



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월09일

(11) 등록번호 10-1575867

(24) 등록일자 2015년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 1/10 (2006.01) A23L 1/182 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0158119

(22) 출원일자 2013년12월18일

심사청구일자 2013년12월18일

(65) 공개번호 10-2015-0071765

(43) 공개일자 2015년06월29일

(56) 선행기술조사문헌

김치로부터 Phytate 분해유산균 선별 및 현미에서의 반응특성, 한국식품영양과학회지 42(4) 2013

KR1020120126619 A

JP2011055832A

KR1020070071911 A

(73) 특허권자

한국식품연구원

경기도 성남시 분당구 안양관교로1201번길 62 (백현동)

(72) 발명자

박성희

서울 관악구 봉천로 308-22, (봉천동)

김태운

광주광역시 남구 효사랑길 14 포스코아파트 103동 1608호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 1 항

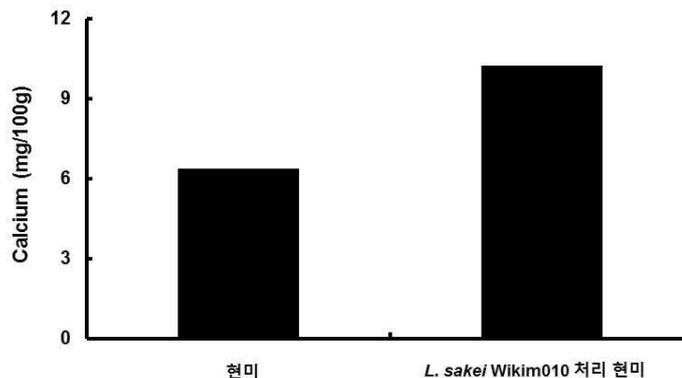
심사관 : 김태산

(54) 발명의 명칭 유리 칼슘 함량이 향상된 곡물 조성물 제조방법

(57) 요약

본 발명은 유리 칼슘 함량이 향상된 곡물 조성물 및 이를 이용한 골다공증 예방을 위한 조성물에 관한 것으로, 곡물 및 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 포함하는 것을 특징으로 하는 본 발명에 따른 유리 칼슘 함량이 증가된 곡물 조성물은 곡물내 함유된 피탄산을 분해하여 곡물내 유리 칼슘의 함량을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 조골세포 증식효과가 월등하다. 따라서, 본 발명의 유리 칼슘 함량이 증가된 곡물 조성물은 골다공증 예방을 위한 조성물로서 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

강미란

광주 서구 풍암순환로 10, 202동 1506호 (풍암동,
중흥아파트2차)

임현정

광주 남구 백양로51번길 4, 305 (백운동,
센트레빌)

정종성

경기 안성시 서운면 제3공단1길 100,

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545006585

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발

연구과제명 유산균을 이용한 저피틴산 곡물 발효기술개발 및 기능성 효과 구명

기 여 율 1/1

주관기관 한국식품연구원 부설 세계김치연구소

연구기간 2013.08.19 ~ 2014.08.18

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 유리 칼슘 함량이 증가된 곡물 조성물을 제조하는 방법:

(S1) 현미 45 내지 55 중량%, 흑미 5 내지 10 중량%, 찰쌀 5 내지 10 중량%, 찰보리쌀 5 내지 10 중량%, 찰기장쌀 5 내지 10 중량%, 겉보리쌀 5 내지 10 중량%, 수수 5 내지 10 중량%, 대두 5 내지 10 중량%, 서리태 5 내지 10 중량% 및 팥 5 내지 10 중량%를 혼합하는 단계;

(S2) 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주(한국미생물보존센터 수탁번호 : KFCC11571P)를 상기 혼합곡물의 총중량을 기준으로 하여 1 내지 10중량%의 양으로 접종하는 단계; 및

(S3) 상기 균주를 접종한 혼합곡물을 25 내지 35℃에서 20 내지 30 시간동안 반응시키는 단계.

