

바실러스 발효대사물이 함유된 신규 칼슘보충용식품의 성장기 쥐 장골 성장촉진효과

이재연¹ · 박영식¹ · 김영훈² · 오경환² · 황교열¹ · 조용석¹ · 강경돈¹ · 김 근² · 주동관³ · 성수일^{1,4*}

¹(주)바이오토피아 부설생명과학연구소, ²수원대학교 생명공학과
³(주)엠에스바이오텍, ⁴수원대학교 생명과학과

Effect of New Calcium Supplementary Food Containing Fermented Product of *Bacillus* on the Longitudinal Bone Growth in the Adolescent Male Rats

Jae-Yeon Lee¹, Young-Shik Park¹, Young-Hoon Kim², Kyung-Hwan Oh², Kyo-Yeol Hwang¹,
Yong-Seok Cho¹, Kyung-Don Kang¹, Keun Kim², Dong-Kwan Joo³, and Su-Il Seong^{1,4*}

¹R&D Center for Life Science, Biotopia Co., Ltd., Gyeonggido 456-853, Korea

²Dept. of Bioscience and Biotechnology, The University of Suwon, Gyeonggido 445-743, Korea

³MS Biotech Co., Ltd., Seoul 137-130, Korea

⁴Dept. of Life Science, The University of Suwon, Gyeonggido 445-743, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of administration of calcium supplementary food containing fermented product of *Bacillus subtilis* SE4 highly producing poly- γ -glutamic acid on the growth-parameters of adolescent male rats. Four-week old male Sprague-Dawley (SD) rats were fed for 4 weeks and assigned to the following 4 groups: two groups administered orally with new calcium supplementary food (such as 150 mg/kg and 300 mg/kg) containing fermented product of *B. subtilis* SE4, one group administered with conventional calcium supplementary food product (150 mg/kg) and one saline group as control. Daily weight gain and daily food intake in the two new food product groups were higher than those of conventional food product group and control group. Especially, the content of serum IGF- I in the two new food product groups were significantly higher than those in conventional food product group and in control group ($p < 0.05$). In addition, length and weight of longitudinal bone in the two new food product groups were longer and heavier than those of conventional food product group and control group. Therefore, the addition of fermented food product of *B. subtilis* SE4 into the conventional calcium supplementary food increased all the parameters examined for the growth of the adolescent male rats.

Key words: *Bacillus subtilis* SE4, fermented product, longitudinal bone growth, IGF-1, poly- γ -glutamic acid

서 론

성장은 성숙에 수반되는 복잡한 생물학적 현상으로 일반적으로는 신장의 증가를 의미하며 이러한 신장의 증가는 연골조직합성, 골격길이 성장 및 광범위한 골 성장을 포함하는 골격대사를 통하여 이루어진다(1). 성장에 기여하는 주 인자는 뼈 길이의 증가인데 이러한 뼈의 성장은 연골 내 골화 과정과 이에 따른 연골조직의 경골조직으로의 전환에 의해 일어난다. 연골 내 골화는 주로 사지의 장관골에서 일어나며, 한편 뼈의 두께증가는 섬유성막에서 직접 골격조직으로의 발달에 기인한다(2).

최근 경제력의 향상과 함께 우리 사회의 영양결핍문제는 어느 정도 해결되었으나 불규칙한 식사습관과 패스트푸드

의 과잉섭취 등으로 특히 청소년들의 성장에 필요한 칼슘, 철분 및 비타민 등의 섭취량이 권장량에 비하여 크게 부족한 것으로 나타나고 있다(3,4). 그 중 칼슘은 특히 한국인에게 부족한 영양소로서 2005년 국민영양조사결과(5)를 2005년 11월 개정된 한국인 영양섭취기준(6)과 비교하였을 때 대부분 해당 영양소의 권장섭취기준과 유사하였으나, 칼슘섭취량은 권장섭취량의 76.4%로 매우 낮았다. 특히 13~19세 청소년의 칼슘섭취량은 권장섭취량의 55.4%에 불과해 심각하게 부족한 것으로 나타났다. 이러한 칼슘의 체내 흡수율은 함께 섭취하는 식이성분에 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있으며 칼슘의 섭취량 증대와 함께 칼슘의 흡수율 증진을 위한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

뼈 성장의 중요한 인자로 알려진 IGF- I (insulin-like

*Corresponding author. E-mail: sseong@mail.suwon.ac.kr
Phone: 82-31-220-2483, Fax: 82-31-220-2483

growth factor- I)은 체내에서 일정한 농도를 유지하므로 측정이 비교적 용이하여 내인성 성장호르몬 분비 평가의 진단에 유용한 지표로 사용되고 있다(7). IGF- I 은 70개의 아미노산으로 구성되어 있으며 주로 간과 뼈 조직에서 활동한다. IGF- I 유전자는 간세포 수용체와 성장호르몬의 상호작용에 의해 발현이 촉진되고, 생성된 IGF- I 은 IGF- I 수용체와 결합하여 성장과 발육에 필요한 조절물질로 작용하여 성장 및 체세포분화를 돕는다(8,9). 실제, IGF- I 이 결핍된 환자에게 IGF- I 을 투여한 결과 체 조성, 인슐린 민감성, 뼈 무기질 밀도 및 길이성장 등이 개선되는 것으로 보고되고 있다(10).

