

뼈건강 지표를 이용한 유기태 칼슘 급원의 생체이용성 및 소화율

한정호¹ · 김은미^{2*} · 정만기¹ · 지성규³ · 지규만¹

고려대학교 생명공학원,¹ 한국식품연구원,² (주)삼풍B&F³

Bioavailability and Digestibility of Organic Calcium Sources by Bone Health Index

Han, Jeongho¹ · Kim, Eunmi^{2*} · Cheong, Manki¹ · Chee, Sungkew³ · Chee, Kewmann¹

¹College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-702, Korea

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

³Sampoong B&F Co. Ltd. Seoul 143-960, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the bioavailabilities and the digestibilities of oligopeptide chelated (peptide-Ca), anchovy bone (anchovy-Ca) and methionine hydroxyl analogue (MHA-Ca) calcium compared to those of calcium carbonate in rats. In exp1, CaCO₃ were added to the basal diet at level of 0, 30 and 60% calcium of the AIN-93G diet. In test groups, peptide-Ca, anchovy-Ca and MHA-Ca, were added to the basal diet to provide calcium at the level of 40% of AIN-93G. In exp1, the bioavailabilities were evaluated from the regression equation of the ratios of theolo-gical/actual calcium intakes of each dietary treatment. In exp2, urine and feces was to evaluate the true- and apparent digestibility and apparent retention. In exp1, Ca-60% group had higher bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC) and bone breaking strength (BBS) than those of the other standard groups. The bone weight and ash content of the peptide-Ca and anchovy-Ca groups were significantly higher than those of the MHA-Ca. Bone calcium content were not significantly different from the test group. The bioavailability of the MHA-Ca group was shown higher BMD (71%), BS (38%) and BBS (27%) compared to another control group. But the regression coefficient for BMD, BS and BBS were lower compare with that of bone ash and BMC. In exp2, the true- and apparent digestibility of test groups were shown to over 90%. Peptide-Ca was not significantly different from other test group, but digestibility and retention were higher compare to other test groups. In conclusion, peptide-Ca, anchovy-Ca and MHA-Ca improved Ca bioavailability in the rats. The compounds were higher Ca digestibility compared with those of CaCO₃. It is assumed that difference of digestibility for test groups may be correlated to the bioavailability of test groups in BMD, BMC, BS, BBS and bone ash respectively. (Korean J Nutr 2010; 43(1): 12~25)

KEY WORDS: calcium, bioavailability, digestibility, bone calcium, rat.

서론

한국인 영양섭취 기준¹⁾에 의하면 우리 나라 성인 남녀의 칼슘 섭취 권장량은 700 mg/day이고 청소년기와 골 밀도 감소가 우려되는 폐경기 여성과 50세 이상의 성인에게는 1,200~1,500 mg/day이지만 실제 칼슘 섭취량 평균은 권장량에 못 미치고 있다. 국민 건강 영양 조사²⁾에 따르면 전년대비 섭취량은 증가했지만, 1995년도 이후 성인 남녀는 권장량의 70% 정도의 섭취율을 보이고 있는 상황이며,

3~6세의 유아기, 65세 이상 노령층 및 여성의 칼슘 섭취량이 각각 481 mg, 492 mg와 422 mg으로서 권장량보다 상대적으로 매우 적게 섭취하였다. 하지만 우리 나라 국민의 칼슘 섭취 주요 급원 식품들이 주로 식물성 식품 (보건복지부, 2005)임을 감안할 때 칼슘 섭취량의 증가는 어려울 것으로 예상 된다.

그러나 칼슘이 현대 질병에서 갖는 중요성³⁾과 칼슘의 인체 생리적으로 수행하는 다양한 기능⁴⁾은 더욱 중요시 되고 있다. 칼슘은 인체 내 무기질 중 가장 많은 비율을 차지하고 있으며, 보통 성인의 체중의 1.5~2%인 1,200 g정도를 차지 하고 있다. 칼슘의 가장 중요한 기능은 신체 내 골격과 치아를 구성하고 유지하는 기능으로 osteoblasts에서 점성다당류를 분비함으로써 칼슘을 침착 시켜 뼈가 견고하고 단단해지는 석회화 과정을 통해 지속적인 골격을

접수일 : 2009년 12월 16일 / 수정일 : 2010년 1월 5일

채택일 : 2010년 1월 12일

*To whom correspondence should be addressed.

