

## 납두 발효과정 중 Angiotensin Converting Enzyme 저해물질의 생성 및 분리

조영제<sup>†</sup> · 차원섭 · 복수경 · 김명옥 · 천성숙\* · 최웅규\* · 김순희\*\* · 박경숙\*\*\*

상주대학교 식품공학과, \*영남대학교 식품가공학과  
\*\*김천대학 식품가공과, \*\*\*대구공업대학 식품영양과

### Production and Separation of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor during *Natto* Fermentation

Young-Je Cho<sup>†</sup>, Woen-Suep Cha, Su-Kyung Bok, Myoung-Uk Kim, Sung-Sook Chun\*,  
Ung-Kyu Choi\*, Soon-Hee Kim\*\* and Kyung-Sook Park\*\*\*

Dept. of Food Engineering, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea

\*Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

\*\*Dept. of Food Science and Technology, Kimcheon College, Kimcheon 740-704, Korea

\*\*\*Dept. of Foods and Nutrition, Taegu Technical College, Taegu 704-721, Korea

#### Abstract

As functionality investigation of a soybean fermentation food, a angiotensin converting enzyme inhibitory peptide was separated during *natto* fermentation by *Bacillus natto* and inhibitory effect was investigated. After incubation at each 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C for the 0~72 hr, protein content, protease activity and angiotensin converting enzyme inhibition were determined. The protein content and protease activity were increased and reached maximum at 60 hr fermentation with 40°C and decreased after the 60 hr fermentation during *natto* fermentation. The optimum condition for angiotensin converting enzyme inhibitors was appeared at fermentation for 60 hr at 40°C. Crude extract of *natto* was partially purified by Amicon membrane YM-3 and Sephadex G-10, G-25 gel filtration, stepwise. The inhibitory rate was increased in a concentration dependent manner, especially the most potent activity about 74.74% at 1.0 mg peptide content. The most prominent amino acid of the peptide from *natto* was alanine, followed by phenylalanine, histidine.

**Key words:** angiotensin converting enzyme, antihypertension peptide, *natto*, *Bacillus natto*

#### 서 론

서구화된 식생활 문화로 인한 과다한 열량 섭취와 체액의 산성화로 성인병이 급증하여 이것의 치료와 예방법을 기능성 식품에서 찾고자 노력하고 있으며, 이들 기능성 식품 중 대두 발효식품이 근래에 와서 주목받기 시작하고 있다. 대두에는 아미노산(1), 불포화 지방산(2) 등이 풍부하여 영양학적인 측면에서도 매우 효율적인 열량원이며(3), 여러 가지 생리활성 물질들이 함유되어 있음이 밝혀졌다(4). 대두를 이용한 발효식품 중 납두는 발효속성과정 중에 *Bacillus natto*가 생산하는 효소의 작용으로 대두의 여러 단백질이 분해되어 가용성 질소 화합물인 아미노산 및 펩티드 생성(5), 휘발성 향기 성분(6,7), 당류(8,9) 및 유지성분의 변화(10) 등이 일어나 특유의 구수한 맛을 형성함과 동시에 끈끈한 점질물이 생성되면서 방향을 내는 대두 발효가공식품이다. 대두 발효식품에 관한

연구는 유효세균 분리 동정(11), 최적제조 방법 확립(12, 13), 발효과정 중 생성되는 점질물의 성분과 생리활성기의 이화학적 특성 조사(14,15), 발효시간에 따른 아미노태질소와 수용성질소, protease 역가, 유리당 및 유리아미노산 함량 등의 변화(8) 등이 보고된 바 있다. 납두와 유사한 대두발효식품인 된장의 기능성에 관한 연구로는 항돌연변이(16), 항혈전펩타이드 탐색(17), ACE 저해 펩타이드(18), 혈중 cholesterol 저하작용 및 대장암 발생 억제 작용 등 많은 연구가 이루어져 왔으나 납두 발효과정 중 생성되는 peptide에 관한 연구보고는 미흡한 실정이다.

고혈압은 발생기작에서 renin-angiotensin system이 혈압조절에 매우 중요한 역할을 한다. 특히 angiotensin converting enzyme(ACE)은 renin에 의하여 생성된 decapeptide인 angiotensin I으로부터 C-말단의 dipeptide를 가수분해시킴으로서 강력한 혈관수축작용을 갖는 octapeptide인 angiotensin II를 합성하는 단계에 관여하는 효

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

소이다. 생성된 angiotensin II는 강력한 혈관수축작용을 가지며, ACE는 또한 혈관이완작용을 가진 nonapeptide 인 bradykinin을 불활성화시킴으로서 결과적으로 혈압을 상승시키는 역할을 한다(19). 따라서 이러한 ACE에 대한 억제제들이 고혈압 치료제로서의 개발 가능성이 제시되어 많은 연구가 이루어져 오고 있다(20,21).

따라서 본 연구에서는 대두발효식품의 기능성 탐색 연구의 일환으로 *Bacillus natto*를 이용한 납두 발효과정 중 고혈압 유발인자인 angiotensin converting enzyme의 저해 peptide를 분리하고 저해효과를 검토함으로써 대두발효식품의 우수성을 입증하기 위한 과학적 접근을 시도하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 납두의 제조

본 실험에 사용한 대두는 한국산 중립의 태백종을 시중에서 구입하여 사용하였으며, 정선한 콩을 10°C에서 20시간 동안 침지 후 물빼기를 하고 40 g씩 칭량한 후 삼각 flask에 넣어서 121°C에서 60분간 증자하였다. 증자 후 냉각시키고, 상주대학교 식품공학과에서 보관중인 *Bacillus natto*를 공시균으로 사용하여, 균주  $1.16 \times 10^4$  (CFU/mL)을 접종하여 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C에서 0~72시간 동안 배양하면서 6시간 단위로 마쇄하여 실험에 사용하였다.

### 단백질의 정량

단백질 정량은 Lowry 등(22)의 방법에 따라 측정하였으며, bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

### 납두 추출액 제조

배양된 납두 시료 40 g에 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 200 mL를 가하여 4°C에서 150 rpm으로 6시간 진탕 추출한 후 원심분리하고 상층액을 여과하여 납두 추출액으로 하였다.

