KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 43, No. 2, pp. 206~212 (2011)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

시중 유통 막걸리의 유기산 조성과 생리활성

이상진[1,2] · 김지혜[2] · 정용우[2] · 박선영[1] · 신우창[1] · 박천석[3] · 홍성렬[2] · 김계원[4*]
[1](주)국순당부설연구소, [2]성균관대학교 유전공학과, [3]경희대학교 식품공학과, [4]한경대학교 산학협력단

Composition of Organic Acids and Physiological Functionality of Commercial *Makgeolli*

Sang-Jin Lee[1,2], Ji-Hye Kim[2], Yong-Woo Jung[2], Sunyoung Park[1], Woo-Chang Shin[1], Cheon-Seok Park[3], Sungyoul Hong[2], and Gye-Won Kim[4*]
[1]*Research Laboratories, Kooksoondang Brewery Co., Ltd.*
[2]*Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University*
[3]*Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University*
[4]*Academic Industry Cooperation, Hankyong National University*

Abstract *Makgeolli* is Korean traditional alcoholic beverage that has historically been brewed. In this study, we analyzed the profile of organic acids in *makgeolli* and also evaluated its physiological characteristics. *Makgeolli* contained excess lactic acid, which is produced by lactic acid bacteria (LAB). Anti-obesity effects of *makgeolli* were investigated in 3T3-L1 preadipocytes. Compared to the negative control, *makgeolli* inhibited the differentiation of preadipocyte as quantified by Oil red O dye. In particular, 100 μg/mL *makgeolli* reduced 40 to 70% of differentiation. To evaluate the anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of *makgeolli*, we performed chorioallantoic membrane assay and measured nitric oxide production from lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells. Most *makgeolli* interrupted the formation of neo-vasculature and significantly inhibited NO production in a dose-dependent manner. Taken together, these findings suggest that commercial *makgeolli* has inhibitory activities against adipogenesis, neo-vascularization, and inflammation, and also they are influenced by second metabolites from *nuruk* microflora containing fungi and LAB.

Keywords: adipogenesis, anti-angiogenesis, anti-inflammation, *makgeolli*, organic acid

서 론

막걸리는 우리나라 고유의 술로서 천여 년 이상 양조되어 왔으며 탁주 또는 농주(農酒)라고도 하며(1), 주세법에는 전분질 원료와 국을 주원료로 하여 발효시킨 술덧을 혼탁하게 제성한 것을 말한다고 정의되어 있다(2). 막걸리는 다른 주류에 비해, 알코올 도수가 상대적으로 낮고 곡류를 이용한 발효식품으로서 위에 부담을 주지 않을 뿐 아니라, 단백질, 식이섬유, 당질이 풍부하게 함유되어 있고, 비타민 B 복합체, 술 발효 중 효모 및 유산균에 의해 생성된 다양한 유기산과 inositol, acetylcholine, 리보플라빈 등 각종 유용한 생리활성 물질을 포함하고 있으며(3-5), 인체 내 신진대사에 관여하는 10여종의 필수 아미노산을 함유하고 있다(3). 이런 막걸리는 영양학적, 기능적 가치가 높을 뿐만 아니라 다량의 유산균을 함유하고 있으며, 발효 과정 중 효모에 의해 생성된 탄산가스는 막걸리에 청량감을 부여한다.

*Corresponding author: Gye-Won Kim, Academic Industry Cooperation, Hankyong National University, Anseong, Gyeonggi 456-749, Korea
Tel: 82-31-678-4879
Fax: 82-31-670-5491
E-mail: kgw@hknu.ac.kr
Received October 21, 2010; revised December 23, 2010; accepted December 28, 2010

막걸리는 알코올 도수가 낮아 부담 없이 즐길 수 있는 데다 앞서 언급한 바와 같이 영양학적 측면에서도 다른 어떤 술보다 웰빙주로 인정받아 소비자들에게 좋은 반응을 얻고 있으며, 막걸리 품질 향상에 대한 소비자의 재인식과 일본에서의 한류 열풍 및 다이어트 효과가 있는 것으로 알려져 소비가 급격히 증가하고 있는 추세이다. 또한 정부의 지역경제 살리기와 우리쌀 소비 촉진을 위한 우리술 산업 경쟁력 강화방안 등 정책 지원을 통해 국내 시장에서 저변이 확대되고 세계로 수출이 급증하고 있다. 이와 같은 막걸리에 대한 관심 및 소비 증가의 주요 요인 중 하나가 막걸리에 대한 기능성을 기대하는 것인데 현재까지 막걸리 관련 연구는 원료와 누룩의 종류에 따른 막걸리 품질 특성(6,7)과 술덧의 성분 변화 그리고 향기 성분에 대한 내용(8-10), 막걸리 술덧 중의 미생물 분류에 관한 내용(11), 막걸리 발효 중 유기산 성분 분석(9), 그리고 효모에 따른 막걸리 품질 특성에 대한 내용(12) 등이 보고되어 있다. 생리 활성에 대한 연구는 triglyceride와 total cholesterol 등 혈중지질 감소 효과(13)에 대한 보고가 있으며, 막걸리 농축물의 메탄올 분획물에서 암세포 성장 억제효과를 확인하였고 특히 간암 세포에서 quinone reductase 활성 증가 효과에 대해 보고되었다(14). 이처럼 막걸리에 대한 제한된 연구만 보고되었을 뿐, 제조방법 차이에 따른 생리활성의 차이 및 작용 기전 등에 대하여 과학적으로 입증된 연구 결과는 매우 미흡한 실정이다.

