

# 어피 젤라틴 펩티드와 결합한 굴껍질 유래 칼슘 화합물이 칼슘 결핍 흰쥐에 미치는 영향

김규형 · 전유진 · 변희국 · 이연숙\* · 이응호\*\* · 김세권  
부경대학교 화학과, \*서울대학교 식품영양학과, \*\*부경대학교 식품공학과

## Effect of Calcium Compounds from Oyster Shell Bound Fish Skin Gelatin Peptide in Calcium Deficient Rats

Gyu-Hyung KIM, You-Jin JEON, Hee-Guk BYUN, Yeon-Sook LEE\*, Eung-Ho LEE\*\* and Se-Kwon KIM  
Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea  
\*Department of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea  
\*\*Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

To utilize the oyster shell containing a lot of calcium, we investigated the bioavailability of calcium compounds from oyster shell. First, calcium oxide was prepared by burning of oyster shell at 1200°C. Its purity was approximately 98.5%. Calcium compounds, CaCl<sub>2</sub> and CaHPO<sub>4</sub> from the calcium oxide were prepared by chemical reaction. Effect on calcium absorption by the calcium compounds from oyster shell was improved using fish skin gelatin peptides (FSGP), which was prepared by enzymatic hydrolysis of fish skin gelatin for 4hr with tuna pyloric caeca crude enzyme (TPCCE). *In vitro* experiment, calcium absorption by addition of FSGP in a mixture solution of calcium and phosphate was higher approximately 70% than that by control. *In vivo* using calcium deficient rats, a group taken the diets with 3% FSGP and CaHPO<sub>4</sub> was significantly improved amount of calcium and ash in femur and strength of femur. These results suggest that calcium compounds from oyster shell and FSGP could be used as an effective dietary calcium source.

**Key words:** Oyster shell calcium, Fish skin gelatin peptide, Calcium deficient rats

### 서 론

칼슘은 인체에 가장 많이 존재하는 무기질 원소로 일반 성인의 경우 체중의 약 2%인 1,200 g 정도를 체내에 보유하고 있다. 체내 칼슘의 99%는 골격과 치아를 형성하고 있으며, 나머지 1% 정도만이 근육의 수축과 이완, 규칙적 심장 박동, 혈액 응고, 효소의 활성화, 세포내 자극과 흥분의 전달과 같은 생리활성 조절 기능을 담당하고 있다 (Einhorn et al., 1990; Allen and Wood, 1994).

체내 칼슘 농도는 항상 일정한 농도 (약 10 mg/100 ml)로 유지되어야 하며, 칼슘의 공급이 장기간 결핍되어 체내 칼슘의 농도가 낮아지면 골다공증 (osteoporosis), 구루병 (rickets), 테타니 (tetany)와 같은 결핍증이 유발된다. 칼슘은 이와 같은 골격과 관련된 질환 이외에도 순환기 계통 질환, 대장 질환, 고혈압 등의 각종 성인병과 관련지어져 그 중요성이 강조되고 있다 (Allen and Wood, 1994; Scalmati et al., 1992; McCarren, 1997). 이와 같은 문제점의 해결을 위해서는 적당한 칼슘의 섭취와 적절한 소장내 칼슘 흡수량의 증가가 중요하다.

칼슘의 섭취는 적절한 칼슘 공급원을 통해서 일어나는데, 식품 중 칼슘 공급원의 가치는 칼슘 함량 뿐만 아니라 체내 이용성에 의해서 평가된다. 이러한 체내 이용성

은 칼슘염의 형태, 신체의 생리적 상태, 나이 및 식이 인자에 의해 결정된다. 최근 여러 나라에서 소뼈 회분 (bone ash), 패각분말 (shell powder), CCM (calcium citrate malate)과 같은 칼슘 공급원 및 칼슘 보충제가 개발되어 보급되고 있다 (Lee et al., 1992; Okano et al., 1991; 岡野, 1996). 이러한 칼슘 공급원의 체내 이용성은 흰쥐와 사람을 대상으로 연구한 것들이 보고되어 있다 (Igarashi et al., 1990; Fujita et al., 1993; Fujita et al., 1995).

칼슘의 이용성을 증진시키기 위해 단백질을 특정 효소로 분해시켜 얻은 칼슘 흡수 펩티드 (Alder-Nissen, 1986)와 특정 단백질이나 펩티드를 화학적으로 수식한 인산화 단백질 혹은 펩티드가 널리 이용되고 있으며 (Hirotosuka et al., 1986; Seguro and Motoki, 1990), 최근에는 바다게나 새우의 껍질로부터 추출한 키토산도 칼슘의 흡수를 촉진하는 역할을 한다는 것이 보고되어 있다 (Jeon and Kim, 1997). 이중 가장 널리 알려진 것이 우유에 들어있는 카제인 단백질을 트립신으로 분해시켜 만든 CPP (casein phosphopeptide)로 카제인의 serine 잔기가 인산화되어 있어 소장내 가용성 칼슘과 결합하여 체내 흡수를 용이하게 해 주는 물질로 알려져 있다 (Lee et al., 1980; 1983).

같은 우리 나라에서 1994년 세계 총생산량의 15.5%

(양식)를 차지할 만큼 많이 생산되고 있다. 1995년 현재 우리 나라의 굴 생산량은 약 21만 톤 가량인데(수산연감, 1996), 그 중 약 90%를 차지하는 굴껍질은 바다나 해안가에 방치되어 심각한 환경오염을 초래하고 있다. 굴껍질은 지금까지는 토양의 산성화를 중화시키는 중화제나 닭과 같은 가금류의 알을 단단하게 하기 위한 사료로, 또 일부는 칼슘 보급제 등으로 사용되어 왔다(Greger, 1987; Hamilton, 1985). 그러나 아직까지는 화학적 수식을 통한 칼슘화합물 및 칼슘 공급원으로서의 개발이 어려운 실정에 있다.

따라서 본 연구는 우리 나라 양식 사업에 있어 큰 문제가 되고 있는 굴껍질로부터 산화칼슘을 추출하여 이로부터  $\text{CaCl}_2$ 와  $\text{CaHPO}_4$ 를 제조하였고, 이들에 대하여 칼슘 공급원으로서의 생물학적 유용성을 조사하였다. 그리고 이들 칼슘 공급원들에 대한 칼슘 흡수를 효과적으로 증진시키기 위하여 우리 나라 수산가공공장의 부산물로 대량 생산되는 가자미피로부터 추출한 젤라틴을 효소분해하여 제조한 어피 젤라틴 펩티드를 이용하여 굴껍질 유래 칼슘 화합물의 흡수에 미치는 효과를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

실험에 사용된 굴껍질은 길이가 약  $10 \pm 3.1$  cm, 높이가  $5 \pm 1.8$  cm 정도이며, 무게는 약  $20 \pm 3.7$  g로  $-20^\circ\text{C}$ 에서 보관하여 두고 실험에 사용하였다. 참치 유문수 유래의 단백질 가수분해효소(TPCCE; tuna pyloric caeca crude enzyme)를 제조하기 위한 참치 유문수는 동원산업(주)으로부터 제공받았으며, 시판 효소인  $\alpha$ -chymotrypsin( EC 3.4.21.1; from bovine pancreas, Type II), papain( EC 3.4.21.2; from papayas latex, Type IV) 및 pronase E( from *Streptomyces griseus*, Proteinase Type X IV) 등은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였고, Alcalase는 Novo Co. 제품을 사용하였다. Proteinase의 가수분해도 측정을 위한 TNBS( trinitro benzene sulfonic acid)는 日本 東京化學(株) 제품을 사용하였다. 칼슘 흡수 측진을 위하여 사용된 단백질은 Kang et al.(1992)의 방법으로 제조한 가자미피 젤라틴을 사용하였으며, 그 외 사용한 모든 분석 시약은 특급 시약을 사용하였다.

