

(옆면)

(앞면)

110142-01

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(), 비공개(O), 발간등록번호(O)

발간등록번호

11-1543000-002258-01

수경재배인삼을 활용한 항산화 및 면역증강효과가 있는 발효음료 개발 최종보고서

2018 농생명산업기술평가원 농림축산식품부

수경재배인삼을 활용한 항산화 및 면역증강효과가 있는 발효음료 개발 최종보고서

2018. 03. 23.

주관연구기관 / 계명대학교 산학협력단
협동연구기관 / (주)디케이에코팜

농림축산식품부
농생명산업기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

‘수경재배인삼을 활용한 항산화 및 면역증강 효과가 있는 발효음료 개발’(연구개발 기간 : 2016.12.05. ~ 2017.12.04.) 과제의 최종보고서 9부를 제출합니다.

2018. 03. 23.

주관연구기관명 : 계명대학교 산학협력단 (대표자) 남재열 (인)
참여기관명 : (주)디케이에코팜 (대표자) 홍의기 (인)



주관연구기관책임자: 이삼빈
참여기관책임자: 홍의기

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제 18조에 따라 보고서 열람에
동의합니다.

보고서 요약서

보고서 요약서

과제 고유 번호	116142-01	해당 단계 연구 기간	2016.12.05. - 2017.12.04	단계구분	기초연구/ (총단계)
연구사업명	중사업명	농식품기술개발사업			
	세부사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명	(해당없음)			
	세부과제명	수경재배인삼을 활용한 항산화 및 면역증강효과가 있는 발효음료 개발			
연구책임자	이삼빈	해당단계 참여연구원 수	총: 6명 내부: 6명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 50,000천원 민간: 17,000천원 계: 67,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 6명 내부: 6명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 50,000천원 민간: 17,000천원 계: 67,000천원
연구기관명 및 소속 부서명	계명대학교 산학협력단			참여기업명	(주)디케이에코팜
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내·외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		출원번호 10-2017-0126307									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호
(해당없음)								

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

- Bacillus subtilis* HA와 *Lactobacillus plantarum* EJ2014를 이용한 기능성 발효음료 개발
 - 유용 발효미생물의 발효특성 및 배지조성 확립
 - 복합발효를 통한 건강기능성분 강화
 - Bacillus subtilis* HA의 발효를 통한 γ -PGA 생산
 - L. plantarum* EJ2014를 이용한 GABA생산 및 분석
 - 항산화 효과, 면역증강 효과
 - DPPH라디칼 소거능
 - 세포독성과 NO생성 확인
- 발효 수경인삼을 이용한 기능성 발효음료 시제품 개발
 - 발효음료 최적 조합비
 - 품질 및 관능 평가

보고서 면수

39

요약문

연구의 목적 및 내용	<p>노지재배 방법에 비교하여 다양한 이점을 가지고 있는 수경재배인삼의 고부가가치화를 위하여 전통식품에서 분리한 유용 미생물을 이용하여 복합발효기술을 통해 γ-PGA와 GABA생산으로 생리활성물질이 강화된 다기능성(항산화 및 면역증강 활성)의 수경인삼 발효물을 개발하고 음료형태의 제품에 대한 레시피 개발</p>				
연구개발성과	<p>수경재배인삼의 고부가가치화를 위한 방안으로 고초균과 젖산균을 이용한 핵심 복합발효기술을 최적화함으로써 기능성물질인 r-PGA, GABA 등이 강화된 복합 기능성소재를 개발하여 음료 및 다양한 식품바이오 소재로 활용이 가능함</p> <p>가. 정량적 성과</p> <p>(1) 수경인삼 발효연구 결과 전국규모 학술 발표 (2건)</p> <p>(2) 참여기업 핵심발효기술 및 분석 관련 기술지도 (3건)</p> <p>(3) 발효인삼을 원료로 시제품 (발효음료) 개발 (1건)</p> <p>나. 정성적 성과</p> <p>(1) 복합 기능성물질이 강화된 수경인삼발효 소재 개발</p> <p>(2) 발효소재의 효능평가 SOP확립</p> <p>(3) 구축된 연계기관 네트워크 활용한 차별화된 제품화 지원</p> <p>(4) 지속적인 산학협력을 통한 기업애로기술 및 컨설팅 지원</p>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>가. 활용계획</p> <p>(1) 수경재배인삼의 발효기술 및 개발된 발효 소재를 활용한 다양한 형태의 식품, 화장품 산업에 적용</p> <p>(2) 개발된 발효 음료 레시피를 통한 기능성 발효음료 사업화</p> <p>(3) 수경재배인삼 발효물 제조의 원천기술 확보 및 신제품 개발</p> <p>(4) 발효 및 저장기술을 바탕으로 보존성 및 안정성을 갖춘 맞춤형 기능성 간편제품 개발</p> <p>(5) 우수 균주, 핵심발효 기술을 확보하여 발효업체에 대한 기술 경쟁력 강화</p> <p>(6) 수경재배인삼 재배 및 발효 연구에 대한 전문 인력의 양성 기반구축</p> <p>(7) 수경재배인삼 및 발효제품 개발 확대로 국외 시장개척</p> <p>나. 기대효과</p> <p>(1) 발효 및 가공기술의 차별화로 수경재배인삼의 고부가 가치화 및 기업 지원 확대</p> <p>(2) 발효 수경인삼소재에 대한 특허출원을 통해 국내외 발효식품산업에서 기술 경쟁력을 확보</p> <p>(3) 다기능성 발효수경인삼의 제품화는 고령화시대에 국민의 의료비 절감이라는 보건의료정책을 지원하는 하나의 대안이 될 수 있음</p>				
국문핵심어 (5개 이내)	수경재배인삼	생물전환기술	발효	γ -PGA	GABA
영문핵심어 (5개 이내)	Hydroponic cultured ginseng	Bioconversion	Fermentation	Gamma poly glutamic acid	Gamma amino butyric acid

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

본문 작성 양식

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	5
2. 국내외 기술개발 현황	11
3. 연구수행 내용 및 결과	13
4. 목표달성도	34
5. 연구결과의 활용계획	35
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	36
7. 연구개발성과의 보안등급	37
8. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	37
9. 연구개발과제의 대표적 연구실적	38
10. 기타사항	38
붙임. 참고 문헌	39

<별첨> 주관연구기관의 자체평가 의견서

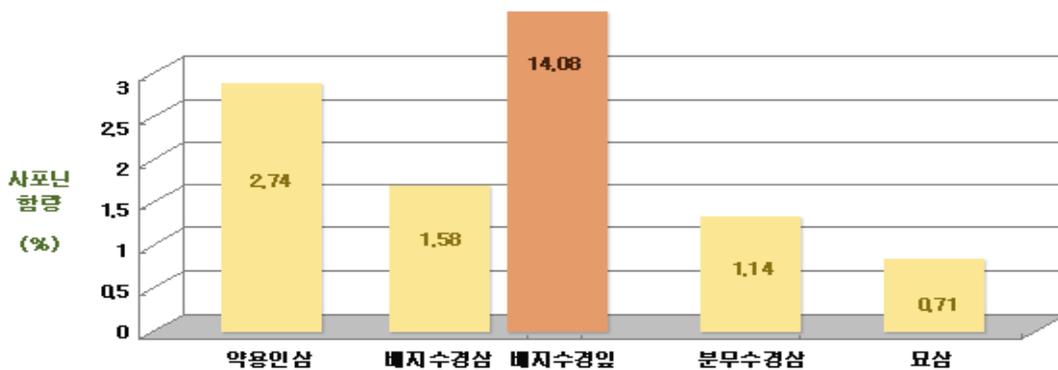
1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

가. 연구개발 필요성

(1) 인삼의 일반적 특징

- 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 오갈피나무과(Araliaceae) 식물로 한반도가 원산인 한국의 특산 약용식물이며, 2,000여 년 전부터 보원기제로 사용되어온 중요한 한방약 중의 하나임
- 대부분 뿌리만을 약재로 사용하고, 뿌리의 모양이 사람형상으로 되어 인삼이라 하며 사포닌(Saponin)이라는 약용 성분을 많이 포함하고 있는데, 인삼의 사포닌 성분을 진세노사이드(Ginsenoside)라 함
- 인삼의 주요 성분은 배당체(glycoside) 성분인 사포닌을 비롯하여 질소함유 화합물로서, 단백질, 아미노산, 핵산, 알칼로이드, 지용성 성분으로 지방산, 정유, 폴리아세틸렌(polyacetylene), 당류로서 단당류와 올리고당, 다당류, 펙틴질 그리고 비타민류와 무기질 등 매우 다양한 성분들이 함유되어 있음
- 인삼의 약리학적 성분 및 생리학적인활성은 뿌리, 줄기, 잎 및 열매에 따라 다소 차이를 나타내며, 현재까지는 뿌리에 관한 연구가 주로 진행되고 있음
- 국내 인삼의 잎과 뿌리에서 10종류 ginsenosides (Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, and Rh1)성분이 존재하며, 뿌리보다 잎에서 높은 함량을 보였다. 특히, 모든 ginsenoside는 생육 초기 2년 내에는 주로 잎에 존재하며, 생육 5년 이후에는 뿌리에서 축적되는 것으로 나타남
- 인삼 뿌리의 중요한 구성성분인 ginsenoside는 tetracyclic dammarane skeleton를 갖는 두 개의 group: protopanaxadiol group(주로 ginsenoside Ra, Rb1, Rb2, Rc and Rd), protopanaxatriol group(주로 ginsenoside Rg1, Re, Rf and Rg2)으로 이루어지고 protopanaxadiol는 진정작용, 진통제, 항염, 정신병에 효과가 있는 것으로 조사되었고, protopanaxatriol는 활력과 피로회복, 운동 근력을 증진시킴
- 인삼은 그 건조 상태에 따라 건조되지 않은 수삼과 건조가 끝난 건삼 및 수삼을 찌서 말린 홍삼 등으로 구분되고, 용도에 따라 식용과 약용으로 구분됨



<토양인삼, 수경인삼의 ginsenoside 함량 비교, 출처: 2008, 국립원예특작과학원 연보자료>

- 약용인삼은 주로 4년근 이상의 인삼이 사용되며, 4년근 미만의 인삼은 주로 식용으로 사용되고 있음

(2) 수경재배인삼의 장점

- 인삼을 노지에서 재배하는 것은 시간이 많이 소요되고, 적절한 기후 및 토양이 맞지 않으며 양질의 인삼을 얻기가 어려워 인체에 유익한 성분이 많이 함유되어 있는 것을 알면서도 이를 식용으로 섭취하기에는 비용이 많이 든다는 단점이 있음
- 인삼 재배 및 섭취의 단점을 보완하기 위해 노지에서 1년간 재배한 묘삼을 비닐하우스에서 양액을 이용하여 수경 재배하는 방법이 개발되었고 묘삼을 4개월간 수경재배하면 노지에서 재배된 2년근 인삼과 거의 동일한 크기의 인삼을 얻을 수 있음
- 인삼수경재배 방법은 생육에 필요한 무기양분의 공급을 조절할 수 있으며 온도, 광도 및 물 관리 등 생육환경 조절이 용이하고, 빗물과 토양 등에 의한 병해 발생의 경감 등의 장점이 있음
- 또한 수경재배는 토경재배에서보다 단위면적당 수량증가 및 생육기간 단축, 작물의 생육에 적합한 양분관리에 따른 건강한 생산물 수확, 토양병해 및 연작장해가 없으며 제초제를 포함한 농약오염이 없는 청정 농산물 생산이 가능함
- 토질에 관계없이 재배가 가능하며 토경 재배 대비 약 10%의 물만으로도 재배가 가능하고, 비료의 유실이 없다는 큰 장점을 가지고 있음

<수경재배 인삼의 특징>

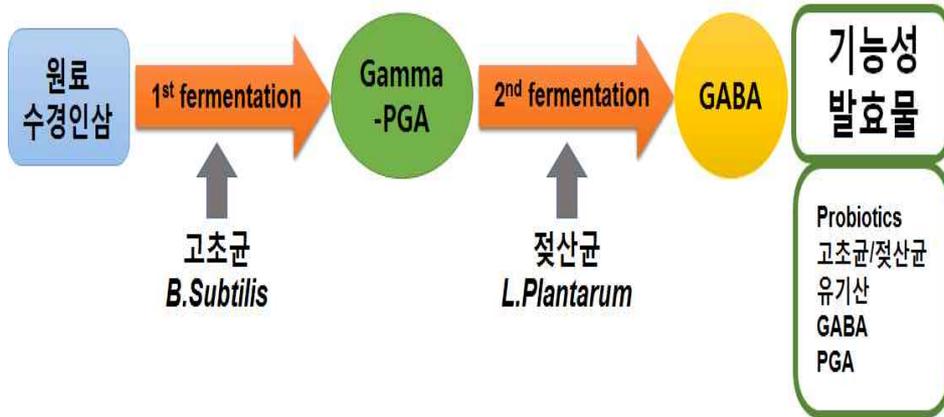
항목	토양재배 인삼	수경재배 인삼
거래방법	주산지인삼시장, 인삼농협 KT&G 계약재배 등	수경인삼 협의체와 대형백화점, 마트, 식품회사 등과 직거래, 신선상태 수출
거래형태	수삼(뿌리)형태로 거래(홍삼용, 가공용 등)	줄기, 잎이 붙은 전초상태로 거래(샐러드, 쌈채소, 식품재료용 등)
유통장소	약용 건강식품 코너에서 판매	청정채소 코너에서 판매
외형 차이점	뿌리가 크고 잎이 역세다 황토색이며 잔뿌리 발달	뿌리가 작고 잎은 부드럽다 백색이며 통뿌리 발달
생산량 조절	제한이 없어 과잉생산 우려(최근 시장가격 하락)	특허기술로 대상자에게 허가수량 지정 후 계약면적 생산
가격	저년근의 경우 가격이 낮음 20g, 1000원/개	토양 저년근삼에 비하여 가격 비쌈 6~10g, 900~1300원/개

(3) 연구개발 필요성

- 수경재배인삼은 잔류농약의 오염에서 자유롭고 잎과 줄기까지 모두를 활용할 수 있는 장점이 있어 갈수록 주목받고 있는 실정임
- 현재 수경재배인삼의 활용한 식품류는 쌈채류, 샐러드 등에 국한되어 있으며, 가공식품으

