

저칼슘식이동물모델에서 한국 자생 작은구슬산호말(*Corallina pilulifera*) 유래 해조칼슘이 뼈건강에 미치는 영향

이지안^{1,2} · 구선희³ · 황호원³ · 박용석³ · 곽인애⁴ · 이정석⁴ · 한영석⁴ · 김학재^{1,2*}

¹순천향대학교 의과대학 임상약리학교실, ²순천향대학교 의과대학 해양의과학기술연구소, ³주워터핀, ⁴네오엔비즈

Analysis of the Effect of Calcium Supplementation *Corallina pilulifera* on Bone Health using Low-Calcium Dietary Animal Models

Ji-An Lee^{1,2}, Sun-hoi Gu³, Ho-won Hwang³, Yong-Seok Park³, Inae Kwak⁴, Jung Suk Lee⁴, Young-Seok Han⁴ and Hak-Jae Kim^{1,2*}

¹Department of Clinical Pharmacology, College of Medicine, Soonchunhyang University, Cheonan 31151, Republic of Korea

²Laboratory of Marine Medical Science Technology, Cheonan 31151, Republic of Korea

³Department of Research and Development Center, Waterfin Inc., Seoul 08512, Republic of Korea

⁴Department of Research and Development Center, Neo Environmental Business Co., Bucheon 14523, Republic of Korea

Corallina pilulifera (CP) is prevalent along the Korean coastline and belongs to the *Corallinaceae* family, exhibiting growth throughout all seasons. This study confirmed the role of calcium supplementation through CP, calcined CP (CCP), and a commercial calcium powder, highlighting variations in dosage within animal models induced by a calcium-deficient diet. Analysis of calcium absorption was conducted by assessing the serum and urine calcium levels during the feeding periods. Serum calcium content was significantly higher in the control group (CON, 9.79 mg/dL) than in the calcium-deficient model (CDM, 6.15 mg/dL). The calcium content of urine was significantly higher than that of CON (0.20 mg/dL) compared with CDM (0.08 mg/dL). Reticular bone thickness showed no significant differences between the CON and CDM groups. Additionally, micro-CT results demonstrated a reduction in the trabecular volume and a significant difference between the number of strands and the average interval of the reticular bone. In conclusion, CP serves as a promising source of calcium supplementation. Therefore, these findings emphasize that CP is of sufficient value as an industrial material related to calcium metabolism.

Keywords: *Corallina pilulifera*, Calcined powder, Low calcium dietary, Animal model, Korean source

서 론

칼슘(calcium, Ca²⁺)은 생명유지에 필요한 성분 중 하나로서 체내에서 가장 많이 존재하는 대표적인 무기질이다. 칼슘은 체내에서 뼈와 치아 등의 골격을 형성하며, 규칙적인 심장박동, 혈액 응고 및 근육의 수축과 이완, 세포내 생리활성을 조절하는 기능을 가지고 있기 때문에 칼슘의 결핍은 골다공증과 같은 골격의 이상이나 근육 및 대사증후군과 관련된 이상을 야기할 수 있다(Peacock, 2010; O'Toole, 2011). 2021년 국민건강영양조사에 따르면, 칼슘의 섭취율은 영양소 섭취기준 대비 64%에 그

치고 있으나, 최근 현대인의 생활의 변화로 인해 야기되는 비만, 골다공증, 고지혈증, 고혈압 등과 같은 만성질환에 대한 칼슘의 역할이 강조되면서 무기질 보충제나 건강기능식품에 대한 다양한 유형의 칼슘 급원의 시장규모가 증가하고 있다(Chang, 2003). 그 중에서도 칼슘의 대체 소재로서 해양자원을 이용한 연구들이 지속되고 있으며, 대부분의 어류 유래 뼈(Kim et al., 1998), 난각(Shin and Kim, 1997) 및 패각(Kim et al., 1998), 갑오징어의 갑(Kim et al., 2003) 등을 이용한 연구사례들이 보고되고 있다. 이렇게 해양자원에 대한 관심이 높아 지면서 최근에는 해조칼슘을 이용한 칼슘 보충제의 시장이 증가하게 되었

*Corresponding author: Tel: +82. 41. 570. 2478 Fax: +82. 41. 574. 3860

E-mail address: hak3962@sch.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2023.0841>

Korean J Fish Aquat Sci 56(6), 841-849, December 2023

Received 25 October 2023; Revised 20 November 2023; Accepted 21 December 2023

저자 직위: 이지안(선임연구원), 구선희(부장), 황호원(주임), 박용석(워터핀대표), 곽인애(연구원), 이정석(네오엔비즈대표), 한영석(연구소장), 김학재(교수)

다. 이는 해조칼슘이 지니는 다공질의 벌집형 구조와 연관되어 칼슘 흡수율이 높으며, 대퇴골의 형성에 영향을 미친다는 연구 결과를 통해 해조칼슘이 새로운 칼슘 원료로서 인식되며 다양한 원료를 이용한 연구들이 수행되고 있는 추세를 보이고 있다 (Tsuchita et al., 1996, Chen et al., 2002).

본 연구에서 이용한 소재는 작은구슬산호말(*Corallina pilu-lifera*, CP)로서 이는 우리나라의 전 연안에서 흔히 볼 수 있는 산호말목 산호말과에 속하는 종으로 분홍색을 띠는 것이 특징이다. 작은구슬산호말은 우리나라 주변부의 해안에서 고르게 분포하고 있을 뿐만 아니라 봄에서 겨울까지 전 계절에 걸쳐 흔하게 볼 수 있으며 주로 조간대에 암반에서 생육하나 실제로 사용되는 예가 없는 소재이다. 또한 기존의 작은구슬산호말을 이용하여 진행된 연구는 한국 서해 및 동해 지역의 해조류 군집과 관련된 연구 및 항산화와 관련된 연구들이 주를 이루고 있어 아직 연구 소재로서의 가치 또한 높다고 할 수 있다(Kim et al., 2013; Na et al., 2013).

본 연구에서는 국내에서 자생하는 해양자원 중에서 사용되지 않고 있는 작은구슬산호말의 석회질로 쌓여 있는 엽상체를 이용하여 충분한 탄산칼슘의 확보가 가능할 것이라 예상하였으며, 최근 수온상승으로 인한 갯녹음 현상으로 원활한 수급이 가능하다고 판단하였다. 이를 토대로 해외가 아닌 국내의 칼슘자원의 원료로서 건강에 미치는 유용한 효과를 확인함과 더불어 칼슘 원료로서의 부가 가치를 확인하기 위하여 *in vitro/in vivo* 대상으로 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

재료

사용된 작은구슬산호말 원말 해조칼슘과 소성과정을 거친 작은구슬산호말 유래 해조칼슘은 (주)네오엔비즈(NeoEnBiz Co., Bucheon, Korea) 및 (주)워터핀(WATERFIN inc., Seoul, Korea)에서 제작한 칼슘 시료를 제공받아 수행되었다. 대조군으로는 시판용 해조칼슘(Aquamin F; Marigot Ltd., Strand Farm House, Ireland)을 이용하였다.