성장과 관련된 천연물소재로는 흰쥐 성장판 BMP-2의 발현촉진과 뼈 성장을 유도하는 구척 및 속단 추출물(11,12), 성장기 흰쥐의 뼈 길이성장 및 IGF- I 분비촉진 효과를 나타낸 가시오가피 추출물(13,14), 흰쥐 뇌하수체 세포의 성장호르몬 유발을 촉진시키는 인동 추출물(15) 등이 알려져 있다. 그러나 이러한 천연물유래 추출물들은 대부분 물과 알코올 추출물로서 이들 추출물의 기능성 성분들은 극성이 높아 소장에서의 흡수가 원활하지 못한 단점이 있다.

뼈 성장에 필수적인 칼슘의 장내 흡수에 영향을 미치는 성분으로는 vitamin D, casein phosphopeptide, dietary fiber, phytate, oxalate, fat 그리고 lactose 등이 알려져 있다(16-20). 그 밖에 최근 *Bacillus subtilis(chungkookjang)* 균에서 생산되는 poly- γ -glutamic acid(γ -PGA)가 Ca의 용해도 및 장내 흡수에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(21). 이러한 Ca의 장내 흡수증진 기능 외에 *B. subtilis* 균은 대두발효에 많이 사용되는 균으로서 고분자의 전분, 단백질, 지질 등을 분해하여 저분자의 아미노산, 뉴클레오티드, 지방산, 비타민, 알카로이드 및 점성의 폴리머 등을 생산하는 특성을 갖고 있다. 이 균의 배양산물은 청국장이나 된장 등과 같은 전통 발효식품에 많이 들어 있으며 배양산물에 함유된 성분은 사람이나 동물에게 매우 유용할 뿐만 아니라 식품으로써의 안전성도 우수하다.

따라서 본 연구는 바실러스균의 발효 대사산물을 기존의 칼슘보충용식품에 첨가, 흰쥐에 경구투여 하여 체중, 사료섭취량, 장골길이, IGF- I 생성 등에 미치는 각종 성장지표를 조사함으로써 뼈 성장의 주요 요인이 되는 장내 칼슘흡수 증진을 위한 신규 칼슘보충용식품의 개발을 목적으로 하고 있다.

재료 및 방법

γ -PGA 생산균주선발

γ -PGA를 다량으로 생산하는 바실러스 균주를 분리 및 선발하기 위해, 토양(경기도 화성시 일대) 및 곡물 시료(경기도 화성시 미곡처리장)를 연속 희석법에 의해 YM(Becton

Dickinson and Company, MD 21152, USA) 고체배지에 도말하고, 생성된 콜로니 중 점성이 높은 균주들을 대상으로 1차 균 선발을 하였다. 1차로 선발된 균주들은 6% sucrose, 1% sodium glutamate, 5% soybean meal, 2.5% Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.4% NaH₂PO₄ · 2H₂O, 0.5% sodium citrate, 0.02% MgCl₂ · 6H₂O, 0.002% ZnSO₄ · 7H₂O(pH 7.2) 등이 함유된 100 mL γ -PGA 생산배지에 접종하여 37°C에서 4일간 정치 배양 하였다. γ -PGA의 정제는 Goto와 Kunioka(22)의 알코올 침전법을 사용하였다. 즉 배양이 끝난 배양액을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 얻어진 상등액에 4배수의 에탄올을 가하여 천천히 섞은 후 형성된 침전물을 60°C에서 진공건조한 후 건조중량을 측정하였다. 이렇게 해서 얻어진 γ -PGA 생산성이 가장 우수한 균주를 최종 목적 균주로 선발하였다.

바실러스 발효대사물의 제조

바실러스 발효대사물의 제조에는 상기 선발된 γ -PGA 생산능이 우수한 *Bacillus subtilis* SE4 균주를 사용하였다. 균주는 100 mL YM 액체배지를 사용하여 37°C에서 1일간 180 rpm으로 진탕배양하고 이렇게 배양된 100 mL 배양액을 5 L 발효조(한국발효기, 한국) 안에 3 L γ -PGA 생산배지에 접종하여 37°C에서 4일간 정치배양 하였다. 다음, 배양액 3 L을 10,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 진공농축기(Rotavapor R-114, Büchi, Switzerland)를 통해 최종 500 mL로 농축하여 바실러스 발효대사물로 사용하였다.

