

흰쥐에서 불가사리칼슘의 체내이용성에 대한 칼슘흡수증진물질의 첨가 효과

이연숙^{1*} · 문지영¹ · 장수정¹ · 박미나¹ · 박희연²

¹서울대학교 식품영양학과, 생활과학연구소

²국립수산과학원 생명공학연구소

Effects of Supplemental Agents Enhancing Calcium Absorption on Bioavailability of Starfish Calcium in Rats

Yeon-Sook Lee^{1*}, Ji-Young Moon¹, Soo-Jung Jang¹, Mi-Na Park¹ and Hee-Yeon Park²

¹Dept. of Food and Nutrition, Research Institute of Human Ecology,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

²Biotechnology Research Center NFRDI, Busan 619-902, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the bioavailability of starfish calcium with substances enhancing calcium absorption. Three week-old young female rats (Sprague-Dawley) were divided into 5 groups according to calcium sources and testing agents; calcium carbonate (C), starfish calcium (S), starfish calcium + casein phosphopeptide (S-CPP), starfish calcium + citrate-malate (S-CM), starfish calcium + isoflavone (S-ISO), and were fed experimental diets containing AIN-93G based Ca (0.35% w/w) diet with CPP, CM and ISO for 6 weeks. Blood, femur, urine and feces samples were collected. There was no significant difference among groups in terms of growth and food intake. Serum Ca concentrations were normal in all 5 groups. Serum P concentrations and ALP activities were not significantly different among groups. Ca absorption and retention were significantly increased both in S-CPP and S-CM groups compared to C group ($p < 0.05$). P absorption was significantly higher in S-CPP group than in other groups. While the amount of soluble Ca of intestinal contents did not differ among groups, the amount of insoluble Ca was significantly lower in S-CPP, S-CM and S-ISO groups than in C and S groups. However, the weight, Ca and P concentrations of femur were not significantly different among groups. These results suggest that the addition of CPP and citrate-malate were more effective for enhancing the bioavailability, intestinal absorption and solubility of starfish calcium.

Key words: starfish calcium, calcium bioavailability, casein phosphopeptide, citrate-malate, isoflavone

서 론

칼슘은 식품으로 섭취하는 것이 가장 바람직하나(1), 식품을 통해 충분한 섭취가 어려울 경우에는 칼슘 보충제 및 칼슘 강화제가 이용될 수 있다. 현재 calcium carbonate (CaCO₃), calcium citrate malate(CCM), calcium citrate, calcium phosphate, calcium sulfate, calcium lactate, calcium gluconate 등의 칼슘염 또는 소뼈분말(bone meal), 난각분말(egg shell), 굴피분말(oyster shell), 해조칼슘 등의 천연소재 칼슘을 원료로 한 다양한 칼슘제품이 시판되고 있다. 이러한 칼슘염 또는 천연소재 칼슘을 제품으로 개발할 경우, 칼슘의 체내 이용성을 높이기 위한 여러 가지 방안이 강구되고 있다. 일반적으로 칼슘은 체내 이용률이 높지 않은 영양소로서, 최대 60%를 넘지 않으며 보통 성인의 흡수율은 25~30%로 평가되고 있다(2). 이와 같이 칼슘은 소장 내 흡수

가 상당히 제한되기 때문에 칼슘급원의 가치는 일반적으로 함유량뿐만 아니라 생체 이용효율로서 평가된다(2).

칼슘의 체내 이용성은 성장, 임신, 수유 등의 체내 생리적 요구뿐 아니라 우유성분인 유당과 카제인 포스포펩타이드(casein phosphopeptide; CPP) 또는 피틴산, 수산, 섬유소, 지방 등의 식이성분에 의해서 영향을 받는다. 식이성분 중 수산, 피틴산, 섬유소 등은 칼슘 흡수를 방해한다(3)고 알려져 있는 반면, vitamin D, lactose(4,5), CPP(6-8), citrate-malate(9), isoflavones(10) 등은 칼슘 흡수를 증진시킨다고 알려져 왔다.

본인들은 선행연구(11)에서 새로운 칼슘급원으로서 불가사리 칼슘의 유용성을 보고하였다. 즉 성장기 흰쥐에서 불가사리에서 추출한 칼슘분말을 이용하여 체내이용성과 흡수율을 탄산칼슘과 비교한 결과, 우수한 칼슘급원으로서 제시하였다. 본 연구에서는 불가사리 칼슘의 체내이용성을 높이

*Corresponding author. E-mail: lysook@snu.ac.kr
Phone: 82-2-880-6832, Fax: 82-2-884-0305

기 위한 하나의 방안으로, 칼슘흡수율을 증진시킨다고 알려진 성분들(CPP, citrate-malate, isoflavones)을 첨가하여 그 효과를 검토하고, 칼슘보충제의 개발에 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

실험설계

갓 이유된 암컷 흰쥐(3주령, Sprague Dawley)를 서울대학교 실험동물 자원관리원에서 구입하여 평균체중 80 g이 되었을 때, 각 실험군 당 8마리씩 5군으로 나누었다. 즉 탄산칼슘군(C), 불가사리칼슘군(S), 불가사리칼슘+Casein phosphopeptide군(S-CPP), 불가사리칼슘+Citrate-malate군(S-CM), 불가사리 칼슘+Isoflavone군(S-ISO)으로 나누었다. 실험식을 6주간 공급하였으며, 4주째에 대사케이지에 넣어 4일간 대사실험을 실시하였다. 실험식이와 식수는 완전 자유 급여법으로 급여하였다. 실험동물 사육실 환경은 온도 22±2°C, 상대습도 65±5%로 유지하였으며, 명암은 12시간 주기(6:00 a.m.~6:00 p.m.)로 조절하였다.