해조칼슘 원료 수집

본 연구에서 사용된 CP는 대한민국 동해 강릉 안인해변 암반(위도 37.733958, 경도 128.990599)에서 자생되는 작은구슬산호말을 대상으로 조간대 암반에 부착하여 서식하는 특성을 가졌기 때문에 끈을 이용하여 긁어서 수집되었으며, 해수면이 낮아지는 간조시기에 동일하게 채취하였다.

이 때 채취된 산호말은 불순물 제거하기 위하여 채망을 이용하여 깨끗한 해수에서 모래 및 이물질을 세척 후 바람이 잘 통하는 서늘한 곳에서 1-2일간 자연 건조되었다. 건조된 산호말은 분말화 전까지 공기가 통하지 않도록 밀봉하여 서늘하고 건조한 곳에 보관하였다.

수용화를 위한 분말화 및 소성처리

소성처리한 작은구슬산호말(calcined CP, CCP) 시료를 제작하기 위하여 준비된 CP 시료를 이용하여 분말화 진행 전 채망에 넣고 수회 흔들어 잔류할 수 있는 이물질을 추가로 제거하였으며, 세척된 원물은 80°C에서 5분간 열수 침지하였다. 침지 후 물기를 제거한 시료는 60°C 건조기에서 48시간 동안 건조하였다. 완전히 건조된 시료는 볼밀(Pulverisette 6; Fritsch, Idar-Oberstein, Germany)을 이용하여 22 g으로 10분간 분쇄하여 분말화 하였다. 분말화된 CP 250 g을 취하여 800 mL 크기의 일루미나 도가니에 담고 전기회화로(HQ-DMF3; CORETECH, Anyang, Korea)에 옮겨서 900°C에서 4시간 동안 소성을 진행하였으며, 소성이 끝난 CP 분말은 회화로 안에서 하루 동안 서서히 냉각시킨 후 200 mesh 채망을 이용하여 입자를 고르게 준비하였다.

칼슘 분석

칼슘은 식품공전의 미량 영양성분 시험법 중 4.1.2 습식분해법에 따라 질산-과염소산법을 통해 시료를 조제하였다. 그 후 3-16-3 칼슘의 제3 법 유도결합플라즈마법을 수행하였으며, 측정 기기는 원자방출분광기(ICP-AES; ICPE 9820, Shimadzu Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 분석하였다(MFDS, 2021).

pH, 용해도 및 수율

pH는 pH meter (SevenCompact pH/Ion meter S220; METTLER TOLEDO, Greifensee, Switzerland)를 사용하여 측정하였으며, 용해도(solubility, %)는 감압여과 한 후 불용성의 잔사를 건조(105°C, 5시간)하여 중량을 측정하고, 이를 각 시료 중량으로부터 공제한 값의 백분율로 구하였다.

$$\text{Solubility (\%)} = \frac{\text{sample(g)} - \text{residue(g)}}{\text{sample(g)}} \times 100$$

수율(yield, %)은 감압여과한 여과액을 건조하여(105°C, 5시간) 얻어진 가용성 분말의 무게를 측정 후, 시료 중량의 백분율로 구하였다.

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{dried filtrate(g)}}{\text{sample(g)}} \times 100$$

색차(Hunter's color value) 및 백색도

시료의 백색도는 직시색차계(1001-DP; Konica Minolta, Tokyo, Japan)를 이용하여 분말의 L(백색도), a(적색도) 및 b값(갈색도)을 측정 후 다음 이들을 이용하여 다음과 같은 식으로 계산하였고, 이 때 색차계의 표준백판은 L=91.6, a=0.28, b=2.69이었다. 색차는 건조한 분말 시료를 관능적으로 검사하였다(Kim et al., 2015).

$$\text{White index} = 100 - \sqrt{(100-L)^2 + a^2 + b^2}$$

시료의 일반성분 및 무기질 분석

CP와 CCP 시료를 대상으로 각각 일반분석과 무기질 분석의 분석을 진행하였으며, 해당 결과는 한국품질시험원에 의뢰하였다. 일반분석은 탄수화물, 조단백, 조지방, 조회분, 조섬유 및 수분으로 총 6가지 항목에 대해 진행하였으며, 무기질의 경우 칼슘과 칼륨, 마그네슘의 3가지 항목을 수행하였다(MFDS, 2021).

실험동물 및 사육 환경

실험동물은 Sprague-Dawley (SD) 3주령 수컷 랫트를 (주)대한바이오파마(Seoul, Korea)로부터 구입하여 2주간 장소 적응 및 사료 적응을 시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물은 사육케이지(42×28 cm)를 이용해 사육하였으며, 온도 22–24°C, 습도 60±5%가 유지되며 밤낮 주기(12시간 light/12시간 dark)가 자동 조절장치에 의해 조절되는 사육 환경에서 사육하였다. 실험동물은 cage 당 1마리씩 배정하여 해당 개체의 시료가 수거될 수 있도록 하였고, 군별 혼합을 방지하기 위해 ear tag를 실시하여 별도 관리하였다. 실험동물의 구입, 사육 및 실험의 모든 과정은 순천향대학교 동물실험윤리위원회의 승인(SCH23_U_074)을 받고 규정에 따라 실행하였다.

칼슘 결핍유도 및 실험군 설정

칼슘결핍 유도는 AIN-93G 사료의 식이 조성을 토대로 제조되었으며, 정상군을 제외한 모든 군에 대하여 calcium-free mineral mixture로 교체하고 56일간 투여하여 칼슘 결핍 상태를 유도하였다. 기간의 설정은 기능성식품가이드라인에 따라 최소 8주간의 진행을 고려하여 수행되었으며, 칼슘 결핍이 유도된 실험동물은 난괴법에 따라 분류되었다. 또한, 정상(control, CON)군과 칼슘결핍 유도모델(calcium deficient model, CDM)군 및 CP 투여군을 제외한 CCP 투여군 및 시판용 해조칼슘(Sea-A) 투여군은 유효한 농도를 확인하기 위해 각 3그룹으로 추가 분류되어 수행되었다.

1) CON군; 칼슘이 급여되는 기간동안 일반식을 섭취한 군, 2) CDM군; 실험이 수행되는 8주간 칼슘부족식이만을 섭취한 군, 3) CP; 500 mg/kg, 4) CCP; 100 mg/kg/day, 250 mg/kg/day, 500 mg/kg/day 군 총 3개의 농도군으로 분류된 소성처리된 CP 급여군, 5) Sea-A 급여군; 100 mg/kg/day, 250 mg/kg/day, 500 mg/kg/day군 총 3개의 농도군으로 분류된 시판용 해조칼슘 급여군으로 구분되어 본 연구에서는 총 9군의 실험군으로 진행되었다. 투여된 시료의 pH에 의한 영향을 최소화하기 위하여 정상군 및 투여군 모두 pH 7.2–7.4 범위내로 조정하여 제공하였다. 또한, 제공되는 칼슘부족식은 각 개체의 무게를 측정하고 체중에 맞게 제공되었으며, 매일 섭취량을 측정하였다. 식이는 24시간 자유급식 방식으로 급식하였으며 사료를 제외한 모든 환경은 동일하게 제공되었다(Yoon and Kim, 2010; Amany et al., 2013; Moon et al., 2015).

