

아스파르트산 킬레이트 칼슘의 칼슘 결핍쥐에서의 생물학적 유용성

박명규^{1,3} · 하태열² · 신광순^{1*}

경기대학교 식품생물공학과,¹ 한국식품연구원,² (주)머젠스³

Bioavailability of Aspartic Acid Chelated Calcium in Calcium Deficient Rats

Park, Myoung-Gyu^{1,3} · Ha, Tae-Yul² · Shin, Kwang-Soon^{1*}

¹Department of Food Science & Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

²Korea Food Research Institute, Suwon 463-746, Korea

³Department of Integrated Lead Discovery, Mazence Co. Ltd., Suwon 443-813, Korea

ABSTRACT

Calcium (Ca) is an essential element to maintain body homeostasis. However, many factors disturb calcium absorption. Aspartic acid chelated calcium (AAC) was synthesized by new methods using calcium carbonate and aspartic acid. This study was carried out to investigate the bioavailability of AAC in Ca-deficient rats. The experimental groups were as follows: NC; normal diet control group, CD-C; untreated control group of Ca-deficient (CD) rats, CD-CaCO₃; CaCO₃ treated group of CD rats, CD-AAC; AAC treated group of CD rats, and CD-SWC; and seaweed-derived Ca treated group of CD rats. The Ca content of various types of Ca was held constant at 32 mg/day, and the four CD groups were fed for 7 days after randomized grouping. Ca content in serum, urine, and feces within feeding periods were analyzed to confirm Ca absorption. Serum Ca content was significantly higher in the CD-AAC (11.24 mg/dL) and CD-SWC (10.12 mg/dL) groups than that in the CD-C (8.6 mg/dL) group 2 hours following the first administration. The Ca content in feces was significantly lower in the CD-AAC (35.4 mg/3 days) and CD-SWC (71.1 mg/3 day) groups than that in the CD-CaCO₃ (98.7 mg/3 days) group ($p > 0.05$). AAC had a 2.3-fold higher absorption rate of Ca than that of SWC. No differences in fibula length were observed in the NC and CD groups. The fibula weights of the CD-AAC (0.33 g) and CD-SWC (0.33 g) groups increased compared to those in the CD-C (0.27 g) group; however, no significant difference was observed between the CD groups. We conclude that bioavailability of AAC is higher than that of seaweed-derived Ca or inorganic Ca. Thus, these findings suggest the AAC has potential as a functional food material related to Ca metabolism. (Korean J Nutr 2011; 44(6): 474 ~ 480)

KEY WORDS: aspartic acid chelated calcium, bioavailability, adsorption, calcium deficient rat.

서론

칼슘 (calcium, Ca)은 생명유지에 필요한 성분 중 하나로서, 인체내에서 가장 많이 존재하는 대표적인 무기질로 일반 성인의 경우 체중의 약 2% 정도를 체내에 보유하고 있다.¹⁾ 체내에 있는 대부분의 칼슘은 뼈와 치아를 형성하며, 나머지 1% 정도는 근육의 수축과 이완, 규칙적인 심장박동, 혈액응고, 효소의 활성화, 세포내 자극과 흥분을 전달과 같은 생리활성을 조절하는 기능을 가지고 있어 칼슘의 결핍은 골다공증 뿐만

이 아니라 근육이나 눈의 경련, 손발 저림 및 불면증 등을 유도한다.²⁾ 2009년 발표된 국민건강통계에³⁾ 따르면 칼슘은 한국인의 식생활에서 섭취량이 권장량에 가장 못 미치는 영양소로 거의 모든 연령층에서 칼슘부족이 나타난다. 특히 절반 이상의 국민이 권장량의 75%에 못 미치는 수준으로 섭취하고 있으며 특히, 50세 이상 성인 여성의 경우 섭취권장량 대비 55% 수준으로 낮게 섭취하고 있다고 보고되었다.

칼슘은 여러 식품 중에 함유되어 있으나 일반적으로 식품 중 칼슘의 체내 흡수율은 함께 섭취되는 여러 가지 식이성분에 의해서 영향을 받는다. 예를 들어 적당량의 단백질, 인 (Ca/P비), 유당, 비타민 D 등은 칼슘의 흡수를 촉진시키지만 과량의 지방, 인산, 수산, 피틴산, 섬유질 등은 칼슘의 흡수를 저하시킨다고 보고되고 있다.⁴⁾ 뿐만 아니라 칼슘의 흡수율은 신체의 요구량에 따라서도 달라지며 식이를 통해 공급되는

접수일: 2011년 10월 26일 / 수정일: 2011년 11월 9일

채택일: 2011년 11월 10일

*To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ksshin@kyonggi.ac.kr

칼슘의 양보다 체내로의 흡수율을 높이는 것이 더 중요하다고 알려져 있다.²⁾

세계 각국에서는 칼슘영양의 중요성이 재 강조되면서 체내 이용성이 높은 칼슘급원식품, 칼슘강화식품, 칼슘보충제, 칼슘강화 신소재 및 체내 칼슘이용 증진물질 등에 대한 개발연구가 활발하게 수행되고 있다. 현재 시판중인 칼슘소재로는 탄산칼슘, 인산칼슘, 글루콘산칼슘, 구연산칼슘, 염화칼슘 등의 무기칼슘염과 우골분, 난각칼슘, 패각칼슘, 해조칼슘, 유청칼슘 등의 유기칼슘 소재들이 있다.^{5,6)} 우리나라의 경우 많은 칼슘 함유식품의 원료로, 수입된 우골분이 사용되는데 광우병 파동 이후 안정성의 문제가 제기되고 있어 칼슘 공급원으로서의 양질의 우골분 대체물질의 개발은 국민의 건강과 영양을 위해 매우 시급한 과제이다.⁷⁾