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 유리 칼슘 함량이 향상된 곡물 조성물 및 이를 이용한 골다공증 예방을 위한 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 곡물에 함유된 피틴산을 분해할 수 있는 락토바실러스 사케이 균주를 사용하여 곡물내에 유리 칼슘 함량이 향상된 곡물 조성물 및 이를 이용한 골다공증 예방효과를 갖는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

피틴산(Phytic acid, myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate)은 곡류와 콩과식물의 씨앗 중에 인과 이노시톨(inositol)의 중요한 저장물질이다. 피틴산의 작용은 음식물 내부에서 칼슘과 같은 유용한 무기물과 강력히

결합하여 무기물의 소화나 흡수를 저해하는 항영양 인자로 작용하게 된다. 특히 피틴산은 소화기관중 장관내에서 칼슘의 흡수를 억제함으로써 골다공증을 유발하는 간접적인 원인이 될 수가 있는 것으로 알려져 있다.

[0003] 한편, 칼슘은 골격조직의 성장, 뼈와 치아의 구성성분일 뿐 아니라, 생체내 각종 효소의 활성화, 신경흥분의 조절, 근육 수축과 이완, 심장의 규칙적인 박동 그리고 혈액응고 등 체내의 생리조절 기능에 중요한 무기질이다. 그러나, 현대인의 생활수준 향상에 따른, 동물성 단백질의 섭취 증가와 운동부족, 과도한 음주, 흡연, 고지방식, 카페인 및 스트레스 등으로 인해 칼슘 흡수율은 더욱 떨어져 칼슘 섭취의 필요성이 더욱 증대되고 있다. 그러나, 칼슘은 물에 불용성일 뿐만 아니라 특유의 쓴맛으로 인하여 식품에 첨가하기가 곤란하며 그 체내 흡수율 또한 매우 낮아서 거의 대부분이 체외로 배출된다.

[0004] 따라서, 이러한 피틴산을 분해시키기 위한 방법으로 화학적인 처리가 시도되었으나, 공존하는 영양소를 파괴시키기 때문에 실용화되지 못하는 실정이다. 식품이나 사료에 대한 영양적인 악영향이 없이 피틴산을 분해시키기 위한 수단으로 피타아제가 가장 효과적이라고 입증된 후, 피타아제를 생산하는 미생물을 검색하기 위한 연구가 1960년대부터 진행되었으며, 유산균 및 효모의 피타아제 활성에 대하여 국외에서 꾸준히 연구되어 왔다. 특히 통 밀가루(whole wheat flour)로 빵을 부풀리는 데 사용하는 유산균과 효모의 공생 배양물인 사워도우(Sourdough)를 제조하여 빵을 만드는 경우, 유산균 배양으로 반죽의 pH가 낮아지고 밀에 존재하는 피타아제의 활성화로 밀가루에 함유된 피틴산이 효과적으로 분해되는 것으로 보고되어 있으며, 자돈분변에서 분리한 락토바실러스 파라카제이 서브스피시스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*)는 우수한 피틴산 분해력을 가지고 있으며, 분리 균주를 비육돈 사료에 첨가하여 급여한 결과 사료효율 개선효과를 얻었다고 하였으며, 인 함량이 낮은 사료를 급여한 쥐에 있어 사카로마이세스 세레비시에 효모 제제(*Saccharomyces cerevisiae* yeast culture) 4~6% 첨가시 피틴산의 인산기(Phytate-P)의 이용성이 높아졌다고 하였다. 뿐만 아니라 산란계에 있어 인 함량이 낮은(0.25%) 사료급여시 유산균의 첨가에 의해 P 축적율이 개선되었는데, 이는 함유된 피타아제 및 장내 pH 저하에 따른 결과라고 하였다. 하지만 이는 주로 동물사료의 피틴산 저감에 대한 연구이며, 식품 중 피틴산 분해에 대한 연구는 대부분 밀가루를 재료로 사용하는 빵 제품에 집중되어 있으며, 쌀 제품의 피틴산 분해에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다.