동물 시료수집

실험기간은 총 8주로 진행되었으며, 실험 종료 후 실험동물을 희생하였다. 첫 칼슘 투여 2시간 경과 후 혈액은 안와 채혈 방식으로 혈액을 채취하였으며, 실험 종료 시점에서의 혈액은 12시간 절식시킨 후 ethyl ether (4025-4405; DUKSAN, Seoul, Korea)로 마취시켜 희생시킨 후 흉강을 열고 대동맥에서 혈액을 채취하였다.

채취된 혈액은 채취 즉시 STT 튜브에 옮겨졌으며, 원심분리 전까지 4°C에서 보관되었다. 4°C의 동일한 온도에서 3,000 g로 10분간 원심분리 하여 혈청만을 취하였고, 분리된 혈청은 분석 시까지 -70°C에서 초저온 냉동 보관하였다. 노는 실험 종료 전날 칼슘시료를 투여한 후 사육장의 톱밥을 제거하고 철제 발판을 깔아두고 다음날 오전 아래에 모아지는 노를 주사기로 수집하여 멸균된 tube에 넣고 분석 시까지 -70°C에서 초저온 냉동 보관하였다. 또한, 골밀도 측정을 위하여 대퇴골 부위 위쪽을 절단하여 가죽과 살을 제거하고 동일한 다리의 뼈를 4% PFA buffer에 침지하여 사용전까지 냉장 보관하였다(Park et al., 2011).

Micro-CT 측정

저칼슘식이 동물모델의 제작 확인 및 투여의 영향을 확인하기 위하여 대퇴골을 대상으로 한 골밀도 측정을 진행하였다. 이 때 SKYSCAN1272 ex-vivo (Bruker, Kartuizersweg, Belgium) 장비가 사용되었고, X-ray, 60 kV, 166 µA, Al 0.25 mm필터사용, rotation step 0.6°, Resolution, 15.00 µm pixel resolution 조건으로 수행되었다.

혈액 및 노의 칼슘함량 분석

실험 동물로부터 수집된 혈청 및 노를 이용하여 칼슘함량 분석을 진행하였으며, 이 때 사용된 키트는 Calcium Assay Kit (Colorimetric) (AB102505; Abcam, Cambridge, UK) 제품이다. 실험은 kit에서 제공되는 방법을 따라 수행되었으며, 3회 반복을 수행하였다. 결과는 평균과 표준편차로 나타내었다.

통계분석

실험결과는 SPSS 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차 및 통계분석을 수행하였다. 실험군 간의 차이는 One way ANOVA 및 t-test를 사용하여 비교하였으며, Tukey's HSD에 의해 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다. 통계의 유의성은 P<0.05으로 판정되었다.

Table 1. Comparison of Calcium content between CP and CCP

	CP	CCP
Calcium content (%)	27.4±0.6	57.8±1.6

CP, *Corallina pilulifera*; CCP, Calcined *C. pilulifera*. Values are mean±SD of three determination.

결과 및 고찰

칼슘함량

CP와 CCP 시료를 대상으로 칼슘 함량을 비교한 결과는 Table 1과 같다. CP의 칼슘 함량은 27.4%로 나타났으며, CCP는 57.8%로 두 시료를 비교했을 때 CCP 시료에서 칼슘 함량이 현저히 증가되는 것으로 나타났다. CP를 대상으로 소성을 진행한 결과 칼슘의 함량이 증가하는 것을 확인하였다. 이는 소성처리를 통해 이물질인 유기물과 탄산칼슘 유래 이산화탄소가 휘발됨에 따라 변화된 것으로 예상되며 이와 같은 결과는 굴 폐각(Lee et al., 2009) 및 갑오징어의 갑(Cho et al., 2001b)을 대상으로 소성가공을 통한 이전 연구들에서도 소성을 통한 칼슘함량의 증가가 동일하게 보였다.

pH, 용해도, 수율

CP와 CCP 시료를 대상으로 pH, 용해도 및 수율을 비교한 결과는 Table 2와 같다. CP의 pH는 9.84로 나타났으며, CCP는 12.76으로 두 시료를 비교했을 때 소성처리를 통해 pH가 상승한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 소성을 통해 10배가량 용해도가 증가하는 것으로 나타났다. 이와 같이 소성 후 pH의 상승과 용해도의 증가는 기존 다른 해조칼슘을 대상으로 한 연구에서도 보였으며, 본 연구와 동일한 결과를 보였다(Kim et al., 2000; Cho et al., 2001b). 이는 소성처리를 통해 탄산칼슘이 산화칼슘으로 변화하는 과정에서 pH의 상승하였으며, 유기물 및 수분 등이 제거되면서 겔보기 밀도가 감소하고 칼슘이 용해되기 좋은 다공성 구조의 미립자로 변화하면서 용해도 증가에 영향을

Table 2. Comparison of pH and solubility of CP and CCP

Dependent variables	CP	CCP
pH	9.84±0.04	12.76±0.01
Solubility (%)	1.0±0.02	10.0±0.07
Yield (%)	52.77±1.12	97.20±1.84

CP, *Corallina pilulifera*; CCP, Calcined *C. pilulifera*. Values are mean±SD of three determination.

Table 3. Hunter's color values and white index of calcined *Corallina pilulifera*

Calcined time	L	a	b	white index
0 h	83.28±0.01	-2.49±0.01	10.75±0.01	79.97
1 h	85.09±0.01	0.50±0.01	2.93±0.00	84.80
2 h	87.97±0.00	0.36±0.01	3.01±0.01	87.59
4 h	91.45±0.01	0.52±0.01	5.06±0.01	90.05
6 h	90.65±0.01	0.74±0.00	7.35±0.00	88.08
8 h	92.22±0.00	0.76±0.01	6.09±0.02	90.09

L, Whiteness; a, Redness; b, Yellowness. Values are mean±SD of three determination.

미쳤을 것으로 판단된다.