최근 몇몇 연구자들에 의해 단백질의 가수분해물인 oligopeptide, CPP (casein phosphopeptide) 혹은 대두펩타이드와 킬레이트된 칼슘이 무기칼슘보다 소장세포내로 더 잘 흡수된다고 보고되고 있다.^{8,9)} 본 연구진은 탄산칼슘을 원료로 산성 아미노산인 aspartic acid와 아미노산 킬레이트 칼슘(amino acid chelated calcium)을 제조하였다.

이에 본 연구에서는 이렇게 제조된 아스파르트산 킬레이트 칼슘(aspartic acid-chelated calcium)의 체내 흡수 정도와 그 생물학적 유용성을 확인하고자 하였다. 이를 위하여 칼슘 결핍 식이로 유도된 실험동물에서의 체내 흡수율과 칼슘 결핍 상태 개선력을 확인하였으며 현재 식물성 유래 칼슘으로 시판되는 유기칼슘형태인 해조칼슘(Seaweed-derived calcium, SWC)과 무기칼슘형태인 탄산칼슘(CaCO_3)과 비교 분석하여 그 유용성의 정도를 확인하였다.

재료 및 방법

재 료

아미노산 킬레이트 칼슘 제조에 사용한 CaCO_3 , aspartic acid는 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, 동물 실험 시 대조군으로 사용한 해조칼슘(Seaweed-derived calcium)은 Strand Farm Cussabinnny Carnaline Co. (Cork, Ireland) 제품을 구입하여 사용하였다. 혈청과 뇨의 칼슘 함량 측정 시 사용한 Calcium Reagent Arsenazo III kits는 Sigma Co. 제품을 사용하였다.

아미노산 칼슘의 제조

실험에 사용한 아스파르트산 킬레이트 칼슘(Aspartic Acid-chelated Calcium; AAC)은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 정제수 500 mL에 CaCO_3 20 g을 충분히 교반시켜 분산

시킨 후 aspartic acid 60 g을 넣어 충분히 교반시켰다. 반응이 끝난 반응액으로부터 불용성의 물질을 제거하기 위하여 원심분리($3,000 \times g$, 10 min) 후 투명한 상등액을 회수 후 동결 건조시켜서 실험에 사용하였다.

실험동물 및 사육 환경

실험동물은 Sprague-Dawley계 3주령 수컷흰쥐를 (주)대한바이오파크(Seoul, Korea)로 부터 구입하여 1 주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물은 사육케이지(42×28 cm)를 이용해 사육하였으며, 온도 $22 \sim 24^\circ\text{C}$, 습도 $60 \pm 5\%$ 가 유지되며 밤낮 주기(12시간 light/12시간 dark)가 자동 조절 장치에 의해 조절되는 사육 환경에서 사육하였다. 실험동물의 구입, 사육 및 실험의 모든 과정은 한국식품연구원 동물실험 윤리위원회의 승인을 받고 규정에 따라 실행하였다.

칼슘 결핍 유도 및 실험군 설정

칼슘 결핍 유도는 Table 1과 같이 식이를 제조하였으며 이때 mineral mixture 대신 칼슘이 제거된 Ca-free mineral mixture로 조제하여 24일 간 투여하여 칼슘 결핍 상태를 유도하였다. 칼슘 결핍이 유도된 실험동물은 난괴법에 따라 6마리 씩 4 군으로 분류하였다. 칼슘 결핍 상태가 유도된 흰쥐(calcium deficient rat, CD)에 CaCO_3 투여군(CD- CaCO_3), AAC 투여군(CD-AAC), 해조칼슘 투여군(CD-SWC) 및 증류수 투여군(CD-C)으로 나누었으며, 각 시료는 투여시 오차를 줄이기 위하여 강제경구투여 방식으로 7일간 수행하였다. 정상대조군(Normal control; NC)은 칼슘 결핍 쥐와 동일한 환경에서 사육하면서 Table 1과 같이 AIN-76 mineral mixture를 첨가한 정상 식이를 조제하여 투여하였다. 각 시료의 칼슘함량은 CaCO_3 40%, AAC 10.8% 및 SWC 33%이며, 칼슘 결핍 쥐에 투여된 칼슘 보충제의 농도는 AIN-76 mineral mixture에 첨가되어 있는 칼슘 농도의 1/3에 해당하는 양인 32 mg을 환산하여 투여하였다. 실험 식이를 조제할 때와 동물을 사육하는 동안 급여한 물은 모두 3차 증류수를 사용하였으며, 식이는 24시간 자유급식 방식으로 급식하였다. 사육기간 중 무기질의 오염을 방지하기 위하여 사육이 시작하기 전에 질산으로 물통 및 대사 cage를 세척 후 3차 증류수로 완전히 수세한 후 건조한 후 사용하였다. 7일의 투여 기간 중 각 군의 시료섭취량과 체중 변화를 관찰하였다.