[0005] 이에 본 발명자들은 곡물내 피틴산을 분해하여 유리 칼슘의 함량이 증가된 곡물 조성물을 개발하기 위해 계속 연구를 진행하던 중 곡물내 피틴산을 분해할 수 있는 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 분리 및 동정하여 곡물에 첨가하여 발효시킨 조성물내 유리 칼슘 함량이 증가되어 이를 식용할 경우 골다공증 예방 효과를 나타낸다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서, 본 발명에서 해결하고자 하는 기술적 과제는 곡물내 유리 칼슘의 함량이 증가된 곡물 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0007] 또한, 본 발명에서 해결하고자 하는 다른 기술적 과제는 상기 유리 칼슘의 함량이 증가된 곡물 조성물의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

[0008] 또한, 본 발명에서 해결하고자 하는 또다른 기술적 과제는 상기 유리 칼슘의 함량이 증가된 곡물 조성물을 포함하는 골다공증 예방을 위한 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기한 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명에서는 곡물 및 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 포함하는 것을 특징으로 하는 유리 칼슘 함량이 증가된 곡물 조성물을 제공한다.

[0010] 상기한 다른 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명에서는 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 유리 칼슘 함량이 증가된 곡물 조성물을 제공한다.

[0011] (S1) 현미 45 내지 55 중량%, 흑미 5 내지 10 중량%, 찰쌀 5 내지 10 중량%, 찰보리쌀 5 내지 10 중량%, 찰기장쌀 5 내지 10 중량%, 결보리쌀 5 내지 10 중량%, 수수 5 내지 10 중량%, 대두 5 내지 10 중량%, 서리태 5 내지 10 중량%,

지 10 중량% 및 팔 5 내지 10 중량%를 혼합하는 단계;

- [0012] (S2) 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 상기 혼합곡물의 총중량을 기준으로 하여 1 내지 10중량%의 양으로 접종하는 단계; 및
- [0013] (S3) 상기 균주를 접종한 혼합곡물을 25 내지 35℃에서 20 내지 30 시간동안 반응시키는 단계.
- [0014] 상기한 또다른 기술적 과제를 달성하기 위하여, 상기 유리 칼슘 함량이 증가된 곡물 조성물을 포함하는 골다공증 예방을 위한 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따른 유리 칼슘 함량이 증가된 곡물 조성물은 곡물내 함유된 피탄산을 분해하여 곡물내 유리 칼슘의 함량을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 조골세포 증식효과가 월등하다. 따라서, 본 발명의 유리 칼슘 함량이 증가된 곡물 조성물은 골다공증 예방을 위한 조성물로서 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 본 명세서에 첨부되는 다음의 도면들은 본 발명의 바람직한 실시예를 예시하는 것이며, 전술한 발명의 내용과 함께 본 발명의 기술사상을 더욱 이해시키는 역할을 하는 것이므로, 본 발명은 그러한 도면에 기재된 사항에만 한정되어 해석되어서는 아니 된다.
 - 도 1은 현미에 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 접종하여 배양한 후 피탄산 함량 변화를 나타낸 그래프이다.
 - 도 2는 보리에 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 접종하여 배양한 후 피탄산 함량 변화를 나타낸 그래프이다.
 - 도 3은 서리태에 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 접종하여 배양한 후 피탄산 함량 변화를 나타낸 그래프이다.
 - 도 4는 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주의 처리에 따른 현미의 칼슘 함량 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
 - 도 5는 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주의 처리에 따른 인간 유사조골세포주인 SaOS-2의 세포증식 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명의 유리 칼슘 함량이 증가된 곡물 조성물은 곡물 및 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 바람직하게, 본 발명에서 곡물은 현미이거나, 또는 현미와 함께 흑미, 찹쌀, 찰보리쌀, 찰기장쌀, 걸보리쌀, 수수, 대두, 서리태 및 팥으로 이루어진 곡물 중 선택된 하나 이상의 곡물을 혼합한 혼합곡물일 수 있다.
- [0019] 바람직하게, 본 발명에서 곡물로서 현미와 이외의 곡물을 혼합한 혼합곡물일 경우, 현미 45 내지 55 중량%; 및 흑미, 찹쌀, 찰보리쌀, 찰기장쌀, 걸보리쌀, 수수, 대두, 서리태 및 팥으로 이루어진 곡물 중 선택된 하나 이상의 곡물 45 내지 55 중량%로 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0020] 더욱 바람직하게, 본 발명에서 혼합곡물은 45 내지 55 중량%, 흑미 5 내지 10 중량%, 찹쌀 5 내지 10 중량%, 찰보리쌀 5 내지 10 중량%, 찰기장쌀 5 내지 10 중량%, 걸보리쌀 5 내지 10 중량%, 수수 5 내지 10 중량%, 대두 5 내지 10 중량%, 서리태 5 내지 10 중량% 및 팥 5 내지 10 중량%로 이루어진 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명에서 사용되는 곡물은 시중에서 쉽게 구할 수 있는 곡물로서 이에 특별한 제한이 없다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주는 곡물에 함유된 피탄산의 저감효과를 가지며 곡물내 유리 칼슘의 함량을 증가시킬 수 있는 균주로서, 락토바실러스 사케이 균주와 99%의 상동성을 가지는 바 락토바실러스 사케이 균주로 동정될 수 있다. 본 발명에서는 상기 균주를 "락토바실러스 사케이 Wikim010(*Lactobacillus sakei* Wikim010)"으로 명명하고 이를 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms)에 기탁번호 제 KFCC 11571P 호로서 2013년 12월 3일자로 수탁하였다.