### Protease 활성측정

추출액의 protease 활성은 Hagihara의 방법(23)으로 측정하였으며, 효소액 1 mL가 1분간에 1 µg의 tyrosine을 생성하는 것을 1 unit로 정하였다. 이때 tyrosine을 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

### ACE 저해 실험

ACE 저해효과 측정은 Cushman 등의 방법(21,24)에 의하여 행하였다. 즉, 반응구는 0.3 M NaCl을 함유하는

0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.3)에 기질 2.5 mM Hippuryl-histidyl-leucine(Sigma Co.) 용액 0.15 mL와 ACE(5.1 unit/mg, Sigma Co.) 0.1 mL 및 peptide 용액 0.1 mL를 혼합하였으며, 대조구는 peptide대신 동일 buffer 0.1 mL를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고 1 N HCl 0.35 mL 첨가로 반응을 중지시킨 뒤 3 mL의 EtOAc를 첨가하였다. EtOAc층만을 취한 다음 용매를 증류시킨 잔사에 2 mL의 증류수를 첨가하여 효소에 의해 기질로부터 분리되어 추출된 hippuric acid를 280 nm에서 흡광도를 측정한 후 표준곡선에서 양을 환산하여 아래의 식에 의해 저해율을 계산하였다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{반응구의 hippuric acid 생성량}}{\text{대조구의 hippuric acid 생성량}}\right) \times 100$$

### 발효조건에 따른 효소활성 변화

증자한 콩에 균주를 접종하고 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C의 각각의 배양온도에서 0~72시간동안 배양한 후 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 가해 6시간 동안 진탕 추출하고 그 여액의 protease activity를 측정하였다.

### 발효조건에 따른 ACE의 저해효과

증자한 콩에 균주 접종 후 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C의 각각의 배양온도에서 0~72시간동안 배양한 후 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 가해 6시간동안 진탕 추출하고 그 여액의 ACE 저해효과를 측정하였다.

### ACE 저해물질의 부분정제

납두 250 g을 분취하여 1 L의 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)와 함께 과쇄하고 6시간 교반한 후 8000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 Whatman No. 2 여과지로 여과한 여액을 Amicon membrane YM-3에 통과시키고 농축하였으며, 농축된 시료는 Sephadex G-10 column(3×60 cm)과 Sephadex G-25 column(3×60 cm)을 이용하여 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 gel filtration한 후 저해작용을 나타내는 분획만 모아서 동결건조하였다.

### 아미노산 분석

유리관에 20 mg의 각각의 시료와 6 N HCl를 넣고 질소 충전시킨 후 밀봉하고 105°C에서 24시간 동안 산 가수분해한 후 아미노산 자동분석기로 분석하였다

### 통계처리

실험 측정결과는 평균점수로 나타내며 그 평균값 사이의 유의차는 ANOVA test를 이용하였고, Duncan's

Multiple Range Test(25)로 95% 수준으로 유의성을 검정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 배양온도 및 배양시간에 의한 protease activity 측정

증자한 콩에 *Bacillus natto*를 접종 후 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C의 정온기에서 0~72시간 동안 배양하면서 6시간 간격으로 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 가해 6시간 동안 진탕 추출 후 그 여액의 protease activity를 측정한 결과는 Table 1과 같이 20°C, 60°C 배양 시에는 배양시간이 경과할수록 효소활성이 증가하는 경향이었으나 대조구에 비해 큰 폭의 상승은 나타나지 않았으며, 30°C, 40°C, 50°C 배양 시에 대조구의 0.72 unit에 비해 66, 60, 60시간 배양 시 각각 1.4 unit, 5.1 unit, 3.1 unit로 최대활성을 나타내었다. 따라서 최대 protease activity를 나타내는 40°C에서 60시간 배양이 최적배양조건으로 판단되었다. Lee 등(15)은 48시간 발효 때 protease activity가 최대치라고 하였으며, Suh 등(26)은 48~60시간에서 protease activity가 최대치를 보인다고 하여, 본 실험의 결과와 대체적으로 일치하였다.

#### 배양온도 및 배양시간에 따른 protein 용출량 변화

증자한 콩에 *Bacillus natto*를 접종 후 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C의 정온기에서 0~72시간 동안 배양하면서 6시간 간격으로 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 가해 6시간 진탕 추출 후 그 여액의 protein 용출량을 측정한 결과는 Table 2와 같이 20°C, 60°C 배양 시 각각 60, 54시간에서 231.83±4.81 µg/mL와 245.83±48.84 µg/mL로 최대의 protein 용출을 나타내었지만 대조구와 비교할 때 큰 차이는 없었고, 30°C, 40°C, 50°C 배양 시 각각

66, 60, 66시간에서 244.33±6.17, 301.50±11.44 및 282.67±5.01 µg/mL로 최대의 protein 용출을 나타내었으며, protein 용출을 위한 최적조건은 40°C에서 60시간 배양이었다.

#### 발효조건에 의한 angiotensin converting enzyme 저해효과

증자한 콩에 *Bacillus natto* 균주 접종 후 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C의 정온기에서 0~72시간 배양한 후 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 가해 6시간 동안 진탕 추출하고 그 여액의 저해효과를 측정한 결과는 Table 3과 같이 40°C, 60시간의 배양조건에서 31.51%의 저해를 나타내었다. 이는 protease activity가 가장 높은 조건에서 단백질 용출량과 peptide량이 가장 많으며 저해활성도 높은 것으로 생각된다.

#### 남두로부터 항고혈압성 peptide의 분리 및 부분정제

Membrane filter를 이용한 peptide의 부분정제

*Bacillus natto*에 의해 제조된 남두에 5배의 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 가하여 균질화시켜 준 뒤 4°C에서 24시간동안 교반하여 추출하고 여과한 후 8000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상정액인 남두 추출물을 얻고 그 추출물을 amicon membrane YM-3 ultra-filtration을 통하여 분자량 3000 이하의 peptide를 얻은 후 각각의 용액에 대해 ACE저해를 측정한 결과 Table 4와 같이 ACE 저해가 추출물인 경우 31.53%였고, membrane을 통과한 peptide의 경우 42.52%로 높게 나타났다.

Sephadex G-10 gel filtration

Amicon membrane YM-3를 통과한 peptide액을 동결 건조하여 농축한 후 Sephadex G-10 column(3×60 cm)에 주입하고 0.43 mL/min의 유속으로 6 mL/tube씩 분획

Table 1. Changes of protease activity during *natto* fermentation by *Bacillus natto*