실험동물 및 실험디자인

실험에 사용된 흰쥐는 Sprague-Dawley(SD)계 3주령 수컷으로 (주)샘타코(한국)에서 40마리를 분양받은 후 5일간 온도 22°C, 습도 50%, 명암 12시간으로 조절된 동물사육실의 환경에 적응시켰다. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 바실러스 발효대사물의 성장촉진효능실험을 위해 대조군, 기존칼슘보충용식품군(150 mg/kg), 저용량 신규칼슘보충용식품군(150 mg/kg), 고용량 신규칼슘보충용식품군(300 mg/kg)의 4개 시험구를 설정하고 각 시험구당 무작위적으로 10마리씩 공시하여 실험을 수행하였다. 사육 28일째 모두 희생시킨 후 좌우 장골을 적출하여 길이, 부위별 두께, 무게 등을 측정하였다.

생체흡수율 증진효능 실험

바실러스 발효대사물에 의한 생체흡수율의 증진효능을 알기 위한 지표물질로는 200 mg/kg(체중) tetracycline(Sigma, USA)을 사용하였다. 실험구별 각 3마리의 흰쥐를 3시간 동안 절식시킨 후 대조군에는 200 mg/kg(체중) 용량의 tetracycline을 1 mL 0.85% NaCl에 혼합하였으며, 시험군은 바실러스 발효대사물과 tetracycline을 각각 200 mg/kg(체중)의 용량으로 1 mL 0.85% NaCl에 혼합하여 경구투여 하였다. 경구투여 후 2시간째 모든 쥐의 안구정맥총으로부터 혈액

1 mL을 안와채혈하여 혈청분리관(BD vacutainer, USA)에 담고 1,200×g에서 10분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다(23). 분리된 혈청으로부터 HPLC(Nanospace SI-2, Shiseido, Japan)를 이용하여 혈청 내 tetracycline의 함량을 측정하였다. 분석칼럼은 Capcell Pak C₁₈ MG(250×4.6 mm I.D., 5 µm, Shiseido)를 사용하였고, 칼럼온도는 35°C이었다. 시료주입량은 10 µL이었으며, 이동상으로는 580 mL sodium phosphate monobasic, 480 mL methanol, 3 mL N,N-dimethyloctylanine과 1 mM EDTA를 혼합한 후 H₃PO₄로 pH를 6.5로 최종 조절한 혼합액을 사용하였다. 용매의 흐름속도는 1.0 mL/min로 하였고, 검출기는 UV-VIS 검출기(SI-1/3002, Shiseido)를 사용하여 273 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

바실러스 발효대사물의 성장촉진효능 실험

바실러스 발효대사물 첨가에 의한 성장촉진효과 검증에는 기존칼슘보충용식품(conventional food product)을 양성대조군으로 하고, 기존칼슘보충용식품에 바실러스 발효대사물을 첨가한 신규칼슘보충용식품(new food product)을 시험군으로 하여 비교 실험하였다. 실험에 사용된 칼슘보충용식품의 조성은 Table 1과 같으며 모든 제조 원료는 (주)엠에스바이오텍으로부터 제공받아 사용하였다. 처리량은 기존칼슘보충용식품군은 150 mg/kg(체중), 신규칼슘보충용식품군은 150 mg/kg(체중)과 300 mg/kg(체중)의 양을 각각 0.85% NaCl 용액에 최종 1 mL로 희석하여 흰쥐에게 매일 1회 경구투여 하였다. 양성대조군 외에 0.85% NaCl 용액 1 mL를 무처리 대조군으로 하여 역시 매일 1회 경구투여 하였다. 실험기간은 4주로 하여 매일 1회 체중과 사료섭취량을 측정하였다.

IGF- I 분석

4주간 경구투여 한 실험동물 SD 흰쥐를 에테르로 마취시

킨 후, 1 mL 넘게 안와채혈하여 혈청분리관에 담고 1,200×g에서 10분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다. 혈청 내 IGF- I 함량은 OCTEIA Rat/Mouse IGF- I kit(Immuno-diagnostic systems, UK)를 이용하여 측정하였다.

장골 측정

경구투여 실험 2주 및 4주 경과된 SD 흰쥐를 희생시킨 후, 좌우 장골을 적출하여 장골길이, 부위별(상부, 중부, 하부) 두께, 장골무게 등을 측정하였다(14). 장골의 각 부위별 두께는 디지털캘리퍼(Digital caliper, model No. CD-6"PS, Mitutoyo Co., Japan)를 사용하여 장골 상부와 하부는 가장 두꺼운 부위를, 중부는 가장 얇은 부위를 지표로 하여 측정하였다.