실험식이

실험식이는 정제식이로서 조성은 기본적으로 AIN-93G 패턴을 따랐다(Table 1). 불가사리에서 추출한 칼슘은 국립수산물과학원(영안화공(주) 제조, 김해)에서 제공받아 실험에 이용하였다. 대조군으로는 탄산칼슘(CaCO₃; Shinyo Pure Chemicals Co. Ltd., Japan)을 이용하였다. 실험식이의 단백질 급원은 ISP(isolated soy bean protein; 매일유업주식회사)를 이용하였으며, 모든 실험식이의 질소 함량뿐 아니라 칼슘(0.35%)과 인(0.70%) 함량 또한 동일하게 조정하였다. 칼슘 흡수 증진 물질의 첨가효과를 검토하기 위하여 CPP

(casein phosphopeptide; 매일유업주식회사), citrate-malate, isoflavone(90% 이상 genistein; 태평양 주식회사)을 불가사리 칼슘식에 첨가하였다. 칼슘 흡수 증진 물질의 첨가량은 기존 논문을 참조하여 임의로 정하였다. 즉, CPP 첨가량은 CPP/Ca이 15일 때 가장 흡수율이 높았다는 연구결과(12)를 참조하였으며, citrate 및 malate는 calcium citrate malate(CCM)의 조성 및 선행논문(13)을 참고로 각각 0.7%로 하였다. 또한 isoflavone량은 0.01%로 정하였다(10,11). 또한 장관 내 식이 이동 marker로서 PEG(polyethylene glycol 4,000)를 실험식에 포함시켰다.

시료수집

희생시키기 전 하룻밤 절식(overnight-fasting) 후, 1시간 30분 동안 다시 식이를 급여한 다음, 식이섭취 종료 1시간 후에 염산케타민(케타라, 유한양행(주))으로 마취하여 시료를 채취하였다. 이는 모든 실험동물의 식이섭취 조건을 일정하게 하고, 흡수기(absorptive phase)에 소장내용물 중 가용성 칼슘을 측정하기 위해서이다. 복대동맥에서 혈액을 채취하여 4°C에서 보관하였다가 3,000 rpm에서 10분간 원심분리(Inverter union 5KR, Hanil Co., Korea)하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 분석 전까지 -70°C에서 보관하였다. 양쪽 대퇴골은 적출한 후 부착되어 있는 근육, 지방, 인대 등 부착물을 모두 제거한 다음, 냉동건조 후 마른 무게를 측정하였다. 모든 시료는 분석할 때까지 -70°C에서 보관하였다. 분과 뇨는 4일간 매일 동일한 시간에 각각 수거하였으며, 분은 중량을 측정 후, 뇨는 부피를 측정하고 35% 염산을 한 두 방울 떨어뜨린 후, 각각 냉동 보관하였다. 소장내용물은 0.9% NaCl 용액으로 2회 씻어 내린 후, 일정하게 부피를 맞추었다. 그 후 10,000 rpm에서 20분간 원심분리(Mega 21R, Hanil Co.)하여 가용성 분획과 불용성 분획을 분리하여

Table 1. Composition of experimental diets¹⁾

	C	S	S-CPP	S-CM	S-ISO
Cornstarch	483.17	483.17	470.04	469.17	483.07
ISP	200	200	160.63	200	200
Sucrose	100	100	100	100	100
Soybean oil	70	70	70	70	70
Fiber	50	50	50	50	50
Min. Mix. ²⁾ (Ca, P free)	35	35	35	35	35
Vit. Mix. ³⁾	10	10	10	10	10
L-Cysteine	3	3	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
t-Buthylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
Calcium source ⁴⁾	8.75	8.75	8.75	8.75	8.75
KH ₂ PO ₄	17.57	17.57	17.57	17.57	17.57
PEG	20	20	20	20	20
Product ⁵⁾	0	0	52.5	14	0.1

¹⁾ Experimental diets were prepared according to AIN-93G composition.

²⁾ Mineral mix (Ca, P free); AIN-93G-MX.

³⁾ Vitamin mix; AIN-93-VX.

⁴⁾ Calcium source; CaCO₃ (C); starfish calcium (S, S-CPP, S-CM, S-ISO).

⁵⁾ Product (substances enhancing Ca absorption); S-CPP, starfish calcium+5.25% CPP; S-CM, starfish calcium+0.7% citrate+0.7% malate; S-ISO, starfish calcium+0.01% isoflavone.

-70°C에서 냉동 보관하였다.

시료분석

혈청 칼슘과 인 농도 및 ALP 활성: 혈청 칼슘 농도와 alkaline phosphatase(ALP) 활성은 혈액 자동분석기(Spot-chem; Daiichi Kagaku Co., Japan)를 이용하여 측정하였다. 혈청 인은 3차 증류수로 희석한 후 Fiske와 Subbarow의 방법(14)을 이용하여 비색법(Spectrophotometer; Beckman DU-650, USA)으로 측정하였다.

대퇴골 중 칼슘과 인 함량: 대퇴골의 칼슘 함량은 뼈 조직을 냉동건조 후 600°C의 회화로에서 건식 회화시킨 다음, 식혀서 질산용액을 시료가 젖을 정도로 떨어뜨린 후 다시 3시간 동안 회화하여 얻은 회분을 6 N HCl 용액으로 용해하였다. 이것을 1% LaCl₃·7H₂O로 희석하여 원자흡광계(Atomic Absorption Spectrophotometry; GBC904AA, USA)를 이용하여 422.7 nm에서 측정하였다. 인의 처리는 칼슘의 경우와 동일하지만, 3차 증류수로 희석하여 Fiske와 Subbarow의 방법(14)으로 측정하였다.

분과 뇨 중 칼슘 및 인 함량: 분은 105°C의 drying oven에서 일정한 무게가 될 때까지 건조시켜 마른 무게를 잰 후, 시료를 600°C의 회화로에서 회화시켜 얻은 회분을 6 N HCl 용액으로 용해하였다. 뇨는 3,000 rpm에서 20분간 원심분리(Inverter union 5KR, Hanil Co.)시켰다. 분과 뇨의 칼슘과 인은 뼈 조직과 동일한 방법으로 측정하였다.

