

## 킬레이트화 칼슘 및 게르마늄의 방울토마토 시용에 따른 흡수 특성

장영희\* · 이승환 · 박영일 · 이규승<sup>1</sup>

(주)바이오넬 기술연구소, <sup>1</sup>충남대학교 농화학과

## Characteristics of the Absorption of Cherry Tomato by the Application of Chelated Calcium and Germanium

Young-Hee Jang\*, Seung-Hwan Lee, Young-Il Park, and Kyu-Seung Lee<sup>1</sup>

Research Institute, Bionel co.,LTD, Nonsan 320-837, Korea

<sup>1</sup>Department of Agricultural Chemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Bloods from slaughtered Korean native cattle (Hanwoo : *Bos taurus coreanae*) can be used in agriculture with various beneficial effects on the environment. This study was performed to find out the effect of the application of calcium and germanium, which are chelated with peptides made of cattle bloods on the absorption of them by cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Peptide was purified by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration from serum protein, which is composed of Asp, Glu, Lue etc. Chelated Ca and Ge were produced by reacting the peptide with CaCl<sub>2</sub> and Ge-132<sup>®</sup>. Then, they were applied to cherry tomato during cultivation period at the rate of 300mL x 3 times (10 days interval) for each tomato tree. Application of chelated-Ca increased the Ca contents in leaves and fruits of cherry tomato showing as 19.9% and 23.4% in newly prepared chelated-Ca-200 (200 mg L<sup>-1</sup>), 8.1% and 6.8% in commercial Calciloid Ca-300 (300 mg L<sup>-1</sup>) compared to 3152.6 and 63.2 mg kg<sup>-1</sup> in control, respectively. Application of chelated-Ge showed the increase in the germanium contents in both leaves and fruits of cherry tomato by over 6 times than those of control and over 4 times than Ge 132<sup>®</sup>-20 application. As a result of this study, it seemed that the application of chelated-Ca and chelated-Ge would be more effective than the existing commercial one in the absorption of calcium and germanium by cherry tomato.

**Key words:** Peptide, Chelate, Calcium, Germanium, Cherry tomato

### 서 언

우리나라 국민 소득의 증가로 육류 소비량의 증가와 함께 도축 수도 증가하고 있다. 한우의 경우, 2004년 324,595두, 2011년 720,508두로 지속적으로 증가하는 추세를 보이고 있고 돼지와 닭의 경우도 동일한 추세이다 (한국육류유통수출입협회 도축현황). 이는 발생 혈액량의 증가로 직결되므로 많은 정화 비용이 낭비되고 있고 일부에서는 그대로 물로 방출되어 수질 오염의 원인이 되고 있으며 2012년부터는 해양 투기가 금지되어 있기 때문에 그 활용이 시급한 상황이다. 따라서 현실적으로 지속적인 활용이 가능한 기술 및 제품 개발이 필요한 실정이다.

칼슘이 부족할 경우 작물에 생리적 장애 발생으로 수량 감소 및 품질저하가 일어나고 토양에 석회가 충분해도 뿌리의 흡수력이 저하되면 칼슘의 이동이 어려워 엽면시비로 양

분을 공급시키는 노력들이 이루어지고 있다 (Chung, 2001). 따라서 칼슘을 비롯한 미네랄 흡수를 향상시키는 기술이 필요한 실정이다. 또한, 건강지향적인 소비 성향을 충족할 수 있는 성분의 작물적용이 필요한데 그 대표적인 것이 게르마늄으로 항종양, 항돌연변이, 면역강화, 항염증 및 약리 효과 등을 갖는다고 보고하고 있다 (Lim et al., 2008). 게르마늄도 칼슘처럼 그 자체로는 흡수가 어렵기 때문에 흡수를 향상시키는 기술이 필요하다.