혈액, 뇨 채취 및 장기 적출

첫 칼슘 투여 2시간 경과 후 혈액은 안와채혈 방식으로 혈액을 채취하였으며, 실험 종료 시점에서의 혈액은 12시간 절식시킨 후 ethyl ether로 마취시켜 희생시킨 후 흉강을 열고 대동맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 시험관에 넣

Table 1. Diet composition (g/kg diet) and feed rate of calcium

	NC	Calcium deficient (CD) groups			
		CD-C	CD-CaCO ₃	CD-AAC	CD-SWC
Casein	200	200	200	200	200
Sucrose	100	100	100	100	100
Cellulose	50	50	50	50	50
Mineral mixture ¹⁾	35	35	35	35	35
Vitamin mixture ²⁾	10	10	10	10	10
Methionine	3	3	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Corn starch	549.5	549.5	549.5	549.5	549.5
Corn oil	50	50	50	50	50
Calcium intake by oral administration (mg/day)					
CaCO ₃	—	—	32	—	—
AAC	—	—	—	32	—
SWC	—	—	—	—	32

1) NC (normal control) group: AIN-76 mineral mixture, CD (calcium Deficient) groups: Ca deficient mineral mixture 2) Vitamin mixture: AIN-93G.

NC: normal control, CD-C: vehicle administration on calcium deficient rat, CD-CaCO₃: CaCO₃ administration on calcium deficient rat, CD-AAC: amino acid chelated calcium (AAC) administration on calcium deficient rat, CD-SWC: seaweed-derived calcium administration on calcium deficient rat

어 4℃, 3,000 × g에서 10분간 원심분리하여 혈청을 취하였으며 분석 시까지 -70℃에서 보관하였다. 혈액 채취 후 간, 신장 및 비장을 적출하여 중량을 측정하였다. 채취된 비골 (fibula)은 trimming 후 생리식염수에 세척하여 여과지로 표면의 수분을 제거한 후 무게 및 길이를 측정하였다.

변의 칼슘량의 측정

시료 투여 시작 후 3일 동안 각 군의 변을 모두 취하였다. 변에 함유된 칼슘의 함량을 측정하기 위하여 시료 (변) 전처리에는 마이크로웨이브 분해법을¹⁰⁾ 이용하여 처리하였다. 시료 0.25 g에 HNO₃ 5 mL과 H₂O₂ 2 mL을 넣고 400 W, 15 min, 800 psi, 200 °C에서 전처리 한 후 ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer, Model: Jobin Yvon 138 Ultrace)로 칼슘 함량을 분석하였다.

통계 분석

실험을 통해 얻어진 모든 자료는 SAS program을 이용하여 평균 ± 표준오차로 나타내었다. 각 군의 유의차 검증은 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple comparison test에 의해 검증하였다.

결 과

혈청 중 칼슘농도의 경시적 변화

경구로 투여된 칼슘은 소장 점막을 통해 흡수된 후 각각의 장기로 이동되어 이용되게 된다.¹¹⁾ Bhandarkar 등¹²⁾의 연구 결과에 따르면 ⁴⁵Ca를 이용하여 칼슘의 흡수율을 측정해 본 결

과 투여 2시간 후 혈액 중에서 측정하는 것이 흡수율을 측정하는데 가장 유효하다고 보고하였다. 따라서 24일간 칼슘 결핍 식이를 제공하여 칼슘 결핍 상태를 유도한 실험동물에 각각의 칼슘 보충제를 최초로 투여한 다음 2시간 후 안와채혈로 혈액을 채취하여 혈중 칼슘의 농도를 측정해 보았다. 그 결과 (Fig. 1), 무기칼슘인 CaCO₃ 형태로 투여된 군 (CD-CaCO₃)은 칼슘결핍 대조군 (CD-C)과 혈중 칼슘의 농도에서 유의적 차이를 보이지 않았지만, 아마노산과 결합된 형태로 투여한 군 (CD-AAC)은 11.24 ± 0.85 mg/dL로 칼슘결핍이 유도되지 않은 정상 대조군 (NC)의 혈중 칼슘 농도인 12.19 ± 0.38 mg/dL와 거의 유사한 수준을 나타냈다. 해조칼슘 투여군 (CD-SWC)의 경우 10.12 ± 0.21 mg/dL로 CD-AAC 군보다 낮은 흡수율을 나타내었다. 형태를 달리한 칼슘 투여 후 칼슘 결핍 상태의 회복률은 NC를 대조군으로 하여 AAC (92.2%) > SWC (83.0%) > CaCO₃ (69.9%)로 확인되었다. 이와 같은 결과는 칼슘의 흡수가 원료의 상태 및 용해도 등에 의하여 유의적인 차이를 나타남을 알 수 있었다.

ACC가 SWC 투여 군 보다 높은 칼슘 흡수율을 나타내는 것은 아스파르트산 킬레이트 칼슘이 용해되어 있는 상태로 소화기관에서 존재한다는 것을 의미하고 또한 다른 칼슘 흡수를 저해하는 물질로부터 보호를 받고 있다는 것으로 예측할 수 있다.