통계분석

모든 실험결과와 통계처리는 SAS 통계 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 평균값과 표준오차로 표시하였다. 생체이용률 증진효능시험에서는 Student's t-test로 유의성을 검증하였고, 바실러스 발효대사물 성장촉진효능 시험에서는 Duncan's multiple test를 이용하여 p<0.05에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

γ-PGA 생산균주의 분리

γ-PGA는 장관 내에서 칼슘흡수를 증진시켜 주는 물질로 알려져 있으며, 현재 주로 기능성식품이나 유제품 등에서 뼈 성장 관련 식품첨가물로 사용되고 있다. 이러한 효능의 γ-PGA를 대량으로 생산하는 후보 균주로 YM agar plate 상에서 높은 점성을 형성하는 10개의 바실러스 균주를 우선 선발하고, 1차로 선발된 이들 10균주로부터 γ-PGA의 생산성이 7.5 g/L로 가장 높은 SE4 균주를 최종 목적균주로 선발하였다(Table 2). 이 SE4 균주는 API kit를 사용한 탄소원이용능 분석과 16S rDNA 염기서열 분석 결과 *Bacillus subtilis*로 최종 확인되었다(data not shown).

Table 2. Poly-γ-glutamic acid produced by various selected *Bacillus* strains

Strain ¹⁾	Poly-γ-glutamic acid (g/L)
SE1	3.2
SE2	1.8
SE3	1.5
SE4	7.5
SE5	2.0
SE6	0.3
SE7	1.9
SE8	1.3
SE9	0.7
SE10	1.0

¹⁾All selected strains were incubated at 37°C for 4 days.

Table 1. Ingredients of calcium supplementary food used in animal study

Ingredient	Content (%)	
	Conventional food product	New food product
Shellfish calcium	31.50	31.50
Casein phosphopeptide	3.50	3.50
Vitamin D3	0.05	0.05
Vitamin mixture	0.30	0.30
Ostrich egg shell	4.50	4.50
Colostrum powder	4.50	4.50
Amino acid mixture	7.50	7.50
Dextrose	26.65	16.65
Yam powder	5.50	5.50
Safflower seed extract	6.50	6.50
<i>Acanthopanax senticosus</i> extract	9.50	9.50
Folyl-γ-polyglutamate-Ca	2.00	2.00
Fermented product of <i>Bacillus subtilis</i> SE4	0.00	10.00

바실러스 발효대사물의 생체흡수율 증진효과

장내 칼슘흡수에 대한 γ -PGA의 효과에 대한 기전은 아직 확실하게 밝혀져 있지 않으나, γ -PGA가 pH가 낮은 소장 상부에서 칼슘의 용해도를 높이고 한편 칼슘 통과속도를 지연시켜 결국 칼슘의 장내 흡수를 증진시키는 것으로 알려져 있다(24). 이밖에 γ -PGA는 의약품 전달체(drug carrier)로도 이용되는데 그 대표적인 예로 γ -PGA는 난용성의 항암제 paclitaxel(Taxol, TXL)를 수용성의 polyglutamic acid paclitaxol(PG-TXL)로 전환시켜 항암기능을 증진시켰다는 보고가 있다(25).

본 연구에서의 바실러스 발효대사물의 생체흡수율 증진이 γ -PGA에 의한 것인지 아니면 그 밖의 다른 성분들에 의한 것인지는 아직 명확하게 알 수 없으나 우선 발효대사물이 칼슘을 비롯한 한약재와 같은 기능성물질들의 생체흡수 증진에 효과가 있는지의 여부를 확인하였다. 생체흡수 증진여부의 지표물질로는 tetracycline을 사용하였는데, tetracycline은 혈중 농도의 HPLC 분석이 가능하고 물에 잘 녹지 않아(23) 소화관내에서 paclitaxel과 같은 난용성 약재나 기능성물질들과 유사한 흡수 패턴을 나타내기 때문이다. 발효대사물 투여 후 2시간에서의 혈액 내 tetracycline 함량을 측정된 결과(26), 대조군의 혈액 내 tetracycline 함량 26.3 ± 0.9 ppm에 비해 바실러스 발효대사물군의 tetracycline 함량은 42.3 ± 4.0 ppm으로 발효대사물군이 1.6배 이상 높게 나타났다($p < 0.05$)(Table 3). 즉, 발효대사물이 tetracycline의 장내 흡수증진에 영향을 미치고 있음이 입증되었다. 따라

Table 3. The content of tetracycline in rat-blood after oral administration with fermented product of *Bacillus subtilis* SE4 and tetracycline

Group administered with	Tetracycline (ppm) in serum
Tetracycline ¹⁾	26.3 ± 0.9 ³⁾
Tetracycline+fermented product ²⁾	42.3 ± 4.0 *

¹⁾Two hundreds mg of tetracycline/kg (body weight) was administered to a group of rats.

²⁾Two hundreds mg of tetracycline/kg (b.w.) plus fermented product (200 mg/kg b.w.) of *B. subtilis* SE4 was administered to a group of rats.

³⁾Values are mean \pm SE.

*Significantly different ($p < 0.05$) by Student's t-test.

서 바실러스 발효대사물의 첨가가 칼슘보충용식품 내에 존재하는 성장관련 물질들의 흡수율 증진에도 실제 관여하는지의 여부를 기존칼슘보충용식품에 바실러스 발효대사물을 첨가하여 흰쥐에 섭취시킨 후 나타나는 각종 성장지표를 통해 확인하였다.