소장내용물 중 가용성, 불용성 칼슘 함량 및 PEG 함량: 가용성 분획의 칼슘함량은 TCA의 최종농도가 5%가 되도록 하여 단백질을 제거한 후, LaCl₃·7H₂O 용액으로 La의 농도가 1%가 되도록 희석하여 원자흡광계(Atomic Absorption Spectrophotometry; GBC904AA, USA)로 422.7 nm에서 측정하였다. 불용성 분획의 칼슘 함량은 600°C의 회화로에서 회화시켜 얻은 회분을 6 N HCl 용액으로 용해한 후, 상기와 동일한 방법으로 측정하였다. PEG(polyethylene glycol)은 Hyden의 방법(15)으로 정량하였다. 시료수집 및 분석에 이용된 모든 초자기구는 10% 염산 용액에 담갔다가 3차 탈 이온수로 3회 이상 행구어 사용하였다.

통계분석

실험결과는 SAS program을 이용하여 평균과 표준오차

(mean±SE)로 제시하였다. 실험군 간의 차이는 one-way ANOVA test 후, p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다.

결과 및 고찰

성장 및 식이섭취량

실험시작 및 종료기 체중, 체중증가량, 식이섭취량은 Table 2에 제시하였다. 성장 및 식이섭취량은 칼슘 급원에 따른 차이를 보이지 않았다. 또한 CPP, citrate-malate, isoflavone의 첨가에 의해서도 차이가 없었다.

칼슘염의 종류에 따른 성장과 식이섭취량은 식이 조건에 따라 다양하게 보고되었는데, 칼슘염의 종류(calcium carbonate, calcium lactate, calcium phosphate)를 달리하여 1.6%의 Ca를 첨가하였을 때, calcium phosphate 섭취군에서 가장 체중증가량이 컸다(16). 그러나 Tsugawa 등의 연구(17)에서는 비타민 D의 조건을 달리하여 calcium carbonate, calcium lactate, powdered oyster shell calcium의 칼슘이용률을 비교하였을 때, 칼슘 급원에 따른 체중증가와 식이섭취량은 차이가 없었다. 또 흰쥐를 대상으로 칼슘식이에 CPP를 첨가했을 때에도 성장, 식이섭취량 및 식이효율에 영향을 미치지 않았다(18,19).

혈청 칼슘과 인 농도 및 ALP 활성

혈청 칼슘, 인 농도 및 ALP 활성은 Fig. 1에 제시하였다.

혈청 칼슘 농도는 실험군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 모두 정상칼슘 범위(7.2~13.9 mg/dL)(20)에 속하였다. 혈청 인의 농도 또한 실험군 간에 차이가 없었다. Citric acid의 첨가가 혈청 인 농도를 증가시켰다는 연구결과(9)가 있으나, 이는 고칼슘 식이(1.0% Ca)에 citrate를 1:1의 molar ratio로 첨가했을 경우로서, 정상칼슘(0.35%) 식이에 citrate-malate를 첨가한 본 실험에서는 S-CM군의 혈청 인 농도에 차이가 없었다. ALP 활성은 S-CPP군이 낮은 경향을 보이고 C(탄산칼슘)군이 높은 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 없었다. ALP는 골 대사 지표로 알려져 있으며, skeletal alkaline phosphatase는 골 형성과 골 무기질화 과정에서 osteoblast에서 합성되고 분비된다(21).

Table 2. Body weight, weight gain and food intake of the rats fed experimental diets for 6 weeks

Group ¹⁾	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Daily weight gain (g/d)	Daily food intake (g/d)
C	81.1±3.4 ^{2)NS3)}	214.3±5.7 ^{NS}	3.2±0.1 ^{NS}	15.5±0.4 ^{NS}
S	81.0±3.2	205.5±3.5	3.0±0.1	15.1±0.4
S-CPP	81.8±3.0	209.4±4.4	3.0±0.1	15.4±0.8
S-CM	81.6±3.0	204.6±6.8	2.9±0.1	15.7±0.4
S-ISO	82.1±2.8	206.3±5.1	3.0±0.1	16.1±0.4

¹⁾C, calcium carbonate; S, starfish calcium; S-CPP, starfish calcium+5.25% CPP; S-CM, starfish calcium+0.7% citrate+0.7% malate; S-ISO, starfish calcium+0.01% isoflavone.

²⁾Values are mean±SE of 8 rats per group.

³⁾NS: not significantly different at p<0.05 ANOVA test followed by Duncan's multiple test.

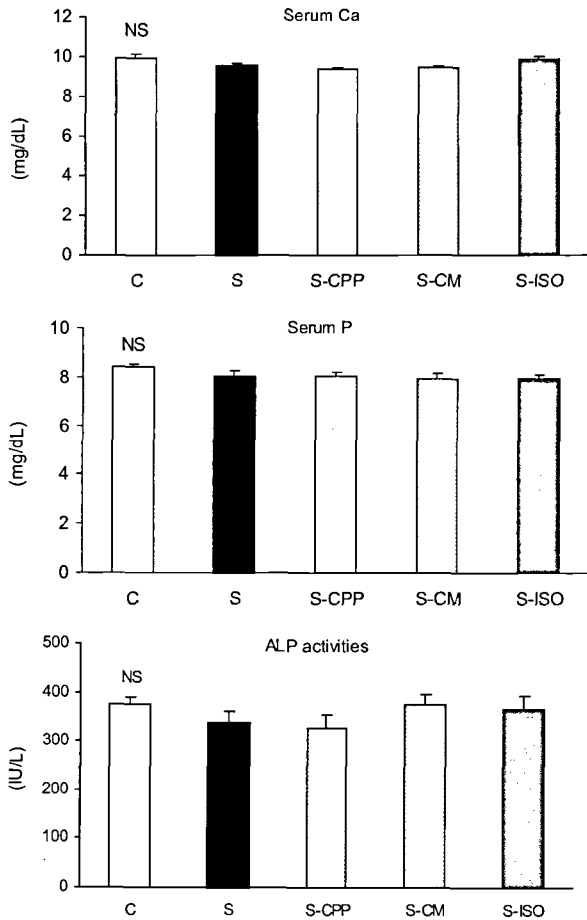


Fig. 1. Ca, P concentrations and alkaline phosphatase (ALP) activities in serum of rats fed experimental diets for 6 weeks. Groups are the same as in Table 2. NS: not significant.