Fermentation time (hr)	Protease activity (unit) <sup>2)</sup>				
	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
0	0.72±0.03 <sup>a1)</sup>	0.72±0.03 <sup>a</sup>	0.72±0.03 <sup>a</sup>	0.72±0.03 <sup>a</sup>	0.72±0.03 <sup>a</sup>
6	0.73±0.01 <sup>a</sup>	0.76±0.01 <sup>ab</sup>	0.84±0.03 <sup>a</sup>	0.80±0.03 <sup>a</sup>	0.83±0.04 <sup>b</sup>
12	0.76±0.01 <sup>ab</sup>	0.76±0.02 <sup>ab</sup>	1.02±0.02 <sup>ab</sup>	0.91±0.02 <sup>ab</sup>	0.88±0.02 <sup>bc</sup>
18	0.79±0.01 <sup>bc</sup>	0.76±0.03 <sup>ab</sup>	1.03±0.04 <sup>ab</sup>	1.02±0.04 <sup>bc</sup>	0.88±0.01 <sup>bc</sup>
24	0.80±0.03 <sup>bc</sup>	0.80±0.01 <sup>abc</sup>	1.44±0.10 <sup>bc</sup>	1.14±0.01 <sup>c</sup>	0.89±0.03 <sup>bc</sup>
30	0.82±0.02 <sup>c</sup>	0.84±0.02 <sup>bcd</sup>	1.56±0.04 <sup>c</sup>	1.36±0.07 <sup>d</sup>	0.91±0.04 <sup>c</sup>
36	0.87±0.01 <sup>d</sup>	0.87±0.03 <sup>cd</sup>	2.15±0.05 <sup>d</sup>	1.48±0.03 <sup>de</sup>	0.89±0.03 <sup>bc</sup>
42	0.91±0.03 <sup>d</sup>	0.89±0.02 <sup>d</sup>	2.41±0.04 <sup>d</sup>	1.57±0.05 <sup>d</sup>	0.86±0.03 <sup>bc</sup>
48	0.91±0.04 <sup>d</sup>	1.07±0.03 <sup>e</sup>	3.08±0.24 <sup>e</sup>	2.07±0.08 <sup>g</sup>	0.86±0.01 <sup>bc</sup>
54	1.00±0.09 <sup>e</sup>	1.04±0.02 <sup>e</sup>	4.55±0.50 <sup>f</sup>	2.16±0.22 <sup>g</sup>	1.25±0.09 <sup>e</sup>
60	1.01±0.03 <sup>e</sup>	1.33±0.04 <sup>f</sup>	5.08±1.48 <sup>g</sup>	3.08±0.24 <sup>h</sup>	1.09±0.02 <sup>d</sup>
66	0.76±0.02 <sup>ab</sup>	1.35±0.14 <sup>f</sup>	3.07±0.06 <sup>e</sup>	3.07±0.06 <sup>h</sup>	0.75±0.04 <sup>a</sup>
72	0.73±0.01 <sup>a</sup>	0.74±0.02 <sup>a</sup>	2.78±0.07 <sup>d</sup>	1.85±0.18 <sup>f</sup>	0.74±0.02 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Another alphabet was described to significantly different of 95% level.

<sup>2)</sup> Protease was reacted with 2.5 mL of 0.6% Hammarstein milk casein and 0.2 mL enzyme at 37°C for 30 min.

**Table 2. Changes of protein content during *natto* fermentation by *Bacillus natto***

Fermentation time (hr)	Protein Content ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>2)</sup>				
	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
0	197.50 ± 1.73 <sup>a1)</sup>	197.50 ± 1.73 <sup>a</sup>	197.50 ± 1.73 <sup>a</sup>	197.50 ± 1.73 <sup>a</sup>	197.50 ± 1.73 <sup>a</sup>
6	214.00 ± 2.29 <sup>b</sup>	202.83 ± 4.31 <sup>b</sup>	225.17 ± 5.75 <sup>c</sup>	208.17 ± 2.93 <sup>b</sup>	208.17 ± 2.93 <sup>b</sup>
12	216.67 ± 12.69 <sup>c</sup>	216.83 ± 8.25 <sup>d</sup>	225.83 ± 1.44 <sup>d</sup>	211.50 ± 4.09 <sup>c</sup>	217.33 ± 1.89 <sup>h</sup>
18	219.00 ± 1.32 <sup>c</sup>	216.50 ± 4.27 <sup>c</sup>	224.00 ± 7.40 <sup>b</sup>	221.83 ± 6.17 <sup>d</sup>	214.67 ± 1.89 <sup>g</sup>
24	222.50 ± 10.21 <sup>h</sup>	219.50 ± 1.00 <sup>f</sup>	241.50 ± 3.78 <sup>e</sup>	212.33 ± 0.76 <sup>c</sup>	212.83 ± 3.33 <sup>e</sup>
30	228.00 ± 3.97 <sup>i</sup>	223.17 ± 5.86 <sup>f</sup>	248.17 ± 4.31 <sup>f</sup>	227.50 ± 8.89 <sup>e</sup>	213.33 ± 7.01 <sup>f</sup>
36	228.00 ± 3.00 <sup>j</sup>	227.17 ± 1.76 <sup>g</sup>	274.17 ± 2.75 <sup>h</sup>	233.50 ± 5.64 <sup>f</sup>	211.17 ± 5.51 <sup>c</sup>
42	221.50 ± 7.40 <sup>f</sup>	228.17 ± 7.10 <sup>h</sup>	280.00 ± 13.44 <sup>i</sup>	233.33 ± 1.04 <sup>f</sup>	212.00 ± 3.46 <sup>d</sup>
48	228.33 ± 3.82 <sup>k</sup>	231.33 ± 2.36 <sup>j</sup>	285.00 ± 7.05 <sup>j</sup>	248.33 ± 7.69 <sup>g</sup>	213.50 ± 2.60 <sup>f</sup>
54	221.67 ± 2.93 <sup>g</sup>	234.50 ± 2.18 <sup>k</sup>	298.83 ± 13.04 <sup>k</sup>	249.67 ± 3.75 <sup>g</sup>	245.83 ± 48.84 <sup>l</sup>
60	231.83 ± 4.81 <sup>l</sup>	238.33 ± 1.04 <sup>l</sup>	301.50 ± 11.44 <sup>l</sup>	269.33 ± 1.53 <sup>i</sup>	234.00 ± 3.28 <sup>j</sup>
66	226.00 ± 6.06 <sup>j</sup>	244.33 ± 6.17 <sup>m</sup>	274.50 ± 11.91 <sup>h</sup>	282.67 ± 5.01 <sup>j</sup>	234.67 ± 3.33 <sup>k</sup>
72	217.00 ± 6.06 <sup>d</sup>	229.50 ± 3.97 <sup>i</sup>	272.83 ± 4.07 <sup>g</sup>	257.50 ± 3.97 <sup>b</sup>	231.50 ± 4.36 <sup>j</sup>

<sup>1)</sup>Another alphabet was described to significantly different of 95% level.

<sup>2)</sup>Protein measurement was Lowry method.