일일증체량 및 일일사료섭취량

28일간의 일일 체중변화를 보면 투여기간이 길어질수록 신규칼슘보충용식품군이 대조군이나 기존칼슘보충용식품군에 비해 높은 체중증가를 나타냈다(Fig. 1). 또한 통계상의 유의적 차이는 없었지만 사육 초기와는 달리 종반에 이르러 신규칼슘보충용식품군이 대조군나 기존칼슘보충용식품군의 체중을 상회한 것으로 나타났다(Table 4). *Bacillus*로 제조한 청국장을 흰쥐에 투여한 시험에서도 체중이 증가되었다는 유사한 보고가 있으며(27), 발효대사물 첨가에 의한 이 체중증가 현상은 이후 수회 반복실험을 통해 충분히 확인하였다. 이러한 체중증가의 원인을 정확히 설명할 수는 없으나 바실러스 발효대사물 내에 존재하는 미지의 각종 성장관련 물질들에 의한 생체흡수 및 성장촉진작용에 의한 것이 아닌가 생각된다.

일일증체량을 보면 우선 14일간의 경우, 저용량 신규칼슘보충용식품군(150 mg/kg)과 고용량 신규칼슘보충용식품군(300 mg/kg)이 각각 8.1 ± 0.2 g과 8.4 ± 0.1 g으로서 대조군

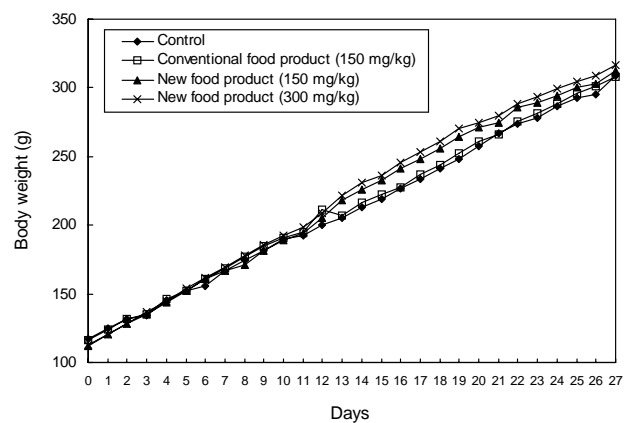


Fig. 1. The changes of body weights in mice after oral administration of calcium supplementary food containing fermented product of *Bacillus subtilis* SE4.

Table 4. The effect of calcium supplementary food containing fermented product of *Bacillus subtilis* SE4 on the body weight, body weight gain and food intake in the adolescent male rats

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g/day) after		Food intake (g/day) after	
			14 days	28	14	28
Control (saline)	116.9 ± 1.8 ¹⁾	309.9 ± 10.9	7.3 ± 0.3 ^{b2)}	7.2 ± 0.4 ^a	17.1 ± 0.2 ^b	19.8 ± 0.3 ^{ab}
Conventional food product (150 mg/kg)	115.9 ± 2.0	308.4 ± 9.3	7.2 ± 0.1 ^b	7.2 ± 0.3 ^a	17.4 ± 0.2 ^b	19.6 ± 0.3 ^b
New food product (150 mg/kg)	112.3 ± 2.0	312.0 ± 6.0	8.1 ± 0.2 ^a	7.4 ± 0.2 ^a	17.8 ± 0.3 ^{ab}	19.9 ± 0.3 ^{ab}
New food product (300 mg/kg)	112.8 ± 1.6	316.9 ± 2.9	8.4 ± 0.1 ^a	7.6 ± 0.1 ^a	18.2 ± 0.1 ^a	20.4 ± 0.1 ^a

¹⁾Values are means \pm SE in each group.

²⁾Means with the different letters in each column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

의 7.3 ± 0.3 g, 기존칼슘보충용식품군의 7.2 ± 0.1 g에 비해 두 신규칼슘보충용식품군 모두 유의적으로 높은 일일증체량을 나타내었다($p < 0.05$)(Table 4). 이러한 경향은 28일간의 일일증체량에서도 나타났으나 유의적인 차이는 없었다. 대조군 7.2 ± 0.4 g, 기존칼슘보충용식품군 7.2 ± 0.3 g에 비해 신규칼슘보충용식품군(150 mg/kg, 300 mg/kg)의 7.4 ± 0.2 g, 7.6 ± 0.1 g으로 역시 신규칼슘보충용식품군이 다소 높은 일일증체량을 나타내었다.