칼슘의 보유량 및 흡수량

실험군의 칼슘 섭취량, 분 중 칼슘 배설량, 뇨 중 칼슘 배설량, 칼슘 보유량 및 칼슘 흡수량은 Table 3에, 칼슘 보유율 및 결보기 흡수율은 Fig. 2에 각각 제시하였다.

칼슘 보유율 및 결보기 흡수율은 S-CPP군, S-CM군이 탄산칼슘 섭취군(C)에 비해 유의적으로 높았다. S-CPP군의

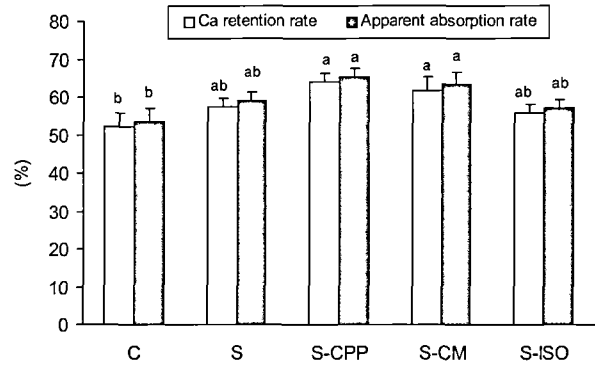


Fig. 2. Ca retention and apparent absorption rates of the rats fed experimental diets for 6 weeks. Groups are the same as in Table 2. Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ ANOVA test followed by Duncan's multiple test. Retention rate (%) = [Retention (mg) / Intake (mg)] \times 100. Apparent absorption rate (%) = [Apparent absorption (mg) / Intake (mg)] \times 100.

경우 탄산칼슘 섭취군(C)에 비하여 각각 22%, 23% 높은 흡수율과 보유율을 보였으며, 불가사리 칼슘만을 섭취한 S군에 비해서도 10%, 11% 높은 흡수율과 보유율을 나타냈다. 또한 S-CM군은 C군에 비하여 18%, 20% 높은 흡수율과 보유율을, S군에 비해서는 7%, 8% 높은 흡수율과 보유율을 나타냈다. 즉, 본 실험 결과는 불가사리 칼슘에 CPP 첨가 또는 citrate-malate 첨가가 칼슘 체내이용성을 증진시킬 수 있음을 밝힌 것이다. CPP는 카제인을 트립신으로 가수분해한 것으로, in vivo와 in vitro에서 칼슘의 흡수를 증진시킨다고 알려져 왔다(7,8,18,19). CPP는 Ser-P(phosphoserine) 구조를 가지고 있으며, 이 phosphoserine 잔기가 calcium phosphate 침전을 방해함으로써 칼슘의 용해도에 영향을 준다(22,23). Heaney 등(24)은 흡수율이 낮은 폐경 후 여성을 대상으로 CPP를 투여했을 때 칼슘의 흡수율이 높아졌다고 하였다. Sato 등(19)은 성장기의 흰쥐에 칼슘 0.35%, 인 0.7%를 함유하는 대두단백질 사료에 CPP/Ca 비가 다른 사료를 4~8주간 먹인 후 칼슘의 흡수율과 보유율을 측정된 결과, CPP/Ca가 0.35 이상에서 칼슘 흡수율이 상승하고 8주간에

Table 3. Daily Ca intake, fecal and urinary excretion, daily Ca retention and apparent Ca absorption of the rats fed experimental diet for 6 weeks

Group ¹⁾	Ca intake (mg/d)	Fecal Ca excretion (mg/d)	Urinary Ca excretion (mg/d)	Ca retention ⁴⁾ (mg/d)	Apparent absorption ⁵⁾ (mg/d)
C	54.1 \pm 3.1 ^{2)NS3)}	25.8 \pm 3.1 ^{NS}	0.8 \pm 0.1 ^{NS}	28.0 \pm 1.6 ^{NS}	28.7 \pm 1.6 ^{NS}
S	55.2 \pm 1.8	22.5 \pm 1.1	0.8 \pm 0.1	31.9 \pm 1.9	32.7 \pm 2.0
S-CPP	57.5 \pm 3.1	20.0 \pm 1.8	0.9 \pm 0.1	36.6 \pm 2.3	37.6 \pm 2.3
S-CM	53.1 \pm 2.9	19.2 \pm 1.8	0.8 \pm 0.2	33.2 \pm 3.0	34.0 \pm 3.1
S-ISO	56.9 \pm 1.7	24.5 \pm 1.6	0.8 \pm 0.1	31.7 \pm 1.4	32.5 \pm 1.5

¹⁾Groups are the same as in Table 2.

²⁾Values are mean \pm SE of 8 rats per group.

³⁾NS: not significantly different.

⁴⁾Retention (mg) = Intake (mg) - [Fecal excretion (mg) + urinary excretion (mg)].

⁵⁾Apparent absorption (mg) = Intake (mg) - Fecal excretion (mg).

걸쳐 칼슘 보유량도 상승하는 것을 보고하였다. CPP와 칼슘의 비율에 따른 장내 칼슘 수송 상승 정도를 알아본 in vitro 실험(12)에서는 CPP/Ca의 비율 5, 10, 15, 20으로 나누어 칼슘의 흡수량을 관찰하였는데, CPP와 칼슘의 비율이 5~15까지는 칼슘의 흡수량이 증가하였다고 보고하였다. 한편, 본 실험과 같이 칼슘과 CPP를 1:15의 비율로(0.6% Ca, 9% CPP) 첨가한 Tsuchita 등(18)의 실험결과에서는 칼슘과 인의 흡수율은 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다.

