

발효 조건이 막걸리 술덧 유래 다당의 면역자극 활성화에 미치는 효과

이영경 · 남소현 · 김혜련 · 조장원 · 이영철 · 김영찬 · 홍희도

한국식품연구원 전략산업연구본부

Effect of Crude Polysaccharide Isolated from *Mageoli* Mash under Different Fermentation Conditions on Immune-Stimulating Activity

Young Kyoung Rhee, So-Hyun Nam, Hye-Ryun Kim, Chang-Won Cho,
Young-Chul Lee, Young-Chan Kim, and Hee-Do Hong

Division of Strategic Food Research, Korea Food Research Institute

ABSTRACT Various microorganisms are involved in the fermentation of *Mageoli*, Korean traditional liquor. Among them, the most predominant microorganism is yeast, including *Saccharomyces cerevisiae*. This study investigated the effects of crude polysaccharides separated from *Mageoli* mash (CP-M) on activation of peritoneal macrophages in cell culture medium. Four types of yeasts, *S. cerevisiae* 89-1-1, 98-2, 268-3, and 113-4, were used. When peritoneal macrophages were treated with 10 µg/mL of CP-M fermented with *S. cerevisiae* 113-4, the concentration of nitric oxide (NO) in the medium was highest (33.3 µM). The concentrations of IL-6 and -12 were also highest at 116.3 pg/mL and 59.8 pg/mL, respectively. In the case of CP-M cultured at 15, 20, and 30°C after inoculation with *S. cerevisiae* 113-4 and fermented at different temperatures, production of NO and IL-6 by peritoneal macrophages did not change compared to the control. For CP-M obtained after fermentation at 25°C, however, NO concentration increased 2.7~3.3 fold and IL-6 concentration by 5.7 fold compared to the control. Furthermore, the effect of fermentation period on expression of CP-M functionality was examined. NO production by CP-M of the 5th day mash was highest, increasing 2.2 fold compared to 0-day CP-M. However, there were no significant differences in concentration of IL-6 or -12 according to different fermentation periods, although CP-M showed a large decrease after 10 days. The results show that fermentation conditions with the highest activity were observed in CP-M inoculated with *S. cerevisiae* 113-4 and fermented at 25°C for 5 days. CP-M consisted of 78.6% neutral sugar, 11.6% acidic polysaccharide, and 9.8% protein. In particular, the sugar composition of neutral sugar consisted of mannose (47.8%), glucose (29.6%), and galactose (12.7%). Based on the results, CP-M is assumed to be an extracellular polysaccharide originating in yeast with high mannose content.

Key words: *Mageoli* mash, polysaccharides, immunomodulating effect, peritoneal macrophages

서 론

술의 역사는 오래전 선(先) 인류가 식량으로 저장해 둔 과일이나 곡물이 자연적으로 발효되어 얻어진 것을 시작으로 각 지역의 기후와 풍토에 맞는 다양한 술로 발전했으리라 추정하고 있다(1). 우리나라 역시 고조선 시대의 유물로 술병, 술잔, 시루 등이 출토되는 것으로 보아 이미 그때에도 술을 빚어 마셨던 것을 짐작할 수 있다. 우리나라의 전통주인 막걸리는 탁주, 농주, 부의주, 동동주 등의 다양한 이름으로 불리며 서민을 위한 주류로 전승되어 왔지만 일제 강점기의 정책으로 가양주 제조가 금지되어 주질이 획일화되면서

전통 발효주의 침체가 시작되었다(2). 그 이후에도 제주(制酒)용 쌀 사용을 금지하여 주질마저 나빠지게 돼 소비자의 외면을 받아오다가 2008년 '사업체 쌀 소비량 촉진 정책'에 힘입어 막걸리 개발이 본격화되었고, 2010년 전후로 비약적인 해외 수출 증가를 이루었다. 이는 한류(韓流)와 함께 홍보를 통해 술의 유희성을 대표하는 알코올 함량이 막걸리가 상대적으로 낮고 단백질, 당질, 비타민 B₂ 등의 영양성분 함량이 높다는 등의 장점을 들어 웰빙과 연관된 이미지를 갖게 된 것과 관련이 있다(3).

전통주 발효에는 알코올을 생산하는 효모뿐 아니라 곡물에서 유래한 전분을 포도당과 같은 당류로 분해하여 효모의 알코올 생성을 돕는 곰팡이류, 젖산 생성으로 보존 효과를 가져오는 유산균류 등 다양한 미생물이 균총을 이루며 관여하고 있다. 다양한 균총 중에서도 생균수 측면에서 가장 우위에 있는 것은 *Saccharomyces cerevisiae* 등과 같은 효모로, 시중 막걸리 분석 결과 유산균 대비 가장 적게는 1.2배에

서 최고 458.3배까지 많은 것으로 조사된 바 있다(4). 이러한 특성으로 인해 기존의 연구는 주류 제조를 위한 효모 선별(5-8), 선별 균주의 배양 조건(9-11), 알코올 생산력과 저장성(12,13), 성분 변화 및 품질 특성(14-16) 등에 관한 연구가 진행되어 왔다. 또한 전통적인 방법에 의해 제조된 막걸리 또는 상품화된 막걸리에 대한 기능성 평가 연구가 보고되어 있다. 알코올에 의한 간 손상 억제(17,18), 아질산염 소거능(19), 혈압 상승 억제 효과(20), 위 보호 효과, 심혈관질환 개선 효과, 전지방 세포 분화 억제 효과(21), 항암 효과(3) 등의 효능 평가를 통해 포도주의 '프렌치 패러독스'에 상응하는 막걸리의 '코리아 패러독스'를 제안하고 있다.

막걸리는 곡류를 기질로 하여 만들기 때문에 곡류에서 유래한 당질, 단백질, 아미노산 등의 함량이 높은 독특한 영양적 특성을 가지고 있다. 그렇기 때문에 포도주의 기능성이 발효 기질이 함유한 polyphenols에서 오는 반면 막걸리의 기능성은 충분한 영양원을 기반으로 증식한 미생물 균체 또는 그 대사산물에 의해 부가되므로 발효주를 개발할 때 균의 종류에 따라 맛과 향은 물론 기능성까지도 고려한 소재 개발이 가능할 것으로 여겨진다.