- [0023] 본 발명의 유리 칼슘 함량이 증가된 곡물 조성물은 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 곡물의 총중량을 기준으로 하여 1 내지 10 중량%의 양으로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 본 발명의 유리 칼슘 함량이 증가된 곡물 조성물은
- [0025] (S1) 현미 45 내지 55 중량%, 흑미 5 내지 10 중량%, 찹쌀 5 내지 10 중량%, 찰보리쌀 5 내지 10 중량%, 찰기장쌀 5 내지 10 중량%, 겉보리쌀 5 내지 10 중량%, 수수 5 내지 10 중량%, 대두 5 내지 10 중량%, 서리태 5 내지 10 중량% 및 팥 5 내지 10 중량%를 혼합하는 단계;
- [0026] (S2) 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 상기 혼합곡물의 총중량을 기준으로 하여 1 내지 10중량%의 양으로 접종하는 단계; 및
- [0027] (S3) 상기 균주를 접종한 혼합곡물을 25 내지 35℃에서 20 내지 30 시간동안 반응시키는 단계를 포함하는 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 유리 칼슘 함량이 증가된 곡물 조성물은 곡물내 함유된 피틴산을 분해하여 곡물내 유리 칼슘의 함량을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 조골세포 증식효과가 월등하다.
- [0029] 따라서, 본 발명의 유리 칼슘 함량이 증가된 곡물 조성물은 골다공증 예방을 위한 조성물로서 이용될 수 있다.
- [0030] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 발명의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0031] <실시예 1> 피틴산 분해능을 가지는 락토바실러스 사케이 균주의 분리 및 동정
- [0032] <1-1> 김치로부터 유산균의 분리
- [0033] 김치시료를 균의 분리가 가능한 농도로 생리식염수로 희석하여 MRS 고체배지에 도말하여 30℃, 미호기 조건에서 48시간 배양하였다. 배지에서 성장한 150여개의 집락들 중 외관상 색깔과 모양이 차이가 나는 집락을 순수 분리하였다.
- [0034] 유산균주들을 MRS 액체배지(Difco, USA)를 사용하여 배양한 후 대수기에 있는 배양액에 글리세롤 25%(v/v)가 되게 첨가하여 -70℃에서 보관하였으며 실험에 사용할 경우 5 mL MRS 액체배지에 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 후 MRS 액체배지에 1차 계대배양하고 다시 MRS 액체배지에 2차 계대하여 30℃에서 24시간 배양하였다. 피타아제의 활성도는 Quan과 Shimizu의 방법을 변형하여 분석하였으며, 세포내 피타아제 활성(intracellular phytase activity)은 배양액을 원심분리하여 균체를 수확한 후 0.85% NaCl 용액으로 2-3회 세척하고 0.2M 아세트레이트(acetate) 완충용액(pH 3.5)에서 유산균체의 피타아제 활성을 측정하여 피타아제 활성이 우수한 균주를 선발하였다.
- [0035] 세포내 피타아제 활성은 단위 배양액이 함유하는 세포의 효소활성을 용량을 기준으로 한 세포내 효소활성의 합으로 나타내었다. 기질로 사용한 2mM의 피틴산나트륨(sodium phytate) 활성은 세포의 활성과 용량을 기준으로 한 세포내 효소활성의 합으로 나타내었다. 기질로 사용한 2mM의 피틴산나트륨 용액 0.9ml를 37℃에서 충분히 예열시킨 후 0.1ml의 조효소액 또는 균체 현탁액을 첨가하여 10분간 반응시킨 후, 10% TCA 1ml를 첨가하여 효소활성을 중지시켰다. 이 반응 완료액에 발색시약 1.5ml(5.5% H2SO4에 1.5%가 되도록 몰리브덴산암모늄(ammonium molybdate)을 녹인 용액과 2.7% 황산제일철(ferrous sulfate)을 증류수에 녹인 용액을 4:1로 혼합하여 조제한 용액)를 첨가하여 10분간 발색시킨 후 유리된 인산의 양을 700nm에서 측정하여 피타아제의 활성도로 나타냈다. 효소활성도는 lunit는 1분 동안에 피틴산에서 1μ 몰의 PO₄⁻³로 전환시키는 효소량으로 정의하였다.
- [0036] <1-2> 선별된 유산균의 동정
- [0037] a. API 시스템을 이용한 분석