E-mail: kem@kfri.re.kr

유지시켜 주는 기능을 수행한다.⁴⁾ 이외에도 혈액의 응고, 근육의 수축이완 및 세포막 물질 이동의 조절인자 또는 세포 내 second messenger로서 역할을 하는 것으로 보고되었다.⁵⁾ 이러한 칼슘은 보충을 통해 골다공증, 고혈압, 고콜레스테롤혈증, 당뇨 및 대장암의 발생 위험을 감소시킨다는 보고⁶⁾가 있어 칼슘 섭취의 중요성은 더욱 강조되고 있다. 칼슘 섭취의 부족은 성인기의 최대 골 밀도를 낮추고, 성장기 아동의 칼슘 결핍은 골격과 치아의 석회화가 충분히 이루어지지 않아 성장 장애, 뼈의 성분 변화 및 기형을 초래하여 구루병이 나타나며, 결국 노년기 골다공증 빈도가 증가한다.⁷⁾

반면 칼슘 과잉섭취는 식욕상실, 신장 결석, 고칼슘 뇨증, 신장 기능 부전, 흡수과정 중 철분, 아연 및 기타 필수 원소의 흡수 저해 한다.^{8,9)} 결국 칼슘 섭취의 바람직한 방향은 섭취의 부족과 과다 사이의 이상적인 guide-line의 제시가 중요한 시점이다.

칼슘 보충제의 소비는 미국에서 연간 2억 달러를 초과한다고 보고⁶⁾되고 있으며 칼슘 보충제의 복용율이 30~60% 정도로 알려져 있다.¹⁰⁾ 현재 우리나라에서의 칼슘보충제의 소비 상황은 조사되어 있지 않지만, 국내에서 생산되는 비타민, 무기질 보충제의 종류와 금액은 각각 556여종과 2,500억 원에 달하고 있다.¹¹⁾

칼슘의 생체이용성은 칼슘의 흡수와 이용으로 정의 내릴 수 있고, 3단계로 분류된다. 1단계는 영양소가 흡수되는 동안 내장 안에서 이용이며, 2단계는 체조직 내 영양소의 흡수와 저장되며, 3단계는 체내의 이용으로 나뉜다.¹²⁾ 결국 생체이용성의 평가는 영양소가 흡수되는 정도와 흡수된 영양소의 각 조직 내 이동을 추적하여, 섭취된 영양소의 흡수와 이용을 평가함으로써 영양소의 양적 및 질적 측면을 평가할 수 있다.

칼슘의 생체이용성 평가방법은 크게 두 가지 방법으로 분류하는데 첫째 흡수 (absorption) 평가와 뼈 건강평가로 분류된다. 흡수평가는 직접 및 간접 방법으로 나뉜다. 직접 측정은 chemical balance, intestinal lavage techniques, 방사선동위원소 및 stable isotope techniques이고, 간접 측정은 serum calcium과 urinary calcium 측정법이 사용된다. 뼈건강은 골 질량 (bone mineral mass), 골 밀도 (bone mineral density, BMD) 측정, bone biomarkers ⁴¹Ca techniques를 이용하는 방법이 있다.¹³⁻¹⁵⁾

본 연구는 실험용 쥐에게 서로 다른 유기태 칼슘을 급여하여 칼슘 공급 부족에 의한 골 밀도에 대한 영향과 이를 표준 칼슘 공급원인 calcium carbonate (CaCO₃)를 기준으로 뼈건강 지표를 활용하여 생체 이용성과 소화율을 평가

하고자 실시하였다. 뼈건강에 관한 측정방법인 BMD 및 Bone Mineral Content (BMC)을 측정하였고, bone breaking strength (BBS) 및 bone stiffness (BS)를 측정하여 Ca의 흡수와 이용도가 뼈에 미치는 영향을 주로 측정하였고, 아울러 혈중 칼슘 농도도 참고로 조사하였다. 또한 전통적인 생체이용성 직접평가 방법인 chemical balance를 평가¹⁶⁾하여 영양소의 흡수에 대한 각 칼슘 급원별로 소화율을 조사하였다.

연구 방법

실험 동물

체중 70 g의 3주령의 수컷 흰쥐 (Sprague Dawley, (주) 대한실험동물) 36마리를 사용하였고, 20 × 23 × 18 (W × L × H, cm) 규격의 stainless-steel wired cage에 개체 별로 수용하여 사육하였다. 사육실의 온도와 습도는 각각 22 ± 2℃와 50 ± 5%로 조절하였고, 명암의 주기는 12시간 간격으로 조절하였다. 흰쥐는 실험군당 6마리씩 배치하였고 3주 동안 실험 식이와 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 물은 실험기간 동안 무기질의 간섭을 피하기 위하여 증류수를 공급하였다. 소화율 측정을 위해 종료 6일전 식이 별로 흰쥐 2마리를 선별하여 총 12마리를 사용하였고, 분, 뇨 시료를 분리하여 수거할 수 있는 metabolic cage에 개체 별로 수용하여 사육하였다.