**Table 3. Angiotensin converting enzyme inhibition of extract during *natto* fermentation by *Bacillus natto***

Fermentation time (hr)	Angiotensin converting enzyme inhibition (%) <sup>1)</sup>				
	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
0	-	-	-	-	-
6	-	-	1.37	2.74	-
12	1.40	4.11	5.48	6.85	1.37
18	4.11	10.96	12.33	13.70	6.85
24	5.48	15.07	17.81	16.44	12.33
30	10.96	13.70	17.81	16.44	15.07
36	16.44	20.55	19.18	20.55	19.18
42	17.81	20.55	26.23	20.55	23.29
48	21.92	23.29	28.51	26.03	24.66
54	24.66	24.66	30.51	26.03	24.66
60	24.66	28.77	31.51	27.03	21.92
66	23.29	21.92	28.77	21.92	21.92
72	23.29	21.92	24.66	17.81	17.81

<sup>1)</sup>Angiotensin converting enzyme was reacted with 0.15 mL of 2.5 mM Hippuryl-histidyl-leucine 0.1 mL enzyme and 0.1 mL peptide at 37°C for 30 min.

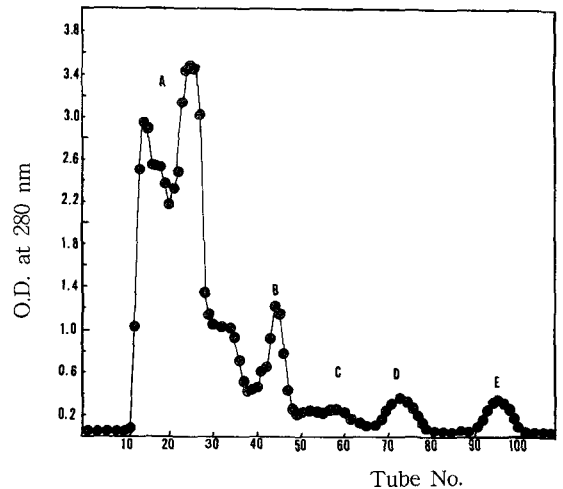
**Table 4. Angiotensin converting enzyme inhibition of extract from *natto* by *Bacillus natto***

Step	Hippuric acid ( $\mu\text{g/mL}$ )	Inhibition (%) <sup>2)</sup>
Control	185.00 ± 12.12 <sup>a1)</sup>	-
Crude extract	121.67 ± 5.51 <sup>b</sup>	31.53
YM-3 membrane	106.33 ± 4.73 <sup>b</sup>	42.52

<sup>1)</sup>Another alphabet was described to significantly different of 95% level.

<sup>2)</sup>Angiotensin converting enzyme was reacted with 0.15 mL of 2.5 mM hippuryl-histidyl-leucine 0.1 mL enzyme and 0.1 mL peptide at 37°C for 30 min.

하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 A, B, C, D, E 5개의 분획으로 나타났다. 용출된 분획의 ACE 저해 결과는 Table 5와

**Fig. 1. Sephadex G-10 gel filtration of extract from *natto* by *Bacillus natto*.****Table 5. Angiotensin converting enzyme inhibition of fraction after Sephadex G-10 gel filtration of extract from *natto* by *Bacillus natto***

Fraction	Hippuric acid ( $\mu\text{g/mL}$ )	Inhibition (%) <sup>2)</sup>
Control	177.33 ± 12.10 <sup>bc1)</sup>	-
A	191.33 ± 3.51 <sup>a</sup>	-
B	94.67 ± 5.69 <sup>d</sup>	46.61
C	164.00 ± 5.57 <sup>c</sup>	7.52
D	173.33 ± 2.52 <sup>bc</sup>	2.26
E	180.33 ± 9.07 <sup>ab</sup>	-

<sup>1)</sup>Another alphabet was described to significantly different of 95% level.

<sup>2)</sup>Angiotensin converting enzyme was reacted with 0.15 mL of 2.5 mM hippuryl-histidyl-leucine 0.1 mL enzyme and 0.1 mL peptide at 37°C for 30 min.

같이 B에서 46.61%의 ACE 저해가 나타났으며 ACE 저해가 나타난 B분획은 농축하였다.

Sephadex G-25 gel filtration

농축한 활성분획 B를 소량의 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 녹인 후 Sephadex G-25 column (3×60 cm)에 주입하고 0.5 mL/min의 유속으로 5.5 mL/tube씩 분획한 결과 Fig. 2와 같이 B-1, B-2로 2개의 분획으로 분리되었고 용출된 분획의 ACE 저해를 측정 한 결과는 Table 6과 같이 B-2에서 54.25%로 ACE 저해가 높게 나타났으며 B-1 분획에서는 ACE 저해가 나타나지 않았다. 따라서 B-2가 ACE 저해 peptide로 판단되었으며, 그 분획을 모아서 동결건조하였다. *Bacillus natto* 균을 접종한 납두 추출물로부터 ACE 저해 peptide를 정제한 결과 250 g의 납두로부터 140 mg의 건조 peptide를 얻었다. 납두 발효과정 중 생성된 부분정제 peptide의 농

도에 의한 ACE 저해결과는 Table 7과 같이 0.5 mg과 1.0 mg을 첨가했을 때 각각 42.37%와 74.74%의 저해를 나타 내었고 이는 peptide량이 많을수록 ACE 저해가 높은 것으로 생각된다. 이는 Shin 등(18)이 된장 peptide의 ACE 저해가 41.8%라고 보고한 것과 비교하면 상당히 높은 저해 효과를 가지는 것으로 측정되었다.

Peptide의 아미노산 분석

유리관에 20 mg의 각각의 시료와 6 N HCl를 넣고 질소 충전시킨 후 밀봉하고 105°C에서 24시간 동안 가수분해 하였다. 가수분해한 액을 여과한 후 rotary evaporator를 사용하여 염산을 완전히 증발시킨 다음 아미노산 자동분석기로 분석한 결과는 Table 8과 같이 peptide의 아미노산 조성 중에서 alanine이 30.84%로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 그 다음으로 phenylalanine이 30.03%, histidine이 20.24% 등의 순서로 나타났다. 이는 Suh 등(27)의 된장에서 정제한 peptide의 아미노산 조성이 alanine, phenylalanine이 55.50%, 39.84%로 상당히 높은 비중을 차지한다고 보고한 것과 유사한 경향을 나타내었다.

Table 7. Angiotensin converting enzyme inhibition of partial purified peptide from *natto* by *Bacillus natto*

Content (mg)	Inhibition (%) <sup>1)</sup>
Control	-
0.1	-
0.2	17.12
0.5	42.37
1.0	74.74

<sup>1)</sup>Angiotensin converting enzyme was reacted with 0.15 mL of 2.5 mM hippuryl-histidyl-leucine 0.1 mL enzyme and 0.1 mL peptide at 37°C for 30 min.

Table 8. Amino acid composition of isolated peptide from *natto* by *Bacillus natto*

Amino acid	Content (%)
Asp	0.62
Glu	0.87
Ser	0.29
Gly	5.14
His	20.24
Arg	1.05
Thr	2.21
Ala	30.84
Pro	ND <sup>1)</sup>
Tyr	0.98
Val	2.03
Met	ND
Cys	ND
Ile	2.76
Ceu	1.82
Phe	30.03
Lys	1.12
Total	100.00

<sup>1)</sup>ND: Not detected.