이와 같이 막걸리에 대하여 과학적으로 입증된 자료가 부족하

고 많은 사람들에게 생리 활성에 대해 잘 알려져 있지 못한 상황이므로 서울 및 경기도에서 유통 중인 13종의 막걸리를 선정하여 유기산 조성 분석과 생리 기능 활성에 어떠한 영향을 미치는 지에 대해 비교 조사함으로써 전통 발효식품인 막걸리의 우수성 및 제조방법에 따른 차이 등에 관한 정보를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용한 막걸리는 서울·경기도에서 유통되고 있는 제품이며 살균막걸리와 살균하지 않은 비살균막걸리 등 13종을 하나로 마트에서 구매하여 사용하였다. 각 막걸리 700 mL을 균일하게 섞어서 동결건조물을 제조하여 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다.

시약

Dexamethasone(DEX), 1-methyl-3-isobutylxanthine(IBMX), insulin, lipopolysaccharide(LPS), aminoguanidine(AG), Oil red O, DMSO, bromothymol blue, Neutral red는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서, fetal calf serum(FCS)은 HyClone(Logan, UT, USA)에서, fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium(DMEM), RPMI1640 medium, penicillin, streptomycin, trypsin-EDTA는 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다.

세포주 배양

실험에 사용한 모든 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 섬유아세포인 3T3-L1은 10% heat-inactivated FCS, 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin이 함유된 DMEM에서 배양하였다. 3T3-L1 세포는 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 씻어준 후 100 mm cell culture plate당 1 mL의 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 37°C에서 3분간 보관하여 세포를 탈착시켜 계대배양을 하였다. 탈착된 세포는 1×10^6 cells/well이 되도록 세포 수를 측정하여 10% FCS가 첨가된 DMEM 배양액 10 mL에 부유시킨 다음 37°C, 5% CO_2로 설정된 배양기(Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다. RAW264.7 murine macrophage는 RPMI1640에 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL steptomycin을 첨가한 것을 사용하였으며, 37°C, 5% CO_2를 유지하며 배양하였다.

일반분석

환원당은 막걸리를 filter paper(Hyundai Micro No. 20, Bucheon, Korea)로 여과한 후, 적당량으로 희석하여 Lane-Eynon법 및 Bertrand법의 변법을 사용하여 측정 및 정량 하였으며, 포도당 함량은 Biochemistry analyzer(YSI 2700, Yellow Springs, OH, USA)를 이용하여 측정하였다. pH는 filter paper로 여과한 후 직접 pH meter(HORIBA D-51, Minami, Kyoto, Japan)로 측정하였으며, 산도 측정은 여과액 10 mL에 혼합지시약(bromothymol blue 0.2 g, neutral red 0.1 g, absolute ethanol 300 mL) 2-3방울을 가한 뒤 0.1 N NaOH로 담록색이 나타날 때까지 적정 시키는데 소요되는 mL수를 산도로 표시하였다. 알코올 농도 분석을 위해 국세청 기술연구소 주류분석 규정(15)에 의거하여 시료 100 mL에 동량의 증류수를 첨가하여 희석하였고 전분질 원료의 호화 현상과 시료의 기포발생을 억제하기 위해 α-amylase 용액(Spezyme Xtra FG, Genencor, Rochester, NY, USA)과 소포제(DSA732, DYS Co., Seoul, Korea)를 소량 가하여 증류하였으며, 포집된 유액은 DMA4500 밀도 측정기(Anton Parr, Graz, Austria)를 이용하여 농도를 측정하였다.

유기산 분석

막걸리 시료를 균일하게 혼합한 후 시료 10 mL를 취하여 filter paper에 여과한 후, 0.45 μm membrane filter(Agela Technologies Inc., Newark, DE, USA)로 한번 더 여과하여 사용하였다. 유기산 표준물질은 막걸리와 같은 최종 알코올농도 6%로 보정한 용액에 녹여 사용하였다. 시료 중 각각의 유기산함량은 HPLC(Waters. Co., Milford, MA, USA)로 ODS column(Prevail Organic Acid, 4.6×150 mm, 3 μm, Alltech Grace Co., Deerfield, IL, USA)을 사용하였으며 이동상은 0.25 mM phosphate buffer를 사용하여 0.3 mL/min의 유속 조건에서 크로마토그라피를 실시하고, 210 nm에서의 흡광도를 측정하여 분석하였다.

전지방세포의 분화 유도 및 Oil-red O 염색과 정량

전지방세포인 3T3-L1 섬유아세포를 계대배양과 동일한 방법으로 탈착시켜 4×10^4 cells/well의 농도로 48-well plate에 넣은 다음, 완전한 confluent 상태까지 배양하였다. 이로부터, 2일 후에 분화 유도 물질인 0.25 mM DEX, 0.5 mM IBMX, insulin(10 μg/mL)이 함유된 배지와 시험물질을 함께 처리하여 3일 동안 배양하였다. 여기에 insulin(1 μg/mL)만 포함된 배지를 다시 넣어 2일 동안 배양 후, 2일에 한번씩 DMEM을 새로 바꾸어 주어 지방세포로 완전히 분화시켰다. 3T3-L1 세포의 분화는 역상현미경으로 관찰하여 세포 내 밝은 색의 작은 지방과립이 형성되는 것으로 확인하였고, 세포의 분화 정도는 Oil red O로 염색하여 측정하였다. Oil red O stock solution(60% triethyl-phosphate 100 mL에 500 mg Oil red O)을 녹여 여과한 후 용액 12 mL을 취하고 여기에 8 mL의 증류수를 첨가하여 실험에 이용하였다. 세포배양 8일 후 분화된 세포를 관찰하기 위해 4% formaldehyde 처리 후 30시간 동안 고정시켰다. PBS로 두 번 세척하였고 1 mL Oil red O 용액을 처리하여 1시간 동안 암조건에서 염색하였다. 40% isopropanol로 3번 세척하고 100% isopropanol로 추출한 염료액을 모아 microplate reader(Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA)을 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