[0038]

상기 균주는 API 시스템(API system; La Balme-les-Grottes, France)으로 동정하였다. 우선, 멸균 백금어로 균 콜로니를 각각 취한 후 멸균 증류수에 부유시켰다. 다시 상기 균액을 멸균 증류수에 API 50CH 키트(BioMerieux, France)에서 제공되는 맥팔랜드 표준 용액 No.2(MccFaland Standard Solution No.2)의 농도로 균액을 부유시켰다. 상기 부유액을 API 50CH 키트의 액체배지에 첨가하여 균질화시킨 후, API 50CH 키트의 50개 각 튜브에 네랄 오일로 튜브 위를 덮어준 후, 30℃ 에서 48 시간 동안 배양시켰다. 상기 배양액을 API 시스템으로 분석하여 49종의 탄수화물 발효패턴을 분석하여 하기 표 1에 나타내었다. 이 결과를 ATB 동정 컴퓨터 시스템에 입력하여 동정하였다.

표 1

대조균	-	D-만노즈	+	살리신	+	겐티오비오즈	-
글리세롤	-	L-솔보즈	-	셀로비즈	+	D-튜라노즈	-
에리쓰로톨	-	람노즈	-	말토즈	+	D-리조즈	-
D-아라비노즈	-	돌시톨	-	락토즈	-	D-타가토즈	-
L-아라비노즈	+	이노시톨	-	멜리비오즈	+	D-퓨코즈	-
리보오즈	+	만니톨	-	사카로즈	+	L-퓨코즈	-
D-자일로즈	-	솔비톨	-	트레할로즈	+	D-아라비톨	-
L-자일로즈	-	D-만노시드	-	이눌린	-	L-아라비톨	-
아도니톨	-	D-글루코시드	-	멜레지토즈	-	글루코네이트	-
자일로시드	-	글루코사민	+	D-라피노즈	-	2-세토-글루코네이트	-
갈락토즈	+	아미그달린	-	아미돈	-	5-세토-글루코네이트	-
D-글루코즈	+	알부틴	-	글리코겐	-		
D-포룩토즈	+	에스클린	+	자일리톨	-		

[0039]

[0040]

상기 표 1에서 보듯이, 상기 <1-1>에서 선별된 유산균은 탄수화물 발효패턴을 갖고 있는 락토바실러스 속에 속하는 균주인 것으로 판명되었다.

[0041]

b. 16S rRNA 염기서열 분석

[0042]

당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 상기 선별된 유산균들의 16S rRNA의 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 상기유산균의 16S rRNA 염기서열은 락토바실러스 사케이의 16S rRNA 염기서열과 99 % 동일함을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명자들은 동정된 유산균을 "락토바실러스 사케이 Wikim010(*Lactobacillus sakei* Wikim010)"으로 명명하고 이를 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms)에 기탁번호 제 KFCC 11571P 호로서 2013년 12월 3일자로 수탁하였다.

