

γ -PGA(Poly- γ -glutamic acid) 보충이 흰쥐의 칼슘 흡수율 및 골대사에 미치는 영향

이민숙[†] · 강정일 · 김현수

풀무원 식문화연구원 기능성연구소

Effect of γ -PGA (Poly- γ -Glutamic Acid) Supplement on Calcium Absorption and Bone Metabolism in Rats

Min-Sook Lee[†], Jung-Il Kang and Hyun-Su Kim

R&D Center for Functional Foods, Institute of Food and Culture, Pulmuone Co. Ltd., Seoul 120-600, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of γ -PGA (γ -poly glutamic acid) on Ca absorption and bone metabolism in rats. Weaned 4-week old male rats were fed Ca-deficient diets for 3 weeks after the adjustment period. Rats were divided into 6 groups and were fed experimental diets for four weeks. Experimental groups were basal (Ca deficient), control (Ca diet: Ca 0.45%), CP1 (Ca 0.45%+casein phosphopeptide 1%), PG1 (Ca 0.45%+gamma poly glutamic acid 1%), CPG (Ca 0.45%+casein phosphopeptide 1%+gamma poly glutamic acid 1%) and PG3 (Ca 0.45%+gamma poly glutamic acid 3%). Though daily Ca intake and food intake of experimental groups showed no significant difference that of control group. The values of fecal Ca excretion and urinary Ca excretion in groups fed γ -PGA were significantly lower than that in the control group. The values of Ca absorption in groups fed γ -PGA were significantly higher than that in the control group. The levels of femur Ca in γ -PGA supplemented group were significantly increased compared to the control group. Also, breaking force of femur in γ -PGA supplemented group showed about 40% increase compared to the control group. These results show that γ -PGA supplement could be helpful to increase Ca absorption as well as to intensify the femur strength and to increase the Ca content of femur in rats.

Key words: γ -PGA (γ -poly glutamic acid), Ca absorption, Ca content, breaking force of femur, rat

서론

칼슘은 한국인에게 가장 부족되기 쉬운 영양소로 국민건강, 영양조사 결과 1일 평균 섭취량이 500 mg 정도로 한국인 영양섭취기준이 정한 권장섭취량 700 mg에 미치지 못하고 있는 실정이다(1). 칼슘은 인체에 가장 많은 무기질로서 성인 체중의 약 1.5~2%정도를 차지하며 이 양의 99%는 뼈와 치아에 존재한다. 나머지 1%는 혈액, 세포외액, 근육과 기타 조직에 존재하여 혈액응고, 근육수축과 이완, 심장의 규칙적인 박동, 신경의 흥분과 자극전달, 효소의 활성화 등의 중요한 생리작용을 한다(2). 칼슘의 섭취가 부족하면 뼈의 성장 및 유지, 테타니증, 구루병, 골연화증 및 골다공증의 발생 위험이 높을 뿐 아니라 순환기계 질환, 고혈압, 동맥경화 및 고지혈증 등 각종 성인병과 깊은 관련이 있는 것으로 연구되고 있다(2-4).

장내 칼슘 흡수는 주로 pH가 낮은 산성환경의 소장 상부에서 이루어지는 능동적 수송기전(active transport)과 pH가

알카리성인 소장하부에서 농도 차에 의해 일어나는 확산기전(passive diffusion)으로 이루어지며(5,6), 그 흡수율은 비교적 낮아서 성인기에는 30%내외, 소아 및 청소년기는 40% 정도이고(7), 한국인의 경우는 12~46%정도로 보고되고 있다. 체내 칼슘 이용률은 성장기, 임신기, 수유기 등과 같이 체내 요구도가 클 때 증가되며, 지속적으로 칼슘 섭취가 낮은 경우도 증가된다. 칼슘의 흡수율은 함께 섭취하는 식이성분에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있어 단백질, 비타민 D, 유당과 펩타이드 등은 칼슘의 흡수를 촉진하는 반면, 인산, 수산, 피틴산, 식이섬유질, 지방 등은 흡수를 저해하는 것으로 알려져 있다. 이는 칼슘의 식이섭취도 중요하지만 섭취한 칼슘의 흡수를 증진시키는 것도 중요함을 의미하며, 특히 한국인의 칼슘섭취 수준이 권장섭취량의 70% 수준임을 감안할 때 흡수를 효율적으로 높일 수 있는 물질개발 연구는 중요하다 하겠다.