로서의 연구 및 사업화 단계는 초보적인 수준에 머무르고 있음

- 본 연구 사업에서는 노지재배방법에 비교하여 다양한 이점을 가지고 있는 수경재배인삼의 고부가가치화를 위하여 전통식품에서 분리된 유용 미생물을 이용한 복합발효기술을 통해 생리활성물질이 강화된 다기능성의 수경인삼 발효물을 개발하고 제품화하는데 목적이 있음



<개발 기술 개요도>

나. 생물전환기술을 이용한 수경재배인삼의 고부가가치화

- 수경인삼재배기술은 2009년 농진청에서 세계 최초 수경재배 특허를 낸 이후 수경재배인삼이 가진 여러 장점에도 불구하고 사업화가 제대로 진행되지 못해 많은 농가들이 도입했으나 사업적 성과와 연결되지 못하고 있음
- 반면 인삼의 가공은 성분이나 효능, 형태, 색상 등이 개선된 새로운 상품화, 사업화 발전 방향을 다양하게 제시하고 있음
- 인삼의 1차가공은 인삼의 원형을 유지해 만드는 것으로 4~6년근 수삼을 그대로 건조하여 수분함량이 14%이하가 되도록 가공한 백삼, 수삼을 증삼, 건조 등의 과정을 거쳐 수분함량이 14%이하가 되도록 가공한 홍삼, 수삼을 뜨거운 물속에 일정시간 담구어 표피로부터 동체의 일부를 호화시켜 건조한 태극삼, 수삼을 정산하여 껍질이 존재하는 상태로 증숙과 건조과정을 9회 반복하여 만드는 구증구포를 통해 삼을 가공하는 흑삼 등이 있음
- 인삼의 2차가공은 수삼 또는 1차 가공인삼을 농축액, 분말, 차, 캡슐, 환, 과립, 음료, 술, 화장품, 사탕 등의 여러 가지 용도에 알맞은 형태로 변환하여 제품을 만드는 것으로 최근 시장이 크게 성장하는 추세임
- 인삼은 가공 시 증숙에 의해 효소가 불활성화 되고 호화현상을 조직이 견고해져 장기간 보관이 가능하고 증숙 처리 과정에서 항산화활성을 가진 갈변물질이 생성되며 인삼내의 지방산 산패를 억제하여 품질이 양호해짐
- 가공기술 중 하나로 생물전환기술(Bio-conversion)은 미생물 및 진균을 이용하여 인삼을 발효하여 인삼 중에 4~10% 함유되어 있는 진세노사이드의 전환 및 증대를 목표로 함

- 생물전환에 이용되는 미생물 균주에는 세균류와 진균류(담자균과 자낭균류)가 있으며 세균은 주로 유산균, *Bacillus* sp. 등 발효식품 유래의 종류를 사용하여 진균류는 황국균 등과 같은 발효식품 유래 곰팡이, 식용버섯 균사 등을 사용함

<GRAS(일반적으로 안전하다고 인정된 미생물)로 분류되는 유용 미생물>

세균	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc oenos</i>
효모	<i>Candida utilis</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
사상균	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Mucor javanicus</i> (<i>Mucor circinelloides</i> F. <i>circinelloides</i>) <i>Penicillium roqueforti</i>

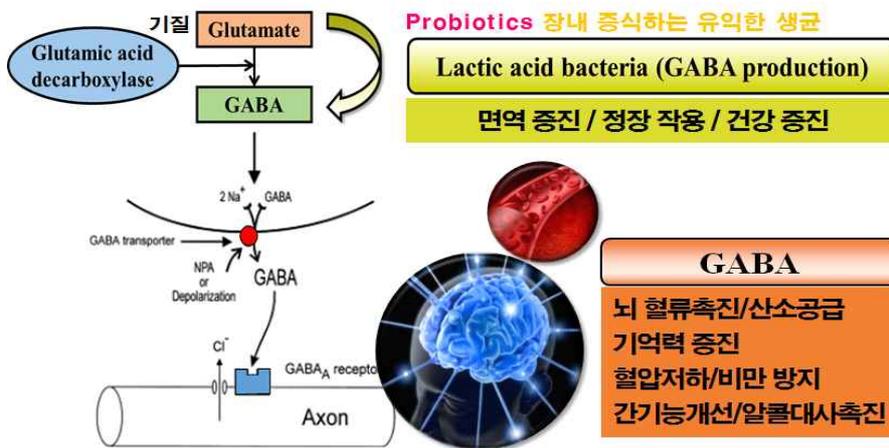
주: GRAS 미생물들의 경우에 적절한 배양조건에서 사용된다면 일반적으로 안전하다고 판단되어 구체적인 검사가 필요하지 않다

- 인삼 내의 진세노사이드는 발효에 의해 가수분해되어 완전 다른 형태의 사포닌이 발견되기도 하여 균주에 따른 특정 진세노사이드 생산이 가능하나 단점은 전환시간이 효소적 처리에 비해 많이 소요되고 미생물을 다루는 전문 기술력이 요구됨
- 본 연구에서 제시하는 발효기술은 GRAS 균주 중에서 재래식 청국장에서 분리한 균주인 *Bacillus subtilis* HA 균주와 미강에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* EJ2014균주로 고초균과 젖산균 발효를 각각 수행하거나 또는 혼합 발효를 수행하여 유용물질인 폴리감마글루탐산(Poly- γ -glutamic acid Acid, γ -PGA)와 가바(Gamma-aminobutyric acid, GABA)를 생산하고 이를 이용한 기능성 발효음료를 개발하는데 목적이 있음
- 고초균이 생산하는 γ -PGA는 청국장과 낫토와 같은 콩 발효식품의 점질물 속에 많이 포함되어 있는 천연 고분자물질로써 글루탐산의 γ -카르복실기와 글루탐산의 α -아미노기가 결합된 γ -폴리펩타이드로 수용성, 음이온성, 생분해성이 있음
- 식용의 아미노산 고분자소재로 면역증진, 칼슘흡수 등의 효능이 입증된 고부가가치 소재로서 건강기능성식품, 화장품, 의약품 및 환경관련 제품 등으로 적용 범위가 매우 다양함



<γ-PGA의 응용범위>

- GABA는 세계적인 기능성식품소재로 2001년부터 본격적인 시장을 형성하기 시작한 성분으로 glutamate decarboxylase (GAD)의 L-glutamate의 탈탄산 반응에 의해 CO₂와 함께 생성되며, 조효소 pyridoxal-5'-phosphate가 필요한 것으로 알려져 있음
- GABA는 억제성 신경전달물질로서 뇌 혈류개선, 산소공급 증가, 뇌세포 대사기능을 촉진시켜 신경안정작용, 스트레스 해소, 기억력 증진, 혈압강화작용, 우울증 완화, 중풍과 치매 예방, 불면, 비만, 갱년기 장애 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 최근 뇌졸중 및 결장암, 대장암 세포의 전이 및 증식억제 효과가 있는 것으로 밝혀지면서 이러한 효능을 목적으로 한 제품개발이 이루어지고 있음
- 유산균 발효에 의한 GABA 생성량은 250~700 mg/100g(건조중량)의 함량이 생성되는 것으로 보고되고 있으며, 자연적인 섭취로는 GABA 생리작용을 기대하기는 힘들어 미생물에 의한 GABA 함량을 증대시키고 이를 다양한 제품으로 적용하여 이용하는 방법이 효과적임



<GABA의 생성기작>

- 본 연구에 사용될 *Lactobacillus plantarum* EJ2014균주는 각종 한약재, 울금, 버섯 분말 등을 함유한 배지에서 발효하였을 때 GABA 생산량이 발효물 100g당 약 1000~1500 mg/100g 정도로 생산되어 기존 연구 보고보다 2배정도 많이 생성되는 우수한 균주임
- 1차적으로 *Bacillus subtilis* HA균주를 이용하여 전구물질인 MSG (Monosodium glutamate)를 이용하여 점질물인 γ -PGA 생산을 최대로 한 후 남아있는 MSG를 이용하여 *Lactobacillus plantarum* EJ2014균주를 이용하여 GABA를 생성시킴으로서 최종 발효물에는 γ -PGA와 GABA가 모두 함유되어 있음
- 또한 미생물 probiotics와 이에 의한 진세노사이드가 변화되거나 새로이 생성된 기능성 발효물(중간소재)을 개발하고 이를 이용한 기능성 발효음료(시제품)를 개발하고자 함

다. 수경재배인삼 가공품 개발의 중요점

- 인삼의 연작장해, 기상재해와 병해충 발생증가, 농촌고령화로 인한 신규 재배면적 감소로 원료의 안정적 수급 방안이 절실함
신규 재배면적(ha) : ('08)5,263 → ('09)4,287 → ('10)3,372 → ('11)3,052
- 국민소득수준 향상 및 고령화시대에 웰빙 영향으로 건강기능식품의 소비와 친환경농산물의 수요가 크게 증가하고 있으나 수경재배인삼 생산 및 가공품의 개발이 미흡한 실정임
- 홍삼 등 건강기능식품 및 관련제품 매출액 매년 19.7%씩 증가
- 인삼을 주원료로 한 고급화장품 매출 급신장 : ('10)6,000억원
- 인삼수출액 : ('05)82 → ('08)97 → ('10)124 → ('11)189백만불
- 인삼 농가 ('09)23,000 → 친환경 인삼 생산농가 ('11)44호
- 인삼원료의 안정적 공급 및 친환경 생산의 증대와 더불어 기후변화 등 국내외 환경변화와 시장개방에 대응한 기술개발 필요
- 자동화시설을 이용한 수경재배기술은 생력재배와 연작이 가능하고 뿌리뿐만 아니라 사포닌 함량이 높은 잎·줄기·열매의 친환경생산이 가능한 기술로 인삼의 새로운 소비창출 및 수출 확대에 유망
- 인삼산업의 경쟁력 강화를 위해서 수경재배인삼 시설 및 가공품 개발 확대가 필요함
- 수경인삼은 농약을 전혀 사용하지 않고 연중 상시 수확이 가능하며 Rd, Re, Rg1등의 성분이 뿌리 대비 월등히 높고 뿌리에 존재하지 않는 진세노사이드 F1등의 성분을 지닌 잎과 줄기를 활용할 수 있어 기존 정제된 인삼산업의 신성장 동력원으로 성장 잠재성이 높음
- 수경인삼을 신선식품시장으로 유통하기에는 한계가 있어 국내외 사업 활성화가 부진함
- 전통발효미생물을 이용한 혼합발효기술을 활용하여 고기능성 식품바이오 소재 개발을 통해 농가 소득을 향상시키고 뿌리삼 위주의 인삼산업 성장의 보완재로 활용될 수 있음

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
------	------

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술 현황

- 청정인삼 주년 안전생산기술이 개발됨

단기 고속생산: 3~4개월 단기간 수경재배로 8~10g 크기의 인삼을 생산

뿌리는 물론 줄기, 잎, 열매까지 인삼 전체를 샐러드, 쌈채소 등 식품재료로 이용

무농약 인삼 생산기술 및 주년생산 기술 확립

- 인삼 고품질 식재료 생산기술 개발됨

사포닌 함량이 높은 청정수삼 및 무공해 인삼 잎 생산

수경인삼 잎의 사포닌 함량은 140.8~180mg/g로 수삼 15.8 mg/g에 비하여 9~10배 높고, 6년근 인삼보다 높으며 비타민C 함량도 65.9mg/g로 나타남

(2) 기존 진행하고 있는 정부개발사업

- 기존 진행하고 있는 정부개발사업은 인삼을 수경재배하는 방법이나 종자개발 또는 설비에 관한 사업이 주를 이루고 있으며 종료된 사업으로는 “수경재배인삼의 발효전통주 개발사업(농림축산식품부)”이 있으나 본 연구과제와는 연구내용에 중복성이 전혀 없음

(3) 시장 현황

- 우리나라 인삼시장은 1조 6,000억원 규모이며, 생산량의 60%가 수삼형태로 수삼의 시장은 6,400억원에 달함
- 그러나 수삼의 경우 용도가 한정되어 소비확대를 위해서는 샐러드용, 가공식품, 화장품 소재 등 새로운 개념의 도입이 절실함 실정임

(4) 경쟁기관 현황

연번	업체명	개발 제품
1	삼미르	<p>농촌진흥청 개발한 수경재배인삼과 가공품 생산 및 가공품 판매</p>  <p><수경인삼잎 진액></p>  <p><수경인삼 짬아찌></p>
2	농업법인 자연드림(주)	<p>수경인삼 화장품, 식품, 가공원료 판매</p>   

			<수경 인삼잎 차> <수경 인삼잎 마스크팩>
3	수경인삼 영농조합법인	수경인삼전체 를 활용한 음료	 <수경인삼 음료>

(5) 지식재산권 현황

- 2008년 인삼수경재배 방법 관련 특허 2건이 처음 출원된 뒤 2009년과 2010년에 각 2건, 2011년 4건, 2012년 7건, 2014년 이후 10건 이상으로 증가됨
- 인삼의 시기별로 공급하는 양액의 성분을 변화시키고 재배기간의 온도, 빛 등의 환경을 제어하는 기술이 속속 개발되어 특허 출원되고 있음
- 인삼과 관련된 특허는 1958년에 3건이 출원된 것을 시작으로 현재까지 총 2,000여건이 출원되었고 최근 10년간 출원된 특허를 보면 인삼의 기능성을 이용한 출원(식품, 약품, 화장품), 인삼의 재배방법에 관한 출원, 인삼의 재배 또는 가공에 이용되는 장치의 출원이 다수를 점하고 있음
- 수경재배인삼은 잎과 줄기로부터 노지삼보다 다양하고 많은 사포닌 성분을 추출할 수 있어 피부, 간 등의 건강에 유용한 식품, 화장품, 의약품 등의 제조에 이용되며 이들에 관한 특허가 속속 출원되고 있음

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술 현황

- 수경재배인삼의 재배와 가공기술은 우리나라가 세계적으로 우위를 점하는 기술 분야임

(2) 시장 현황

- 세계의 인삼시장 규모: 200억달러
- 베링거 인겔하임의 자회사인 파마톤(Pharmaton)사가 인삼 성분인 사포닌(saponin)으로 만든 자양강장 캡슐 “진사나(Ginsana)”와 인삼류 제품개발로 해마다 30억 달러의 매출을 기록하고 있음
- 수경인삼재배기술 및 가공식품시장은 전무한 상태임



<파마톤사의 Ginsana 제품>

(3) 지식재산권 현황

- 파나소닉사(일본): 수경법으로 인삼을 재배하고 재배된 인삼의 뇌세포 또는 신경 세포 보호제로서의 가능성에 관한 특허를 일본, 유럽, 미국에 등록한 상태임
- 아모레퍼시픽(한국): 수경법으로 재배한 인삼뿌리에서 유래된 진세노사이드 F2를 포함하는 피부개선 조성물에 관한 특허를 미국에 등록한 상태임

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

가. 수경인삼 젖산균 단일 발효

(1) 재료 및 방법

디케이에코팜(천안)에서 받은 수경인삼의 뿌리와 잎을 균질화하여 5% 수경인삼 파쇄액을 제조한 후 80 mL을 121°C에서 15분간 멸균하였다. 그 후 멸균된 MSG 3%, glucose 2%, Yeast extract(YE)를 첨가하여 *Lactobacillus plantarum* EJ2014 starter를 2% 접종한 후, 30°C 인큐베이터에서 30일간 정치 배양하여 분석하였다(Figure 1).