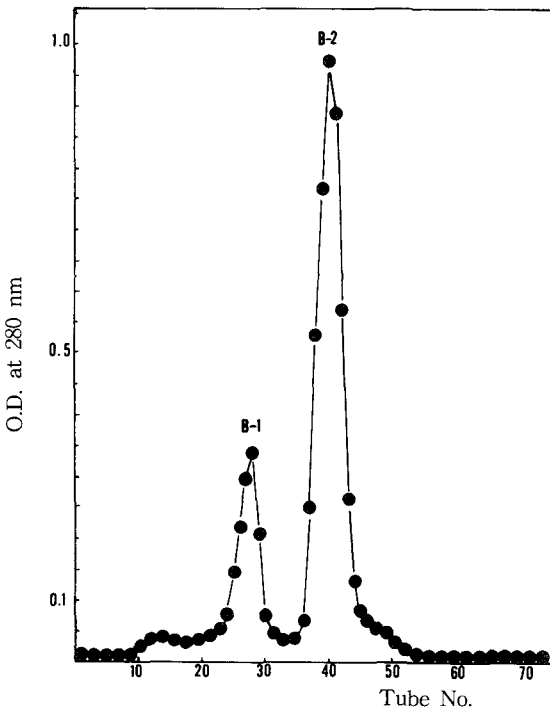


Fig. 2. Sephadex G-25 gel filtration of antihypertensive peptide of extract from *natto* by *Bacillus natto*.

Table 6. Angiotensin converting enzyme inhibition of fraction after Sephadex G-25 gel filtration of extract from *natto* by *Bacillus natto*

Fraction	Hippuric acid (µg/mL)	Inhibition (%) <sup>2)</sup>
Control	102.00 ± 6.08 <sup>a1)</sup>	-
B-1	96.33 ± 15.01 <sup>a</sup>	5.56
B-2	46.67 ± 7.64 <sup>b</sup>	54.25

<sup>1)</sup>Another alphabet was described to significantly different of 95% level.

<sup>2)</sup>Angiotensin converting enzyme was reacted with 0.15 mL of 2.5 mM hippuryl-histidyl-leucine 0.1 mL enzyme and 0.1 mL peptide at 37°C for 30 min.

## 요 약

대두발효식품의 기능성 탐색 연구의 일환으로 *Bacillus natto*를 접종한 납두의 발효과정 중 고혈압을 유발하는 angiotension converting enzyme의 저해 peptide를 분리하고 저해효과를 검토함으로써 대두발효식품의 우수성을 입증하기 위한 과학적 접근을 시도하고자 하였다. 납두는 *Bacillus natto*균을 이용하여 제조하였고, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C에서 0~72시간 동안 배양하면서 protein 함량, protease activity, ACE 저해율을 측정하고 저해활성을 가지는 peptide를 정제 후 아미노산 조성을 분석하였다. *Bacillus natto*에 의한 납두의 발효시간이 경과함에 따라 protein 함량이 증가하여 40°C, 60시간에서 최대를 나타낸 후 감소하였다. 발효시간에 따른 protease activity는 40°C, 60시간에서 최대의 활성을 나타낸 후 점차 활성이 감소하였다. 따라서 *Bacillus natto*를 이용한 납두 제조는 40°C에서 60시간 배양이 최적의 조건이었으며, 최적 발효조건에 따라 납두를 제조한 후 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 가해 추출한 추출물을 Amicon membrane YM-3 filtration 과 Sephadex G-10, G-25를 이용한 gel filtration으로 부분정제하였다. 또한 정제한 peptide는 첨가함량이 높아질수록 저해활성은 높게 나타났으며, 1 mg 정도의 peptide 함량으로 74.74%의 저해율을 나타내었다. 정제한 peptide의 아미노산 조성은 alanine(30.84%), phenylalanine(30.03%), histidine(20.24%) 순서로 그 함량이 높게 나타났다.

## 문 헌

- Kim, S.Y. and Kim, W.U. : Studies on the changes of protein, peptide and amino acid during preparation. *Korean J. Agric. Chem.*, **8**, 11-20 (1967)
- Kim, J.G., Kim, S.K. and Lee, J.S. : Fatty acid composition and electrophoretic patterns of protein of Korean soy beans. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **20**, 263-271 (1988)
- Landers, R.E. and Rathmann, D.M. : Vegetable oils: Effect of processing storage and use on nutritional values. *J. Am. Oil Chem.*, **58**, 255-259 (1981)
- Kim, C.J. : Biologically active compound of soybean. The research institute of soybean fermentation foods. Yeungnam University, 2nd Symposium, p.9-43 (1999)
- Julistyo, J., Taya, N., Funane, K. and Kiuchi, K. : Production of natto starter. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **35**, 278-283 (1988)
- Kanno, A. and Takamatsu, H. : Changes in the volatile components of natto during manufacturing and storage. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **34**, 330-335 (1987)
- Sugawara, E., Ito, T., Odagiri, S., Kubotu, K. and Kobayashi, A. : Comparison of compositions of odor components of natto and cooked soybean. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 311-317 (1985)
- Kanno, A., Takamatsu, H., Takano, N. and Akimoto, T. : Change of saccharides in soybean during manufacturing of natto. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **29**, 105-110 (1982)
- Kim, B.R., Han, Y.B. and Park, C.H. : Changes of free sugar and free amino acid during the natto fermentation used by *Bacillus subtilis* S.N.U 816. *Korean J. Agric. Chem.*, **30**, 192-197 (1987)
- Rhee, S.H., Kim, S.K. and Cheigh, H.S. : Studies on the lipids in Korean soybean fermented foods. *Korean J. Food. Sci. Technol.*, **15**, 399-403 (1983)
- Park, K.I. and Sung, S.H. : Studies on the chungkookjang fermentation (I). *Korean J. Micro. Biol.*, **9**, 74-85 (1971)
- Suh, J.S. and Lee, H.J. : Effect of *Bacillus* strains on the chungkookjang processing (I). *Korean J. Food. Sci. Nutr.*, **14**, 301-307 (1981)
- Suh, J.S., Lee, S.G. and Ryu, M.K. : Effect of *Bacillus* strains on the chungkookjang processing (II). *Korean J. Food. Sci. Technol.*, **14**, 309-314 (1982)
- Lee, B.Y., Kim, K.M. and Kim, K.H. : Physico-chemical properties of viscous substance extracted from chungkookjang. *Korean J. Food. Sci. Technol.*, **23**, 599-604 (1991)
- Lee, B.Y., Kim, D.M. and Kim, K.H. : Studies on the change in rheological properties of chungkookjang. *Korean J. Food. Sci. Technol.*, **23**, 478-484 (1991)
- Park, K.Y., Moon, S.H., Baik, H.S. and Cheigh, H.S. : Antimutagenic effect of doenjang (Korean fermented soy paste) toward aflatoxin. *Korean J. Food. Nutr.*, **19**, 156-162 (1990)
- Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H. : A novel fibrinolytic enzyme (natto kinase) in the vegetable cheese natto : a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*, **43**, 1110-1111 (1987)
- Shin, Z.I., Ahn, C.W., Nam, H.S., Lee, H.H., Lee, H.J. and Moon, T.H. : Fractionation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 230-234 (1995)
- Ondette, M.A. and Cushman, D.W. : Enzymes of the rinin angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 283-308 (1982)
- Wyvratt, M.J. and Patchett, A.A. : Recent developments in the design of an angiotensin converting enzyme inhibitors. *Medicinal Res. Rev.*, **5**, 483-488 (1985)
- Cushman, D.W., Cheung, E.F., Sabo, B.R. and Ondette, M.A. : Development of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme (kiniase II). *Fed. Proceed.*, **38**, 2778-2782 (1979)
- Lowry, C.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-273 (1951)
- Hagihara, B. : Method of enzymatic analysis. Tokyo, Japan, Vol. 2, p.237-246 (1956)
- Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F. and Ondette, M.A. : Design of potent competitive inhibitors of angiotensin converting enzyme. Carboxylalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*, **16**, 5484-5490 (1977)
- Cho, J.C. and Lee, K.J. : *Experimental statistics*. Sunjin Press Inc., Seoul, Korea, p.188-192 (1996)
- Suh, J.S., Ryu, M.K. and Hur, Y.H. : Effect of *Bacillus* strains on the chungkookjang processing (III). *Korean J. Food. Sci. Technol.*, **15**, 385-391 (1983)
- Suh, H.J., Suh, D.B., Chung, S.H., Whang, J.H., Sung, H.J. and Yang, H.C. : Purification of ACE inhibitor from soybean paste. *Korean J. Agric. Chem Biotech.*, **37**, 441-446 (1994)