### 굴껍질로부터 칼슘화합물의 조제

굴 가공 후에 폐기된 굴껍질을 회수하여 자연광에서 완전히 건조시킨 후 마쇄하였다. 이를 고온 전기로에서  $1200^\circ\text{C}$ 로 회화시켜 산화칼슘을 얻었다. 이 산화칼슘을 유

발(乳鉢)로 미세하게 분쇄한 후 주사형 전자 현미경(SEM; Jeol, JSM-6100)과 energy dispersive X-ray spectrometer(EDS; Link, QX-2000) 및 X-ray diffractometer(XRD; IKAKU, DMAX-2400)를 이용하여 산화칼슘의 함량과 결정성을 확인하였다.

$\text{CaCl}_2$ 는 앞에서 만든 산화칼슘 5.6 g에 진한 염산 17.75 ml를 가하여 만든 후 건조시켰다. 제조된  $\text{CaCl}_2$ 는 수분의 흡수를 방지하기 위해 진공감압 상태로 보관하였다.

$\text{CaHPO}_4$ 는 앞에서 만든  $\text{CaCl}_2$ 에 같은 당량의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 를 가하여 만들어진 침전을 여과하고, 남은 부분을 탈이온수로 여러 번 세정하여 탈염시킨 후 건조시켰다.

어피 젤라틴의 효소적 가수분해와 가수분해도의 측정 굴껍질로부터 추출한 칼슘화합물들의 체내 흡수를 증진시키는 펩티드를 제조하기 위해 Kim et al.(1997)의 방법으로 제조한 참치 유문수 유래의 가수분해효소(TPCCE)와 시판 효소를 사용하여 다음과 같이 가자미피 젤라틴을 가수분해시켰다. 가자미피 젤라틴을 0.3 g 취하여 1% (w/v)되게 한 후, TPCCE는 pH 10.0, 온도  $50^\circ\text{C}$ , Alcalase는 pH 8.0, 온도  $37^\circ\text{C}$ , 그리고 이를 제외한 나머지 시판 효소 pronase E, papain,  $\alpha$ -chymotrypsin은 모두 pH 7.0, 온도  $37^\circ\text{C}$ 로 조절된 반응액에 효소대 기질비가 1 : 100 (w/w)이 되도록 첨가하여 시간경과에 따른 가수분해도를 측정하였다. 가수분해 반응 후,  $100^\circ\text{C}$ 에서 효소를 불활성화시키고, 추출액은 원심분리(4,650×g, 20 min)하여 각각을 동결 건조한 후, 어피 젤라틴 펩티드(fish skin gelatin peptide; FSGP)의 시료로 사용하였다.

어피 젤라틴의 가수분해도는 Montecalvo(1981)의 방법을 수정하여 사용하였는데, 4%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  용액(pH 8.2) 2 ml에 0.25 ml의 시료를 넣은 후 0.1% TNBS를 2 ml 가하고  $50^\circ\text{C}$ 의 항온조에서 1시간 반응시켰다. 반응이 종료된 후 0.1N HCl을 4 ml 가하여 반응을 종결시키고, 30분 간 방치한 후 340 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 중의 유리  $\alpha$ -아미노 잔기를 측정하였다. 가수분해도는 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{가수분해도}(\%) = \frac{\text{시료 중의 } \alpha\text{-아미노 잔기의 수}}{\text{총 } \alpha\text{-아미노 잔기의 수}} \times 100$$

### 펩티드의 아미노산 조성

펩티드의 아미노산 조성은 다음과 같이 분석하였다. 시료 40 mg을 정평한 후 6N HCl 15 ml를 가하여 진공

밀봉한 다음 24시간 동안 105°C 항온기에서 산 분해하였다. 이 산 분해물을 glass filter로 여과하고 감압 건조 과정을 거치면서 HCl을 완전히 제거한 다음, citrate buffer (pH 2.2)를 이용하여 50 ml가 되도록 한 후 아미노산 자동 분석 장치 (Amino acid analyzer; 626-LC System, Waters Co.)로 분석하였다. 또한 hydroxyproline 정량은 Edwards and O'Brien (1980)의 방법을 사용하여 측정하였다.

*In vitro*에 의한 칼슘 흡수 촉진 효과

*In vitro*에 의한 시간별 칼슘 흡수 촉진 효과에 대한 측정은 Naito (1986)의 방법에 따라 CaHPO<sub>4</sub> (calcium phosphate) 형성에 대한 침전 저지 실험에 의하여 검토하였다. 즉, 칼슘이온은 인산이온과 반응하여 인산칼슘의 형태로 되어 침전된다. 그러나 이러한 침전은 칼슘 흡수 촉진제를 첨가하였을 때 칼슘이온이나 인산이온 중의 어느 한쪽이 칼슘흡수 촉진제와 결합하여 침전형성을 저지하게 된다. 따라서 상층액의 칼슘농도를 측정함으로써 칼슘 흡수 촉진 효과를 검토할 수 있다. 0.2 ml 시료 용액 (40 µg/ml)에 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 ml를 첨가한 후, 20 mM CaCl<sub>2</sub> 0.25 ml를 가하여 37°C에서 0~12시간 동안 반응시키고 원심분리 (1,520×g 5 min)하여 상층액 중의 칼슘 농도를 ICP 분광광도계 (SPS 1200A plasmaspectrometer S II)로 측정하였다.

*In vivo*에 의한 칼슘 흡수 촉진 효과

실험동물

펩티드를 도입한 굴껍질 유래의 칼슘화합물이 칼슘 이용성에 미치는 영향을 생체내에서 검토하기 위하여 체중 115~125 g의 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley rats, male: 서울대학교 실험 동물 사육장에서 구입) 48마리에게 3주간 칼슘결핍 식이 (Ca-deficient diet)를 급여시켜 칼슘결핍을 유도하였고 (basal), 이후 군당 6마리씩 7군의 실험식이군으로 체중에 따라 완전 임의배치하였다. 실험식이군은 대조군 (control; 칼슘 공급원으로 CaCO<sub>3</sub> 제공)을 포함하여 1% 및 3% 펩티드 첨가군, 무첨가군의 7군 (대조군을 제외한 나머지 각 군은 칼슘 공급원으로 굴껍질 유래의 CaCl<sub>2</sub>와 CaHPO<sub>4</sub>로 각각 나누어서 식이 제공)으로 나누어서 3주간 칼슘이 첨가된 실험식이를 제공하였다.

실험 동물은 모두 Shoe-box cage에서 사육하였으며, 사육실의 환경은 일정하게 유지하였다 (온도 22 ± 2°C, 상대 습도 65 ± 5%, 조명 6:00 a.m.-6:00 p.m.). 실험 식이와 탈이온수는 완전 자유급식법 (*ad libitum*)으로 공급하였으며, 실험 기간동안 2일마다 일정한 시각에 식이 섭취량과 체중 증가량을 측정하였다.

실험식이

실험에 사용된 식이는 정제식이로 대체로 AIN-76 조성을 따랐다 (Table 1). 실험식이의 원료로는 질소급원

Table 1. The composition of diets (g/kg)

Ingredients	Basal (Ca deficient)	Control (CaCO <sub>3</sub> )	FSGP					
			Non addition		1%		3%	
			CaCl <sub>2</sub>	CaHPO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	CaHPO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	CaHPO <sub>4</sub>
ISP <sup>1</sup>	200	200	200	200	200	200	200	200
DL-Methionine	3	3	3	3	3	3	3	3
Starch	562.5	550.01	547.65	563.03	537.65	553.03	517.65	533.03
Fiber	50	50	50	50	50	50	50	50
Corn oil	100	100	100	100	100	100	100	100
Min. mix. <sup>2</sup>	35	35	35	35	35	35	35	35
Vit. mix. <sup>3</sup>	10	10	10	10	10	10	10	10
Choline chloride	2	2	2	2	2	2	2	2
PEG #4000	20	20	20	20	20	20	20	20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17.5	17.5	17.5	-	17.5	-	17.5	-
FSGP <sup>4</sup>	-	-	-	-	10	10	30	30
CaCO <sub>3</sub> <sup>5</sup>	-	12.49	-	-	-	-	-	-
CaCl <sub>2</sub> <sup>6</sup>	-	-	14.85	-	14.85	-	14.85	-
CaHPO <sub>4</sub> <sup>7</sup>	-	-	-	16.97	-	16.97	-	16.97