본 연구에서는 효모(*S. cerevisiae*)를 접종하여 발효시킨 막걸리 술덧으로부터 조다당 분획을 분리하여 동결건조 분말을 얻었다. 만들어진 각각의 조다당 분획을 peritoneal macrophage에 처리하여 nitric oxide(NO), IL-6, IL-12 등 면역력 증강 관련 지표 상승에 영향을 미치는 strain을 선별하고 이렇게 선별된 효모의 발효 조건을 달리하였을 때 지표 변화에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 또한 면역 활성이 가장 높았던 발효 조건의 술덧에서 분리한 조다당 시료의 구성당을 조사하여 유효 시료의 조성 특성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 효모

본 연구에 사용한 4종의 효모 89-1-1, 98-2, 268-3, 113-4는 한국식품연구원 우리술 연구팀에서 분리·보관 중인 *S. cerevisiae* strain을 Potato Dextrose Agar(PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 배양하여 사용하였다.

막걸리 술덧 및 조다당 시료 제조

막걸리 술덧 제조: 발효 조건이 막걸리 유래 다당의 면역 자극 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 *S. cerevisiae* strain별, 발효온도, 발효기간을 달리하여 막걸리를 제조하였다. 막걸리 기본 제조 방법은 Table 1과 같다. 최종 1,500 g 중량으로 뽕쌀(Odae-mi, Choerwon, Korea), 발효제인 진주곡자(SP300, Jinju, Korea), 효모(0.02%), 물을 넣고 25°C에서 2일 동안 발효하여 밀술을 제조한 다음 뽕쌀과 물을 추가로 첨가하여 덧술을 제조한 후 25°C에서 5일 동안

Table 1. The mixing ratio of raw materials for the preparation of *Makgeolli* mash

	Seed mash (<i>Ju-mo</i>)	Mash (<i>Sul-dut</i>)
Rice (g)		294
Koji (g)	206	
Water (g)	333	667
Yeast (g)	0.30	
Total weight (g)	1,500	
Test strain (at 25°C for 5 days)	<i>S. cerevisiae</i> 89-1-1, 98-2, 268-3, 113-4	
Fermentation temperature (for 5 days by <i>S. cerevisiae</i> 113-4)	15°C, 20°C, 25°C, 30°C	
Fermentation periods of mash (by <i>S. cerevisiae</i> 113-4 at 25°C)	0, 1, 3, 5, 7, 10 days	

발효하여 막걸리를 제조하였다. 4가지 효모 중 면역 활성에 더 나은 효과를 보이는 균주를 선발하여 발효온도(15°C, 20°C, 25°C, 30°C)에 따라 막걸리를 달리 제조하였다. 마지막으로 막걸리가 발효기간별로 면역 활성 효과에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 밀술을 제조한 뒤 덧술 발효기간을 0일, 1일, 3일, 5일, 7일, 10일로 차이를 두어 막걸리를 제조하였다.

막걸리 조다당 시료(CP-M)의 제조: 시료를 85°C water bath에서 30분간 가열하여 발효를 중지하였다. 그 후 회전 감압 농축 장치(RE121 Rotavapor, BÜCHI, Flawil, Switzerland)를 이용하여 알코올을 휘발시킨 후 원심분리기(Mega 17R, Hanil Science Industrial Co. Ltd., Incheon, Korea)를 이용하여 가용성 다당을 분리하였다. 최종 농도가 80% 되도록 에탄올을 첨가하고 하룻밤 방치 후 생성된 침전물을 분리하였다. 침전물을 소량의 증류수에 용해하여 Spectra/Por 투석막(MWCO: 6,000~8,000, Spectrum Medical Industries Inc., Laguna Hills, CA, USA)을 이용하여 2~3일간 투석을 처리한 것을 동결건조(FD5508, Ilshin Lab Co. Ltd., Suwon, Korea) 하여 조다당 시료(CP-M, crude polysaccharides from *Makgeolli* mash)를 얻었다.

면역 활성 평가

Peritoneal macrophage 세포 분리 배양: C57BL/6 mouse (male, 5 weeks, Hanlim Animal Research, Hwasung, Korea)의 복강에 5% thioglycollate(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 1 mL 주입하고, 72~96시간 내에 유도된 macrophage를 PBS를 이용하여 회수하였다. 그 후 RPMI 1640(Gibco BRL Co., Grand Island, NY, USA)으로 2~3회 세척하고 세포수를 2.5×10^5 cell/well로 조정하여 96-well plate에 배양하였다. 배지는 RPMI 1640에 10% (v/v) fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL Co.)과 1%(v/v) penicillin-streptomycin을 가한 배지를 사용하였다(22).

NO assay: 활성화된 대식세포가 분비하는 것으로 알려진 NO의 생성량을 측정하였다. NO의 생성은 비색법으로 세포 상등액에 축적되는 nitrite 양을 측정하였다. 100 μ L의 세포배양 상등액을 취하여 동량의 Griess reagent(Sigma-Aldrich Co.)를 가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. NO의 활성 정도는 ELISA 판독기(Infinite M200 Pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 540 nm 흡광도를 측정하였다(22).

Cytokines 농도 측정: 배지로 희석시킨 막걸리 조다당(CP-M)을 세포에 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후 상등액으로 분비된 cytokines IL-6, IL-12의 양을 제조사의 지침에 따라 ELISA kit(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 사용하여 측정하였다(22).

막걸리 술덧 시료 분석

알코올 함량: 알코올 함량은 시료를 0.45 μ m syringe filter(Xpertek, Rivonia, Republic of South Africa)로 여과하여 GC(6890N, Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA)로 분석하였다. Column은 DB-ALC2(30 m×0.53 mm, 2 μ m film thickness, J & W Scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였고, oven 온도 70°C(isothermal), inlet 온도 200°C, detector FID 250°C의 분석조건에서 carrier gas는 helium을 사용하였다. 이상의 조건에서 표준물질 농도와 peak area로부터 표준곡선을 작성하여 각각의 알코올 함량을 산출하였다(23).

가용성 고형분 및 pH: 가용성 고형분 함량은 hand refractometer(Atago Pocket PAL-1, Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan)로 측정하여 °Brix, %로 표시하였고 pH는 pH meter(Horiba, Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였다(23).