Citrate는 금속이온을 킬레이트하여 소장에서 흡수율을 높이고, CCM은 용해도가 높아 칼슘흡수를 도와준다고 알려져 있다(25). Lacour 등(9)은 Ca과 citrate의 몰 비율을 1:1로 하여 citrate를 식이에 첨가하였는데, 특히 고칼슘 수준(1% Ca)에서 칼슘과 인의 흡수율이 높았다고 보고하였다. Miller 등(26)은 청소년을 대상으로 CaCO₃와 CCM의 흡수율을 측정하였는데, CCM의 흡수율은 36.2%로써 CaCO₃의 26.4%보다 유의적으로 높은 수치를 보였다. 또한 Sakhaee 등(27)은 성인에게는 calcium citrate 형태가 CaCO₃보다 20% 이상 흡수율이 높다고 보고하였다. 이 밖에 Nicar와 Pak(28), Harvey 등(29)도 calcium citrate가 흡수율이 더 높다고 보고하였다. 그러나 칼슘의 체내이용성은 실험대상, 첨가된 칼슘 양, 칼슘 섭취 상태, 투여 시기 등에 따라 실험 결과는 다양하였다. Sheikh 등(30)은 우유, 칼슘염(carbonate, acetate, lactate, gluconate, citrate)의 칼슘 이용성을 비교하였는데 비슷한 것으로 보고하였으며, 이 밖에 calcium citrate, calcium phosphate, calcium carbonate를 비교한 Heaney 등(31)의 연구 또한 비슷한 경향을 보고하였다.

Soy isoflavone은 폐경 후 호르몬이 부족한 여성의 뼈에 이로운 효과를 갖는 것으로 알려져 있다. Arjmandi 등(32)은 합성 isoflavone인 ipriflavone을 골다공증 모델 쥐에 투여했을 때, 십이지장 세포에서 칼슘 수송이 증가됨을 발견했다. Isoflavone의 소장 내 칼슘 흡수증진 효과를 살펴본 in vitro

실험(33)에서도 십이지장, 회장, 공장 세포에서 모두 isoflavone을 투여한 군의 칼슘 수송 비율이 높게 나타났다. 그러나 본 실험에서는 isoflavone 투여군(S-ISO)의 흡수율 및 보유율은 불가사리칼슘 단독 투여군인 S군보다도 낮은 수치를 보였다. 이는 본 실험의 대상이 난소절제를 하지 않은 성장기 흰쥐였기 때문이라 생각된다.

인의 보유량 및 흡수량

실험군의 인 섭취량, 분과 뇨 중 인 배설량, 인의 보유량 및 흡수량은 Table 4에 제시하였다. 식이 중 인 섭취량은 실험군 간 유의적인 차이가 없었다. 분 중 인 함량은 S-ISO군이 높았으며, S-CPP군 및 S-CM군이 다른 군보다 낮았다. 칼슘과 인은 장내에서 불용성염인 calcium phosphate를 형성하여 침전할 수 있다. CPP나 citrate 등은 칼슘을 킬레이트하여(12) calcium phosphate 형성을 방해하였기 때문에, S-CPP군과 S-CM군의 분 중 인 배설량이 낮아졌다고 생각된다.

인의 보유량 및 결보기 흡수량은 실험군 간 유의적인 차이가 없었으나 결보기 흡수율은 차이를 보여, S-CPP군이 가장 높았고 S-ISO군이 가장 낮았다. 뇨 중 인 함량은 군 별 유의적인 차이가 없었으나 S-ISO군이 낮은 경향을 보여, 인의 보유량 및 보유율은 S-CPP군 및 S-ISO군이 다른 군에 비해 높은 경향을 보였다.

CPP는 구조상 인을 함유하고 있으나 CPP로부터의 인은 거의 영향을 주지 않는 것으로 알려져 있으며, Tsuchita 등(18)의 결과에서도 CPP가 인 흡수에 영향을 미치지 않았다. 본 실험에서는 S-CPP군의 인 흡수율이 높은 경향을 보였으나, 인의 보유율의 경우에는 차이가 없었다.

Lacour 등(9)은 칼슘 수준을 세 그룹(0.1%, 0.5%, 1.0%)으로 나누어 citric acid를 첨가하였을 때(citric acid/Ca=1), 1% Ca 그룹에서는 인 흡수율과 보유율이 증가하였으나 나머지 두 그룹에서는 차이가 없다고 보고하였다. 본 실험은 0.35%

Table 4. Daily P intake, fecal and urinary excretion, daily P retention and apparent P absorption of the rats fed experimental diets for 6 weeks

Group ¹⁾	P intake (mg/d)	Fecal P excretion (mg/d)	Urinary P excretion (mg/d)	P retention ⁵⁾ (mg/d)	Retention rate ⁶⁾ (%)	Apparent absorption ⁷⁾ (mg/d)	Apparent absorption rate ⁸⁾ (%)
C	110.2±6.4 ^{2)NS3)}	20.5±1.8 ^{4)ab4)}	58.3±3.3 ^{NS}	31.6±3.6 ^{NS}	28.2±2.1 ^{NS}	89.9±4.5 ^{NS}	81.6±0.9 ^{ab}
S	108.4±3.7	21.2±1.5 ^{ab}	61.4±3.0	25.9±3.0	25.1±2.3	87.3±3.4	80.5±1.4 ^{ab}
S-CPP	113.5±5.7	17.6±1.5 ^b	63.9±5.0	36.9±3.8	32.0±3.7	95.9±5.4	84.3±1.3 ^a
S-CM	105.5±5.9	18.1±1.4 ^b	58.4±3.9	29.0±4.2	26.7±2.9	87.4±5.8	82.5±1.6 ^{ab}
S-ISO	114.2±3.4	24.3±1.2 ^a	53.8±4.5	36.0±5.1	31.3±4.1	89.9±3.0	78.6±0.9 ^b

¹⁾ Groups are the same as in Table 2.