일일사료섭취량 역시 신규칼슘보충용식품군에서 높은 경향을 보였으며 특히 14일간의 고용량 신규칼슘보충용식품군에서 높은 사료섭취량을 나타냈다. 즉, 대조군 17.1 ± 0.2 g, 기존칼슘보충용식품군 17.4 ± 0.2 g, 신규칼슘보충용식품군(150 mg/kg, 300 mg/kg) 17.8 ± 0.3 g에 비해 고용량 신규칼슘보충용식품군은 18.2 ± 0.1 g로 유의적으로 일일사료섭취량이 높았다($p < 0.05$). 그러나 28일간의 경우에는 신규칼슘보충용식품군이 대조구나 기존칼슘보충용식품군에 비해 다소 증가하는 경향은 보였지만 유의적인 차이는 인정되지 않았다(Table 4). 이러한 일일증체량의 증가는 바실러스 발효대사물의 투여에 의해 흰쥐의 사료섭취량이 증가하고, 사료섭취의 증가는 결국 체중 증가의 결과로 나타난 것으로 생각된다.

혈청내 IGF- I 함량

IGF- I 은 골격형성을 자극하는 anabolic polypeptide 물질로 그의 수용체는 조골세포와 연골세포에 존재하는데 이 부위에서 IGF- I 은 조골세포에 대해 세포분화와 증식 및 조골세포에 의한 collagen 합성을 촉진시키는 역할을 한다(9). 이와 같이 골격형성에 중요한 역할을 하는 IGF- I 의 혈청 내 함량을 조사한 결과, 대조군 2047 ± 58 ng/mL, 기존칼슘보충용식품군 2074 ± 49 ng/mL에 비해 신규칼슘보충용식품군은 2714 ± 45 ng/mL(150 mg/kg 함유)과 2962 ± 24 ng/mL(300 mg/kg 함유)로서 신규칼슘보충용식품군이 대조군 및 기존칼슘보충용식품군보다 유의적으로 높은 함량을 나타냈다($p < 0.05$)(Table 5). 이와 같은 신규칼슘보충용식품군에서의 높은 IGF- I 함량은 본 실험에서 확인한 장골성장과 직접적인 연관성이 있을 것으로 생각된다. 즉, 혈청 내 IGF- I 함량은 성장호르몬의 분비를 간접적으로 반영하는 생화학적 지표로써(7) 이와 같이 신규칼슘보충용식품 투여

Table 5. The effect of different calcium supplementary foods containing fermented product of *Bacillus subtilis* SE4 on the IGF- I in serum of adolescent male rats¹⁾

Group	IGF- I (ng/mL)
Control (saline)	$2047 \pm 58^{2)c3)}$
Conventional food product (150 mg/kg)	2074 ± 49^c
New food product (150 mg/kg)	2714 ± 45^b
New food product (300 mg/kg)	2962 ± 24^a

¹⁾The rats were fed with the foods for 28 days.

²⁾Values are means \pm SE in each group.

³⁾Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

군에서 보인 높은 IGF- I 함량은 바실러스 발효대사물의 첨가에 의한 성장호르몬의 분비촉진 및 칼슘성분의 흡수증대 효과를 불러오고 이는 결국 성장기 흰쥐의 장골성장에도 긍정적인 결과를 미친 것으로 생각된다.

장골성장효과

28일간 경구투여한 후의 장골길이는 대조군 33.4 ± 0.2 mm, 기존칼슘보충용식품군 33.3 ± 0.2 mm에 비해 저용량 신규칼슘보충용식품군(150 mg/kg) 33.7 ± 0.1 mm, 고용량 신규칼슘보충용식품군(150 mg/kg) 34.8 ± 0.1 mm로서 배양대사물의 첨가 용량에 따라 증가하는 경향을 보였으며 특히 고용량에서 유의적으로 장골길이가 길었다($p < 0.05$)(Table 6).

장골무게는 대조군 405.9 ± 10.0 mg, 기존칼슘보충용식품군 410.3 ± 15.1 mg에 비해 저용량 신규칼슘보충용식품군 426.8 ± 7.8 mg, 고용량 신규칼슘보충용식품군 432.9 ± 4.8 mg로 신규칼슘보충용식품군에서 모두 무거웠지만 통계적인 유의성은 없었다.

장골의 두께를 보면 상부의 경우, 대조군 6.5 ± 0.0 mm, 기존칼슘보충용식품군 6.6 ± 0.1 mm에 비해 저용량 신규칼슘보충용식품군이 6.8 ± 0.1 mm로 유의적으로 굵었으며($p < 0.05$), 고용량 신규칼슘보충용식품은 6.6 ± 0.0 으로 기존칼슘보충용식품과 비슷하였다. 중부는 대조군 2.6 ± 0.1 mm, 기존칼슘보충용식품군 2.5 ± 0.1 mm에 비해 저용량 신규칼슘보충용식품군이 2.8 ± 0.1 mm로 유의적으로 굵었으나($p < 0.05$) 고용량 신규칼슘보충용식품군은 2.4 ± 0.1 mm로 오히려 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 하부의 경우는 대조군 3.8 ± 0.0 mm, 기존칼슘보충용식품군 3.7 ± 0.1 mm, 저