총산(total acid): 총산은 시료 10 mL에 phenolphthalein 지시약 2~3방울을 가하여 표준 후 탈산수소 칼륨으로 표정한 0.1 N NaOH 용액으로 담녹색을 나타낼 때까지의 적정 mL 수를 다음 식에 의하여 초산(acetic acid)으로 환산하여 나타내었다(23).

$$\text{Total acid (acetic acid, \%)} = \text{mL of 0.1 N NaOH} \times 0.006 \times 10$$

일반성분 분석 방법: 총당 함량은 phenol-sulfuric acid 법으로 측정하였다(24). 즉 test tube에 증류수로 희석한 1%(w/v) CP-M 시료용액을 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 여액을 각각 1 mL씩 취하여 5% phenol 1 mL에 잘 혼합시켰다. 여기에 황산 5 mL를 첨가한 후 30분 반응시키고 490 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선으로부터 구해진 glucose의 함량으로 총당 함량을 계산하였다.

산성당 함량은 carbazole-sulfuric acid법으로 측정하였다(25). 1%(w/v) CP-M 용액을 각각 0.5 mL씩 취하고 0.125% carbazole(Sigma-Aldrich Co.) 0.25 mL를 가하여 잘 혼합시켰다. 여기에 진한 황산 3 mL를 가하고 85°C water bath에서 15분간 발색시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정

하여 검량선으로부터 구해진 β -D-galacturonic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 표준물질로 하여 함량을 계산하였다.

단백질 함량 측정은 Bradford method로 측정하였으며 표준물질로는 bovine serum albumin(Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였다(26).

구성당 분석: 구성당 분석은 Jones와 Albersheim(27)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 다당 시료를 2 M trifluoroacetic acid(TFA) 중에서 121°C, 1.5시간 반응시켜 가수분해 후 1 mL의 1 M NH₄OH 용액에 용해하여 10 mg NaBH₄로 4시간 환원시켰다. Acetic acid를 적당량 가하여 잔존하는 NaBH₄를 제거한 후 methanol을 가하며 반복 건조함으로써 과량으로 가해진 acetic acid를 제거하여 각 구성당에 상당하는 alditol로 전환하였다. 중성당의 구성을 알기 위해 각각의 alditol을 1 mL acetic anhydride를 가하여 121°C에서 30분 동안 반응시켜 alditol acetate로 전환시켰으며, 이를 chloroform/H₂O₂ 상 용매계로 분리하여 추출하고, 추출물은 건조 후 소량의 acetone에 용해하여 GC 분석용 시료로 사용하였다. 또 산성당의 구성을 분석하기 위하여 전환된 alditol을 증류수에 녹인 뒤 Sep-pak QMA Cartridge(Waters, Milford, MA, USA)에 전개하고, 1 M HCl로 aldonic acid를 분리하였다. 분리한 용액에 2 M TFA를 가하여 100°C에서 5분간 반응시켜 aldonolactone으로 전환시켰다. 그 후 chloroform/H₂O₂상 용매계로 분리하여 추출하고 건조하여 GC 분석 시료로 사용하였다. GC column은 SP-2380 capillary column(0.25 mm×30 m, 0.2 μ m film thickness, Supelco, Bellefonte, PA, USA)을, detector는 Flame ionization detector(FID, Young-In Co. Ltd., Seoul, Korea)를 사용하였고, carrier gas로서 N₂ gas를 1.5 mL/min으로 흘렸다. Injection 온도 250°C, detector 온도 270°C, column 온도는 60°C에서 220°C까지 30°C/min, 220°C에서 250°C까지 8°C/min의 조건 하에서 실험하였다. 각 구성당의 mole%는 각 유도체의 peak 면적, 분자량 및 FID에 대한 molecular response factor를 각각 산출하여 계산하였다.

통계분석

연구 결과 얻어진 자료는 SPSS(ver 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 기술 통계치(mean, SD)를 산출하였고, 대조군(Control)과 양성 대조군(LPS) 및 시료 처리군의 평균의 차이는 독립표본 t-test를 이용하여 유의성을 검증하였다($P < 0.05$, $P < 0.01$).

결과 및 고찰

접종 효모에 따른 술덧 시료의 면역 활성 평가

생체가 병원균 등의 외부 침입에 대해 방어기전으로 운용하고 있는 면역 기능 수행에는 비특이적인 작용을 위주하는 선천성 면역(innate immune)과 앞선 병원균의 침투에

대해 축적된 정보를 바탕으로 방어체계가 구축된 특이적인 작용 위주의 적응성 면역(adaptive immune)으로 나눌 수 있다. 이 중 침입에 대해 1차적인 방어막 역할을 하는 선천성 면역 중에서 macrophage는 침입체(병원성 세균 등)를 식균 작용(phagocytosis)으로 파괴하고, cytokines을 유리시켜 T 세포 등을 비롯한 기타 면역 작용 활성화에 기여하는 주요 역할을 담당하고 있다(28).

4종의 *S. cerevisiae* 각각으로 발효된 술덧에서 ethanol 침전법으로 분리한 조다당 시료(CP-M)를 peritoneal macrophages에 저농도(10 µg/mL)와 고농도(100 µg/mL)로 처리하였을 때 NO 생성량을 통해 macrophage 활성화 정도를 확인하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 CP-M 대신 멸균 증류수를 처리한 대조구는 NO 생성량이 9.2 µM이었으나 저농도 시료 처리구에서의 NO 생성량은 268-3 효모로 제조한 CP-M 처리구가 최저인 16.7 µM, 113-4 효모 제조 CP-M 처리구는 최고인 33.3 µM로 나타났다. 또한 고농도 시료 처리구의 경우 전반적으로 저농도 시료 처리구에 비해 NO 생성량이 증가하여 113-4 효모 제조 CP-M 처리에 의해 NO 생성량이 46.8 µM까지 증가하였다. 이는 양성 대조구로 사용한 LPS(2 µg/mL) 처리로 NO 생성량 42.8 µM 대비 1.1배 활성화된 수치였다. 사용한 효모의 종류에 따라 나타난 결과도 다양하여 macrophage 활성이 저농도 시료 처리구에서는 2.0배, 고농도 시료 처리구에서는 2.2배까지 증가하였다(Fig. 1).