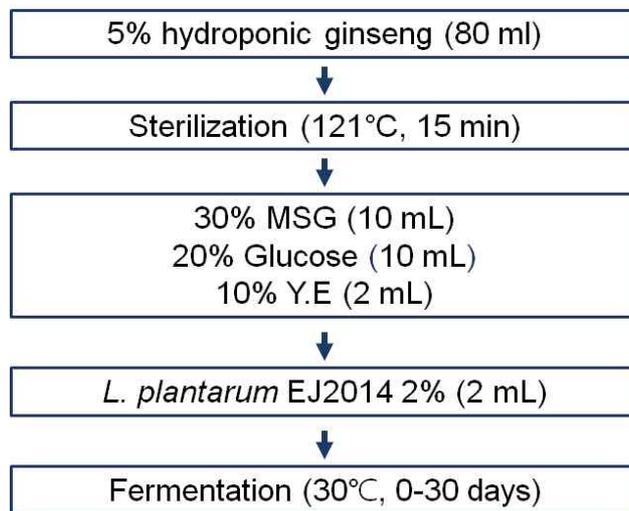


Figure 1. Flow chart for lactic acid fermentation by *L. plantarum* EJ2014.

(2) 결과 및 고찰

(가) pH 및 산도 측정

발효 전 수경인삼의 초기 pH는 6.53에서 발효 4일까지 4.28로 감소하였으며, 그 후 발효 30일까지 pH 4.37-4.53으로 비슷하게 유지되는 경향을 확인 할 수 있었다. 산도는 초기 0.13%에서 발효 4일 1.19%까지 증가한 후 발효 10일 0.69%로 급격히 감소하였으며, 그 후 발효 15일 0.9%로 증가한 후 발효 30일까지 0.80%로 지속적으로 감소하는 것을 확인 할 수 있었습니다(Figure 2).

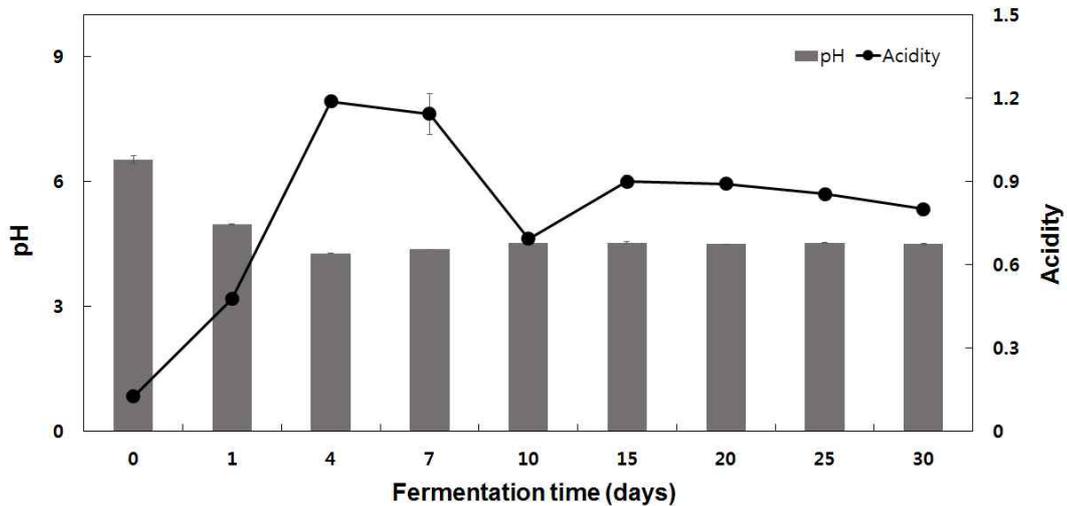


Figure 2. pH and acidity of fermented hydroponic ginseng by *L. plantarum* EJ2014.

(나) 생균수 측정

생균수 측정 결과 젖산 발효가 진행되는 동안 초기 5.65×10^7 CFU/mL을 접종하여 발효 1일 10^9 CFU/mL로 증가하였고 발효 4일부터 10^9 CFU/mL에서 서서히 감소하는 것을 확인 할 수 있었으며 발효 30일의 생균수는 5.30×10^7 CFU/mL을 나타내었다(Figure 3).

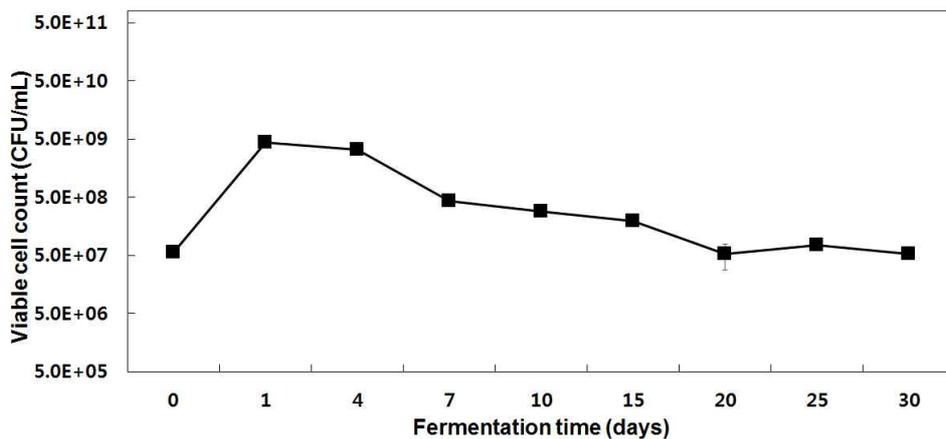


Figure 3. Viable cell count of fermented hydroponic ginseng by *L. plantarum* EJ2014

(다) GABA 함량 측정

GABA (γ -aminobutyric acid)의 생성을 확인하기 위하여 정성분석법인 TLC를 이용한 결과이다. 발효 1일 GABA로 전환이 시작되는 것처럼 보였으며, 발효 30일까지 꾸준히 MSG가 GABA로 전환되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4).

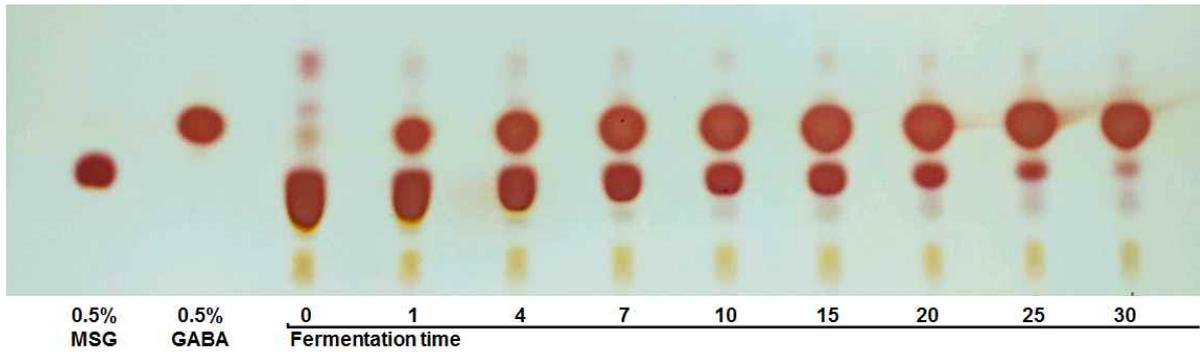


Figure 4. GABA production pattern in fermented hydroponic ginseng by *L. plantarum* EJ2014

나. MSG 농도별(0, 1, 3, 5%)

(1) 재료 및 방법

디케이에코팜(천안)에서 받은 수경인삼의 뿌리와 잎을 균질화하여 5% 수경인삼 파쇄액을 제조한 후 80 mL을 121°C에서 15분간 멸균하였다. 그 후 멸균된 MSG 0, 1, 3, 5%, glucose 2%를 첨가하여 *Bacillus subtilis* HA 농축 starter를 2% 접종한 후, 42°C 진탕 인큐베이터에서 3일간 배양하여 분석하였다(Figure 5).

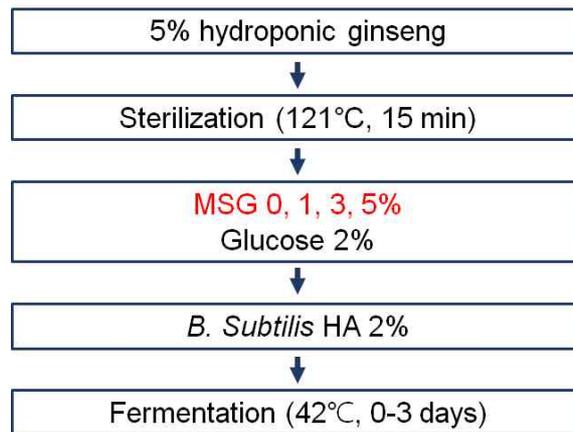


Figure 5. Method of alkaline fermentation by *B. subtilis* HA according to MSG concentration.

(2) 결과 및 고찰

(가) pH 및 산도 측정

발효 전 MSG 0, 1, 3, 5% 농도별 수경인삼 배지의 pH는 6.66, 6.93, 6.62, 6.73으로 나타났다. 네 가지 조건 모두 발효 1일에 5.66, 7.22, 6.53, 6.11로 감소하였다가 발효 2일 pH 5.74, 8.00, 8.07, 7.58로 증가하였다. 발효 3일 MSG가 첨가되지 않은 조건은 pH가 5.45로 감소하였으나, MSG가 1, 3, 5% 첨가된 조건의 pH는 7.91, 8.19, 8.17로 증가하는 경향을 보였다. 산도는 초기 0.02, 0.02, 0.08, 0.08%를 나타냈다. MSG 0% 조건의 경우 발효가 진행되어도 산도가 비슷하게 유지되는 것을 확인 할 수 있었다. MSG가 1% 첨가된 조건은 발효 1일에 0.06%를 나타냈으며 발효 2일 0.02%로 감소 후 발효 3일 0.04%로 다시 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. MSG 3, 5% 조건은 발효 1일 0.07, 0.12%로 증가하였다가 발효 2일 0.05, 0.08% 3일 0.02, 0.05%로 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 6).

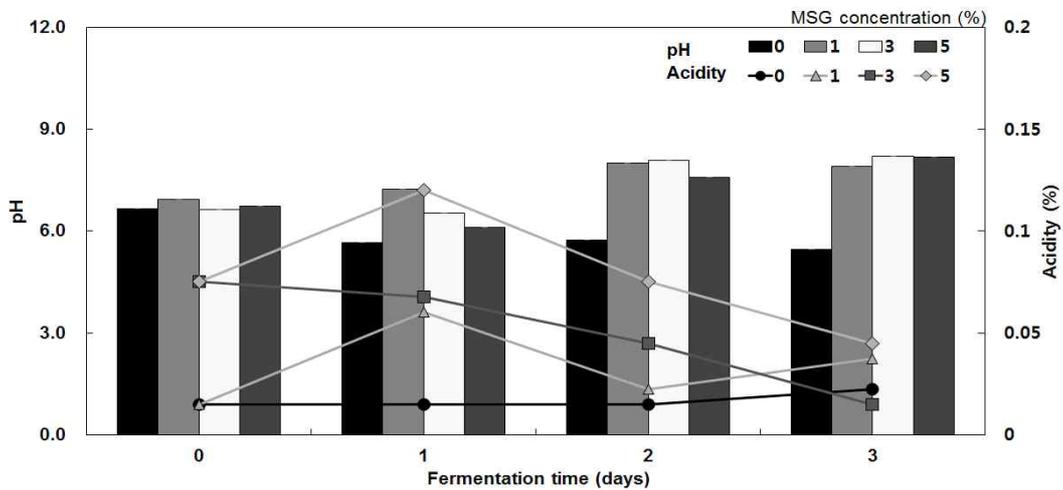


Figure 6. pH and acidity of fermented hydroponic ginseng by *B. subtilis* HA

(나) 점조도 및 점질물 측정

수경인삼 고초균 발효 1일에서 점조도는 0.02, 0.02, 0.10, 0.15 Pa·sⁿ로 측정되었다. 발효 2일 0.07, 0.03, 0.48, 0.79 Pa·sⁿ로 MSG 첨가량이 많을수록 점조도 값의 증가 폭이 커지는 것을 확인할 수 있었다. 점질물의 경우 MSG 5% 조건의 발효 1일의 값이 2.84%로 가장 높은 값을 보였으나, 건조 후 정제되지 않은 γ -PGA에서 MSG 결정이 육안으로 확인되었으나 발효가 진행되면서 확인이 되지 않는 것을 보아 MSG가 소진되는 것으로 사료되었다. 발효 후반에 점질물 및 점조도의 감소는 고분자 r-PGA의 부분적인 효소적 분해에 의한 결과로 판단되면서 발효 2일 2.13%로 소폭 감소하였다(Figure 7).

