



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0036873
(43) 공개일자 2019년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/00 (2016.01) A23L 19/10 (2016.01)
A23L 29/00 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/00 (2016.08)
A23L 19/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0126307
(22) 출원일자 2017년09월28일
심사청구일자 2017년09월28일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)
(주)디케이에코팜
충청남도 천안시 동남구 병천면 개목고개길
113-2 ()
(72) 발명자
이삼빈
대구광역시 달서구 선원로 171, 102동 306호 (이
곡동, 성서무지개타운)
박지현
대구광역시 수성구 범어로 73, 204동 1105호 (범
어동, 범어에스케이뷰아파트2단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

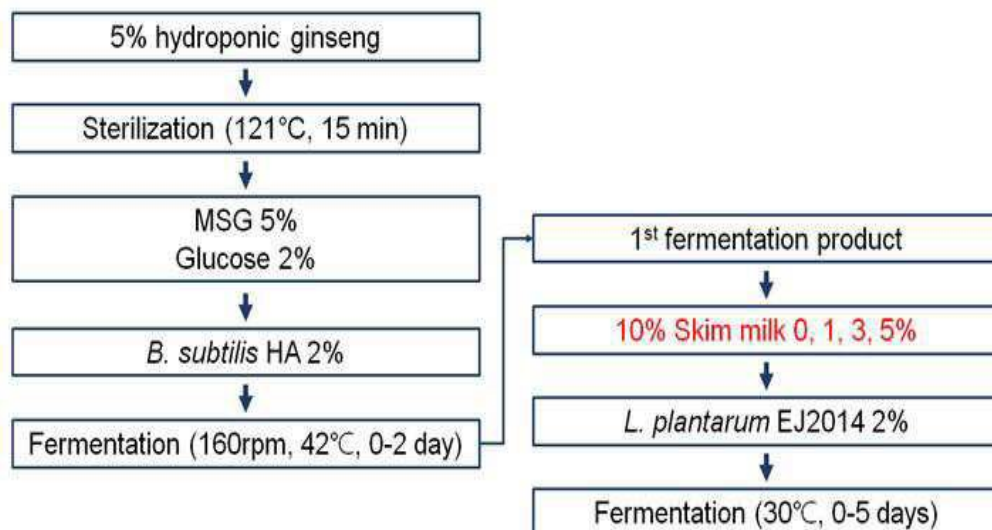
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 수경재배인삼을 이용한 복합발효를 통해 기능성 물질이 강화된 발효물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 수경재배인삼을 이용한 복합발효를 통해 기능성 물질이 강화된 발효물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에서는 수경인삼 파쇄물을 모노 소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 및 고초균으로 1차 발효한 후, 탈지유 및 젖산균으로 2차 발효하여 복합발효물을 제조하였으며, 상기 수경인삼을 이용한 복합발효는 점질물[폴리감마글루탐산(γ -polyglutamic acid; γ -PGA)], 펩타이드(티로신), 감마-아미노뷰티르산(γ -aminobutyric acid; GABA) 등의 다양한 기능성 물질이 증진된 발효물을 생산하며, 상기와 같은 효과를 가지는 발효물은 기능성 소재 개발에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23L 29/065 (2016.08)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2250/2124 (2013.01)

A23Y 2220/67 (2013.01)

(72) 발명자

김지은

대구광역시 달서구 계대동문로 99, 206동 1002호
(이곡동, 청서보성화성타운)

김근영

대구광역시 수성구 지범로39길 56, 103동 811호 (범물동, 범물보성타운)

최지연

대구광역시 중구 달구벌대로 1937, 2동 103호 (대신동, 동서타운아파트)

홍의기

서울특별시 노원구 한글비석로15길 51, 203동 305호 (중계동, 현대아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 116142-1

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발사업

연구과제명 수경재배인삼을 활용한 향산화 및 면역증강효과가 있는 발효음료개발

기 여 율 1/1

주관기관 계명대학교 산학협력단

연구기간 2016.12.05 ~ 2017.12.04

명세서

청구범위

청구항 1

수경인삼을 이용하여 파쇄물을 제조하는 제 1단계;

상기 파쇄물을 멸균시키는 제 2단계;

상기 멸균된 파쇄물 100 중량부에 대하여 모노 소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 1 내지 8 중량부 및 글루코즈 1 내지 5 중량부를 첨가하여 1차 혼합물을 제조하는 제 3단계;

상기 1차 혼합물에 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA) 균주 스타터를 접종 및 배양하여 1차 발효물을 획득하는 제 4단계;

상기 1차 발효물 100 중량부에 대하여 탈지유 20 내지 150 중량부를 첨가하여 2차 혼합물을 제조하는 제 5단계; 및

상기 2차 혼합물에 락토바실러스 플란타룸 EJ2014(*Lactobacillus plantarum* EJ2014 (KCCM11545P) 균주 스타터를 접종 및 배양하여 2차 복합발효물을 획득하는 제 6단계;