생체 내 혈관 신생 측정

생체 내 혈관신생은 잘 알려진 유정란의 chorioallantoic membrane(CAM) assay를 이용하여 측정하였다(16). 입란전 유정란을 양성바이오(Yongin, Korea)에서 구매하여 온도 37°C, 습도 70%의 항온항습기에서 3일 동안 부화시켰다. 실험군과 대조군은 9-12개씩 대상으로 하였다. 유정란의 끝부분에 구멍을 내어 주사기로 알부민을 3-4 mL을 뽑아낸 뒤, 계란의 공기주머니가 있는 쪽을 70% 알코올로 소독한 후 메스를 이용하여 지름 3 cm 크기의 원형창문을 만들었다. 공기주머니 아래에 있는 막은 핀셋으로 제거한 후 유리테이프로 구멍을 막았다. 계속 배양기에서 키워 1.5일 후, 시험물질 1 μL를 Thermanox coverslip(Nunc, Naperville, IL, USA)에 점적하여 2시간 동안 말린 다음, 유정란에 만든 원형창문을 통해 노출된 CAM 위에 얹고 다시 유리테이프로 창문을 막았다. 이를 배양기에서 1일 동안 배양시킨 후 10% fat emulsion (Intralipid, Green Cross, Suwon, Korea)을 CAM막 안쪽에 주입하여 해부현미경으로 혈관신생 효과를 관찰하였다.

Nitrite 측정

RAW264.7 세포를 48-well plate에 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 18시간 배양하였다. 이후 각 well은 PBS를 이용하여 세척 후 FBS-free RPMI1640 배지를 이용하여 막걸리 동결건조물을 10, 50 μg/mL 농도로 1 μg/mL LPS와 함께 처리하여 24시간 배양 후 nitric oxide(NO) 생성량을 측정하였다. Nitrite의 양은 막걸리 동결건조물을 처리한 세포 배양액 100 μL와 동량의 Griess reagent를 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계학적 분석

모든 실험은 3회 반복실험을 실시하여 결과를 평균과 표준편차로 나타내었고 대조군과 시험물질 처리군 간의 통계분석은 one-way ANOVA로 각군 간의 평균치에 대한 유의성 검정을 하였으며, 통계적 유의성 검정은 신뢰구간 $p<0.05$ 또는 $p<0.01$ 수준에서 분석하였다.

결과 및 고찰

시판 중인 살균막걸리와 비살균막걸리 13종을 구매하여 각 막걸리의 일반 분석과 유기산 조성을 분석하였으며, 막걸리의 알코올 성분을 제거하여 제조한 동결건조물에 대하여 지방세포 분화 억제능력, 혈관신생 억제 그리고 항염증 효과 등의 생리 기능활성을 관찰하였다. 현재 시판 중인 막걸리 중 상당수가 발효제로 입국을 사용하고 있으나 발효제의 사용 여부가 기업 기밀 사항이므로 본 연구에서 분석한 제품들의 경우 막걸리 제조에 사용되는 모든 발효제를 누룩으로 총칭하였다.

pH, 산도, 환원당 및 포도당 분석

막걸리에서의 pH는 함유하고 있는 유기산의 종류 및 농도, 기타 산 유래 물질에 영향을 받으며, 발효 진행 경향을 예측할 수 있는 지표로 활용된다(17). 한편 산도는 막걸리의 관능적 요소와 제품 품질에 영향을 주는 중요한 지표로서 발효 이상으로 인하여 산도가 지나치게 높을 경우 감미의 소실과 함께 산미와 고미가 상대적으로 증가하게 되어 제품 관능 품질을 저하시킨다(18).

시판되는 13종의 막걸리를 분석한 결과, pH 및 산도는 Table 1과 같았다. 살균막걸리는 pH 3.60-4.17이었고, 살균하지 아니한 비살균막걸리의 경우 pH 3.40-3.77 수준으로서 살균막걸리가 비살균막걸리에 비해 평균적으로 높은 경향을 보였다. 한편, 살균막걸리의 산도는 2.05-3.50이었으며, 비살균막걸리는 2.40-4.75 수준으로서 살균막걸리가 비살균막걸리와 비교하였을 때, 평균적으로 낮은 산도를 관찰하였다. 살균막걸리와 비살균막걸리 간 유의적 차이는 없으나, 이러한 결과는 일부 살균막걸리의 경우 제조공정 시 유기산 첨가에 의해, 비살균막걸리 경우는 제품 내 효모 및 유산균 등에 의하여 유통 중에도 미세하게 발효가 진행되어 발효 산물인 각종 유기산 및 기타 산 물질에 의해 총산 함량이 증가한 것으로 여겨지며 이로 인해 비살균막걸리가 살균막걸리에 비해 상대적으로 낮은 pH와 높은 산도를 나타내는 것으로 사료된다(19).