Table 6. The effect of calcium supplementary food containing fermented product of *Bacillus subtilis* SE4 on the growth of longitudinal bone in the adolescent male rats¹⁾

Group	Length (mm)	Thickness (mm)			Weight (mg)
		Upper part	Middle part	Lower part	
Control (saline)	$33.4 \pm 0.2^{2)b3)}$	6.5 ± 0.0^b	2.6 ± 0.1^b	3.8 ± 0.0^b	405.9 ± 10.0^a
Conventional food product (150 mg/kg)	33.3 ± 0.2^b	6.6 ± 0.1^{ab}	2.5 ± 0.1^b	3.7 ± 0.1^b	410.3 ± 15.1^a
New food product (150 mg/kg)	33.7 ± 0.1^b	6.8 ± 0.1^a	2.8 ± 0.1^a	3.8 ± 0.1^b	426.8 ± 7.8^a
New food product (300 mg/kg)	34.8 ± 0.1^a	6.6 ± 0.0^{ab}	2.4 ± 0.1^c	4.2 ± 0.2^a	432.9 ± 4.8^a

¹⁾The rats were fed with the foods for 28 days.

²⁾Values are means \pm SE in each group.

³⁾Means with the different letters in each column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

용량 신규칼슘보충용식품군 3.8±0.1 mm에 비해 고용량 신규칼슘보충용식품군이 4.2±0.2 mm로 유의적으로 컸었다 (p<0.05). 즉 장골의 두께는 상부와 중부에서 저용량 신규칼슘보충용식품군이 그리고 하부에서는 고용량 신규칼슘보충용식품군이 각각 유의적으로 컸었던 것으로 보아 신규칼슘보충용식품은 장골의 두께 성장에 어느 정도 영향을 미치고 있음을 확인하였다.

이와 같이 *B. subtilis* SE4 발효대사물 첨가가 장골의 길이, 두께 및 무게 성장에 전반적으로 양호한 성적을 나타내는 이유에 대해 아직 정확하게 설명할 수는 없으나 최근 *B. subtilis*가 생산하는 γ -PGA가 Ca의 용해도 증진과 장내 흡수율 향상에 관여하고 있으며(21), 실험동물에 IGF-1 투여 시 장골 길이와 근위부 두께가 증가한다는 보고(28,29) 등을 종합할 때, 본 연구에서의 바실러스 발효대사물 투여에 의한 장골 성장의 긍정적 효과 역시 γ -PGA에 의한 칼슘의 장내 흡수 증진 및 혈액 내 IGF-1의 함량의 유의적 증가에 의한 결과가 아닌가 생각된다.

요 약

기존 칼슘보충용식품의 성장촉진효능을 증진시키기 위하여 칼슘흡수 관여 물질인 γ -PGA를 다량 생산하는 *Bacillus subtilis* SE4 균주를 선발하였다. 선발된 *B. subtilis* SE4의 발효대사물을 기존 칼슘보충용식품에 첨가하여 성장기 수컷 흰쥐에 28일간 경구투여 한 결과 발효대사물이 첨가된 신규칼슘보충용식품군에서 혈청 내 IGF- I 함량이 대조군이나 기존칼슘보충용식품군에 비해 유의적으로 높게 나타났다(p<0.05). 일일체중량, 일일사료섭취량, 장골길이, 장골 무게, 장골폭 등의 성장관련 지표에서도 장골의 길이와 일부 부위별 두께에서의 유의적 결과를 포함하여 전반적으로 신규칼슘보충용식품군이 대조군과 기존칼슘보충용식품군에 비해 양호한 성적을 나타내었다. 이러한 결과는 기존칼슘보충용식품에 발효대사물을 첨가함으로써 나타난 칼슘의 생체흡수율 증대 및 성장호르몬의 분비활성화 등 여러 성장관련요인들이 흰쥐 성장에 긍정적으로 작용한 때문으로 생각되어진다.

문 헌

1. Crofton PM, Wade JC, Taylor MRH, Holland CV. 1997. Serum concentration of carboxyl-terminal propeptide of type I procollagen, amino-terminal propeptide of type III procollagen, cross-linked carboxyl-terminal telopeptide of type I collagen, and their interrelationships in school-children. *Clin Chem* 43: 1577-1581.
2. Stevens DA, Williams GR. 1999. Hormone regulation of chondrocyte differentiation and endochondral bone formation. *Mol Cell Endocrinol* 151: 195-204.
3. Choi MJ, Yoon JS. 2003. The effect of eating habits and nutrient intake on the physical growth indices in preschool