를 포함하는 기능성 물질이 강화된 복합발효물의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 제 4단계의 바실러스 서브틸리스 HA 균주 스타터는 상기 제 3단계의 1차 혼합물 100 중량부에 대하여 1 내지 10 중량부로 접종하는 것을 특징으로 하는 기능성 물질이 강화된 복합발효물의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 제 4단계의 1차 발효는 30℃ 내지 50℃의 발효 온도에서 1 내지 3일 동안 진행되는 것을 특징으로 하는 기능성 물질이 강화된 복합발효물의 제조방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 제 4단계의 바실러스 서브틸리스 HA가 상기 제 3단계에서 혼합한 모노 소듐 글루타메이트를 폴리감마글루탐산(γ -polyglutamic acid; γ -PGA)으로 전환시키는 것을 특징으로 하는 기능성 물질이 강화된 복합발효물의 제조방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 제 6단계의 락토바실러스 플란타룸 EJ2014 균주 스타터는 상기 제 5단계의 2차 혼합물 100 중량부에 대하여 1 내지 10 중량부로 접종하는 것을 특징으로 하는 기능성 물질이 강화된 복합발효물의 제조방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 제 6단계의 2차 복합발효는 25℃ 내지 35℃의 발효 온도에서 1 내지 7일 동안 진행되는 것을 특징으로 하는 기능성 물질이 강화된 복합발효물의 제조방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 제 6단계의 락토바실러스 플란타룸 EJ2014가 상기 제 5단계에서 혼합한 탈지유를 분해하여 펩타이드를 생성하는 것을 특징으로 하는 기능성 물질이 강화된 복합발효물의 제조방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 제 6단계의 락토바실러스 플란타룸 EJ2014가 1차 발효물에 잔존하는 모노 소듐 글루타메이트를 감마-아미노뷰티르산(γ -aminobutyric acid; GABA)으로 전환시키는 것을 특징으로 하는 기능성 물질이

강화된 복합발효물의 제조방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 기능성 물질은 폴리감마글루탐산, 감마-아미노뷰티르산 및 펩타이드(티로신)인 것을 특징으로 하는 기능성 물질이 강화된 복합발효물의 제조방법.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 하나의 항에 따른 제조방법에 의해 제조된 기능성 물질이 강화된 복합발효물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 수경재배인삼을 이용한 복합발효를 통해 기능성 물질이 강화된 발효물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고초균은 전통적인 콩 발효식품에서 발견되는 유용 발효 미생물로서 단백질, 탄수화물, 혈전 등을 분해하는 다양한 효소뿐만 아니라 점질물인 폴리감마글루탐산(γ -polyglutamic acid; γ -PGA), 펩타이드 등을 생산하는 특징을 가진다. 폴리감마글루탐산은 글루탐산이 중합된 고분자 중합체로 면역증진 또는 칼슘 흡수를 도와 식약처로부터 인정된 건강기능성 식품 소재이다. 따라서 콩을 포함한 다양한 원료로부터 가수분해 효소를 포함한 점질물을 다량 생산하기 위해서는 점질물 생산능이 우수한 고초균의 분리 및 활용이 요구된다. 특히, 고초균을 이용한 전통 발효제품의 고유한 풍미는 소비자들의 기호성에 부정적으로 영향을 미치기 때문에 고초균 발효물을 식품소재 등으로 활용하기 위해서는 유용 고초균의 선발 및 발효 환경의 조건을 최적화하여 최종 발효제품의 기호성을 개선하는 것이 필요하다. 또한, 전통 발효제품에 있어서 원료 성분 외에 미생물로부터 생산되는 다양한 기능성 물질의 강화는 제품의 부가가치를 높이는 수단이 될 수 있다.

[0003] 젖산균은 대표적인 프로바이오틱스(probiotics)로서 당류를 발효해서 젖산을 생성하는 세균으로 발효유, 간장, 된장, 치즈, 김치 및 유제품 등 전통적인 발효식품 제조에 스타터(starter)로서 이용되고 있다. 또한, 젖산균에 의한 젖산발효, 단백질 및 지방분해 작용으로 발효식품의 저장성을 높이며 풍미를 향상시킨다. 최근 젖산균이 정장작용 및 면역증진 등 건강에 좋다는 인식이 확산 되면서 젖산균을 이용한 식품 산업이 다양해지고 이를 이용한 제품개발이 활발해지고 있다.

[0004] 한편, 인삼은 일반적으로 생육이 느리고 성숙기간이 길어 3년이 되어야 개화하는 것으로 알려져 있다. 인삼은 최소 4년 동안 재배하여야 상품성을 인정받을 수 있으며, 번식에 필요한 종자를 얻기 위해서는 보통 4년 근에서 채취하는 것을 원칙으로 하고 있다. 이러한 노지 재배의 문제점을 해결하기 위하여, 인삼을 보다 쉽게 재배하고, 수확률을 높이는 기술로서 수경재배 방법이 이용되고 있다. 수경 재배 방법은 온실 내부의 재배 베드에 묘삼을 정식한 다음, 정식된 묘삼에 각종 영양분이 포함되어 있는 양액을 공급하고, 온실 내부의 온도, 습도, 통풍 및 햇빛양을 최적의 상태로 조절하여 인삼을 생육하는 방법이다. 수경재배 방법은 인삼의 생육환경을 인위적으로 조절이 가능하여 유지관리가 쉽고, 생산성이 높은 경제적인 재배 방식에 해당하며, 농약을 사용하지 않는 청정한 인삼으로 사포닌의 함량 또한 높아서 다양한 산업의 소재로서 각광받고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1614929호 (2016.04.18 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 수경재배인삼을 이용한 복합발효를 통해 기능성 물질이 강화된 발효물 및 이의 제조방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 수경인삼을 이용하여 과쇄물을 제조하는 제 1단계; 상기 과쇄물을 멸균시키는 제 2단계; 상기 멸균된 과쇄물 100 중량부에 대하여 모노 소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 1 내지 8 중량부 및 글루코즈 1 내지 5 중량부를 첨가하여 1차 혼합물을 제조하는 제 3단계; 상기 1차 혼합물에 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA) 균주 스타터를 접종 및 배양하여 1차 발효물을 획득하는 제 4단계; 상기 1차 발효물 100 중량부에 대하여 탈지유 20 내지 150 중량부를 첨가하여 2차 혼합물을 제조하는 제 5단계; 및 상기 2차 혼합물에 락토바실러스 플란타룸 EJ2014(*Lactobacillus plantarum* EJ2014 (KCCM11545P) 균주 스타터를 접종 및 배양하여 2차 복합발효물을 획득하는 제 6단계;를 포함하는 기능성 물질이 강화된 복합발효물의 제조방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 기능성 물질이 강화된 복합발효물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에서는 수경인삼 과쇄물을 모노 소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 및 고초균으로 1차 발효한 후, 탈지유 및 젖산균으로 2차 발효하여 복합발효물을 제조하였으며, 상기 수경인삼을 이용한 복합발효는 점질물[폴리감마글루탐산(γ -polyglutamic acid; γ -PGA)], 펩타이드(티로신), 감마-아미노뷰티르산(γ -aminobutyric acid; GABA) 등의 다양한 기능성 물질이 증진된 발효물을 생산하며, 상기와 같은 효과를 가지는 발효물은 기능성 소재 개발에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 수경인삼 과쇄물, 모노 소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG), 글루코즈 및 고초균(*B. subtilis* HA)을 이용하여 제조된 1차 수경인삼 발효물의 발효 공정을 도시하여 나타낸 것이다.