미네랄 흡수를 향상시키는 미네랄 결합 펩타이드가 개발되었고 in vitro상에서 흡수가 향상되었다는 보고 (Ait-Oukhatar et al., 1999)도 있는데 이는 미네랄의 흡수 한계를 갖는 작물에 미네랄 결합 펩타이드를 적용함으로써 미네랄 흡수를 향상시킬 수 있다고 예견된다. 따라서 도축혈액의 활용이라는 친환경적인 측면에서 혈액으로부터 분리한 펩타이드에 칼슘 및 게르마늄을 결합시킨 제제를 방울토마토에 적용하여 칼슘, 게르마늄의 흡수 특성을 확인하기 위해 본 연구를 수행하였다.

접수 : 2012. 10. 2 수리 : 2012. 10. 15

\*연락처 : Phone: +82417429651

E-mail: pine805@naver.com

## 재료 및 방법

**혈청 분리 및 가수분해** 한우 혈액은 논산시 지산동 논산특별도축장에서 도축 즉시 멸균용기에 수거하여 4°C에서 24시간 동안 정치하였다. 이를 4°C, 3,000 xg 조건에서 20분 동안 원심분리 후 얻어진 혈청을 연구시료로 사용하였다. 한우 혈액으로부터 분리한 혈청을 단백질 가수분해 효소인 alcalase, flavourzyme, esperase, protamex로 최적 조건에서 12시간 동안 각각 가수분해를 실시하였다. 기질대비 첨가한 효소량은 250:1, 500:1, 1,000:1로 하였다. 단백질 가수분해 효소를 이용하여 얻은 혈청 가수분해물은 유리 아미노산 분석에 사용하였다.

**아미노산 분석** 구성 아미노산 분석은 한국기초과학지원연구원의 fluorometric analysis system (Waters 510 HPLC Pump, Gradient Controller, 717 Automatic sampler, USA)을 활용하여 분석하였다. 혈청 100 µL을 취한 후 PICO-tag방법을 이용하여 hydrolysis 및 PITC labeling을 실시한 후 400 µL의 buffer에 녹여 그 중 10 µL을 취하여 분석에 사용하였다. 유리 아미노산 분석은 충남대학교 공동 실험실습관의 amino acid analyzer (HITACHI L-8900, Japan)을 활용하여 분석하였다. 혈청 가수분해 시료에 5% TCA (trichloroacetic acid)를 일정량 첨가하여 단백질 등의 간섭물질을 침전시킨 후 10,000 xg, 15분 원심 분리하여 상정액만을 사용하였다. 상정액은 유리 아미노산 표준시료와 유사한 농도로 희석하여 아미노산 분석에 사용하였다.

**작물시험재료 및 처리내용** 실험에 사용한 공시작물 방울토마토 품종은 '로블리'를 이용하였고, 포장은 (주)바이오넬의 시설하우스를 이용하였으며 두둑너비 50 cm, 재식거리 50 cm, 한 처리구당 30주의 방울토마토를 정식하였다. 처리제는 혈청을 가수분해효소로 분해 후 한외여과 과정을 통해 얻은 펩타이드와 CaCl<sub>2</sub>를 킬레이트 결합한 chelate-Ca (CaO 20%), 리다코리아의 'Calciolid' (CaO 15%), 펩타이드와 유기 게르마늄인 Ge-132<sup>®</sup>를 킬레이트 결합한 chelate-Ge (Ge 2000 mg L<sup>-1</sup>), 물에 Ge-132<sup>®</sup>를 녹인 유기 게르마늄제 (Ge 2000 mg L<sup>-1</sup>)를 사용하였다. 처리 시기는 2011년 4월 29일 정식하고, 2011년 6월 21일 1회 처리한 후 10일 간격으로 10a당 1,200 L (주당 300 mL)를 3회 엽면시비 처리하였다. 시험은 대조구 (control), Calciolid 500배 희석액 (Ca 300 mg L<sup>-1</sup>; Calciolid Ca-300), chelate-Ca 2000배 희석액 (Ca 100 mg L<sup>-1</sup>; Chelate-Ca 100), chelate-Ca 1000배 희석액 (Ca 200 mg L<sup>-1</sup>; Chelate-Ca 200), chelate-Ca 500배 희석액 (Ca 400 mg L<sup>-1</sup>; Chelate-Ca 400), Ge-132<sup>®</sup> 100배 희석액 (Ge 20 mg L<sup>-1</sup>; Ge 132<sup>®</sup>-20), Chelate-Ge 200배 희석액 (Ge 10 mg L<sup>-1</sup>; Chelate-Ge 10), Chelate-Ge 100배 희석액