이와 관련하여 최근 식물(콩)을 발효시켜 생성된 음이온성 고분자 아미노산인 폴리감마글루탐산(poly- γ -glutamic

[†]Corresponding author. E-mail: msleeb@pulmuone.co.kr
Phone: 82-2-3277-8339. Fax: 82-2-3277-8503

acid, γ -PGA)이 장내에서 칼슘흡수를 촉진시키는 기능(8,9)이 있음이 연구되고 있어 신기능성 소재로 주목 받고 있다. γ -PGA는 글루탐산의 γ -카르복실기와 글루탐산의 α -아미노기가 아마이드 결합된 γ -폴리펩타이드로 미생물에 의해서 생산되는 아미노산계 폴리머이다(10). 지금까지 *Natrialba aegyptiaca*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus magaterium*, *Bacillus subtilis* 등의 균주가 생산하는 것으로 보고되어 있으며 콩 발효식품 미생물인 *Bacillus subtilis*에 의해서 생성되는 γ -PGA가 가장 일반적이다(11). γ -PGA의 보고된 효능으로는 면역기능 증강, 세포내 세균 및 바이러스 감염에 대한 억제효능 및 암세포 사멸효과, 세포벽보호 및 항산화효과 등이 있으며(12-14) 그 외 최근에 연구되고 있는 장내 칼슘흡수 증진효과에 대한 기전은 아직 확실히 밝혀져 있지 않으나 Tanimoto 등(9)은 pH가 낮은 소장하부에서 Ca 용해성을 증가시키고 소장의 통과시간을 지연시켜 장내 Ca 흡수를 증가시키는 것으로 보고하였다. 그러나 이는 in vitro 및 단회 투여에 의한 in vivo 보고로서 γ -PGA가 칼슘흡수를 증가시키는 증진제로서의 효과가 있는지에 대한 추가연구는 더욱 활발히 진행되어야 할 것으로 보인다.

따라서 본 연구에서는 흰쥐를 대상으로 동일한 조건의 칼슘 섭취하에서 γ -PGA보충이 체내 칼슘흡수 증진 및 골대사에 미치는 영향을 알아보려고 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육관리

실험에 사용된 동물은 4주령된 Sprague Dawley종으로 수컷 흰쥐 70마리를 구입하여 1주간 일반 고형사료((주)샘

타코 Biokorea, 경기도)로 적응시킨 뒤, 칼슘결핍을 유도하기 위해 3주간 칼슘결핍식이를 급여한 후 난괴법(randomized complete block design)에 의해 각 그룹당 10마리씩 6군으로 나누었다. 한 군은 계속 칼슘결핍식이를 4주간 급여하였고, 한 군은 대조군으로 칼슘만을, 나머지 4군은 칼슘공급과 함께 각각 γ -PGA, CPP, γ -PGA와 CPP를 급여하였다. 실험동물 사육실의 실내환경은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 명암 12시간 cycle로 유지하였으며, 물과 실험식은 자유급식 형태로 공급하였고 실험기간 동안의 사료섭취량은 격일마다, 체중은 1주일에 한 번 일정시간에 측정하였다.

실험식이

본 실험에 사용된 식이조성은 Table 1과 같다. 실험군은 ① basal-칼슘결핍군(Ca free group) ② control-칼슘보충군(scallop shell powder 34.4%(Ca 36%), fish bone meal 65.6%(Ca 38%), total Ca 0.45%) ③ CP1-CPP1%보충군(Ca 0.45%+casein phosphopeptide 1%) ④ PG1- γ -PGA1%보충군(Ca 0.45%+poly gamma glutamic acid 1%) ⑤ CPG-CPP1%와 γ -PGA1% 보충군(Ca 0.45%+casein phosphopeptide 1%+poly gamma glutamic acid 1%) ⑥ PG3-PGA3% 보충군(Ca 0.45%+poly gamma glutamic acid 3%)으로 나누어 식이를 조성하였다. 칼슘은 천연의 칼슘급원 중에서 광우병 등에 안전한 가리비조개칼슘(scallop shell powder, 일본 NC Corp.)과 어골분(codfish bone, 일본 NC Corp.)을 사용하였다. γ -PGA는 *Bacillus subtilis*에 의한 발효과정에 의해 제조된 대만 Vedan, Ltd.에서 구입하였으며, γ -PGA의 효능 비교를 위한 casein phosphopeptide은 우유 casein(카제인, 케이신)을 단백질 분해효소인 트립신에 의한 가수분해 과정에 의해 제조된 일본 Meiji Seika Kaisha, Ltd.에서 구입하였다. CPP와 γ -PGA의 공급량은 기존의

Table 1. Composition of the experimental diets

(g/kg)

Ingredient	Group ¹⁾						
	Basal (Ca deficient)	Control (Ca)	CP1 (CPP1%)	PG1 (PGA1%)	CPG (CPP1%+PGA1%)	PG3 (PGA3%)	
Corn starch	538.6	517.5	507.5	507.5	497.5	477.5	
Casein	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	
Sucrose	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
Soybean oil	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	
Cellulose	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	
Mineral mix ²⁾	25.9	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	
Vitamin mix ³⁾	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	
Choline chloride	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	
DL-methionine	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	
Ca ⁴⁾		12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	
CPP			10.0		10.0	10.0	
PGA				10.0	10.0	30.0	
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000	

¹⁾Basal (Ca free), Control (Ca 1.2%), CP1 (Ca 1.2%+casein phosphopeptide 1%), PG1 (Ca 1.2%+poly gamma glutamic acid 1%), CPG (Ca 1.2%+casein phosphopeptide 1%+poly gamma glutamic acid 1%), PG3 (Ca 1.2%+poly gamma glutamic acid 3%).

²⁾The composition of mineral mix was based on AIN-93G (calcium free).

³⁾Vitamin mix: AIN-93.

