으로 제조하여 현장에서 판매해 오고 있어 그 제조법이나 맛, 그리고 기능이 조금씩 다르다(Lee *et al.*, 2011)고 할 수 있다.

전라도 지방에서는 전주 모주의 제조방법과 다르며, 모주를 ‘단술’이라 불리며 막걸리가 완성되기 직전 알코올도수가 3%인 시점에 걸러서 갹엿을 첨가한 후 끓여

서 아낙들이나 어린아이들의 음료로 사랑받았었으나 오늘날은 식은 밥을 재활용하기 위하여 식혜가루와 누룩으로 하룻밤 당화 및 발효시킨 후 가미하여 기호식품으로 애용되어지고 있다.

b. 시판되는 모주의 일반성분

전주모주의 일반성분과 이화학적 특성은 전주모주 22종을 중심으로 분석(Lee *et al.*, 2011)에 의하면 조단백질 함량은 최저 1.22% 에서 최고 2.61%, 조회분 함량은 최저 0.15% 에서 최고 0.38% 범위를 나타내었다. 수분 함량은 최저 87.67% 에서 최고 95.26% 범위로 제조 업소마다 모주의 고형분 함량 차이가 큰 것으로 나타나 모주 제조방법의 규격화가 필요한 것으로 나타났다. 모주의 걸쭉한 정도를 나타내는 점도의 범위는 3.21 cP ~ 35.52 cP 로서 제조업소 간에 차이가 큰 편으로 이는 막걸리에 첨가하는 부재료와 설탕의 양, 증점제 첨가 여부, 희석수 가수여부, 끓이는 시간 등의 차이에서 기인한다고 판단된다(kwon, 2009).

전주모주 22종의 알코올 함량 범위는 0.1% ~ 2.5%로 알코올 함량 평균은 1.09%이었다. 상기 결과는 Kwon (2009) 등의 알코올 함량 0.3 ~ 2.1% 보다 넓은 범위 값을 나타내었는데 이는 모주의 건강기능성 음료로서의 개발에 걸림돌이 될 수 있다. 발효과정 중 생성되는 유기산, 탄산가스 및 기타 산성 물질의 영향을 받는 pH의 범위는 3.88 ~ 5.16, pH 평균은 4.25이었다(Kim *et al.*, 2007). 총산함량 범위는 0.10% ~ 0.57%로 총산함량 평균은 0.27%이었다.

당도 범위는 4.65 °Bx ~ 20.45 °Brix로 당도 평균은 13.75° Brix, 주요 유기산은 lactic acid, malic acid, citric acid로 Lee 등(2011)이 보고하였으며, 아미노산도 범위는 0.18% ~ 0.84% 로 아미노산도 평균은 0.41%으로 모주 22종에 대한 총 유리아미노산 함량은 모주의 주원료인 탁주에 비해 적은 편이다(Lee *et al.*, 2011).

Kwon 등(2009)의 전주모주 유기산 종류별 함량 평균은 malic acid 1.92 mg/mL, lactic acid 1.76 mg/mL, acetic acid 0.73 mg/mL, succinic acid 0.52 mg/mL, pyroglutamic acid 0.52 mg/mL, citric acid 0.13 mg/mL라고 하는 보고(Kwon, 2009)에 비추어 주요 유기산이 citric acid를 제외하고는 lactic acid와 malic acid인 점에서 유사하다.

3. 식초

a. 정의

식초는 술과 함께 인류의 생활사에서 오랜 역사를 갖는 발효식품으로 동서양의 대표적인 발효음료로 알려져 왔으며 예부터 우리나라 가정에서는 쌀막걸리를 이용하여 빚은 자가식초(DIY vinegar)로 주로 음식에 맛을 내는 조미료로 이용해왔다 (Jeong *et al.*, 1998).

식초는 소량의 휘발성 및 비 휘발성의 유기산, 당류, 아미노산, ester 등을 함유한 독특한 향과 신맛을 가진 대표적 발효식품(Jeong *et al.*, 2002)으로 천연 발효 식초는 다양한 맛과 영양을 지니고 있어 1990년대 감식초를 시작으로 천연발효식초에 대한 소비자의 선호도가 증가하였으며 최근에는 발효식초의 약리작용이 알려지면서 관심이 많이 증가하고 있다(Jeong *et al.*, 2002).

식초는 제조 방법에 따라 식초의 발효과정을 거치지 않고 빙초산, 물, 향신료 및 착색료 등을 사용하여 제조하는 합성식초와 알콜 발효 및 초산 발효시켜 얻는 양조식초로 구별하며, 숙성하는 방법에 따라 교반하여 숙성시키는 교반발효와 그대로 정지된 상태에서 숙성시키는 정치발효로 나누어지며(김 등., 2009), 정확한 기록은 없으나 신라시대부터 곡물을 재료로 다양한 종류의 식초를 가정에서 제조하여 조미료뿐만 아니라 가정 상비약으로 널리 활용하여 왔다(Moon *et al.*, 1997).

b. 초산균(Acetic acid bacteria; AAB)

초산균은 자연에 광범위하게 서식하고 있으며 그 예로 Wine vinegar에서 *A. pasteurianus*, 전통적인 balsamic vinegar(Italy)에서 *A. pasteurianus*, *Ga. europaeus* 등 여러 종류의 식품으로부터 초산균이 분리되었다(윤, 2014). 그리고 천연의 사과, 바나나, 포도, 망고, 오렌지, 파인애플, 메론 등과 같은 과일, 커피농장, 발효된 코코아 콩, 열대성 과일인 코코넛, 구아바, 부패된 사과, 딸기, 꽃 등에서 많은 초산균이 분리되었다(Shimoji *et al.*, 2002).

초산균은 주로 그람음성 균으로 호기성(반호기성)이며 포자를 형성하지 않는 0.4 ~ 4.5 μ m 크기의 간균이다. 최적 생육 pH는 5 ~ 6.5이며 최저 pH 3 ~ 4에서도 생육한다. 양쪽 편모형태의 hetero균이기도 하다(Jeong *et al.*, 2002).

일찍이 초산균은 주로 *Acetobacter*와 *Gluconobacter* 2개의 속으로 나누었고 당시 자연의 와인, 식초, 과일, 꽃 등에서의 초산균은 *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaininathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia*, *Granulibacter*, *Tanticharoenia* 및 *Ameyaniaia*의 12개 초산균 속으로 분류하였다(윤, 2014).

초산균은 전통적으로 당류와 알코올을 산화하여 유기산으로 전환시킨다. 과당으로부터 mannitol, sorbose로부터 sorbitol 또는 erythritol로, D-sorbitol로부터 L-sorbose를 생성, D-glucose로부터 5-keto-gluconate, gluconic acid를 생성하고 glycerol로부터 dihydroxyacetone를 생성하는 중요한 균이다(신, 2002).

초산균은 최적 생육온도가 25 ~ 31 $^{\circ}$ C의 중온 균이다. 열대아프리카의 사하라지역의 열대작물에서 분리한 *Acetobacter tropicalis*와 *Acetobacter pasteurianus*는 높은 생육온도에서 초산을 생성한다. 알코올발효가 5%에서 12%가 되면 자연스럽게 공기 중에 초산균이 항아리에 부착하여 알코올을 먹이로 초산균이 번식하기 시작한다. 식초의 초산은 초산균에 의하여 생성되며 초산균은 알코올을 영양원으로 이용하여 번식 및 성장하면서 내놓는 부산물로 초기 알코올이 산도의 수득율과 관계가 있다(Jeong *et al.*, 2002; 신, 2002).

c. 유기산 구성

알코올의 산화로 얻어지는 초산균이 생산하는 주된 향균 물질인 유기산은 상당히 많은 종류가 있으며 그 중 향균력을 나타내는 유기산은 식초 속에 다양한 비율과 종류로 존재하고 있다(이, 2014). 정치배양한 현미식초의 유기산 함량은 발효온도와 여과방식에 의하기보다 다양한 발효제 사용에 따라 발효 초기에는 8종(oxalic, citric, malic, tartaric, succinic, lactic, acetic 및 formic acid 등)이 검출되었으나 발효가 진행됨에 따라 식초의 주요산인 acetic acid가 많이 생성되었다(정, 2013). Acetic acid를 비롯한 유기산은 당의 에너지 대사의 중간산물로서 식초의 산미와 향미 및 감미를 증가시켜주고 TCA 회로를 활성화하여 젖산 분해 촉진 등 기능성이 있는 것으로 보고되었다(Nakancn, 1998).

식초의 원료 중의 당분은 발효과정 중 초산균의 대사 작용에 따라서 대부분 산으로 변화되고 일부는 에너지원으로 이용되기 때문에 초산 발효 후 식초 중의 당 함량은 소량으로 식초의 감미와 산미의 조화에 관여하고 sucrose와 maltose는 발효기간 동안 glucose와 Fructose로 유리된 후 발효로 이용되기 때문에 유리당 구성 성분에 검출되지 않는다(Moon *et al.*, 1997).

자연발효 식초에 많이 함유하고 있는 60여 종의 유기산은 체내에서의 위와 장속의 노폐물 세척, 피로회복, 식품에서의 살균효과, 항산화작용으로 활성산소를 제거해 노화를 방지하고 동맥을 보호하며 콜레스테롤이 생성되는 것을 억제하여 혈액순환을 원활하게 해 준다(Castillo, 2014).

B. 연구의 목적

세계적으로 항생제의 무분별한 오남용으로 인한 내성 균주 출현 문제가 심각하게 드러나고 있다. 병원성 세균 중 전 세계적으로 가장 문제 시 되고 있는 *Staphylococcus aureus* 은 전체 인구의 약 30% 에서 검출되는 그람양성구균으로, 병원 내 감염증을 유발하는 병원체로 널리 알려져 있다(정, 2011). 페니실린, 메티실린 등 포도상구균 항생균제는 그 효과가 우수하여 지난 수십 년간 본 감염증의 주요 치료약제로 사용되어 왔으나, 1961년 영국에서 메티실린에 내성을 보이는 균주 *methicillin resistant staphylococcus aureus* 가 처음으로 보고된 이후 전 세계적으로 지속적인 증가 추세를 보이고 있다(김, 1983).

합성 고분자화합물의 환경과 인체에 대한 유해성 논란과 함께 항생제에 대한 학계의 경고는 오래되었다. 출생 전후 항생제에 노출되면 비만 위험이 높다. 출생 초기 장내 균총의 형성에 없어서는 안되는 4가지 장내 박테리아(락토바실러스, 알로바쿨룸, 칸디다투스 아르스로미투스, 리케네랄레세아)들이 항생제에 노출되어 사라지면 비만위험이 커진다(Cell, 2014)는 보고가 있다.

장내 미생물이 생산하는 생물고분자(biopolymer)인 프로바이오틱스는 독특한 물성을 지니며, 독성이 낮고 생분해성이 높아 공해를 유발하지 않으면서도 MRSA와 같은 내성균을 만들지 않고 장내 유익균을 돕는다. 이러한 특성으로 학문적으로나 산업적으로 관심의 대상이 되었다(정, 2011).

프로바이오틱스의 연구는 우유 유산균이 주를 이루어 왔으며 국내에서는 김치 유산균에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다. 전주모주와 막걸리의 연구는 주로 제조법에 대한 연구와 일반성분 분석으로 이루어지고 있다. 일본의 경우, 현미식초에 대한 연구가 오래 전부터 시작하였고 다양한 흑초 개발과 더불어, 이들이 갖고 있는 기능성에 대한 보고도 다수 이루어지고 있다(Woo *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2010; Fukuyama. *et al.*, 2007). 현재까지 국내 식초연구는 주로 발효미생물인 초산균의 탐색, 발효제 및 제조 방법 등에 국한되어 있고(Lee *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). 우리나라 고유의 향아리를 이용한 전통 정치배양법으로 제조한 식초의 여과방식에 따른 품질변화 연구는 전무한 상황이다(Seo *et al.*, 2001).

본 연구의 목적은 현미에 다량으로 들어있는 우수한 영양성분에 주목하여 현미

를 재료로 하여 프로바이오틱스가 풍부한 전통 우리밀 누룩만을 발효제로 발효시킨 발효현미슬러리와 흑초의 생리활성 및 분자유전학적 연구로 쌀의 자궁심 양양과 프로바이오틱스로서의 치료제로서의 가능성을 탐색하고자 하는데 목적이 있다.

II. 발효현미 슬러리

A. 서론

세균 감염은 오늘 공공 보건 의료가 직면하고 있는 가장 큰 글로벌 과제 중 하나이다. 항생제, 은 입자, 감광제, 항균 펩타이드 그리고 하이드로 겔과 같은 항균 물질의 지속적인 개발을 포함한 세균 감염에 대한 치료의 개발에 많은 노력은 지속되어 오고 있다(Irwansyah, 2015). 최근연구는 천연 의약품 및 기타 천연 제품 생산이다. 여러 과일과 과일 추출물뿐만 아니라 칩이나 차 추출물인 카페인은 대장균 O157:H7에 대한 항균 활성을 나타낸다. 항균 작용의 상대적으로 높은 수준과 관련이 있는 식물이 식중독 병원균의 증식을 억제하는 화합물의 공급원 일 수 있다. 식물 추출물로 세포내 매트릭스의 파괴에 의해 세균 세포의 세포벽 및 세포막의 파열로 항세균 능력을 갖는다(Biswas, 2013).

프로바이오틱스의 대표균(*Bacillus bacteria*와 *lactic acid bacteria*)은 탄수화물을 혐기적으로 대사하여 젖산을 생성하는 세균으로서 장내 유해 세균의 증식을 억제하고 면역력을 강화하며 배변을 편하게 해주는 역할을 한다(Gilliland, 1979; Hong *et al.*, 2005). *Pediococcus* 속 *lactic acid bacteria*이 생산하는 bacteriocin은 천연보존료 등 여러 분야에서 주목 받고 있으며 발효 시 잡균 번식을 억제하는 등의 유익한 역할을 확인하였다(Kekkonen, 2008).

일본의 대표적 현미식초는 쿠로즈이며 이의 고형물을 쿠로즈-모로미마추라 부른다. 쿠로즈-모로미마추는 대장암 균주와 항산화 능력 및 체내 금속성분 분해 능력이 뛰어나다(Naoto *et al.*, 2007). 현미발효의 고형물은 쿠로즈-모로미마추와 유사하여 문헌적 고찰을 하였으며 본 연구의 시료로 제조한 현미발효의 고형물을 발효현미슬러리(Fermented Slurry of Unpolished Rice FSUFR)로 명명하였다.

전통발효공법을 현미와 접목한 발효현미 슬러리 개발로 프로바이오틱스로서 가능성 및 탁월성을 탐색하고자 FSUR의 생리활성 및 분자유전학적 동정을 통하여 FSUR의 치유적 기능으로 접근하고자 했다.

B. 실험재료 및 방법

1. 균주 및 배지

a. 발효현미슬러리의 제조

현미는 2013년 전라남도 담양군 창평면 일대의 청정지역에서 재배된 벼를 오광리 정미소에서 5분도미로 정미한 현미를 구입하여 사용하였다. 발효현미슬러리에 사용된 항아리(traditional aerobic jar, 지름42cm, 높이60cm, 용량50L)는 전남 강진군 칠량면 봉황리 220 무형문화재 제 37 호 정윤석 옹기에서 제작하여 구입하였으며, 지하수(130M 석간수)를 직수한 물을 사용했으며, 당화제 및 발효제인 전통누룩은 광주광역시 광산구 소재 송학곡자에서 구입하여 사용하였다.

시료의 제작 과정은 Fig. 1로 나타내었다. 1단계, 밀술 담그기로 4kg의 멥쌀을 백세해서 4시간 불린 후 12리터 물(130m 지하석간수)과 혼합하여 쌀죽으로 만들어 차게 식힌 후 2kg의 누룩과 잘 섞어 25°C에서 1차 발효하여 밀술을 만든다.

2단계, 항아리 내부온도가 32°C까지 1차 발효 시킨 후 25°C까지 식힌다.

3단계, 현미 20kg를 잘 씻어 8시간 불린 후 1시간 동안 소쿠리에 건져 물기를 뺀 후 20mesh정도의 알갱이로 파쇄한 후 시루에 백설기로 만들어 10°C까지 차게 식힌다.

4단계, 2단계의 1차 발효한 밀술과 3단계 과정 현미 설기떡, 누룩 4kg, 물 38리터를 넣어 골고루 섞은 후 25°C ~ 28°C에서 2차 발효하여 알코올 13% ~ 14%가 도달하면 30일정도 초막이 형성되기 시작하면 20mesh의 걸름망에서 걸러내어 석간수를 가수한 후 보일링하여 발효현미슬러리를 제조하였다.