분변을 통해 확인한 칼슘 흡수율

칼슘 결핍쥐에 형태를 달리한 칼슘 보충제를 투여한 지 3일이 경과 한 다음, 3일 간의 대변을 모두 회수하여 실험동물

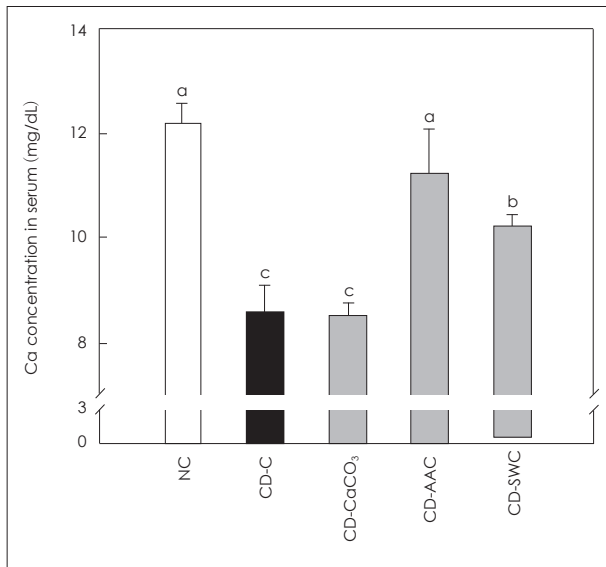


Fig. 1. Acute metabolic effects by various forms of calcium supplement. NC: normal control, CD-C: Vehicle administration on calcium deficient rat, CD-CaCO₃: CaCO₃ administration on calcium deficient rat, CD-AAC: amino acid chelated calcium (AAC) administration on calcium deficient rat, CD-SWC: seaweed-derived calcium administration on calcium deficient rat. Bloods were collected in two hours following first administration. Values are Mean \pm SD for 6 rats. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range tests.

Table 2. Apparent calcium absorption

	Ca intake (mg/3 days)	Fecal Ca excretion (mg/3 days)	Apparent absorption (%)
CD-C	0	2.7 \pm 0.6	—
CD-CaCO ₃	96	98.7 \pm 5.3 ^a	0
CD-AAC	96	35.4 \pm 2.3 ^b	63.1
CD-SWC	96	71.1 \pm 7.3 ^c	25.9

CD-C: vehicle administration on calcium deficient rat, CD-CaCO₃: CaCO₃ administration on calcium deficient rat, CD-AAC: amino acid chelated calcium (AAC) administration on calcium deficient rat, CD-SWC: seaweed-derived calcium administration on calcium deficient rat. Feces were collected for 3 days following first administration. Values are Mean \pm SD for 6 rats. Means with different superscript letters in Ca intake group are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range tests

의 대변 중 흡수되지 못하고 배설된 칼슘의 양을 측정한 결과 (Table 2), CD-CaCO₃군의 경우 변으로 배설된 칼슘이 양이 98.7 mg으로 3일 간 투여된 칼슘 (96 mg/3 day)이 거의 흡수되지 못하였으나 CD-AAC군의 경우 35.39 mg, CD-SWC군의 경우 71.05 mg이 배설되었다. 출납법에 의한 칼슘의 외견상 흡수율을 보면 무기형태의 탄산칼슘군은 0%의 흡수율을 나타내었고 해조유래 칼슘인 SWC가 28.8%, 아미노산과 킬레이트 결합한 형태를 가지는 AAC가 65.9%로 나타나 아미노산 형태의 칼슘 투여시 해조유래 칼슘보다 약 2.3배 높은

흡수율을 가지고 있는 것을 알 수 있었다.

Heaney 등¹³⁾은 글리신아미노산 칼슘킬레이트가 다른 칼슘종류인 우유칼슘 (27%), 우골분 (27%), 구연산칼슘 (24%), 탄산칼슘 (24%) 및 hydroxyapatite (17%)의 흡수율에 비하여 유의적으로 높은 흡수율 (44%)을 가지고 있다고 보고하였다. 본 연구에 사용된 아스파르트산 킬레이트 칼슘의 흡수율 65.9%로 Heaney 등이 발표한 글리신아미노산칼슘 킬레이트의 흡수율보다도 높은 것으로 나타났다.

Heaney 등¹⁶⁾과 Pointillart와 Gueguen¹⁷⁾은 탄산칼슘과 같은 불용성 칼슘의 흡수에 식이가 미치는 영향이 매우 크다고 보고하였다. 탄산칼슘은 절식상태에서 음식이 없이 단독으로 투여했을 때 보다 식이와 함께 투여되었을 때 흡수가 잘 되는 것으로 보고되었다. 이와 같은 현상은 사람과 돼지의 실험에서 입증되었다. 본 연구에서 탄산칼슘이 거의 흡수되지 않은 것으로 나타난 이유는 칼슘은 위산과 같이 낮은 pH에서 녹지만 pH가 중성인 십이지장과 소장에서는 칼슘의 용해도가 낮아지거나 일부의 칼슘은 침전이 일어난 것으로 추정할 수 있다.^{14,15)} 본 실험에서 탄산칼슘의 흡수율이 낮은 현상은 단회투여 후 2시간 후의 혈청에서의 칼슘의 변화 (Fig. 1)와 3일간 투여 후 대변에서의 칼슘의 배출량 (Table 2)에서 보듯이 무기형태의 칼슘의 흡수가 매우 낮은 것을 알 수 있었다. 또한 동일한 유기형태의 AAC와 SWC에서도 해조 유래 칼슘인 SWC 보다 아미노산 킬레이트 칼슘이 더 높은 흡수율을 가지는 것을 알 수 있었다.