한편, 환원당(reducing sugar, RS)의 경우 Table 1에서 나타낸 바와 같이 제품 C의 경우 30 mg/mL로 농도가 가장 높았으며, 제품 A와 H는 1.5 mg/mL, 제품 B의 경우 2.6 mg/mL 농도로 나타났다. 그 외 분석한 막걸리 제품에서는 미량으로 존재하거나 전혀 함유하지 않은 것으로 나타났다. 또한 환원당 중의 하나인 포도당의 경우도 이와 유사한 경향을 보였다. 전반적으로 비살균막걸리가 살균막걸리에 비해 환원당 및 포도당을 거의 함유하고 있지 않은 것으로 분석되었는바, 이는 비살균막걸리 제품 내 살아있는 효모 및 유산균등에 의해 발효 기질, 즉 탄소원으로 이용된 것으로 사료된다. 한편 일부 살균 막걸리 제품에서 환원당 및 포도당이 없거나 미량으로 존재하였는데 이는 최종 발효 술덧 자체에서 각 성분의 농도가 낮았던 것으로 판단된다.

유기산 분석

막걸리 제품의 유기산을 HPLC로 분석한 결과는 Table 2와 같다. 유기산 표준물질로 사용한 tartaric acid, pyruvic acid, malic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid 및 fumaric acid 중에서 lactic acid, acetic acid, citric acid는 모든 살균막걸리 및 비살균막걸리에서 검출되었으나, tartaric acid, pyruvic acid, malic acid, fumaric acid는 제품에 따라 검출 여부가 달랐다. 살균막걸리의 경우 citric acid가 2.49-5.03 mg/mL의 농도로 가장 많았으며, 그 다음으로는 lactic acid, acetic acid의 농도가 각각 0.74-2.87 mg/mL, 0.21-1.09 mg/mL 순서로 많았다. 비살균막걸리의 경우 lactic

Table 1. Analysis of alcohol, pH, acidity, reducing sugar, and glucose in commercial *makgeolli*

	Alcohol (%)	pH	Acidity	RS[1)] (mg/mL)	Glucose (mg/mL)	Type[2)]
A	6.04±0.04[3)]	4.03±0.01	2.05±0.01	1.50±0.12	0.45±0.03	Pasteurized
B	6.02±0.02	3.63±0.01	2.75±0.01	2.62±0.15	1.17±0.03	Pasteurized
C	6.05±0.05	3.60±0.02	3.50±0.08	30.33±1.53	14.73±2.29	Pasteurized
D	7.46±0.10	4.17±0.04	2.49±0.01	0.17±0.29	0.08±0.05	Pasteurized
E	7.01±0.02	3.88±0.02	2.60±0.00	0.00±0.00	0.03±0.04	Pasteurized
F	5.99±0.02	3.74±0.01	2.25±0.03	0.00±0.00	0.02±0.02	Pasteurized
G	6.08±0.17	3.40±0.05	2.89±0.10	0.48±0.33	0.09±0.13	Draft
H	6.09±0.16	3.52±0.04	2.42±0.10	1.47±0.76	0.12±0.10	Draft
I	6.02±0.02	3.77±0.03	2.51±0.01	0.82±0.40	0.10±0.17	Draft
J	6.05±0.09	3.77±0.01	2.50±0.00	0.48±0.28	0.00±0.01	Draft
K	6.01±0.02	3.59±0.05	4.72±0.03	0.17±0.29	0.01±0.01	Draft
L	6.01±0.02	3.68±0.00	2.75±0.03	0.00±0.00	0.04±0.02	Draft
M	6.07±0.07	3.75±0.01	4.20±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	Draft

[1)]Reducing sugars
[2)]*Makgeolli* was divided into two types, unpasteurized (draft) and pasteurized type.
[3)]Each data represents the mean±SD of three independent experiments.

Table 2. Analysis for composition of organic acids in commercial *makgeolli*

Makgeolli	Organic acids (mg/mL)						
	Tartrate	Pyruvate	Malate	Lactate	Acetate	Citrate	Fumarate
A	0.33±0.02	0.07±0.00[2)]	0.72±0.00	0.87±0.00	0.37±0.00	3.55±0.07	ND
B	ND[1)]	ND	0.37±0.02	1.55±0.02	0.70±0.00	2.49±0.23	ND
C	0.25±0.00	0.05±0.00	0.89±0.02	2.87±0.02	0.21±0.02	4.64±0.00	0.004±0.00
D	0.67±0.01	0.21±0.00	1.16±0.00	2.75±0.03	1.09±0.01	4.83±0.05	0.006±0.05
E	0.73±0.00	0.12±0.00	1.35±0.00	1.66±0.01	0.94±0.01	5.03±0.02	0.005±0.00
F	0.33±0.01	0.04±0.00	0.40±0.00	0.74±0.01	0.47±0.01	2.70±0.01	ND
G	ND	ND	0.27±0.03	0.96±0.07	0.54±0.14	1.28±0.06	ND
H	0.40±0.00	0.15±0.00	ND	1.08±0.01	0.97±0.01	2.60±0.01	0.003±0.00
I	ND	ND	1.44±0.53	3.66±0.77	1.52±0.02	2.54±0.57	ND
J	ND	ND	1.04±0.02	4.28±0.46	0.73±0.06	2.35±0.14	ND
K	0.61±0.01	0.15±0.00	ND	5.70±0.00	0.41±0.00	2.54±0.04	0.002±0.00
L	0.53±0.03	0.03±0.00	ND	1.77±0.01	0.56±0.01	2.15±0.03	0.002±0.00
M	0.64±0.00	0.07±0.00	ND	5.32±0.02	0.81±0.01	4.98±0.05	0.004±0.00

[1)]Not detected
[2)]Each data represents the mean±SD of three independent experiments.