- children. *Korean J Community Nutrition* 8: 3-14.
4. Kim SE. 1993. Impact of fast food on balanced nutrients intake among Korean young generation. Part 1. *KOSEF* 911-1509-079-2.
5. The Korean Nutrition Society. 2005. Dietary reference intake for Koreans.
6. Ministry of Health and Welfare. 2006. The 3rd Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES III), 2005-nutrition survey.
7. Juul A, Kastrup KW, Pedersen SA, Skakkebaek NE. 1997. Growth hormone (GH) provocative retesting of 108 young adults with childhood-onset GH deficiency and the diagnostic value of insulin-like growth factor I (IGF- I) and IGF-binding protein-3. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1195-2101.
8. Roith DL. 1997. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med* 336:633-640.
9. Ueno T, Mizukawa N, Sugahara T. 1999. Experimental study of bone formation from autogenous periosteal graft following insulin-like growth factor I administration. *J Cranio-Maxillofacial Surgery* 27: 308-313.
10. Woods KA, Camavho-Hybner C, Bergman RN, Barter D, Clark AJL, Savage MO. 2000. Effects of insulin-like growth factor I (IGF- I) therapy on body composition and insulin resistance in IGF- I gene deletion. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1407-1411.
11. Leem KH, Kim HC. 2001. Effect of *Cibotium barometis* on the growth of longitudinal bone in adolescent male rats. *Kor J Herbology* 16: 49-55.
12. Leem KH, Jeon H. 2001. Effect of *Diasacus asper* on the growth of longitudinal bone in adolescent male rats. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 15: 983-988.
13. Park SY, Leem KH, Kim HC. 2003. Effects of *Acanthopanax Senticosi Radix* and its subfractions on longitudinal bone growth of adolescent rats. *Kor J Herbology* 18: 87-92.
14. Yang DS, Cha MH, Kang BJ, Oh SW, Kim YE, Yoon YS. 2003. A study on the longitudinal bone growth of growth-stimulating material with *Eleutherococcus senticosus*. *Korean J Food Sci Technol* 35: 702-707.
15. Jung DY, Lee HY, Ha HK, Jung DY, Kang SS, Kim CS. 2003. Induction of growth hormone release by the extracts of *Lonicera japonica* Thunb. *Kor J Pharmacogn* 34: 256-262.
16. Heaney RP, Weaver CM, Fizesimmons ML. 1991. Soybean phytate content: Effect of calcium absorption. *Am J Clin Nutr* 53: 745-747.
17. Kim YJ, Lee KW, Lee HJ. 2003. Increase of conjugated linoleic acid level in milk fat by bovine feeding regimen and urea fractionation. *J Microbiol Biotechnol* 13: 22-28.
18. Loennerdal B, Sandberg AS, Sandstroem B, Kunz C. 1989. Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphate on zinc and calcium absorption in suckling rats. *J Nutr* 119: 211-214.
19. Pingle U, Ramasastry BV. 1978. Absorption of calcium from a leafy vegetable rich in oxalates. *Br J Nutr* 39: 119-125.
20. Yamanaka S. 1991. New gamma-polyglutamic acid, production therefore and drinking agent containing the same. *JP patent* 3047087.
21. Park C, Choi YH, Shin HJ, Poo H, Song JJ, Kim CJ, Sung MH. 2005. Effect of high-molecular-weight poly- γ -glutamic acid from *Bacillus subtilis* (*chungkookjang*) on Ca solubility and intestinal absorption. *J Microbiol Biotechnol* 15: 855-858.
22. Goto A, Kunioka M. 1992. Biosynthesis and hydrolysis of

- poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO 3335. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 1031-1035.
23. Agwuh KN, MacGowan A. 2006. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including gly-cylclines. *J Antimicrob Chemother* 58: 256-265.
 24. Tanimoto H, Mori M, Motoki M, Toru K. 2001. Natto mu-cilage containing poly- γ -glutamic acid increases soluble calcium in rat small intestine. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 516-521.
 25. Li C, Price JE, Milas L, Hunter NR, Ke S, Tansey W, Charnsagavej C, Wallace S. 1999. Antitumor activity of poly(L-glutamic acid)-paclitaxol on syngeneic and xenografted tumors. *Clin Cancer Res* 5: 891-897.
 26. Spénard J, Aumais C, Massicotte J, Brunet J-S, Tremblay C, Grace M, Lefebve M. 2005. Effects of food and for-mulation on the relative bioavailability of bismuth biscalci-trate, metronidazole, and tetracycline given for *Helicobacter pylori* eradication. *Br J Clin Pharmacol* 60: 374-377.
 27. Lee YK, Lee MY, Kim MK, Choe WK, Kim SD. 2004. Effects of calcium lactate and *chungkukjang* on calcium status in rat. *J Food Sci Nutr* 9: 45-52.
 28. Rosen HN, Chen V, Cittadini A, Greenspan SL, Douglas PS, Moses AC, Beamer WG. 1995. Treatment with growth hormone and IGF-1 in growing rats increases bone mineral content but not bone mineral density. *J Bone Miner Res* 10: 1352-1358.
 29. Guler HP, Zapf J, Scheiwiller E, Froesch ER. 1988. Re-combinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypo-physectomized rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4889-4893.

(2008년 9월 23일 접수; 2008년 11월 1일 채택)