도 2는 상기 도 1의 1차 수경인삼 발효물, 탈지유 및 젖산균(*L. plantarum* EJ2014)을 이용하여 제조된 2차 수경인삼 복합발효물의 발효 공정을 도시하여 나타낸 것이다.

도 3은 2차 수경인삼 복합발효 중 젖산균에 의한 감마-아미노뷰티르산(γ -aminobutyric acid; GABA) 생성 중 가스 발생을 나타낸 것이다.

도 4는 1차 수경인삼 발효물의 pH 및 산도를 측정한 것이다.

도 5는 1차 수경인삼 발효물의 점질물 및 점조도를 측정한 것이다.

도 6은 1차 수경인삼 발효물 및 2차 수경인삼 복합발효물의 pH 및 산도를 측정한 것이다.

도 7은 1차 수경인삼 발효물 및 2차 수경인삼 복합발효물의 생균수를 측정한 것이다.

도 8은 1차 수경인삼 발효물 및 2차 수경인삼 복합발효물의 티로신 함량을 측정한 것이다.

도 9는 탈지유 농도에 따른 2차 수경인삼 복합발효물의 GABA 함량을 측정한 것이다.

도 10은 2차 수경인삼 복합발효물의 발효 전, 후 세포 독성을 측정한 것이다.

도 11은 2차 수경인삼 복합발효물의 발효 전, 후 일산화질소(NO) 생성량을 측정한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명의 발명자들은 사포닌 함량이 높은 수경인삼을 천연 원료로 이용하고, 유용 미생물인 고초균과 젖산균의 혼합 발효를 통해 기능성 물질의 생산을 최적화함으로써 기능성 소재를 개발하고자 하였다.

[0012] 이에, 수경인삼 과쇄물을 모노 소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG), 글루코즈 및 고초균으로 1차 발효한 후, 탈지유 및 젖산균으로 2차 발효하여 복합발효물을 제조하였으며, 상기 복합발효가 폴리감마글루탐산(γ -polyglutamic acid; γ -PGA), 펩타이드, 감마-아미노뷰티르산(γ -aminobutyric acid; GABA) 등 다양한 기능성 물질을 강화시키는 것을 확인하며 본 발명을 완성하였다.

- [0014] 따라서 본 발명은 수경인삼을 이용하여 과쇄물을 제조하는 제 1단계; 상기 과쇄물을 멸균시키는 제 2단계; 상기 멸균된 과쇄물 100 중량부에 대하여 모노 소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 1 내지 8 중량부 및 글루코즈 1 내지 5 중량부를 첨가하여 1차 혼합물을 제조하는 제 3단계; 상기 1차 혼합물에 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA, 또는 JL) 균주 스타터를 접종 및 배양하여 1차 발효물을 획득하는 제 4단계; 상기 1차 발효물 100 중량부에 대하여 탈지유 20 내지 150 중량부를 첨가하여 2차 혼합물을 제조하는 제 5단계; 및 상기 2차 혼합물에 락토바실러스 플란타룸 EJ2014(*Lactobacillus plantarum* EJ2014 (KCCM11545P) 균주 스타터를 접종 및 배양하여 2차 복합발효물을 획득하는 제 6단계;를 포함하는 기능성 물질이 강화된 복합발효물의 제조방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명에서 사용된 용어 "스타터(starter)"는 발효물을 제조하는 경우에 사용하는 미생물 배양액을 말한다. 따라서 스타터 미생물의 종류는 그 제품의 특성을 결정하게 되며 제품의 품질에 중요한 영향을 미친다. 일반적으로 미생물 중에서 스타터로 사용되고 있는 것은 박테리아, 곰팡이, 효모 등이 있으며, 이것을 단독 혹은 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0018] 본 발명에 사용된 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)(KCCM 10775P) 균주는 전통 청국장에서 분리 및 동정한 균주로서, 한국등록특허 제10-0864850호(등록일 2008.10.16)에 개시되어 있다.
- [0020] 본 발명에서 사용된 용어 "점질물"은 "폴리감마글루탐산(γ -polyglutamic acid; γ -PGA)"이 포함되어 있으며, 상기 γ -PGA는 글루탐산 단량체(monomer glutamic acid)의 α -아미노기와 γ -카르복실기 사이의 아미드 결합(amide linkage)에 의해 결합된 동중 중합체(homopolymer)이다. 일본의 전통발효식품인 낫토(natto)의 점액성 물질이 고초균(*Bacillus*)에 의해 생산되는 대표적인 γ -PGA로서 바실러스 낫토 사와무라(*Bacillus natto* Sawamura)에 의해 생산되었다는 보고가 있다. 일반적으로 γ -PGA는 수용성, 음이온성, 무독성, 생분해성, 생체 적합성, 식용 등의 다양한 특성이 있기 때문에 다양한 분야에서 응용되고 있다.
- [0022] 본 발명에서 사용된 락토바실러스 플란타룸 EJ2014(*Lactobacillus plantarum* EJ2014) 균주는 한국미생물보존센터에 KCCM 11545P로 수탁하였다.
- [0024] 본 발명에서 사용된 용어 "티로신(Tyrosine)"은 단백질을 구성하는 20가지의 표준 아미노산 중 하나로서, 비필수아미노산인 동시에 방향족 아미노산이다. 뇌의 신경세포의 전달물질 중 중요한 도파민, 에피네프린, 노르에피네프린, 갑상선 호르몬, 피부의 멜라닌 성분의 생성에 필요한 성분으로 알려져 있다. 또한, 스트레스를 다스리고 집중력 향상에 효과가 있는 아미노산으로서, 우울증 및 치매 치료에 사용되기도 한다.
- [0025] 한편, 본 발명에서는 발효물의 펩타이드(peptide) 생성 정도를 측정하기 위하여 발효물 중에 존재하는 티로신 함량을 측정한 것이며, 상기 펩타이드가 티로신으로 한정된 것은 아님을 명시한다.
- [0027] 본 발명에서 사용된 용어 "감마-아미노뷰티르산(γ -amino butyric acid; GABA)"은 4-아미노뷰티르산으로써 L-글루타메이트(L-glutamate) 기질이 탈탄산 반응에 의해 생성되며, 이에 관여하는 효소로는 글루타메이트 디카르복실라제(glutamate decarboxylase; GAD)가 있으며 피리독시드-5'-포스페이트(pyridoxid-5'-phosphate) 의존성 경로로 합성된다. GABA는 단백질에서는 발견이 되지 않는 비단백질성 아미노산으로 뇌나 척수에 존재하는 신경전달물질로 혈류를 개선하며 뇌의 산소공급을 증가시켜 뇌의 대사촉진 및 뇌 기억을 증진시키는 뇌의 영양제로 알려져 있다. GABA는 글루타메이트(glutamate)가 신경을 활성화시키는 것과는 달리 신경활성을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 기능은 신경세포의 기능과 정보처리에 지대한 영향을 미치게 되는데 특히 감각 뇌에서 방향 민감성, 각도 민감성 반응 등을 결정하며 정교한 운동기능도 조절하는 것으로 알려져 있다. GABA의 뇌혈류 촉진 효과와 산소공급 증가효과는 뇌세포의 대사를 촉진시킴으로써 뇌졸중의 후유증 및 뇌동맥경화증 등에 개선