색차(Hunter's color value)

CP 시료를 대상으로 소성의 시간조건의 변화를 주었으며, 백색도에 대한 결과를 CP와 비교하여 Table 3에 나타내었다. 명도(L값)는 85.09–92.22의 범위를 보였으며 소성 처리된 시료에서 모두 L값에 원물에 비해 상승하는 것을 볼 수 있었으며, 4 시간 이상 소성처리가 진행된 4 h, 6 h, 8 h CCP에서만 유의한 차이를 보였다. 또한, 적색도(a값)의 수치에서 0.50–0.76에 이르기까지 상당히 높은 차이의 수치를 보였으며, 붉은색을 띠는 CP의 분말이 소성에 의해 색의 변화가 나타나는 것으로 확인되었다. 이 결과는 CP의 수치와 비교하였을 때 현저히 높은 수치를 보였으며, 육안으로 색차를 구분할 수 있었다. 이와는 반대로 갈색도(b값)에서는 CP 시료보다 현저히 낮은 수치를 보였다. 소성시간에 따라 색의 차이를 보였으나 그 범위는 2.93–7.35에 이르기까지 격차가 심한 양상을 보였다. 실험 조건 중에서 소성 처리 시간이 길수록 CP 시료와 유사한 수치를 보였으나, 8 h 소성처리 시료보다 6 h CCP 시료에서 갈색도가 높게 나타났다. 도출한 백색도값은 79.97–90.09의 범위로 나타났으며, 이 수치는 CP 시료의 수치와 비교하였을 때 높게 나타났으며 1 h 소성 처리된 시료와는 유사한 수치를 보였다. 해당결과를 통해 본 연구에서는 소성 처리 시간에 따라 CP 시료의 백색도가 개선되는 것을 확인하였으며, 이는 기존 바지락 폐각 소성분말(Lee et al., 2016), 갑오징어의 갑 분말의 소성처리 및 유기산 처리(Cho et al., 2001a, 2001b) 및 가다랑어 뼈(Kim et al., 2000)의 소성처리를 통한 백색도가 개선된다는 결과에서도 확인할 수 있다. 또한, 백색도의 개선과 더불어 소성시간이 경과할수록 소성율이 증가하는 것을 확인하였으며, 4 h 소성 처리된 시료에서 47.6%로 1 h (34.8%), 2 h (44.8%) 보다 증가된 수치를 보였다. 이에 비해 6 h (49.2%), 8 h (50%)로 소성시간에 비해 큰 변화를 보

Table 4. Comparison of general and minerals component between CP and CCP

Component/content	CP	CCP	
General component	Carbohydrate (%)	17.50	0.01 ^a
	Crude protein (%)	6.60	0.15 ^a
	Crude fat (%)	0.00	0.03 ^b
	Crude ash (%)	74.40	97.40 ^b
	Crude fiber (%)	0.81	2.40 ^a
	Water (%)	0.70	0.01 ^a
Minerals	Calcium (%)	26.8	59.6 ^b
	Potassium (%)	0.45	0.12 ^a
	Magnesium (%)	2.9	6 ^b

CP, *Corallina pilulifera*; CCP, Calcined *C. pilulifera*. a, Compared to CP, it decreased significantly ($P<0.05$). b, Compared to CP, it increased significantly ($P<0.05$). Values are mean±SD of three determination.

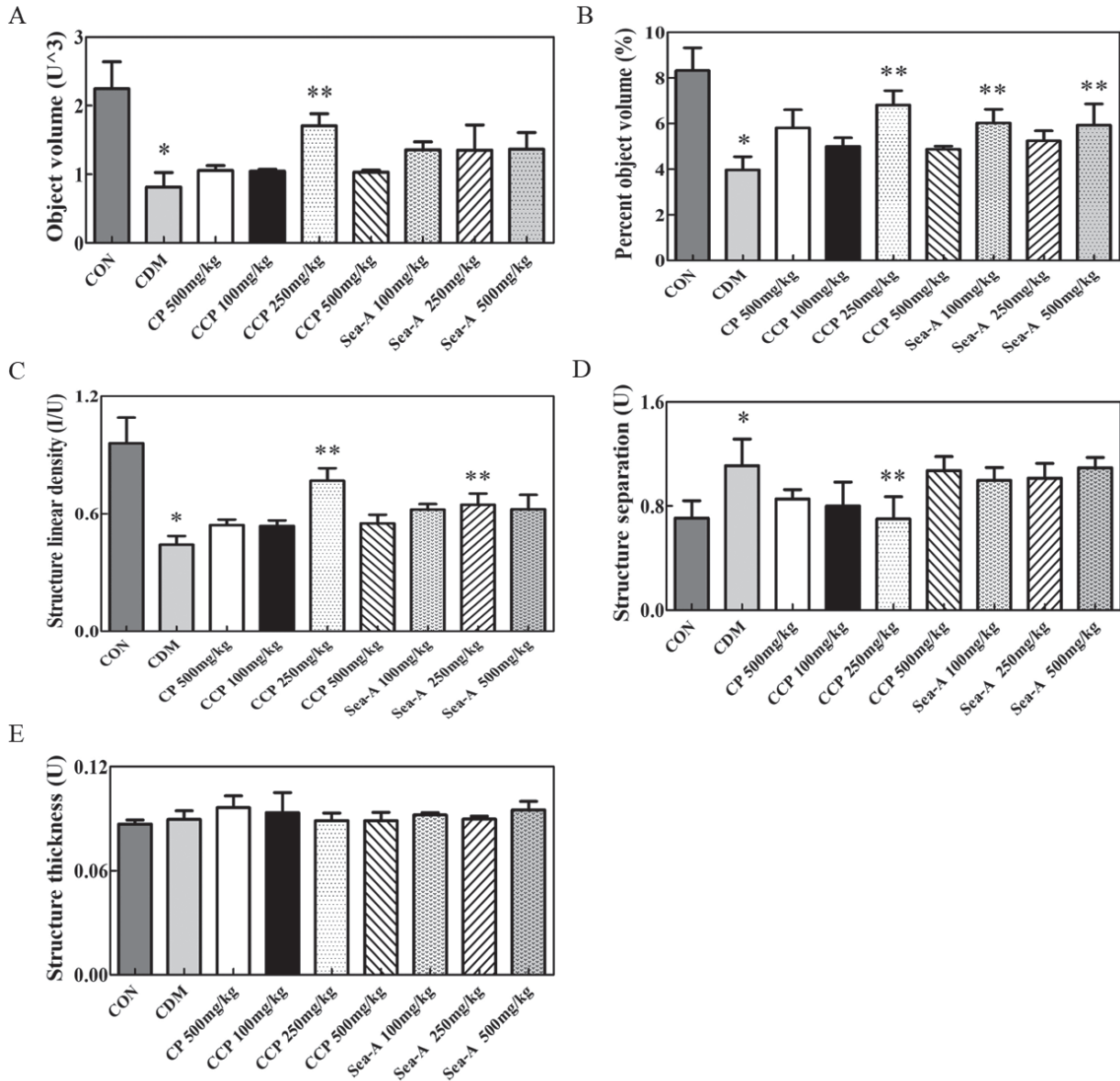


Fig. 1. Comparison of micro-CT results between low calcium dietary animal models and calcium source administration model groups. A, Object volume, Volume of the Trabecular in cortical inner; B, Percent object volume; space ratio of the trabecular in cortical inner; C, Structure linear density; the number of strands in the reticular bone; D, Structure separation; the mean spacing of the reticular bone; E, Structure thickness; the thickness of the reticular bone; CON, vehicle administration on normal control rat; CDM, Vehicle administration on calcium deficient rat; CP, *Corallina pilulifera*; CP 500 mg/kg, 500 mg/kg dose of CP administration on calcium deficient rat; CCP, Calcined CP; CCP 100 mg/kg, 100 mg/kg dose of CCP administration on calcium deficient rat; CCP 250 mg/kg, 250 mg/kg dose of CCP administration on calcium deficient rat; CCP 500 mg/kg, 500 mg/kg dose of CCP administration on calcium deficient rat; Sea-A 100 mg/kg, 100mg/kg dose of Sea-A administration on calcium deficient rat; Sea-A 250 mg/kg, 250 mg/kg dose of Sea-A administration on calcium deficient rat; Sea-A 500 mg/kg, 500 mg/kg dose of Sea-A administration on calcium deficient rat. Values are Mean±SD for 4 rats. *CON vs CDM P<0.05. **CDM vs CCP 250 mg/kg P<0.05 by Tukey's HSD.