식이 섭취량 및 신체적 변화

24일간의 칼슘 결핍 식이를 급여한 실험동물의 체중 증가량 및 사료 섭취량에 1주일 간의 칼슘 보충제의 투여가 미치는 영향을 Table 3에 나타내었다. 우선 체중 증가량을 보면, 정상군과 칼슘결핍 실험군 간에 차이는 거의 나타나지 않았으며 실험군 간에도 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 칼슘 결핍이 심한 경우 실험동물에서 성장을 저해한다고 알려져 있으나 본 실험에서는 정상군과 칼슘결핍 대조군 간에 유의적인 차이가 나타나지 않은 것으로 보아 24일의 칼슘결핍 식이의 공급으로 실험동물의 칼슘 결핍정도가 심화되지는 않았던 것으로 생각된다. 사육하는 동안 섭취한 총 식이 섭취량을 보면 정상 군과 칼슘결핍 대조군 간에 차이는 나타나지 않았으며 그룹 간에도 유의적인 차이는 나타나지 않았다. Tsugawa 등¹⁸⁾은 비타민 D의 조건을 달리하여 탄산칼슘, 젖산칼슘, 굴 칼슘의 칼슘이용률을 비교하였을 때 칼슘급원에 따른 체중 증가와 식이섭취량의 차이가 없음을 보고하였다. 또한 흰쥐를 대상으로 칼슘식이에 casein phosphopeptides (CPP)를 첨가했을 때에도 성장, 식이섭취량 및 식이효율에 영향을 주

Table 3. Body weight, weight gain, diet intake, and organ weight

Groups	NC	CD-C	CD-CaCO ₃	CD-AAC	CD-SWC
Items					
IBW (g) ¹⁾	107.6 ± 2.2 ^{ns}	106.0 ± 2.3	106.3 ± 2.1	106.2 ± 2.0	106.3 ± 2.1
FBW (g) ²⁾	181.2 ± 2.2 ^{ns}	197.4 ± 13.6	191.2 ± 15.2	181.6 ± 16.3	196.6 ± 18.9
TDI (g) ³⁾	376.2 ± 19.2 ^{ns}	371.6 ± 22.4	405.0 ± 14.7	327.9 ± 24.4	401.1 ± 27.2
Organ weight (mg/BW)					
Liver	44.8 ± 1.9 ^a	40.7 ± 1.4 ^{ab}	37.4 ± 1.6 ^b	44.2 ± 1.7 ^a	36.0 ± 0.6 ^b
Kidney	8.3 ± 0.3 ^{ns}	8.8 ± 0.3	8.6 ± 0.40	8.4 ± 0.3	8.2 ± 0.2
Spleen	3.5 ± 0.5 ^{ns}	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.3

1) IBW: Initial body weight 2) FBW: Final body weight 3) TDI: Total diet intake. Values are Mean ± SD for 6 rats. Means with different superscript letters in same items are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range tests. ns: not significant
 NC: normal control, CD-C: vehicle administration on calcium deficient rat, CD-CaCO₃: CaCO₃ administration on calcium deficient rat, CD-AAC: amino acid chelated calcium (AAC) administration on calcium deficient rat, CD-SWC: seaweed-derived calcium administration on calcium deficient rat

Table 4. Calcium concentration of serum and urine

	Serum (mg/dL)	Urine (mg/dL)
NC	10.68 ± 0.18 ^a	0.20 ± 0.03 ^a
CD-C	8.12 ± 0.52 ^b	0.11 ± 0.03 ^b
CD-CaCO ₃	9.13 ± 0.21 ^b	0.22 ± 0.01 ^a
CD-AAC	10.63 ± 0.21 ^a	0.22 ± 0.04 ^a
CD-SWC	10.44 ± 0.07 ^a	0.22 ± 0.02 ^a

NC: normal control, CD-C: vehicle administration on calcium deficient rat, CD-CaCO₃: CaCO₃ administration on calcium deficient rat, CD-AAC: amino acid chelated calcium (AAC) administration on calcium deficient rat, CD-SWC: seaweed-derived calcium administration on calcium deficient rat. Values are Mean ± SD for 6 rats. Means with different superscript letters in same items are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range tests. ns: not significant

지 않았다.¹⁹⁾ 따라서 군간 식이 섭취량이나 성장에 차이가 없는 것은 상기의 연구자와 동일한 결과라고 생각된다.

칼슘 결핍된 흰쥐에 칼슘 보충제의 투여가 장기 무게에 미치는 영향을 관찰해 본 결과 (Table 3) 간 중량을 보면 칼슘 결핍 대조군 (40.7 mg/BW)이 정상식이 투여군 (44.8 mg/BW)에 비해 감소하였고 칼슘 결핍 후 AAC 투여군 (CD-AAC)은 44.2 mg/BW로 정상군과 동일한 수준이었으며 해조칼슘 투여군 (CD-SWC)은 AAC 투여군 보다는 간의 무게가 작았으나 두 군의 유의적 차이는 없었다. 신장 및 비장의 중량은 모든 군 간에 차이를 나타내지 않았다. 따라서 AAC 투여가 SWC보다 흡수율이 더 좋아 hepatic calcium의 농도가 증가한 것으로 예측할 수 있다.