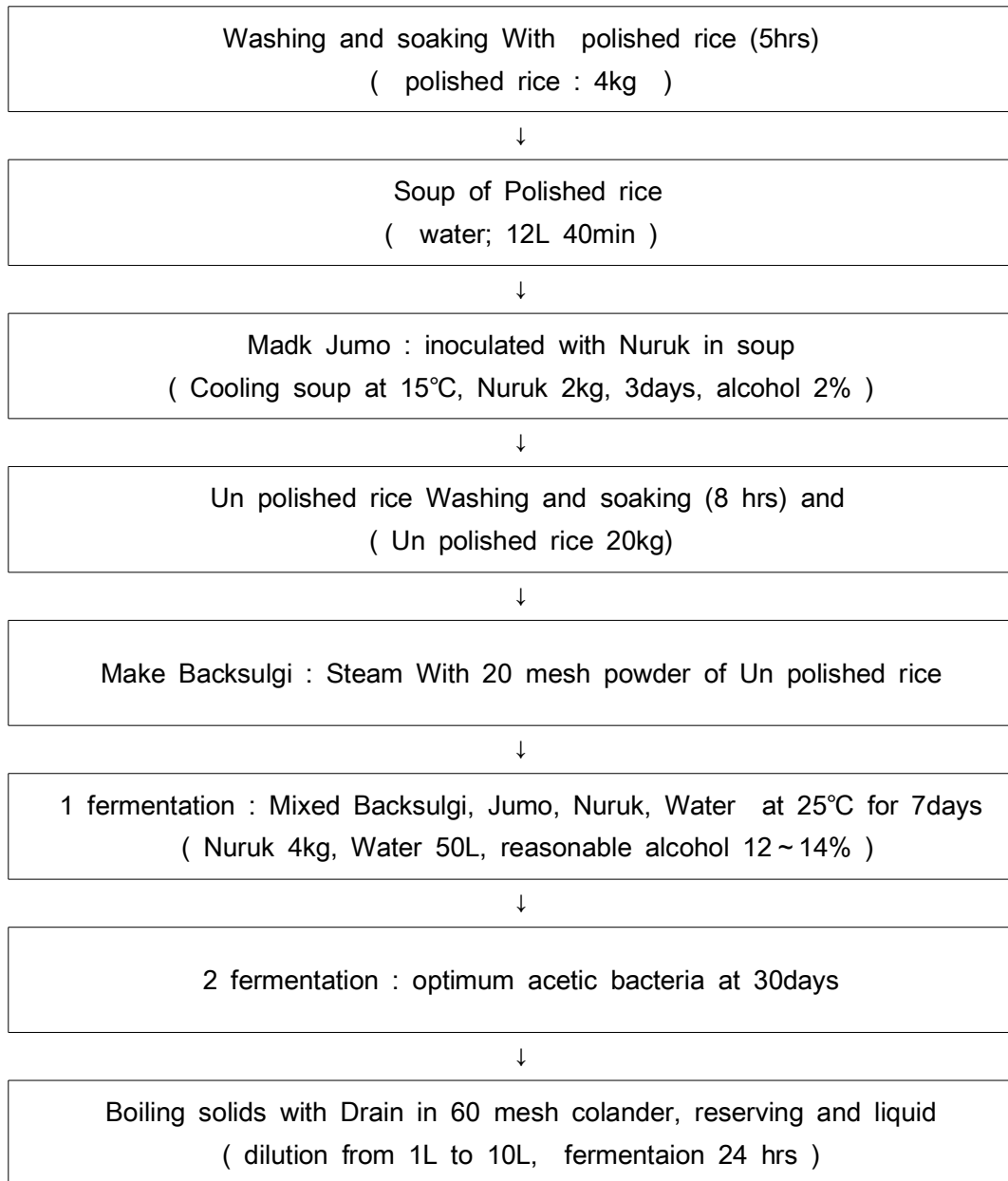


Fig. 1. Preparation of Fermented Slurry of Unpolished Rice (FSUR)

b. 사용 배지

균주의 기본배양에는 TSB고체배지와 YPD배지를 사용하였다. tryptic soy broth (TSB)은 (BD 211825; Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하였다. YPD배지의 조성(g/L)은 20.0 g/L peptone, 10.0 g/L yeast extract, 20.0 g/L glucose, and 20.0 g/L agar, Final pH 6.8 ± 0.2 at 25°C로 조성한 다음, 가압 멸균기 121°C에서 15분간 처리하여 Plate에 분주하여 Incubator에 보관 사용하였다. 균주의 배양은 2 일 동안 30 °C에서 배양하였으며, 단일 콜로니를 새로운 접시에 옮긴 후 다시 인큐베이션 한 후 정제 하였다(Mateo *et al.*, 2014).

FSUR의 제조단계에 따라 7일(발효현미 슬러리 M-1), 14일(발효현미 슬러리 M-2), 21일(발효현미 슬러리 M-3), 30일(발효현미 슬러리 M-4) 등 총 4종류의 단계별 각 시료 20ul를 Bohin 등(1976)과 Koransky 등(1978)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 각 시료는 TSB (trypton soy broth) 액체배지와 YPD 액체배지에 도말하여 37°C에서 48시간 진탕 배양하였다. 이들 배양액을 다시 TSB agar plate에 도말하여 혐기적으로 38°C에서 배양한 후 몇 개의 콜로니가 형성되면 콜로니 별로 백금이로 well plate에 도말하여 배양한 후 TSB액체 배지에 접종하고, 배지 37°C 진탕 배양기에서 3일에서 6일간 교반 배양시킨 결과 총 4개주를 분리하여 연구에 이용하였다. 균주의 보관은 15% glycerol이 함유된 증류수에 넣어 -80°C deef freezer에 liquid stock으로 냉동 보관하여 실험시에 해동하여 사용하였다.

2. 분자유전학적 동정

a. 균주의 스크리닝 및 동정

분리 선발한 미생물의 동정은 Gram staining method와 현미경 관찰을 통해 형태학적 특성을 분류하였다. 보다 더 정확한 동정을 위하여 16S ribosomal DNA gene sequencing을 통하여 동정하였다. 선발미생물의 chromosomal DNA는 ExgeneTMCCellSV (Geneall)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 16S rDNA gene 증폭을 위하여 일반적으로 사용하는 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')와 1492 (5'-GATACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하였다(Weisburg *et al.*, 1991). 돌연변이체의 total genomic 를 추출하고 추출된 DNA를 주형으로 돌연변이를 유도하기 위해 넣어 주었던 pTnMod-OTc의 염기서열에서 유래된 PT2 primer와 acetone 생합성 과정에 관여하는 UDT-glucosyltransferase와 GDP-mannosyltransferase의 유전자에서 각각 5' 쪽에서 3' 쪽으로 만든 primers와 3' 쪽에서 5' 쪽으로 만든 primers를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR반응 시 0.4 mM dNTP, 0.5 units Taq polymerase, 4 mM Mg²⁺이 함유된 Takara Perfect Premix (Takara, Japan) 10 µl에 DNA template (20 µg/ml) 1 µl, forward primer (1.0 µM)와 1 µl reverse primer (1.0 µM)를 각각 1 µl씩 넣고 나머지는 증류수를 첨가하여 총 부피가 20 µl가 되도록 제조하였다. PCR 증폭은 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 30초 동안 extension을 30 cycles 실시하였고, 72°C에서 5분간 최종 extension을 실시하는 조건에서 PCR로 증폭하였다. 그 결과는 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) program을 이용하여 GENBANK (NCBI, Bethesda, MD, USA)의 ribosomal DNA gene sequence와 비교하여 동정하였다. 분리된 미생물의 16S rDNA 염기서열을 CLUSTAL_X program으로 multiple sequence alignment한 후 phylogenetic tree를 작성하였다. 해당 분석은 neighborhood-joining 알고리즘을 바탕으로 수행되었다.

b. 유당 이용능

ONPG (O-nitrophenol-b-D-galactopyranoside)로 lactose 분해 음성균 중에서 b-galactosidase를 생성하여 유당을 서서히 분해하는지를 알아보았다.

FSUR M-1의 *Gluconacetobacter intermedius*, FSUR M-2의 *Lactobacillus casei*, FSUR M-3의 *Lactobacillus plantarum*, FSUR M-4의 *Acetobacter peroxydansumj*의 4개의 균주를 TSB 액체배지, 5 mL에 1% 접종하여 37°C에서 12시간 전배양하였다. 유당 1%(w/v)와 2%가 각각 첨가된 TSB 액체배지와 유당이 첨가되지 않은 TSB 액체배지에 전배양액을 각각 1%접종하여 37°C에서 48시간 배양하여 0 ~ 48 시간동안 12시간 간격으로 세포 생육도를 OD 600 nm에서 흡광도 0.1로 측정하였다. BSM media + @ 로 8개의 탄소원인 Maltose, Fructose, Lactose, Arabinose, Cellobiose, Mannose, Mannitol, Glucose에 대한 이용성을 조사하였다(Banat *et al.*, 1991).

3. 생리활성 측정

a. 일반 성분 분석

FSUR의 일반성분 분석을 위해 다양한 화학 분석을 실시하였다. pH는 Orion 420A pH Meter (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 총 가용성 고형분 함량 분석은 Brix Refractometer HI 96811 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA)를 사용하여 측정 하였다. 알코올 함량은 증류 후 vinometer를 사용하여 측정 하였다. 각 샘플의 100 mL를 약 70mL의 볼륨까지 증류기를 통해 수집하였다. 수집 된 70mL 샘플에 증류수를 첨가하여 100mL로 조정하였다. 같은 방법으로 sugar, organic acid, moisture, ash, and crude protein의 일반조성 및 유기산 분석을 동신대학교 생물자원산업화지원센터(Biotechnology Industrialization Center, Dongshin University, Korea, BIC)에 의뢰하여 조사하였다.

b. 유리 아미노산 분석

아미노산은 천연 식품 생선 같은 제품, 치즈, 고기 등의 다양한 제품에서 생산한다. 이들은 성장 인자, DNA 또는 RNA의 안정화제로서의 단백질의 구성물로 대사에 중요한 역할을 한다(Jia *et al.*, 2011). 유리 아미노산은 LC-MS/MS에서 (+)ESI 이온화 및 selected ion monitoring(SIM) mode로 분석하였다. FSUR의 유리 아미노산 분석은 동신대학교 생물자원산업화지원센터(BIC) 연구분석팀에 의뢰하여 조사하였다.

4. 항생제 감수성

a. 항균 spectrum

Probiotics의 항균물질 생산은 위장기관이 병원균을 제어하는 중요한 요소로 probiotics 균주로서 중요한 고려사항이다(Huis *et al.*, 1991). FSUR의 항균 활성은 paper well disc assay으로 수행하였다.

항균활성 분석은 10종의 미생물 균주에서 실시하였다. 항세균 활성평가를 위한 그람 양성세균으로는 *Staphylococcus aureus* (KCTC 1916), *Listeria monocytogenes* (KCTC 3710)를 사용하였으며, 그람 음성세균으로 *Escherichia coli* (KCTC 1682), *Pseudomonas aeruginosa* (KACC 10186), *Salmonella typhimurium* (KCTC 1926), *Yersinia enterocolitica* (KCCM 41657)를 사용하였다. TSB와 YPD 액체배지에 각각의 세균을 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양한 후, 각 세균 현탁액의 100 µl를 분리하여 TSB agar plate에 도말하고, *Lodderomyces elongisporus*는 YPD agar plate에 도말 하였다(Sharma *et al.*, 2015). 이 때는 생육저지환의 크기가 나타나지 않아 발효현미 슬러리 M-4 원액을 TSB와 YPD 액체배지로 멸균 petri dish에 100 µl 도말하여 측정하였다. 생육저지환의 크기는 육안으로 생육이 나타나지 않는 clear zone의 지름을 mm 단위로 측정하였고, 3회 이상 평가 후 대표 결과로 나타내었다.

b. pH 및 유기산에 따른 항균활성

FSUR의 산성도 변화에 따른 항균활성을 측정하였다. 1N NaOH를 사용하여 발효현미 슬러리의 pH를 3 ~ 7까지 조정하고, pH에 따른 항균활성 효과를 분석하였다. 유기산 및 산성도에 따른 항균 활성을 분석한 균주는 그람 양성세균인 *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* 와 그람 음성세균인 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* 로 6종의 병원성 균주를 사용하였다. FSUR과 4종류의 유기산(lactic acid, oxalic acid, acetic acid, and propionic acid; 25 µg/mL, Sigma-Aldrich)을 paper discs (8 mm in diameter)에 가하여 agar plate에 접종하여 18 시간 동안 37 °C에서 배양하였다.

생육 저지환의 크기는 육안으로 생육이 나타나지 않는 부분의 지름을 mm 단위로 측정하였고(Mehni *et al.*,2014), 3회 이상 분석하여 평균값으로 나타냈다.

5. 항산화 활성도

a. Free radical 소거 활성 측정을 통한 항산화능 분석

FSUR의 항산화능 분석을 위하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 소거법을 이용한 전자공여능 측정을 수행하였다(Wang *et al.*, 2008). FSUR원액과 FSUR를 동결건조 시켜 5mg/ml로 증류수에 녹여 준비한 후, 96 well plate에 무수 에탄올에 용해된 1.5×10^{-4} M DPPH 180 μ l와 각 시료 20 μ l를 분주한 혼합액을 실온에서 30분간 반응시킨 후, microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내었다. 양성 대조군으로는 대표적인 항산화제인 ascorbic acid를 사용하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다(Kitagaki *et al.*, 1999; Koleva *et al.*, 2002). 억제능의 백분율 공식은 다음과 같다.

$$=100-[(\text{absorbance increase of sample}/\text{absorbance increase of control}) \times 100]$$

C. 실험 결과

1. 분자유전학적 동정

a. 균주의 스크리닝 및 동정

FSUR에서 분리한 4개의 균주의 형태학적 특성을 Table 2로 나타내었다. 상기 배지에서 배양된 발효 1주차에 분리한 발효현미슬러리 M-1은 그람 음성균이며, 막대모양 또는 타원형이며 포자를 형성하지 않고 운동성이 없었다. 발효 2주차 발효현미슬러리 M-2는 그람양성균이며 막대모양이며 포자를 형성하지 않고 운동성이 없었다. 발효 3주차에 분리한 발효현미슬러리 M-3은 그람양성균이며 막대모양이며 포자를 형성하지 않고 운동성이 없었다. 발효 4주차 발효현미슬러리 M-4는 그람 음성균이며 막대모양으로 포자를 형성하지 않고 운동성이 없었다.

4개의 균주를 TSB 액체배지, 5 mL에 1% 접종하여 37°C에서 12시간 전 배양한 결과는 발효현미슬러리 M-1은 *Gluconacetobacter intermedius*와 100% 유사하였으며, 발효현미슬러리 M-2는 *Lactobacillus casei*와 100% 유사성을 보였으며, 발효현미슬러리 M-3도 *Lactobacillus plantarum*과 100% 유사하였다. 발효현미슬러리 M-4만이 *Acetobacter peroxydans*와 98% 유사하였다.

균주의 정확한 동정을 위해 16S ribosomal DNA gene sequencing을 한 균주의 band (Fig. 3)를 확인결과 4개의 균주가 동정되었다.

분리된 미생물의 16S rDNA 염기서열을 CLUSTAL_X program으로 multiple sequence alignment한 후 phylogenetic tree를 작성하여 Fig. 2로 나타내었다. 16S ribosomal DNA gene sequencing결과 발효현미 슬러리 M-1은 *Gluconacetobacter intermedius*와 100%의 유사성을 보였고, 발효현미 슬러리 M-2는 *Lactobacillus casei*와 100%, 발효현미 슬러리 M-3은 *Lactobacillus plantarum*와 100%, 발효현미 슬러리 M-4는 *Acetobacter peroxydans*와 98%의 유사성을 보였다.

Table 2. Morphological characteristics of four microorganisms

Strain	Morphology	Gram staining	Motility	Spore formation	16s rDNA sequence similarity ¹	period
발효현미슬 러리 M-1	Rod	Negative	-2	-	100% to <i>Gluconacetobacter intermedius</i>	7일
발효현미슬 러리 M-2	Rod	Positive	-	-	100% to <i>Lactobacillus casei</i>	14일
발효현미슬 러리 M-3	Rod	Positive	-	-	100% to <i>Lactobacillus plantarum</i>	21일
발효현미슬 러리 M-4	Rod	Negative	-	-	98% to <i>Acetobacter peroxydans</i>	30일

*116S rDNA of each isolate were analyzed at the 16S ribosomal DNA gene sequencing 2+, growth or presence; -, no growth or absence.

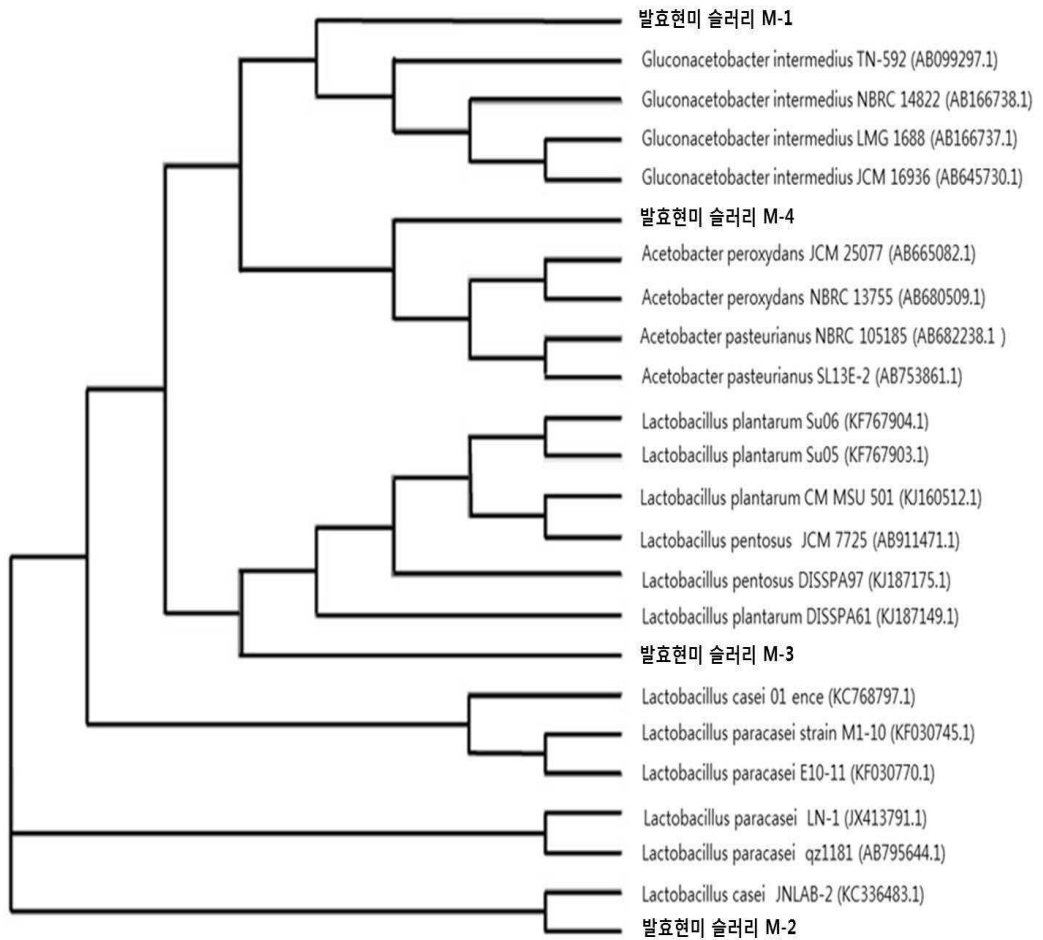


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16s rRNA gene sequences of 4 isolates

*The tree was based on an alignment of 1,318 bp of 16s rRNA gene sequences, and constructed by the neighbor-joining method.