²⁾ Values are mean±SE of 8 rats per group.

³⁾ NS: not significant.

⁴⁾ Values with different superscripts within the same column are significantly different at p<0.05 ANOVA test followed by Duncan's multiple test.

⁵⁾ Retention (mg)=[Intake (mg)-[Fecal excretion (mg)+urinary excretion (mg)]].

⁶⁾ Retention rate (%)=[Retention (mg)/Intake (mg)]×100.

⁷⁾ Apparent absorption (mg)=Intake (mg)-Fecal excretion (mg).

⁸⁾ Apparent absorption rate (%)=[Apparent absorption (mg)/Intake (mg)]×100.

칼슘 수준으로써, 식이 칼슘수준이나 첨가된 citrate-malate 비율이 다르기 때문에 citrate, malate 첨가가 인의 이용성에는 영향을 미치지 않았다고 사료된다.

소장 내 가용성 칼슘 및 불용성 칼슘

Fig. 3에는 소장 내용물의 가용성 분획과 불용성 분획 중 칼슘 함량 및 식이 유래 칼슘 중 가용성 칼슘의 비율(%)을 제시하였다. 가용성 칼슘(%)은 식이 중 Ca/PEG 비와 소장 내 Ca/PEG 비에 의하여 계산되었다.

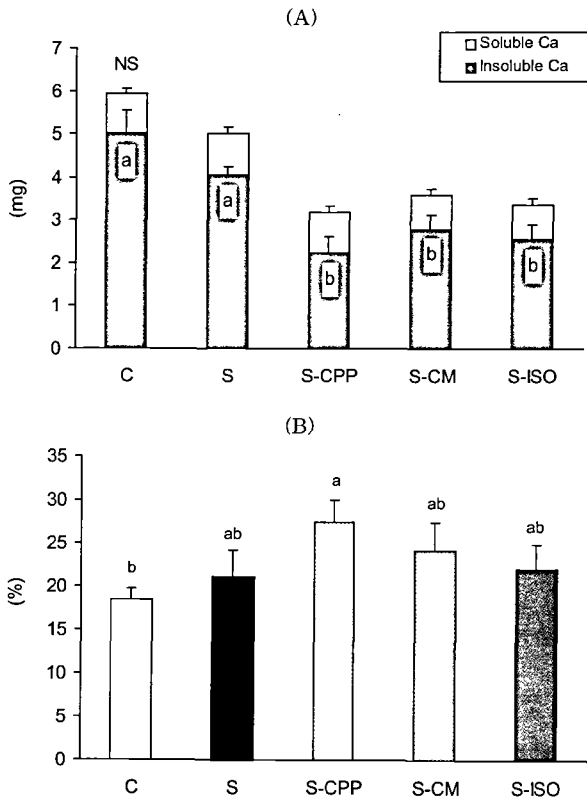


Fig. 3. Soluble and insoluble Ca contents (A) and % soluble Ca derived from diet in small intestine (B) of the rats fed experimental diets for 6 weeks.

Groups are the same as in Table 2. NS: not significant. Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ ANOVA test followed by Duncan's multiple test.

소장 내용물의 가용성 분획 중 칼슘 함량은 실험군 간 유의적인 차이가 없었다. 그러나 불용성 분획의 칼슘 함량은 실험군 간 차이를 보여, 탄산칼슘 단독 섭취군(C) 및 불가사리칼슘 단독 섭취군(S)의 불용성 칼슘 함량은 CPP 첨가군(S-CPP)보다 각각 2.3배, 1.8배 높았다.

소장 내용물 중 PEG 함량으로부터 식이 유래의 칼슘 함량을 계산하여 이 중 실제 소장 내 존재하는 가용성 칼슘의 차지 비율(%)을 살펴보면, 가용성 칼슘 비율은 C군이 가장 낮고, S-CPP군 및 S-CM군이 높았다. 즉 S군이 C군보다 가용성 칼슘 함량이 높은 경향을 보였으므로, 불가사리칼슘의 소장 내 칼슘의 이온화도가 높음을 알 수 있었고, 칼슘흡수증진 물질, 특히 CPP와 citrate-malate의 첨가가 소장 내 가용성 칼슘 비율을 높임을 알 수 있었다. 칼슘이 흡수되기 위해서는 가용성 상태가 되어야 하거나 최소한 흡수가 잘 되는 물질에 결합한 후 떨어질 수 있는 상태가 되어야 한다(26). CPP, citrate 및 malate 등은 칼슘을 가용화 상태로 만들어 주어 흡수율에 도움을 준다고 알려져 있다(7,25).

대퇴골의 무게, 회분, 칼슘 및 인 함량

대퇴골의 무게, 회분, 칼슘 및 인 함량은 Table 5에 제시하였다. 대퇴골의 마른 무게는 실험군 간 유의적인 차이가 없었다. 회분량은 S-ISO군이 낮았으나 칼슘 및 인의 함량은 실험군 간 차이를 보이지 않았다.

Tsuchita 등(34)은 폐경 후 골다공증 모델 흰쥐를 대상으로 Ca-bound casein phosphopeptides(CaCPP)와 Ca-free CPP를 투여하여 골격에 미치는 영향을 보았을 때, 대퇴의 골밀도(bone mineral density; BMD)는 CaCPP군이 높게 나타났으나, Ca-free CPP군은 효과를 나타내지 못했다. 흰쥐를 대상으로 한 다른 연구에서도 CPP가 골격에 미치는 영향은 관찰되지 않았으나(35), CPP가 뼈 무게와 함량을 증가시켰다는 보고도 있다(8). Sato 등(19)은 성장하는 수컷 흰쥐를 대상으로 marginal Ca dose(0.35%)에서 칼슘 흡수를 증진시키는 CPP와 칼슘의 최소비율을 조사하였는데, CPP/Ca가 0.2 이상에서 칼슘 흡수율이 증가하였음을 보고하였으나 증가된 흡수율이 골격에까지 영향을 미치지 않는다고 하였다.