혈청, 뇨의 칼슘 농도

칼슘이 결핍된 흰쥐에게 7일간의 칼슘 보충제 투여가 혈액과 뇨의 칼슘 농도에 어떠한 영향을 미치는지 Table 4에 나타내었다. 칼슘 결핍 대조군의 혈중 칼슘 농도는 8.12 mg/dL로 정상 군의 10.68 mg/dL에 비해 유의적으로 감소하였으나, 유기 칼슘 보충제 (AAC 및 SWC)의 투여로 혈중 칼슘 농도는

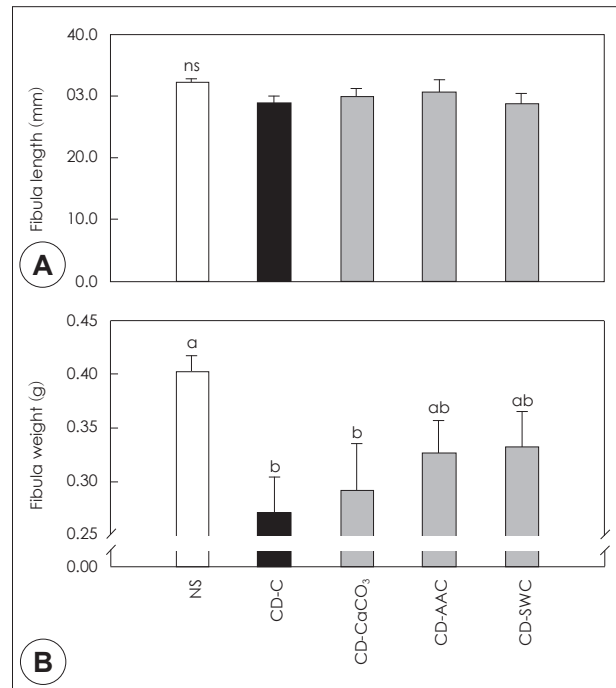


Fig. 2. Changes of length (A) and weight (B) on fibula by various forms of calcium supplement. NC: normal control, CD-C: Vehicle administration on calcium deficient rat, CD-CaCO₃: CaCO₃ administration on calcium deficient rat, CD-AAC: amino acid chelated calcium (AAC) administration on calcium deficient rat, CD-SWC: seaweed-derived calcium administration on calcium deficient rat. Fibulas were collected in 7 days following first administration. Values are Mean ± SD for 6 rats. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range tests. ns: not significant.

정상과 유사한 수준으로 증가하였다. 뇨 중 칼슘 농도는 칼슘 결핍 대조군이 정상군에 비해 약 45%로 상당히 감소하였으며, 칼슘 보충제의 투여군은 정상군 유사한 수준을 나타내었다.

비골의 길이 및 중량 변화

형태가 다른 칼슘 보충제의 투여가 칼슘이 결핍된 흰쥐의

비골 무게 및 길이에 미치는 영향을 측정해 본 결과 (Fig. 2) 비골의 길이는 칼슘 결핍 대조군 (CD-C)이 정상군 (NC)에 비해 다소 낮았으며, CaCO_3 및 AAC를 투여한 군이 CD-C에 비해 증가하는 경향을 보였으나 모든 실험군에서 유의적 차이는 없었다 (Fig. 2A). 비골의 무게를 관찰한 결과 (Fig. 2B) CD-C 군이 정상군에 비해 약 32.5% 유의적으로 감소하였으며, CaCO_3 투여군은 CD-C 군보다는 비골의 중량이 증가하였으나 유의적 차이는 없었다. 반면 유기 형태의 칼슘을 투여한 군 (CD-AAC 및 CD-SWC)은 정상군 수준에는 미치지 못하였으나 CD-C 군보다 증가하였다. Chen 등²⁰ 및 Tsuchita 등²¹에 의하면 칼슘이 함유된 식이를 섭취한 군에서 대퇴골의 무게가 증가하였다고 보고하였다. Cho 등²²은 대퇴골의 길이 성장은 칼슘 섭취기간에 의한 영향을 받으며 칼슘의 종류와 섭취수준에 영향을 받지 않는다고 보고하였다. Bell 등²³의 연구에서도 칼슘의 급원 및 섭취수준이 골격의 길이에 영향을 주지 못한다고 하였다. 칼슘 섭취가 부족하거나 해면 골 자체에 충분한 칼슘이 보유되지 않았을 경우, 우선적으로 다른 골격부분에서 골반 및 척추 뼈에 칼슘 공급을 하게 되며, 칼슘 섭취가 증가하면 뼈의 안쪽을 구성하는 해면 골의 규모가 커지게 된다고 알려져 있다. 본 실험의 결과 칼슘 결핍으로 인하여 비골의 무게 및 길이가 감소하며, 칼슘 보충제에 의해 비골의 무게가 증가하는 것은 이러한 이유 때문으로 생각된다. CD-AAC 및 CD-SWC군이 정상적인 수준까지 비골의 중량이 늘어나지 못한 것은 두 군의 칼슘 함량이 정상군의 1/3에 해당하는 것과 24일의 결핍 식이 투여 후 7일 간의 짧은 투여 때문이라고 생각된다.