acid가 0.96-5.70 mg/mL의 농도로서 전반적으로 가장 높았으며, citric acid, acetic acid의 농도가 각각 1.28-4.98, 0.41-1.52 mg/mL의 순서로 많았다. 살균막걸리와 비살균막걸리 총 유기산의 평균 농도는 각각 7.53, 7.44 mg/mL로 비슷하였지만, 유기산의 구성 비율은 서로 상이하였으며, 특히 lactic acid의 경우 살균막걸리에 비해 비살균막걸리에서 더 높은 농도로 검출되었다. 두 실험군 간 유의적 차이는 없으나, 이는 비살균막걸리 제품 내에서 효모 및 유산균에 의한 발효가 미세하게나마 진행된 것에 기인한 것으로 판단된다. 막걸리 발효에서 malo-lactic fermentation(MLF)은 알코올 발효 후 *Lactobacillus* sp.와 *Leuconostoc* sp. 등과 같은 특정 유산균에 의해 일어나는 발효로서 이로 인하여 malic acid가 lactic acid로 전환된다. 막걸리 발효에서의 MLF가 적절히 이루어지면 산도의 감소로 주질의 부드러움과 입에서 느껴지는 촉감을 강화시켜 주며 acetaldehyde의 감소로 풍미가 개선되고 발효 중 미생물학적 안정성을 높여주는 긍정적인 효과를 제공하는 역할을 한다. 이 MLF는 오래 전부터 와인에서 연구 및 산업화가 이루어지고 있다.

Tartaric acid와 pyruvic acid는 일부 제품에서는 검출되지 않았으며 살균막걸리, 비살균막걸리와 관계없이 각각 0.25-0.73, 0.04-0.21 mg/mL의 농도로 분석되었다. Fumaric acid는 미량 검출되거나 전혀 검출되지 않았다. 한편, malic acid는 살균막걸리에서 0.37-1.35 mg/mL의 농도로 모든 제품에서 검출되었지만, 비살균막걸리의 경우 G, I, J 제품을 제외한 나머지 제품에서는 검출되지 않았다. 이는 비살균막걸리가 유통되는 동안 제품 내 살아있는 유산균 중 사과산의 젖산 발효(malo-lactic fermentation)를 일으키는 유산균에 의해 malic acid가 분해되어 lactic acid로 생성되었기 때문으로 판단된다. 살균막걸리 내 유기산 중 lactic acid/malic acid의 ratio는 2.35±1.18인 반면에 비살균막걸리 중 malic acid가 검출된 제품에서의 lactic acid/malic acid의 ratio는 3.40±0.80으로 비살균막걸리에서의 ratio가 다소 높음을 볼 수 있다. 이는 비살균막걸리가 살균막걸리에 비해 평균적으로 lactic acid가 높게 나타나는 것과 부합한다. 또한 일부 비살균막걸리 제품에서 malic acid가 검출되는 경우를 볼 수 있는데, 이는 유통 과정 중 온도에 따른 malo-lactic fermentation 진행 정도의 차이로 판단된다. 즉, 비살균막걸리 특성 상 냉장 유통되는 제품의 경우 낮은 온도로 인해 이와 연관된 유산균의 생육이 지체되어 malo-lactic fermentation이 다소 지연됨으로써 malic acid가 잔존하게 된 것으로 판단된다. 비살균막걸리 유통 과정 중 제품 내에서 malo-lactic fermentation이 일반적으로 빈번하게 일어날 경우 유통 과정 중 제품 내 malic acid의 정성 및 정량 분석을 통해 비살균막걸리의 유통 기한 지표로 활용할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 malo-lactic fermentation에 관여하는 유산균의 규명과 시간 및 온도에 따른 비살균막걸리 제품 내에서의 malo-lactic fermentation에 대한 연구를 진행할 필요가 있다.

막걸리의 전지방 세포 분화 억제 효과

전구 지방세포(preadipocyte)에서 지방세포(adipocyte)로의 분화는 성장과정 중 특정 호르몬의 급작스러운 양적 변화와 과잉 영양공급에 의해 유발될 수 있다(20). 지방세포의 크기는 한계가 있으므로 과잉 영양공급이 될 때, 에너지를 신속히 저장하기 위하여 지방세포수의 증가가 일어나게 된다. 본 연구는 막걸리 동결건조물의 처리가 미분화 상태 전구 지방세포인 3T3-L1 세포의 지방세포로 분화에 미치는 영향을 평가한 결과, 모든 막걸리에서 지방세포 분화 저해활성을 나타내었다(Table 3). 대조군에 비해 막걸리 A 등 11개 제품의 막걸리 100 μg/mL에서 40-70% 저해하였고, 50 μg/mL에서 10-50% 정도의 저해 활성을 보여 막걸리는 지방세포의 분화 지표로 사용되는 lipid droplet의 형성을 저해하는 것을 통해 지방세포 분화를 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 모든 막걸리 동결건조물은 전구 지방세포인 3T3-L1 세포와 분화 유도된 지방세포에 대한 세포독성을 나타내지 않았다(data not shown).