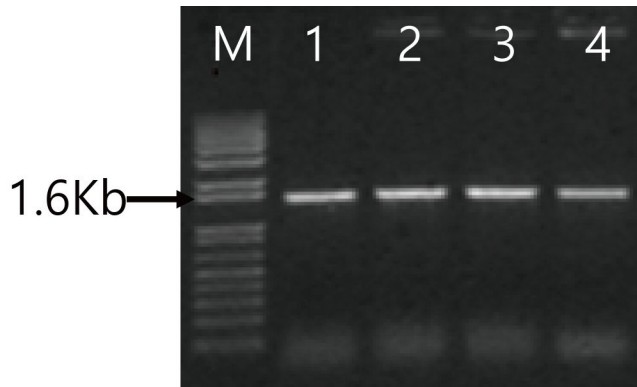


Fig. 3. PCR and electrophoresis using 16sRNA primer of four microorganisms
M; 1Kb Marker, 1; URS-1, 2; URS-2, 3; URS-3, 4; URS-4, primer; 27F+1492R

b. 유당 이용능

생화학적 동정을 위하여 BSM 배지 + @ 배지로 8개의 탄소원 Maltose, Fructose, Lactose, Arabinose, Cellobiose, Mannose, Mannitol, Glucose에 대한 유당 이용성을 조사한 결과를 Table 3으로 나타내었다.

유당 1%(w/v)와 2%가 각각 첨가된 TSB 액체배지와 유당이 첨가되지 않은 TSB 액체배지에 각각 1% 접종하여 37°C에서 48시간 전배양하여 0 ~ 48시간 동안 12시간 간격으로 세포 생육도를 OD 600 nm에서 측정하였다.

생화학적 동정을 위한 BSM 배지를 이용한 탄소원 실험에서, 발효현미슬러리 M-1은 Fructose만을 탄소원으로 사용하며, 발효현미슬러리 M-2, 발효현미슬러리 M-3, 발효현미슬러리 M-4는 8종의 탄소원 중에서 사용하는 탄소원이 없었다.

Table 3. Biochemical characteristics of *Gluconacetobacter intermedius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Acetobacter peroxydans*

	Malt ose	Fluct ose	Lact ose	Arabi nose	Cellob iose	Mann ose	Mann itol	Gluc ose
<i>Gluconacetobacter intermedius</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acetobacter peroxydans</i>								

*Carbon source usage tests were carried out using BSM media.

a+, growth; -, no growth.

2. 생리활성 측정

a. 일반 성분 및 유기산 분석

일반성분 분석결과는 Table 4와 Table 5로 나타내었다. pH는 3 ~ 3.6으로 한 달 동안 거의 높아지지 않았으나 당도는 3일째 8.1Brix에서 시작하여 22일째 9.2Brix, 29일째 9.1Brix로 나타났다. FSUR의 알코올 함량은 중복 발효시 12%에서 시작하여 3일째 9%, 7일째 7%, 10일째 5%, 10일째 5%, 15일째 4%, 22일째 2%, 29일째 0% 함량을 보였다.

수분 함유량은 $95.54 \pm 0.08\%$ 이고, 회분 $0.04 \pm 0.01\%$ 이며, 조 단백질은 $1.36 \pm 0.03\%$ 로 분석되었다. 당은 Fructose $0.515 \pm 0.103\text{mg}/\ell$, Glucose $0.556 \pm 0.124\text{mg}/\ell$, Sucrose $1.806 \pm 0.062\text{mg}/\ell$ 의 3종의 당이 분석되었다. 유기산의 경우에는 Lactic acid $2.069 \pm 0.007\text{mg}/\ell$, Acetic acid $4.050 \pm 0.043\text{mg}/\ell$, Propionic acid $0.405 \pm 0.025\text{mg}/\ell$ 의 3종의 유기산이 분석되었다.

Table 4. Changes in alcohol, pH, and total soluble solid content during the fermentation of fermented slurry of unpolished rice (FSUR)

	3일	7일	10일	15일	22일	29일
Sugar Content (Brix)	8.1	8.4	8.8	8.8	9.2	9.1
pH	3.6	3.87	3.63	3.64	3.65	3.6
Alcohol content (%)	9	7	5	4	2	0

Table 5. Biochemical component analysis of FSUR

		Content (mg/L)
		FSUR
pH		3.20±0.24
Sugar Content(Brix)		16.5
Moisture (%)		95.54±0.08
Ash (%)		0.04±0.01
Crude Protein (%)		1.36±0.03
Sugar (mg/L)	Fructose	-
	Glucose	0.582 ± 0.052
	Sucrose	0.052 ± 0.046
Organic acid (mg/L)	Lactic acid	4.775 ± 0.122
	Oxalic acid	0.034 ± 0.004
	Acetic acid	42.253 ± 0.048
	Propionic acid	7.391 ± 0.046

b. 유리 아미노산 분석

FSUR의 유리아미노산 분석 실험한 결과 FSUR에 포함된 유리 아미노산 17종을 분석하여 Table 6로 나타내었다. Icyine ($47.7 \pm 7.0 \text{mg/l}$), Alanine (153.5mg/l), Serine ($44.8 \pm 7.3 \text{mg/l}$), Proline ($63.9 \pm 6.0 \text{mg/l}$), Valine ($49.0 \pm 4.6 \text{mg/l}$), Threonine ($21.2 \pm 2.6 \text{mg/l}$), Leucine ($60.8 \pm 5.4 \text{mg/l}$), Isoleucine (124.4mg/l), Aspartic acid ($37.0 \pm 4.7 \text{mg/l}$), Lysine ($13.4 \pm 1.2 \text{mg/l}$), Glutamic acid ($57.8 \pm 6.1 \text{mg/l}$), Methionine ($48.8 \pm 5.4 \text{mg/l}$), Histidine ($21.7 \pm 2.2 \text{mg/l}$), Phenylalanine ($29.5 \pm 2.5 \text{mg/l}$), Arginine ($62.6 \pm 5.3 \text{mg/l}$), Tyrosine ($20.2 \pm 1.2 \text{mg/l}$) 및 Cystine ($9.9 \pm 1.5 \text{mg/l}$)으로 분석되었으며 신경안정물질인 GABA (56.2 ± 6.3)로 검출 되었다. 총 아미노산함량은 922.4로 나타났으며 필수아미노산으로 valine, leucine, isoleucine, methionine, Histidine, threonine, phenylalanine, lysine 8종이 모두 검출되어 Lee (2011)과 같이 모두 함유되어 있으며 높게 나타났다.

Table 6. Amino acid analysis of fermented slurry of unpolished rice(FSUR)

	Contents (mg/L)
Glycine	47.7 ±7.0
Alanine	153.5 ±33.4
Serine	44.8 ±7.3
Proline	63.9 ±6.0
Valine	49.0 ±4.6
Threonine	21.2 ±2.6
Leucine	60.8 ±5.4
Isoleucine	124.4 ±13.0
Aspartic acid	37.0±4.7
Lysine	13.4 ±1.2
Glutamic acid	57.8 ±6.2
Methionine	48.8 ±5.4
Histidine	21.7 ±2.2
Phenylalanine	29.5 ±2.5
Arginine	62.6 ± 5.3
Tyrosine	20.2 ± 1.2
Cystine	9.9 ± 1.5
γ-aminobutyric acid	56.2±6.3
Total amino acid	922.4

3. 항생제 감수성

a. 항균 spectrum

(1) 발효현미 슬러리의 항균 활성

FSUR의 발효 단계별로 *Gluconacetobacter intermedius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter peroxydans*로 4개의 균주를 동정할 수 있었다. FSUR에서 분리된 유산균 4균주의 배양액을 원심분리 후 상등액을 pH 6.5로 조성한 후 병원성 균인 *Staphylococcus aureus* (KCTC 1916), *Escherichia coli* (KCTC 1682), *Yersinia enterocolitica* (KCCM 41657), *Listeria monocytogenes* (KCTC 3710), *Salmonella typhimurium* (KCTC 1926), *Pseudomonas aeruginosa* (KACC 10186)에 대한 성장억제 효과를 조사하였으나 성장 억제능을 나타내지 않아서 4종의 균주를 분리하지 않고 발효현미슬러리 원액 50 ul/disc의 농도에서 항균활성을 측정하여 Table 7; 8, Fig. 4; 5으로 나타내었다. 분리된 4개주의 유산균이 생산하는 물질이 대조균인 Carbenicillin보다 *Staphylococcus aureus* (KCTC 1916)에서는 22mm로 평균치 보다 높았으며 *Escherichia coli* (KCTC 1682)와 *Yersinia enterocolitica* (KCCM 41657)에서는 대조균인 Carbenicillin에서 보이지 않던 항균력이 높게 나타났으며 *Listeria monocytogenes* (KCTC 3710) 27mm와 *Salmonella typhimurium* (KCTC 1926) 26mm로 대조균인 Carbenicillin보다 괄목할 만한 높은 항균활성을 보였다. *Pseudomonas aeruginosa* (KACC 10186)에서는 대조균 Carbenicillin보다는 낮은 항균력을 보였으나 6개의 균주 모두에 골고루 항균능력을 보였다. 이는 FSUR에서 분리된 4개의 균주가 생산하는 항균물질이 그람양성균과 그람음성균 모두에 선택적으로 저해하는 단백질성 항균물질인 bacteriocin의 가능성여부를 알기 위하여 그 배양액을 100°C에서 15분 동안 boiling한 후와 단백질 분해효소인 pepsin, trypsin을 처리한 후에 항균력을 비교하였지만 항균력에 변화가 없었다. 즉 FSUR 배양액내의 항균물질은 열이나 단백질 분해효소에 의해 파괴되지 않았기 때문에 FSUR가 생산한 항균물질은 단백질성 항균물질이 아니며 비 단백질성 항균물질인 것으로 판단되었다.

Table 7. Screening of fermented slurry of unpolished rice (FSUR) and a variety of other antibiotics and control substances for antimicrobial activity using a paper disc assay

strains	KCL buffer pH3	Carbenicillin (50ug/ml)	Tetracycline (50ug/ml)	FSUR
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	15	12	18
<i>Escherichia coli</i>	-	12	11	13
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	14	11	21
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	17	16	18
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	13	11	15
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	12	32
<i>Lactobacillus casei</i>	-	14	16	10
<i>Acetobacter peroxydans</i>	-	19	17	18
<i>Gluconacetobacter intermedius</i>	-	11	18	12
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	12	11	11

*Antimicrobial activity of fermented slurry of unpolished rice (FSUR) by the paper disc assay. Fifty microliters of each sample was placed onto a YPD or TSB agar plate. Tetracycline was used as a positive control

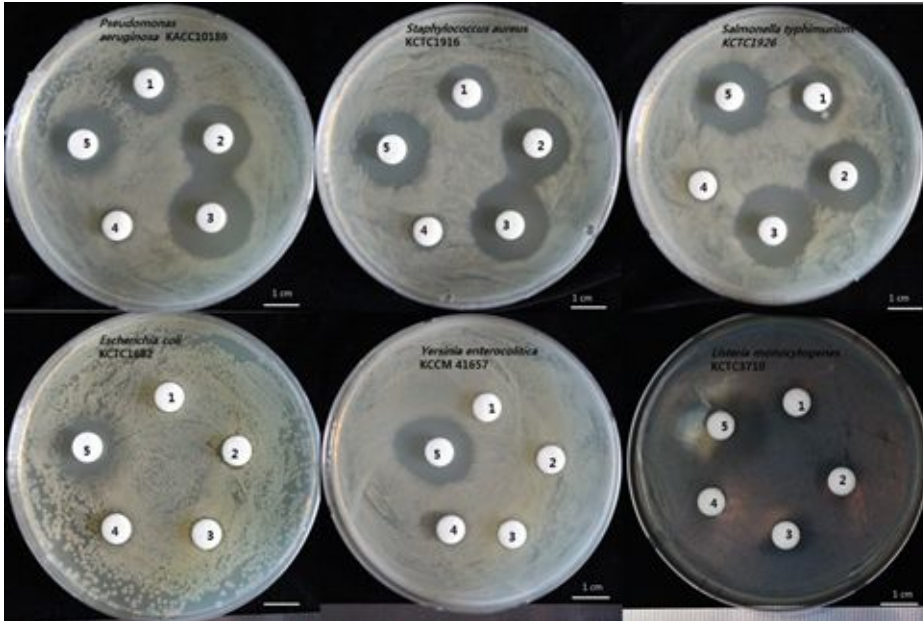


Fig. 4. Screening for antibacterial activity by paper disc assay

Loaded with each sample (50 ul) was placed on the agar plate which was seeded with each test microorganism. carbenicillin was used as a positive control. 1; Carbencillin 50 ug/ml, 2; Carbenicillin 100 ug/ml, 3; Carbenicillin 200 ug/ml 4; URM

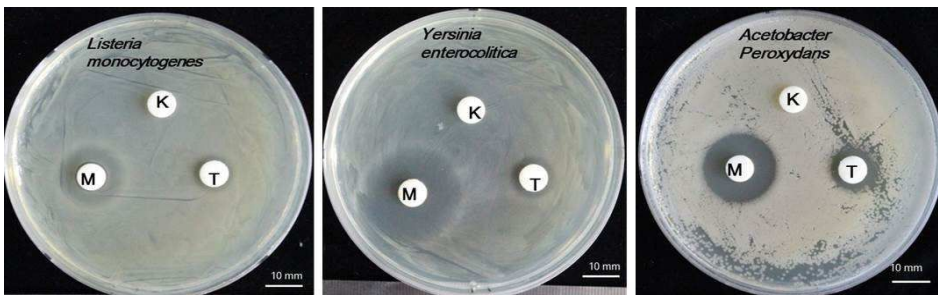


Fig. 5. Screening for antibacterial activity by paper disc assay

*Loaded with each sample (50 ul) was placed on the agar plate which was seeded with each test microorganism. Tetracycline was used as a positive control.

*K; KCL Buffer pH 3, T; Tetracycline(50 ug/ml), M;FSUR

Table 8. Screening for antimicrobial activity according to the acidity of 3-year fermented dark vinegar using paper disc assay

	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC1916	<i>Escherichia coli</i> KCTC1682	<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC3710	<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC1926	<i>Yersinia enterocolitica</i> KCCM 41657	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KACC10186
Carbenicillin (50ug/ml)	16	-	13	16	-	15
Carbenicillin (100ug/ml)	20	-	15	21	-	21
Carbenicillin (200ug/ml)	24	-	17	25	-	30
FSUR	22	13	27	26	23	18

*Loaded with each sample (50 ul) was placed on the agar plate which was seeded with each test microorganism. carbenicillin was used as a positive control.

(2) 유기산의 항균 활성

FSUR에 포함된 유기산인 Lactic acid, Oxalic acid, Acetic acid Formic acid 및 Propionic acid의 항균활성 분석을 위해 대조균으로 그람 양성균 *Staphylococcus aureus* 와 *Listeria monocytogenes*를 사용하였으며, 그람 음성균은 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* 총 6 균주로 분석하여 Table 9로 나타내었다.

FSUR에 포함된 유기산 중에서 Lactic acid, Oxalic acid, Formic acid, Acetic acid에서는 항균활성이 나타나지 않았으며, Propionic acid에서 실시한 항균활성은 *Yersinia enterocolitica*에서 28mm로 높은 항균력을 보였고 *Staphylococcus aureus*에서는 가장 낮은 항균력을 보였다. 발효현미 슬러리의 항균활성은 Propionic acid와 비슷한 정도로 높은 항균활성이 6개의 균주 모두에서 나타났다.

Table 9. 발효현미 슬러리에 포함된 유기산의 향균활성

	FSUR	Lactic acid	Oxalic acid	Formic acid	Acetic acid	Propionic acid
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	-	-	-	-	15
<i>Escherichia coli</i>	20	-	-	-	-	17
<i>Listeria monocytogenes</i>	23	-	-	-	-	19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	-	-	-	-	17
<i>Salmonella typhimurium</i>	26	-	-	-	-	22
<i>Yersinia enterocolitica</i>	27	-	-	-	-	28

(3) pH에 따른 FSUR 항균 활성

발효현미 슬러리의 산성도 변화에 따른 항균 활성을 측정하였다. 1N NaOH를 사용하여 pH 3인 FSUR의 pH를 3 ~ 7까지 조정하고, pH에 따른 항균활성 효과를 분석하여 Table 10으로 나타내었다.