또한 본 실험에서는 isoflavone 첨가가 뼈의 무기질 함량에 영향을 주지 않았다. 본 실험에서 장내 칼슘 흡수율과

Table 5. Weight, Ash, Ca and P contents in femur of the rats fed experimental diets for 6 weeks

Group ¹⁾	Dry weight (mg)	Ash/dry wt (mg/g)	Ca/dry weight (mg/g)	P/dry weight (mg/g)
C	445.7 ± 12.7 ^{2)NS3)}	686.3 ± 12.0 ⁴⁾	209.2 ± 2.2 ^{NS}	103.5 ± 2.2 ^{NS}
S	424.3 ± 3.9	675.8 ± 7.7 ^{ab}	213.7 ± 2.4	106.3 ± 2.5
S-CPP	435.8 ± 12.7	663.0 ± 7.2 ^b	206.9 ± 1.6	107.3 ± 1.8
S-CM	421.7 ± 11.3	655.8 ± 10.5 ^{bc}	207.0 ± 2.0	108.7 ± 0.8
S-ISO	424.0 ± 11.9	639.5 ± 10.1 ^c	210.8 ± 2.9	108.8 ± 1.4

¹⁾Groups are the same as in Table 2.

²⁾Values are mean ± SE of 8 rats per group.

³⁾NS: not significant.

⁴⁾Values with different superscripts within the same column are significantly different at $p < 0.05$ ANOVA test followed by Duncan's multiple test.

보유율의 군 간 차이가 뼈 중 칼슘 함량에 크게 영향을 미치지 않았는데, 칼슘 흡수량의 증진효과가 골격에까지 반영되기 위해서는 보다 장기간의 섭취효과를 검토하여야 할 것이다.

요 약

본 연구는 불가사리에서 추출한 칼슘의 체내 이용성 및 칼슘 흡수증진 물질 첨가가 불가사리 칼슘의 이용성에 미치는 영향을 검토함으로써 새로운 칼슘 급원으로서의 불가사리 칼슘의 유용성을 알아보고자, 동물실험을 수행하였다. 즉 3주령 된 암컷 흰쥐를 대상으로, 불가사리에서 추출한 칼슘에 칼슘흡수증진 물질로서 casein phosphopeptide(CPP; 5.25%), citrate-malate(1.4%), isoflavone(0.01%)을 각각 첨가한 식이를 6주간 공급한 후, 불가사리 칼슘의 이용성에 미치는 효과를 알아보았다. 이 때 칼슘 수준은 0.35%로, 인 수준은 0.7%로 각각 고정시켰다. 희생을 통하여 혈청 칼슘과 인 농도 및 alkaline phosphatase(ALP) 활성, 칼슘과 인의 흡수율 및 보유율, 대퇴골의 칼슘 및 인 함량, 소장의 가용성 및 불용성 칼슘 함량을 측정하였다. 그 결과는 다음과 같다. 불가사리에서 추출한 칼슘에 칼슘흡수증진 물질을 첨가했을 경우, 성장 및 식이섭취량은 실험군 간에 차이가 없었다. 혈청 칼슘과 인 농도 및 ALP 활성은 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다. 칼슘의 보유율과 결보기 흡수율은 불가사리 칼슘+CPP군과 불가사리칼슘+citrate-malate군이 높았다. 인의 보유율은 차이가 없었으나, 결보기 흡수율은 불가사리 칼슘+CPP군에서 높았다. 소장 내용물의 가용성 분획 중 칼슘 함량은 실험군 간 유의적인 차이가 없었다. 반면 불용성 분획의 칼슘 함량은 불가사리칼슘+CPP군, 불가사리칼슘+citrate-malate군 및 불가사리칼슘+ISO군에서 유의적으로 낮았다. 식이로부터 유래된 장내 가용성 칼슘 함량은 불가사리칼슘+CPP군에서 가장 높았다. 대퇴골의 무게, 칼슘 및 인의 함량은 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다. 이상의 결과에서 불가사리 칼슘은 흰쥐의 일반적인 성장 및 기능에 영향을 미치지 않으면서도 칼슘의 흡수율은 높아 새로운 칼슘급원으로서 이용가능성이 높음을 시사하였다. 그러나 대체로 골격 대사에는 영향을 미치지 못했다. 또한 칼슘흡수증진 물질을 첨가하였을 경우에 CPP와 citrate-malate가 불가사리칼슘의 흡수율을 높여, 불가사리칼슘에 CPP와 citrate-malate를 첨가할 경우 보다 좋은 효과가 기대된다.