효모의 종류에 따라 서로 다른 NO 활성화 유도능을 확인한 것과 마찬가지로 배양액의 cytokine 농도를 분석하는 것으로도 시료에 따른 면역세포 활성화 유도능의 차이를 확인할 수 있었다. 고농도 시료 처리구의 평균 IL-6 농도는 143.9~151.0 pg/mL로 서로 다른 효모로 발효된 CP-M 처리구 간에는 유의적인 차이가 없었으나 무처리구인 대조구의 농도 5.8 pg/mL에 비해 24.8~26.0배 증가하였다. 저농도 CP-M 시료 처리구에서는 고농도 CP-M 시료 처리구에 비해 발효 효모의 종류에 따른 차이가 크게 나타나 배양 상등액 중 IL-6의 농도가 가장 낮게 확인된 시료는 89-1-1

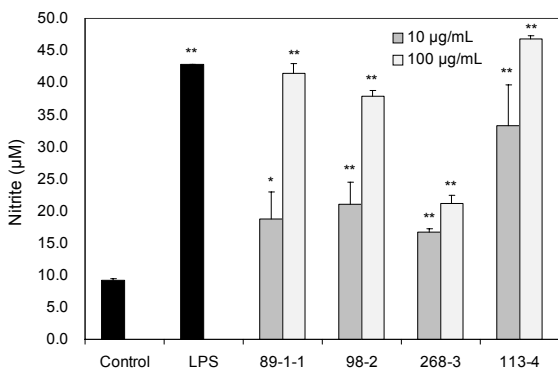


Fig. 1. Production of nitrite on peritoneal macrophage cells with CP-M from mash fermented by different yeast strain. The data are representative of three independent experiments and expressed as mean±SD. * P <0.05, ** P <0.01 vs. Control.

효모로 발효한 CP-M이었으며(68.2 pg/mL), 113-4 효모로 발효한 CP-M 처리에 의해서는 116.3 pg/mL의 IL-6가 생성되었다(Fig. 2-A). 배양 상등액 중의 IL-12 농도는 무처리구인 대조구의 경우 18.6 pg/mL였으나 저농도 CP-M 처리구에서는 발효에 사용된 효모의 종류에 따라 약간의 차이가 있어 49.1~59.8 pg/mL였으며, 고농도 CP-M 처리구에서는 이보다 증가한 72.6~75.1 pg/mL였다(Fig. 2-B). Lee 등(6)과 Lee 등(11)은 막걸리 발효에 관여하는 효모의 다양성과 다양한 효모에 의해 생성되는 막걸리의 향미적 특성 및 ethanol 생산성 등에 대해 보고한 바 있다. 앞선 연구들이 술을 만들기 위한 최적 효모 strain과 그 조건에 대해 연구를 한 것이며, 본 연구는 다른 첨가물이 없어도 알코올을 생성하는 효모 strain에 따라 면역세포를 자극하는 활성이 다르게 나타난다는 것을 확인하였다.

Macrophage로부터 생성된 NO 농도 및 cytokine 생성능을 고려했을 때 비교 대상이 된 4가지 효모 중 더 우수한 면역 활성화 효능이 기대되는 균주로 *S. cerevisiae* 113-4 효모를 선별하였다. 이후의 연구는 *S. cerevisiae* 113-4를 접종한 CP-M에 대하여 실시하였다.

발효온도에 따른 CP-M의 면역 활성 평가

S. cerevisiae 113-4를 접종하여 15, 20, 25, 30°C 온도 조건에서 2일의 주모 발효기간 포함 총 7일간을 발효하여

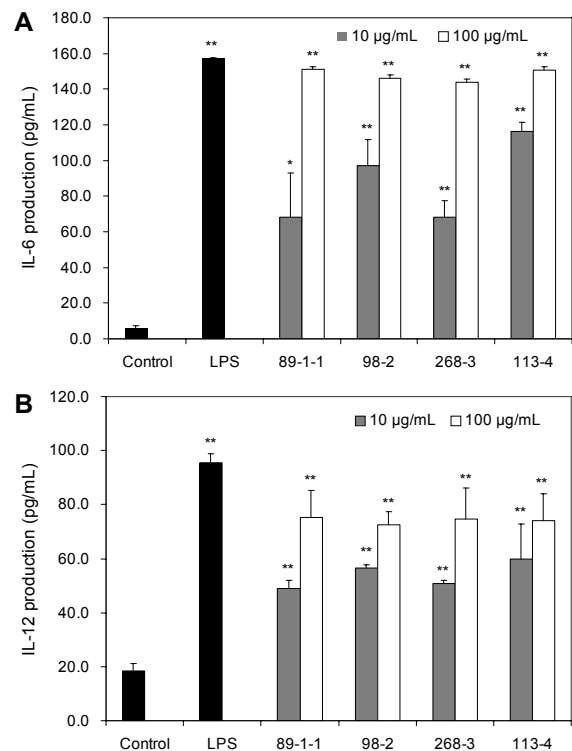


Fig. 2. Production of IL-6 (A) and IL-12 (B) of peritoneal macrophage cells with CP-M from mash fermented by different yeast strain. The data are representative of three independent experiments and expressed as mean±SD. * P <0.05, ** P <0.01 vs. Control.

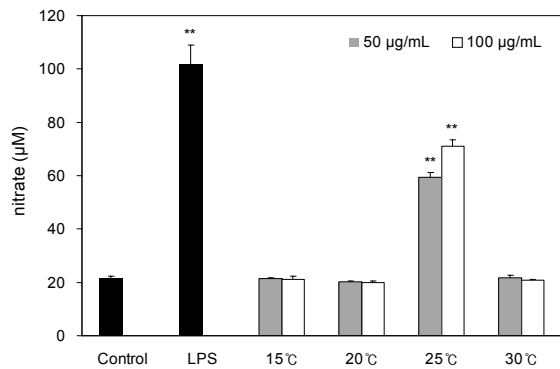


Fig. 3. Production of nitrite on peritoneal macrophage cells with CP-M from mash fermented by *S. cerevisiae* 113-4 at different temperature. The data are representative of three independent experiments and expressed as mean±SD. ***P*<0.01 vs. Control.

술덧을 만들었다. 여기에 ethanol 침전물을 분리해 만든 CP-M을 저농도(50 µg/mL)와 고농도(100 µg/mL)의 두 가지 농도로 peritoneal macrophages에 처리하였을 때 면역세포 활성화로 생성된 세포 배양 상등액 중의 NO 농도를 측정하였다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이 무처리 대조구에서의 NO 농도는 21.7 µM이었으나 25°C에서 발효한 CP-M을 저농도 처리했을 때는 59.2 µM, 고농도로 시료 처리했을 때는 71.0 µM을 생성하여 무처리구 대비 NO 농도가 2.7~3.3배까지 증가하였다. 그러나 25°C를 제외한 기타 배양온도에서 발효한 CP-M은 NO 농도에 있어 무처리구와 유의적인 차이가 없었다(Fig. 3).