FSUR의 산성도에 따른 항균활성을 6종의 균주에서 전체적으로 pH값이 3에서 가장 높게 나타났으며 *Yersinia enterocolitica*에서 27mm로 발효현미 슬러리와 비슷한 항균력을 보였고 *Staphylococcus aureus*에서는 가장 낮은 항균력을 보였다. pH값이 증가할수록 항균활성이 줄어드는 양상을 보였으며, pH 6부터는 항균활성이 나타나지 않았다.

Table 10. Screening for antimicrobial activity according to the acidity of fermented slurry of unpolished rice (FSUR)

	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	12	10	-	-
<i>Escherichia coli</i>	20	16	12	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	23	16	11	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	13	11	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	26	16	10	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	27	16	13	-	-

*Acidity was adjusted using 0.1 N NaOH. Units: mm, values represent the diameter of the inhibition zone.

4. 항산화 활성도

a. Free radical 소거 활성 측정을 통한 항산화능 분석

발효현미슬러리의 항산화능을 DPPH radical scavenging activity 측정을 통해 분석한 결과를 Fig. 6으로 나타내었다. 양성 대조군인 ascorbic acid는 71.26%, FSUR 63.04%, Freeze Dry FSUR는 45.65%로 FSUR의 DPPH radical 억제능은 63.04%의 활성을 나타냈으나 동결건조한 FSUR의 항산화능은 낮게 나타났다. 양성 대조군인 ascorbic acid가 1mg/ml의 농도로 일 때 71.26%으로 FSUR보다 높은 억제 능을 보였다.

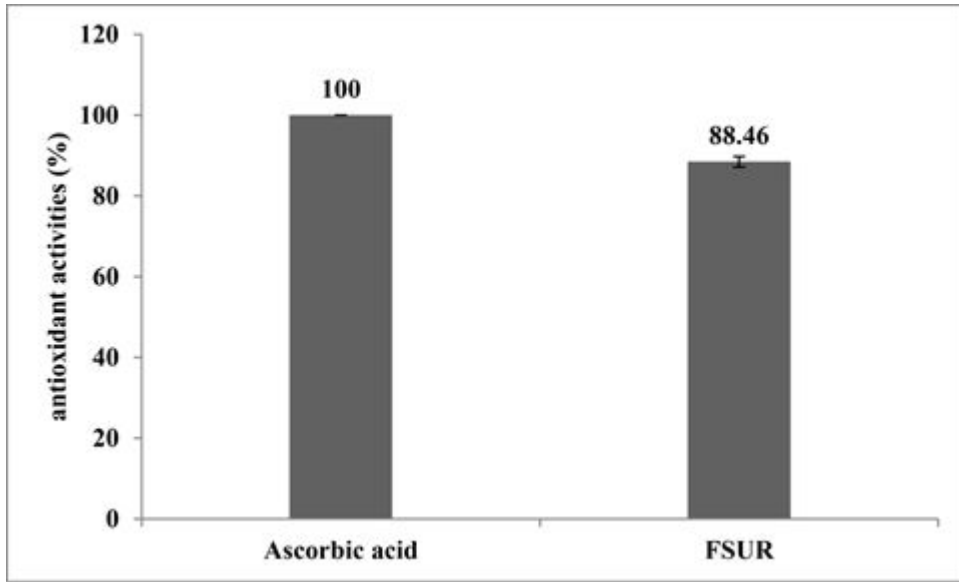


Fig. 6. Antioxidant activity of fermented slurry of unpolished rice (FSUR)

* The overall antioxidant activity of the prepared sample was assessed by the DPPH method. As positive control, Ascorbic acid (1 mg/ml, 5mM) was used.

* FSUR; Fermented slurry of Unfolishod rice.

D. 고찰 및 결론

본 연구의 재료인 FSUR의 제조는 일반적으로 알려져 있는 전주 모주와는 다른 방법으로 만들어졌으며 일본의 크로주-모로미마추와 더 유사하다. 전주모주가 해장술이나 후식으로 자리매김에 그치고 약리적 기능에 대한 연구는 미미하다. 일본에서 연구된 Fukuyama 등(2007)의 Kurozu moromimatsu의 in vivo 실험에서 대장암세포주의 성장을 억제했다는 결과와 더불어 Kurozu moromimatsu의 유기산 및 미네랄 함량이 Kurozu보다 높다는 Fukuyama 등(2007)의 연구와 FSUR의 생리활성 및 분자유전학적 특성 분석결과 유의미하게 나타났다.

일반성분 분석결과 pH는 3 ~ 3.6으로 한 달 동안 거의 높아지지 않았으나 당도는 3일째 8.1Brix에서 시작하여 22일째 9.2Brix, 29일째 9.1Brix로 나타났으며 전주모주와 비슷한 결과를 보였으며 알코올 함량은 2차 발효를 시작한 시점인 12%에서 시작하여 3일째 9%, 7일째 7%, 10일째 5%, 10일째 5%, 15일째 4%, 22일째 2%, 29일째 0% 함량을 보였다. 이는 알코올을 먹이로 하는 초산균이 잠식하면서 알코올이 사라진 것으로 판단했다. 무 알코올의 약 산성 그리고 낮은 당도로 좋은 결과가 프로바이오틱스로서의 가능성을 보이고 있으나 맛에 있어서 높은 관능평가를 위한 시료제조 연구가 과제로 남는다.

당은 Fructose $0.515 \pm 0.103\text{mg}/\ell$, Glucose $0.556 \pm 0.124\text{mg}/\ell$, Sucrose $1.806 \pm 0.062\text{mg}/\ell$ 의 3종의 당이 분석되어 전주모주와 유사하였으나 주요 유기산인 Lactic acid $2.069 \pm 0.007\text{mg}/\ell$, Acetic acid $4.050 \pm 0.043\text{mg}/\ell$, Propionic acid $0.405 \pm 0.025\text{mg}/\ell$ 으로 분석되었다. 전주모주의 주요 유기산은 acetic acid, lactic acid, malic acid, citric acid로 식품의 부패방지와 유효균을 보호하는 특성을 지닌 Propionic acid가 다량 검출된 것은 FSUR의 특이한 특성으로 긍정적 결과로 보인다.

좋은 식품균의 분류는 아미노산의 함량이라고 볼수 있다. *Lactobacillus* 속 균주들은 단당류의 분해를 촉진하기 위해 필수 아미노산인 valine, leucine, isoleucine, methionine, threonine, lysine, phenylalanine, tryptophan 등이 다양하게 분포되어야 한다. 그러므로 *Lactobacillus* 속 균주들이 생존한다는 것은 필수아미노산이 풍부함을 알 수 있다(이, 1995). FSUR의 아미노산 분석결과 18종이 검출되었으며 특히 8종의 필수아미노산 모두를 함유하고 있는 것으로 나타났다. 이는 전주 모주 22종의 유리아미노산 분석결과 21종의 유리아미노산이 검출되었으나 그 함량이 미미하게

검출(lee *et al.*, 2011)된 것과 비교하면 건강음료로서 기능성에 좋은 긍정적 결과로 볼 수 있다. 전주모주가 전통방법으로 제조되지 않는 시판 막걸리로 모주를 만들었으며, 막걸리 재료가 백미와 밀가루를 사용하여 3일에서 4일로 단기간 발효된 막걸리로 만들기(Her., 2004) 때문인 것으로 사료된다.

FSUR의 발효 단계별로 나타난 4종의 균주(*Gluconacetobacter intermedius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter peroxydans*)를 동정했다. 이 중 *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*는 *Lactobacillus*속의 균주로 사람의 입 속이나 장에서 발견되는 프로바이오틱스의 대표균주이다.

향산화능 검사에서 FSUR의 자체 검사결과는 63.03%, 양성대조군 Ascorbic acid 1 mg/ml이 71.26%으로 FSUR보다 높은 활성을 보였으나 FSUR의 1회 복용시 100ml로 강력한 향산화능을 가진 것으로 추론할 수 있다.

FSUR은 *Listeria monocytogenes* (KCTC 3710), *Yersinia enterocolitica* (KCCM 41657)에 항균활성을 보였다. *Listeria monocytogenes*는 리스테리아증이라는 인수 공통의 전염병의 원인인 균으로 가벼운 복통이나 설사, 구토 등과 같은 식중독과 유사한 증상이 나타나게 된다. *Yersinia enterocolitica*는 장내세균으로 식중독의 원인균으로 감염되면 복통, 설사, 발열, 발진 등 다양한 증상이 나타나게 된다. FSUR은 이러한 두 병원성 균주의 성장 억제율이 괄목하게 높은 것으로 나타났다.

높은 항균력을 보인 FSUR가 단백질성 항균물질인 bacteriocin의 가능성여부를 알기 위하여 그 배양액을 100°C에서 15분 동안 boiling한 후와 단백질 분해효소인 pepsin, trypsin을 처리한 후에 항균력을 비교하였지만 항균력에 변화가 없었다. FSUR가 생산한 항균물질은 비단백질성 항균물질인 것으로 판단되어 Pristovsek *et al.*, (1999)와 van *et al.*, (2002)의 antibiotics는 non-ribosomal synthesis에 의해서 합성되는 항균 물질로 D-amino acids나 hydroxy amino acids와 같은 비단백질성 acids를 갖고 있어서 단백질분해 효소에 안정하며, 광범위하게 항균 활성을 나타낸다는 연구결과와 동일했다.

본 연구의 실험 결과로 FSUR는 알코올 0%, 높은 향산화능 그리고 내성이 강한 *Staphylococcus aureus* KCTC1916와 *Listeria monocytogenes* (KCTC 3710), *Yersinia enterocolitica* (KCCM 41657)에 항균활성을 가지고 있어 유용한 프로바이오틱스 기능성 보완대체 제재로서의 가능성을 입증 했다.

III. 흑초

A. 서론

일반 쌀식초가 무색인대 비해 현미식초는 해를 거듭할수록 검은 빛을 띄어 일반적으로 흑초(黑酢)라 명명되어 진다. 흑초는 야외의 향아리 속에서 1년 이상의 긴 발효숙성의 기간에 아미노산과 당이 점차 반응을 일으켜 검은 색소가 생겨 흑갈색으로 변한다. 흑초는 다른 식초보다 아미노산과 유기산의 함량이 높은 것이 특징으로 본 연구에서 제조한 전통현미식초는 FDV로 명명할 것이며, 일본 흑초는 쿠로즈로 통일하여 사용하였다.

가고시마현은 큐슈의 서남단에 위치한 곳으로 육지의 대부분이 화산재, 화산모래, 화산성 퇴적물로 이루어져 있으며 연간 평균기온은 섭씨 18.5°C로 대체적으로 온난하며 겨울 평균기온이 영하를 내려가지 않는 비교적 따뜻한 곳이며 쿠로즈는 400년 전통을 자랑하면서 향아리 정치배양 제조법으로 만들어지고 있는 천연양조식초로 암성장 억제력, 과산화지질, 항염작용이 있다고 보고되었다(Fukuyama *et al.*, 2007; Nishidai *et al.*, 2000; Seki *et al.*, 2008; Shimoji *et al.*, 2004; Shizuma *et al.*, 2011; Shizuma *et al.*, 2011; Tong *et al.*, 2010). 일본의 대표적인 Gagoshima와 기리시마에서 만들어내는 Gagguida쿠로즈와 전통방법으로 복원한 FDV의 비교연구를 통해 우리 나라의 천연 현미 양조식초의 우수성을 입증하고자했으며, 프로바이오틱스로서 therapeutic agent로서 가능성 제기 하고자 했다.

B. 실험재료 및 방법

1. 균주 및 배지

a. 사용균주의 제조

오늘날 널리 약리적 효능을 위해 활용되고 있는 현미식초를 전통제조법 그대로 복원하였으며 옹기는 강진 칠량의 흙과 바람 그리고 불에서 구워내는 전통항아리의 보유자인 인간문화재 정윤석 항아리를 사용하였다. 현미는 2010년산, 2012년산으로 전라남도 담양군 창평면 일대의 청정지역에서 생산된 벼를 창평면 오광리정미소에서 5분도미로 정미하여 현미의 눈과 껍질층이 97%인 현미를 구입하여 사용하였다.

시료의 제조과정은 Fig. 7로 나타내었다. 제조과정은 8단계로 1차와 2차 중복병행발효로 제조하였으며 초기알코올 12% ~ 14%내의 함량을 수득하였으며 자연발효 1년부터 3년 이상의 FDV를 얻기 위하여 초기 알코올 함량 12% ~ 14%를 고수했다. 시료 FDV는 제작하여 6개월까지 발효실에서 충분히 숙성시킨 후 맑은 상등액만을 야외에서 1년, 3년 발효하여 냉장온도 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

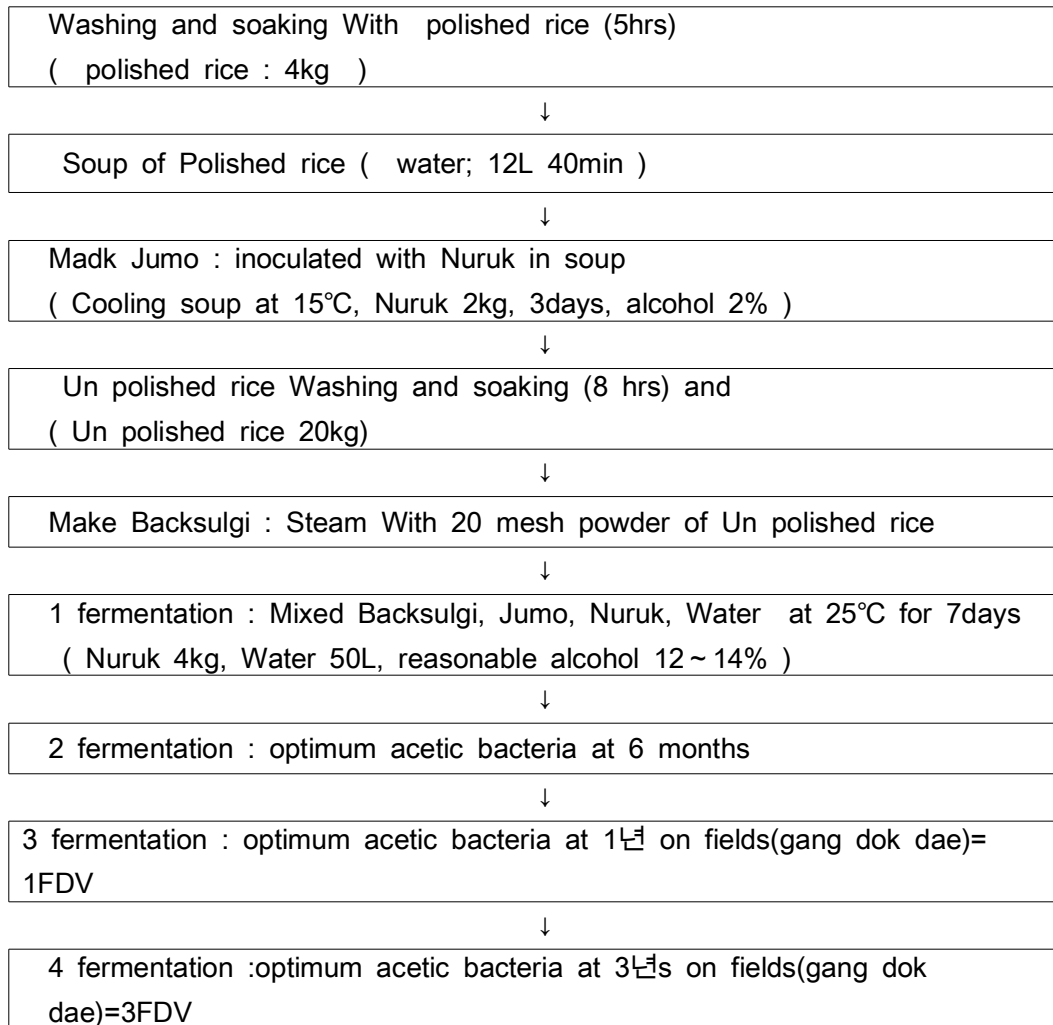


Fig. 7. Preparation of fermented dark vinegar (FDV)

b. 사용 배지

균주의 기본배양에는 TSB 고체배지, YPD배지를 사용하였다.

TSB의 조성은 kit (BD 211825; Becton, Dickinson and Co., NJ, USA) Tryptone (pancreatic digest of casein)를 활용하였으며 YPD배지의 조성(g/L)은 Peptone 20.0g, Yeast Extract 10.0g, Glucose 20.0g, Agar 20.0g, Final pH 6.8 ± 0.2 at 25°C로 조성한 다음 Incubator에 보관하면서 가압멸균기 121°C에서 15분간 처리하여 Plate에 분주하여 사용하였다.

유산균을 검출하기 위해 MRS배지를 만들어 사용하였다. MRS의 조성은 MRS Broth 11.0g, Agar powder 3.0g, 증류수 200ml을 넣어 마그네틱 바를 비커에 넣고 교반한 후 Autoclave에 넣고 멸균했다. 멸균이 끝나면 약 45°C MRS Agar를 petri dish에 25ml씩 담고 굳혀 Incubator에 보관하면서 사용하였다.

FDV의 세균 분리를 위해서 FDV 100 μ l 를 각각 yeast extract-peptone-dextrose 한천배지와 tryptic soy broth 한천배지 에 도말하여 2일 동안 30°C에서 배양하여 분리 독립된 개개의 콜로니를 백금으로 소독된 새 배지에 옮겨 2일 동안 30°C에서 계대 배양하였다. 형태와 생화학적 특성을 위한 그람염색은 기성제품인 그람염색 키트인 Fluka, 77730으로 행하였다.