염증 유도 물질로 알려진 tumor necrosis factor-alpha(TNF-α)는 비만과 제2형 당뇨병 환자의 지방조직에서 up-regulation되어 있다. 지방세포 분화를 억제하는 강력한 조절자로 알려져 있으며 adiponectin 발현 저해를 유도하는 것으로 알려져 있다(21,22). 본 연구에서 양성대조군으로 사용한 TNF-α는 0.1 ng/mL에서 91.81±3.82, 1 ng/mL에 56.11±1.97, 5 ng/mL에서 27.65±4.20, 10 ng/mL는 19.83±2.54의 지방세포 분화 비율을 관찰하였다. 막걸리 E, I, J, M은 농도의존적으로 유의적인 지방세포 분화 억제 효과를 나타내었으며, 최고 처리 농도인 100 μg/mL에서 5 ng/mL TNF-α과

Table 3. Effects of *makgeolli* on adipocyte differentiation analyzed by Oil red O staining and extraction method

Makgeolli	Differentiation rate[1] (%)		
	10 μg/mL	50 μg/mL	100 μg/mL
Positive control		100	
A	106.71±4.10[2]	99.89±5.58	52.27±7.37**
B	97.32±2.84	86.0±6.49	40.08±4.67**
C	96.71±1.92	72.32±4.63**	43.80±6.78**
D	100.86±0.64	83.65±4.22	55.46±2.39**
E	85.38±6.06*[3]	61.13±7.42**	43.36±6.68**
F	109.06±5.31	99.18±8.53	67.40±8.29**
G	107.45±3.91	93.44±1.77	48.09±6.79**
H	93.78±7.54	72.99±6.11**	51.64±6.52**
I	83.16±8.57**	55.83±9.49**	33.86±0.72**
J	75.22±4.61**	51.95±5.27**	36.13±7.74**
K	109.63±2.35	94.47±4.71	59.52±11.33**
L	104.98±3.17	91.92±7.29	80.32±6.71**
M	81.14±5.81**	64.15±6.91**	38.45±4.75**

[1]Percent ratio to the positive control
[2]Each value represents the mean±SD, n=3.
[3]*$p<0.05$, **$p<0.01$, significantly different from the control value.

Table 4. Effects of *makgeolli* on angiogenic activity[1]

Makgeolli	Amount treated	No. of viable eggs	No. of positive eggs	Inhibition rate (%)[2]
DMSO	1 μL	10/10	0	0
Retinoic acid	1 μM	11/11	7	63.6
A	50 μg	8/11	3	37.5
B	50 μg	10/12	8	80.0
C	50 μg	9/11	6	66.7
D	50 μg	10/12	6	60.0
E	50 μg	10/11	4	40.0
F	50 μg	8/9	4	50.0
G	50 μg	11/11	4	36.4
H	50 μg	11/12	4	45.5
I	50 μg	12/12	8	66.7
J	50 μg	10/10	7	70.0
K	50 μg	10/10	4	40.0
L	50 μg	9/10	4	44.4
M	50 μg	8/10	3	37.5

[1]Each assay employed about 9-12 eggs per group.
[2]Number of positive eggs/number of viable eggs×100

동등 수준의 저해효과가 확인되었다. 이들 막걸리는 10 μg/mL 농도에서 본 연구에 적용한 다른 막걸리의 50 μg/mL과 동등 이상의 강력한 지방세포 분화 억제 효과를 나타내었다.

전통누룩 농축물이 high-cholesterol diet-fed rat model에서 혈중 low-density lipoprotein(LDL)-cholesterol과 total cholesterol의 농도를 낮추는 효과를 관찰하였고 이는 peroxisome proliferator-activated receptor-α(PPAR-α) 활성화와 apolipoprotein A1(ApoA1)의 분비를 촉진하는 기전으로 이루어진다고 보고되었다(23). 또한 막걸리와 막걸리 주박 농축물에 대하여는 혈중 triglyceride와 total cholesterol 농도 저하와 high-density lipoprotein(HDL)-cholesterol 농도 증가를 유도하여 지질대사 개선에 효과가 있는 것으로 보고 되었다(13,24). 본 연구에서 확인된 막걸리의 전지방세포 분화 억제 효과는 지질대사 개선 효과의 상관성과 그의 정확한 작용 기전 규명에 대한 연구가 필요하다.

막걸리의 신생 혈관 생성 억제 효과

비정상적인 혈관신생은 암, rheumatoid arthritis, 만성 염증 등, 여러 가지 질환들의 발생과 진행을 결정하는 한 요인으로 주목받고 있다(25). 암세포는 혈관신생에 의존하여 증식과 전이를 진행하므로 혈관신생의 여러 단계들을 제어하여 암의 증식과 전이를 감소시킬 수 있다. 이런 이유로 질병 치료 목적, 특히 암 치료를 위해 혈관신생 억제 물질을 탐색하고 개발하려는 시도들이 매우 활발하게 진행되고 있다(26). 본 연구는 막걸리 동결건조물이 *in vivo*에서 혈관신생에 어떠한 영향을 미치는지를 평가하고자 발생 초기 유정란의 CAM에 막걸리 동결건조물 각각 50 μg을 처리하였다. 그 결과, 시제품 막걸리 B, C, D, F, I, J의 동결건조물 처리에 의해 50% 이상 혈관신생을 억제하였으며, 특히 막걸리 B, C, I, J는 양성 대조군인 retinoic acid와 동등 이상의 효과를 관찰하였다(Table 4). 정상적인 CAM에 형성되는 혈관들의 밀도가 감소하여, 이로 인해 형성되는 무혈관 지역이 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 막걸리 동결건조물이 생체 내에서의 혈관신생에 강하게 억제한다는 점을 시사한다.