⁴⁾Scallop shell powder 34.4% (Ca 36%) and fish bone meal 65.6% (Ca 38%).

Table 2. Body weight, body weight gain and food efficiency rate (FER) in the experimental groups

Group ¹⁾	Initial BW (g)	Final BW (g)	Weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	FER ²⁾
Ca-deficient	105.03±7.10 ^{3)NS4)}	343.13±19.57 ^{b5)}	4.86±0.43 ^b	18.63±2.29 ^{NS}	0.26±0.02 ^{NS}
Control	104.93±5.56	364.73±27.62 ^a	5.30±0.50 ^a	19.24±2.20	0.28±0.03
CP1	105.03±7.01	354.24±13.00 ^{ab}	5.09±0.33 ^{ab}	19.48±2.41	0.26±0.02
PG1	104.88±5.79	374.45±16.70 ^a	5.50±0.35 ^a	19.68±2.49	0.28±0.02
CPG	105.38±6.01	373.79±15.55 ^a	5.48±0.37 ^a	19.45±2.61	0.28±0.02
PG3	105.56±7.70	366.34±18.76 ^a	5.32±0.32 ^a	19.22±2.45	0.28±0.02

¹⁾Groups are the same as in Table 1.

²⁾Food Efficiency Rate = Body weight gain (g)/Food intake (g).

³⁾Values are mean±SD.

⁴⁾Not significant.

⁵⁾Different superscripts within the same column indicate significant differences (p<0.05) among groups by Duncan's multiple range test.

동물과 사람을 대상으로 한 연구결과에서 제시한 수준과 칼슘공급량을 고려하여 결정하였다(8,9). 실험식은 산화를 방지하기 위하여 사료배합 직후 밀봉하여 냉암소에서 보관하면서 급여하였다.

시료채취

실험동물은 시료채취 전 24시간동안 절식시킨 후, 실험당일 ether에 마취시킨 후 회복하여 심장으로부터 전혈을 채취하고 여기에 1 unit/mL blood 농도의 heparin을 첨가하여 혈액응고를 방지하며 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장을 얻어 분석 전까지 -20°C이하에서 냉동보관하였다. 혈액을 채취한 흰쥐는 대퇴골을 적출하여 골격에 붙어있는 근육, 인대, 지방 등을 제거한 후 열풍건조 후 냉동보관하였다. 뇨와 변은 실험종료 이틀 전 metabolic cage에서 적응시킨 후 24시간동안 채취하여 냉동보관하였다가 분석에 사용하였다.

시료분석

혈액 및 뇨의 생화학적 분석 : 골격형성(bone formation)과 관련이 깊은 것으로 알려져 있는 혈청 alkaline phosphates(ALP)의 활성은 kind-King의 비색법을 이용한 kit(아산제약)를 사용하여 분석하였다(15). 뇨와 혈중 creatinine함량은 Jaffe reaction을 이용한 kit(아산제약)를 사용하여 측정하였으며 뇨 중 hydroxyproline함량은 Bergman과 Loxley의 방법(16)으로 비색정량하였다. 뇨와 혈중 Ca함량은 OCPC법을 이용한 kit(아산제약)를 사용하여 측정하였다.

골강도 및 대퇴부, 변 중 Ca 함량측정 : 대변과 뼈의 칼슘 함량은 105°C에서 건조 후 550~600°C의 회화로에서 6~8시간 회화시켜 얻은 회분을 HCl용액에 용해한 후 회석하여 ICP(Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy(JU 38S, France)로 측정하였다. 대퇴골 강도는 Texture analyzer(TA-XT Plus, Stable Micro Systems Ltd, UK)를 이용하여 plunger가 대퇴골의 중심부위에 오도록 조정 후 3 mm/sec의 속도로 하강시켜 대퇴골을 파단시키도록 하였다. 이때 plunger에 가해진 하중량(kg)을 길이(mm) 및 두께(mm)에 대한 hardness(kg)로 나타내었다(17).

통계분석

실험결과는 SPSS 10.1 package를 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차를 계산하였고, 각 실험군간의 차이는 one way ANOVA를 사용하여 비교하였으며 (α=0.05), Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다.

결과 및 고찰

체중변화 및 식이섭취량

실험기간동안 각 실험군의 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율은 Table 2와 같다. 최종 체중 및 시험기간 동안의 체중증가량은 그룹간 유의적(p<0.05) 차이를 보여 칼슘결핍군이 가장 낮았고 칼슘과 함께 PGA 1%를 섭취한 그룹이 가장 높았다. 반면, 식이섭취량과 식이효율은 칼슘결핍군에서 다소 낮은 경향을 보였으나 그룹간의 유의적인 차이는 없었다.