2. 분자유전학적 동정

a. 균주의 스크리닝 및 동정

분리 선발한 미생물의 동정은 Gram 염색법과 현미경 관찰을 통해 형태학적 특성을 관찰하여 분류하였다.

16S rDNA 의 PCR은 27F 프라이머 5'-AGAGTTTGATCMTGG-CTCAG-3'와 1492R 프라이머 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'를 사용하여 증폭 하였다 (Amalfi *et al.*, 2010; Weisburg *et al.*, 1991). 16S rDNA의 PCR 증폭은 MJ Research Tetrad PTC 225 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA)를 최종 부피 50 μ L인 pH 7.4인 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 각각 deoxynucleotide (dNTP) 0.2 μ M, 각각 primer 0.2 μ M, 1.25 U의 Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), 그리고 추출 된 DNA의 3 μ L를 이용하여 수행 하였다. PCR 생산물은 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Limburg, Netherlands) 사용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 16S rDNA 염기 서열 분석은 ABI PRISM BigDye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., CA, USA)와 ABI 310 DNA sequencer (Applied Biosystems, Inc.)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 수행 하였다.

b. 유당 이용능

유당 이용능은 BSM 배지를 활용하여 8개의 탄소원에 대해 조사하였다. 3개의 Peptidoglycan types 과 16S rDNA sequence 분석결과, 분리된 3개의 균주인 *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter peroxydans*, *Acetobacter senegalensis* 균주를 8개의 탄소원 maltose, mannitol, cellobiose, D-mannose, D-glucose, lactose, fructose, and D-arabinose를 기저로 한 basal salt media (BSM) (Banat *et al.*, 1991)에서 각각 최종적으로 2% 탄소원(Banat *et al.*, 1991)으로 실험했다.

3. 생리활성 측정

FDV의 알코올과 온도는 alcohol-temperature correction table를 사용하였다. 알코올 함량(%)은 시료의 상등액 100ml를 증류기를 통해 70 ml의 수집 될 때까지 실행하여 증류수에 수집된 샘플에 총 부피 100 ml이 될 때까지 증류수를 첨가한 후 vinometer를 사용하여 측정했다.

모든 실험은 3회 분석하여 평균값으로 나타내었다.

a. 일반성분 분석

(1) 유리당 측정

총 가용성 고형분 함량은 a Brix Refractometer HI 96811 (Hanna Instruments, RI, USA)로 측정하였다(Woo *et al.*, 2010). 이러한 분석은 The Biotechnology Industrialization Center (BIC; Dongshin University, Naju, Korea)에서 수행되었다.

(2) 유기산 함량

pH는 Orion 420A pH meter (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA)로 측정했다. 유기산 함량분석은 The Biotechnology Industrialization Center (BIC; Dongshin University, Naju, Korea)에서 수행하였다.

b. 유리 아미노산 분석

초산균의 세포 성장 및 에너지 대사를 위해 다양한 아미노산을 필요로 한다. 특히 유기산은 영양 요구성이 매우 까다로우며(Parente *et al.*, 1992; De Vuyst, 1996) 한 가지 이상의 특정한 아미노산이 없으면 성장하지 못하거나 생육속도가

매우 늦어지는 경우를 보여 아미노산과 비타민이 미생물 성장에 중요한 인자라고 강조하였다(Amrane *et al.*, 1994; Rogosa *et al.*, 1961). 유산균이 필요로 하고 또는 유산균 산물로서 생산되는 유리 아미노산의 함량은 현미식초의 약리적 기능과 밀접한 관계를 갖고 있다.

유리 아미노산 및 componential 분석은 proximate composition analysis으로 수행했다. 유리 아미노산분석은 liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)과 electrospray ionization (ESI)로 선택된 ion monitoring (SIM) mode로 수행하였다. 이러한 분석은 BIC (Biotechnology Industrialization Center, Dongshin University, Korea)에 의해서 수행되었다.

4. 항생제 감수성

FDV와 Gagoshima와 3년 숙성된 Gagguida의 항균 활성의 측정은 고체 배지에서 agar diffusion method (Lee *et al.*, 2007; Mehni *et al.*, 2014)을 사용하여 수행하였다. 항세균 활성 평가를 위해 TSB 고체배지와 YPD 액체배지에 각각의 세균을 접종하여 30°C에서 18시간 동안 배양한 각 균주를 OD 600nm에서 흡광도를 0.1로 조정하여 TSB 고체배지를 포함하는 멸균 petri dish에 100 μ l 도말하고, 각각의 시료 100 μ l를 멸균 disc-paper (지름 6.5 mm, Whatman No.2)에 가하여, 30°C에서 18시간 동안 배양하였다.

양성 대조균으로 그람 양성세균으로는 *Staphylococcus aureus* (KCTC 1916), *Listeria monocytogenes* (KCTC 3710)와 그람 음성세균으로 *Escherichia coli* (KCTC 1682), *Pseudomonas aeruginosa* (KACC 10186), *Salmonella typhimurium* (KCTC 1926), *Yersinia enterocolitica* (KCCM 41657)를 사용하였다.

생육저지환의 크기는 육안으로 생육이 나타나지 않는 부분의 지름을 mm 단위로 측정하였고(Mehni *et al.*, 2014), 3회 이상 평가 후 대표 결과로 나타내었다.

5. 항산화 활성도

a. FDV의 배양기간에 따른 항산화 활성도

활성산소는 노화, 암, 관절염 등에 직, 간접적으로 생체의 장애를 일으키는 원인으로 잘 알려져 있어서 항암활성을 포함한 다양한 생리활성 후보소재로 항산화능의 보유 유무의 확인은 매우 중요하다(FAO/WHO. 2002).

DPPH의 전자공여능 실험은 항산화 작용의 지표로 사용되고 있으며, FDV의 항산화능 분석은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거법(Kitagaki *et al.*, 1999; Koleva *et al.*, 2002)을 이용한 전자공여능 측정을 수행하였다.

FDV를 동결건조 시켜 5mg/ml로 증류수에 녹여 준비한 후, 96 well plate에 무수 에탄올에 용해된 1.5×10^{-4} M DPPH 180 μ m와 각 시료 20 μ m를 분주하여 혼합액을 실온에서 30분간 반응시킨 후 DPPH 측정법(Kitagaki H *et al.*, 1999; Koleva *et al.*, 2002)에 따라 devices (Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도 0.1로 측정하였다.

시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내었다. 양성 대조군으로는 대표적인 항산화제인 ascorbic acid를 사용하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

억제능의 백분율 공식은 다음과 같다.

$$= 100 - [(absorbance\ increase\ of\ sample / absorbance\ increase\ of\ control) \times 100]$$

b. FDV와 Gagoshima Gagguida 쿠로즈의 항산화능 분석

일본의 명품식초는 현미로 만든 Gagoshima와 기리시마에서 만들어내는 Gagguida쿠로즈로 400년 전통을 자랑하지만 처음 시료의 제조는 우리나라의 옹기를 구입하여 사용했다. 쿠로즈는 쌀식초, 포도식초, 사과식초 그리고 와인식초보다 높은 미네랄, 아미노산, 그리고 유기산을 갖는 것이 특징이다(Li-Tao *et al.*, 2010).

일본산 흑초는 3년 숙성한 Gagoshima와 3년 숙성된 Gagguida쿠로즈를 직접 구입하여 냉장온도 4°C에 보관하면서 사용하였다.

DPPH의 전자공여능 실험은 항산화 작용의 지표로 사용되고 있으며, 본 FDV의 항산화능 측정에서는 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) 측정법(Kitagaki H *et al.*, 1999; Koleva *et al.*, 2002) 에 따라 시행했으며 Table 11로 나타냈다.

저장된 DPPH는 무수 ethanol 100 ml 에 DPPH 0.4 mM를 용해해서 준비해두었다. 20 µl FDV의 시료를 180 µl of DPPH 에 용해시켰다. 용해된 용액을 힘차게 흔들어서 spectrophotometer (Eon™, BioTek)로 OD 517 nm에서 측정했다. 대조 그룹으로 Ascorbic acid (1 mg/ml, 5mM)를 사용했으며 DPPH radical 샘플의 소거 능력을 나타내는 억제능의 비율은 Koleva *et al.*, (2002)의 동일한 방법으로 계산하였다.

$$\text{Antioxidant Activity (AOA)} = 100 - \left[\frac{\text{absorbance increase of sample}}{\text{absorbance increase of control}} \times 100 \right]$$

Table 11. DPPH assay

	sample	S.Blank	control
DPPH	250	0	250
EtOH	0	250	500
sample(계대희석한 것)	500	500	0
Total	750	750	750

Experiment: 실험군의 흡광도

Blank: 용매의 흡광도

Control: 대조군의 흡광도

C. 실험의 결과

1. 분자유전학적 동정

a. 균주의 스크리닝 및 동정

FDV의 PCR과 electrophoresis using 16sRNA primer of four microorganism 한 결과를 Fig. 8로 나타내었으며 16S rDNA sequence 분석결과 분리된 3개의 균주를 FDV-1, 2, 3으로 명명하였으며 FDV에서 분리된 각 3개 균주의 특성은 뉴클레오티드 배열과 16S rDNA gene 분석으로 종 단계까지 계통발생분류 분석에 따라서 Fig. 9으로 나타내었으며, FDV-1, 2, 3의 형태학적 특성 및 균주분석결과를 Table 12로 나타내었다.

FDV-1은 *Acetobacter pasteurianus* 와 98% 상동했으며, FDV-2은 *Acetobacter peroxydans*와는 100% 상동했으며, FDV-3은 *Acetobacter senegalensis*와 96% 상동했다. 형태학적 분석결과는 FDV-1 은 타원형, FDV-2은 막대모형, FDV-3은 둥근형으로 나타났다. 그람염색결과 세 개의 균주 모두 그람 음성균으로 나타났다. 각각의 균주는 혐기성이나 호기성아래서 모두 성장하는 것으로 나타났으며, 운동성이 없으나 진균이 아닌 그람 음성균으로 나타났다.

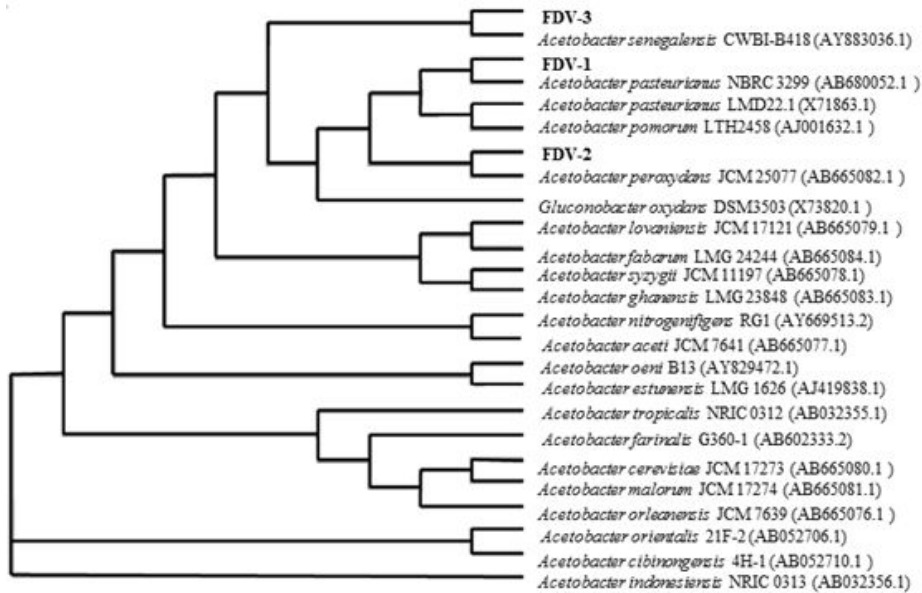


Fig. 8. Phylogenetic tree based on 16s rRNA gene sequences of 3 isolated microorganism from Fermented Dark Vinegar

*The tree was based on an alignment of 1,318 bp of 16s rRNA gene sequences, and constructed by the neighbor-joining method

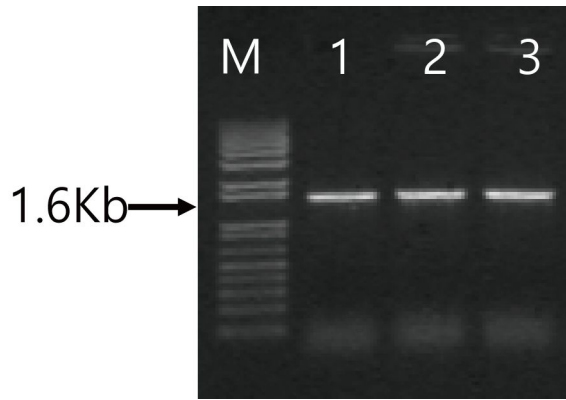


Fig. 9. PCR and electrophoresis using 16sRNA primer of four microorganism
M; 1Kb Marker, 1; FDV-1, 2; FDV-2, 3; FDV-3, primer; 27F+1492R

Table 12. Morphological characteristics of 3 microorganisms

Strain	Morphological	Gram strain	Growth		Motility	Spore formation	s rRNA sequence similarity
			aerobic	Anaerobic			
FDV-1	Ovoid	Negative	+ND	-	-	98% to <i>Acetobacter pasteurianus</i>	
FDV-2	Rod	Negative	+ND	-	-	100% to <i>Acetobacter peroxydans</i>	
FDV-3	Coccus	Negative	+ND	-	-	96% to <i>Acetobacter senegalensis</i>	

*116S rDNA of each isolate were analyzed at the 16S ribosomal DNA gene sequencing

*2+; growth or presence, -; no growth or absence.

b. 유당 이용능

유당 이용능 실험은 basal salt media (BSM) 배지를 활용하여 8개의 탄소원에 대해 조사하여 Table 13으로 나타내었다. *Acetobacter pasterianus*, *Acetobacter peroxidans*, *Acetobacter senegalensis*가 8개의 탄소원 maltose, mannitol, cellobiose, D-mannose, D-glucose, lactose, fructose, and D-arabinose를 기저로 한 BSM (Banat *et al.*, 1991) 배지에서 각각 최종적으로 2% 탄소원(Banat *et al.*, 1991)에서 수행하였다.

FDV-1인 *Acetobacter pasterianus*, FDV-2인 *Acetobacter peroxidans*, FDV-3인 *Acetobacter senegalensis* 중에서 FDV-1만이 Lactose의 탄소원을 사용하는 것으로 나타났다.

Table 13. Carbon source usage of three microorganisms isolated from fermented dark vinegar (FDV)

	Malto se	Flucto se	Lacto se	Arabino se	Cellobio se	Manno se	Mannit ol	Gluco se
<i>Acetobacter pasterianus</i> FDV-1	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Acetobacter peroxidans</i> FDV-2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acetobacter senegalensis</i> FDV-3	-	-	-	-	-	-	-	-

*1 Carbon source usage tests were carried out using the BSM media

2. 생리활성 측정

a. 일반성분 분석

(1) pH 측정

FDV의 일반성분 중 pH는 1년 3.2로 나타났으며 3년에는 4.7로 Table 14에 나타내었다. 이는 시중 판매되는 주정 무첨가 현미식초 3종류에서 나타난 pH 2.44 ~ 2.83(김귀란 등., 2009)보다 높아 부드러운 맛을 가지고 있는 것으로 나타났다.

(2) 유리당 측정

유리당 측정결과는 Table 14로 나타내었다. 당도는 1년에서 5.0° Brix, 3년 7.1° Brix로 3년에서 유의적으로 높게 나타났으며 이는 시중에서 판매되는 주정 무첨가 현미식초 3종류에서 나타난 4.2° Brix ~ 7.0° Brix와 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

(3) 유기산 함량의 변화

FDV의 유기산 함량결과는 Table 14로 나타내었다. 초산발효 중 유기산은 Oxalic acid, Lactic acid, Acetic acid, Propionic acid로 4종의 유기산이 검출되었으며, 1년과 3년에서 Acetic acid가 가장 높게 검출되었다. 이전 연구에서 보이지 않는 유기산인 Propionic acid가 다량 검출되었고 Oxalic acid, Acetic acid, Propionic acid가 1년에서 3년으로 갈수록 높게 향상 되었으나 Lactic acid는 감소하고 있는 것으로 나타났다.

Table 14. Component analysis of Fermented Dark Vinegar (FDV)

		Contents (mg/l)	
		1 년 - aFDV	3 년 - bFDV
pH		3.2	4.7
Sugar Content (Brix)		5.0	7.1
Moisture (%)		97.49 ±0.07	95.79 ±0.02
Ash (%)		0.26 ±0.02	0.35 ±0.0
Crude Protein (%)		2.29 ±0.19	4.41 ±0.03
Fructose		-	-
Sugar (mg/L)	Glucose	0.582 ±0.052	0.628 ±0.047
	Sucrose	0.052 ±0.046	0.552 ±0.080
	Oxalic acid	0.034 ±0.004	0.1 ±0.011
Organic acid (mg/L)	Lactic acid	4.775 ±0.122	3.826 ±0.047
	Acetic acid	42.253 ±0.048	49.577 ±0.035
	Propionic acid	7.391 ±0.046	9.443 ±0.025

*aFDV fermented for 1 년, bFDV fermented for 3 년.

b. 유리 아미노산 분석

배양기간에 따른 아미노산 조성의 FDV-1년과 FDV-3년을 분석한 결과를 Table 15으로 나타내었다.