이지 않았다.

위의 결과와 기존의 연구 보고들을 바탕으로 소성처리를 통해 백색도가 개선되는 것을 확인하였으며, 이와 더불어 소성시간

에 따른 소성률 및 색차값, 백색도를 고려하여 작은구슬산호말의 소성처리는 900°C에서 4 h를 진행하였을 때 가장 효율적이라고 판단하여 해당 시료를 대상으로 동물실험을 진행하였다.

시료의 일반성분 및 무기질 분석

CP와 CCP사이에서 영양성분의 변화를 확인하기 위하여 그 함량을 분석하였고, 그 결과 위의 Table 4와 같이 나타내었다. 영양성분은 일반성분과 무기질을 대상으로 진행되었다. 분석 결과 CP의 탄수화물(17.50%), 조단백(6.60%) 및 수분(0.70%) 함량은 소성을 거친 뒤 탄수화물(0.01%), 조단백(0.15%), 수분(0.01%)로 유의하게 감소하였다($P<0.05$). 반면에 CP에서 74.40%였던 조회분과 0.81%였던 조섬유의 수치는 소성을 거친 뒤 각각 97.40%와 2.40%로 증가한 것을 확인하였다. 뿐만 아니라 26.8%였던 칼슘과 2.9%였던 마그네슘의 함량도 각각 59.6%와 6%로 증가한 것으로 나타났으나, 칼륨의 수치는 0.45%에서 0.12%로 상대적으로 감소하였다($P<0.05$). 이 결과는 이전 다른 연구에서도 밝혀진 것처럼 가용성 개선을 위한 소성 처리에 따라 칼슘 함량은 증가하고 고온으로 이뤄지는 가열에 의해 이물질 및 유기물의 제거와 탄산 칼슘으로부터 휘발되는 이산화탄소로 인하여 산화 칼슘이 되기 때문에 칼슘이 차지하는 비율이 증가했다.

Micro-CT 측정

저칼슘식이 동물모델을 대상으로 시료채취를 통해 56일 동안의 실험 종료 후 Micro-CT상의 변화를 확인하였고, Fig. 1로 나타내었다. Fig. 1A에 CDM군은 CON군에 비해 골피질 안쪽의 해면골의 부피가 현저히 감소한 수치를 보였다. 또한, CCP 250 mg/kg 투여군에서 CON군과 유사한 수치로 회복되는 것을 확인하였다($P<0.05$). 하지만 다른 칼슘투여군의 경우 일정 수준으로 증가하는 추세를 보이기는 하였으나 유의미한 변화는 보이지 않았다. Fig. 1B의 CDM군에서 골피질 안쪽의 해면골의 공간을 차지하는 비율이 현저히 감소한 것으로 나타났다. 전체적인 칼슘급여군에서 비율이 증가하였으나 CCP 250 mg/kg, Sea-A 100 mg/kg, Sea-A 500 mg/kg의 농도에서만 수치가 회복되는 것을 확인하였다($P<0.05$). Fig. 1C의 CDM군에서 망상골의 가닥수가 CON군에 비해 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, 칼슘투여를 통해 일부 증가하는 것을 나타냈다. 하지만 CCP 250 mg/kg 및 Sea-A 250 mg/kg 투여군에서만 통계적 유의성을 보였다($P<0.05$). Fig. 1D의 CDM군에서 망상골의 평균 간격이 CON군에 비해 현저히 떨어져 있는 것으로 나타났으며, 이는 망상골이 비어 있는 형태로 있다는 것을 의미한다. 또한 칼슘투여군에서는 CDM군에 비해 이 간격이 좁아지는 것을 확인할 수 있었으며, CCP 250 mg/kg 투여군에서만 그 수치가 현저히 감소한 것으로 나타났다($P<0.05$). 모든 실험군에서 망상골의 두께차이는 보이지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1E). 본 연구에서 투여 농도 및 형태가 다른 칼슘 보충제의 투여가 칼슘이 결핍된 동물모델의 대퇴골에 미치는 영향을 측정하였고, 그 결과는 CDM에서 CON에 비해 골피질 안쪽의 해면골 부피 및 밀도가 현저히 감소된 수치를 보였으며, 유의적인 차이를 보였다(Fig. 1A-1D). 그 외 칼슘 급여군에서는 다소 증가하는

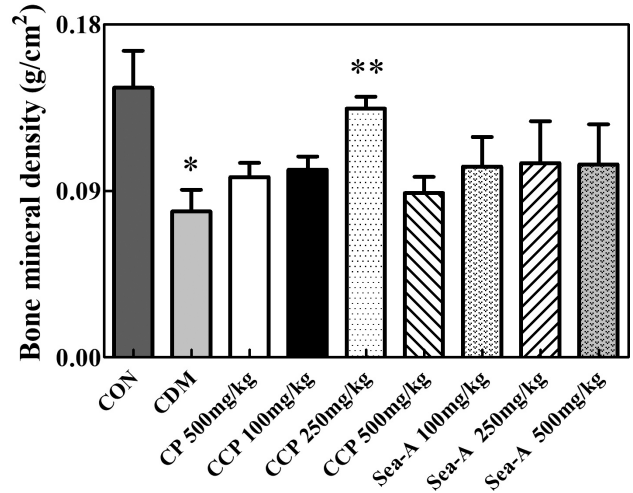


Fig. 2. Comparison of bone mineral density between low calcium diet animal models and calcium source administration model groups. CON, Vehicle administration on normal control rat; CDM, Vehicle administration on calcium deficient rat; CP, *Corallina pilulifera*; CP 500 mg/kg, 500 mg/kg dose of CP administration on calcium deficient rat; CCP, Calcined CP; CCP 100 mg/kg, 100 mg/kg dose of CCP administration on calcium deficient rat; CCP 250 mg/kg, 250 mg/kg dose of CCP administration on calcium deficient rat; CCP 500 mg/kg, 500 mg/kg dose of CCP administration on calcium deficient rat; Sea-A 100 mg/kg, 100 mg/kg dose of Sea-A administration on calcium deficient rat; Sea-A 250 mg/kg, 250 mg/kg dose of Sea-A administration on calcium deficient rat; Sea-A 500 mg/kg, 500 mg/kg dose of Sea-A administration on calcium deficient rat. Values are Mean±SD for 4 rats. *CON vs CDM $P<0.05$. **CDM vs CCP 250 mg/kg $P<0.05$ by Tukey's HSD.