(Ge 20 mg L<sup>-1</sup>; Chelate-Ge 20), Chelate-Ge 50배 희석액 (Ge 40 mg L<sup>-1</sup>; Chelate-Ge 40) 처리로 나누었다. 엽과 과실은 3회 처리 1주일 후 수확하여 칼슘과 게르마늄 함량 조사에 이용하였다.

**엽과 과실의 칼슘, 게르마늄 함량 조사** 엽과 과실은 시료채취 후 증류수를 이용하여 세척한 후 물기를 제거하고, 과실은 처리당 10개, 엽은 처리당 20매를 무게를 측정한 후 70°C의 건조기에서 3일간 건조한 후 마쇄하여 분석시료로 사용하였다. 분석 전처리에는 시료 0.5 g을 100 mL 분해용 플라스크에 넣고 conc. HNO<sub>3</sub> 10 mL를 가하여 100°C에서 3시간 가열한 후 conc. HNO<sub>3</sub> 10 mL를 첨가하여 250°C에서 분해시켰다. 분해된 시료용액은 3차 증류수로 50 mL 정용하였으며, Ca 함량은 ICP-AES (OPTIMA 3300DV, USA, Perkin-Elmer)를 이용하여 분석하였고 게르마늄 함량은 ICP-MS (ELAN 6000 ELAN DRC II, USA, Parkin-Elmer)로 측정하였다.

**통계분석** 시험구 배치는 난괴법으로 3반복 하였으며, 자료분석은 Statistical Analysis System program (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석 후 Duncan's multiple range test로 통계처리 하였다.

## 결과 및 고찰

**혈청의 구성 아미노산** 한우 혈청에 함유된 단백질의 아미노산 구성을 분석한 결과는 Table 1에 나타내었다. 한우 혈청 단백질은 Asp, Glu, Leu가 13.66, 11.29, 5.54 g L<sup>-1</sup>로 가장 높은 함유량을 나타내었고, 각각 19.7, 16.3, 8.0%에 해당하는 양이다. 이는 TCA로 침전시킨 돼지 혈장 단백질의 아미노산 분석결과 Asp, Glu, Leu 등이 가장 높은 함유량을 나타낸 것과 유사하다 (Park et al., 1996). 미국 국

Table 1. Amino acids composition of bovine serum.

Amino acid	Concentration	Amino acid	Concentration
	g L <sup>-1</sup>		g L <sup>-1</sup>
Asp	13.66	Tyr	2.81
Glu	11.29	Val	4.17
Ser	3.53	Met	0.75
Gly	1.94	Cys2	1.64
His	1.89	Ile	1.71
Arg	3.40	Leu	5.54
Thr	3.77	Phe	2.93
Ala	3.11	Lys	4.30
Pro	3.00	Trp	0.00

**Table 2. Effect of substrate & enzyme ratio on the FAA concentration of serum hydrolysates by various enzymes.**

Sample		Conc. of FAA <sup>†</sup>	Conc. of MAA <sup>‡</sup>		Sample	Conc. of FAA <sup>†</sup>	Conc. of MAA <sup>‡</sup>
		----- g L <sup>-1</sup> -----				----- g L <sup>-1</sup> -----	
A <sup>§</sup>	250:1	9.90	5.34	P <sup>¶</sup>	250:1	3.97	3.23
A	500:1	8.65	5.27	P	500:1	3.32	2.76
A	1,000:1	3.11	2.69	P	1,000:1	2.52	2.08
E	250:1	7.53	4.59	F	250:1	3.77	3.40
E	500:1	3.78	3.10	F	500:1	1.98	1.65
E	1,000:1	3.07	2.59	F	1,000:1	1.29	0.97

<sup>†</sup>FAA, free amino acids, <sup>‡</sup>MAA, major amino acids (D, T, S, E, G, A, V, C, M, I, L, Y, F, W, K, H, R, P), <sup>§</sup>A, alcalase; E, esperase. <sup>¶</sup>P, protamex; F, flavourzyme.