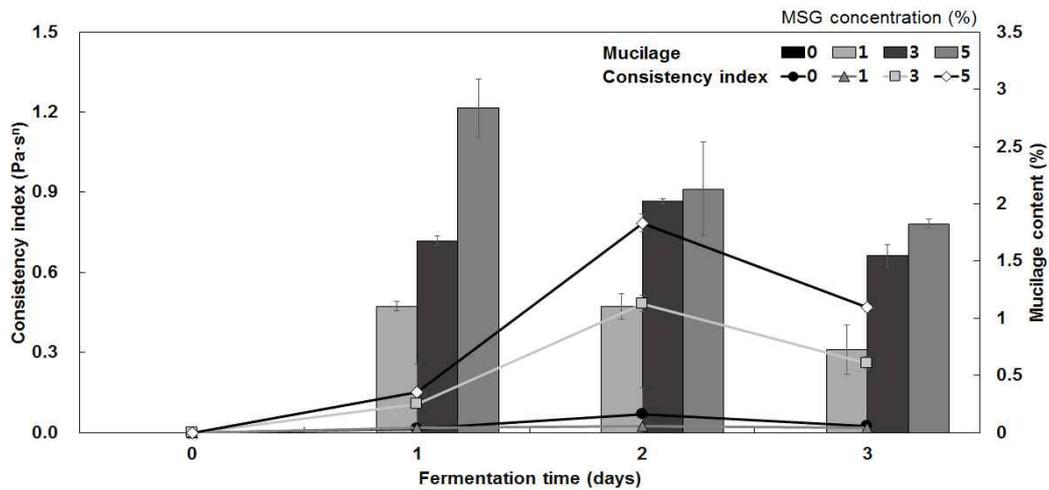


Figure 7. Consistency index and mucilage content of fermented hydroponic ginseng by *B. subtilis* HA

(다) 타이로신 측정

타이로신을 측정한 결과 초기 타이로신 4.85, 4.50, 4.63, 4.49 mg%로 측정되었고, MSG 0%의 경우 발효가 진행되면서 큰 차이를 보이지 않았다. MSG 1%의 경우 가장 큰 폭으로 증가한 후 발효 3일에는 유지되는 경향을 보였다. MSG 3, 5%의 경우 발효가 진행될수록 계속적으로 증가하는 경향을 보였다(Figure 8).

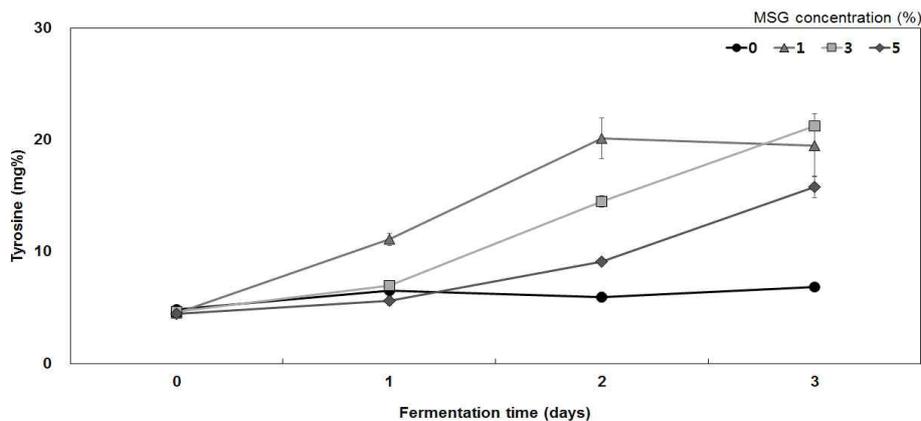


Figure 8. Tyrosine content of fermented hydroponic ginseng by *B. subtilis* HA

(라) MSG 소진 측정

γ -PGA를 생성하기 위해 첨가한 MSG의 이용을 확인하기 위해 TLC를 이용하여 소진율을 확인해보았다. MSG 0%에서 MSG spot이 확인되지 않았으며, MSG 1% 시료의 경우 발효 2일부터 MSG가 소진된 것으로 나타났다. MSG 3%와 5%의 경우 잔존하는 MSG가 있지만 발효가 진행되면서 계속적으로 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 9).

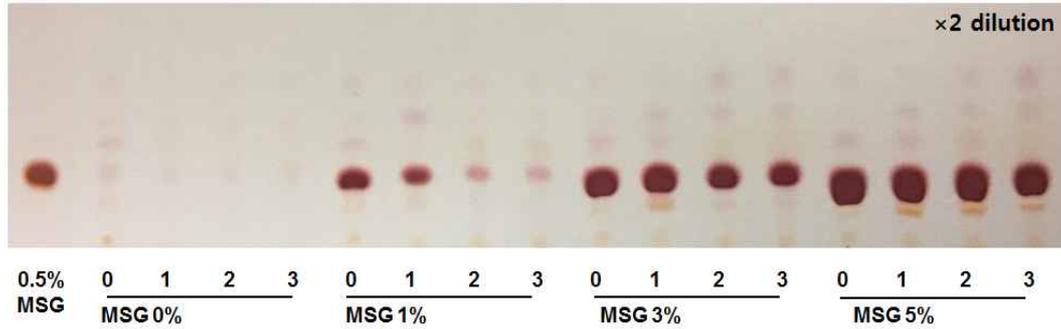


Figure 9. Consumption pattern of MSG in the hydroponic ginseng fermented by *B. subtilis* HA

다. Yeast extract (YE) 농도별(1차 고초균 발효)

(1) 재료 및 방법

디케이에코팜(천안)에서 받은 수경인삼의 뿌리와 잎을 균질화하여 5% 수경인삼 파쇄액을 제조한 후 80 mL을 121°C에서 15분간 멸균하였다. 그 후 멸균된 MSG 5%, glucose 2%, YE 0, 1, 3, 5%를 첨가하여 *Bacillus subtilis* HA 농축 starter를 2% 접종한 후, 42°C 진탕 인큐베이터에서 2일간 배양하였다. 그 후 1차 고초균 발효물에 영양성분으로 skim milk 10%를 추가적으로 첨가하여 *Lactobacillus plantarum* EJ2014 starter를 2% 접종 후 30°C 인큐베이터에서 5일간 배양하여 분석하였다(Figure 10).

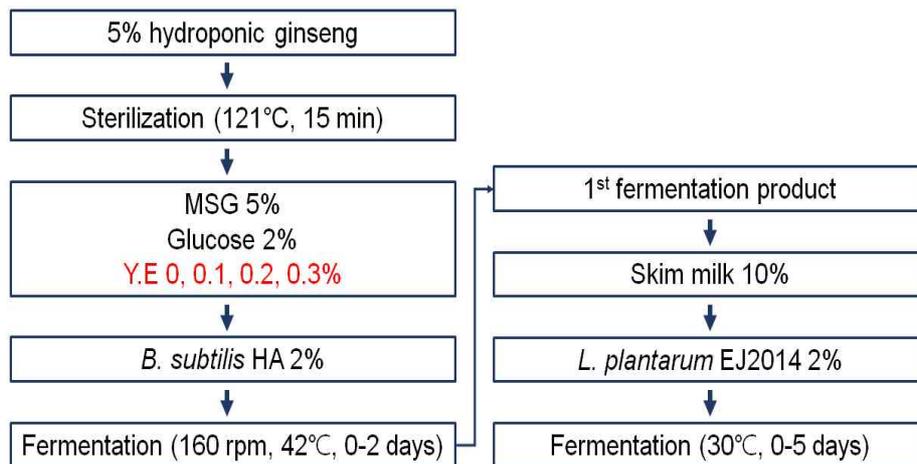


Figure 10. Method of co-fermentation by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014 according to yeast extract concentration

(2) 결과 및 고찰

(가) pH 및 산도 측정

발효 전 수경인삼 YE 농도별 시료의 pH는 6.42, 6.31, 6.29, 6.22로 YE의 함량과 시료의 pH가 반비례하는 것을 확인 할 수 있었다. YE가 들어가지 않은 조건은 1차 고초균 발효 1일 pH가 감소하여 5.88을 나타냈으나, 1차 발효 2일 7.38로 증가하였다. 반면 YE

가 첨가된 시료는 1차 고초균 발효가 진행될수록 증가하여 고초균 발효 2일 7.31, 7.63, 7.27로 측정되었다. 2차 젖산 발효 전 skim milk 첨가로 인해 pH가 5.52, 6.55, 6.58, 6.53으로 감소하였다. 2차 젖산 발효가 진행되면서 pH가 지속적으로 감소하여 2차 젖산 발효 5일에는 4.40, 4.40, 4.45, 4.39였다. 각각의 YE 농도별 시료의 초기 산도는 0.14, 0.13, 0.14, 0.15%에서 소폭 증가 후 감소하여 1차 고초균 발효 2일의 산도는 0.12, 0.14, 0.13, 0.14%를 나타내었다. 그 후 2차 젖산발효가 진행되면서 산도가 증가하여 2차 젖산 발효 5일 각 시료의 산도는 1.08, 1.35, 1.35, 1.50%로 나타났다 (Figure 11).

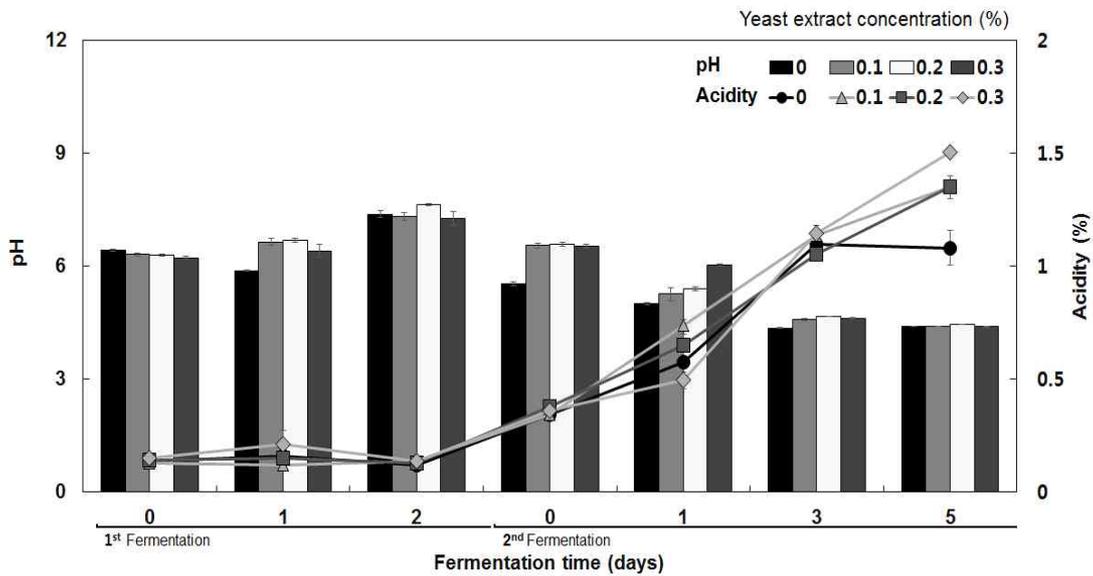


Figure 11. pH and acidity of co-fermented hydroponic ginseng by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

(나) 생균수 측정

생균수 측정 결과 1차 고초균 발효기간 동안 고초균은 10^7 CFU/mL에서 1차 고초균 발효 1일 10^8 CFU/mL 증가하였고 고초균 발효 2일 10^7 CFU/mL로 감소한 후 2차 젖산 발효가 진행되면서 계속적으로 감소하여 2차 젖산 발효 5일에 고초균은 크게 감소하면서 10^5 CFU/mL을 나타내었다. 2차 젖산 발효 중의 젖산균은 초기 10^7 CFU/mL에서 크게 증가하면서 2차 젖산발효 5일에도 10^9 CFU/mL의 높은 생균수를 유지하였다(Figure 12).

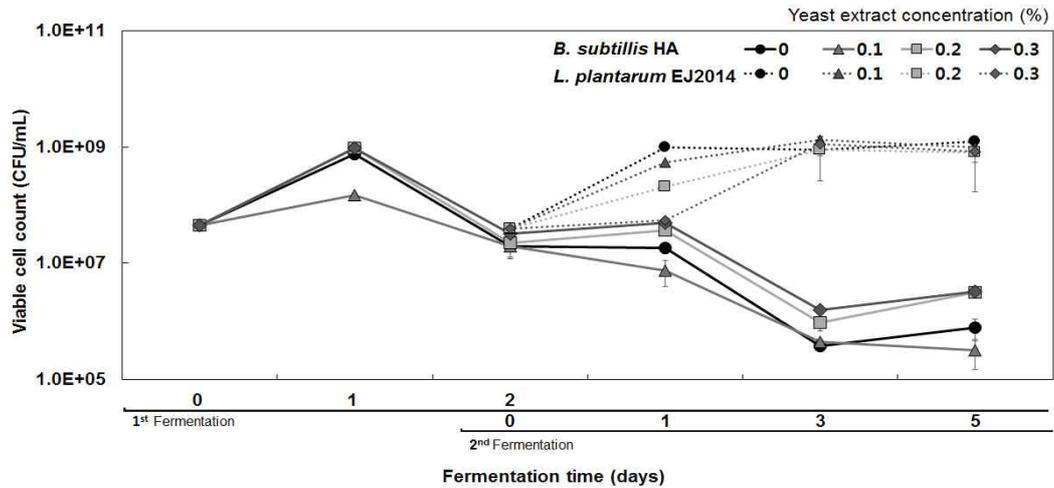


Figure 12. Viable cell count of co-fermented hydroponic ginseng by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

(다) 점조도 및 점질물 측정

수경인삼 고초균 발효 1일에서 YE 0, 0.1, 0.2, 0.3% 시료 각 각의 점조도는 0.34, 0.05, 0.02, 0.02 Pa·sⁿ로 측정되었다. 발효 2일에는 0.41, 0.15, 0.01, 0.02 Pa·sⁿ로 증가하였다. 점질물은 발효 1일 YE 0% 조건에서 2.91%에서 발효 2일 1.97%로 소폭 감소 하였으며, YE가 첨가량이 증가할수록 점질물과 점조도 값이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 13).