추세를 보이기는 하였으나, CCP 250 mg/kg, Sea-A 100, 250, 500 mg/kg를 제외한 그룹에서는 유의성을 보이지 않았다. Bell et al. (1941)의 연구에서도 보인 바와 같이 칼슘 섭취를 통해 뼈의 안쪽을 구성하는 해면골의 규모가 커지게 된다고 알려져 있으며, 본 연구의 Fig. 1A와 Fig. 1B에서 해면골의 수치가 증가한 것을 확인할 수 있었다.

대퇴골 내 실험군 별 중심 지정부분(region of interest, ROI)에 대한 BMD (bone mineral density)값은 Fig. 2와 같이 나타났다. CON군과 CDM군 사이에서 골무기질 밀도가 현저하게 감소하는 것으로 나타났다($P<0.05$). 또한 감소된 수치는 CCP 250 mg/kg 투여군에서 CON 수준으로 회복되는 것으로 나타났다($P<0.05$). Han et al. (2010)에서 다뤄진 바와 같이 칼슘급여를 통해 골무기질의 밀도가 증가되는 것으로 나타났다. 대퇴골의 중심부분을 동일한 면적으로 지정하는 ROI 측정치를 보면 CCP 250 mg/kg 투여군이 가장 높았고, CP 500 mg/kg, CCP 100 mg/kg, CCP 500 mg/kg 및 Sea-A 100, 250, 500 mg/kg의 농도군에서는 CDM군에 비교하여 상승된 수치를 보였으나 큰

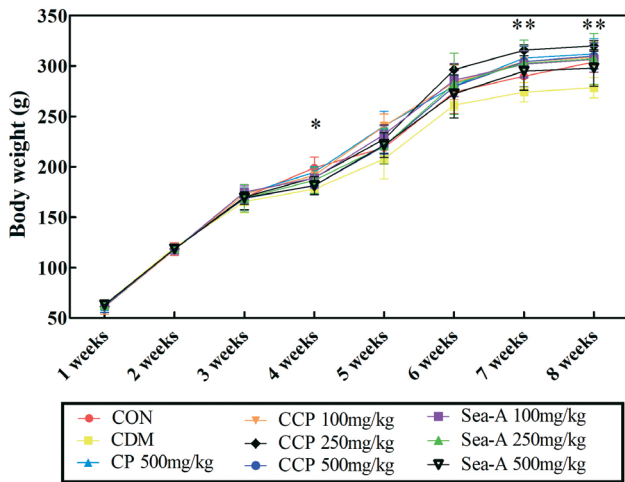


Fig. 3. Comparison of body weight for 8 weeks between low calcium diet animal models and calcium source administration model groups. CON, Vehicle administration on normal control rat; CDM, Vehicle administration on calcium deficient rat; CP, *Corallina pilulifera*; CP 500 mg/kg, 500 mg/kg dose of CP administration on calcium deficient rat; CCP, Calcined CP; CCP 100 mg/kg, 100 mg/kg dose of CCP administration on calcium deficient rat; CCP 250 mg/kg, 250mg/kg dose of CCP administration on calcium deficient rat; CCP 500 mg/kg, 500 mg/kg dose of CCP administration on calcium deficient rat; Sea-A 100 mg/kg, 100 mg/kg dose of Sea-A administration on calcium deficient rat; Sea-A 250 mg/kg, 250 mg/kg dose of Sea-A administration on calcium deficient rat; Sea-A 500 mg/kg, 500 mg/kg dose of Sea-A administration on calcium deficient rat. Values are Mean±SD for 4 rats. *CON vs CDM P<0.05. **CDM vs CCP 250 mg/kg P<0.05 by Tukey's HSD.

차이를 보이지 않았다(P>0.05). 또한, 위와 같은 결과는 Duan et al. (1999), Cordey et al. (1992), Vega et al. (1998)의 연구에서 뼈 건강 지표 중 BMD 및 bone area의 높은 수치가 강한 뼈라는 결과를 바탕으로 칼슘결핍유도가 명확하게 이뤄졌음을 나타냈고, 칼슘급여를 통해 개선됨을 확인할 수 있다. 이는 Roberfroid et al. (2002)의 연구 결과와 같이 칼슘의 섭취수준과 칼슘 결핍 식이를 통해 뼈의 상태가 비례관계를 보여준 결과로 일치하는 것으로 나타났지만 높은 칼슘 섭취수준에도 불구하고 급원의 처리 형태에 따라 상이한 결과를 보였다.

식이에 따른 체중 및 신체적 변화

56일간의 칼슘 결핍 식이를 진행한 실험동물의 체중 증가량 및 사료 섭취량에 1주일 간격으로 칼슘 보충제의 투여가 미치는 영향을 Fig. 3에 나타내었다. 본 실험을 진행하는 과정에서 처음 실험군간 차이를 보인 주차는 4주차로 칼슘공급이 이뤄진 군에서는 차이를 보이지 않았으나, CON과 CDM 사이에서 체중의 차이를 보였으며, 이는 통계적 유의성을 보였다(P<0.05). 하지

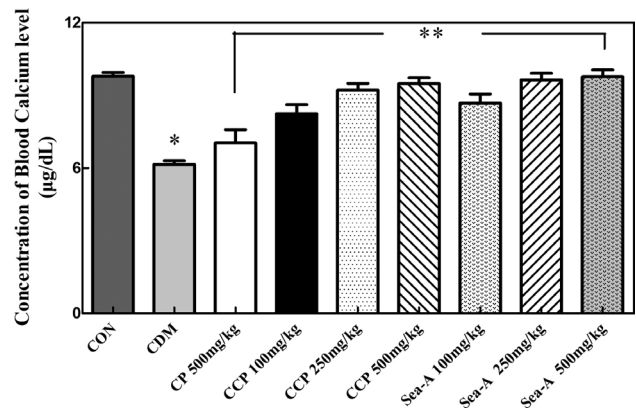


Fig. 4. Comparison of blood calcium concentrations between low calcium diet animal models and calcium source administration model groups. CON, Vehicle administration on normal control rat; CDM, Vehicle administration on calcium deficient rat; CP, *Corallina pilulifera*; CP 500 mg/kg, 500 mg/kg dose of CP administration on calcium deficient rat; CCP, Calcined CP; CCP 100 mg/kg, 100 mg/kg dose of CCP administration on calcium deficient rat; CCP 250 mg/kg, 250mg/kg dose of CCP administration on calcium deficient rat; CCP 500 mg/kg, 500 mg/kg dose of CCP administration on calcium deficient rat; Sea-A 100 mg/kg, 100 mg/kg dose of Sea-A administration on calcium deficient rat; Sea-A 250 mg/kg, 250 mg/kg dose of Sea-A administration on calcium deficient rat; Sea-A 500 mg/kg, 500 mg/kg dose of Sea-A administration on calcium deficient rat. Values are Mean±SD for 4 rats. *CON vs CDM P<0.05. **CDM vs CCP 250 mg/kg P<0.05 by Tukey's HSD.