## 칼슘원으로서의 오적골의 특성연구

- 연구노트 -

김한수 · 이미영 · 이승철<sup>†</sup>  
경남대학교 식품생물공학전공

### Characteristics of Sepiae Os As a Calcium Source

Han-Soo Kim, Mi-Young Lee and Seung-Cheol Lee<sup>†</sup>

Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

#### Abstract

The possibility of sepiae os as a calcium supplement in food was studied. Elementary contents of sepiae os were as follows: Ca 53.254%, O 26.781%, Na 14.905%, Cl 4.37%, Sr 0.507%, P 0.064%, S 0.068% and Si 0.051%, respectively. Most of calcium in sepiae os was present as a form of CaCO<sub>3</sub>. Surface area of sepiae os was found as 386 m<sup>2</sup>/g, and scanning electron micrograph showed sepiae os has multilayer structure. Buffering capacity of sepiae os showed same pattern as that of CaCO<sub>3</sub>. With above results, sepiae os can be used as a calcium supplement in food with good characteristics.

**Key words:** sepiae os, calcium source, characteristics

#### 서 론

칼슘은 인체의 필수원소로서, 골격과 치아의 형성, 혈액의 응고, 근육의 수축이완, 신경 전달작용, 세포막의 투과성 조절, 비타민 B<sub>12</sub>의 흡수, 세포막의 융합 및 분열 등 아주 광범위하게 작용하고 있다(1). 칼슘은 일반적으로 우유, 멸치 등의 식품으로부터 섭취를 하고 있으나 칼슘이 많이 요구되는 성장기 어린이나 폐경기 이후의 여성들은 칼슘 섭취가 부족하기 쉽다(2,3). 특히, 골다공증의 발병 요인으로서 칼슘의 섭취, 칼슘의 대사 및 관련인자에 관한 연구결과로 지속적이고 충분한 칼슘 섭취가 골다공증의 예방과 치료에 필수요건임이 확인되었다(4). 따라서, 체내이용성이 높은 칼슘 급원식품, 칼슘 강화식품, 칼슘 보충제 및 칼슘 이용성 증진물질 등 칼슘의 양적, 질적 섭취방안에 대한 연구가 수행되었다(5-9).

우리나라의 식품공전에는 칼슘함유식품을 칼슘을 많이 함유한 동·식물을 원료로 하여 식품에 적합하도록 분리, 정제, 살균하여 분말로 한 것이거나 소성하여 분말로 한 것 또는 이를 주원료로 하여 섭취가 용이하도록 액상, 페이스트상, 분말, 과립, 정제, 캡슐 등으로 가공한 것이라 명시되어 있다(10). 이를 기준하여 우리나라에서는 소뼈 분말, 난각분말, 조개껍질분말을 주된 소재로 이용하여 칼슘식품시장이 형성되고 있으며, 1998년에는 칼슘소비량이 207톤으로 추정되고 금액은 약 900억원에 이른다(11). 일본에서의 칼슘원료 유통량은 22,000톤으로 추정되며

식품용 칼슘원료의 유통량은 탄산칼슘이 약 13,000톤, 유기산칼슘 2,800톤, 난각 유래제품이 약 2,000톤, 패각 유래제품이 1,000톤 등으로 추정된다(12).

본 연구에서는 수산폐기물로 발생하는 갑오징어(*Sepia esculenta* Hoyle)의 내갑골(sepiae os, 이하 오적골)의 칼슘소재 가능성을 확인하였다. 오적골은 예로부터 한방에서 지혈제 등으로 이용되어 왔으며, 약리작용으로는 항궤양 작용이 있다고 알려져 왔다(13). 따라서, 오적골의 칼슘 함량, 칼슘의 물리적 및 화학적 특성을 조사하여 칼슘원으로서의 기초자료를 제공하고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

본 연구에 사용된 오적골은 1999년 10월 경상남도 마산시의 어시장으로부터 건조된 것을 구입하여 심온냉동기에 넣어서 보관하며 분석에 이용하였고, 그 외 사용된 시약들은 분석용 등급의 시약을 이용하였다.

##### 오적골의 칼슘성분분석

오적골의 원소 함량 및 칼슘의 존재 형태를 알기 위하여 XRF(Philips PW2400, Netherland)를 이용하였다. 즉, 오적골의 평탄면 형태와 균일한 입도분포를 위해 binder (Cat. 600, Chemplex Co., USA)를 30% 첨가한 후 혼합하

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

여 20톤의 압력으로 압착하여 평탄면으로 전처리한 후 시료로 이용하여 분석하였다. XRD 상분석(Philips expert system, Netherland)은 40 KV, 30 mA의 조건에서 10~70°C의 범위에서 분석하였다. 또한, 열중량 분석(TA Instruments Model SDT 2960, USA)은 5°C/min로 1000°C까지 온도를 상승시키며 분석하였다.