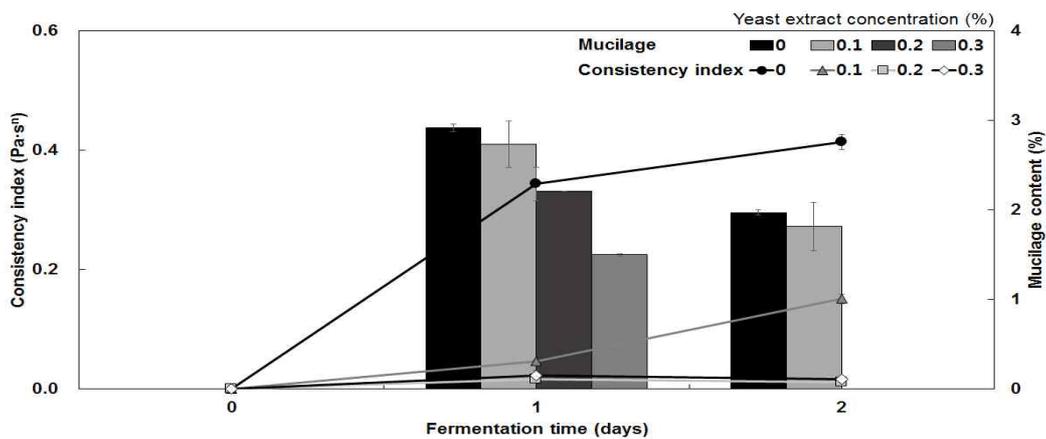


Figure 13. Consistency index and mucilage content of fermented hydroponic ginseng by *B. subtilis* HA

(라) GABA 함량 측정

GABA (γ -amino butyric acid)의 생성을 확인하기 위하여 정성분석법인 TLC를 이용한 결과이다. YE가 첨가되지 않은 조건에서 2차 발효 5일에 MSG가 GABA로 전환이 시작되는

것처럼 보였으며, YE가 0.1, 0.2, 0.3% 첨가된 조건의 결과를 보면 YE의 농도가 증가할수록 GABA의 전환 속도가 빨라지는 경향을 보였다(Figure 14).

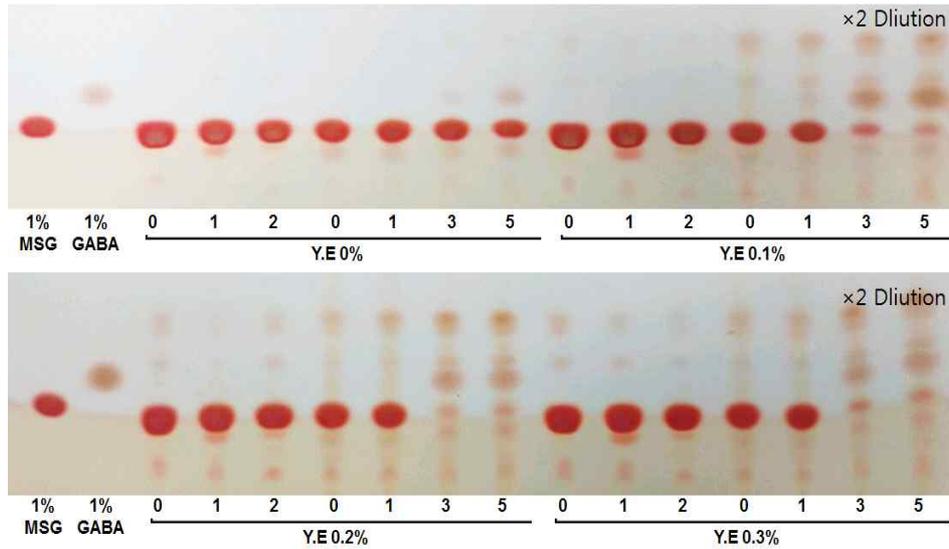


Figure 14. GABA production pattern in co-fermented hydroponic ginseng by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

라. Skim milk 농도별(2차 젖산 발효)

(1) 재료 및 방법

디케이에코팜(천안)에서 받은 수경인삼의 뿌리와 잎을 균질화하여 5% 수경인삼 파쇄액을 제조한 후 80 mL을 121°C에서 15분간 멸균하였다. 그 후 멸균된 MSG 5%, glucose 2%를 첨가하여 *B. subtilis* HA 농축 starter를 2% 접종한 후, 42°C 진탕 인큐베이터에서 2일간 배양하였다. 그 후 1차 고초균 발효물에 영양성분으로 skim milk를 0, 1, 3, 5% 추가적으로 첨가하여 *L. plantarum* EJ2014 starter를 2% 접종 후 30°C 인큐베이터에서 5일간 배양하여 분석하였다(Figure 15).

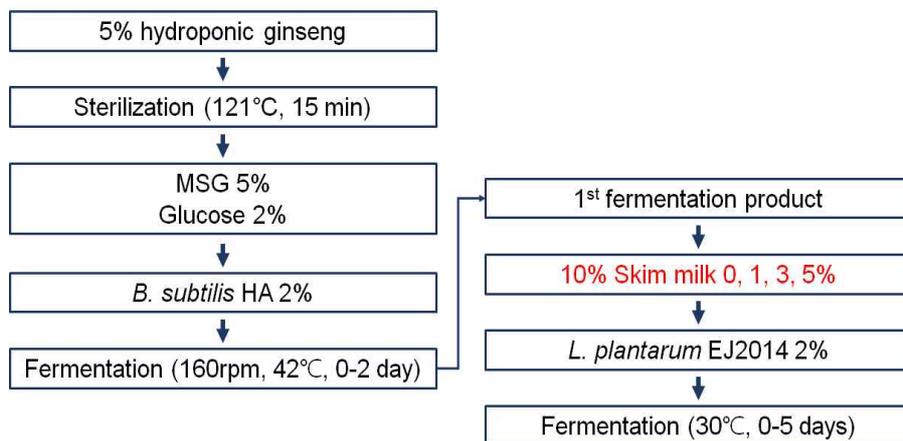


Figure 15. Method of co-fermentation by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014 according to skim milk concentration

(2) 결과 및 고찰

(가) pH 및 산도 측정

발효 전 수경인삼 배지의 pH는 6.93으로 나타났으며, 1차 고초균 발효가 진행으로 pH 증가하여 발효 2일에는 pH 8.08로 나타났다. 그 후 skim milk를 0, 1, 3, 5% 농도별 첨가한 각 각의 시료는 pH 8.08, 7.36, 5.22 7.30으로 측정되었다. 2차 젖산 발효가 진행되면서 pH는 7.86, 6.65, 4.75, 5.18로 감소하였으나, 2차 젖산 발효 5일의 pH는 8.07, 8.00, 5.85, 5.64로 다시 증가하는 경향을 보였다. 산도는 초기 0.08%에서 1차 발효 1일 0.09%로 소폭 증가 후 발효 2일 0.03%로 감소하였다. Skim milk가 첨가된 후의 산도는 0.04, 0.13, 0.86, 0.63%로 skim milk를 첨가한 조건에서 증가하였다. 2차 젖산발효가 진행되면서 산도가 증가 후 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 특히 skim milk 3% 조건에서 2차 젖산발효 1일에 0.9% 산도를 나타내었으며, 이후 산도는 급격히 감소하는 경향을 보였다. 이는 젖산균 발효에 의한 기질인 MSG가 소진되면서 GABA로 전환될 때 proton소비에 따른 산도의 감소현상으로 사료되었으며, 최종 발효물의 산도는 0.05, 0.05, 0.21, 0.36%로 측정되었다(Figure 16).

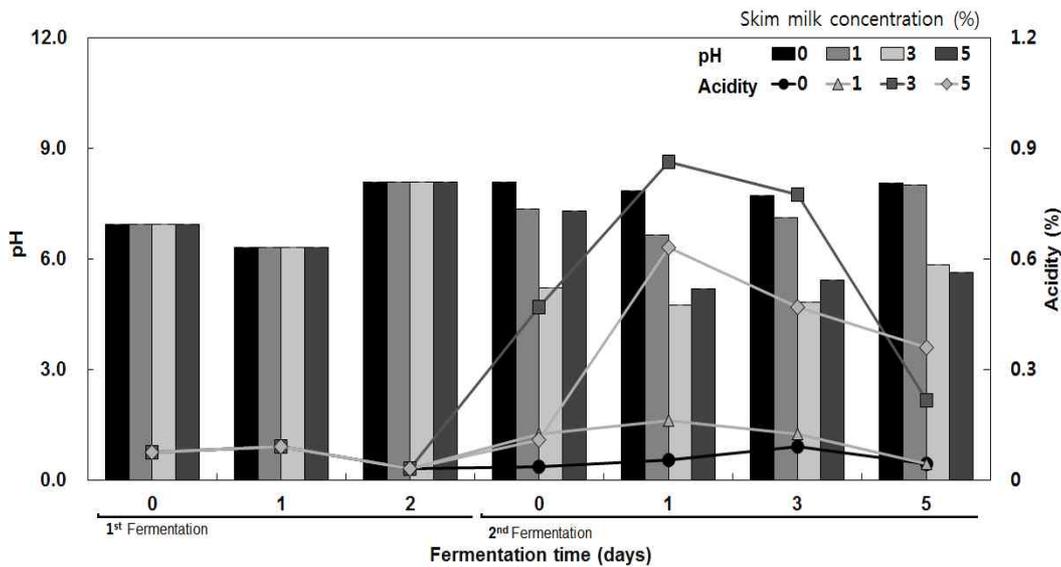


Figure 16. pH and acidity of co-fermented hydroponic ginseng by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

(나) 생균수 측정

생균수 측정 결과 1차 고초균 발효기간 동안 고초균은 10^6 CFU/mL에서 10^8 CFU/mL으로 증가하였고, 2차 젖산 발효가 진행되면서 skim milk가 0, 1%를 추가적으로 첨가한 시료의 경우 10^7 CFU/mL로 감소하였으며, skim milk 3% 조건은 10^5 CFU/mL까지 감소하였으며, skim milk 5% 조건의 시료는 10^6 CFU/mL으로 감소하였다. 젖산균의 경우 초기 10^7 CFU/mL에서 skim milk 0, 1% 조건은 점차적으로 발효 5일 10^8 CFU/mL로 증가하였고, skim milk 3, 5% 시료는 젖산 발효 1일 10^9 CFU/mL으로 증가 후 발효 5일까지 10^9 CFU/mL을 유지하였다. 이 실험을 통해 젖산발효에서 skim milk가 긍정적 영향을 미친다고 판단 할 수 있었다(Figure 17).

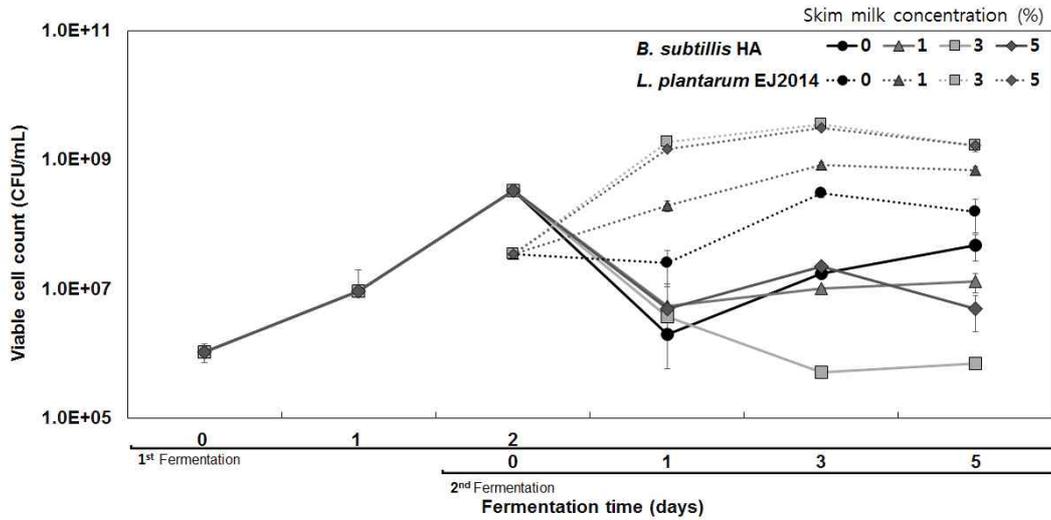


Figure 17. Viable cell count of co-fermented hydroponic ginseng by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

(다) 점조도 및 점질물 측정

수경인삼 고초균 발효 1일에서 점조도는 0.01 Pa·sⁿ로 측정되었다. 발효 2일 0.02 Pa·sⁿ로 증가하였다. 점질물은 발효 1일 2.67%에서 발효 2일 2.32%로 오차범위 내에서 소폭 감소하는 경향을 보였다(Figure 18).

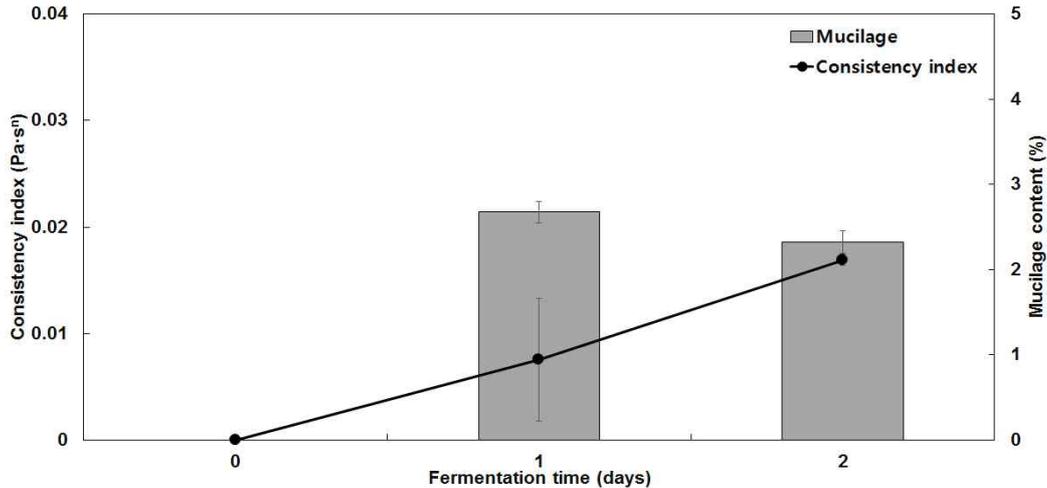


Figure 18. Consistency index and mucilage content of fermented hydroponic ginseng by *B. subtilis* HA

(라) 타이로신 측정

타이로신을 측정한 결과 발효 전의 타이로신 함량은 7.83 mg%로 측정되었고, 2일간의 1차 고초균 발효 진행 후 15.80 mg%로 나타났다. skim milk 0, 1, 3, 5%가 첨가 후 젖산 발효 전의 2차 발효 0일 각 시료의 타이로신 함량이 15.80, 16.93, 26.73, 38.31 mg%로 나타났다. 그 후 2차 발효가 진행되는 동안 타이로신 함량이 증가하여 2차 젖산발효 5

일 19.37, 24.04, 26.88, 55.12 mg%로 측정되었다. 이 실험결과 첨가된 skim milk 농도와 타이로신 함량이 비례적으로 증가하는 경향을 보였다(Figure 15). 따라서 2차 젖산균 발효시에 첨가되는 skim milk의 우유 단백질들이 단백질분해효소에 의해서 가수분해되면서 펩타이드를 생성하는 것은 최종 발효물에 기능성물질을 강화시키며 동시에 영양 성분 및 기호성을 증진시키는 것으로 나타났다(Figure 19).