총 아미노산 함량은 FDV-1년에는 1398 ± 409.1 로 나타났고 FDV-3년에는 1841.1 ± 202.4 mg/L, 감식초 464.28과 비교해서 최고 4배의 차이를 보였으며 FDV-1년과 FDV-3년의 함량 검출 결과는 상당히 유의한 차이인 1.2배 향상되었음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Kim 등(2012)의 보고 보다 높은 함량을 보였다. 필수아미노산 총 함량은 FDV-1년에서 574.5mg/L, FDV-3년에는 747.8mg/L로 나타나 총 1.3배 향상되어 상당히 많은 함량이 나타났음을 알 수 있다. 배양기간에 따른 유기산 중 Threonine은 3.1배로 높은 향상을 보였으며 이러한 함량의 변화는 AAB들이 내놓은 물질들이나 사균들로 인하여 아미노산 함량이 높아졌을 것으로 보인다. 2배 이상의 유리아미노산함량을 보인 것은 Histidine 2.9배, Cystine 2.6 배, Tyrosine 2.21배, Isoleucine 2.06배 순서로 나타났다.

FDV-1년의 주요 amino acid 함량 순위는 alanine > iso-leucine > threonine > leucine > valine > arginine > glycine > serine > glutamic acid > Tyrosine > Histidine > aspartic acid > phenylalanine > Lysine > Methionine > cystine 순위로 많이 함유 되었으며, FDV-13년의 아미노산 구성 비율 및 함량에서는 iso-leucine > alanine > leucine > valine > Tyrosine > arginine > serine > glutamic acid > proline > glycine > Histidine > Lysine > aspartic acid > threonine > phenylalanine > cystine > Methionine 순서로 많이 함유 된 것으로 나타났다.

Table 15. Amino acid analysis of fermented dark vinegar(FDV)

	Contents (mg/L)		
	FDV-1	FDV-3	persimmon(*)
Glycine	83.9 ±18.7	80.5 ±18.8	6.2
Alanine	148.8 ±47.8	164.1 ±52.8	41.58
Serine	70.2 ±11.3	93.6 ±12.3	11.74
Proline	73.2 ±6.3	82.5 ±5.0	2.60
Valine	111.7 ±15.1	146.3 ±17.7	23.18
Threonine	138.1 ±177.2	43.2 ±3.9	35.09
Leucine	127.8 ±30.7	163.1 ±15.6	53.21
Isoleucine	146.9 ±71.1	303.8 ±32.0	56.77
Aspartic acid	32.2 ±3.8	46.1 ±4.6	4.09
Lysine	15.8 ±1.0	49.4 ±2.9	- -
Glutamic acid	68.4 ±6.2	92.4 ±7.1	41.99
Methionine	10.9 ±1.4	2.1 ±0.4	15.75
Histidine	33.1 ±2.5	69.2 ±4.6	- -
Phenylalanine	21.5 ±1.4	35.3 ±2.3	119.98
Arginine	105.3 ± 6.9	138.2 ±7.5	0.49
Tyrosine	64.4 ± 4.0	142.7 ±8.2	38.31
Cystine	1.8 ± 0.2	4.6 ±0.6	- -
γ-aminobutyric acid	144.0 ± 3.5	184.0 ± 6.1	- -
Total amino acid	1,398	1,841.1	464.28

*이경진. 2014. 자색고구마 발효식초의 제조 및 항산화 활성의 평가

3. 항생제 감수성

a. pH에 따른 항균 활성

FDV-3년의 유기산에 따른 항균활성을 6개의 그람음성 병원균을 대조군으로 하여 paper disc diffusion method를 활용하여 조사하였으며 Table 16으로 나타내었다. 각각 pH3, pH4, pH5, pH6, pH7에 따라 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*에 대해 조사한 결과에 따르면 pH3에서 높은 항균력을 보였으나 pH4, pH5에서는 낮은 항균력을 보였으며, pH6, pH7에서는 저해 활성이 전혀 나타나지 않았다.

Table 16. Screening for antimicrobial activity according to the acidity of 3-year fermented dark vinegar using paper disc assay

	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	12	10	-	-
<i>Escherichia coli</i>	13	11	10	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	13	12	11	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17	13	11	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	21	16	10	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	22	16	13	-	-

*Acidity was adjusted using 0.1 N NaOH. Units: mm, values represent diameter of the inhibition zone.

b. 유기산의 항균 활성

FDV와 Propionic acid의 항균활성능력을 paper disc diffusion method를 활용하여 조사하였다. 시험대상 병원성 균으로 3개의 그람양성균(*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Lactobacillus casei*)과 6개의 그람음성균(*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, 그리고 *Glucanacetobacter intermedius*), 1개의 진균(*Lodderomyces elongisporus*)과 양성대조균으로 항생제인 carbenicillin (50ug/ml) 과 tetracyclin (50ug/ml)을 활용하였다. 그 결과를 Table 17, Fig. 10으로 나타내었다.

FDV-3은 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* 와 *Lodderomyces elongisporus*의 성장을 억제시켜 carbenicillin (50ug/ml) 이나 tetracyclin (50ug/ml)보다 높은 억제력을 보였으며 *Yersinia enterocolitica*(B)에서 carbenicillin 보다 2배가 넘는 항균력을 보였으며, *Lactobacillus casei*에서는 carbenicillin에 보이지 않던 항균력이 17mm zone으로 나타났다. 사람을 포함한 여러 종의 동물들을 감염시키고 그리고 광범위하게 퍼져있는 *Salmonella typhimurium* 과 *Yersinia enterocolitica*의 성장을 강하게 억제시켰다. *Salmonella typhimurium*은 장염과 패혈증의 원인균이다. *Yersinia enterocolitica*는 설사, 장염 외에 폐혈증이나 관절염과도 관계가 있는 것으로 알려져 있다(Vilar *et al.*, 2015).

Propionic acid는 모든 균주(억제 저지환 15 - 28mm zone)에 대해 carbenicillin과 tetracyclin보다 강한 활성을 보였다. 다른 발효식초에서 검출되지 않고 FDV에만 검출된 유기산으로 식품산업 및 치유적 제재로 긍정적 기여를 할 것으로 기대한다.

Table 17. Screening for antimicrobial activity of fermented dark vinegar (FDV) and variety of other antibiotics and control substance by paper disc assay

	Kcl buffer pH3	carbenicillin (50ug/ml)	tetracyclin (50ug/ml)	FDV 1년	FDV 3년	Propionic acid
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	11	14	15	15	15
<i>Escherichia coli</i>	-	11	13	13	13	17
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	11	12	12	13	19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	11	14	12	17	17
<i>Salmonella typhimurium(A)</i>	-	12	30	21	21	22
<i>Yersinia enterocolitica(B)</i>	-	10	20	21	22	28
<i>Lactobacillus casei</i>	-	-	12	14	17	ND
<i>Gluconacetobacter intermedius</i>	-	11	16	14	15	ND
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	-	11	13	14	15	ND

*Loaded with each sample (50 ul) was placed on the agar plate which was seeded with each test microorganism. Tetracycline was used as a positive control.

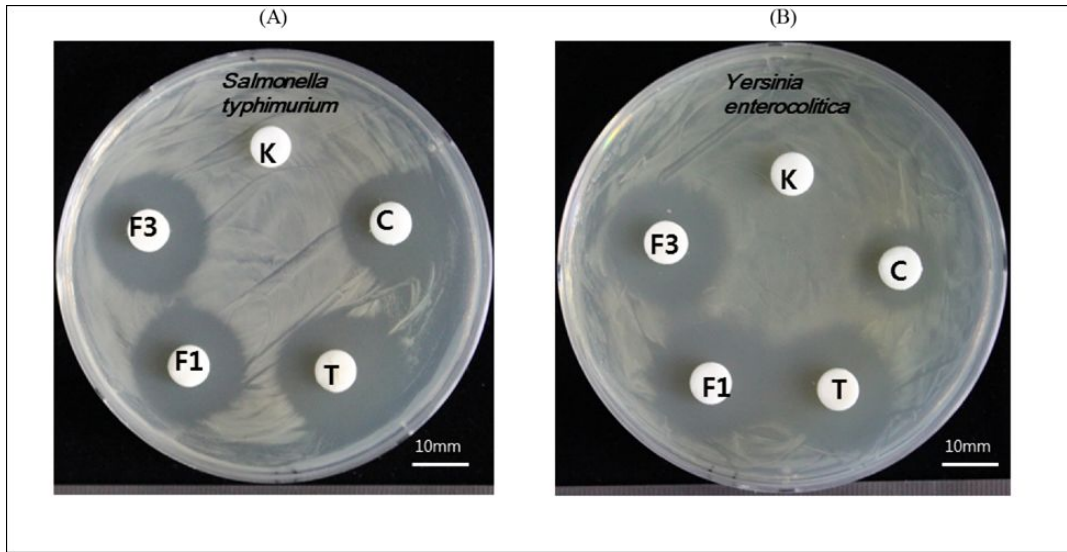


Fig. 10. Screening for antibacterial activity

* (A); *Salmonella typhimurium*, (B); *Yersinia enterocolitica*

* Loaded with each sample (50 ul) was placed on the agar plate which was seeded with each test microorganism. Tetracycline was used as a positive control. K; KCl Buffer pH 3, C; Carbenicillin (50ug/ml), T; Tetracycline (50 ug/ml), F1; FDV-1년, F3; FDV-3년

c. FDV-3와 Gagguida, Gagoshima 쿠로즈의 항균력 분석

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* 와 *Lodderomyces elongisporus*의 병원성균을 양성대조군으로 하여 FDV-3년과 Gagguida, Gagoshima 쿠로즈의 항균력을 조사하여 Fig. 11로 나타내었다.

FDV가 Gagguida, Gagoshima에 비해 높은 항균력을 보였으며 *Salmonella typhimurium*과 *Yersinia enterocolitica*. *Salmonella Typhimurium*의 성장을 강하게 억제시켰다. enteritis와 septicemia의 질병원인 *Yersinia enterocolitica*에도 높은 항균을 보였다. FDV-3년은 *Yersinia enterocolitica*에서 carbenicillin 보다 2배, Gagguida, Gagoshima 쿠로즈와 비교 결과 *Yersinia enterocolitica*와 *Listeria monocytogenes* 그리고 *Staphylococcus aureus*에서 높은 항균력을 보였다. FDV의 MTT 실험결과 세포독성은 나타나지 않아 치유적 제재로 긍정적 기여를 할 것으로 조망한다.

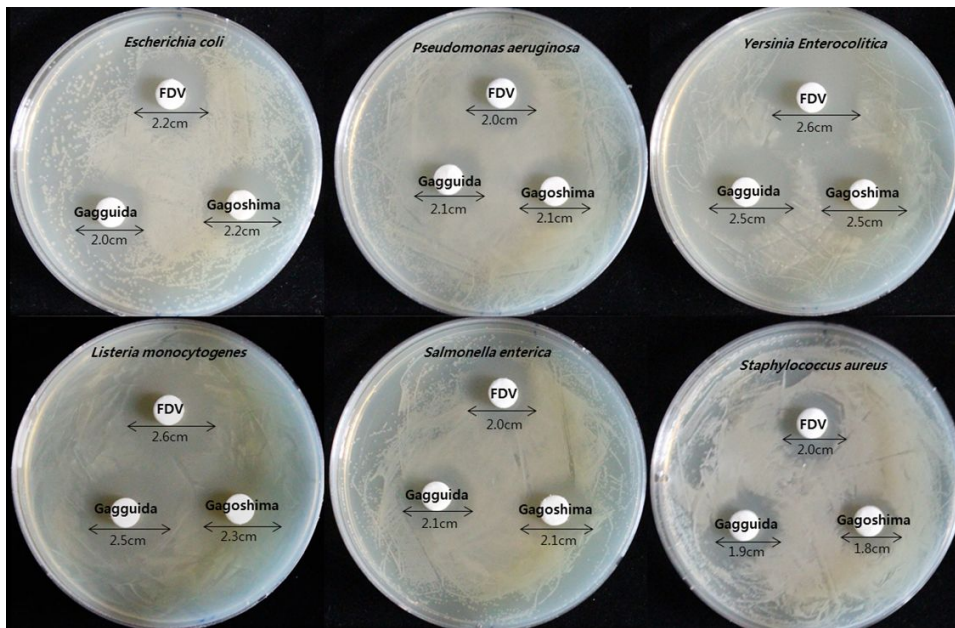


Fig. 11. creening for antibacterial activities of FDV-3, Gagguida, GagoshimaS by paper disc assay

Pseudomonas aeruginosa, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella typhimurium*. According to our results, microorganisms isolated from FDV-3 possessed strong antibacterial activity and didn't have cytotoxicity checked by 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl -2H-tetrazolium bromide (MTT) assay.

4. Free radical 소거 활성 측정을 통한 항산화능 분석

a. 항산화 활성도

식물에서 유래된 Antioxidant는 합성 Antioxidant보다 더 안전하느냐와 연관되어 폭넓은 연구는 지속되고 있다(Nishidai *et al.*, 2000). 항산화 활성도 즉 자유기 소거 활성능은 DPPH 활용해서 percentage 나타내었으며 Fig. 12 에서와 같이 조사되었다.

FDV-1년 과 FDV-3년의 항산화 활성도는 각각 82.07 ± 1.90 % 와 86.76 ± 1.14 % 로 밝혀졌으며 Ascorbic acid (1mg/ml)와 유사하게 나타났다. 이러한 결과는 FDV의 항균력과 함께 질병치유제로서의 긍정적 지표를 보여주고 있다.

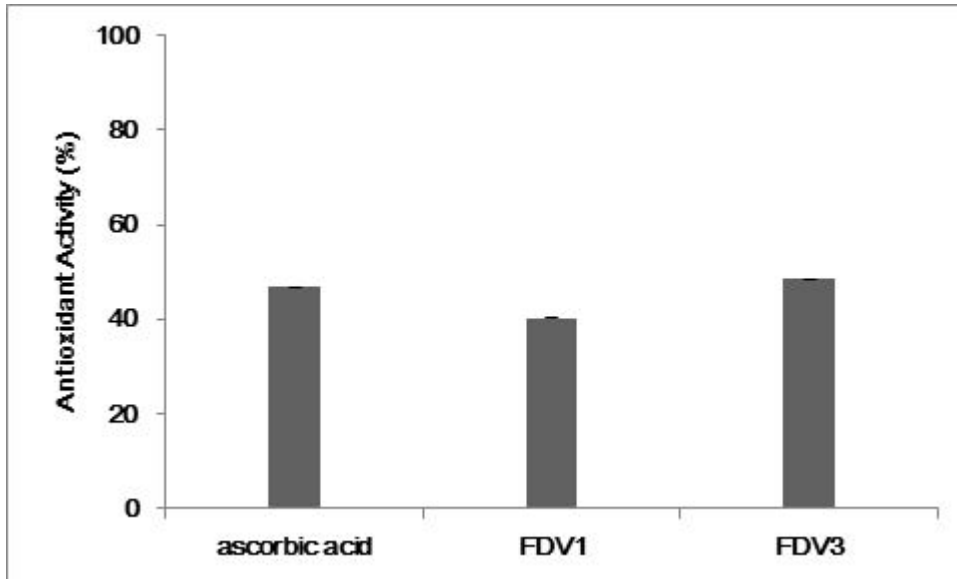


Fig. 12. Antioxidant activities of Fermented Dark Vinegar (FDV)

*The overall antioxidant activity of FDV was assessed by the DPPH method. Ascorbic acid (1 mg/ml, 5mM) as positive control was used. FDV1; 1년- Fermented Dark Vinegar, FDV3; 3년 - Fermented Dark Vinegar

b. FDV와 Gagguida, Gagoshima 쿠로즈의 항산화능 분석

항산화능이란 세포의 산화스트레스를 줄여 많은 질병의 원인을 제거해줌으로서 질병치유에 유용하다(Nishidai *et al.*, 2000). 세계적으로 유명한 일본의 Gagguida, Gagoshima 쿠로즈와 FDV-3년을 비교한 결과를 Fig. 13으로 나타내었다. 활성산소 소거능은 DPPH 방법을 활용하였고 percentage로 나타내었다. 항산화활성능이 Gagguida, Gagoshima 쿠로즈는 비슷하게 나왔으나 FDV-3년이 약간 높게 조사되었다.

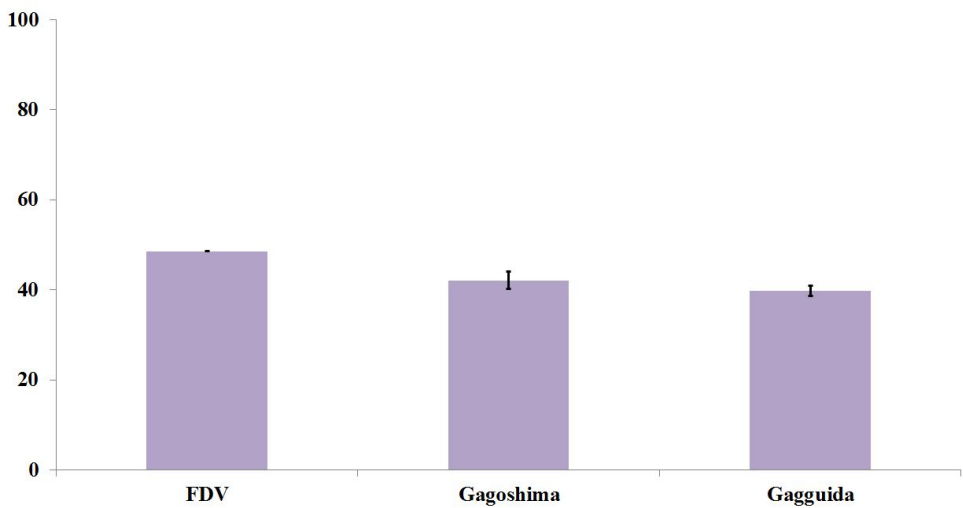


Fig. 13. Comparison antioxidant activities of fermented dark vinegar and Gagoshima dark vinegar, Gagguida dark vinegar

D. 고찰 및 결론

본 연구의 목적은 FDV의 분자생물학적 분석을 통한 항균 활성능과 항산화능을 조사하여 우리 전통 흑초인 FDV가 현대인에게 건강함 삶을 유지하는데 의료보완 대체제로서의 가능성 연구로 3,000 여년 동안 내려온 우리나라 현미식초를 전통적 방법 그대로 복원하여 시료를 제작하여 기존연구와 비교고찰을 통해 전통발효국으로서의 위상을 정립하고자 하였으며 흑초를 전 세계화시킨 일본의 명품 흑초인 Gagguida, Gagoshima 쿠로즈를 구입하여 비교분석 했다.