혈청의 골관련 지표

혈청의 골형성 지표인 ALP의 활성과 Ca함량을 Table 3에 나타내었다. ALP는 골격형성(bone formation)과 관련이 깊은 것으로 알려져 있으며, 이의 활성은 대사성 골질환 등 골대사 회전이 활발할 때, 즉 골격형성 시 조골세포의 활동이 증가되어 골교체율이 빠를 때 혈중 농도가 증가된다고 알려져 있다(18). 본 연구에서는 칼슘결핍군이 153.75±25.79

Table 3. Alkaline phosphatase and Ca concentration in serum

Group ¹⁾	Alkaline phosphatase (IU/L)	Ca (mg/dL)
Ca deficient	153.75±25.79 ^{2)a3)}	6.38±0.70 ^b
Control	85.00±12.07 ^b	6.98±0.65 ^{ab}
CP1	76.25±5.95 ^{bc}	6.59±0.55 ^{ab}
PG1	68.63±6.00 ^c	6.88±0.38 ^{ab}
CPG	80.38±7.56 ^{bc}	7.15±0.39 ^a
PG3	78.00±9.85 ^{bc}	6.94±0.36 ^{ab}

¹⁾Groups are the same as in Table 1.

²⁾Values are mean±SD.

³⁾Different superscripts within the same column indicate significant differences (p<0.05) among groups by Duncan's multiple range test.

IU/L로 실험군들에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 높아 칼슘결핍군에서 골교체가 일어나고 있음을 알 수 있다. 또한, 칼슘과 함께 γ -PGA 1%를 보충한 그룹의 ALP가 68.63 ± 6.00 IU/L로 다른 실험군들에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 가장 낮았다. 이러한 결과는 칼슘결핍군에 비해 칼슘보충 및 칼슘과 이소플라본을 보충한 그룹에서 ALP가 낮았음을 보고한 Yang 등(19)의 결과와 유사하였으며, Aloia 등(20)의 연구에서도 골다공증 환자에서 ALP 활성도가 증가된다고 보고한 바와 같다. 이는 칼슘을 공급하지 않은 그룹이 다른 그룹에 비해 효소활성이 가장 높아 골교체율이 높은 것을 의미하며, 본 실험에서도 칼슘보충군, 칼슘과 CPP, 칼슘과 PGA 및 칼슘과 CPP+PGA를 보충한 그룹에서 칼슘을 공급하지 않은 그룹에 비해 상대적으로 적은 양의 골 교체가 일어나고 있음을 알 수 있었다.

혈청의 Ca농도는 칼슘결핍군이 보충군 그룹들에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 낮았다. 그러나 일반적으로 혈중 칼슘농도는 식이섭취량, 흡수량 및 체외 배설량, 뼈축적량과 뼈로부터의 용출량, 신장에서 재흡수량과 뇨중 배설량 등에 의해서 항상성이 유지되는 것으로 알려져 있으나(21,22) 본 실험의 칼슘결핍군은 칼슘결핍 유도 후 추가 실험기간동안 계속적인 칼슘결핍으로 인해 혈중 칼슘량의 유의적 감소를 보인 것으로 생각된다. 이와 같은 결과는 칼슘섭취가 높을수록 혈장 중 칼슘함량이 높았다는 Thomas 등(23) 및 Oh와 Lee(24)의 결과와도 유사하였다.

칼슘흡수율

칼슘섭취량과 칼슘배설량을 통한 칼슘흡수율 및 칼슘보유량은 Table 4와 같다. 표에서 보는 바와 같이 칼슘결핍군은 분과 뇨중 배설량이 크게 감소되어 칼슘결핍상태에 있는 것을 알 수 있다($p < 0.05$). γ -PGA 1%를 보충시킨 그룹의 분과 뇨중 칼슘배설량은 칼슘만을 보충시킨 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 칼슘흡수율 또한 56.53%인 대조군

(칼슘보충군)에 비해 γ -PGA 1%를 함께 보충했을 경우 73.52%로 유의적인 증가를 나타내었다. 이는 대조군에 비해 30%정도 높은 수준으로 흡수율의 차이는 있지만 Tanimoto 등(9)에 의한 연구에서 대조군에 비해 γ -PGA 보충군의 칼슘흡수율이 53%이상 증가하였다는 결과와 일치한다. 그러나 γ -PGA 1%와 γ -PGA 3% 보충에 따른 칼슘흡수율은 각각 73.52%, 72.09%로 농도에 따른 차이는 보이지 않았다. 또한 CPP를 보충한 그룹의 흡수율은 67.41%로 γ -PGA를 보충한 그룹에 비해 낮은 흡수율을 보였으며, γ -PGA와 CPP를 함께 보충한 그룹의 흡수율은 73.67%로 73.52%인 γ -PGA보충군과 유사한 수준을 나타내었다.