**다공성 분석**

오적골의 표면적과 미세구멍 크기를 측정하여 계산하였다. 즉, 오적골을 200°C에서 8시간 동안 탈기한 후 N<sub>2</sub> 가스를 흡착 가스로 이용하였으며, 표면분석기(Micromeritics ASAP 2010, USA)를 이용하여 BET방법으로 비표면적과 입자의 크기를 구하였다.

**미세구조분석(Scanning electron microscope : SEM)**

오적골의 미세구조를 확인하기 위해 막자사발로 마쇄한 오적골 분말을 백금 코팅처리 후 주사전자현미경(SEM, ABT-32 Model, Topcon사, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

**완충용량 측정**

오적골의 완충특성을 조사하기 위하여 Assoumani의 방법(14)에 의한 적정실험을 수행하였다. 즉, 25 g의 오적골 또는 CaCO<sub>3</sub>를 100 mL의 탈이온수에 녹인 뒤 초기 pH를 측정하고 0.1 N HCl의 10 mL씩 첨가하면서 일정 pH에 도달할 때까지 측정하였다

**결과 및 고찰**

칼슘은 일상 식품에 함유되어 있어 매일같이 섭취하고 있지만, 부족하기 쉬운 영양소이다. 칼슘의 공급원으로서 많은 식품이 연구되어 왔고(15,16), 특히 수산폐기물을 칼슘소재원으로 이용하려는 연구도 있었지만(17,18), 오적골에 관하여는 아직까지 보고된 바 없다. 칼슘원 소재로서 오적골의 성분을 분석하기 위해 XRF분석, XRD 상분석, 열중량 분석을 수행하였다. 먼저, XRF를 이용하여 오적골의 성분을 분석한 결과(Table 1), 오적골에는 53.254%의 칼슘이 함유되어 있었으며, 굴 폐각의 경우(17) 칼슘이 39.64%인 것과 비교하면 오적골은 훨씬 많은 칼슘이 함유하고 있음을 알 수 있다. 또한, 산소도 26.781%가 함유되어 있으며, 다른 미량 원소와 비교하여 볼 때 산소

는 대부분 칼슘과 결합된 형태로 존재함을 유추할 수 있다.

오적골을 구성하고 있는 칼슘의 존재 형태를 조사하기 위해 XRD 상분석을 행하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이, 아래의 표준시료인 CaCO<sub>3</sub>와 오적골을 비교한 결과 peak가 대부분 일치하는 것으로 보아 오적골을 구성하는 칼슘은 대부분 CaCO<sub>3</sub>임을 확인할 수 있었다. 또한, 열중량 분석으로 칼슘의 존재 형태를 재확인하였다. 즉, 오적골에 존재하는 칼슘의 대부분이 CaCO<sub>3</sub> 형태로 존재한다면 열량분석을 수행하여 온도를 상승시키면 CaCO<sub>3</sub>의 CO<sub>2</sub>가 분해되어 중량의 감소가 일어날 것이다. Fig. 2의 결과에서, 온도가 상승한 후, 약 50%의 중량이 소실되었으며, 이는 존재하는 칼슘이 대부분 CO<sub>2</sub>와 결합한 CaCO<sub>3</sub> 형태임을 확인할 수 있었다.

칼슘 소재의 다공성은 완충제나 유해물질 흡착물질로 많은 중요성을 가지고 있으며, 입자의 크기는 식품첨가시 식감에 관여하기 때문에 BET표면적을 측정하여 다공성을 확인하였다. 오적골의 표면적은 386 m<sup>2</sup>/g으로 측정되었는데, 이 수치는 CaCO<sub>3</sub>의 표면적이 1.7 m<sup>2</sup>/g이며, 해조칼슘미네랄로 시판 중인 AQUACAL이 9.4 m<sup>2</sup>/g, 활성탄이 200~1,000 m<sup>2</sup>/g인 것에 비하면(18) 매우 큰 표면적을 보유하고 있음을 알 수 있다. 즉, 오적골에 존재하는 CaCO<sub>3</sub>는 다른 칼슘 소재에 비해 다공성이 높으며, 이는 생체이용률이 높음을 의미한다. 오적골의 구조를 전자현



Fig. 1. XRD analysis of sepiae os. Standard material used was CaCO<sub>3</sub>.

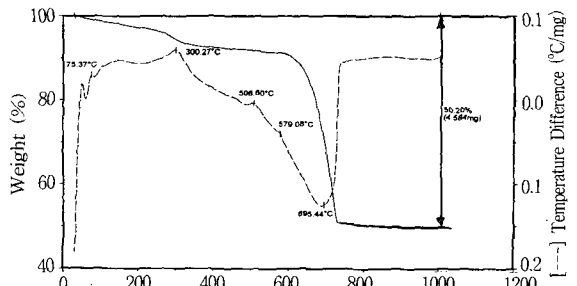


Fig. 2. Heat absorption analysis of sepiae os.

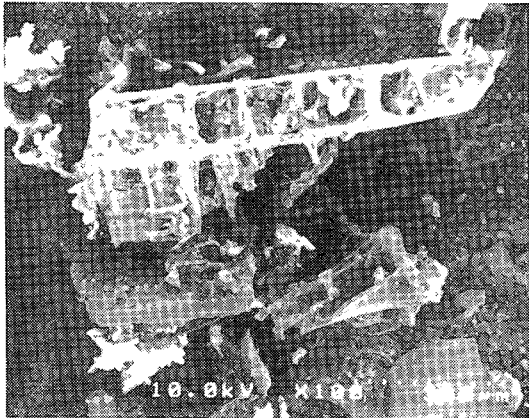
Table 1. Element analysis of sepiae os

Element	Ca	O	Na	Cl	Sr	S	P	Si
(%)	53.254	26.781	14.905	4.370	0.507	0.068	0.064	0.051

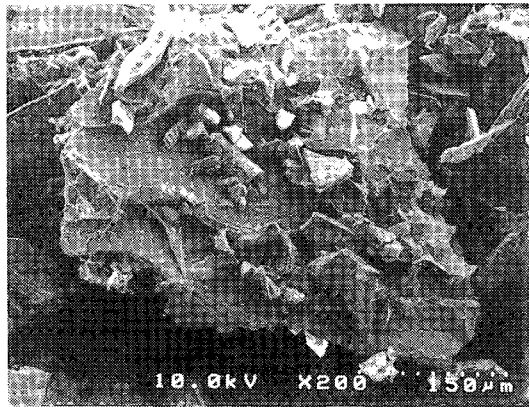


미경으로 관찰한 결과(Fig. 3), 오적골은 다층구조의 높은 다공성을 지니고 있음을 확인되었다.