이런 막걸리의 혈관신생 억제 활성은 막걸리 제조 공정상의 차이가 아닌 발효제로 사용한 누룩에 기인한다고 생각된다. 이 결과는 누룩의 H_2O 분획물이 mRNA 수준에서 basic fibroblast growth factor(bFGF), TNF-α, hypoxia-inducible factor-1α(HIF-1α)의 발현을 저해하는 기전을 통해 혈관신생과 혈관 관상 구조 생성 억제한다는 보고(27)와 상관성이 있다. 향후 막걸리의 혈관신생 효과에 대한 농도의존적인 결과와 혈관상피 세포를 이용한 시험관 내 연구를 통하여 막걸리 동결건조물과 누룩 대사산물의 혈관신생 억제 작용 기전을 규명할 필요가 있다.

막걸리의 염증 반응 억제 효과

Nitric oxide synthase(NOS)의 작용에 의해 생성되는 nitric oxide(NO)는 동물세포의 경우 pro-inflammatory cytokine이나 LPS 등에 의해 생성이 촉진될 수 있다. LPS는 세균 내독소로 대식세포에 처리하면 염증성 cytokines 및 NO와 같은 염증반응의 매개물질을 생성하여 병리학적 반응이 일어나게 된다(28). 본 연구는 막걸리 동결건조물의 처리가 murine macrophage(RAW264.7)의 NO 생성에 어떠한 영향을 미치는지를 평가하고자 수행하였다. RAW264.7 세포에 LPS(1 μg/mL) 단독처리 또는 LPS와 각 막걸리 동결건조물을 10, 50 μg/mL의 농도로 동시에 처리한 후, 각 막걸리 동결건조물에 의한 NO 생성 저해 효과를 관찰하였다. 그 결과, 막걸리 동결건조물은 유의적 수준에서 농도의존적인 경향으로 NO 생성을 저해하는 것으로 관찰하였다(Table 5). 본 연구에 사용한 막걸리 동결건조물은 RAW264.7 세포에 대한 세포독성 효과가 없는 것으로 확인하였다(data not shown). 양성 대조물질로 사용한 aminoguanidine(AG)는 100 μM의 농도에서 49.21%의 NO 생성을 저해하였다. 막걸리 D, H, J, K의 50 μg/mL 처리는 NO의 생성을 LPS만 단독으로 처리한 세포에 비해 각각 42.2, 45.4, 50.7, 46.4%를 저해시켜 100 μM의 AG와 동등한 수준의 저해 효과를 확인하였다. 반면, 나머지 막걸리 50 μg/mL 처리는 20-40% 수준으로 NO 생성을 저해하는 것으로 확인하였다.

전통 누룩 추출물이 LPS에 의해 유도된 염증 반응에서 염증 매개체인 NO와 interleukin-6의 생성을 저해하는 것을 관찰하였고 이는 mitogen activated protein kinases(MAPKs) 중 p38 MAPK 활성화를 저해하는 기전을 통해 이루어진다고 보고 되었다(29).

Table 5. Inhibitory effects of *makgeolli* on nitric oxide production

	Relative NO production (%)[1)]	
	10 μg/mL	50 μg/mL
LPS[2)]	100	
AG[3)]	50.79±4.95**[4,5)]	
A	79.2±8.2**	60.0±9.6**
B	85.2±1.3**	78.3±1.5**
C	104.5±4.3*	78.0±10.1**
D	88.0±6.9	57.8±2.7**
E	92.0±7.1	65.5±3.5**
F	100.8±3.3	65.4±7.0**
G	90.6±8.4	36.7±3.5**
H	84.3±4.5*	54.6±8.2**
I	96.8±3.8	78.5±14.3*
J	86.6±6.0**	49.3±6.7**
K	87.4±8.5	53.6±7.6**
L	98.6±3.5	60.5±10.0**
M	80.4±5.0**	65.6±4.6**

[1)]Percent ratio of NO production to the LPS-treated control
[2)]Final concentration of LPS was 1 μg/mL
[3)]Final concentration of aminoguanidine (AG) was 100 μM
[4)]Each value represents the mean±SD, n=3.
[5)]*p<0.05, **p<0.01, significantly different from the control value.

누룩 유래 지방산 화합물에 대한 LPS에 의해 유도한 NO 생성 저해 효과를 평가한 결과, 농도의존적으로 염증 반응을 억제한다고 보고 하였다(30). 본 연구에서 확인한 막걸리의 NO 생성 저해 활성을 바탕으로 향후 항염증에 대한 정확한 작용 기전 규명이 필요하다.

요 약

막걸리는 고려시대 이후 제조된 우리나라 전통술이다. 본 연구는 막걸리의 유기산 분석과 생리 기능활성을 평가하고자 수행하였다. 막걸리의 유기산 분석 결과, 막걸리는 유기산 중에서 유산균에 의한 대사 산물인 lactic acid를 가장 많이 함유하고 있었으며 시판 막걸리에 따라 다양한 유기산 조성을 나타내고 있었다. 막걸리의 항비만 효과를 전지방세포인 3T3-L1 세포주를 사용하여 평가한 결과, 대조군 대비 막걸리는 전지방세포 분화를 저해하였으며, 특히 100 μg/mL의 농도에서 40-70% 수준으로 분화를 억제하였다. 또한 혈관신생 억제 효과와 항염증 활성을 관찰하기 위하여, 각각 CAM assay와 LPS를 처리하여 염증반응을 유발한 murine macrophage RAW264.7 세포주에서 NO를 정량하였다. 그 결과, 대부분의 막걸리는 50% 이상의 혈관신생 억제 효과를 확인하였다. 또한 농도의존적으로 NO의 생성량을 유의적 수준으로 저해하였다. 이런 결과를 종합할 때, 막걸리는 항비만, 혈관신생 억제, 그리고 항염증 활성을 가지고 있으며, 이는 막걸리의 누룩 미생물 균총의 2차 대사산물의 효과에 기인한다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 식품기술개발사업(110098-031-SB010)의 지원에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사를 표합니다.