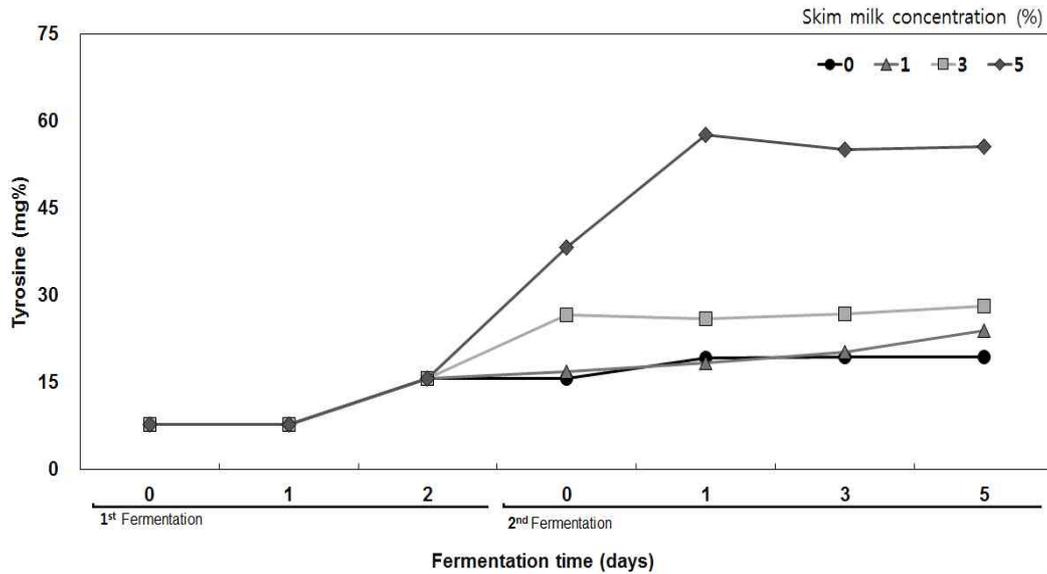


Figure 19. Tyrosine content of co-fermented hydroponic ginseng by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

(마) GABA 함량 측정

GABA (γ -aminobutyric acid)의 생성을 확인하기 위하여 정성분석법인 TLC를 이용한 결과이다. Skim milk가 첨가되지 않은 조건에서 2차 발효 5일에도 GABA가 전환되지 않는 것을 확인 할 수 있었다. Skim milk가 1% 첨가된 조건에서는 2차 발효 5일에도 잔존하는 MSG 함량이 높은 것을 확인 할 수 있었으며, skim milk 3% 수준으로 첨가된 시료의 경우 2차 발효 5일 GABA 전환율이 높은 것을 확인 할 수 있었다. Skim milk가 5% 첨가된 조건의 경우 2차 발효 5일에 거의 모든 MSG가 GABA로 전환된 것으로 보였다(Figure 16). 따라서 수경인삼의 고초균 발효를 통해서 점질물이 생성된 조건에서 2차 젖산균 발효를 수행할 때 발효성당 등을 포함한 skim milk를 추가적 첨가하는 것이 젖산균에 의한 2차 발효를 효과적으로 수행하면서 동시에 배지에 잔존하는 MSG를 기능성물질인 GABA로 전환시키는 것으로 나타났다.

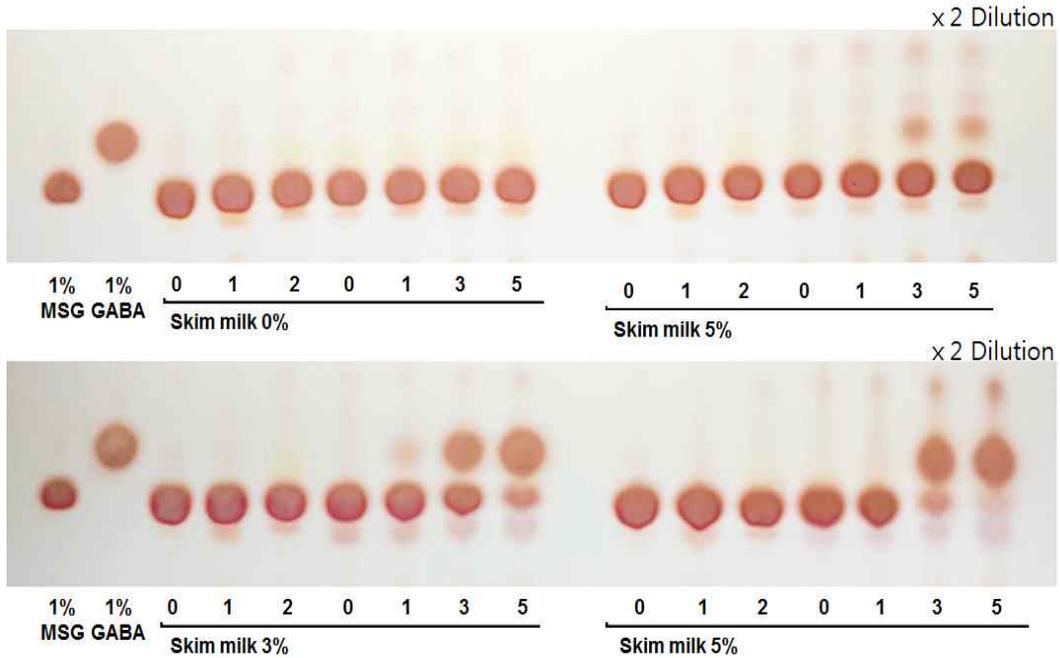


Figure 20. GABA production pattern in co-fermented hydroponic ginseng by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

마. Yeast Extract (YE) 농도별 발효특성(2차 젖산균 발효)

(1) 재료 및 방법

디케이에코팜(천안)에서 받은 수경인삼의 뿌리와 잎을 균질화하여 5% 수경인삼 파쇄액을 제조한 후 80 mL을 121°C에서 15분간 멸균하였다. 그 후 멸균된 MSG 5%, glucose 2%를 첨가하여 *Bacillus subtilis* HA 농축 starter를 2% 접종한 후, 42°C 진탕 인큐베이터에서 2일간 배양하였다. 그 후 1차 고초균 발효물에 영양성분으로 skim milk 10%와, YE 0, 1, 3, 5%를 추가적으로 첨가하여 *L. plantarum* EJ2014 starter를 2% 접종 후 30°C 인큐베이터에서 5일간 배양하여 분석하였다(Figure 21).

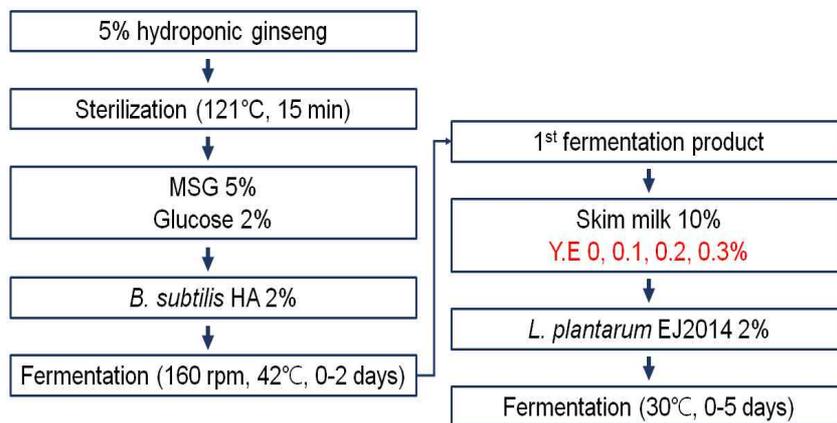


Figure 21. Method of co-fermentation by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014 according to yeast extract concentration

(2) 결과 및 고찰

(가) pH 및 산도 측정

발효 전 수경인삼의 pH는 6.45에서 1차 발효 1일과 2일 6.71, 7.46로 증가하였다. 이후 skim milk 10%와 YE 0, 0.1, 0.2, 0.3%를 첨가한 각각의 시료는 6.24, 6.26, 6.25, 6.24로 나타났다. *L. plantarum* EJ2014를 접종하여 2차 젖산 발효를 진행하는 동안 pH가 계속적으로 감소하였다. 초기 산도는 0.14%에서 소폭 증가 후 감소 후 증가하여 1차 고초균 발효 2일의 산도는 0.12%를 나타냈다. 그 후 젖산발효가 진행되면서 산도가 증가하여 2차 젖산 발효 5일에 각 시료의 산도는 1.30, 1.24, 1.28, 1.22%로 나타났다 (Figure 22).

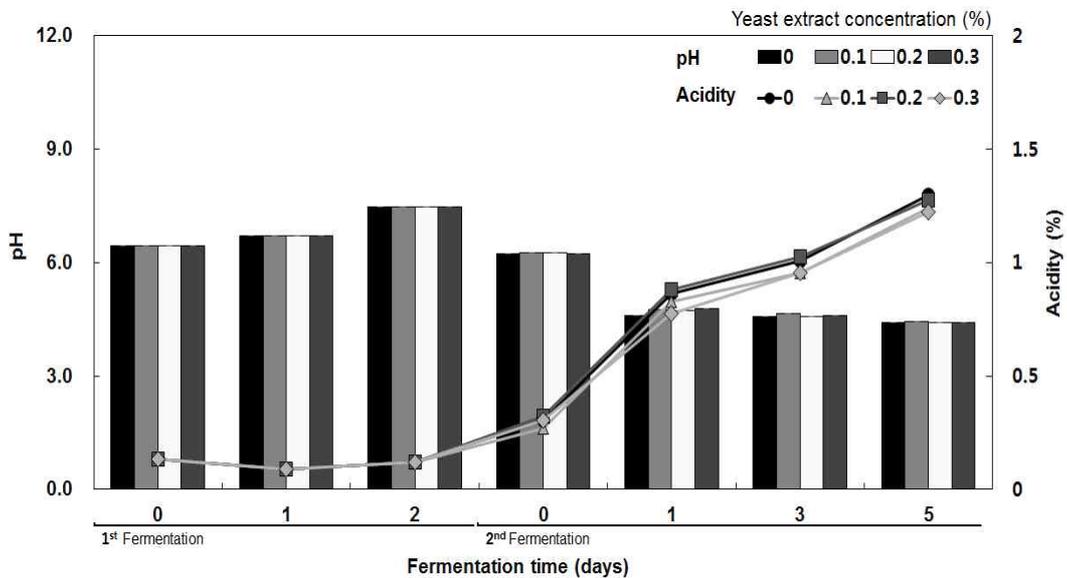


Figure 22. pH and acidity of co-fermented hydroponic ginseng by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

(나) 생균수 측정

생균수 측정 결과 1차 고초균 발효기간 동안 고초균은 10^7 CFU/mL에서 1차 고초균 발효 1일에 생균수 10^8 CFU/mL으로 증가하였고 1차 고초균 발효 2일에 생균수 10^7 CFU/mL로 감소한 후 2차 젖산 발효가 진행되면서 계속적으로 감소하여 2차 젖산 발효 5일 고초균은 10^5 CFU/mL을 나타냈다. 2차 젖산 발효 중의 젖산균은 초기 10^7 CFU/mL에서 2차 젖산 발효 5일에도 10^9 CFU/mL을 유지하였다(Figure 23). 이는 1차 수경인삼의 고초균 발효물은 2차 젖산발효 기간 동안에 매우 높은 생균수를 유지하는 것으로 보아, 발효배지에 존재하는 점질물 등이 균의 생육과 유지에 도움을 주는 것으로 판단되었다.

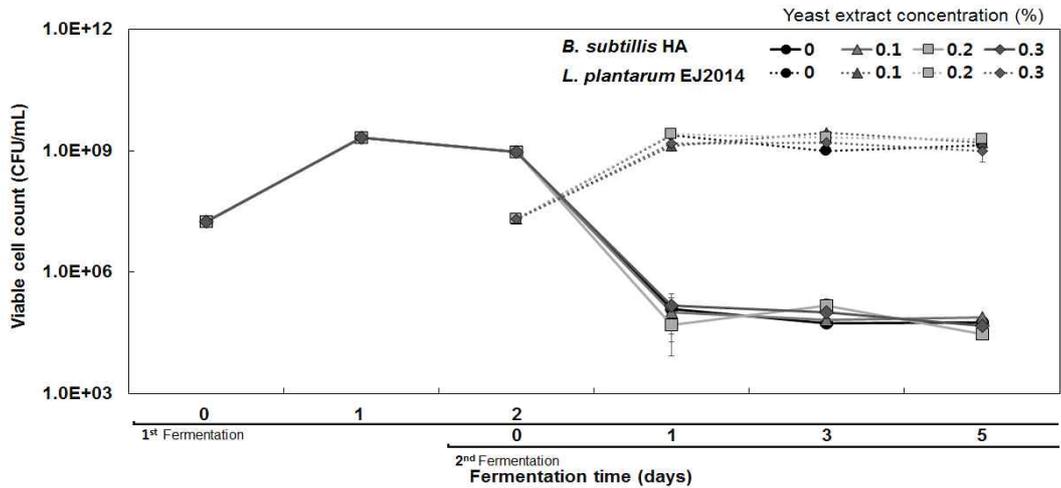


Figure 23. Viable cell count of co-fermented hydroponic ginseng by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

(다) 점조도 및 점질물 측정

수경인삼 고초균 발효 1일에서 0.61 Pa·sⁿ로 측정되었다. 발효 2일에는 0.22 Pa·sⁿ로 감소하였다. 점질물은 발효 1일 3.53%에서 발효 2일 3.82%로 소폭 증가하였다(Figure 24).