CPP(casein phosphopeptide)는 우유 casein(카제인, 케이신)을 단백질 분해효소인 트립신에 의해 가수분해되어 생성되는 것으로 여러 연구에 의해 칼슘의 흡수를 촉진한다는 것이 밝혀졌다(25,26). Naito 등(27)은 CPP가 소화효소에 의해 공격받기 어렵고, 또 Ca이온과 가용성의 염을 형성하기 때문에 Ca의 흡수를 촉진하는 것으로 보고하였다. 즉, 칼슘이 흡수되기 위해서는 가용성 상태로 소장내에 존재해야 하는데 소장하부의 pH는 알칼리측에 기울어져 있어 칼슘이 침전하거나 불용화되기 쉬운 상태가 되어 소장하부에서 흡수되지 못하고 체외로 배설되지만, CPP가 칼슘을 가용화시킴으로서 흡수를 촉진하게 되는 매커니즘이다(28,29). γ -PGA의 칼슘흡수 기전도 CPP와 유사하여 소장하부에서 칼슘용해성을 증진시키고 칼슘의 확산기전을 증가시키는 것으로 연구되고 있다(9). 이와 함께 γ -PGA는 소장내에서 칼슘의 통과시간을 지연시킴으로써 흡수를 증가시키는 것으로 보고되기도 하였다(30,31). 이러한 선행연구에 의해 본 실험에서는 흡수기전이 유사하고 이미 효능이 보고된 CPP 보충그룹을 γ -PGA의 효능검증을 위한 대조그룹으로 실험군에 추가하였다. 본 연구에서도 칼슘만을 섭취한 그룹에 비해 칼슘과 CPP를 보충한 그룹의 흡수율이 유의적으로 높았으며 γ -PGA를 보충했을 경우 CPP를 보충한 그룹보다 높은 흡수율을 확인할 수 있었다. 이러한 실험결과는 γ -

Table 4. Calcium intake, Ca absorption and retention in the experimental groups

Group ¹⁾	Ca intake (mg/day)	Fecal Ca excretion (mg/day)	Urinary Ca excretion (mg/day)	Ca absorption rate (%) ²⁾	Ca retention (mg/day) ³⁾
Ca deficient	-	$3.50 \pm 0.55^{4c5)}$	0.06 ± 0.04^c		
Control	$86.16 \pm 10.52^{NS6)}$	37.32 ± 10.26^a	0.14 ± 0.04^a	56.53 ± 11.23^b	48.70 ± 12.36^b
CP1	87.21 ± 10.11	28.28 ± 10.08^{bc}	0.14 ± 0.12^a	67.41 ± 11.53^{ab}	58.79 ± 10.05^{ab}
PG1	88.12 ± 11.06	23.22 ± 10.86^b	0.12 ± 0.03^{ab}	73.52 ± 13.52^a	64.78 ± 11.93^a
CPG	87.08 ± 11.41	22.82 ± 9.07^b	0.10 ± 0.03^{abc}	73.67 ± 10.44^a	64.15 ± 9.09^a
PG3	86.05 ± 11.96	23.93 ± 8.97^b	0.09 ± 0.04^{bc}	72.09 ± 10.45^a	62.03 ± 8.99^{ab}

¹⁾Groups are the same as in Table 1.

²⁾Ca absorption rate (%) = (Ca intake - fecal Ca excretion) / Ca intake \times 100.

³⁾Ca retention (mg/day) = (Ca intake - fecal Ca excretion - urinary Ca excretion).

⁴⁾Values are mean \pm SD.

⁵⁾Different superscripts within the same column indicate significant differences ($p < 0.05$) among groups by Duncan's multiple range test.

⁶⁾Not significant.

Table 5. Hydroxyproline and creatinine contents in urine

Group ¹⁾	Hydroxyproline (μg/d)	Creatinine (mg/d)	OHP/Cre (μg/mg)
Ca deficient	93.98±31.40 ^{2)NS3)}	2.04±0.55 ^{NS}	47.42±15.10 ^{NS}
Control	79.78±41.94	2.12±1.19	42.13±25.71
CP1	81.98±18.17	2.28±0.83	40.86±18.37
PG1	67.07±14.82	2.37±1.25	38.70±25.00
CPG	77.42±19.65	2.44±1.00	36.65±18.81
PG3	87.67±22.53	2.31±0.83	46.15±30.44

¹⁾Groups are the same as in Table 1.

²⁾Values are mean±SD.

³⁾Not significant.

PGA보충이 칼슘흡수율 증진에 효과적으로 작용한다는 것을 보여주는 것이라 하겠다.

노중 hydroxyproline(OHP) 및 creatinine(Cre) 함량 골흡수 지표인 소변 중의 hydroxyproline과 creatinine의 비는 Table 5에 나타내었다. hydroxyproline의 경우 그룹간의 유의적인 차이는 없었으나 칼슘결핍군이 93.98±31.40 μg/d으로 가장 높고 칼슘섭취와 함께 γ-PGA를 보충한 그룹은 67.07±14.82 μg/d로 가장 낮아 두 그룹간에 유의적 차이를 보였다(p<0.05). Horsman과 Gallagher(32) 및 Dull과 Henneman(33)은 칼슘 평형이 낮거나 소변의 hydroxyproline 배설량이 높은 사람들의 골격손실이 더 빠르게 일어남을 보고한 바 있어, 칼슘결핍군의 골 대사에 장애가 있음을 간접적으로 보여주고 있다. Creatinine의 경우도 칼슘결핍군이 2.04±0.55 mg/d로 나머지 그룹보다 낮게 나타났으나 그룹간에 유의한 차이는 없었다. OHP/Cre의 경우 유의적 차이는 없었으나 칼슘결핍군이 47.42±15.1 μg/mg로 가장 높아 골격분해가 이루어지고 있음을 짐작할 수 있었고, 반면 칼슘과 함께 CPP와 γ-PGA를 보충한 그룹이 36.65±65 μg/mg로 가장 낮은 경향을 보였다. 그러나 칼슘과 γ-PGA 1%를 보충한 그룹도 38.70±25.00 μg/mg으로 낮은 경향을 보인 반면 γ-PGA 3%보충 그룹에서는 46.15±30.44 μg/mg으로 칼슘결핍군과 유사한 수준을 나타내었다. 이러한 상이한 결과는 향후 γ-PGA 수준을 달리한 추가연구가 필요할 것으로 보인다.