효과가 나타나 의약품으로 사용되고 있다.

- [0029] 상기 제 4단계의 바실러스 서브틸리스 HA 균주 스타터는 상기 제 3단계의 1차 혼합물 100 중량부에 대하여 1 내지 10 중량부로 접종할 수 있으며, 상기 수치 범위 내에서 가장 효과적으로 1차 발효가 진행되어 고농도의 폴리감마글루탐산이 포함된 1차 발효물을 제조할 수 있다.
- [0030] 상기 제 4단계의 1차 발효는 30℃ 내지 50℃의 발효 온도에서 1 내지 3일 동안 진행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0031] 이때, 상기 제 4단계의 바실러스 서브틸리스 HA가 상기 제 3단계에서 혼합한 모노 소듐 글루타메이트를 폴리감마글루탐산(γ -polyglutamic acid; γ -PGA)으로 전환시킬 수 있으며, 특정 수치 범위 내에서 접종된 상기 바실러스 서브틸리스 HA 및 발효 조건은 고농도의 폴리감마글루탐산이 포함된 1차 발효물을 제조할 수 있다.
- [0033] 또한, 상기 제 6단계의 락토바실러스 플란타룸 EJ2014 균주 스타터는 상기 제 5단계의 2차 혼합물 100 중량부에 대하여 1 내지 10 중량부로 접종할 수 있으며, 상기 수치 범위 내에서 가장 효과적으로 2차 복합발효가 진행되어 고농도의 펩타이드 및 감마-아미노뷰티르산이 포함된 2차 복합발효물을 제조할 수 있다.
- [0034] 상기 제 6단계의 2차 복합발효는 25℃ 내지 35℃의 발효 온도에서 1 내지 7일 동안 진행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0035] 이때, 상기 제 6단계의 락토바실러스 플란타룸 EJ2014가 상기 제 5단계에서 혼합한 탈지유를 분해하여 펩타이드를 생성할 수 있다.
- [0036] 또한, 상기 제 6단계의 락토바실러스 플란타룸 EJ2014가 1차 발효물에 잔존하는 모노 소듐 글루타메이트를 감마-아미노뷰티르산(γ -aminobutyric acid; GABA)으로 전환시킬 수 있으며, 특정 수치범위 내에서 접종된 락토바실러스 플란타룸 EJ2014 및 발효 조건은 고농도의 펩타이드 및 감마-아미노뷰티르산이 포함된 2차 복합발효물을 제조할 수 있다.
- [0037] 즉, 본 발명의 기능성 물질이 강화된 복합발효물에서 상기 기능성 물질은 폴리감마글루탐산, 감마-아미노뷰티르산 및 펩타이드(티로신)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0039] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 기능성 물질이 강화된 복합발효물을 제공한다.
- [0041] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0043] **실시예 1: 수경인삼 발효물 및 복합발효물 제조**
- [0044] 도 1과 같이, 디케이에코팜에서 제공 받은 수경인삼 2년근을 잎, 줄기, 뿌리를 모두 사용하여 5% 파쇄물로 제조한 후, 121℃에서 15분 동안 멸균하였다. 상기 멸균된 파쇄물에 모노 소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG)를 전체 부피의 0 내지 5% 농도로 첨가하고, 글루코즈(glucose)를 전체 부피의 2% 농도로 첨가한 후, 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA) 농축 스타터를 2% 접종하였다. 이후 42℃에서 2일간 발효하여 1차 발효물을 제조하였다.
- [0045] 도 2와 같이, 상기 1차 발효물에 탈지유(skim milk)를 1차 발효물 부피의 0 내지 50% 농도로 첨가하고, 락토바실러스 플란타룸 EJ2014(*Lactobacillus plantarum* EJ2014)를 2% 접종하였다. 이후 30℃에서 5일간 정지배양하여 2차 복합발효물을 제조하였다. 도 3은 2차 복합발효 중 락토바실러스 플란타룸 EJ2014에 의한 감마-아미노뷰티르산(γ -aminobutyric acid; GABA) 생성 중 가스 발생을 나타낸 것이다.