[0043]

<실시에 2> 곡류에서 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주의 피틴산 함량 저감 활성 확인

[0044]

현미, 보리 및 서리태 각 200g을 락토바실러스 사케이 Wikim010와 반응시켜 30℃ 인큐베이터에 24시간 배양한 후, 5g을 채취하여 증류수 30ml을 첨가한 후, 그라인더에 1분 동안 마쇄하여 10배 희석하였다. 증류수로 10배 희석한 시료 3mL에 Wade시약(증류수에 0.03% FeCl₃·H₂O와 0.3% sulfosalicylic acid 용해) 1mL을 가한 후 볼텍스 믹서(vortex mixer)로 10초간 혼합하고 0.45 μm 시린지필터(syringe filter)로 여과하여 500nm에서 여과액의 흡광도를 측정하였다. 피틴산 함량은 Na-phytate 표준곡선을 이용하여 계산하였다. 표준 기질에서의 반응 패턴을 기반으로 실제 식품에서의 기질인 현미, 보리 및 서리태 각각에 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 처리하고 그 반응 양상을 관찰하였다.

[0045]

현미, 보리 및 서리태에 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 접종하여 24시간 동안 배양한 결과를 도 1 내지 3에 각각 나타내었다.

[0046]

도 1 내지 3에서 보듯이, 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주는 현미, 보리 및 서리태에서 피틴산 함량을 현저히 감소시키는 것을 알 수 있었다.

- [0047] <실시예 3> 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주 처리에 따른 곡물내 칼슘 함량 측정
- [0048] 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주의 처리에 따른 현미의 칼슘 함량 분석은 전라남도식품산업연구센터에 의뢰하였다.
- [0049] 그 결과는 도 4에 나타내었으며, 도 4에서 보듯이, 현미의 칼슘함량은 6.3682 mg/100g 이었으며, 락토바실러스 사케이 Wikim010을 처리한 현미의 칼슘함량은 10.2470 mg/100g이었다.
- [0050] 이상의 결과로부터 본 발명의 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주는 피타제를 분비하여 현미에 함유되어 있는 피틴산과 결합된 칼슘을 이용 가능한 형태로 전환하는 것으로 판단된다.
- [0051] <실시예 4>
- [0052] 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주 처리에 의한 현미의 조골세포 증식 효과 확인
- [0053] 본 실험에 사용된 SaOS-2 cell은 인간의 유사 조골세포이며, KCLB에서 분양받아 RPMI 1640 (Gibco, USA) 액체 배지 500 mL에 10% FBS (Gibco), 1% streptomycin (Gibco)을 첨가하여 배양하였으며, 약 48-60시간 주기로 세대배양 하였다. 세포배양은 37℃, 5%의 CO₂ 배양기에서 실시하였다.
- [0054] 현미 추출물이 조골세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 실시하였다. 현미추출물은 현미 200 g에 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 처리하여 지퍼 백에 공기를 뺀 후, 납작하게 펴서 밀봉한 뒤 24시간 30℃에서 incubation하였다. 현미와 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 처리한 현미 시료 30 g을 글라인더로 마쇄한 후, 3차 멸균수, 70% 에탄올을 270 mL 넣어 갈아서 상온에서 24시간, 48시간, 72시간 간격으로 stirring 한 다음 1, 2, 3회 여과를 실시하였다. 현미 70% 에탄올 여과물을 농축기를 사용하여 65℃에서 농축한 다음, 증류수로 농축액을 회수하였다. 농축액을 동결 건조시켜 분말을 얻었으며, 이를 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 100 mg/ml의 농도로 만든 후 실험에 사용하였다.
- [0055] SaOS-2 cell을 96 well plate에 well 당 2×10^4 개로 접종하고, 약 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 상기 현미 에탄올 추출물을 0, 50, 125, 250, 500 μ g/ml의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다.
- [0056] MTT를 5 mg/ml 농도로 가하여 같은 조건에서 4시간 더 배양한 후 배지를 제거하고 불용성의 formazan 결정을 DMSO로 용해시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0057] 대조군으로서 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 처리하지 않은 현미 에탄올 추출물을 사용하였으며, 양성 비교군으로서 조골세포 활성 증가의 기준물질 NaF (Sodium fluoride, Sigma aldrich) 및 CaCl₂ (Calcium chloride, Sigma aldrich)를 로 사용하였다.
- [0058] 그 결과는 도 5에 나타내었다. 도 5에서 보듯이, 인간 유사조골세포주인 SaOS-2의 세포증식 실험 결과, 조골세포의 세포증식 및 활성을 증가시키는 것으로 알려진 NaF와 CaCl₂ 처리군은 10^{-4} mg/ml의 농도에서 대조군에 비하여 높은 세포증식효과를 나타냈으며, 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 처리한 현미 에탄올 추출물에서도 24 시간의 농도 500 ug/ml에서 대조군에 비하여 유의적인 세포증식효과를 나타내었다. 반면, 일반 현미 에탄올 추출물(500 ug/ml)에 의한 세포증식효과가 없는 것이 확인되었다.
- [0059] 이와 같은 결과로부터 본 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 처리한 현미 추출물은 기존의 조골세포 활성 증가효능을 가지는 기준물질에 필적할 정도로 조골세포 활성 증가효과를 가지는 것을 알 수 있다.
- [0060] <실험예 5>
- [0061] 본 발명의 곡물 조성물에 대한 관능검사를 수행하였다.
- [0062] 곡물로서 현미 100중량%를 사용한 조성물 1; 현미 50중량%, 흑미 5중량%, 찰쌀 5중량%, 찰보리쌀 5중량%, 찰기장쌀 5중량%, 겉보리쌀 5중량%, 수수 5중량%, 대두 5중량%, 서리태 10중량%, 팥 5중량%를 사용한 조성물 2, 및 현미 50중량%와 찰보리쌀 20중량% 및 서리태 30중량%를 사용한 조성물 3을 사용하였다. 입자가 큰 곡물인 대두,