<sup>1</sup> ISP : Isolated soy protein

<sup>2</sup> Calcium-free mineral mixture (AIN-76)

<sup>3</sup> Vitamin mixture (AIN-76)

<sup>4</sup> FSGP : Fish skin gelatin peptides

<sup>5</sup> CaCO<sub>3</sub> (commercial) contained 40.04% Ca

<sup>6</sup> CaCl<sub>2</sub> (calcium from oyster shell) contained 36.11% Ca

<sup>7</sup> CaHPO<sub>4</sub> (calcium from oyster shell) contained 29.46% Ca

으로 대두 단백질 (isolated soy protein, ISP: PP500E, Ralston Purina International Co.), 옥수수 전분 (미원식품 (주)), 옥수수 기름 (동방유량 (주)), 비타민 혼합물 (AIN-76; Oriental 酵母工業 (주), 東京)과 칼슘을 결핍시킨 무기질 혼합물 (AIN-76)이 포함되어 있었다. 칼슘 공급원으로서 시판  $\text{CaCO}_3$ , 굴껍질 유래의  $\text{CaCl}_2$  및  $\text{CaHPO}_4$ 를 사용하였으며, 식이 중 칼슘 함유량은 0.51% 되도록 조정하였고, 식이 중 칼슘과 인의 함량 비는 대략 1.3:1이 되도록  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 사용하여 조정하였다.

시료 수집

실험식이 섭취 후 3주 후에 쥐를 희생하였고, 일정한 식이섭취 조건을 위해 실험동물을 희생시키기 전 하룻밤 절식시킨 후, ether로 마취하여 경동맥혈을 채취하였다. 채취한 혈액은 12시간 동안 냉장고 (4°C)에 방치한 후 원심분리 (850×g, 20 min; Sorvall, GLC-2B)하여 혈청을 얻었다. 혈청은 분석할 때까지 -20°C 이하에서 냉동 보관하였다.

혈액채취 직후, 양쪽 대퇴골에 부착되어 있는 근육, 인대, 지방 등을 전부 제거하고 습중량과 길이를 측정 한 후 뼈의 파단력 (breaking force)을 측정하였으며, 다른 분석을 할 때까지 냉동 보관하였다. 실험 종료전 4일간 매일 동일한 시간에 24시간 동안 수집된 노를 채취하여 부피를 측정하고 냉동 보관하였으며, 동일 기간동안 분을 채취하여 무게를 측정하고 수집된 분을 동결건조 (Freeze-dryer 18, Labconco) 시켜 총 건조량을 측정 한 뒤 분석할 때까지 냉동 보관하였다.

시료 분석

혈중 칼슘농도는 혈청을 해동시킨 후 혈액 자동 분석기 (Fully Automated Dry Chemistry System; ARKRAY, SP-4410; Kyoto Daiichi Kagaku Co. LTD.)를 이용하여 측정하였고, 인의 함량은 인 측정용 Kit (아산제약 (주))를 사용하여 측정하였다.

노는 원심분리 (850×g, 30 min)하여 불순물을 제거한 후, 일정량을 회화시켜 전처리 한 후, 0.2%  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  용액으로 희석하여 원자 흡광 광도계로 측정하였다. 분 및 대퇴골의 칼슘 함량은 550~600°C 회화로에서 6~8시간 동안 회화시켜 얻은 회분을 6N HCl 용액으로 용해한 후 0.2%  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  용액으로 희석하여 원자 흡광 광도계 (AA-6401F, SHIMADZU Co.)로 측정하였다. 대퇴골의 강도는 Instron (Instron Universal Testing Instrument, Model 1011)을 이용하여 대퇴골의 일정 부위 즉, 길이의 중간 부위에서 load range를 20 kg로 하여 100 mm/min의 속도로 뼈의 파단력을 측정하였다.

통계분석

모든 결과는 평균±표준 오차 (mean ± SE)로 제시하였으며, 유의성의 검정은  $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계처리하였다.

결과 및 고찰

굴껍질 유래 칼슘 조제

굴껍질로부터 고온 전기로에서 1200°C로 처리하여 만들어진 산화칼슘 결정의 모양과 함량을 측정한 결과, 산화칼슘의 순도는 98.6%로 매우 높게 나타났으며, 불순물로 산화 규소와 산화 마그네슘 등이 각각 0.9%, 0.5%로 미량 함유되어 있었으며 (Fig. 1), SEM을 이용한 산화칼슘의 표면 조사는 제조된 산화칼슘의 결정성이 아주 우수함을 보여주었다 (Fig. 2). 또한 XRD를 이용하여 비교해 본 결과 1200°C에서 제조된 산화칼슘은 표준 산화칼슘과 완전히 일치함을 보였다 (Fig. 3).

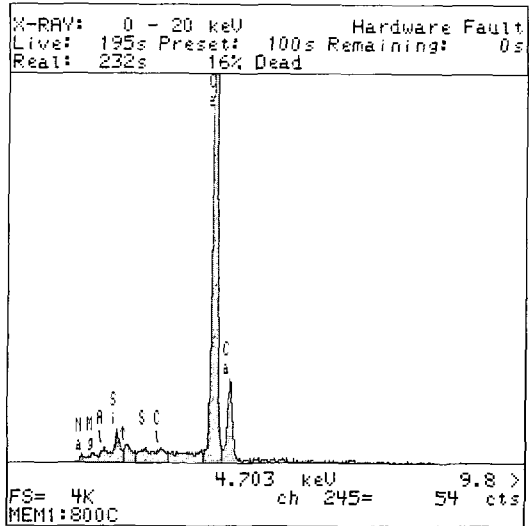


Fig. 1. The EDS analysis of the CaO from oyster shell by treatment of 1200°C.

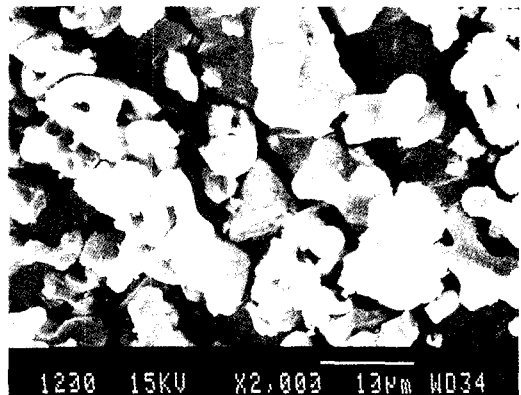


Fig. 2. Scanning electron micrograph of the CaO from oyster shell by treatment of 1200°C.

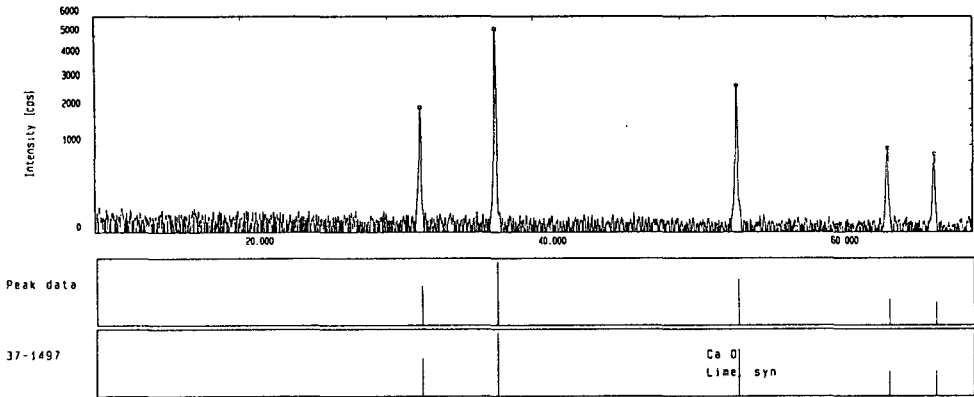


Fig. 3. X-ray diffraction pattern of the CaO from oyster shell by treatment of 1200°C.