고 찰

Heaney 등¹³은 우유칼슘, 구연산칼슘, 우골분, 탄산칼슘, hydroxyapatite 그리고 아미노산 칼슘 킬레이트의 흡수율 비교 평가 결과를 보고하였다. 그들의 연구 결과에 따르면 아미노산킬레이트 칼슘의 흡수율이 탄산칼슘과 구연산칼슘에 비하여 1.83배 흡수율이 높은 것으로 보고하였다. 아미노산 칼슘 킬레이트가 흡수율이 높은 것은 아미노산 킬레이트 미네랄이 식품의 성분과 반응하지 않고 흡수될 수 있는 미네랄의 양이 상대적으로 많이 남아 있을 가능성이 높기 때문이다. 이러한 이유는 미네랄이 아미노산의 아미노기와 카르복실기에 의하여 킬레이트로 보호되어지고 있으며 전기적으로 전하가 중성을 유지하기 때문이다. 따라서 피틴산, 옥살산 혹은 인산과 같은 저해제와 반응을 일으키지 않는 특성 뿐 아니라 아미노산 킬레이트는 다른 미네랄과의 흡수길항작용을 받지 않는 것으로 알려져 있다.²⁴

부작용이 거의 없으며 흡수율이 높은 아미노산 킬레이트는 일반적으로 알파-아미노산과 금속이온 사이의 반응에 의해 생성되며, 상기 킬레이트가 환구조를 갖기 위해서는 2 또는 그 이상의 원자기를 가진 금속이온이 요구된다. 이러한 반응에서, 금속이온의 양전하는 알파-아미노산의 아미노기 또는 카르복실기의 음전하와 반응하여 중화된다. 기존의 아미노산 미네랄 킬레이트의 제조에 사용되는 소재들은 염화물 혹은 황산과 같은 수용성의 염의 형태를 갖고 있는 소재를 이용하여 제조할 경우 반응공정을 알칼리로 만들어 반응이 원활히 이루어지도록 해야 한다. 이 경우에 부산물이 아미노산 킬레이트에 함유되는 단점이 있는데 이들 부산물은 아미노산 킬레이트 제조반응에 간섭을 주거나 흡수에 영향을 주는 경향이 있다. 탄산칼슘을 원료로 하여 산성아미노산과 반응을 시킬 경우 탄산가스가 발생되어 휘발되어 없어짐으로 황산나트륨과 같은 간섭이온이 형성되지 않을 뿐 아니라 전기적으로 중성인 형태의 아미노산킬레이트를 제조할 수 있었다. 이렇게 제조된 아스파르트산 킬레이트 칼슘 (AAC)의 흡수율은 해조칼슘 (SWC)이나 무기염 형태의 CaCO_3 보다 유의적으로 높았으며, 1주일간 투여 결과 24일 동안 칼슘 결핍 식이로 인해 발생한 혈중 칼슘 농도 감소 및 비골의 중량 감소 개선 효과가 있는 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구의 결과를 통해 AAC가 철분 보충제로서 충분한 생물학적 유용성을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다.

요약 및 결론

칼슘은 우리몸의 항상성을 유지하는데 필수적인 요소이지만 칼슘의 체내 흡수는 함께 섭취되는 여러 가지 식이성분에 의해 흡수율이 낮아지며, 장내 환경, 신체의 요구량에 따라 서로 달라진다. 따라서 칼슘은 섭취된 양보다는 흡수율을 높이는 것이 더 중요하다. 세계 각국에서는 칼슘영양의 중요성이 재 강조되면서 흡수율이 높은 칼슘에 대한 연구가 활발하게 수행되고 있다. 본 연구진에서는 아스파르트산과 탄산칼슘을 알칼리 조건에서 반응시켜 아스파르트산 킬레이트 칼슘 (AAC; aspartic acid chelated calcium)을 제조하였으며 본 연구에서는 AAC의 칼슘결핍 쥐 (Ca-deficient rat)에서의 생물학적 유용성을 확인하였다. 시험군은 칼슘이 함유된 식이를 섭취한 정상군 (NC), 칼슘 결핍 쥐에 생리식염수를 공급한 결핍 대조군 (CD-C), 칼슘 결핍 쥐에 무기칼슘인 탄산칼슘 투여군 (CD- CaCO_3), AAC 투여군 (CD-AAC) 및 해조칼슘 투여군 (CD-SWC)으로 나누어 실시하였다. 칼슘 결핍쥐에 형태가 다른 칼슘을 각각 칼슘 함량 32 mg/day로 보정하여 7일 간 투여하였으며 흡수를 확인하기 위하여 투여 기간 중 혈

액, 뇨 및 변에서의 칼슘의 함량을 측정하였다. 첫 투여 후 2 시간이 지난 다음 혈액 중 칼슘의 함량을 측정 한 결과 CDA-AAC군 (11.24 mg/dL)와 CD-SWC군 (10.12 mg/dL) 이 결핍 대조군인 CD-C (8.6 mg/dL)군보다 유의적으로 높았다. 3일간 투여하면서 흡수되지 못한 칼슘의 배출량을 변에서 측정 한 결과 AAC (35.39 mg/3 days)와 SWC (71.05 mg/3 day) 각각 65.9% 및 28.8%의 흡수율로 AAC가 SWC보다 약 2.3 배 높은 흡수율을 나타내었으며 CaCO_3 는 거의 흡수되지 않았다. 7일간의 투여를 종료하고 대퇴골의 중량을 측정해 본 결과, CD-AAC 군 (0.33 g)과 CD-SWC 군 (0.33 g)은 결핍 대조군 (CD-C, 0.27 g) 보다 증가하였다. 상기의 결과를 통해 아스파르트산 킬레이트 칼슘이 해조칼슘 보다 생물학적 유용성이 높음을 알 수 있었다. 따라서 아스파르트산 킬레이트 칼슘은 칼슘 대사와 관계되는 기능성 소재로의 잠재성이 있음을 확인할 수 있었다.