또한 peritoneal macrophages 배양 상등액 중의 IL-6 농도 역시 NO 농도와 마찬가지로 25°C에서 발효한 CP-M을 처리하였을 때 가장 높았다(Fig. 4-A). 무처리 대조구의 IL-6 농도는 205.5 pg/mL였으나 25°C에서 발효한 CP-M은 저농도 처리했을 때 1,114.4 pg/mL, 고농도 처리했을 때 1,064.5 pg/mL로 무처리구에 비해 최고 5.4배 증가하였다. 그 밖에도 30°C에서 발효한 술덧 시료는 저농도를 처리했을 때 IL-6의 농도가 211.0 pg/mL로 무처리 대조구와 차이가 없었으나 고농도를 처리했을 때는 488.2 pg/mL로 CP-M 처리 농도가 2배 증가하는 동안 IL-6의 농도가 2.3배 증가하여, 면역세포에 처리한 시료의 농도가 50 µg/mL 이상의 높은 농도일 때 IL-6 생성을 유도하는 특성을 확인하였다. 그러나 다른 온도에서 발효한 술덧은 IL-6 생성 유도에 유의한 영향을 미치지 못하였다.

25°C를 제외한 기타 온도에서 발효한 대부분의 CP-M은 macrophage로부터 생성된 NO나 IL-6의 농도를 유의적으로 증가시키지 못하였으나 IL-12 농도에는 모든 시료가 무처리 대조구에 비해 유의적인 영향을 미쳤다(Fig. 4-B). 그 중 macrophage로부터 IL-12 생성을 가장 많이 유도한 시료는 25°C에서 발효한 CP-M으로, 무처리 대조구의 IL-12 농도는 418.7 pg/mL였으나 25°C 발효 CP-M 처리구는 최고 1,556.6 pg/mL까지 증가하였다. 전통주를 빚을 때 특정한 발효온도에 대한 지침은 없으나 20~28°C로 유지 또는

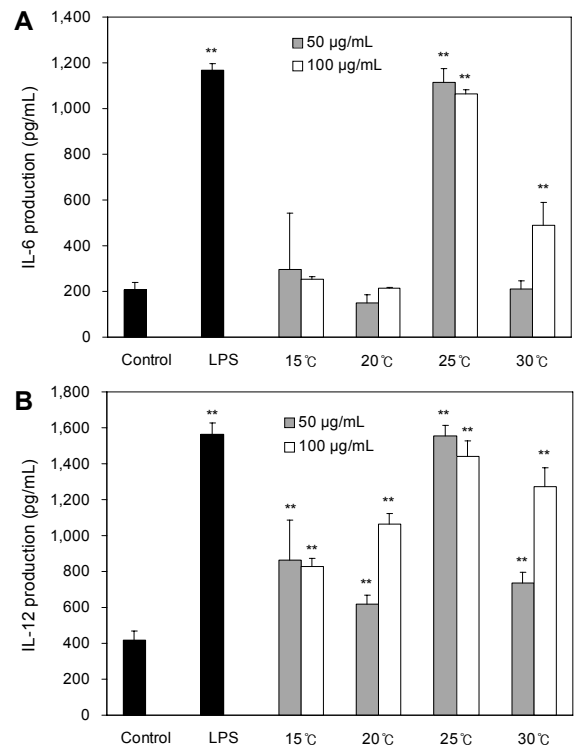


Fig. 4. Production of IL-6 (A) and IL-12 (B) of peritoneal macrophage cells with CP-M from mash fermented by *S. cerevisiae* 113-4 at different temperature. The data are representative of three independent experiments and expressed as mean±SD. ***P*<0.01 vs. Control.

조절하는 것이 일반적이다(29). 이 온도 범위를 유지해야 원활한 효모 증식으로 알코올 함량을 높일 수 있으며, 감패(甘敗)나 산패(酸敗)처럼 효모가 증식하지 못하거나 효모와 함께 잡균이 자라나 부발효가 일어나는 것을 억제할 수 있기 때문이다. 본 연구 결과에서 다른 온도에 비해 25°C에서 발효한 술덧 시료의 면역 활성 유도 효능이 컸던 것은 원재료나 기타 잡균에 의한 영향보다는 기능성 발현을 위해 집중한 효모의 생물학적 또는 생화학적 활성이 최대화되는 온도와 상관성이 있을 것으로 사료된다.

발효기간에 따른 술덧 시료의 면역 활성 평가

S. cerevisiae 113-4를 접종하여 25°C에서 10일간 각기 발효기간을 다르게 만든 막걸리 술덧 유래 조다당 시료(CP-M)가 면역 활성 유도에 미치는 영향을 관찰하였다. Peritoneal macrophages에 발효기간을 달리한 CP-M 시료 100 µg/mL씩 처리하여 생성된 NO 농도는 술덧을 만든 0일째 시료 19.7 µM, 3일째 시료 27.8 µM, 5일째 시료 44.2 µM, 10일째 시료 12.7 µM로 5일째 시료의 macrophage 활성화 효능이 가장 우수하게 나타났다(Fig. 5). 세포 배양 상등액 중 IL-6의 농도는 0~10일간 발효시킨 CP-M 처리구에서 2,135.1~6,619.8 pg/mL로 나타나 모두 대조구에 비해 농도가 높았다(Fig. 6-A). 그러나 발효 0일에 비해 IL-6의 농도가 67.4% 감소한 10일째의 시료를 제외하고는

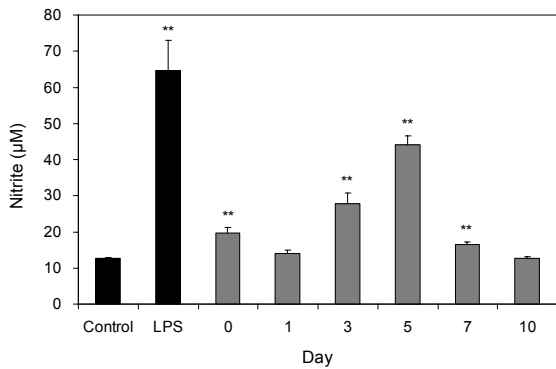


Fig. 5. Production of nitrite on peritoneal macrophage cells with CP-M from mash fermented by *S. cerevisiae* 113-4 during fermentation periods at 25°C. The data are representative of three independent experiments and expressed as mean±SD. ***P*<0.01 vs. Control.