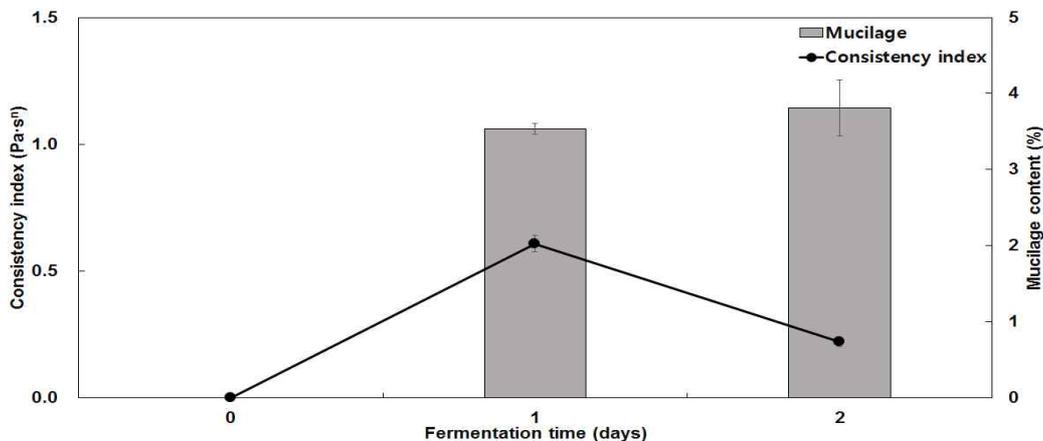


Figure 24. Consistency index and mucilage content of fermented hydroponic ginseng by *B. subtilis* HA

(라) 환원당 측정

DNS법을 이용하여 발효물의 환원당을 측정된 결과이다. 발효 전 2.16%의 당을 함유하고 있었으며 1차 고초균 발효 1일 0.25%로 거의 모든 당이 소진되었다가 고초균 발효 2일 0.51%로 소폭 증가하는 것을 확인 할 수 있었는데 이는 진세노사이드의 당고리 연결이 끊어짐으로 생산된 산으로 생각된다. 2차 젖산 발효 시작 전 추가적으로 첨가한 영양성분이 skim milk의 lactose에 의해 각 YE 농도별 2차 젖산 발효 0일 환원당의 함량은 1.77, 1.81, 1.81, 1.78%로 나타났다. 그 후 당의 함량은 감소하여 2차 젖산 발효 5일 0.20, 0.22, 0.18, 0.19%였다(Figure 25).

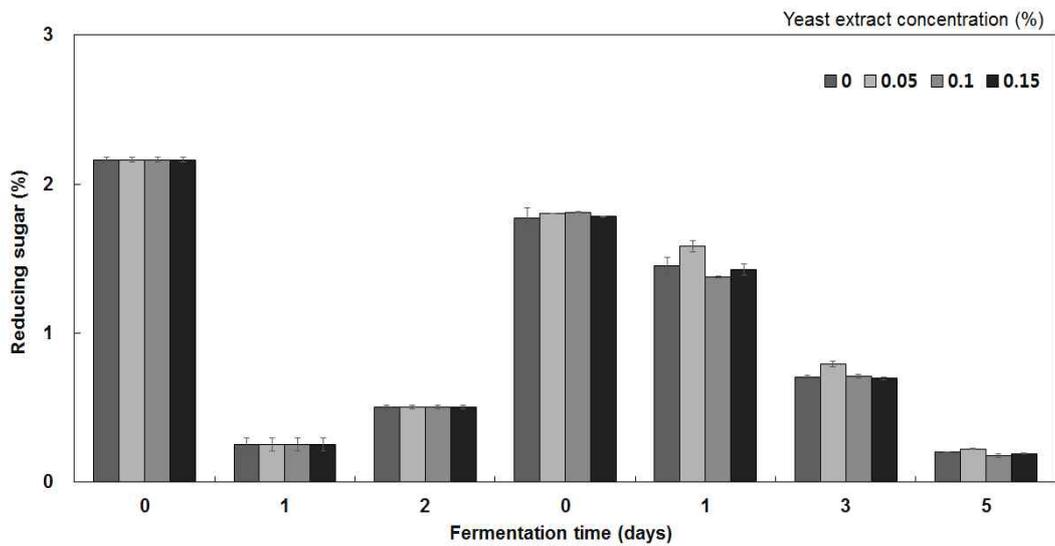


Figure 25. Reducing sugar content of fermented hydroponic ginseng by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

(마) GABA 함량 측정

① TLC 측정

TLC를 이용하여 GABA (γ -amino butyric acid)의 생성을 확인하였다. 2차 젖산균 발효 시에 추가적으로 YE가 첨가된 조건에서 MSG의 소진이 빨리 일어나는 것을 확인 할 수 있었다. YE 0.3% 첨가된 조건에서 발효 3일 만에 배지에 존재하는 MSG가 모두 GABA로 전환되는 것으로 나타났다(Figure 26).

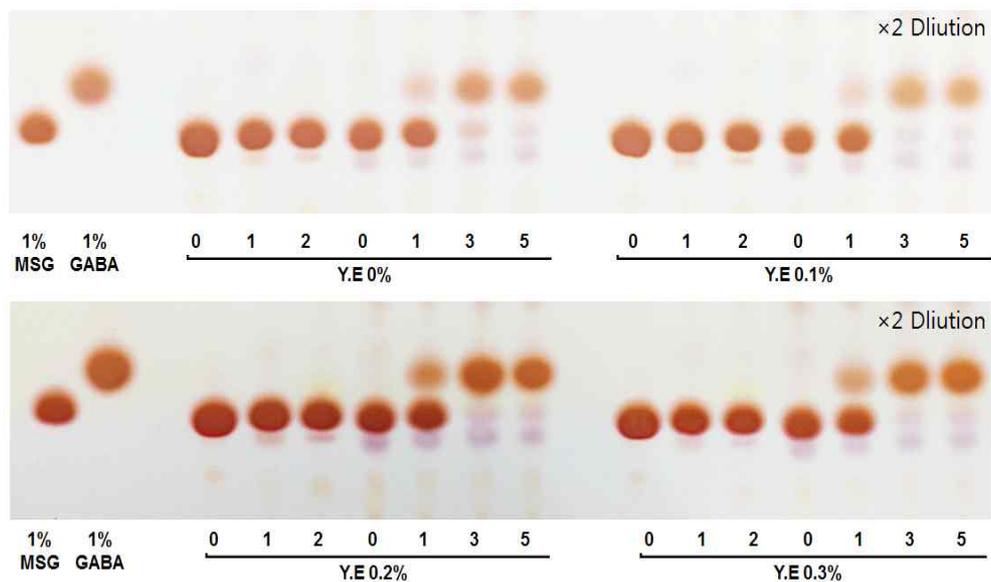


Figure 26. GABA production pattern by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014 in co-fermented hydroponic ginseng

② HPLC 측정

Y.E 0% 조건의 수경인삼 발효물을 HPLC 분석을 통해 MSG의 GABA 전환을 확인한 결과 초기 4.3%의 MSG가 함유되어 있던 5% 수경인삼 배지에서 1차 고초균 발효를 통해 γ -PGA를 생성하고 잔여하는 MSG를 skim milk의 첨가로 인해 2배 희석하여 *L. plantarum* EJ2014을 이용한 젖산발효가 진행되면서 0.9%의 GABA가 생성되었음을 확인 할 수 있었다(Table 1). 이는 1차 고초균 발효를 통해서 기질인 MSG가 이용되면서 점질물로 전환 되었으며, 2차 젖산균 발효를 통해서 잔존하는 MSG가 기능성물질인 GABA로 전환되는 것으로 확인되었다.

Table 1. Glutamate and GABA patterns of hydroponic ginseng co-fermented by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

	Fermentation Time	
	0 day	2 nd 5 day
Glutamate ($\mu\text{g/mL}$)	43320.9	-
GABA ($\mu\text{g/mL}$)	-	9032.5

(바) DPPH radical 소거능

BHA를 대조군으로 이용하여 YE를 첨가하지 않은 5% 수경인삼의 DPPH radical 소거능을 확인한 결과 BHA는 IC₅₀값을 7.54 $\mu\text{g/mL}$ 을 나타내었다. 발효 전 5%수경인삼 배지의 IC₅₀ 값은 67.40 mg/mL을 나타내었으며 1차 고초균 발효 후 5일간의 젖산균 복합발효를 진행한 발효물의 IC₅₀값은 24.70 mg/mL로 대조군으로 사용한 BHA보다 높은 값을 나타내었지만 발효를 통해 항산화활성이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다(Table 2).

Table 2. DPPH radical scavenging activities of hydroponic ginseng co-fermented by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

	Fermentation Time (days)		Control
	0	2 nd fermentation	
DPPH IC ₅₀ (mg/mL)	67.40±2.46	24.70±0.96	7.54±0.31 $\mu\text{g/mL}$ (BHA)

(사) 면역증진 효능평가

① 수경인삼 혼합발효물의 발효 전, 후 세포독성 측정

수경인삼 발효물의 세포독성이 최소화 된 농도 조건을 확인하기 위하여 대식세포 (macrophage cell) 배양액에 수경인삼발효액을 시료로 가하고 24시간 동안 처리하여 얼마나 손상 받았는지를 MTT assay를 통해 시험하였다. 농도는 발효물의 고형분 함량을 측정하여 100-1,000 ug/mL의 농도별로 희석하여 사용하였다. 그 결과, 시험한 농도 범위에서 수경인삼 발효 전, 후 모두 750 ug/mL이하의 농도에서 세포독성을 보이지 않았으며, 1,000 ug/mL에서 발효 전 세포생존율이 75.29%로 발효 후 89.03%와 비교하였을 때 수경인삼을 발효함에 따라 세포독성이 감소되는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig 27).

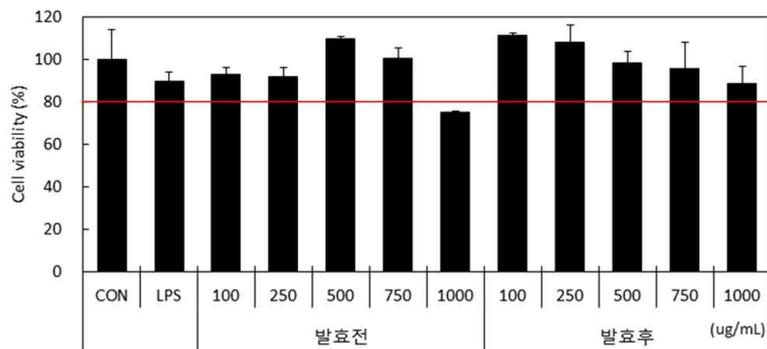


Figure 27. Comparison of cytotoxicity before and after by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014 in co-fermented hydroponic ginseng

② 수경인삼 혼합발효물의 발효 전, 후 NO생산량 비교

수경인삼 혼합발효물의 농도에 따른 NO 생성이 증진되는지 확인하기 위해 positive control로 LPS 100 ng/mL과 수경인삼 혼합발효물을 농도별로 희석하여 비교분석 하였다. 발효전 750 ug/mL의 농도에서 NO 생산량이 2.25 uM로 나타났으며, 발효 후 동일농도에서 6.67 uM로 나타났으며, 발효 후 1,000 ug/mL농도에서 7.0 uM로 가장 높게 생성되었다. Positive control로 사용한 LPS(100% 기준)와 비교하였을 때 NO 생산량이 24.76%로 나타나 면역증진의 효과는 있으나 미비한 것으로 판단되었다(Fig. 28).

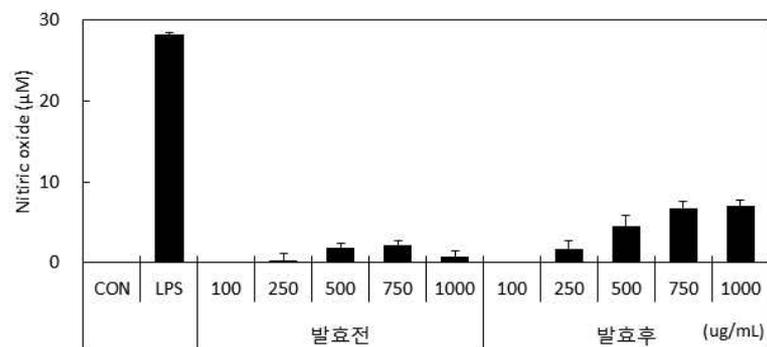


Figure 28. Comparison of NO product before and after by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014 in co-fermented hydroponic ginseng

(아) 진세노사이드 함량 분석

수경인삼 2차 발효시에 Y.E를 첨가하지 않은 조건을 분말화하여 HPLC 분석을 통해 진세노사이드의 함량 변화를 확인한 결과 총 진세노사이드 함량은 초기 21.10 mg/g에서 1차 고초균 발효 이후 16.42 mg/g로 측정하였으며. 1차 고초균 발효물에 젖산균을 접종하여 복합 발효를 진행한 후 11.01 mg/g로 측정되었다(Table 3). 발효물의 ginsenoside중에서 Rg1, Re, Rf, Rg2, Rb1, Rc, Rb2, F1, Rd, F2, Rg3, CK, Rh2 이 분석되었으며, 대표적인 성분인 Rg1, Rb1, Rg3 성분의 합은 발효초기 4.57에서 1차 고초균 발효와 2차 젖산균 발효를 거치면서 감소하여 각각 3.28, 1.82 mg/g를 나타내었다.