현재 천연에서 제조되는 칼슘 공급원은 주로 소의 뼈, 산호, 식용 난·폐각으로부터 얻어지며 (Lee et al., 1992; Okano et al., 1991; 本田眞樹, 1987; Rabon et al., 1990), 굴껍질 유래의 칼슘 공급원도 현재 몇 가지가 알려져 있다 (Greger et al., 1987; Hamilton et al., 1985; Karen and Baker, 1990). 그러나 이러한 칼슘 공급원은 대부분 불용성 상태의 원료를 그대로 이용하므로 사용에 제약이 많다. 최근에는 화학적으로 처리된 칼슘 공급원의 제조가 주목을 받고 있는데, 菅野 (1990)는 가축의 뼈를 산 및 알칼리로 처리하여 단백질이나 다른 불순물을 제거한 후 미세한 입자성과 고순도를 갖는 기능성 소재를 만들어 여러 식품에 대한 첨가 물질로 사용을 검토하였다. 또한 굴껍질 자체를 칼슘 공급원으로 이용할 경우 장내에서 급격한 이온화로 인한 소화장애가 발생하는데, Fujita 등 (1993)은 이를 막기 위해 굴껍질과 유기질 매트릭스를 함께 고온에서 전기 분해시켜 굴껍질 전기 분해물 (oyster shell electrolysate: OSE)을 제조하여 이것을 쥐에게 섭취시켰을 때, 뼈의 무기질 함량이 증가하였다고 보고하였다.

어피 젤라틴의 가수분해도

TPCCE와 시판 효소를 사용하여 가자미피 젤라틴을 기질로 사용한 효소적 가수분해에서, 시간의 변화 (1, 2, 4, 6, 12, 24시간)에 따른 가수분해도를 비교하였다. Fig. 4에 나타난 결과와 같이 TPCCE는 반응시간이 2시간까지 가수분해도가 증가하여 약 38%의 가수분해율을 보였으며, 그 이후 증가 속도는 둔화되어 24시간 분해 후 약 43%에 도달하였다. 시판용 효소의 경우 protease E가 65%로 가장 높은 분해 활성을 보였으며 TPCCE보다도 높았다. 그러나 나머지 시판 효소인 Alcalase, α-chymotrypsin, papain 등은 각각 40%,

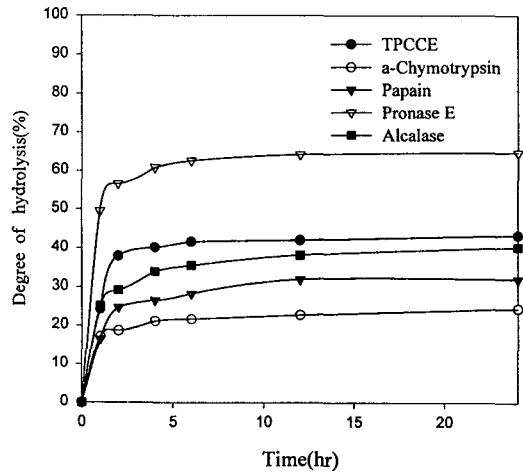


Fig. 4. Degree of enzymatic hydrolysis for fish skin gelatin.

Two ml of 4% phosphate buffer, pH 8.2, was added to 2 ml of 0.1% TNBS and 0.2 ml of each peptide. Then it was incubated in 50°C for 1 hr. The reaction was terminated by adding 4 ml of 1 M HCl. After 30 min, α-Amino residue of each peptide was measured at 340 nm.

24%, 32%로 TPCCE보다는 활성이 낮은 것으로 나타났다. 여기서 주목할 만한 사실은 참치 유문수에서 직접 추출하여 사용한 TPCCE는 부분 정제된 조효소 상태로 사용되었음에도 불구하고 시판 단백질 분해효소와 비교해도 전혀 손색이 없었다는 것이다. 이러한 결과는 어류에서 유래한 단백질을 가수분해하는 데에는 어류에서 유래한 단백질 분해효소가 보다 효율적이라는 사실을 암시해 주고 있다 (Ooshiro, 1971; Ramakrishna et al., 1987).

어피 젤라틴에 대한 효소 반응은 4시간 반응에서 충분히 가수분해 될 것으로 판단되어 각각의 가수분해는 4시간 동안 실시하였으며, 이 때 얻어진 펩티드들은 칼슘흡수에 미치는 효과를 조사하기 위한 시료로 사용하였다.

#### 어피 젤라틴 펩티드 (FSGP)의 아미노산 조성

FSGP의 아미노산 조성은 Table 2와 같다. Glu, Gly, Ala, Pro, Hyp의 함유량은 각각 9.53, 25.74, 8.76, 9.84, 11.01%으로 전체 아미노산 함량의 64.88%를 차지하였으며, collagen 유래의 Hyp를 많이 함유하고 있었다. Asp, Glu과 같은 산성 아미노산의 함량은 15.55%였으며, Arg, Lys과 같은 염기성 아미노산의 함량은 11.12%로 나타났으며, 이는 Kang et al. (1992)이 보고한 가자미피 젤라틴의 아미노산 분석과 유사한 결과를 나타내었다.

아미노산들 중 칼슘의 흡수에 관여하는 아미노산으로는 산성 아미노산과 염기성 아미노산을 들 수 있다. 보통 산성 아미노산은 칼슘과 쉽게 이온결합을 형성하는데, Yamamoto et al. (1994)에 의하면 Glu가 여러 개 중합된 oligo- 및 poly-Glu가 *in vitro* 실험에서  $\text{CaHPO}_4$ 의 형성을 저지하는데 뛰어난 효과를 나타낸다고 보고하였다.

또한 Arg, Lys 같은 염기성 아미노산도 칼슘과 킬레이트 결합하여 칼슘의 흡수를 촉진시키는 것으로 알려져

있다. Dupuis et al. (1981)은 Lys이 소장내 막단백질과 ATP를 사용하여 경쟁적으로 인산화되는데, 만일 Lys의 농도가 경쟁적으로 증가하게 되면 막단백질의 인산화를 저해하여 소장 상피 세포에서의 칼슘 흡수를 증가시킨다고 보고하였다. 한편, Wasserman et al. (1956)은 쥐에게 방사선 동위원소인  $^{45}\text{Ca}$ 를 사용하여 각종 아미노산에 대한 흡수 효과를 검토한 결과, L-Lys과 L-Arg이 높은 효과를 나타내었다고 보고하였다.

그러므로 Table 2에서도 잘 나타났 듯이 어피 젤라틴 펩티드는 산성 아미노산과 염기성 아미노산을 다량 함유하고 있어, 굴껍질 유래 칼슘 공급원에 대한 칼슘 흡수 촉진제로서의 가능성을 보여주었다.

#### *In vitro*에 의한 칼슘 흡수 촉진 효과

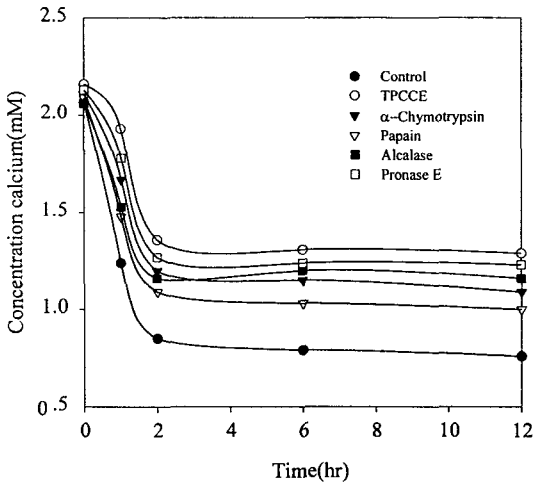
일반적으로 체내에 섭취된 칼슘은 장관에서 흡수되는 단계를 거쳐야 한다. 이렇게 섭취된 칼슘은 위산에 의해 가용화되어 소장 하부로 이동하는데, 이 때 가용성 칼슘은 소장 내부에 존재하는 인산이온과 결합하여 침전을 형성한다 (Kitts and Yuan, 1992). 따라서 칼슘이 소장 부위에서 침전되지 않고 체내로 흡수되기 위해서는 칼슘과 결합할 수 있는 물질이 필요하다. 어피 젤라틴 펩티드의 아미노산 조성을 보면 산성 아미노산과 염기성 아미노산의 조성이 각각 전체의 15.55% 및 11.12%를 차지하고 있어 칼슘 흡수를 촉진시키는 효과가 기대되었기에, 이에 대해 *in vitro*에서  $\text{CaHPO}_4$  침전 저지 실험으로 그 효과를 검토하였다. 즉 20 mM의  $\text{CaCl}_2$  0.25 ml에 각종 단백질 분해효소로 어피 젤라틴을 가수분해시켜 만든 펩티드를 첨가한 후 20 mM의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 ml를 첨가하여 0~12시간 후 원심분리하여 칼슘 농도를 ICP로 분석한 결과 TPCCE로 4시간 가수분해시킨 펩티드를 첨가하였을 때 가장 뛰어난 효과를 나타내었다 (Fig. 5). 상층액의 칼슘 농도가 2시간 까지 급격하게 감소한 것으로 보아 인산칼슘 형성에 소요되는 반응시간은 2시간인 것으로 나타났다. 그 이후 12시간 까지 반응시간이 경과하여도 칼슘의 농도는 거의 변화가 없었다. 시판 효소보다는 참치 유문수로부터 추출한 TPCCE를 사용하였을 때가 특히 높은 효과를 보였는데, 이것은 무첨가시보다 약 70%의 증가 효과를 보였다. 따라서 이러한 결과로 볼 때 어피 젤라틴은 적당한 크기로 분해되었을 때 칼슘 흡수 효과가 높은 것으로 보인다.