[0047] **실시예 2: 고초균을 이용한 수경인삼 발효물의 특성 평가**

[0048] 1) pH 및 산도 분석

[0049] 5% 수경인삼 파쇄물 및 고초균을 이용하여 제조된 1차 발효물의 pH 및 산도를 분석하였다.

[0050] 그 결과, 도 4를 참조하여 보면, 발효 0일 차에 MSG를 0%, 1%, 3%, 5%를 첨가한 시료의 경우, pH는 각각 6.66, 6.93, 6.62, 6.73으로 비슷한 pH 값을 나타내었으며, 발효 3일 차에 pH는 각각 5.45, 7.91, 8.19, 8.17로 발효가 진행될수록 MSG를 첨가한 시료에서 발효가 진행되어 pH가 증가하는 경향을 나타내었다.

[0051] 또한, 산도를 참조하여 보면, 발효 0일 차에 MSG를 0%, 1%, 3%, 5% 첨가한 시료의 경우, 산도는 각각 0.02%, 0.02%, 0.08%, 0.08%를 나타내었으며, 이후 발효 1일 차에 MSG 0%, 5%를 첨가한 시료에서 pH가 감소하였지만, MSG를 1%, 3%, 5% 첨가한 시료의 산도는 증가한 후 다시 감소하여 각각 0.04%, 0.02%, 0.05%를 나타내었다. 즉, 발효가 진행되면서 MSG를 첨가한 시료의 pH가 증가하고, MSG 3%, 5%를 첨가한 시료의 산도가 감소하는 것을 확인하였다.

[0053] 2) 점질물과 점조도 분석

[0054] 5% 수경인삼 파쇄물 및 고초균을 이용하여 제조된 1차 발효물의 점질물 및 점조도의 변화를 분석하였다.

[0055] 그 결과, 도 5를 참조하여 보면, MSG를 첨가하지 않은 시료에서 점조도 값(consistency index)이 낮은 수치를 보인 반면, MSG를 1%, 3%, 5% 첨가한 시료에서 발효 2일 차에 각각 $0.03\text{Pa} \cdot \text{s}^n$, $0.48\text{Pa} \cdot \text{s}^n$, $0.78\text{Pa} \cdot \text{s}^n$ 으로, MSG 함량이 높아질수록 점조도 값이 높은 수치를 보였고, 발효 3일 차에 감소하는 경향을 나타내었다.

[0056] 또한, 점질물 함량을 참조하여 보면, MSG를 첨가하지 않은 시료에서는 발효가 진행되어도 점질물이 측정되지 않았으며, MSG를 첨가한 시료에서는 농도 의존적으로 점질물 함량이 증가하였으며, MSG 1%, 3%, 5%를 첨가한 시료에서 발효 2일 차에 점질물이 1.10%, 2.02%, 2.13%로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0057] 따라서 고초균을 이용한 1차 발효물은 MSG를 기질로 하여 점질물을 생산하고, 상기 점질물은 폴리감마글루탐산(γ -polyglutamic acid; γ -PGA)인 것으로 사료된다.

[0059] **실시예 3: 고초균 및 젖산균을 이용한 수경인삼 복합발효물의 특성 평가**

[0060] (1) pH 및 산도 분석

[0061] 5% 수경인삼 파쇄물 및 고초균을 이용하여 제조된 1차 발효물에 젖산균을 이용하여 2차 발효하여 복합발효물을 제조하였으며, 상기 복합발효물의 pH 및 산도를 분석하였다.

[0062] 그 결과, 도 6을 참조하여 보면, 고초균 발효 전 pH는 초기 6.93에서 발효 1일 차에 6.3으로 소폭 감소한 후 발효 2일 차에 8.08로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0063] 2차 젖산균 발효를 위하여 영양성분으로 탈지유를 0%, 1%, 3%, 5% 첨가한 후, pH는 각각 8.08, 7.36, 5.22, 7.30으로 탈지유 첨가 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었다. 2차 젖산균 발효 1일 차에 pH는 각각 7.86, 6.65, 4.75, 5.18로 감소한 후 다시 증가하여 2차 젖산균 발효 5일 차에 각각 8.07, 8, 5.85, 5.64를 나타내었다.

[0064] 산도의 경우, 고초균 발효 전 0.08%에서 발효 1일 차에 0.09%로 증가한 후 발효 2일 차에 0.03%로 감소하였다. 2차 젖산균 발효를 위하여, 탈지유를 0%, 1%, 3%, 5% 첨가한 후, 산도는 각각 0.04%, 0.13%, 0.47%, 0.63%를 나타내었다. 2차 젖산균 발효 1일 차에 산도는 각각 0.05%, 0.16%, 0.86%, 0.63%로 증가하였으며, 반면 발효 5일 차에 산도는 각각 0.05%, 0.05%, 0.22%, 0.36%로 탈지유를 첨가한 시료에서 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0066] (2) 생균수 분석

[0067] 5% 수경인삼 파쇄물 및 고초균을 이용하여 제조된 1차 발효물에 젖산균을 이용하여 2차 발효하여 복합발효물을 제조하였으며, 상기 복합발효물의 생균수를 분석하였다.