서리태, 쌀의 경우에는 그리즈를 제조하였으며, 그리즈는 입자가 큰 곡물을 글라인더에 넣고 갈아 체에 걸러 5(4 mm)~10(2 mm) mash 사이의 크기로 준비하였다.

[0063] 각 수득된 곡물 200g에 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주 20ml(10^8 cfu/ml)을 첨가하여 반응시켜 30℃ 인큐베이터에 24시간 배양하였다.

[0064] 상기 배양물을 수분도 포함하여 중량의 1.5배가 되도록 가수하여 현미를 전기밥솥(쿠쿠, 모델명: 쿠쿠홈시스, CR-0352FR)에 넣어 50분 취반, 10분 뜸들이기를 한 후 밖으로 꺼내 실온에서 30분 동안 방치한 후 시료로 사용하였다.

[0065] 관능검사는 관능검사요원으로 20~30대 연령층을 15명을 대상으로 실시하였다. 각 시료의 용기에는 난수표에서 선택한 세 자리 숫자를 표시하였고, 제시 순서는 무작위로 하였다. 시료와 시료 사이에 입을 헹글 수 있도록 정수된 물(20℃)과 빨는 컵을 함께 제공하여 시료를 평가하기 전 시료의 특성에 따른 전 시료와의 혼란과 감각의 둔화를 줄이기 위해 2~3회 정도 충분히 입 헹굼을 하도록 하였다. 평가방법은 7점 항목척도(1=대단히 낮음, 4=보통, 7=대단히 높음)로 강도와 기호도를 조사하였다. 통계적 유의성은 SPSS 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석과 Duncan의 다범위 검정(multi range test)을 사용하여 유의성 검정을 시행하였다.

[0066] 대조군으로서 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 첨가하지 않은 것을 제외하고는 조성물 2와 동일한 조성을 갖는 조성물을 사용하였다. 모든 값은 평균±SD이다. 컬럼 내의 다른 첨자로 표시된 평균±SD는 다중 범위 시험(Duncan's multiple range test)으로 유의한 차이($p < 0.05$)가 있는 것을 의미한다.