일본의 가고시마지방은 해안에 위치하고 있어 기후가 영하권으로 내려가지 않는 온실과 같은 효과를 내고 있어 풍부한 단백질과 지방을 함유한 현미발효로는 위험성이 따르지 않는 기후라고 볼 수 있는 반면에 우리 나라의 남쪽의 기후는 여름철은 32 ~ 35°C를 넘나드는 고온 다습하며 겨울철은 영하까지 내려가는 기후이다. 우리 조상들은 이러한 기후에 적합한 옹기로 배가 불뚝하고 평퍼짐한 옹기를 제작하여 사용 했으며, 제조의 위험성은 높으나 그 약리적 기능은 뛰어나리라 생각한다.

FDV의 일반성분 중 pH는 1 년 3.2로 나타났으며 3년에서는 4.7로 시판되는 주정 무첨가 현미식초 3종류에서 나타난 pH 2.44~2.83(김귀란 등., 2009)보다 높게 나타나 좋은 관능감을 갖고 있는 것으로 나타났다.

현미의 우수한 영양성을 기저로 한 FDV의 총 아미노산 함량은 FDV-1년에서는 1398 ± 409.1로 나타났고 FDV-3년에서는 1841.1 ± 202.4mg/L, 감식초 464.28과 비교해서 최고 4배의 차이가 있으며 FDV-1년과 FDV-3년의 함량 검출 결과는 상당히 유의한 차이인 1.2배 향상되었음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Kim et al., (2012)의 보고 보다 높은 함량을 보였다. 아미노산은 체내에서 근육의 원료물질로 에너지를 발생시키고 활력을 도우며, 신진대사의 촉매역할을 하고, 인체 조직의 재생과 회복을 돕와 몸의 항상성유지에 큰 역할을 한다. FDV의 유기산과 총 유리아미노산 함량은 숙성과정 동안에 가파르게 상승함으로써 기능성음료로서의 좋은 특성을 보여주고 있다.

FDV에서 분리된 *Acetic Acid Bacteria* (AAB)으로 AAB는 식품과 음료산업에서 중요한 균종으로 식초 산물에서 핵심 세균이다(Mateo et al., 2014). Cho (1984)의 현미식초의 주된 유기산은 Acetic acid, tartaric acid, Malic acid, succinic acid로

보고하였으며, 신(2002)은 Lactic acid가 검출되지 않고 citric acid가 검출되었으며 Acetic acid가 높은 함량으로 나타난 것으로 연구되었다. 본 연구의 결과 기존 연구에서 보이지 않는 Propionic acid가 다량 검출된 것은 긍정적 특이점으로 해석된다. Propionic acid는 유해 미생물의 증식을 억제하여 빵의 부패의 원인이 되는 곰팡이나 부패균(*Bacillus subtilis*)에 유효하고 빵의 발효에 필요한 효모에는 작용하지 않는다. 빵, 치즈의 제조와 양과자의 보존료로 쓰이는 유기산으로 FDV의 항균력 향상과 기능성음료화의 긍정적 결과이나 그 원인에 대해서는 더 많은 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

일본 쿠로즈의 mouse In vitro, In vivo 실험연구에서 대조군인 Acetic acid균과 쿠로즈균의 지방세포의 평균크기가 신장주변지방세포와 피하지방세포에서 현저하게 줄어들었다(Li-Tao *et al.*, 2010)는 연구와 비만이 과형성조직과 비대로 인하여 지방조직이 커진 비만을 줄이는 유의미한 결과를 가져왔다(Li-Tao *et al.*, 2010)는 결과들이 많이 나오는 명품식초로 본 연구에서 FDV-3년과 생리활성 및 분자유전학적 동정한 결과 FDV의 우수성을 입증할 수 있었다.

FDV-3은 *Salmonella typhimurium*과 *Yersinia enterocolitica*. *Salmonella Typhimurium*의 성장을 강하게 억제시켰다. enteritis와 septicemia의 질병원인 *Yersinia enterocolitica*에도 높은 항균을 보였다. FDV-3년은 *Yersinia enterocolitica*에서 carbenicillin 보다 2배, Gagguida, Gagoshima 쿠로즈와 비교 분석 결과 *Yersinia enterocolitica*와 *Listeria monocytogenes* 그리고 *Staphylococcus aureus*에서 높은 항균력을 보였다.

많은 질병의 원인은 활성산소의 과다 축적으로 보고 되어지고 있다. 세포의 산화 스트레스를 줄여 많은 질병의 원인을 제거해줌으로서 질병치유에 유용하게 하는 능력이 항산화 활성도로 자유기 소거 활성능은 1년 과 3년 숙성된 FDV에서 각각 $82.07 \pm 1.90 \%$ 와 $86.76 \pm 1.14 \%$ 로 밝혀졌으며 양성 대조군인 Ascorbic acid (1mg/ml)와 유사하게 나타났으며 Gagguida, Gagoshima 쿠로즈와 비교한 결과 FDV-3이 높은 항산화력을 보이고 있어 우리나라의 전통기법으로 만들어진 FDV-3의 우수성을 입증할 수 있었다. 후속된 연구들은 흑초의 제조 및 성분 분석과 더불어 Mouse In vitro, In vivo 실험이 계속되어 전통 FDV의 명품화 및 세계화에 기여했으면 한다.

FDV에서 분리된 *Acetic Acid Bacteria* 으로는 *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter peroxydans* 과 *Acetobacter senegalensis* 인 3개의 균주로 나타났다.

AAB는 식품과 음료산업에서 중요한 균종으로, 에탄올을 초산으로 산화시키는 것이 주된 임무로 식초 산물에서 핵심 세균이다(Mateo *et al.*, 2012).

FDV-3년의 항균력은 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* and *Lodderomyces elongisporus*의 성장을 억제시키는 결과를 보였다. 특히 높은 항균력을 지닌 시제품 항균제인 carbenicillin (50ug/ml)이나 tetracyclin (50ug/ml)보다 높은 억제력을 보이는 결과로 나타났다. 특히 사람을 포함한 여러 종의 동물들을 감염시키고 장염과 패혈증의 주된 원인균으로 세계에 광범위하게 퍼져있는 *Salmonella typhimurium* (Kim *et al.*, 2012)과 *Yersinia enterocolitica*. *Salmonella Typhimurium*의 성장을 강하게 억제시켰다. enteritis와 septicemia, 그리고 여러 질병의 원인균인 *Yersinia enterocolitica*에서 가장 높은 항균력을 보였으며, MTT 실험결과 세포독성도 나타나지 않아 probiotics로서의 가능성뿐만 아니라 자연발효식품에 응용할 때 유해균 저해 효과도 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

FDV-3년의 항산화 활성도는 대표적인 항산화능 양성 대조군인 ascorbic acid와 비교할 만큼 유사한 항산화활성을 보여주었으며 일본의 Gagguida, Gagoshima 쿠로즈와 비교했을 때 FDV-3 > Gagoshima > Gagguida으로 나타났으며 FDV-3의 높은 항산화력을 볼 수 있었다.

FDV는 시판 항생제보다 높은 항균력, 생리활성물질, 항산화력을 포함하고 있어서 FDV가 예방 및 치료보조제로서의 가능성이 있음을 증명했다고 볼 수 있다. FDV의 보완대체의학적 접근을 지닌 기능성 음식과 의약품공업의 적용에 대한 많은 연구가 과제로 남아있지만 FDV는 therapeutic agent의 잠재적인 후보가 될 수 있다 것을 확인했다.

VI. 결론

본 연구는 식품 소재로서 영양 및 기능성 물질이 뛰어난 현미를 발효현미슬러리와 FDV로 제조하여 생리활성 및 유전생물학적 동정을 하였다. 현미의 뛰어난 영양식품임에도 불구하고 식이감과 소화흡수율이 낮아(Caceres 2014) 쌀 소비량이 계속 낮아지고 서구음식에 밀려나고 있는 실정이다. 본 연구는 현미의 단점을 극복하고자 전통발효기법으로 발효한 현미발효가 서구의 요구르트를 극복할 수 있는 우수한 프로바이오틱스임을 입증하고자 했다.

현미를 발효시켜 FSUR과 FDA를 제조하였으며, 발효단계별 분석을 하였고 세계 시장을 형성하고 있는 일본의 Gagoshima, Gagguida 쿠로즈를 비교 분석해 봄으로써 전통 발효방법과 전통 옹기와외의 상관성 속에서 우리전통발효의 우수성을 입증하였다.

막걸리가 우수한 프로바이오틱스로서의 가능성으로 연구되어지기도 하나 알코올이 있는 술이기 때문에 건강음료로서는 제한적이다. 본 연구는 이 점을 극복할 수 있는 발효현미슬러리를 제조하여 생리활성 및 분자유전학적 동정을 통하여 우수한 기능성 음료임을 확인하였다.

2장의 FSUR의 생리활성 및 분자유전학적 동정 결과 Lactic acid $2.069 \pm 0.007\text{mg}/\ell$, Acetic acid $4.050 \pm 0.043\text{mg}/\ell$, Propionic acid $0.405 \pm 0.025\text{mg}/\ell$ 의 3종의 유기산이 분석되었다. 전주모주의 주요 유기산은 acetic acid, lactic acid, malic acid, citric acid로 식품의 부패방지와 유익균을 보호하는 특성을 지닌 Propionic acid가 다량 검출된 것은 FSUR의 긍정적 결과이다. *Lactobacillus* 속 균주들은 단당류의 분해를 촉진하기 위해 필수 아미노산인 valine, leucine, isoleucine, methionine, threonine, lysine, phenylalanine, tryptophan 등이 다양하게 분포되어 *Lactobacillus* 속 균주들이 생존한다는 이의(1988) 연구결과에 부합하는 필수아미노산이 풍부함을 알 수 있었으며 전주 모주 22종의 유리아미노산 분석결과 21종의 유리아미노산이 검출되었으나 그 함량이 미미하게 검출(lee et al., 2011)된 것과 비교하면 다량의 유리아미노산이 검출되어 FSUR의 프로바이오틱스로서의 긍정적 결과로 볼 수 있었다. 전주모주가 전통방법으로 제조되지 않고 시판

막걸리로 모주를 만들었으며 막걸리 재료가 백미와 밀가루를 사용하여 3일에서 4일로 단기간 발효된 막걸리로 만들기(Her., 2004) 때문인 것으로 사료된다. FSUR의 발효 단계별로 나타나는 균주 동정결과 *Gluconacetobacter intermedius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter peroxydans*로 4가지의 균주를 동정했다. *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*는 *Lactobacillus*속의 두 균주로 사람의 입 속이나 장에서 발견되는 프로바이오틱스의 대표균주로 FSUR의 프로바이오틱스로의 가능성과 함께 3,000여년 동안 검증되어온 전통고유발효방법의 우수성을 입증했다. FSUR에서 분리된 4개주의 항균력은 대조균인 Carbenicillin보다 *Staphylococcus aureus* (KCTC 1916)에서는 22mm로 평균치보다 높았으며 *Escherichia coli* (KCTC 1682)와 *Yersinia enterocolitica* (KCCM 41657)에서는 대조균인 Carbenicillin에서 보이지 않던 항균력이 높게 나타났으며, *Listeria monocytogenes* (KCTC 3710) 27mm와 *Salmonella typhimurium* (KCTC 1926) 26mm로 대조균인 Carbenicillin보다 괄목할만한 높은 항균활성을 보였다. *Pseudomonas aeruginosa* (KACC 10186)에서는 대조균인 Carbenicillin보다는 낮은 항균력을 보였으나 6개의 균주 모두에 골고루 항균능력을 보였다.

3장 FDV-1년과 FDV-3년의 생리활성 및 균주의 스크리닝 및 동정을 수행했다. FDV의 유기산은 lactic acid, acetic acid, Propionic acid 3종이 검출되었으며 이는 앞선 연구에서 나타나지 않는 Propionic acid의 검출은 FDV에만 검출된 유기산으로 보완대체의학적으로 접근한 기능성 식품산업에 긍정적 기여를 할 것으로 기대된다.

FDA에서 함유하고 있는 물질 중 FDV의 탁월한 기능성을 가능하게 하는 것은 유리아미노산 함량 및 필수아미노산 함량이다. 아미노산 함량은 FDV-1년에는 1398 ± 409.1 로 나타났고 FDV-3년에는 $1841.1 \pm 202.4\text{mg/L}$ 로 상당히 유의미한 차이인 1.2배 향상되었음을 알 수 있었다. 필수아미노산 총 함량은 1년에서 574.5mg/L , 3년에는 747.8mg/L 로 나타나 총 1.3배 향상되어 많은 함량이 나타났음을 알 수 있다. 이는 배양기간에 따라 유기산들이 변화되었으며 유기산에서 내놓은 물질들이나 사균들로 인하여 아미노산 함량이 높아졌을 것으로 보인다. 높은 아미노산 함량은 신체의 항상성 유지와 성장 및 근육형성에 기본 영양소로서 중요하다. 특히 노인들에게 가장 좋은 식품군으로 각광받고 있다.

최근 급증하고 있는 알츠하이머로 인하여 재조명받고 있는 비단백물질인 GABA 함량은 FDA 1년 14.4 ± 3.5 , FDA 3년은 18.4 ± 6.1 의 순서로 나타났다. FDA-1년

14.4 ± 3.5은 현미 2.5mg/100g의 5.76배, FDA-3년에는 18.4 ± 6.1로 현미 2.5mg/100g의 7.36배로 나타나 현미와 전통항아리발효의 만남이 괄목할 만한 전통 건강치유제로서의 가능성을 입증했다.

FDV의 항균력을 페이퍼디스크를 활용해서 agar diffusion method using the paper disc으로 실험했던 결과 FDV-3은 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*와 *Lodderomyces elongisporus*의 성장을 carbenicillin (50ug/ml)이나 tetracyclin (50ug/ml)보다 높은 억제력을 보이고 *Yersinia enterocolitica*(B)에서 carbenicillin 보다 2배가 넘는 항균력을 보였으며, *Lactobacillus casei*에서는 17mm zone을 보였다. 사람을 포함한 여러 종의 동물들을 감염시키는 유해균으로 전 세계적으로 광범위하게 퍼져있는 *Salmonella typhimurium* 과 *Yersinia enterocolitica*의 성장을 강하게 억제시켰다. *Salmonella typhimurium*은 장염과 패혈증의 원인균이다. *Yersinia enterocolitica*는 설사, 장염 외에 폐혈증이나 관절염과도 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 위와 같은 방법으로 FDV-3, Gagguida, Gagoshima의 항균력을 비교분석한 결과 *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*에서 Gagguida, Gagoshima크로즈보다 0.1cm ~ 0.3cm 높은 항균력을 확인했다.

FDV의 항산화능은 양성 대조군을 ascorbic acid로 선택하여 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl 방법에 의하여 실험한 결과 FDV-3 > Gagoshima > Gagguida순으로 FDV가 가장 높은 활성능력을 갖는다는 것을 확인했다.

결론으로 FSUR와 FDV는 치료의학적으로 높은 생리활성물질과 높은 항산화능력 그리고 시판 항생제보다 월등하게 높은 항균력을 포함하고 있어서 예방 및 치료보조제로서의 가능성이 있음을 증명했다고 볼 수 있다. 그러므로 FSUR과 FDV는 치료제로서 잠재적인 후보로 선정하고자 한다.

참 고 문 헌

김귀란, 윤성란, 이지현. 2009. 시판 현미식초의 주정 참가 유무의 발효방식에 따른 이화학적 품질특성비교. 한국영양학회지. 6

김동훈. 1983. 식품화학. 탐구당.