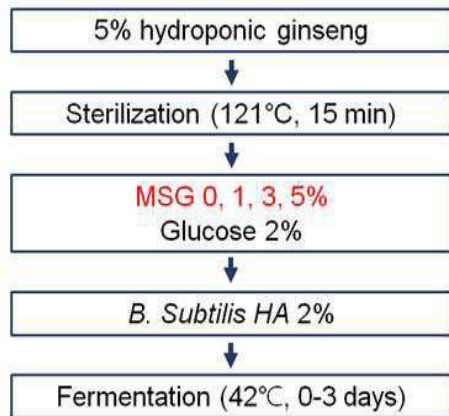
- [0068] 그 결과, 도 7을 참조하여 보면, 고초균 발효 시, 생균수가 1.05×10^6 에서 3.40×10^8 으로 증가하였고, 탈지유를 첨가 후 2차 젖산균 발효 시, 발효 1일 차에 생균수가 10^6 으로 감소한 후 10^7 으로 유지되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0069] 또한, 2차 젖산균 발효를 위하여, 탈지유를 0%, 1%, 3%, 5% 첨가한 후, 생균수를 측정한 결과, 젖산균은 초기 6.85×10^7 에서 2차 젖산균 발효 1일 차에 2.50×10^7 , 1.95×10^8 , 1.93×10^9 , 1.50×10^9 으로 생균수가 증가하였으며, 2차 젖산균 발효 5일 차에도 1.60×10^8 , 6.98×10^8 , 1.70×10^9 , 1.70×10^9 으로 생균수가 증가한 후 유지되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0071] (3) 티로신(tyrosine) 함량 분석
- [0072] 5% 수경인삼 파쇄물 및 고초균을 이용하여 제조된 1차 발효물에 젖산균을 이용하여 2차 발효하여 복합발효물을 제조하였으며, 상기 복합발효물의 티로신 함량을 분석하였다.
- [0073] 그 결과, 도 8을 참조하여 보면, 고초균 발효 전 티로신 함량이 7.83 mg%에서 고초균 발효 1일, 2일 차에 각각 7.90 mg%, 15.80 mg%로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0074] 또한, 2차 젖산균 발효를 위하여, 탈지유를 0%, 1%, 3%, 5% 첨가한 후, 티로신 함량을 측정한 결과, 젖산균 초기에 티로신 함량이 15.80 mg%, 26.73 mg%, 24.04 mg%, 38.31 mg%로 크게 증가하였으며, 2차 젖산균 발효 5일 차에는 티로신 함량이 각각 19.37 mg%, 26.04 mg%, 20.26 mg%, 55.67 mg%로 측정되었다.
- [0075] 따라서 고초균을 이용하여 제조된 1차 발효물에 영양성분으로 첨가된 탈지유의 단백질 성분들이 2차 젖산균 발효 과정에서 단백질 분해 효소에 의한 작용으로 펩타이드가 생성되는 것으로 판단되며, 이는 첨가된 탈지유 농도에 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0077] (4) 감마-아미노뷰티르산(GABA) 함량 분석
- [0078] 5% 수경인삼 파쇄물 및 고초균을 이용하여 제조된 1차 발효물에 젖산균을 이용하여 2차 발효하여 복합발효물을 제조하였으며, 상기 복합발효물의 GABA 함량을 분석하기 위해 박층 크로마토그래피(thin-layer chromatography; TLC)를 수행하였다.
- [0079] 그 결과, 도 9를 참조하여 보면, 2차 젖산균 발효 시에 탈지유를 첨가하지 않은 시료의 경우, 발효가 진행되면서 MSG가 GABA로 전환이 되지 않은 반면, 탈지유를 100% 수준으로 5% 첨가한 시료의 경우, 2차 젖산균 발효 5일 차에 MSG가 모두 GABA로 전환되면서 1.5% 이상 GABA가 생성되는 것을 확인하였다. 그러나 탈지유를 20% 수준으로 1% 첨가한 시료의 경우, 발효 3일 차에 MSG에서 GABA로의 전환이 관찰되었지만, 이는 발효 5일 차에 첨가한 MSG가 거의 잔존하는 것으로 사료되었다.
- [0081] (5) 면역 증진 효능 분석
- [0082] 5% 수경인삼 파쇄물 및 고초균을 이용하여 제조된 1차 발효물에 젖산균을 이용하여 2차 발효하여 복합발효물을 제조하였으며, 상기 복합발효물의 면역 증진 효능을 분석하였다. 마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행에서 분양을 받았으며, 세포배양을 위해 10% 우태아혈청(FBS) 및 1% 항생제(antibiotics)를 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 5% CO₂가 존재하는 37℃ 인큐베이터에서 1주일에 2, 3회 계대배양을 진행하여 실시하였다.
- [0083] 도 10을 참조하여 보면, MTT 분석을 수행하여 세포 생존율을 측정한 결과, 1000 µg/mL 농도에서 발효 전 세포 생존율이 75.29% 였으며, 발효 후 89.03%인 것으로 보아 수경인삼을 발효함에 따라 세포 독성이 감소하는 것을 확인하였다.
- [0084] 또한, 도 11을 참조하여 보면, NO(nitric oxide) 생성량 측정을 통한 면역증진 효과를 확인한 결과, 750 µg/mL 농도에서 발효 전 NO 생산량이 2.25 µM이었으며, 발효 후 동일 농도에서 6.67 µM이었고, 1000 µg/mL 농도에서 발효 후 7.0 µM로 가장 높게 생성되는 것을 확인할 수 있었다.