만 이 무게의 차이는 5주차에 접어들면서 회복되었으며 CON과의 차이를 보이지 않았다. 이와는 대조적으로 칼슘공급이 이루어진 7주차와 8주차에서 각각 CDM군과 CCP 250 mg/kg 투여군 사이에서 체중의 차이가 보였으며, CDM군에 비해 상대적으로 체중이 증가한 것을 나타냈다(P<0.05). 하지만 전체적인 결과를 보았을 때, CDM 군의 체중이 상대적으로 가벼운 것을 확인할 수 있었으나, CCP 250 mg/kg 투여군을 제외한 나머지 실험군에서는 통계적 유의성을 보이지는 않았으며, CP, CCP 및 Sea-A 투여군 내에서도 차이는 없는 것으로 나타났다(P>0.05).

위와 같은 결과는 Iacono (1974)의 연구와 Han et al. (2010)의 연구에서 저 칼슘식이 체중 증가량에 영향을 준다는 연구들과 유사한 결과를 보였으며, 적정 수준의 칼슘 공급이 고 칼슘 공급보다 식이 섭취량 및 체중 증가량이 높다고 보고된 Foley et al. (1990)의 연구 결과와 같았다. 하지만 이와는 대조적으로 Kwon (1988)과 Lee et al. (1993)의 연구결과에서는 낮은 농도의 칼슘 섭취가 식이섭취량과 체중 증가량에 유의한 차이를 나타내지 않는다고 보고하였다. 또한, 본 연구에서는 CDM군의 경우와 같이 칼슘의 함량이 0%에 가까운 식이를 제공함에 따

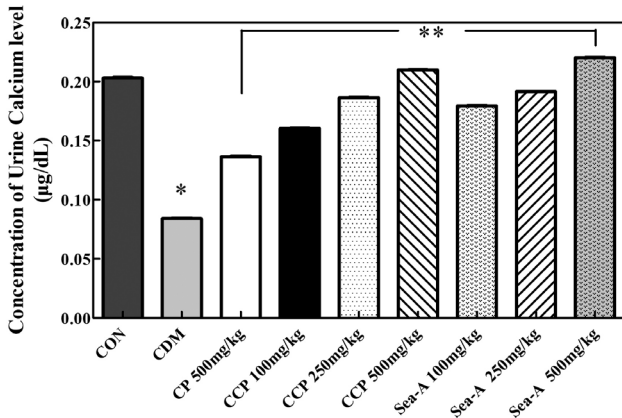


Fig. 5. Comparison of urine calcium concentrations between low calcium diet animal models and calcium source administration model groups. CON, Vehicle administration on normal control rat; CDM, Vehicle administration on calcium deficient rat; CP, *Corallina pilulifera*; CP 500 mg/kg, 500 mg/kg dose of CP administration on calcium deficient rat; CCP, Calcined CP; CCP 100 mg/kg, 100 mg/kg dose of CCP administration on calcium deficient rat; CCP 250 mg/kg, 250mg/kg dose of CCP administration on calcium deficient rat; CCP 500 mg/kg, 500 mg/kg dose of CCP administration on calcium deficient rat; Sea-A 100 mg/kg, 100 mg/kg dose of Sea-A administration on calcium deficient rat; Sea-A 250 mg/kg, 250 mg/kg dose of Sea-A administration on calcium deficient rat; Sea-A 500 mg/kg, 500 mg/kg dose of Sea-A administration on calcium deficient rat. Values are Mean±SD for 4 rats. *CON vs CDM $P < 0.05$. **CDM vs CCP 250 mg/kg $P < 0.05$ by Tukey's HSD.

라 칼슘의 고갈 상태로 인한 생리상태의 영향이 체중 증가량이 낮아질 수 있음을 고려할 수 있다.

혈액 및 뇨에서의 칼슘함량

칼슘이 결핍된 랫트에게 8주간 해조 유래 칼슘 투여가 혈액 및 뇨의 칼슘 농도에 어떠한 영향을 미치는지 Fig. 4 와 Fig. 5에 각각 나타내었다. CDM군의 혈중 칼슘 농도는 6.15 mg/dL로 CON의 9.79 mg/dL에 비해 감소하는 것으로 나타났다 ($P < 0.05$). 또한 농도별 CCP 시료의 투여로 혈중 칼슘 농도는 정상과 유사한 수준으로 증가하였으며, 투여된 농도에 따라 혈액으로부터 얻은 혈청을 이용한 분석 결과 그룹별 칼슘함량의 차이를 나타냈다. 그 수치는 CP 500 mg/kg (7.04 mg/dL), CCP 100 mg/kg (8.24 mg/dL), CCP 250 mg/kg (9.21 mg/dL), CCP 500 mg/kg (9.48 mg/dL), Sea-A 100mg/kg (8.68 mg/dL), Sea-A 250 mg/kg (9.64 mg/dL), Sea-A 500 mg/kg (9.77 mg/dL)로 나타났다. 이에 대한 결과는 뇨의 칼슘 농도에서도 유사하게 나타났다. CDM군의 뇨 중 칼슘 농도는 0.08 mg/dL로 CON군의 0.20 mg/dL에 비해 감소하였고, 칼슘시료들의 급여를 통해 개선되는 것을 확인하였다($P < 0.05$). CP 500 mg/kg (0.13 mg/

dL), CCP 100 mg/kg (0.16 mg/dL), CCP 250 mg/kg (0.18 mg/dL), CCP 500 mg/kg (0.21 mg/dL), Sea-A 100 mg/kg (0.17 mg/dL), Sea-A 250 mg/kg (0.19 mg/dL), Sea-A 500 mg/kg (0.22 mg/dL)로 나타났다. 이 결과를 통해 칼슘 결핍 식이를 통한 동물모델의 뇨 중 칼슘 수치가 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 칼슘 투여를 통해 수치가 상승하는 것으로 나타났다 ($P < 0.05$). 이외에도 CP 500 mg/kg 투여군과 CCP 농도별 투여군 및 Sea-A 농도별 투여군 내에서도 두드러지는 차이를 보이는 것으로 나타났다.

사 사

이 논문은 2023년도 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임 (20220129, 해양바이오전력소재 개발 및 상용화 지원사업).