Table 3. Ginsenoside patterns of hydroponic ginseng co-fermented by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

	Fermentation Time (days)		
	0	1 st fermentaton	2 nd fermentation
		2	5
Rg1	2.01±0.13	1.68±0.13	1.10±0.37
Re	8.24±0.47	7.08±0.52	4.35±0.95
Rf	0.96±0.04	1.03±0.07	1.18±0.25
Rg2	0.80±0.03	0.90±0.05	0.78±0.05
Rb1	2.15±0.10	1.25±0.47	0.42±0.03
Rc	1.07±0.05	0.38±0.06	0.53±0.03
Rb2	2.08±0.19	1.59±0.46	-
F1	0.61±.14	0.66±0.09	0.62±0.07
Rd	1.16±0.05	0.63±0.53	0.32±0.02
F2	0.93±0.07	0.23±0.03	0.59±0.09
Rg3	0.41±0.01	0.35±0.12	0.44±0.07
CK	0.48±0.02	0.48±0.10	0.38±0.04
Rh2	0.20±0.01	0.16±0.02	0.28±0.01
Rg1+Rb1+Rg3	4.57±0.24	3.28±0.71	1.82±0.25
Total ginsenoside	21.10±1.24	16.42±2.25	11.01±1.27

Ginsenoside content: mg/g

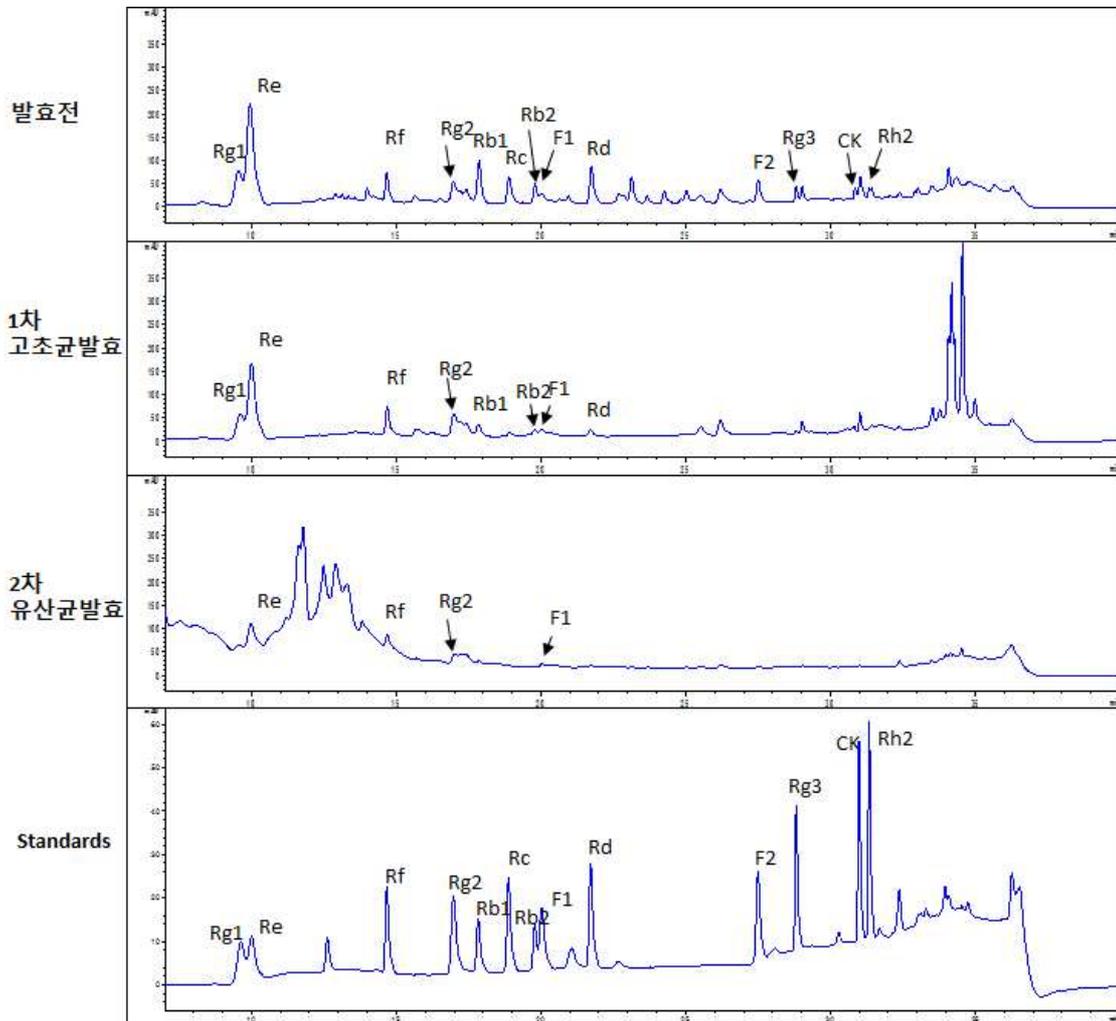


Figure 29. Ginsenoside patterns of hydroponic ginseng co-fermented by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

마. 최적조건의 시제품 제작 및 관능평가

(1) 시제품 제작 및 분석

최적 발효조건으로 판단한 MSG 5%와 glucose 2%를 첨가하여 1차 고초균 발효를 진행한 수 중 부피 대비 5%의 skim milk의 첨가와 젖산균 접종하여 총 7일의 2차 발효를 통해 γ -PGA와 GABA를 비롯한 기능성물질을 함유하고 있는 5% 수경인삼 발효물을 생산하였다. 이에 10%로 수경인삼을 분쇄한 추출물과 올리고당을 혼합하여 시제품의 감미도를 조절하였으며, 1%의 곤약파우더를 첨가하여 점조도 조절을 통해 적당한 흐름을 갖는 파우치 형태의 시제품을 만들었다. 시제품의 원료 혼합 조성비를 Table 4에서 나타내고 있다. 제조한 시제품의 이화학적 분석을 실시한 결과는 Table 5와 같으며, 최종 스파우트 파우치 제품 형태의 음료 시제품을 제작하였다(Fig. 30).

Table 4. Composition of prototype product using fermented hydroponic ginseng

	Fermented 5% HG	Crushed 10% HG	Oligosaccharide	Konjac powder
Content (%)	22	44	33	1

Table 5. Physicochemical analysis of prototype product using fermented hydroponic ginseng

Physicochemical analysis	Values
Solid content (%)	27.55±0.01
pH	4.74±0.03
Total acidity (%)	0.27±0.01
Reducing sugar content(%)	0.68±0.01
Soluble soild content (brix)	25.25±0.96
Viscosity (cP)	425±20

* Viscosity was measured using Brookfiled viscometer (Spindle #1, 12 rpm, 15°C)



Figure 30. Packaging of prototype product

4. 목표달성도

코드번호	D-06
------	------

가. 목표달성도

1차년도															
일련번호	연구내용	월별 추진 일정											목표달성도(%)		
		12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11	
1	수경재배인삼의 고초균 발효최적화 조건 설정	■	■												100
2	수경재배인삼의 젖산균 발효최적화 조건 설정	■	■												100
3	고초균/젖산균 이단발효 조건 최적화			■	■	■	■	■							100
4	발효물의 이화학적 성분 분석	■	■	■	■	■	■								100

나. 기술이전 및 후속 연구

- (1) 해당 연구에 대한 기술이전을 통한 기업의 기술력 확보
- (2) 지속적인 산학협력 및 공동연구를 통해서 수경인삼의 고부가가치화 및 국내외 경쟁력 있는 신제품 개발
- (3) 수경인삼의 발효중에 인삼 성분변화 및 효능향상에 대한 공동연구 추진
- (4) 기능성 및 안전성을 추가적으로 검증하는 후속연구를 진행하여 고부가가치 소재화하며, 향후 화장품 원료 및 건강 기능성식품으로 개발할 가능성이 있음

6. 연구과정에서 수집한 해외 과학기술 정보

	코드번호	D-08
1. Hsu BY, Lu TJ, Chen CH, Wang SJ, Hwang LS, 2013, Biotransformation of ginsenoside Rd in the ginseng extraction residue by fermentation with lingzhi (<i>Ganoderma lucidum</i>), Food chemistry, 141: 4186-4193		
2. Tan JS, Yeo CR, Popovich DG, 2017, Fermentation of protopanaxadiol type ginsenosides (PD) with probiotic <i>Bifidobacterium lactis</i> and <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , Appl Microbiol Biotechnol, 101(13): 5427-5437		
3. Qi LW, Wang CZ, Yuan CS, 2011, Ginsenosides from American ginseng: chemical and pharmacological diversity, Phytochemistry, 72(8): 689-99		
4. Yu W, Chen Z, Ye H, Liu P, Li Z, Wang Y, Li Q, Yan S, Zhong CJ, He N. 2017, Effect of glucose on poly-γ-glutamic acid metabolism in <i>Bacillus licheniformis</i> , Micro. Cell. Fact, 16:22		
5. Fu Y, Yin Z, Wu L, Yin C, 2014, Diversity of cultivable beta glycosidase-producing micro-organisms isolated from the soil of a ginseng field and their ginsenosides-hydrolysing activity, Lett. Appl. Microbiol., 58: 138 - 144.		
6. Noh KH, Oh DK, 2009, Production of the rare ginsenosides compound K, compound Y, and compound Mc by a Thermostable beta-glycosidase from <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> , Biol. Pharm. Bull, 32: 1830 - 1835.		
7. Ye J, Yao JP, Wang X, Zheng MY, Li P, He CW, Wan JB, Yao XL, Su HX, 2016, Neuroprotective effects of ginsenosides on neural progenitor cells against oxidative injury, Mol. Med. Rep., 13: 3083 - 3091.		
8. Block ML, Zecca L, Hong JS, 2007, Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms, Nat. Rev. Neurosci., 8: 57 - 69.		
9. Radad K, Moldzio R and Rausch WD, 2011, Ginsenosides and their CNS targets, CNS Neurosci. Ther., 17: 761 - 768		
10. Zhou W, Yan Q, Li JY, Zhang XC, Zhou P, 2008, Biotransformation of Panax notoginseng saponins into ginsenoside compound K production by <i>Paecilomyces</i>		

bainier sp. 229, J. Appl. Microbiol., 104: 699 - 706.

11. Liu CY, Zhou RX, Sun CK, Jin YH, Yu HS, Zhang TY, Xu LQ Jin FX, 2015, Preparation of minor ginsenosides C-Mc, C-Y, F2, and C-K from American ginseng PPD-ginsenoside using special ginsenosidase type-I from *Aspergillus niger* g.848, J. Ginseng Res., 39:221 - 229.
12. Quan LH, Piao JY, Min JW, Kim HB, Kim SR, Yang DU, Yang DC, 2011, Biotransformation of ginsenoside Rb-1 to prosapogenins, gypenoside XVII, ginsenoside Rd, ginsenoside F-2, and compound K by *Leuconostoc mesenteroides* DC102, J. Ginseng Res., 35: 344 - 351
13. Chen GT, Yang M, Song Y, Lu ZQ, Zhang JQ, Huang HL, Wu LJ, Guo DA, 2008, Microbial transformation of ginsenoside Rb(1) by *Acremonium strictum*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 77: 1345 - 1350.

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
해당 없음		

8. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11		
<p>가. 2017 전반기 실험실 안전관리시스템 교육 실시</p> <p>(1) 2017. 03. 02 - 2017. 07. 31 계명대학교에서 온라인 교육 수행</p> <p>나. 2017 후반기 실험실 안전관리시스템 교육 실시</p> <p>(1) 2017. 09. 14 계명대학교에서 오프라인교육 수행</p> <p>(가) 연구실 안전관리 시스템 매뉴얼</p> <p>(나) 연구실 안전업무 안내</p> <p>(2) 2017. 11. 02 재난대응 안전한국훈련 계명대학교에서 오프라인교육 수행</p> <p>(가) 화재안전사고 대응 및 실험실 사고사례</p> <p>(나) 실험실 사고 대응 복구 및 행동요령</p> <p>(다) 실험실 안전점검</p> <p>(3) 소방안전 훈련 실시</p> <p>(가) 2017. 12. 01 성서소방서에서 실시함.</p>				

9. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	코드번호		D-12		
					논문게재지/특허등록국가	Impact Factor	논문게재일/특허등록일	사사여부	특기사항
1	학술 발표	Production of poly- γ -glutamic acid and γ -amino butyric acid in hydroponic ginseng using <i>Bacillus subtilis</i> HA and <i>Lactobacillus plantarum</i> EJ2014	계명 대학교		아시아 유산균학회		2017.07.03		
2	학술 발표	Physicochemical and functional properties of hydroponic ginseng co-fermented by <i>Bacillus</i> sp. and <i>Lactobacillus</i> sp.	계명 대학교		한국식품영양과학회		2017.11.08		
3	특허 출원	수경재배인삼을 활용한 항산화 및 면역증강효과가 있는 발효음료개발 (출원번호 10-2017-0126307)	계명 대학교		대한민국		2017.07.03	단독사사	

10. 기타사항

코드번호	D-13
해당 없음	

붙임. 참고문헌

코드번호	D-14
1.	Lee AR, 2015, Bioavailability of hydroponic cultured ginseng leaves by fermentation, Jungwon University, Chungbuk, Korea
2.	Kim DS, 2010, Study on the condition of fermentation in lactic acid bacteria for the production of γ -aminobutyric acid, Hannam University, Deajeon, Korea
3.	Kim JS, 2013, Optimum bioconversion of sodium glutamate to γ -poly-glutamic acid and γ -aminobutyric acid by mixed fermentation using lactic acid bacteria and <i>Bacillus subtilis</i> HA, Keimyung University, Deagu, Korea
4.	Lee HJ, 2016, Isolation, identification and characterization of γ -amino butyric acid (GABA) producing bacteria, Silla University, Busan, Korea
5.	Hwang YG, 2014, Preparation of Starter Kimchi Using GABA-producing <i>Lactobacillus brevis</i> , Chonnam National University, Gwangju, Korea
6.	Chang JS, Lee BS, Kim YC. 1992, Changes in γ -aminobutyric acid (GABA) and the main constituents by a treatment conditions and of anaerobically treated green tea leaves. Korean. J. Food Tech. 24(4): 315-319
7.	Oh SH, Oh CH. 2003, Brown rice extract with enhanced levels of GABA stimulate immune cells, Food Sci. Biotechnol. 12(3): 248-252
8.	Kim JE, Whang K, Lee SP. 2010, ACE inhibitory and hydrolytic enzyme activities in textured vegetable protein in relation to the solid state fermentation period using <i>Bacillus subtilis</i> HA, Food Sci. Biotechnol. 19(2): 487-495
9.	Park HS, 2016, Antioxidant activity of ginseng grown under hydroponic conditions, Kongju National University, Kongju, Korea
10.	Choi MH, Shin HJ, 2015, Anti-oxidantive and anti-melanogenesis effects of blueberry extract, Chosun University, Gwangju, Korea
11.	Jung SY, 2014, Microbial transformation of ginsenoside C-K and F1 by <i>Lactobacillus brevis</i> and activity on tyrosinase of mouse B16 cell, Kyung Hee University, Suwon, Korea
12.	Jeon JN, 2012, Physicochemical properties of fermented red ginseng extract using <i>Lactobacillus paracasei</i> JW04, Kyung Hee University, Suwon, Korea
13.	Lee JM. 2015, The study physicochemical properties and composition of ginsenosides in red ginseng extract by subcritical water extraction, Ewha Womans University, Korea

뒷면지

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.