[0086] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

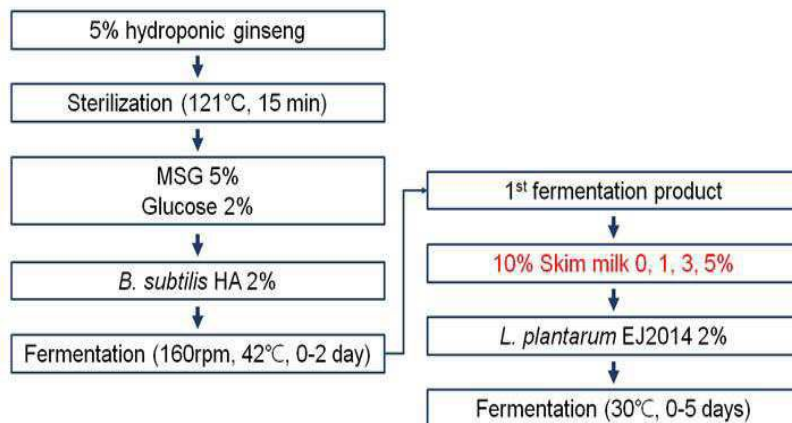
[0087] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



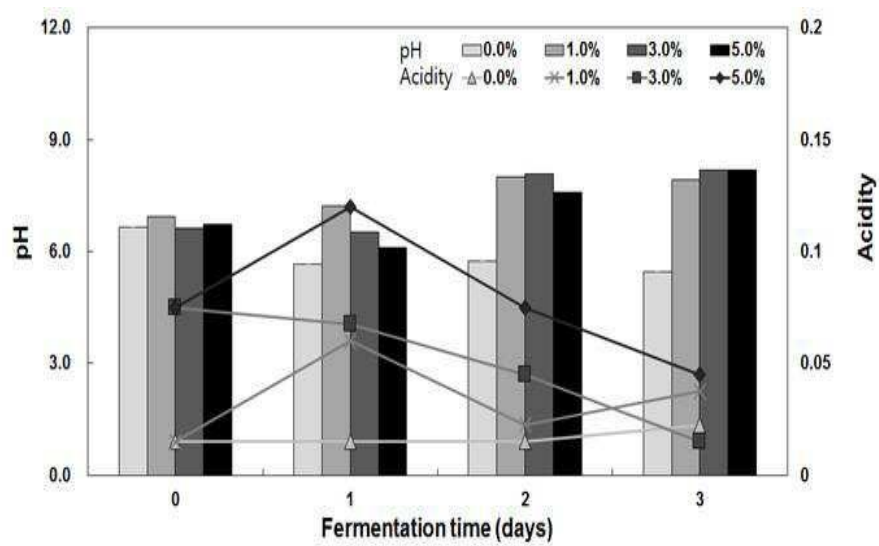
도면2



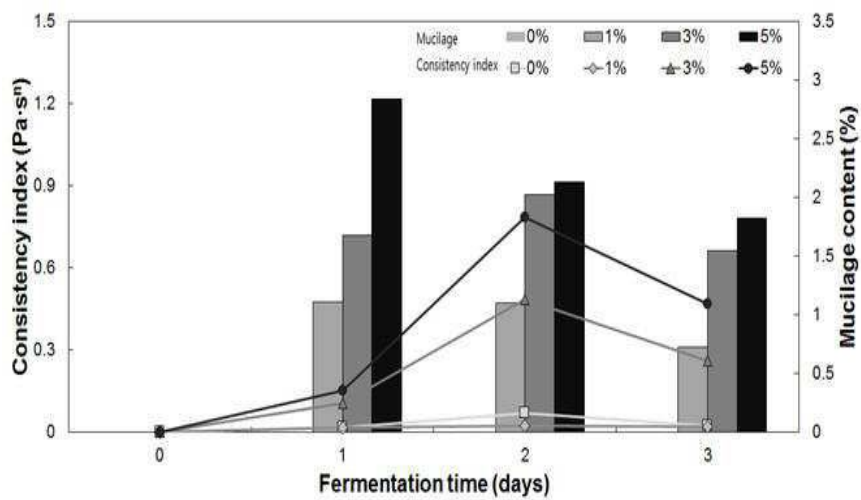
도면3