박상태. 2004. Cellulose 고생산성 *Acetobacter xylinum* 균주의 개발, 연세대학교 석사학위논문

백운화. 2012. 항생제관련 설사증에 대한 Probiotics효과, 대전대학교 석사학위 논문

신진숙. 2002. 생전분 분해효소를 이용한 현미식초 제조방법에 관한 연구. 계명대학교 석사학위 논문

송속자. 2013. 자연치유 식이요법

정지혜. 2013. 시판 식초의 품질특성에 관한 연구. 서울여자대학교, 석사학위 논문

정지혜. 2011. *Bacillus polyfermenticus* CJ6의 프로바이오틱 특성. 조선대학교, 석사학위논문

이경진. 2014. 자색고구마 발효식초의 제조 및 항산화 활성의 평가. 대구대학교, 석사학위 논문

이재연. 2005. 장내 병원성 세균을 억제하는 프로바이오틱 유산균의 탐색. 계명대학교, 석사학위 논문

이진희. 2013. 장류 발효 식품에서 분리한 사상성 진균의 안전성 평가, 국민대학교, 석사학위논문

이호진. 2013. 프로바이오틱 *Lactobacillus acidophilus* JB9489의 균체생산성 향상을 위한 생산배지와 발효조건외 확립. 전북대학교, 석사학위논문

이호지. 1993. 쌀과 우리의 식생활. 월간식생활. 27

이현우. 1995. 쌀관련 식품의 생리활성 기능과 산업화의 과제. 인제식품과학포럼논문집. 43-84

이혜수. 1998. 제9장 대량무기질 기초영양학. 고문사. 173-185

윤정란. 2014. 발효방법을 달리한 비타민나무 잎과 열매 참가 식초의 품질특성. 명지대학교 박사학위 논문

Amalfi M, Yombiyeni P, Decock C. 2010. Fomitiporia in sub-Saharan Africa: morphology and multigene phylogenetic analysis support three new species from the Guineo-Congolian rainforest. *Mycologia*, 102(6): 1303-1317

Amrane A, Prigent Y. 1994. Lactic acid production from lactose in batch culture: analysis of the data with the help of a mathematical model; relevance for nitrogen source and preculture assessment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 644-649

Banat IM. *et al.* 1991. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 7: 80-88

Biswas B, Rogers K, McLaughlin F, Daniels D, Yadav A. 2013. Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *International journal of microbiology.* 2013: 746165

Bohin JP, Rigomier D, Schaeffer P. 1976. Ethanol sensitivity of sporulation in *Bacillus subtilis*: a new tool for the analysis of the sporulation process. *J. Bacteriol.* 127: 934-940

Caceres PJ, Martinez-Villaluenga C, Amigo L, Frias J. 2014. Maximising the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. *Food chemistry.* 152: 407-414

Caceres PJ, Martinez VC, Amigo L, Frias J. 2014. Maximising the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. *Food Chem.* 152: 407-414

Castillo S, Rosales M, Pohlenz C, Gatlin DM. 2014. Effects of organic acids on

growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*. 433: 6-12

Cho JS. 1984. Species and properties of vinegar. *Korean J. Food Sci. Technol.* 17: 38-37

De Vuyst L, Callewaert R, Crabbe K. 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, 142: 817-827

Diana M, Rafecas M, Quílez J. 2014. Free amino acids, acrylamide and biogenic amines in gamma-aminobutyric acid enriched sourdough and commercial breads. *J. Cereal Sci.* 60: 639-644

Lee J, Yun HS, Kim SH, Jeon W.M. 2010. Prevention of inflammatory bowel disease using fermented milk including probiotics. *Korean J. Dairy Sci. Technol.* 28: 25-30

Lee BY, Kim SJ, Doo HS, Kwon TH, Kim JW. 2011. Physicochemical and Sensory Characteristics of Moju Sold at Restaurants Located in Jeonju. *Korean J Food Preserv.* 18(6): 907-915

Entian KD, de Vos WM. 1998. Genetics of subtilin and nisin biosynthesis: biosynthesis of lantibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 69: 109-117

FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Joint

Fukuyama N, Jujo S, Ito I, Shizuma T, Myojin K, Ishiwata K, Nagano M, Nakazawa H, Mori H. 2007. Kurozu moromimatsu inhibits tumor growth of Lovo cells in a mouse model in vivo. *Nutrition* 23(1): 81-86

Gilliland SE. 1979. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: Candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *J. Food Protect*, 42: 164-167

Goffman FD, Bergman CJ. 2004. Rice kernel phenolic content and its relationship with antiradical efficiency. *J. Sci. Food Agr.* 84: 1235-1240

Havenaar R, Huis JHJ. 1992. Probiotics: a general view. pp. 151-170

Her SM. 2004. Mysterious liquor, to discover unknown traditional liquor. *Woongjindotcom, Korea.* 176-177

Hoa TT, Le H, Duc R, Isticato L, Baccigalupi E, Ricca PH, Van Cutting SM. 2001. Fate and disscrnation of Bacillus subtilis spores in a murine model, Appl. Environ. *Microbiol.* 67: 3819-3823

Hong SK, Chaturvedi R, Piazuolo MB, *et al.* 2010. Increased expression and cellular ocalization of spermine oxidase in ulcerative colitis and relationship to disease activity. *Inflamm Bowel Dis.* 16: 1557-1566

Huis In't Veld JHJ, Marteau P. 1997. Rhe role of LAB in relation to human gealth: Progress over the last three tears. *Acets du Colleague LACTIC* 97

Huis In't Veld JHJ, Havenaar R. 1991. Probiotics and health in man and animal. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 51: 562-567

Irwansyah IY, Li Q, Shi W, Qi D, Leow WR, Tang MB, Li X, Chen S. 2015. Gram-positive antimicrobial activity of amino Acid-based hydrogels. *Advanced materials.* 27: 648-654

Jeong YK, Shin YJ, Jung MJ, Joo WH, Choi JS. 2002. Structural analysis of the antifungal antibiotic from Bacillus sp. *YJ-63. Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 21-25

Jeong YJ, Seo JH, Jung SH, Shin SR, Kim KS. 1998. The Quality Comparison of Uncleaned Rice Vinegar By Two Stages Fermentation with Commercial Uncleaned Rice Vinegar. *Korean J. Postharvest Sci. Technol,* 5, 374-379

Jia S, Kang YP, Park JH, Lee J, Kwon SW. 2011. Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1218: 9174-9182

Jo JH. 1999. The recovery of our traditional liquor. Seohaemunjib, Seoul, Korea, 168

Kekkonen R. 2008. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria in healthy adults. Ph.D. thesis, Academic Dissertation, Institute of Bioedicine, Pharmacology University of Gelsinki, Finland

Kim SP, Kang MY, Nam SH, Friedman M. 2012. Dietary rice bran component gamma-oryzanol inhibits tumor growth in tumor-bearing mice. *Molecul. Nutr. Food Res.* 56: 935-944

Kim SH, Cho HK, Shin HS. 2012. Physicochemical properties and antioxidant activities of commercial vinegar drinks in Korea. *Food Sci. Biotechnol.* 21: 1729-1734

Kitagaki H, Mitsuaki Tsugawa. 1999. 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) scavenging ability of sake during storage. *Journal of bioscience and bioengineering.* 87(3): 328-332

Koleva II, van Beek TA, Linssen JP, de Groot A, Evstatieva LN. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical analysis, PCA.* 13(1): 8-17

Koransky JR, Sllen SD, Jr. Dowell R. 1978. Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. *Appl, Environ. Microbiol.* 35: 762-765

Krogsgaard-Larsen, P. 1934. GABA Receptors, In Receptor Pharmacology and Function, M. Williams, R. A. Glennon and P.M.W.M. Timmermans Eds. *Marcel Dekker, Inc.,* New York

Kusima J, Mentula S, Jarvinern H, Kahri A, Saxelin M, Jarkkila M. 2003. Effect of Lactobacillus rhamnosus GG on ildal pouch inflammation and icrobial flora. *Alinent. Pharmacol, Ther.* 17: 509-515

Kwon YH, Jo SJ, Kim HR, Lee HJ, Kim JH, Ahn BH. 2009. Physicochemical Properties and Volatile Compounds in Jeonju Moju *Korea-Sool R&D Center, Korea Food Research Institute.* 5, 503-508

Lee SY, Shin YC, Lee SH, Park SS, Kim HS, Byun SM. 1984. Saccharification of Uncooked Starch. *Korean J. Food Sci, Technol.* 16, 463-471

Lee SJ, Kim YW, Jung SY, Park JH. 2011. Composition of organic acids and physiological functionality of commercial Makgeolli. *Korean J Food sci Technol.* 43: 206-212

Lee BY, Kim SJ, Doo HS, Kwon TH, Kim JW. 2011. Physicochemical and Sensory Characteristics of Moju Sold at Restaurants Located in Jeonju *Jeonju Biomaterials Institute, Jeonju Korea.* 561-360

Lilly DM, Stillwell RH. 1965. Probiotics; Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147: 747-748

Li-Tao Tong¹, Yoshinori Katakura² Sayaka Kawamura¹, Sanae Baba¹, Yasutake Tanaka¹, Miyako Udono², Yoshie Kondo³, Kumi Nakamura³, Katsumi Imaizumi¹, Masao Sato¹. 2010. Effects of Kurozu concentrated liquid on adipocyte size in rats, *Lipids in Health and Disease*

Li, Y, Raftis E, Canchaya C, Fitzgerald GF, van Sinderen D, O'Toole PW. 2006. Polyphasic analysis indicates that *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* and *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* do not merit separate subspecies status. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2397-2403

Mateo E, Torija MJ, Mas A, Bartowsky EJ. 2014. Acetic acid bacteria isolated from grapes of South Australian vineyards. *International journal of food microbiology* 178: 98-106

Mehni AM, Saghar Ketabchi, Gholam Hosein Shahidi Bonjar. 2014. Antibacterial activity and polyphenolic content of *Citrullus colocynthis*. *International Journal of Biosciences (IJB).* 190-196

Monks JLF, Vanier NL, Casaril J, Berto RM, de Oliveira M, Gomes CB. et al. 2013. Effects of milling on proximate composition, folic acid, fatty acids and technological properties of rice. *J. Food Compos. Anal.* 30: 73-79

Moon SY, Chung HC, Yoon HN. 1997. Comparative Analysis of Commercial Vinegars in Physicochemical Properties, Minor Components and Organoleptic. Tastes, *Keoran J. Food Sci. Technol.* 29, 663-670

Nakancn S. 1988. Food useful for preventing alcohol intoxication containing persimmon-vinegar and optimum fruits, with blood alcohol concentration reducing action. *Japan patent.* 63: 562-566

Nakangwa, K. 1996. Onota, A. Accumulation of (GABA) in the Rice Germ. *Food Processing.* 31, 43-46

Naoto Fukuyama MD, Ph. D, Shio Jujoa. 2007. Kurozu moromimatsu inhibits tumor growth of Lovo cells in a mouse model in vivo. *Nutrition.* 23

Nishidai S. *et al.* 2000. Kurosu, a traditional vinegar produced from unpolished rice, suppresses lipid peroxidation in vitro and in mouse skin. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 64(9): 1909-1914

Parente E, Hill C. 1992. A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 290-298

Parker RB, 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Gealth* 29: 4-8

Pfaller A, Vu Q, Lancaster M, Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Grant C, McGinnis MR, Pasarell L, Rinaldi MG, Steele-Moore L. 1994. Multisite reproducibility of colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* 32: 180

Pristovsek P, Kidric J. 1999. Solution structure of polymyxins B and E and effect of binding to lipopolysaccharide: an NMR and molecular modeling study. *J. Med. Chem.* 42: 4604-4613

Rogosa M, Franklin JG, Perry KD. 1961. Correlation of the vitamin requirements with cultural and biochemical characters of *Lactobacillus* subsp. *J. Gen. Microbiol.* 25: 473-482

Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK. 1999. Probiotics: how should they be defined. *Trends in Food Sci. Technol.* 10: 107-110

Sanders ME, Morelli L, Tompkins TA. 2003. Sporeformers as human probiotics: Bacillus, Sporolactobacillus, and Brevibacillus, Comprehensive Rev. *Food Sci.* 60

Sharma M, An V, Madhavi S. 2015. Study on Antibacterial Activity of Agaricus bisporus (Lang). *Imbach. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 553-558

Seki T, Morimura S, Tabata S, Tang Y, Shigematsu T, Kida K. 2008. Antioxidant activity of vinegar produced from distilled residues of the Japanese liquor shochu. *J. Agric. Food Chem.* 56: 3785-3790

Seo JH, Jeong YJ, Kim JN, Woo CJ, Yoon SR, Kim TH. 2001. Quality comparison of Potato Vinegar Produced by Various Acetobacter Bacteria. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 8: 60-65

Servin AL. 2004. Antagonistic activities of Lactobacilli and Bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 405-440

Sheih YH, Chiang bL, Wang LH, Liao C.K, Gill GS. 2001. Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium Lactobacillus rhammosus HN001. *J. Am Co1. Nutr.* 20: 149~156

Shimoji Y, Kohno H, Nanda K, Nishikawa Y, Ohigashi H, Uenakai K, Tanaka T. 2004. Extract of Kurosu, a vinegar from unpolished rice, inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Nutrition and cancer.* 49(2): 170-173

Shizuma T, Ishiwata K, Nagano M, Mori H, Fukuyama N. 2011. Protective effects of Kurozu and Kurozu Moromimatsu on dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Digestive diseases and sciences* 56(5): 1387-1392

Shizuma T, Nagano M, Fujii A, Mori H, Fukuyama N. 2011. Therapeutic effects of four molecular-weight fractions of Kurozu against dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Turk J. Gastroenterol.* 22: 376-381

Shimoji Y, Tamura Y, Nakamura Y, Nanda K, Nishidai S, Nishikawa Y, *et al.* 2002. Isolation and identification of DPPH radical scavenging compounds in Kurosu (Japanese unpolished rice vinegar). *J. Agric. Food Chem.* 50: 6501-6503

Siigur U, Tamm E, Torm S, Lutsar I, Salminen S, Midtvedt T. 1996. Effect of bacterial infection and administration of a probiotic on faecal short-chain fatty acids. *Microb. Ecol. Health Dis.* 9: 271-277

Suzuki Taketo. 2011. about dffective of probiotechnology. *pharmacy*, 62(3): 415~422

Tong LT, Katakura Y, Kawamura S, Baba S, Tanaka Y, Uono M, Kondo Y, Nakamura K, Imaizumi K, Sato M. 2010. Effects of Kurozu concentrated liquid on adipocyte size in rats. *Lipids in health and disease.* 9: 134

van der Lender T. r, van de Kamp M, Verg M, Sjollem K. Bovenberg RA, Veenhuis M, Korings WN, Driessen AJ. 2002. delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, that mediates the first committed step in penicillin biosynthesis, is a cytosolic enzyme. *Fungal Ginet, Giol.* 37: 83-87

Wang H, Gao XD, Zhou GC, Cai L, Yao WB. 2008. In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from Choerospondias axillaris fruit. *Food chemistry.* 106: 888-895

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703

Woo KS, Ko JY, Song SB, Lee JS, Kang JR, Nam MH, Jeong HH, Seo MC. 2010. Physicochemical Characteristics of Vinegars Fermented from Cereal Crops with Incalgyun. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 39: 1171-1178

Woo KS, Ko JY, Song SB, Lee JS, Oh BG, Kang JR. et al. 2010. Physicochemical characteristics of Korean traditional wines prepared by addition of Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) using different nuruks. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 548-553

Yoon HN. 2010. Chemical characterization of commercial vinegars. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 1440-1446

Yoshitaka H, Shinji M, Yoshihiro Y, Yasunobu Y, Tomomi T. 2006. Daily intake of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 supplements acquired immunity in healthy adults. *J. Nutr.* 136: 3069-3073

Zhang G, Malik VS, Pan A, Kumar S, Holmes MD, Spiegelman D. et al. 2010. Substituting brown rice for white rice to lower diabetes risk: a focus-group study in Chinese adults. *J. Am. Diet. Assoc.* 110: 1216-1221

감사의 글

오랫동안 전통문화의 중요한 영역으로 공부해왔던 발효식품에 대하여 학문적 논거를 찾고 싶은 욕구가 일어났다. 2004년 8월 전라남도 담양군 창평면에 멘토르라는 발효음식점의 매니저역할을 맡아 음식으로 손님들의 건강을 보조해주고자 노력하였다. 그러던 중 조선대학교 전호중 전 총장님의 발효 음식에 대한 무한사랑과 격려, 그리고 법과대학 서순복교수님의 안내로 2011년 9월 보완대체의학과 박사과정에 입학하였다. 무엇보다도 초보의 길에 서투른 걸음걸이를 같이 하면서 바쁜 제 일상을 끊임없는 배려와 사랑으로 논문을 끝까지 지도해주신 정현숙 교수님께 이 자리를 빌려 감사드리고 싶어 바쁜 서툼과 바쁜 일정 속에서도 감사의 글을 쓰기로 작정하였는지 모른다. 정말 감사합니다. 오랫동안 중학교 교단에서 어린 학생들을 가르치면서 조선대학교에서 철학을 강의하던 내가 전혀 다른 길인 보완대체의학과에 입학할 수 있도록 허락해주신 현 조선대학교 총장님이신 서재홍 총장님, 그리고 보완대체의학과 학과장님이신 이미지 교수님, 소금영교수님, 문경래 교수님 그리고 흥란교수님의 독려와 로드맵으로 어려운 길을 걸어 올수 있음에 감사드리고 싶습니다.

1인 5역을 맡아하면서도 건강을 잃지 않고 지속적인 열정으로 오늘까지 올 수 있었던 것은 건강한 먹거리와 더불어 아주 가까이서 지켜봐주신 남편과 그 곁을 소홀하게 지켰지만 묵묵히 제자리를 지키면서 서장해온 아들과 딸 김재웅, 김희우에게 미안함과 더불어 감사함을 전합니다.

제게 지금까지도 가장 큰 슬픔을 주지 않고 살아계셔서 사랑으로 무한하게 힘을 주신 친정어머니 박연례여사님께도 눈물나는 감사를 드리고 싶다. 그동안 돈을 들고 해외 여행에서 가슴 뛰는 여정을 보내신 분들이 계신다면 나는 산과 들로 발효실로 생소하기만한 생화학, 유기화학, 각종 의학서들로 논문속으로 실험실로 강의실로 뛰면서 감탄과 경탄을 쏟아내는 가슴뛰는 여정을 5년 동안 걸어왔음에 감사드린다.

교단에 서면서 여러 역할로 인하여 학생들과 동료교사들 그리고 주변의 지인들에게 소홀했다면 이 자리를 빌려 감사함과 미안함을 전하면서 더 많은 노력과 사랑으로 갚으면서 살아가겠다고 약속드립니다. 감사합니다.

2016년 정초 싹싹하고 싱싱한 날 광경자 드림