립생물정보센터 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 자료에 의하면 소 혈청과 돼지 혈청의 아미노산 서열이 유사한 것을 알 수 있다. 소와 돼지 혈청 모두 양질의 단백질 자원인 것과 소 혈청의 대체제로 돼지 혈청의 사용도 가능할 것으로 판단된다 (Hilger et al., 2001; Limeback et al., 1989).

**효소 종류 및 첨가량에 따른 유리 아미노산 변화**  
다양한 단백질 가수분해 효소의 종류 및 기질 대비 첨가량에 따른 혈청 가수분해물의 유리 아미노산 농도는 Table 2에 나타내었다. 기질대비 효소 첨가량이 증가함에 따라 유리 아미노산의 농도는 증가하는 경향이 나타났고 혈청의 분해능은 alcalase, esperase, protamex, flavourzyme 순서로 높게 나타난다는 것을 간접적으로 알 수 있다. 다른 연구 결과에서도 소 혈장 단백질을 다양한 단백질 가수분해 효소로 가수분해하여 얻어진 펩타이드의 수율을 확인한 결과 alcalase가 가장 높았다고 하였다 (Hyun et al., 2000). 이는 소 혈장 또는 혈청에 있어서 alcalase가 분해력이 우수하다는 것을 간접적으로 알 수 있다. Alcalase 250:1, 9.90 g L<sup>-1</sup>는 alcalase 500:1, 8.65 g L<sup>-1</sup>보다 높은 농도를 나타내었지만 효소 첨가량의 증가에 비해 유리 아미노산의 증가는 높지 않았고 주요 아미노산의 농도에서도 250:1과 500:1은 큰 차이를 나타내지 않았다. 따라서 가수분해 능력과 경제성을 모두 고려해 보았을 때 한우 혈청을 분해하기 위한 가장 우수한 효소와 첨가량은 alcalase 500:1로 판단하였다.

**킬레이트 칼슘 처리가 방울토마토 엽과 과실의 칼슘 함량에 미치는 영향**  
방울토마토의 엽과 과실의 칼슘 함량을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 엽과 과실에서 모두 대조구보다 그 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 엽의 경우, 대조구의 칼슘함량은 3152.6 mg kg<sup>-1</sup> 이었고 처리구 Chelate Ca-100, 200, 400은 대조구에 비해 7.85%, 19.94%, 24.98% 증가하여 유의적인 차이를 나타내었다. 과

**Table 3. Effects of Chelate-Ca application on the calcium content in leaf and fruit of cherry tomato.**

Ca treatment	Ca	
	Leaf	Fruit
	----- mg kg <sup>-1</sup> -----	
Control	3152.6c <sup>†</sup>	63.2c
Calciolid Ca-300	3409.1bc	67.5b
Chelate Ca-100	3400.1bc	63.2c
Chelate Ca-200	3781.1ab	78.0a
Chelate Ca-400	3940.1a	78.8a

<sup>†</sup>Values within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test.

실은 대조구 63.2 mg kg<sup>-1</sup>에 비해 처리구 Chelate Ca-400은 78.8 mg kg<sup>-1</sup>로 18.10% 증가하였고 유의적인 차이를 나타내었다. 또한, 대조처리 Calciolid Ca-300 (3409.1, 67.5 mg kg<sup>-1</sup>)보다 Chelate Ca-200 (3781.1, 78.0 mg kg<sup>-1</sup>)는 처리농도가 낮음에도 불구하고 엽과 과실에 포함된 칼슘함량이 높아 킬레이트 칼슘의 흡수율이 더욱 우수한 것을 알 수 있다.