#### *In vivo*에 의한 칼슘 흡수 촉진 효과

체중 증가량, 식이 섭취량 및 식이 효율  
3주간의 결핍 식이를 제공한 후 실험 식이를 급여했을

Table 2. The amino acid composition of fish skin gelatin peptides (FSGP)

Amino acid	FSGP (g-AA/100g-protein)
Aspartic acid	6.02
Glutamic acid	9.53
Serine	5.61
Glycine	25.74
Histidine	0.00
Arginine	7.41
Threonine	2.26
Alanine	8.76
Proline	9.84
Tyrosine	0.51
Valine	2.01
Tryptophan	0.00
Methionine	1.97
Cysteine	0.00
Isoleucine	1.15
Leucine	2.33
Phenylalanine	2.14
Lysine	3.71
Hydroxyproline	11.01
Total amino acid	100.00



**Fig. 5. Calcium absorption effects of the peptides prepared by enzymatic hydrolysis of the fish skin gelatin for 4 hr with various enzymes.** One ml of 20 mM  $PO_4^{3-}$  was added to a mixture of 0.25 ml 20 mM  $Ca^{2+}$  and 40 mg each peptide at pH 7.0.

때 이에 따른 체중 증가량과 1일 식이 섭취량 및 식이 효율은 Table 3과 같다.

실험 종료시 체중 증가량과 식이 섭취량 및 식이 효율은 1% 어피 젤라틴 펩티드 (TPCCE로 어피 젤라틴을 4시간 가수분해시켜 얻어진 펩티드)를 첨가한 식이를 섭취시킨 군들이 대조군인  $CaCO_3$  섭취군에 비해 유의적으로 낮았으며, 그 외 나머지 군들은 대체로 큰 차이를 나타내지 않았다. 이는 칼슘이 결핍되면 체내에서의 칼슘 요구도가 높아져 흡수율이 높아지기 때문인 것으로 판단된다. Kobayashi et al. (1987)과 Tsugawa et al. (1995)은  $CaCO_3$ ,  $CaHPO_4$  및 여러 가지 칼슘화합물을 쥐에게 섭취시켰을 때 체중 증가에는 큰 영향을 주지 않았다고

보고하였다. 그러나 岡野 등 (1996)은 칼슘 공급원으로 소뼈 분말을 섭취시켰을 때 높은 체중의 증가가 발생했다고 보고하였다. 굳겉질 유래의 칼슘화합물인  $CaCl_2$ 와  $CaHPO_4$  만을 섭취시킨 경우 대조군과는 거의 차이가 없음을 보였지만,  $CaCl_2$  보다는  $CaHPO_4$ 가 약간 더 높은 효과를 보였다.

**혈중 칼슘 및 인의 농도**

혈중 칼슘과 인의 농도는 Table 4에 나타난 것과 같다. 어피 젤라틴 펩티드를 칼슘 흡수 촉진제로 첨가한 실험에서 혈중 칼슘의 농도는 전부 정상 수준 (9~11 mg/ml)을 나타내었으며, Stauffer et al. (1973)은 칼슘을 결핍시킨 수컷 쥐에서 혈청의 칼슘 농도가 감소하였다고 보고하였다. Ezawa and Fusako (1983)는 난소를 절제하여 골다공증이 유발된 암컷 쥐를 대상으로 한 실험에서 칼슘 결핍 식이를 제공하면 혈액 중의 칼슘 농도는 저하하지만, 다시 정상 식이를 공급하면 모두 정상 수준의 칼슘 농도를 나타낸다고 보고하였다.

**Table 4. Effect of semi-synthetic diets on serum Ca and P levels in calcium deficient diet induced rats**

	Ca (mg/100 ml)	P (mg/100 ml)
Ca-Deficient	9.62 ± 0.17	9.78 ± 0.13
Control	10.57 ± 0.19 <sup>ab,1</sup>	7.50 ± 0.29 <sup>bc</sup>
$CaCl_2$	10.78 ± 0.19 <sup>ab</sup>	8.85 ± 0.44 <sup>a</sup>
$CaHPO_4$	10.72 ± 0.05 <sup>ab</sup>	8.41 ± 0.25 <sup>abc</sup>
$CaCl_2$ +FGH (1%)	11.02 ± 0.11 <sup>a</sup>	8.31 ± 0.53 <sup>abc</sup>
$CaHPO_4$ +FGH (1%)	10.45 ± 0.19 <sup>b</sup>	8.64 ± 0.39 <sup>ab</sup>
$CaCl_2$ +FGH (3%)	10.73 ± 0.24 <sup>ab</sup>	7.47 ± 0.52 <sup>bc</sup>
$CaHPO_4$ +FGH (3%)	10.63 ± 0.10 <sup>ab</sup>	7.27 ± 0.33 <sup>c</sup>

Values are mean ± SE for 6 rats

<sup>1</sup> Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test

**Table 3. Effect of the addition of fish skin gelatin peptides (FSGP) on body weight, food intake, and food efficiency ratio in calcium deficient induced rats**

	Final body weight (g)	Daily food intake (g)	Daily weight gain (g)	FER <sup>2</sup>
Ca-Deficient	195.0 ± 6.25	15.78 ± 0.25	3.79 ± 0.20	0.24 ± 0.15
Control	333.1 ± 7.55 <sup>a,1</sup>	18.14 ± 0.65 <sup>bc</sup>	7.05 ± 0.35 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.02 <sup>a</sup>
$CaCl_2$	323.6 ± 4.84 <sup>ab</sup>	19.34 ± 0.52 <sup>ab</sup>	6.30 ± 0.27 <sup>ab</sup>	0.33 ± 0.01 <sup>ab</sup>
$CaHPO_4$	336.1 ± 8.68 <sup>a</sup>	18.79 ± 0.30 <sup>bc</sup>	6.85 ± 0.35 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.02 <sup>a</sup>
$CaCl_2$ +FGH (1%)	292.9 ± 9.92 <sup>bc</sup>	17.83 ± 0.41 <sup>cd</sup>	4.93 ± 0.43 <sup>bc</sup>	0.28 ± 0.02 <sup>b</sup>
$CaHPO_4$ +FGH (1%)	287.5 ± 12.59 <sup>c</sup>	16.56 ± 0.45 <sup>d</sup>	4.64 ± 0.69 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.03 <sup>b</sup>
$CaCl_2$ +FGH (3%)	323.4 ± 8.19 <sup>ab</sup>	18.69 ± 0.54 <sup>bc</sup>	6.34 ± 0.43 <sup>ab</sup>	0.34 ± 0.02 <sup>ab</sup>
$CaHPO_4$ +FGH (3%)	348.2 ± 18.47 <sup>a</sup>	20.40 ± 0.23 <sup>a</sup>	7.47 ± 0.67 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.03 <sup>a</sup>

Values are mean ± SE for 6 rats

<sup>1</sup> Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test

<sup>2</sup> Food efficiency ratio (FER) : weight gain (g)/food intake (g)

또 혈중 인의 농도는 펩티드를 첨가하지 않은 군이 높게 나타났다. 일반적으로 혈중 칼슘 농도에는 인이 관여하여, 혈중 인 농도가 높으면 칼슘과 결합하여  $\text{CaHPO}_4$ 의 형태로 배출되고, 혈중 칼슘의 농도가 낮으면 뼈에서 칼슘의 재흡수가 일어나 체내 항상성을 유지한다(松本, 1984). Table 4에서 보면 굴껍질 유래 칼슘화합물과 거기에 1%의 펩티드를 첨가한 군들은 체내 칼슘 뿐만 아니라 인 농도도 높았기 때문에 큰 효과를 나타내지는 않았지만, 3% 펩티드 첨가군은 대조군에 비해 칼슘 농도는 높고, 인 농도는 낮은 것으로 나타나 혈중 칼슘 농도를 높이는 데 효과적인 것으로 나타났다.