References

- Amany AS, Amel MS, Sohair RF and Mohamed M. 2013. Anti-osteoporotic effect of *Coelatura aegyptiaca* shell powder on ovariectomized rats. *Afr J Pharm Pharmacol* 7, 2406-2416. <https://doi.org/10.5897/AJPP2013.3817>.
- Bell GH, Cuthbertson DP and Orr J. 1941. Strength and size of bone in relation to calcium intake. *J Physiol* 100, 299-317. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1941.sp003944>.
- Chang SO. 2003. A study on the calcium bioavailability of eggshell powder in the growing rats. *J Nutr Health* 36, 684-690.
- Chen H, Hayakawa D, Emura S, Ozawa Y, Okumura T and Shoumura S. 2002. Effect of low or high dietary calcium on the morphology of the rat femur. *Histol Histopathol* 17, 1129-1135. <https://doi.org/10.14670/HH-17.1129>.
- Cho ML, Heu MS and Kim JS. 2001a. Study on pretreatment methods for calcium extraction from cuttle bone. *Korean J Fish Aquat Sci* 34, 483-487.
- Cho ML, Heu MS and Kim JS. 2001b. Calcination condition for recovery of calcium from cuttle bone and characteristics of calcined cuttle bone powder. *Korean J Fish Aquat Sci* 34, 600-604.
- Cordey J, Schneider M, Belendez C, Ziegler WJ, Rahn BA and Perren SM. 1992. Effect of bone size, not density, on the stiffness of the proximal part of normal and osteoporotic human femora. *J Bone Miner Res* 7, S437-S444. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650071414>.
- Duan Y, Parfitt AM and Seeman E. 1999. Vertebral bone mass, size, and volumetric density in women with spinal fractures. *J Bone Miner Res* 14, 1796-1802. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.10.1796>.
- Foley MK, Galloway ST, Luhman CM, Faidley TD and Beitz DC. 1990. Influence of dietary calcium and cholecalciferol on composition of plasma lipids in young pigs. *J Nutr* 120, 45-51. <https://doi.org/10.1093/jn/120.1.45>.

- Han J, Kim E, Cheong M, Chee S and Chee K. 2010. Bioavailability and digestibility of organic calcium sources by bone health index. *Korean J Nutr* 43, 12-25. <https://doi.org/10.4163/kjn.2010.43.1.12>.
- Iacono JM. 1974. Effect of varying dietary level of calcium on plasma and tissue lipids of rabbits. *J Nutr* 104, 1165-1171. <https://doi.org/10.1093/jn/104.9.1165>.
- Kim GH, Jeon YJ, Byun HG, Lee YS, Lee EH and Kim SK. 1998. Effect of calcium compounds from oyster shell bound fish skin gelatin peptide in calcium deficient rats. *J Korean Fish Soc* 31, 149-159.
- Kim JS, Cho ML, Heu MS, Cho TH, An HJ and Cha YJ. 2003. Solubility improvement of cuttle bone powder using organic acids. *J Korean Fish Soc* 36, 11-17. <https://doi.org/10.5657/kfas.2003.36.1.011>.
- Kim JS, Choi JD and Kim DS. 1998. Preparation of calcium-based powder from fish bone and its characteristics. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 42, 147-152.
- Kim JS, Jung NY, Jang SJ, Lee HJ, Park SH, Kim MJ and Heu MS. 2015. Characteristics of the shells and calcined powders from the butter clam *Saxidomus purpuratus* and littleneck clam *Ruditapes philippinarum* as a natural calcium resource. *J Korean Fish Soc* 48, 168-177. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0168>.
- Kim JS, Yang SK and Heu MS. 2000. Component characteristics of cooking tuna bone as a food resource. *J Korean Fish Soc* 33, 38-42.
- Kim YS, Yang E and Nam KW. 2013. Benthic marine algal flora and community structure of Eocheongdo in Western Coast of Korea. *Korean J Environ Ecol* 27, 655-665. <https://doi.org/10.13047/KJEE.2013.27.6.655>.
- Kwon OR and Kim MK. 1988. Effects of dietary Ca levels and kinds of lipid on the lipid metabolism in the rats. *Korean J Nutr* 21, 324-332.
- Lee JH, Moon SJ and Huh KB. 1993. Influence of phytate and low dietary calcium on calcium, phosphate and zinc metabolism by growing rats. *Korean J Nutr* 26, 145-155.
- Lee GW, Yoon IS, Lee HJ and Lee JS. 2016. Properties of calcium lactate prepared from calcined littleneck clam *Ruditapes philippinarum* shell powder. *Korean J Fish Aquat Sci* 49, 436-444. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2016.0436>.
- Lee HS, Park DW and Woo DS. 2009. A study on physicochemical and calcination processed characteristic of oyster shell. *J Korean Soc Manuf Technol Eng* 10, 3971-3976. <https://doi.org/10.5762/KAIS.2009.10.12.3971>.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2021. Food Code. Retrieved from <https://various.foodsafetykorea.go.kr/fsd/#!/ext/Document/FC> on Jan 21, 2022.
- Moon JY, Cho EJ, Joo SJ and Park JH. 2015. Effect of calcium extracted from salt-fermented anchovy *Engraulis japonicus* on osteoporosis in ovariectomized SD-rats. *Korean J Fish Aquat Sci* 48, 426-431. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2015.0426>.
- Na YJ, Kim JH, Kwon CJ, Choi HG and Nam KW. 2015. Ecological status evaluation using seaweed community structures of Taean coastal areas in Korea. *Ocean Polar Res* 37, 317-325. <https://doi.org/10.4217/OPR.2015.37.4.317>.
- O'Toole JF. 2011. Disorders of calcium metabolism. *Nephron Physiol* 118, 22-27. <https://doi.org/10.1159/000320884>.
- Park MG, Ha TY and Shin KS. 2011. Bioavailability of aspartic acid chelated calcium in calcium deficient rats. *Korean J Nutr* 44, 474-480. <https://doi.org/10.4163/kjn.2011.44.6.474>.
- Peacock M. 2010. Calcium metabolism in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 5, 23-30. <https://doi.org/10.2215/CJN.05910809>.
- Roberfroid MB, Cumps J and Devogelaer JP. 2002. Dietary chicory inulin increases whole body bone mineral density in growing male rats 1. *J Nutr* 132, 3599-3602. <https://doi.org/10.1093/jn/132.12.3599>.
- Shin H and Kim K. 1997. Preparation of calcium powder from eggshell and use of organic acids for enhancement of calcium ionization. *Agric Chem Biotechnol* 40, 531-535.
- Tsuchita H, Goto T, Shimizu T, Yonehara Y and Kuwata T. 1996. Dietary casein phosphopeptides prevent bone loss in aged ovariectomized rats. *J Nutr* 126, 86-93. <https://doi.org/10.1093/jn/126.1.86>.
- Vega E, Ghiringhelli G, Mautalen C, Rey Valzacchi G, Scaglia H and Zylberstein C. 1998. Bone mineral density and bone size in men with primary osteoporosis and vertebral fractures. *Calcif Tissue Int* 62, 465-469. <https://doi.org/10.1007/s002239900462>.
- Yoon GA and Kim KH. 2010. Effect of calcium source using *Tilapia Mossambica* scales on the bone metabolic biomarkers and bone mineral density in rats. *Korean J Nutr* 43, 351-356. <https://doi.org/10.4163/kjn.2010.43.4.351>.