문 헌

1. Chung DH. The History of Alcohol Tradition in Korea. Shinkwang Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 271-298 (2004)
2. Korea Food & Drug Administration. Official Book for Food. Moonyoung Publishing Co., Seoul, Korea. p. 436 (2000)
3. Yoo TJ. Korean Famous Wine. Central New Book, Seoul, Korea. p. 96 (1981)
4. Kim JY, Sung KW, Bae HW, Yi YH. pH, acidity, color, reducing sugar, total sugar, alcohol and organoleptic characteristics of puffed rice powder added *takju* during fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 39: 266-271 (2007)
5. Lee CH. History of Korean liquor. Bioindus. News 6: 4058-4061 (1993)
6. Song JC, Park HJ. *Takju* brewing using the uncooked germed brown rice at second stage mash. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 847-854 (2003)
7. Lee JS, Lee TS, Park SO, Noh BS. Flavor components in mash of *takju* prepared by different raw materials. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 316-323 (1996)
8. Hong SW, Hah YC, Min KH. The biochemical constituents and their changes during the fermentation of takju. J. Korean Agric. Chem. Soc. 8: 107-115 (1970)
9. Lee WK, Kim JR, Lee MW. Studies on the change in free amino acids and organic acids of takju prepared with different *koji* strains. J. Korean Agric. Chem. Soc. 30: 323-327 (1987)
10. Han EH, Lee TS, Noh BS, Lee DS. Quality characteristics in mash of *takju* prepared by using different *nuruk* during fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 555-562 (1997)
11. Lee JS, Lee TW. Studies on the mciroflora of *takju* brewing. Korean J. Microbiol. 8: 116-133 (1970)
12. Lee HS, Park CS, Choi JY. Quality characteristics of the mashes of *takju* prepared using different yeasts. Korean J. Food Sci. Technol. 42: 56-62 (2010)
13. Kim MH, Kim WH, Bae SJ. The effect of Makkoli on serum lipid concentration in male rats. J. Nat. Sci. Silla Univ. 9: 73-84 (2001)
14. Shin MO, Kang DY, Kim MH, Bae SJ. Effect of growth inhibition and quinone reductase activity stimulation of makgeoly fractions in various cancer cells. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 37: 288-293 (2008)
15. Korea Foods Industry Association. Korean Food Standards Codex. Moonyoung Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 453-454 (2003)
16. Oikawa T, Hirotani K, Nakamura O, Shudo K, Hiragun A, Iwaguchi T. A highly potent antiangiogenic activity of retinoids. Cancer Lett. 48: 157-162 (1998)
17. Song JC, Park HJ, Shin WC. Change of *takju* qualities by addition of cyclodextrin during the brewing and aging. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 895-900 (1997)
18. Lee SM, Lee TS. Effect of roasted rice and defatted soybean on the quality characteristics of *takju* during fermentation. J. Nat. Sci. 12: 71-79 (2000)
19. Han EH, Lee TS, Noh BS, Lee DS. Quality characteristics in mash of *takju* prepared by using different *nuruk* during fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 555-562 (1997)
20. Kim KH, Ahn SC, Lee MS, Kweon OS, Oh WK, Kim MS, Sohn CB, Ahn JS. Adipocyte differentiation inhibitor isolated from the barks of *Phellodendron amurense*. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 503-509 (2003)
21. Szalkowski D, White-Carrington S, Berger J, Zhang B. Antidiabetic thiazolidinediones block the inhibitory effect of tumor necrosis factor-α on differentiation, insulin-stimulated glucose uptake, and gene expression in 3T3-L1 cells. Endocrinology 136: 1474-1481 (1995)
22. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. Diabetes 50:

2094-2099 (2001)
23. Lee SJ, Kim GW. Hypolipidemic effect of hexane fraction from *Rhizopus oryzae* KSD-815 through peroxisome proliferator-activated receptor-α. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 53: 761-765 (2010)
24. Shin MO, Kim MH, Bae SJ. The effect of *makgeolli* on blood flow, serum lipid improvement and inhibition of ACE *in vitro*. J. Life Sci. 20: 710-716 (2010)
25. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease. Nat. Med. 1: 27-31 (1995)
26. Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: Potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. Pharmacol. Rev. 52: 237-268 (2000)
27. Lee SJ, Bae HJ, Ryu JY, Lee DY, Kim GW, Baek NI, Kwon MS, Hong SY. Extracts from *Rhizopus oryzae* KSD-815 of Korean traditional *nuruk* confer the potential to inhibit hypertension, platelet aggregation, and cancer metastasis *in vitro*. Food Sci. Biotechnol. 18: 1423-1429 (2009)
28. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. Curr. Drug Targets 4: 471-479 (2005)
29. Kim JE, Jung SK, Lee SJ, Lee KW, Kim GW, Lee HJ. *Nuruk* extract inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitrite and interleukin-6 in RAW264.7 cells through blocking activation of p38 mitogen-activated protein kinase. J. Microbiol. Biotech. 18: 1423-1426 (2008)
30. Kwak HY, Lee SJ, Lee DY, Jung L, Bae NH, Hong SY, Kim GW, Baek NI. Cytotoxic and anti-inflammatory activities of lipids from the *nuruk* (*Rhizopus oryzae* KSD-815). J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 51: 142-147 (2008)