#### 대퇴골의 무게, 길이 및 강도

대퇴골의 무게와 길이 및 강도는 Table 5에 나타난 바와 같다. 대퇴골의 무게는 1% 어피 젤라틴 펩티드 섭취군을 제외한 나머지 군에서는 대조군과 비교하였을 때 유의적인 차는 없었지만 약간 증가함을 보였다. 또한 칼슘 공급원별로 보았을 때 굴껍질 유래 칼슘화합물을 섭취시킨 군들이 약간 높은 것으로 나타났다. 특히, 무첨가군의 경우  $\text{CaCl}_2$ 와  $\text{CaHPO}_4$ 를 섭취시킨 군은 대조군에 비해 각각 7.6%와 10.4%의 높은 대퇴골 무게 증가율을 나타내었다. 또한 대퇴골의 강도에 있어서는 유의적인 차가 없었지만 대체로 대조군보다도 약간 높은 경향을 나타내었으며, 칼슘 공급원으로는  $\text{CaCl}_2$ 보다  $\text{CaHPO}_4$  형태가 더 우수한 것으로 나타났다. 일반적으로 뼈의 주 성분은  $\text{CaHPO}_4$  염(hydroxyapatite,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$ )의 형태이므로, 뼈에 침착될 때  $\text{CaHPO}_4$  형태의 화합물이 더 유리할 것이라 생각된다(Armstrong and Singer, 1965).

Igarashi et al. (1990)은 골다공증 모델 쥐를 대상으로 한 실험에서 유청 단백질 유래의 칼슘을 섭취시킨 쥐들의 골밀도가 대조군인  $\text{CaCO}_3$  군들에 비해 유의적으로

증가하였다고 보고하였다. O and Lee (1993)도 동일 모델을 이용한 실험에서 난소 절제와 저칼슘 섭취로 유발된 골다공증의 경우, 칼슘 섭취량을 높임으로서 뼈의 손실이 억제되고 및 강도가 증가된다고 보고하였다. 그러나 Lee et al. (1992)은 성장기의 쥐에게 CPP(casein phosphopeptide)와 같은 펩티드를 섭취시켰을 경우 대퇴골 무게와 칼슘 함량은 증가시켰지만 대퇴골 강도는 증가시키지 못했다고 보고하였다.

본 연구 결과에서는 굴껍질 유래 산화칼슘으로 만든  $\text{CaHPO}_4$ 나  $\text{CaCl}_2$ 의 이용가능성이 확인되었으며, 특히 어피 젤라틴 펩티드를 3% 첨가함으로써 대퇴골 강도가 대조군보다 약 12.4% 증가함을 보였다.

#### 대퇴골의 무기질 함량

대퇴골의 회분, 칼슘 및 인의 양은 Table 6에 나타내었다. 굴껍질 유래 칼슘화합물을 섭취시킨 군들의 대퇴골내 회분 및 무기질 함량은 대조군에 비해 유의적인 차이를 나타내지 않았지만, 이들 군은 대체로 대조군 보다 는 다소 높거나 비슷한 효과를 나타내었다.

모든 항목에서 1% 펩티드 첨가군을 제외하고는 앞서와 마찬가지로 유의적인 차이는 나타내지 않았으나, 3% 첨가군이 높은 것으로 나타났다. 특히 3% 어피 젤라틴 펩티드를 칼슘 흡수 촉진제로 사용하고 칼슘 공급원으로  $\text{CaCl}_2$ 와  $\text{CaHPO}_4$ 를 섭취시켰을 때에는 대조군에 비해 대퇴골내 칼슘량이 각각 9.1%와 7.1% 증가하였다.

Omi et al. (1992)은 골다공증 쥐에 글로빈 분말과  $\text{CaCO}_3$ 을 각각 섭취시켰을 때 대퇴골의 칼슘 함량과 회분량, 경골의 골밀도가 글로빈 분말 쪽이 유의적으로 높게 증가하였고, 아미노산이나 펩티드 또는 단백질 등의 성분이 뼈의 무기질 성분의 증가에 상승 작용을 나타낸다고 하였다. Okano et al. (1991)은  $\text{CaCO}_3$ 와 소뼈 분말을 칼슘공급원으로 사용했을 때, 소뼈 분말은 대퇴골내 칼슘

**Table 5. Effect of the addition of fish skin gelatin peptides (FSGP) on wet weight, length, and breaking force of femur deficient induced rats**

	Weight (g)	Length (mm)	Breaking force (kg)
Ca-Deficient	0.90 ± 0.03	29.75 ± 0.39	2.58 ± 0.60
Control	1.43 ± 0.08 <sup>ab,1</sup>	34.56 ± 0.39 <sup>NS,2</sup>	8.48 ± 0.48 <sup>NS</sup>
$\text{CaCl}_2$	1.58 ± 0.03 <sup>a</sup>	35.04 ± 0.26	8.80 ± 0.54
$\text{CaHPO}_4$	1.54 ± 0.06 <sup>a</sup>	34.66 ± 0.51	9.25 ± 0.49
$\text{CaCl}_2$ + FGH (1%)	1.37 ± 0.03 <sup>b</sup>	34.39 ± 0.36	8.78 ± 0.70
$\text{CaHPO}_4$ + FGH (1%)	1.35 ± 0.04 <sup>b</sup>	34.21 ± 0.41	9.41 ± 0.79
$\text{CaCl}_2$ + FGH (3%)	1.52 ± 0.04 <sup>a</sup>	34.72 ± 0.30	8.60 ± 0.55
$\text{CaHPO}_4$ + FGH (3%)	1.58 ± 0.05 <sup>a</sup>	35.00 ± 0.20	9.53 ± 0.64

Values are mean ± SE of 6 rats per group

<sup>1</sup> Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test

<sup>2</sup> Not significantly different at the 0.05 level



**Table 6. Effect of fish skin gelatin peptides on the Ca and P contents of femur in calcium deficient diet induced rats**

	Ash (mg)	Ca (mg)	P (mg)	Ca : P	Ca % (Ca/Ash×100)
Ca-Deficient	102.50 ± 2.61	29.03 ± 1.07	17.44 ± 0.79	1.67 ± 0.07	28.27 ± 0.34
Control	268.75 ± 10.24 <sup>NS,1</sup>	92.93 ± 4.452 <sup>ab,2</sup>	46.60 ± 2.13 <sup>a</sup>	2.00 ± 0.08 <sup>NS</sup>	34.52 ± 0.50 <sup>bc</sup>
CaCl <sub>2</sub>	255.33 ± 4.73	89.41 ± 2.35 <sup>bc</sup>	43.65 ± 1.27 <sup>ab</sup>	2.06 ± 0.09	35.07 ± 1.05 <sup>bc</sup>
CaHPO <sub>4</sub>	267.97 ± 6.25	92.29 ± 1.85 <sup>abc</sup>	45.94 ± 1.42 <sup>a</sup>	2.02 ± 0.04	34.46 ± 0.26 <sup>bc</sup>
CaCl <sub>2</sub> +FGH (1%)	253.95 ± 9.05	84.48 ± 3.37 <sup>c</sup>	40.05 ± 1.49 <sup>b</sup>	2.11 ± 0.06	33.28 ± 1.04 <sup>c</sup>
CaHPO <sub>4</sub> +FGH (1%)	256.58 ± 8.93	86.85 ± 2.90 <sup>c</sup>	42.50 ± 1.89 <sup>ab</sup>	2.05 ± 0.04	33.87 ± 0.44 <sup>c</sup>
CaCl <sub>2</sub> +FGH (3%)	270.50 ± 11.70	101.39 ± 5.25 <sup>a</sup>	46.64 ± 2.23 <sup>a</sup>	2.18 ± 0.04	37.44 ± 0.69 <sup>a</sup>
CaHPO <sub>4</sub> +FGH (3%)	272.22 ± 10.91	99.54 ± 4.32 <sup>ab</sup>	46.05 ± 2.30 <sup>a</sup>	2.17 ± 0.05	36.57 ± 0.71 <sup>ab</sup>