표 2

	appearance	taste	flavor	texture	overall
대조군	4.33±0.98 ^a	4.47±0.92 ^a	4.27±0.80 ^a	2.93±0.88 ^a	3.73±0.80 ^a
조성물 1	4.40±0.88 ^a	4.73±0.88 ^a	4.27±0.80 ^a	3.73±0.80 ^b	4.27±0.80 ^{ab}
조성물 2	4.80±0.56 ^a	5.13±0.92 ^a	4.67±0.82 ^a	4.00±0.93 ^b	4.67±0.62 ^b
조성물 3	4.73±0.46 ^a	4.53±0.74 ^a	4.47±0.92 ^a	3.73±0.70 ^b	4.40±0.99 ^b

[0067]

[0068] 상기 표 2에서 보듯이, 본 발명에 따른 조성물 1, 2 및 3의 경우 외관(appearance), 맛(taste), 향(flavor) 및 조직감(texture)에서 우수한 평가를 받았으며, 특히 곡물을 특정배합으로 조정한 조성물 2의 경우 가장 월등한 평가를 기록하였다. 반면, 락토바실러스 사케이 Wikim010 균주를 첨가하지 않은 대조군의 경우 현격히 낮은 평가결과를 나타내었다.

[0069]

산업상 이용가능성

[0070] 본 발명에 따른 유리 칼슘 함량이 증가된 곡물 조성물은 곡물내 함유된 피탄산을 분해하여 곡물내 유리 칼슘의 함량을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 조골세포 증식효과가 월등하다. 따라서, 본 발명의 유리 칼슘 함량이 증가된 곡물 조성물은 골다공증 예방을 위한 조성물로서 이용될 수 있다.

수탁번호

[0071]

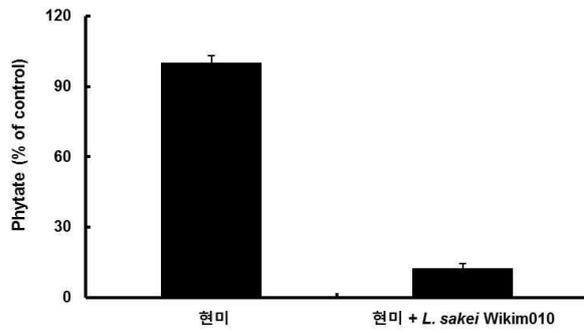
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

수탁번호 : KFCC11571P

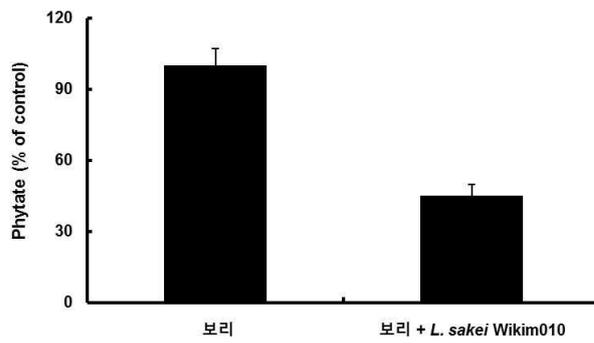
수탁일자 : 20131203

도면

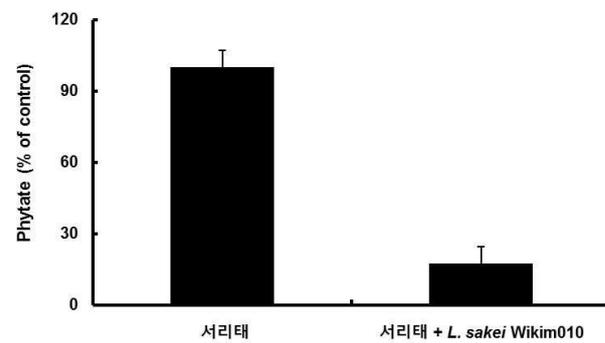
도면1



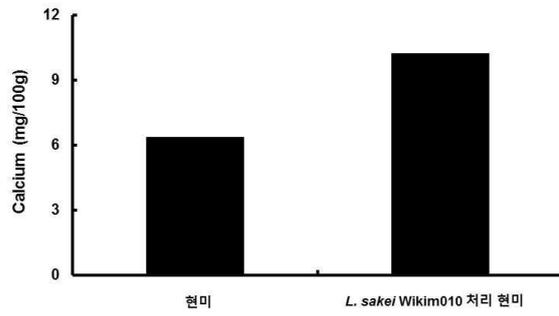
도면2



도면3



도면4



도면5