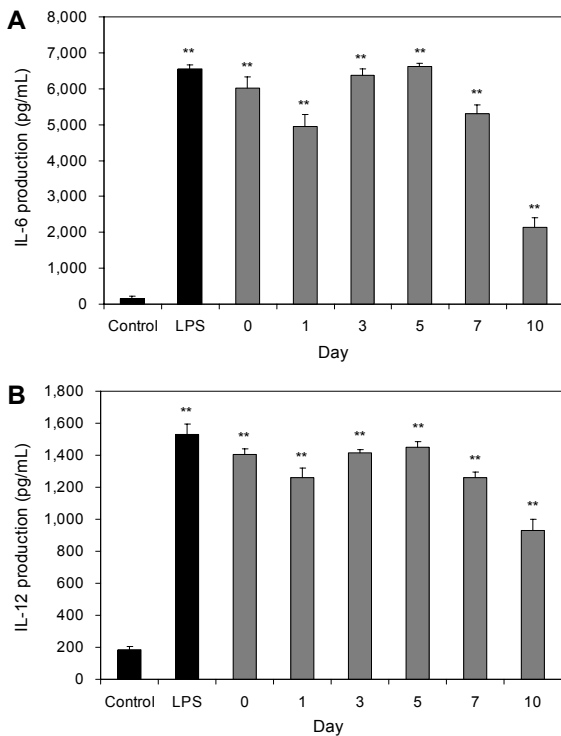


Fig. 6. Production of IL-6 (A) and IL-12 (B) on peritoneal macrophage cells with CP-M from mash fermented by *S. cerevisiae* 113-4 during fermentation periods at 25°C. The data are representative of three independent experiments and expressed as mean±SD. ***P*<0.01 vs. Control.

발효기간에 따른 시료 간의 유의차는 없었다. 마찬가지로 유도된 IL-12 생성 농도 역시 발효 전 기간의 모든 시료가 928.1~1,450.6 pg/mL로 무처리 대조구에 비해 크게 높았으나 발효 0일에 비해 IL-12의 농도가 39.4% 감소한 10일째의 CP-M 시료를 제외하면 CP-M 시료 간의 유의차는 없었다(Fig. 6-B).

막걸리 발효기간에 따른 특정 성분 변화나 기능성 변화에 대한 연구 결과 보고는 없으나 일반적인 특성 변화에 대한

Lee 등(30)의 연구 결과는 막걸리 발효 3~5일째에 효모의 수가 급격하게 증가하고 총산 함량은 가장 높게, pH는 가장 낮게 나타났다고 보고하였다. 미생물의 산 생성에 의해 조성된 산성의 환경은 발효 중인 막걸리 내의 성분 변화는 물론 효모, 유산균, 진균 등 자체 eco-system에도 영향을 미치므로 알코올 생성, 휘발성 물질 생성 등에 의미 있는 시기라고 할 수 있다. 그러나 본 연구의 결과에서는 이 시기는 주류로서 특성뿐 아니라 막걸리의 면역관련 기능성에도 영향을 미침을 확인할 수 있었다.

유효 CP-M의 특성 및 구성당 분석

체내에서 활성화된 macrophage는 IL-1, IL-6, IL-12, TNF-α 등의 cytokines을 생성하는 것으로 알려져 있다. 그중 IL-6는 IL-1, TNF-α와 함께 감염 초기 광범위한 면역 반응에 관여하고 있고, IL-12는 NK cells을 활성화시켜 암 세포 또는 virus에 감염된 세포를 파괴시킴으로 체내 정상화를 유지하도록 기여한다(28). *S. cerevisiae* 113-4 효모로 발효된 술덧에서 분리한 조다당 시료는 적절한 온도(25°C)와 발효기간(5일)을 거쳐 제조하였을 때 macrophage의 활성화 및 cytokines의 생산성을 높이는 데 관여하므로 이후 세포성 면역(cell-mediated immunity) 체계 활성화에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 기대할 수 있다. 술덧 시료의 일반적인 발효 특성은 Table 2에 나타내었다.

Table 2에 나타난 *S. cerevisiae* 113-4 효모를 접종하여 25°C에서 5일간 발효한 술덧의 품질 특성은 alcohol 함량 16.8%, 고형분 함량은 9.9°Brix, pH는 3.7, 총산도는 0.56%로 조사되었다. Park 등(10)의 보고에 의하면 당과 물을 첨가하는 제성(製成) 과정을 거쳐 시판되는 시중 막걸리의 알코올 도수는 5.7~7.5%로 면역증진 활성이 우수한 조다당 생성균주인 *S. cerevisiae* 113-4는 주류 제조용 효모로도 활용 가치가 있을 것으로 사료된다. 또한 *S. cerevisiae* 113-4로 발효된 술덧의 고형분 함량은 담금법이나 증자한 쌀과 물의 비율에 따라 다르긴 하지만 Park 등(10)의 연구와 비교할 수 있다. Park 등(10)은 담금 당일에는 고형분 함량이 5.6~6.4°Brix이었으나 발효 5일째에는 본 연구와 같이 입국을 사용한 발효법의 경우 가용성 8.6°Brix까지 높아진다고 하였는데 본 연구의 술덧은 이보다는 높은 함량을 보였다.

전통주 술덧은 주모, 입국, 곡자 등과 덧밥을 담금 급수에 첨가한 전체 물료(物料)를 말하는 것으로 우리의 전통주 제

Table 2. Characteristics of CP-M from mash fermented by *S. cerevisiae* 113-4 for 5 days at 25°C

	Makgeoli mash
Alcohol (%)	16.8±0.00 ¹⁾
Soluble solid (°Brix, %)	9.9±0.21
pH	3.7±0.01
Total acid (%)	0.56±0.01

¹⁾Mean±SD.

Table 3. Chemical composition of CP-M from mash fermented for 5 days by *S. cerevisiae* 113-4 at 25°C

Contents	
Chemical composition (%)	
Neutral sugar ¹⁾	78.6±6.4 ⁶⁾
Acidic polysaccharide ²⁾	11.6±1.4
Protein ³⁾	9.8±0.1
Component of neutral sugar ⁴⁾	(mole%) ⁵⁾
2-Methyl fucose	0.0
Rhamnose	0.8
Fucose	0.0
2-Methyl xylose	0.0
Arabinose	2.7
Xylose	6.5
Apiose	0.0
Aceric acid	0.0
Mannose	47.8
Galactose	12.7
Glucose	29.6

¹⁾Phenol-sulfuric acid method.

²⁾m-Hydroxydiphenyl method, galacturonic acid+glucuronic acid.

³⁾Bradford method.