문 헌

- Miller GD, Jarvis JK, McBean LD. 2001. The importance of meeting calcium needs with foods. *J Am Coll Nutr* 20(2 Suppl): 168S-185S.
- Louie DS. 1996. *Calcium and phosphorus in health and disease: Intestinal bioavailability and absorption of calcium*. CRC Press, Boca Raton. p 45.
- Allen LH. 1982. Calcium bioavailability and absorption: a review. *Am J Clin Nutr* 35: 783-808.
- Greger JL, Gutkowski CM, Khazen RR. 1989. Interaction of lactose with calcium, magnesium and zinc in rats. *J Nutr* 119: 1691-1697.
- Buchowski MS, Miller DD. 1991. Lactose, calcium source and age affect calcium bioavailability in rats. *J Nutr* 121: 1746-1754.
- Lee YS, Noguchi T, Naito H. 1983. Intestinal absorption of calcium in rats given diets containing casein or amino acid mixture: the role of casein phosphopeptides. *Br J Nutr* 49: 67-76.
- Sato R, Noguchi T, Naito H. 1986. Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligand segment of rats small intestine. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 32: 67-76.
- Lee YS, Park G, Naito H. 1992. Supplemental effect of casein phosphopeptides (CPP) on the calcium balance of growing rats. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi* 45: 333-338.
- Lacour B, Tardivel S, Druke T. 1997. Stimulation by citric acid of calcium and phosphorous bioavailability in rats fed a calcium-rich diet. *Miner Electrolyte Metab* 23: 79-87.
- Arjmandi BH, Khalil DA, Hollis BW. 2000. Ipriflavone, a synthetic phytoestrogen, enhances intestinal calcium transport in vitro. *Calcif Tissue Int* 67: 225-229.
- Lee YS, Moon JY, Jang SJ. 2005. Bioavailability of starfish calcium as a novel calcium source. *Kor J Comm Liv Sci* 16: 135-148.
- Erba D, Ciappellano S, Testolin G. 2002. Effect of the ratio of casein phosphopeptides to calcium (w/w) on passive calcium transport in the distal small intestine of rats. *Nutrition* 18: 743-746.
- Weaver CM, Martin BR, Costa NM, Saleeb FZ, Huth PJ. 2002. Absorption of calcium fumarate salts is equivalent to other calcium salts when measured in the rat model. *J Agric Food Chem* 50: 4974-4975.
- Fiske CH, Subbarow Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66: 375-400.
- Hyden S. 1956. A turbidimetric method for the determination of polyethylene glycols in biological materials. *Lantbrukshoegsk Ann* 22: 139-145.
- Patwardhan UN, Pahuja DN, Samuel AM. 2001. Calcium bioavailability: an in vivo assessment. *Nutr Res* 21: 667-675.
- Tsugawa N, Okano T, Higashino R, Kimura T, Oshio Y, Teraoka Y, Igarashi C, Ezawa I, Kobayashi T. 1995. Bioavailability of calcium from calcium carbonate, DL-calcium lactate, L-calcium lactate and powdered oyster shell calcium in vitamin D-deficient or -replete rats. *Biol Pharm Bull* 18: 677-682.
- Tsuchita H, Goto T, Yonehara Y, Kuwata T. 1995. Calcium and phosphorus availability from casein phosphopeptides in male growing rats. *Nutr Res* 15: 1657-1667.
- Sato Y, Lee YS, Kimura S. 1998. Minimum effective dose of casein phosphopeptides (CPP) for enhancement of calcium absorption in growing rats. *Int J Vitam Nutr Res* 68: 335-340.
- Mitruka BM, Rawnsley HM. 1981. *Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans*. 2nd ed. Masson Publishing USA, Inc., New York. p 160-166.
- Hamalainen MM. 1994. Bone repair in calcium deficient rats: comparison of xylitol+calcium carbonate with calcium

- carbonate, calcium lactate and calcium citrate on the repletion of calcium. *J Nutr* 124: 874-881.
22. Lee YS, Noguchi T, Naito H. 1980. Phosphopeptides and soluble calcium in the small intestine of rats given a casein diet. *Br J Nutr* 43: 457-467.
 23. Berrocal R, Chanton S, Juillerat MA, Pavillard B, Scherz JC, Jost R. 1989. Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium. *J Dairy Res* 56: 335-341.
 24. Heaney RP, Sato Y, Orimo H. 1994. Effect of casein phosphopeptide on absorbability of co-ingested calcium normal postmenopausal women. *J Bone Miner Metab* 12: 77-81.
 25. Pak CY, Harvey JA, Hsu MC. 1987. Enhanced calcium bioavailability from a solubilized form of calcium citrate. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 801-805.
 26. Miller JZ, Smith DL, Flora L, Slemenda C, Jiang XY, Johnston CC Jr. 1988. Calcium absorption from calcium carbonate and a new form of calcium (CCM) in healthy male and female adolescents. *Am J Clin Nutr* 48: 1291-1294.
 27. Sakhae K, Bhuket T, Adams-Huert B, Rao DS. 1999. Meta-analysis of calcium bioavailability: a comparison of calcium citrate with calcium carbonate. *Am J Ther* 6: 313-321.
 28. Nicar MJ, Pak CYC. 1985. Calcium availability from carbonate and calcium citrate. *J Clin Endocrinol Metab* 61: 391-393.
 29. Harvey JA, Kenny P, Poindexter J, Pak CY. 1990. Superior calcium absorption from calcium citrate than calcium carbonate using external forearm counting. *J Am Coll Nutr* 9: 583-587.
 30. Sheikh MS, Santa Ana CA, Nicar MJ, Schiller LR, Fordtran JS. 1987. Gastrointestinal absorption of calcium from milk and calcium salts. *N Engl J Med* 317: 532-536.
 31. Heaney RP, Recker RR, Weaver CM. 1990. Absorbability of calcium sources: the limited role of solubility. *Calcif Tissue Int* 46: 300-304.
 32. Arjmandi BH, Khalil DA, Hollis BW. 2000. Ipriflavone, a synthetic phytoestrogen, enhances intestinal calcium transport in vitro. *Calcif Tissue Int* 67: 225-229.
 33. Arjmandi BH, Khalil DA, Hollis BW. 2002. Soy protein: its effects on intestinal calcium transport, serum vitamin D, and insulin-like growth factor-I in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 70: 483-487.
 34. Tsuchita H, Goto T, Shimizu T, Yonehara Y, Kuwata T. 1996. Dietary casein phosphopeptides prevent bone loss in aged ovariectomized rats. *J Nutr* 126: 86-93.
 35. Scholz-Ahrens KE, Kopra N, Barth CA. 1990. Effect of casein phosphopeptides on utilization of calcium in minipigs and vitamin-D-deficient rats. *Z Ernahrungswiss* 29: 295-298.

(2007년 3월 12일 접수; 2007년 6월 28일 채택)