대퇴골의 칼슘함량 및 골강도

대퇴골의 칼슘함량은 Fig. 1, 대퇴골의 강도는 Fig. 2와 같다. 대퇴골의 칼슘함량은 칼슘결핍군이 516.77 mg으로 가장 낮아 나머지 그룹들과 유의적 차이를 보였다(p<0.05). 또한 칼슘만을 섭취한 군이 636.59 mg에 비해 γ-PGA 1%와 γ-PGA 3%보충군은 각각 691.19 mg, 877.07 mg으로 칼슘만을 섭취한 그룹에 비해 γ-PGA를 보충했을 경우 최소 8.5%에서 최고 33%까지 농도 의존적으로 유의적으로 높은 칼슘함량을 보였다(p<0.05). 대퇴골강도 또한 그룹들간의 유의적(p<0.05) 차이를 보여 칼슘결핍군이 13.79 kg으로 가장 낮았고 칼슘섭취군은 15.7 kg으로 칼슘섭취가 증가할수

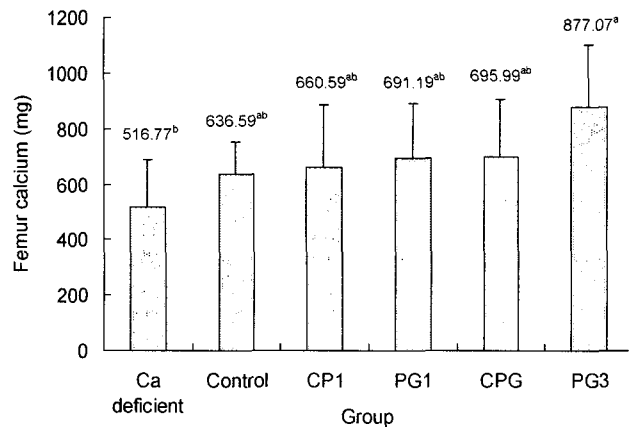


Fig. 1. Calcium content of femur in the experimental groups. ^{a,b}Different superscripts indicate significant differences (p<0.05) among groups by Duncan's multiple range test.

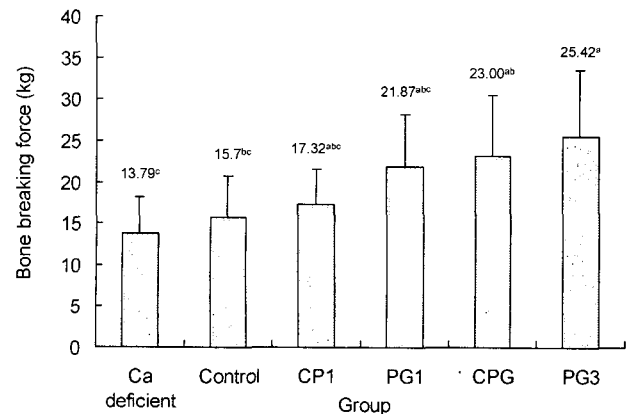


Fig. 2. Bone breaking force of femur in the experimental groups. ^{a-c}Different superscripts indicate significant differences (p<0.05) among groups by Duncan's multiple range test.

록 대퇴골의 칼슘함량이 증가한다고 보고한 선행연구(34-36)와 같으며, 칼슘섭취량과 골밀도간 양의 상관관계가 있음을 동물실험과 인체실험을 통해 입증한 보고와도 같은 결과를 보였다(37,38). 또한 칼슘+CPP섭취군과 칼슘+PGA섭취군간의 유의적 차이는 없었으나 CPP보충군에 비해 PGA보충군의 대퇴골 강도가 더 높게 나타났으며 γ-PGA 1%와 γ-PGA 3%를 섭취한 군의 강도는 각각 21.87 kg, 25.42 kg

으로 농도의존적인 유의적 차이는 없었으나 함량이 증가할수록 대퇴골강도가 증가하였다. 이러한 실험결과는 γ -PGA가 칼슘흡수를 도와 골대사에 효과적으로 이용될 수 있는 소재임을 보여주는 것이라 하겠다.