엽과 과실의 킬레이트 칼슘 처리에 따른 증가량을 비교하면 과실보다 엽에서 흡수된 칼슘의 양이 많았고 이는 엽에서 과실로 이동하는 칼슘의 양이 적다는 것을 간접적으로 알 수 있다. 토마토에서 방사성 동위원소 <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> (CaCl<sub>2</sub>)를 엽면처리하여 이를 추적한 결과 칼슘은 잎에서 주로 흡수되고 인접한 잎이나 과실로의 이동이 적었다는 보고와 일치하였고 (Chung 2001), 뿌리에서 흡수한 칼슘도 77%가 잎으로 이동하고 소량만이 과실에 이동되었다고 하였다 (Wilcox 1994). 킬레이트 칼슘의 뿌리 및 과실 표면에서의 흡수 경향에 대해 더욱 많은 연구가 이루어져야 하지만 기존 칼슘제보다 높은 흡수량을 보였기 때문에 칼슘 결핍 및 강화 등에 긍정적인 효과가 있는 것으로 판단된다.

**Table 4. Effects of Chelate-Ge application on the germanium content in leaf and fruit of cherry tomato.**

Ge treatment	Ge	
	Leaf	Fruit
	----- $\mu\text{g kg}^{-1}$ -----	
Control	1.7e <sup>†</sup>	0.7c
Ge 132 <sup>®</sup> -20	25.0d	1.0c
Chelate Ge-10	51.7c	2.6b
Chelate Ge-20	64.3b	3.0b
Chelate Ge-40	80.3a	4.4a

<sup>†</sup>Values within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test.

**킬레이트 게르마늄 처리가 방울토마토 엽과 과실의 게르마늄함량에 미치는 영향** 킬레이트 게르마늄 처리에 의한 엽과 과실에 존재하는 게르마늄 함량을 분석( ICP-MS, detection limit range: 0.1-1 ppt in DRC mode) 한 결과는 Table 4에 나타내었다. 엽의 게르마늄 함량은 대조구 1.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$  에 비해 대조처리 Ge 132<sup>®</sup>-20은 25.0  $\mu\text{g kg}^{-1}$  로 높은 함량을 나타내었지만 킬레이트 게르마늄 처리구 Chelate Ge-10, 20, 40에서 대조처리에 비해 106.8%, 157.2%, 221.2% 의 높은 게르마늄 함량을 나타내어 처리 간에 유의적인 차이를 나타내었다. 이는 킬레이트 게르마늄이 기존 유기 게르마늄 (Ge-132<sup>®</sup>)만 사용했을 때 보다 흡수율이 높다는 것을 알 수 있었다. 과실의 경우, 엽보다 게르마늄 함량이 낮았으나 대조구 (0.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), 대조처리 (1.0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ )보다 chelate-Ge 처리구가 대조구대비 2.7~5.2배, 대조처리대비 1.6~3.4배 높은 게르마늄 함량을 나타내어 유의적인 차이를 보였다. 게르마늄 처리 및 흡수와 관련된 연구는 주로 벼 작물에 이루어졌고 게르마늄 종류별 처리 시 게르마늄 흡수 경향 또한 전반적으로 잎이 쌀알과 뿌리보다 높게 나타났다 (Seo et al., 2010). 게르마늄의 경우 사람이 살아가는데 필요한 필수영양소가 아닌 미량원소이기 때문에 일정수준 이상 섭취하면 바람직하지 않다. 게르마늄의 daily dietary intakes (DDI)는 0.4 ~ 1.5 mg 이고 (Nielsen 1996), 킬레이트 게르마늄으로 생산된 토마토는 과실의 농도가 최고 4.4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ 임을 감안하면 하루 약 100 kg을 섭취해야 DDI 수준을 초과하므로 매우 안전한 수준으로 판단된다. 이는 안전성을 갖춘 게르마늄 농산물 생산을 위한 가능성을 보여주는 결과로서 앞으로 다양한 농산물에 대한 적용 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

펩타이드는 Asp, Glu, Leu을 주요 구성 아미노산으로 하

는 한우 혈청을 단백질 분해효소로 분해 후 한외여과를 거쳐 제조하였다. 단백질 분해효소는 alcalase, esperase, flavourzyme, protamex를 이용하였고 alcalase가 가장 좋은 분해력을 나타내어 펩타이드 생산을 위한 혈청 분해에 활용하였다. 한우 혈청으로부터 분리한 펩타이드와 킬레이트 결합한 칼슘 (chelate-Ca)과 게르마늄 (chelate-Ge)을 방울토마토에 적용하여 흡수 변화를 확인하고자 시험을 수행하였다.