⁴⁾A gas chromatographic method for aldose analysis.

⁵⁾Mole% was calculated from the detected total carbohydrate.

⁶⁾Mean±SD.

조 과정에서는 이것을 걸러 약주와 탁주 등을 만든다(29). 앞서 결과를 제시한 면역 활성 평가실험에는 *S. cerevisiae* 113-4 활용 막걸리 술덧으로부터 조다당 시료(CP-M)를 만들어 사용하였다. 해당 시료에 대한 주요 성분 함량과 구성당 조성을 분석한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같이 중성당 함량 78.6%, 산성다당 11.6%, 단백질 9.8%로 다당 성분의 비율이 90.2%임을 확인하였다.

중성당의 구성당 비율을 살펴보면 mannose(47.8 mole%)의 함량이 매우 높고 glucose(29.6 mole%)와 galactose(12.7 mole%) 순으로 높은 비율을 차지하고 있었는데, 이들 3종의 다당류의 합은 전체 구성당의 90.1%를 차지했다(Table 3). 이러한 술덧의 당 구성은 원료 또는 발효과정 중 미생물 증식과 관련하여 유래한 것일 수 있다. 그러나 원료인 쌀에서 찾을 수 있는 구성당의 비율은 mannose가 glucose에 비해 매우 적거나 미미한 수준인 것으로 이전의 논문들은 보고하고 있다(31,32). 한편 Giovanni 등(33)은 포도 추출물 배지에 *Saccharomyces* sp.를 접종하여 배양한 배지 상등액의 다당 구성당을 분석한 결과를 제시하였는데 다양한 효모가 생성한 exocellular polysaccharide의 주요 구성당은 mannose, glucose, galactose라고 보고하였다. 이 연구에서 *Saccharomyces* sp.의 경우 생성 다당의 구성당 중 가장 함량이 높았던 mannose의 구성 비율은 84~93%, glucose는 7~16%라고 하였다. 또한 양조에 사용되는 *S. cerevisiae* 효모의 세포벽은 mannoprotein 30~50%, 1,6-β-glucan 5~10%, 1,3-β-glucan 30~45%, chitin 1.5~6%로 구성되어 있는데 이 중 mannoprotein은 균체 세포벽 최외각에 연결되어 있으면서 exocellular poly-

saccharide 형태로 배양 배지(또는 발효 기질)로 배출되고, 배출되는 양은 효모의 strains이나 배양 조건에 영향을 받는다고 하였다(34). 술덧 유래 조다당 시료는 생성되는 발효 특성이나 조성 특성을 고려할 때 효모에 의해 생성된 exocellular polysaccharide로 추정된다.

서양의 wine은 과실을 발효시키는 다양한 효모와 이들이 생성하는 유효 물질에 대한 연구가 많이 진행되어 있다. 그러나 전통주인 막걸리의 경우 아직 이에 대한 구체적인 규명이 미미하다. 본 연구에서는 막걸리의 우세 균주인 효모 선별과 그 발효 조건에 따라 술덧의 면역증강 활성 발현에 영향을 미칠 수 있음을 확인하였고, 원심분리 후 얻어진 술덧 유래 조다당 시료는 mannose 함량이 높은 효모 유래의 다당 분획일 것으로 추정하였다. 우리나라는 예로부터 전통주를 담그기 위한 다양한 발효법을 전승하고 있고, 발효에 관여하는 균종 또한 다양하다. 이를 바탕으로 기능에 맞는 균주를 선별하고 발효 공정을 개발한다면 와인에 뒤지지 않는 기능성을 내세울 수 있을 뿐 아니라 더 나아가 기능성 소재 개발까지도 가능할 것이라 여겨진다.

요 약

본 연구에서는 가장 대중적인 한국의 전통주 막걸리의 제조 과정이 기능성 분획에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. *Saccharomyces cerevisiae* 균주별, 발효온도별, 발효기간별로 다르게 만든 막걸리로부터 ethanol 침전법을 이용해 crude polysaccharides(CP-M)를 분리하여 peritoneal macrophage 활성화 효과와 세포 배양액 중의 interleukin(IL)-6와 -12 농도에 미치는 영향을 조사하였다. *S. cerevisiae* 89-1-1, 98-2, 268-3, 113-4의 4가지 효모 중 *S. cerevisiae* 113-4로 발효한 CP-M을 peritoneal macrophage에 10 µg/mL 처리했을 때 세포 배양액 중 nitric oxide(NO) 농도 33.3 µM로 가장 높았으며, IL-6와 -12의 농도 역시 116.3 pg/mL와 59.8 pg/mL로 가장 높게 나타났다. *S. cerevisiae* 113-4를 접종하여 온도별로 발효한 발효물에서 분리한 CP-M 중 25°C에서 발효 후 얻은 CP-M을 peritoneal macrophage 세포에 처리했을 때, NO 농도가 Control 대비 2.7~3.3배, IL-6 농도는 5.7배까지 증가하였다. 그러나 15, 20, 30°C에서 발효하여 얻은 CP-M의 경우 peritoneal macrophage의 NO와 IL-6 생성량에는 Control(무처리구)과 비교하여 영향이 없었다. 발효기간별 영향을 관찰한 결과 5일째 술덧에서 분리한 CP-M에 의한 NO 생성량이 가장 높아 0일째 MCP에 비해 2.2배 증가하였다. 그러나 급격하게 IL-6와 -12의 농도가 감소한 10일째 MCP를 제외하고는 발효기간에 따른 IL-6와 -12의 유의적인 농도 차이는 없었다. 이상의 결과에서 가장 활성이 좋은 발효 조건은 *S. cerevisiae* 113-4를 접종하여 25°C에서 5일간 발효시킨 술덧의 CP-M이었다. 이때 CP-M의 조성은 neutral sugar 함량 78.6%, acidic polysaccharide 11.6%,

단백질 9.8%였다. 특히 neutral sugar의 구성당 비율은 mannose 47.8 mole%, glucose 29.6 mole%, galactose 12.7 mole%였다. 이상의 결과에서 면역증강 활성이 있는 기능성 조다당 CP-M은 mannose 함량이 높은 yeast 유래의 extracellular polysaccharide로 추정하였다.