요 약

칼슘은 한국인에게 가장 부족되기 쉬운 영양소로 섭취만큼이나 흡수가 중요한 요인이 되는 미네랄이다. 최근 칼슘흡수 증진에 효과가 있는 소재로 주목받고 있는 폴리감마글루탐산(γ -PGA; poly- γ -glutamic acid)이 체내 칼슘흡수에 미치는 영향을 알아보기 위해 4주령된 수컷 흰쥐(Sprague Dawley female rats)를 이용하여 3주간 칼슘결핍식을 급여시켜 칼슘결핍을 유도 후에, γ -PGA 보충식을 4주간 급여하였다. 실험군은 칼슘결핍군(Ca free group), 칼슘보충군(칼슘1.2% 보충군, total Ca 0.45%), 칼슘과 CPP1% 보충군(칼슘1.2%+CPP1% 보충군), 칼슘과 PGA1% 보충군(칼슘1.2%+ γ -PGA1% 보충군), 칼슘과 CP1%+PGA1% 보충군(칼슘1.2%+CPP1%+ γ -PGA1% 보충군), 칼슘과 PGA3% 보충군(칼슘1.2%+ γ -PGA3% 보충군)으로 구분하였다. 이때 γ -PGA의 효과를 검증하기 위해 γ -PGA와 칼슘흡수 기전이 유사하고 이미 효능이 알려져 있는 casein phosphopeptide 보충군을 실험군에 추가하였다. 식이섭취량은 칼슘결핍군이 다소 낮았으나 유의적인 차이는 없었으며 칼슘섭취량도 유의적 차이 없이 비슷한 수준을 보였다. 변 및 뇨중 칼슘 배설량은 칼슘만을 섭취한 대조군에 비해 γ -PGA보충군에서 유의적으로 낮았다($p<0.05$). 칼슘흡수율 또한 그룹간의 유의적 차이를 보여 칼슘만을 섭취한 그룹에 비해 γ -PGA를 함께 보충한 그룹의 흡수율이 30% 더 높은 경향을 보였으며 이는 이미 효능이 알려진 CPP보다 우수한 수준이었다. 골형성 지표인 혈중 ALP를 측정된 결과 대조군에 비해 γ -PGA보충군이 유의적으로($p<0.05$) 낮았고, 혈중 칼슘농도는 항상성을 유지하며 그룹간의 유의적 차이 없이 비슷한 수준을 보였으며, OHP/Cre도 유의적 차이는 없었다. 뼈 중 칼슘함량 및 강도는 칼슘결핍군이 나머지군에 비해 유의하게($p<0.05$) 낮았으며, 칼슘함량의 경우 칼슘만을 보충한 그룹에 비해 γ -PGA를 함께 보충한 그룹이 농도 의존적으로 높은 칼슘함량을 보였고($p<0.05$), 골강도의 경우는 유의적 차이는 없었으나 γ -PGA를 함께 보충한 그룹이 농도 의존적으로 골강도가 높은 경향을 나타내었다. 결론적으로 칼슘결핍을 유발한 흰쥐에 칼슘만을 보충시켰을 때 보다 칼슘과 함께 γ -PGA를 함께 보충했을 경우, 칼슘흡수 증진 및 골대사에 긍정적으로 기여함을 확인할 수 있었다. 그러나 좀 더 명확한 효과 검증을 위해서는 차후 많은 개체수와 장기간의 식이를 통한 반복실험, γ -PGA 섭취수준에 따른 추가실험이 진행되어야 할 것으로 생각된다.

문 헌

1. Ministry of Health and Welfare. 1999. Report of the National Health · Nutrition Research.
2. Allen LH, RJ Wood. 1994. Calcium and phosphours. In *Modern Nutrition in Health and Disease*. 8th ed. Shils ME, Olson JA, Shike M, eds. Lea & Febiger, Philadelphia. p 144-163.
3. Rivilin RS. 1991. An update on calcium: applications for the 90's. *Am J Clin Nutr* 54 (1 Suppl): 177s-290s.
4. McCarren DA. 1997. Role of adequate dietary calcium intake in the prevention and management of salt-selective hypertension. *Am J Clin Nutr* 65: 712-716.
5. Pansu D, Bellaton C, Bronner F. 1981. The effect of calcium intake on saturable and non-saturable components of duodenal calcium transport. *Am J Physiol* 240: G32-G37.
6. Bronner F. 1992. Current concepts of calcium absorption: an overview. *J Nutr* 122: 641-643.
7. Recker RR, Bammi A, Barger-Lux J, Heaney RP. 1988. Calcium absorbability from milk products, an imitation milk, and calcium carbonate. *Am J Clin Nutr* 47: 93-95.
8. Park C, Chol 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.
9. Tanimoto H, Mori M, Motoki M, Torii K, Kadowaki M, Noguchi T. 2001. Natto mucilage containing poly- γ -glutamic acid increases soluble calcium in the rat small intestine. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 516-521.
10. Aono R. 1987. Characterization of structural component of cell walls of alkalophilic strain of *Bacillus* sp. C-125. *Biochem J* 245: 467-472.
11. Perez-Camero G, Congregado F, Bou JJ, Munoz-Guerra S. 1999. Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly- γ -glutamic acid. *Biotechnol Bioeng* 63: 110-115.
12. Hahm JH, Lee TY, Lee JS, Park C, Sung MH, Poo H. 2004. Antitumor effect of poly- γ -glutamic acid by modulating cytokine production and NK cell activity. Abstract No. H003 presented at 2004 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies, Seoul, Korea. Oct. 21-22.
13. Lee JS, Park C, Poo H, Kim CJ, Sung MH. 2004. Enhancement of immunogenicity for the target antigen expressed on the surface of lactic acid bacteria with poly- γ -glutamic acid. In proceedings of the 3rd Japan-Korea Joint Meeting on Molecular Display, Kobe, Japan. July 22. p 9-11.
14. Lee JS, Poo H, Kim CJ, Choi YH, Park C, Sung MH. 2004. Poly-gamma-glutamic acid: Biological characterization and its applications. Abstract No. P676 presented at 2004 International Symposium and Annual Meeting of Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Chungbuk, Korea.
15. Kind PRN, King EJ. 1954. Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolyzed phenol with amino antipyrine. *Am J Clin Pathol* 24: 322-326.
16. Bergman IB, Loxley R. 1963. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal Chem* 35: 1961-1965.
17. Lee JG, Lim YS, Joo DS, Jeong IH. 2002. Effects of diet with sea tangle (*Kjellmaniella crassifolia*) on calcium absorption, serum composition and feces in rats. *J Kor Fish Soc* 35: 601-607.
18. Han IK, Park WK, Choi WW, Shin HH, Kim SW. 1989. A study on hormonal changes and bone densities in Korean