Values are mean ± SE of 6 rats per group

<sup>1</sup> Not significantly different at the 0.05 level

<sup>2</sup> Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test

농도와 인 농도를 유의적으로 증가시켰다고 보고하였다.

**노와 분 중의 칼슘 배설량**

대사 실험 기간동안 노와 분을 통한 1일 칼슘 배설량을 측정한 결과는 Table 7에 나타낸 것과 같이 칼슘을 결핍시킨 군에서는 분과 뇨중 배출량이 매우 크게 감소되어 있는 것을 알 수 있다. 분 중 칼슘의 감소는 식이중 칼슘의 부족으로 인한 것이고, 뇨중 칼슘의 감소는 식이중 칼슘 부족으로 인한 칼슘 결핍을 최소화하기 위해 재흡수가 촉진되었기 때문이다. 전체적인 실험에서는 뇨를 통한 1일 배출량은 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. O and Lee (1993)와 Lee and O (1995)는 골다공증 모델을 대상으로 여러 가지 칼슘원을 섭취시켰을 때 단백질원은 뇨중 칼슘 배설량에 영향을 미치지만, 칼슘 공급원은 뇨중 배설량에 유의적인 차이를 나타내지 않았다고 보고하였다. 일반적으로 체내로 흡수된 칼슘의 배출에 영향을 미치는 것은 신장(kidney)인데, 신장은 하루에 약 10,000 mg의 칼슘을 사구체를 통해 여과시키고 이중 약 2%인 200 mg 만을 체외로 배설한다 (Kumar, 1995). 그러므로 칼슘 공급원에 따른 칼슘 배설량의 차이는 크지 않을 것이다.

그러나 분을 통한 배출은 굴껍질 유래 칼슘화합물을 섭취시킨 군들이 전체적으로 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. 먼저 무첨가군을 살펴보면, CaCl<sub>2</sub>와 CaHPO<sub>4</sub>는 대조군에 비해 각각 47.3%와 50.1% 만을 나타내어 배출량이 절반 정도밖에 되지 않았다. 이것으로 볼 때 소장에서 많은 흡수가 일어났으며, 굴껍질 유래의 칼슘화합물이 체내에서 유용하게 이용되고 있음을 알 수 있었다. 또한 대조군과 비교했을 때 전체적으로 CaCl<sub>2</sub>를 섭취시킨 군들이 CaHPO<sub>4</sub>를 섭취시킨 군들에 비하여 적은 양의 칼슘을 배출하였는데, 이는 장내에서 해리되는

**Table 7. Daily fecal and urinary Ca excretion in calcium deficient model rats fed experimental diets**

	Fecal excretion (mg/d)	Urinary excretion (mg/d)
Ca-Deficient	14.16 ± 1.75	0.13 ± 0.01
Control	64.10 ± 2.12 <sup>a,1</sup>	0.89 ± 0.65 <sup>NS,2</sup>
CaCl <sub>2</sub>	30.41 ± 3.31 <sup>b</sup>	1.37 ± 0.66
CaHPO <sub>4</sub>	32.13 ± 5.84 <sup>b</sup>	1.53 ± 1.18
CaCl <sub>2</sub> +FGH (1%)	29.44 ± 6.07 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.11
CaHPO <sub>4</sub> +FGH (1%)	35.87 ± 6.90 <sup>b</sup>	0.80 ± 0.04
CaCl <sub>2</sub> +FGH (3%)	29.89 ± 3.08 <sup>b</sup>	1.76 ± 0.70
CaHPO <sub>4</sub> +FGH (3%)	38.78 ± 2.39 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.30

Values are mean ± SE for 6 rats

<sup>1</sup> Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test

<sup>2</sup> Not significantly different at the 0.05 level

정도가 CaHPO<sub>4</sub>에 비하여 매우 높기 때문이다. 그러나 CaCl<sub>2</sub>는 높은 해리도로 인해 위장(胃腸)장애를 일으킬 수도 있다고 보고된 적 있다(岡野, 1996).

Lee et al. (1992)에 의하면 CPP 첨가군이 분 중 칼슘 배출량이 감소하였다고 하였다. 이렇게 분 중 칼슘 배설량이 칼슘 공급원에 따라 차이가 나는 것은 장내에서의 칼슘 흡수가 촉진되어 장내 불용성 칼슘염의 형성이 감소했기 때문일 것이다 (Allen and Wood, 1994).

**요 약**

매년 막대한 양이 폐기되어져 환경오염 문제를 유발시키는 굴껍질에 다량 함유되어 있는 칼슘 성분을 체내 칼슘 공급원으로 이용하기 위하여 굴껍질을 1200°C로 소성 가공시켜 98.6%의 수율로 산화칼슘을 만들었고,

이로부터  $\text{CaCl}_2$ 과  $\text{CaHPO}_4$  등과 같은 칼슘화합물을 제조하였다.

여러 가지 효소로 가수분해시켜 얻은 어피 젤라틴 유래 펩티드를 굴껍질 유래 칼슘화합물들에 대한 칼슘 흡수 촉진제로 사용하였는데, *in vitro* 실험 결과 참치 유문수 유래 조효소인 TPCCE를 사용하여 4시간 동안 가수분해시켜 얻은 어피 젤라틴 펩티드가 가장 뛰어난  $\text{CaHPO}_4$  침전 저지 효과를 나타내었으며, 무첨가와 비교했을 때 70%의 상승 효과를 나타내었다.

이상의 결과들을 바탕으로 칼슘을 결핍시킨 수컷 흰쥐 (SD-Dawley male rats)를 이용하여 *in vivo*에서 칼슘 흡수 촉진 실험을 실시한 결과, 칼슘 흡수 촉진제로 어피 젤라틴 펩티드가 첨가된 굴껍질 유래 칼슘화합물을 섭취시킨 군들은 대조군에 비해 유의적으로 높은 칼슘 및 회분량을 나타내었으며, 1%보다는 3%의 펩티드를 섭취시킨 군들이 좋은 것으로 나타났다. 또한  $\text{CaCl}_2$  섭취군 보다는  $\text{CaHPO}_4$  섭취군들에게서 더 뛰어난 촉진 효과를 볼 수 있었다. 또한 분으로의 칼슘 배출은 대조군의 약 50% 이하로 나타나는 것으로 보아 소장내 불용화 칼슘의 형성에 매우 뛰어난 효과를 갖는 것으로 나타났다.