Literature cited

- 1) Allen LH. Calcium bioavailability and absorption: a review. *Am J Clin Nutr* 1982; 35(4): 783-808
- 2) Cashman KD. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *Br J Nutr* 2002; 87 Suppl 2: S169-S177
- 3) Ministry of Health and Welfare, Korea Health Industry Development Institute. The statistics Korea.; 2008. p.158
- 4) Guéguen L, Pointillart A. The bioavailability of dietary calcium. *J Am Coll Nutr* 2000; 19(2 Suppl): 119S-136S
- 5) Lee YS, O JH. Effects of bovine bone ash and calcium phosphate on calcium metabolism in postmenopausal osteoporosis model rats. *Korean J Nutr* 1995; 28(5): 434-441
- 6) Recker RR, Bammi A, Barger-Lux MJ, Heaney RP. Calcium absorbability from milk products, an imitation milk, and calcium carbonate. *Am J Clin Nutr* 1988; 47(1): 93-95
- 7) Kim YM, Yoon GA, Hwang HJ, Chi GY, Son BY, Bae SY, Kim IY, Chung JY. Effect of bluefin tuna bone on calcium metabolism of the rat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2004; 33(1): 101-106
- 8) Bennett T, Kennefick S, Cashman KD. The effect of casein phosphopeptides and sugar alcohols on calcium bioavailability in Caco-2 cells [abstract]. *Proc Nutr Soc* 2000; 59: 89A
- 9) Erba D, Ciappellano S, Testolin G. Effect of the ratio of casein phosphopeptides to calcium (w/w) on passive calcium transport in the distal small intestine of rats. *Nutrition* 2002; 18(9): 743-746
- 10) Ferrando AA, Green NR, Barnes KW, Woodward B. Microwave digestion preparation and ICP determination of boron in human plasma. *Biol Trace Elem Res* 1993; 37(1): 17-25
- 11) Wasserman RH. Vitamin D and the dual processes of intestinal calcium absorption. *J Nutr* 2004; 134(11): 3137-3139
- 12) Bhandarkar SD, Bluhm MM, Macgregor J, Nordin BE. An isotope test of calcium absorption. *Br Med J* 1961; 2(5266): 1539-1541
- 13) Heaney RP, Recker RR, Weaver CM. Absorbability of calcium sources: the limited role of solubility. *Calcif Tissue Int* 1990; 46(5): 300-304
- 14) Fujita T, Ohue T, Fujii Y, Miyauchi A, Takagi Y. Effect of calcium supplementation on bone density and parathyroid function in elderly subjects. *Miner Electrolyte Metab* 1995; 21(1-3): 229-231
- 15) Schedl HP, Osbaldiston GW, Mills IH. Absorption, secretion, and precipitation of calcium in the small intestine of the dog. *Am J Physiol* 1968; 214(4): 814-819
- 16) Heaney RP, Smith KT, Recker RR, Henders SM. Meal effects on calcium absorption. *Am J Clin Nutr* 1989; 49(2): 372-376
- 17) Pointillart A, Guéguen L. Meal-feeding and phosphorus ingestion influence calcium bioavailability evaluated by calcium balance and bone breaking strength in pigs. *Bone Miner* 1993; 21(1): 75-81
- 18) Tsugawa N, Okano T, Higashino R, Kimura T, Oshio Y, Teraoka Y, Igarashi C, Ezawa I, Kobayashi T. Bioavailability of calcium from calcium carbonate, DL-calcium lactate, L-calcium lactate and powdered oyster shell calcium in vitamin D-deficient or -replete rats. *Biol Pharm Bull* 1995; 18(5): 677-682
- 19) Saito Y, Lee YS, Kimura S. Minimum effective dose of casein phosphopeptides (CPP) for enhancement of calcium absorption in growing rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1998; 68(5): 335-340
- 20) Chen H, Hayakawa D, Emura S, Ozawa Y, Okumura T, Shoumura S. Effect of low or high dietary calcium on the morphology of the rat femur. *Histol Histopathol* 2002; 17(4): 1129-1135
- 21) Tsuchita H, Goto T, Shimizu T, Yonehara Y, Kuwata T. Dietary casein phosphopeptides prevent bone loss in aged ovariectomized rats. *J Nutr* 1996; 126(1): 86-93
- 22) Cho SJ, Park MN, Kim HK, Kim JH, Kim MH, Kim WS, Lee YS. Effects of organic Ca supplements on Ca bioavailability and physiological functions in ovariectomized osteoporotic model rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2011; 40(5): 665-672
- 23) Bell GH, Cuthbertson DP, Orr J. Strength and size of bone in relation to calcium intake. *J Physiol* 1941; 100(3): 299-317
- 24) Ashmead HD. The absorption and metabolism of iron amino acid chelate. *Arch Latinoam Nutr* 2001; 51(1 Suppl 1): 13-21