- menopausal women. *J Korean Soc Endo* 4: 21-26.
19. Yang SO, Yang SB, Kwon ST, Lee SY, Kim SB. 1999. The effects of dietary supplement including isoflavone on bone metabolism in ovariectomized rats. *J Korean Soc Bone Metabolism* 6: 11-17.
 20. Aloia JF, Cohn SH, Vaswani A, Yeh JK, Yuen K, Ellis K. 1985. Risk factors for postmenopausal osteoporosis. *Am J Med* 78: 95-100.
 21. Avioli LV. 1988. Calcium and phosphorus. In *Modern Nutrition in Health and Disease*. 7th ed. Goodhart RS, Shils ME, eds. Lea & Febiger, Philadelphia. p 142-158.
 22. Watson RC, Grossman H, Meyers MA. 1994. Radiologic findings in nutritional disturbances. In *Modern nutrition in health and disease*. 8th ed. Shils ME, Olsom JA, Shike M, eds. Lea & Febiger, Philadelphia. p 861-908.
 23. Thomas ML, Simmon DJ, Kidder L, Ibarra MJ. 1991. Calcium metabolism and bone mineralization in female rats fed diets marginally sufficient in calcium: effects of increased dietary calcium intake. *Bone and Mineral* 12: 1-14.
 24. Oh SH, Lee KH. 1996. The effect of combined estrogen/calcium therapy on bone metabolism in ovariectomized rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 993-1005.
 25. Natio H, Lee YS. 1980. Phosphopeptides and soluble calcium in the small intestine of rats given a casein diet. *Br J Nutr* 43: 457-467.
 26. Mykkanen HM, Wasserman RH. 1980. Enhanced absorption of calcium by casein phosphopeptides in rachitic and normal chicks. *J Nutr* 110: 2141-2148.
 27. Naito H, Kawakami A, Imamura T. 1972. In vivo formation of phosphopeptide with calcium-binding property in the small intestinal tract of the rat fed on casein. *Agric Biol Chem* 36: 409.
 28. Lee YS, Natio H. 1982. Effect of lactose on calcium absorption enhanced γ casein phosphopeptides in the rat small intestine. *Korean J Nutr* 15: 1-8.
 29. Lee SW, Hwangbo S, Yang HJ, Nam MS, Yu JH, Chung CI. 2002. Studies on the calcium phosphopeptide in milk casein. *Korean J Food Sci Ani Resour* 22: 55-58.
 30. Barger-Lux MJ, Heaney RP, Lanspa SJ, Healy JC, DeLuca HF. 1995. An investigation of sources of variation in calcium absorption efficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 406-411.
 31. Duflos C, Bellaton C, Pansu D, Bronner F. 1995. Calcium solubility intestinal sojourn time and paracellular permeability codetermine passive calcium absorption in rats. *J Nutr* 125: 2348-2355.
 32. Horman A, Gallagher JC. 1977. Prospective trial of oestrogen and calcium in postmenopausal women. *Br Med J* 2: 789-792.
 33. Dull TA, Henneman PH. 1988. Urinary hydroxyproline as an index of collagen turnover in bone. *New Engl Med* 118: 1217.
 34. Lee YS, Park MN, Kim EM. 1997. Effect of dietary calcium levels on peak bone mass formation in growing female rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 480-487.
 35. Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW. 1989. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 127: 7-19.
 36. Donahue HJ, Mazzeo RS, Horvath SM. 1988. Endurance training and bone loss in calcium deficient and ovariectomized rats. *Metabolism* 37: 741-744.
 37. Lee WT, Leung SS, Wang SH, Xu YC, Zeng WP, Lau J, Oppenheimer SJ, Cheng JC. 1994. Double-blind, controlled calcium supplementation and bone mineral accretion in children accustomed to a low-calcium diet. *Am J Clin Nutr* 60: 744-750.
 38. Chan GM. 1991. Dietary calcium and bone mineral structure of children and adolescents. *Am J Dis Child* 145: 631-634.

(2005년 12월 28일 접수; 2006년 3월 3일 채택)