REFERENCES

- Kwon HJ. 2012. *Sool; Hot craft vol. 8*. Mijinsa Publisher, Seoul, Korea. p 12-17.
- Yum SK. 2011. The history of *Makoli* industry in Korea. *Food Sci Ind* 44(4): 18-27.
- Shin MO, Kang DY, Kim MH, Bae SJ. 2008. 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.
- Yoon SS, Choi JA, Kim KH, Song TS, Park YS. 2012. Populations and potential association of *Saccharomyces cerevisiae* with lactic acid bacteria in naturally fermented Korean rice wine. *Food Sci Biotechnol* 21: 419-424.
- Jeon MJ, Kim M, Lee DG, Hwang H, Kang MS, Kim BK, Lee SW, Jang HJ, Lee SH. 2012. Analysis and properties of *Makgeollies* made by isolated yeast strains from traditional *Makgeollies*. *KSBB J* 27: 21-27.
- Lee H, Park CS, Choi JY. 2010. Quality characteristics of the mashes of *Takju* prepared using different yeasts. *Korean J Food Sci Technol* 42: 56-62.
- Jung HK, Park CD, Park HH, Lee GD, Lee IS, Hong JH. 2006. Manufacturing and characteristics of Korean traditional liquor, Hahyangju prepared by *Saccharomyces cerevisiae* HA3 isolated from traditional *Nuruk*. *Korean J Food Sci Technol* 38: 659-667.
- Lee SS, Kim KS, Eom AH, Sung CK, Hong IP. 2002. Production of Korean traditional rice-wines made from cultures of the single fungal isolates under laboratory conditions. *Korean J Mycol* 30: 61-65.
- Kang HR, Lee AR, Kwon YH, Kim JH, Kim HR, Ahn BH. 2012. Optimization of culture conditions for the yeast and analysis of qualities of *Makgeolli* brewed with the yeast isolated from Korean traditional *Nuruk*. *Korean J Mycol* 40: 204-209.
- Park CW, Jang SY, Park EJ, Yeo SH, Jeong YJ. 2012. Quality characteristics of rice *Makgeolli* prepared by mashing types. *Korean J Food Sci Technol* 44: 207-215.
- Lee DH, Kang HY, Lee YS, Cho CH, Kim SJ, Lee JS. 2011. Effects of yeast and *Nuruk* on the quality of Korean *Yakju*. *Korean J Microbiol Biotechnol* 39: 274-280.
- Lee TJ, Hwang DY, Lee CR, Sohn HJ. 2009. Changes in yeast cell number, total acid and organic acid during production and distribution processes of *Makgeolli*, traditional alcohol of Korea. *Korean J Microbiol* 45: 391-396.
- Yang JY, Lee KH. 1996. Shelf-life and microbiological study of *Sansung Takju*. *Korean J Food Sci Technol* 28: 779-785
- Ji YJ, Chung HJ. 2012. Changes in quality characteristics of *Makgeolli* during storage time. *Korean J Food Culture* 27: 383-390.
- Lee SJ, Kim JH, Jung YW, Park S, Shin WC, Park CS, Hong S, Kim GW. 2011. Composition of organic acids and physiological functionality of commercial *Makgeolli*. *Korean J Food Sci Technol* 43: 206-212.
- Kim JY, Kim D, Park P, Kang HI, Ryu EK, Kim SM. 2011. Effects of storage temperature and time on the biogenic amine content and microflora in Korean turbid rice wine, *Makgeolli*. *Food Chem* 128: 87-92.
- Kim BK, Kang MS, Jeon MJ, Lee SH, Kim M. 2013 Effects of *Makgeolli* and *Makgeolli* precipitate on hepatotoxicity and serum lipid content in rats. *J Life Sci* 23: 282-289.
- Kwon RH, Chae GY, Ha BJ. 2011. The effects of the *Makgeolri* on the antioxidative activity in the endotoxin LPS-treated rats. *J Fd Hyg Safety* 26: 166-170.
- Cho EK, Kim HY, Byeon HJ, Kim SW, Choi YJ. 2010. Nitrite scavenging and alcohol metabolizing activities of hot water extract from *Makgeoly* and its angiotensin converting enzyme inhibitory effect. *J Life Sci* 20: 768-774.
- Kang MG, Kim JH, Ahn BH, Lee JS. 2012. Characterization of new antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from Korean traditional rice wine. *J Microbiol Biotechnol* 22: 339-342.
- Lee SJ, Shin WC. 2011. Physiological functionalities of *Makgeolli* (Korean paradox). *Food Sci Ind* 44(4): 2-11.
- Nam SH, Rhee YK, Hong HD, Lee YC, Kim YC, Shin KS, Cho CW. 2012. Immuno-modulatory activity of the crude polysaccharide from wild ginseng adventitious root. *Korean J Food & Nutr* 25: 755-761.
- The distribution of liquor. The regulation for liquor analysis. http://taxinfo.nts.go.kr/docs/customer/search/total_search.jsp?body=&url=&mode=&sd_mode=none&coll=total&query=%C1%D6%B7%F9%BA%D0%BC%AE%B1%D4%C1%A4 (accessed Dec 2010).
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
- Bruce WZ, Kenneth CF, Barry HG, Fred SN. 1995. *Wine analysis and production*. Chapman & Hall, New York, NY, USA. p 370-372.
- Bruce WZ, Kenneth CF, Barry HG, Fred SN. 1995. *Wine analysis and production*. Chapman & Hall, New York, USA. p 447-449.
- Jones TM, Albersheim P. 1972. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol* 49: 926-936.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. 2002. *Immunology*. 6th ed. Mosby, Edinburgh, UK. p 148-162.
- Bae SM. 2006. *Production for traditional liquor (Yakju · Takju)*. 2nd ed. Woogok Publisher, Seoul, Korea. p 161-184.
- Lee TJ, Hwang DE, Lee CR, Sohn HJ. 2009. Changes in yeast cell number, total acid and organic acid during production and distribution processes of *Makgeolli*, traditional alcohol of Korea. *Korean J Microbiol* 45: 391-396.
- Lee MK, Kim YM, Park JS, Na HS. 2012. Nutritional characteristics of pigmented rice. *Korean J Food Preserv* 19: 235-242.
- Shyama Prasad Rao R, Sai Manohar R, Muralikrishna G. 2007. Functional properties of water-soluble non-starch polysaccharides from rice and ragi: Effect on dough characteristics and baking quality. *LWT-Food Sci Technol* 40: 1678-1686.
- Giovani G, Rosi I, Bertuccioli M. 2012. Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non-saccharomyces yeast strains during alcoholic fermentation. *Int J Food Microbiol* 160: 113-118.
- Klis FM, Boorsma A, De Groot PW. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 185-202.