## 감사의 글

이 논문은 1995년도 농림수산특정연구사업과제 중 현장에로기술개발사업의 연구비 지원으로 수행된 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Alder-Nissen, J. 1986. Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Allen, L.H. and R.J. Wood. 1994. Calcium and Phosphorus. In Shils M.E., J.A. Olson, M. Shike eds. In *Modern Nutrition in Health and Disease*. 8th. ed., 144~163, Lea & Febiger.
- Armstrong, W.D., L. Singer. 1965. Composition and constitution of the mineral phase of bone. Clin. Orth. Rel. Res., 38, 179~190.
- Dupuis, Y., G. Crouzoulon and P. Fournier. 1981 Does the inhibition of microvillus protein phosphorylation by lysine explain the activity of the latter on calcium transfer?. International. J. of Biochem., 13, 1163~1170.
- Edwards, C.A. and W.D. O'Brien Jr. 1980. Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolysate. Clin. Chim. Acta, 104 (2), 161~167.
- Einhorn, T.A., B. Levine and P. Michel. 1990. Nutrition and bone. Ortho. Clin. Nor. Am., 21, 43~50.
- Ezawa, I. and A. Fusako. 1983. The effect of cow-bone-power on osteopenia of rat model of postmenpausal osteoporosis. Jap. J. Home Econ., 34, 555~559 (in Japanese).
- Fujita, T., Y. Fujii, R. Kitagawa and M. Fukase. 1993. Calcium supplementation in Osteoporosis. Osteoporosis International., Suppl.1, S159~162.
- Greger, J.L., C.E. Krzykowsky R.R. Khazen and C.L. Krashoc. 1987. Mineral utilization by rats fed various commercially available calcium supplements or milk. J. Nutr., 117, 717~724.
- Hamilton, R.M.G., R.W. Fairfull and R.S. Gowe. 1985. Use of particulate limestone or oyster shell in the dietary regimen of white leghorn hens. Poultry Science, 64, 1750~1762.
- Hirotsuka, M., H. Taniguchi, H. Narita and M. Kito, 1984. Functionality and digestibility of a highly phosphorylated soybean protein. Agric. Biol. Chem., 48 (1), 93~100.
- Igarashi, C., I. Ezawa and E. Ogata. 1990. Effect of whey calcium on bone metabolism in ovariectomized osteoporpsis model rats. J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci., 43 (6), 437~443 (in Japanese).
- Jeon, Y.J and S.K. Kim. 1997. Antitumor, antibacterial and calcium absorption accelelation effects of chitosan oligosaccharides prepared by using ultrafiltration membrane enzyme reactor. Kor. J. Chitin and Chitosan, 2 (3), 60~78 (in Korean).
- Kang, T.J., Y.J. Jeon, S.K. Kim and D.J. Song. 1992. Investigation of pretreatment method for gelatin preparation from flounder skin. Bull. Kor. Fisheries Soc., 25 (2), 93~102 (in Korean).
- Karen, J.W. and D.H. Baker. 1990. Manganese utilization in chicks as affected by excess calcium and phosphorus ingestion. Poultry Science, 69, 977~984.
- Kim, S.K., Jeon, Y.J., H.G. Byeun, Y.T. Kim, and C.K. Lee. 1997. Enzymatic recovery of cod frame proteinase from tuna pyloric caeca. Fisheries Science, 63 (3), 421~427.
- Kitts, D.D. and Y.V. Yuan. 1992. Caseinphosphopeptides and calcium bioavailability. Trends in food Sci. & Technol., 3 (2), 31~35.
- Kobayashi, T., T. Okano, S. Masuda, A. Takeuchi and N. Tsugawa. 1987. Effect of three kinds of calcium compounds with regard to their bioavailability as calcium sources. J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci., 40 (4), 293~298 (in Japanese).
- Kumar, R. 1995. Calcium transport in epithelial cells of the intestine and kidney. J. Cell. Biochem., 57, 392~398.
- Lee, Y.S., G. Park and H. Naito. 1992. Supplemental effect of casein phosphopeptides (CPP) on the calcium balance of growing rats. J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci., 45 (4), 333~338 (in Japanese).

- Lee, Y.S., J.H. Park, J.H. O and C.W. Cho. 1992. Effect of bovine bone powder as a dietary calcium source on mineral bioavailability in rats. *Kor. J. Rural Living Sci.*, 3, 27~26 (in Korean).
- Lee, Y.S., T. Noguchi and H. Naito. 1980. Phosphopeptides and soluble calcium in the small intestine of rats given a casein diet. *Br. J. Nutr.*, 43, 457~467.
- Lee, Y.S., T. Noguchi and H. Naito. 1983. Intestinal absorption of calcium in rats given diet containing casein or amino acid compounds mixture; the role of casein phosphopeptides. *Br. J. Nutr.*, 49, 67~76.
- Lee, Y.S. and J.H. O. 1995. Effect of bovine bone ash and calcium phosphate on calcium metabolism in postmenopausal osteoporosis model rats. *Kor. J. Nutr.*, 28 (5), 434~441 (in Korean).
- McCaren, D.A. 1997. Role of adequate dietary calcium intake in the prevention and management of salt-selective hypertension. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65 (suppl), 712s~716s.
- Montecalvo, J. Jr. 1981. Protein isolates and enzymatically modified proteins from the frame portion of solid fish waste, UMI. 79~81
- Naito, H. 1986. The mechanism of enhancement in intestinal calcium absorption with phosphopeptides derived during casein digestion. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 39 (6), 433~439. (in Japanese)
- O, J.H. and Y.S. Lee. 1993. Effects of dietary calcium levels on the reduction of calcium availability in ovariectomized osteoporosis model rats. *Kor. J. Nutr.*, 26 (3), 277~285 (in Korean).
- Okano, T., N. Tsugawa, R. Higashino, T. Kobayashi, C. Igarashi and I. Ezawa. 1991. Effect of bovine bone powder and calcium carbonate as a dietary calcium source on plasma and bone calcium metabolism in rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 44 (6), 479~485 (in Japanese).
- Omi, N., N. Morikawa, A. Hoshina and I. Ezawa. 1992. Effect of glovin powder on bone mineral density in model rats with postmenopausal osteoporosis rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 45 (3), 271~276 (in Japanese).
- Ooshiro, Z. 1971. Studies on proteinase in the pyloric caeca of fishes ; I. Some properties of proteinase purified from the pyloric caeca of mackerel. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 37, 145~152 (in Japanese).
- Rabon, H. W., D.A. Roland, M. Bryant, D.G. Barnes and S. M. Laurent. 1990. Influence of sodium zeolite a with and without pullet-sized limestone or oyster shell on eggshell quality. *Poultry Science*, 70, 1943~1947.
- Ramakrishna, M., H.O. Hultin and M.T. Atallah. 1987. A comparison of dogfish and bovine chymotrypsin in relation to protein hydrolysis. *J. Food Sci.*, 52, 1198~1204.
- Scalmati, A., M. Lipkin and H. Newmark. 1992. Calcium, Vitamin D, and Colon cancer. In : Chernoff, R, R.P. Heaney ed. : *Clinics in Applied Nutrition*, Andover Med., 67~74.
- Seguro, K. and M. Motoki. 1990. Functional properties of enzymatically phosphorylated soybean proteins. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1271~1276.
- Stauffer, M., D. Baylink, J. Wergedal and C. Rich. 1973. Decreased bone formation, mineralization and enhanced resorption in calcium-deficient rats. *Am. J. Physiol.*, 225, 269~276.
- Tsugawa, N., T. Okano, R. Higashino, T. Kimura, Y. Oshio, Y. Teraoka, C. Igarashi, I. Ezawa and T. Kobayashi. 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 (5), 677~682.
- Wasserman, R.H., C.L. Comar and M.M. Nold. 1956. The influence of amino acids and other organic compounds on the gastrointestinal absorption of calcium and strontium in the rat. *J. Nutr.*, 59, 371~383.
- Yamamoto, K., H. Kumagai, A. Suzaki and S. Arai. 1994. Physicochemical study of calcium-binding properties of chemical substances as inhibitors against calcium phosphate insolubilization. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 2207~2211.
- 수산연감, 1996.
- 岡野 登志夫. 1996. 食品カルシウムとその利用効率. 月刊フドケミル, (1), 43~48.
- 菅野三郎 (1990) : 骨の食化利用, 月刊フドケミル. (7), 69~73.
- 本田眞樹. 1987. 新しい天然CaとCa吸収促進劑と開發. 食品と開發, 24 (8), 46~51.
- 松本武佳. 1984. ミネラルの重要性和健康食品への利用. ジャパドサイエンス, (1), 49~54.
- 伊藤 不二夫. 1995. 骨粗 症に對する補助食品キトサンの役割. 月刊フドケミカル, (2), 39~44.

1997년 11월 20일 접수

1998년 3월 3일 수리