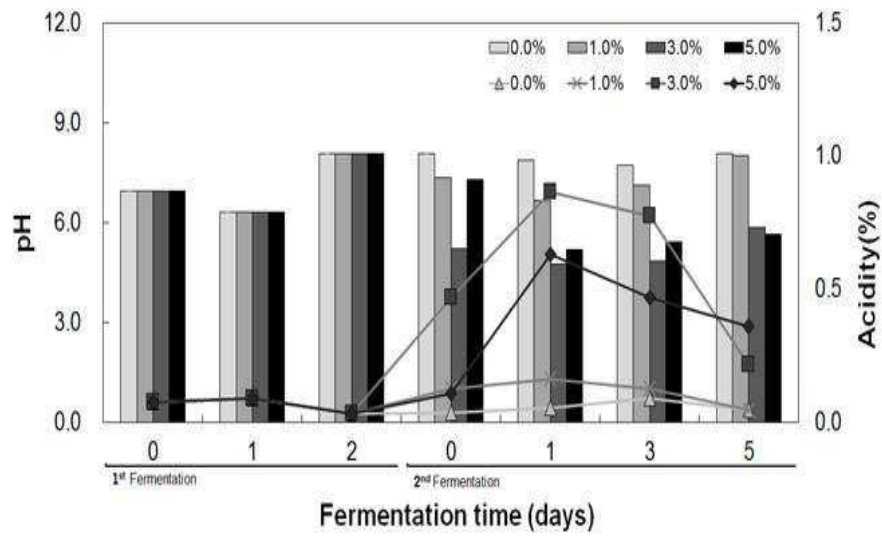
도면4



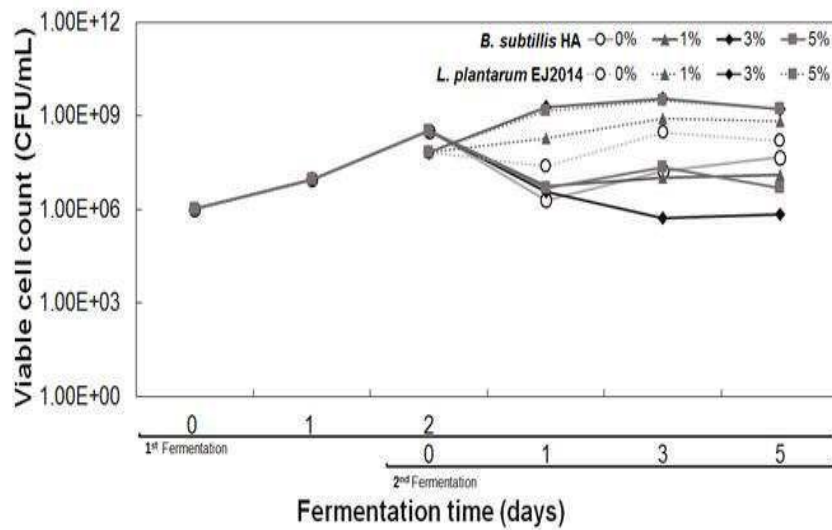
도면5



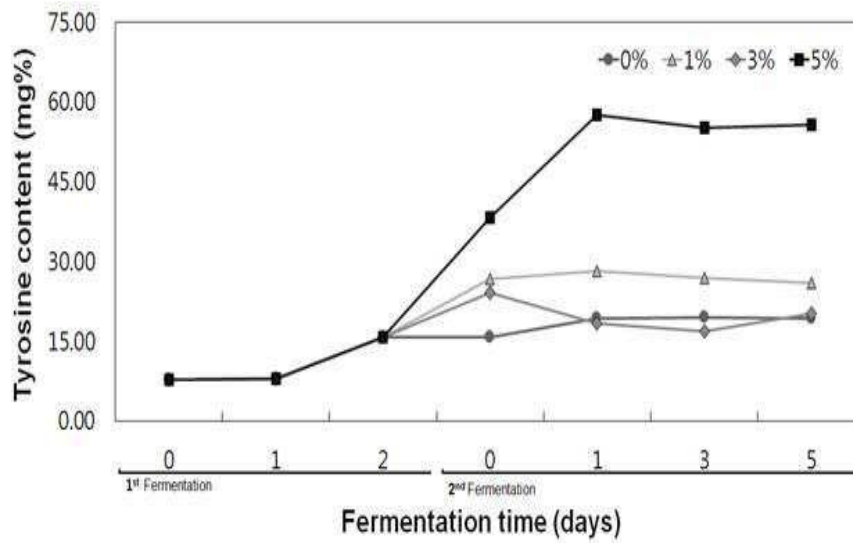
도면6



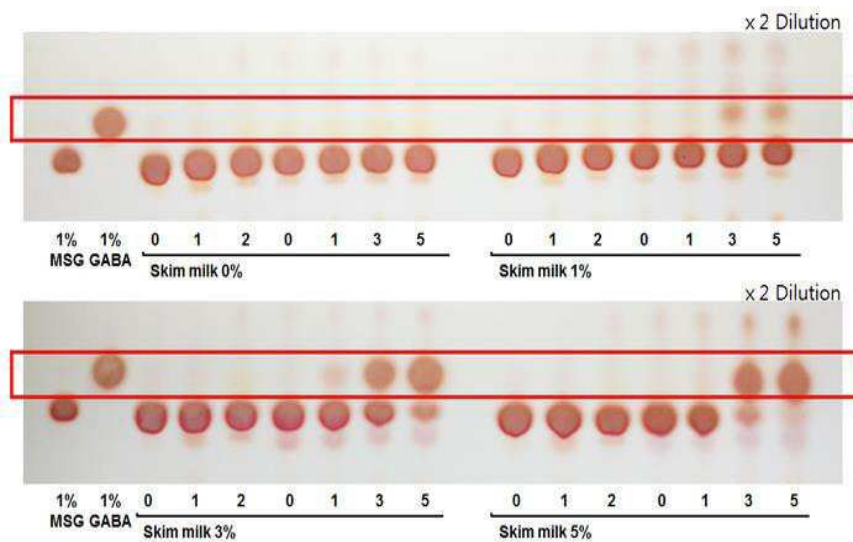
도면7



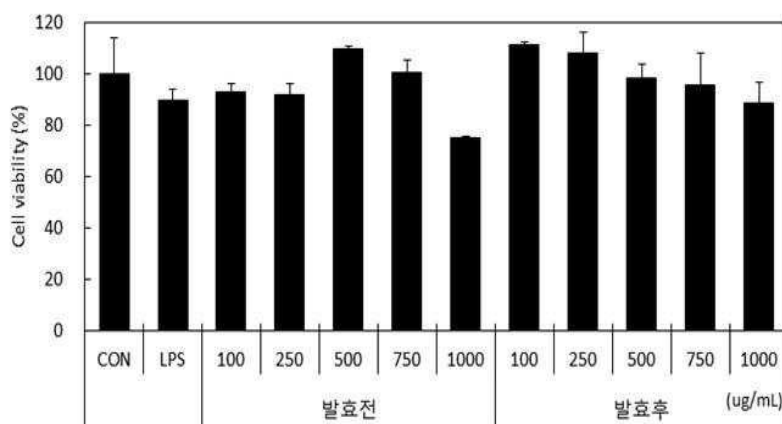
도면8



도면9



도면10



도면11