Chelate Ca을 500, 1,000, 2,000배로 희석하여 방울토마토 재배에 적용한 결과, 처리 농도 및 횟수 증가에 따라 엽과 과실의 칼슘함량이 다소 증가하여 대조처리 Calciolid Ca-300 (3409.1, 67.5  $\text{mg kg}^{-1}$ )이 Chelate Ca-200 (3781.1, 78.0  $\text{mg kg}^{-1}$ ) 보다 처리농도가 높음에도 불구하고 그 함량이 낮아 킬레이트 칼슘의 흡수율이 더 많았다. Chelate Ge을 50, 100, 200배로 희석하여 적용한 결과, 방울토마토 엽의 게르마늄 함량이 처리 농도가 높을수록 많아져 대조구와 Ge 132<sup>®</sup>-20 보다 모든 처리구에서 2배 이상의 높은 함량을 나타내었다. 본 연구를 통해 펩타이드와 킬레이트 결합한 칼슘과 게르마늄을 방울토마토에 사용할 경우 그 흡수율이 증가되는 것을 확인하였다.

## 사 사

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호: PJ00747 2022012)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## 인 용 문 헌

- Ait-Oukhatar, N., S. Bouhallab, P. Arhan, J. L. Maubois, M. Drosowsky, and D. Bougle. 1999. Iron tissue storage and hemoglobin levels of deficient rats repleted with iron bound to the caseinophosphopeptide 1-25 of b-casein. *J. Agric. Food Chem.* 47(7):2786-2790.
- Chung, H.D. 2001. Leaf absorption and translocation of <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 42(6):651-655.
- Hilger, C., F. Grigioni, C. De Beaufort, G. Michel, J. Freilinger, and F. Hentges. 2001. Differential binding of IgG and IgA antibodies to antigenic determinants of bovine serum albumin. *Clin. Exp. Immunol.* 123(3):387-394.
- Hyun, C.K. and H.K. Shin. 2000. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochem.* 36(1-2):65-71.
- Lim, S.D., D.C. Seo, W.Y. Park, Y.S. Cheon, S.K. Park, S.T. Lee, J.H. Park, S.D. Kim, J.S. Cho, and J.S. Heo. 2008. The selection of optimum rice species and germanium

- application method for production of functional rice with germanium. *Korean J. Environ. Agric.* 27(4):373-381.
- Limeback, H., H. Sakarya, W. Chu, and M. MacKinnon. 1989. Serum albumin and its acid hydrolysis peptides dominate preparations of mineralbound enamel proteins. *J. Bone Miner. Res.* 4(2):235-241.
- Nielsen, F.G. 1996. How should dietary guidance be given for mineral elements with beneficial actions or suspected of being Essential? *J. Nutr.* 126:2377S-2385S.
- Park, E.H., H.Y. Lee, and K.B. Song. 1996. Characterization of plasma proteins from bloods of slaughtered cow and pig and utilization of the proteins as adhesives. *Agr. Chem. Biotechnol.* 39(2):123-126.
- Seo, D.C., Y.S. Cheon, S.K. Park, J.H. Park, A.R. Kim, W.G. Lee, S.T. Lee, Y.H. Lee, J.S. Cho, and J.S. Heo. 2010. Application of different types of germanium compounds on rice plant growth and its Ge uptake. *Korean J. Soil. Sci. Fert.* 43(2):166-173.
- Wilcox, G.E. 1994. Tomato, P. 137-141. In W.F, Bennett (ed) *Nutrient deficiencies & toxicities in corp plants*. APS press, USA.