오적골의 완충용량을  $\text{CaCO}_3$ 와 비교하였다(Fig. 4). 완충용량은 pH 변화를 조절하는 염의 능력, 즉 산성화를 중화할 수 있는 능력으로서 산도가 높은 식품에 칼슘염을



(A)



(B)

Fig. 3. Scanning electron micrographs of sepiae os. A:  $\times 100$ , and B:  $\times 200$

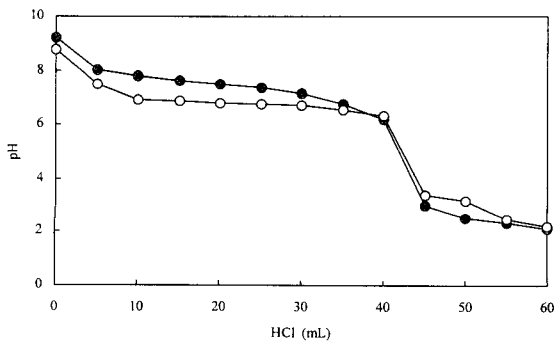


Fig. 4. Buffering capacity of sepiae os (closed circle) and  $\text{CaCO}_3$  (open circle).

첨가할 때 pH를 중화하며 침전을 방지하는 지표로 이용될 수 있다(18). 먼저 칼슘염의 최초 pH를 측정하고, 산을 정해진 pH에 도달할 때까지 가하여 해당 칼슘염의 완충용량을 측정하였다. 오적골은 대체로  $\text{CaCO}_3$ 와 유사한 완충용량을 나타내었는데, HCl이 40 mL까지 첨가된 경우까지는  $\text{CaCO}_3$ 보다 완충능력이 우수하며, 40 mL를 넘게 첨가된 경우에는  $\text{CaCO}_3$ 보다 완충능력이 떨어짐을 관찰할 수 있다.  $\text{CaCO}_3$ 가 일반적으로 이용되는 우수한 칼슘보충제임을 감안하면 오적골도 칼슘보충제로 이용가능함을 의미한다.

### 요 약

예로부터 민간요법이나 한방에서 약품소재로서 이용되어 온 오적골의 칼슘공급원으로서의 특성을 조사하였다. 오적골은 53.254%의 칼슘이 함유되어 있으며, O, Na, Cl, Sr, S, P, Si이 각각 26.781%, 14.905%, 4.37%, 0.507%, 0.068%, 0.064%, 0.051% 존재하였다. XRD 상분석 결과, 오적골에 존재하는 칼슘은  $\text{CaCO}_3$  형태로 존재하며, 오적골의 표면적은  $386 \text{ m}^2/\text{g}$ 으로서  $\text{CaCO}_3$ 의  $1.7 \text{ m}^2/\text{g}$ 과 비교하였을 때 200배 이상의 다공성을 가지고 있고 전자현미경사진으로 다층구조의 다공성을 관찰하였다. 오적골은  $\text{CaCO}_3$ 와 유사한 pH 완충용량을 나타내었고, 이로써 식품용 칼슘 소재로서의 이용가능성을 확인하였다.

### 감사의 글

본 연구는 교육부 BK21 핵심전문연구사업의 지원에 의해 일부 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 문 헌

- Allen, L.H. : Calcium bioavailability and absorption: A review. *Am. J. Clin. Nutr.*, **35**, 738-808 (1982)
- Oh, J.J., Hong, E.S., Baik, I.K., Lee, H.S. and Lim, H.S. : Effects of dietary calcium, protein, and phosphorus intakes on bone mineral density in Korean premenopausal women. *Korean J. Nutr.*, **29**, 59-69 (1996)
- Heaney, R.P. : Nutritional factors in osteoporosis. *Ann. Rev. Nutr.*, **13**, 287-316 (1993)
- Recker, R.R., Bammi, A., Barger-Lux, J. and Heaney, R.P. : Calcium absorbability from milk products, and imitation milk and calcium carbonate. *Am. J. Clin. Nutr.*, **47**, 93-95 (1988)
- Lee, H.O. : Study on the apparent absorption rate of calcium in college woman. *Korean J. Nutr.*, **13**, 134-138 (1980)
- Kobayashi, T., Okano, T. and Matsuda, S. : Comparison of three kinds of Ca compounds with regard to their bioavailability as Ca source. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **40**, 293-298 (1987)
- Lee, S.H. and Chang, S.O. : Comparison of the bioavailability of calcium from anchovy, tofu and nonfat dry

- milk in growing male rats. *Korean J. Nutr.*, **27**, 473-482 (1994)
8. Chung, H.K., Chang, N., Lee, H.S. and Chang, Y.E. : The effect of various type of calcium sources on calcium and bone metabolism in rats. *Korean J. Nutr.*, **29**, 480-488 (1996)
  9. Lee, S.H., Hwangbo, Y.S., Kim, J.Y. and Lee, Y.S. : A study on the bioavailability of dietary calcium sources. *Korean J. Nutr.*, **30**, 499-505 (1997)
  10. 한국식품공업협회 : 식품공전. 문영사, 서울, p.459-461 (1997)
  11. 강대일 : 건강보조식품시장. 식품저널, 한국컴퓨터인쇄, Vol. 3, p.94 (1999)
  12. 강대일 : 칼슘시장 확대 가속화. 식품저널, 한국컴퓨터인쇄, Vol. 9, p.122 (1998)
  13. 동의학연구소 : 동약법제. 여강출판사, 서울, p.363 (1994)
  14. Assoumani, M.B. : Physical-chemical properties of calcium sources. *Agro-Food-Industry Hi-Tech*, **9**, 33-35 (1998)
  15. Kim, E.S. and Im, K.J. : A study on oxalic acid and calcium content in Korean foods. *Korean J. Nutr.*, **10**, 292-298 (1977)
  16. Shin, H.S. and Kim, K.H. : Preparation of calcium powder from eggshell and use of organic acids for enhancement of calcium ionization. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, **40**, 531-535 (1997)
  17. Kang, J.H., Kim, J.H. and Lee, H.C. : A study on the development of manufacturing process of high grade precipitated calcium carbonate from oyster shell. *J. Korean Solid Wastes Engineering Soc.*, **13**, 320-327 (1996)
  18. Ryu, B.H., Lee, S.H., Ha, M.S., Sin, D.B. and Lee, S.H. : Nutritional value of calcium acetate obtained from sea-mussel shell. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **16**, 42-47 (1987)

(2000년 5월 12일 접수)