실험재료

표준식이의 칼슘급원으로 calcium carbonate (CaCO₃)를 사용하였다. Calcium carbonate는 U.S. Food and Drug Administration과 European Parliament Council에서 안전성과 향상된 칼슘 형태를 인정하고 있는 칼슘 급원¹³⁾이며, calcium phosphate, calcium lactate, calcium glutamate 등과 같이 생체이용성 비교연구에 많이 사용되는 물질이다.¹⁷⁻¹⁹⁾

실험군으로 사용한 칼슘 급원은 oligo-peptide chelated 칼슘 보충제 (peptide-Ca), 멸치 뼈 (anchovy bone) 및 methionine hydroxyl analogue calcium (MHA-Ca, Novos International, Inc., U.S.A) 이었다. peptide-Ca은 인체용 건강기능식품으로 개발하여 제조특허 (Patent No. 049982, 체내에 흡수가 용이한 칼슘 올리고 펩티드에 대한 제조방법)를 받은 oligo-peptide chelated 칼슘 보충제 (삼풍 BnF Co., Korea)이다. peptide-Ca은 calcium binding protein인 calmodulin 구조와 유사하게 peptide가 Ca⁺⁺이온을 감싼 형태로 제조되어 칼슘의 흡수를 높이며, 난소화성 올리

고 당인 inulin, fructo-oligosaccharide 및 lactulose 등이 첨가되어 있는 제품이다. 이들 난소화성 올리고 당은 미생물 발효에 의해 장내 pH를 낮춤으로써 칼슘의 흡수율을 높인다고 보고되었다.²⁰⁾ Anchovy bone은 시판하고 있는 중간 크기의 조림용 멸치의 뼈 부분만을 채취하여 사용하였다. 국민 건강 영양 조사에 따르면 멸치는 우리나라 국민이 섭취하는 칼슘 급원 식품 중 우유 다음으로 많은 칼슘섭취 급원으로 사용되는 식품이다.²⁾ MHA-Ca는 칼슘의 공급원이라기 보다는 methionine 대체 아미노산 급원으로 축산분야에서 우유의 생산증가와 체중 증가량, 사료효율 및 생존율 향상에 뛰어난 효과를 보여주고 있다.^{21,22)}

실험 설계 및 실험 식이 배합

칼슘의 이용성 (bioavailability)을 알아보기 위해 표준구 3처리와 실험군 3처리로 총 6실험군을 두었다. 3처리 표준군은 standard curve를 작성하기 위하여 calcium carbonate (CaCO₃, Yakuri Pure Chemicals Co., Japan)를 사용하여 AIN-93G에 제시된 칼슘 함유량의 0%, 30%,

60%수준으로 식이에 첨가하였다. 3가지 칼슘 실험군은 원료의 칼슘함량을 분석하여, 3가지 실험군의 칼슘첨가 수준이 AIN-93G에서 제시한 칼슘 요구량의 40%가 되도록 하였다.

실험에 사용한 식이의 배합표는 Table 1에서와 같다. 식이 성분 조성은 AIN-93G를 기본으로 한 정제식으로 단백질 급원으로 casein (NZMP Ltd., Wellington, New Zealand)을 사용하였다. 모든 실험 식이에 대한 대사에너지 함량은 3,653 kcal/kg, 단백질 함량은 18%, 지방함량은 7.2%이었다. 필수아미노산 함량도 요구량을 충족 시키도록 하였다. 각 실험 처리군에 사용한 칼슘 급원의 칼슘 함량 분석은 Table 2에서와 같다. 모든 실험군은 상기 제시한 칼슘 공급원 이외의 칼슘이 공급되는 것을 차단하였고, 총 실험기간은 3주간 실시 하였다. 칼슘의 소화율 (digestibility) 측정은 동일 한 식이를 6일간 공급 하면서, 매일 분과뇨 시료를 분리 수거하여 -20℃에 보관하였고 실험 종료일에 분과뇨 무게를 측정하였다.

Table 1. Composition of diets (%) for calcium bioavailability test (Experiments 1, 2)

Ingredients	Standard diets ¹⁾ (Added Ca, % NRC)			Ca testing sources diets ²⁾ (Added at 40% of NRC)		
	Ca-0%	Ca-30%	Ca-60%	Peptide-Ca	Anchovy-Ca	MHA-Ca
CaCO ₃ ³⁾	0.00	0.36	0.71			0.36
Peptide-Ca ⁴⁾				1.40		
Anchovy bone ⁵⁾					2.50	
MHA-Ca ⁶⁾						0.50
Casein ⁷⁾	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Glucose	27.26	26.90	26.55	25.86	25.31	26.60
Others ⁸⁾	52.70	52.70	52.70	52.70	52.70	52.70
Nutrient content, calculated						
AME (kcal/kg)	3,650	3,650	3,650	3,650	3,650	3,650
Protein (%)	18	18	18	18	18	18
Available P (%)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Total Ca (%)	0.0038	0.147	0.287	0.217	0.229	0.207
%Ca from casein	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
%Ca from, CaCO ₃		0.144	0.284			0.144
%Ca from, Peptide-Ca				0.214		
%Ca from, Anchovy					0.225	
%Ca from, MHA-Ca						0.060

1) Calcium carbonate, reagent grade, was added to the basal diet to provide 0% (Ca 0%), 30% (Ca 0.15%), and 60% (Ca 0.30%) of calcium requirement in AIN-93G diet for young rats.

2) Each calcium source was added to the basal diet to provide 40% of calcium requirement in AIN-93G diet for young rats

3) Reagent grade chemical (Yakuri, Japan)

4) Sampung BnF (oligo-peptide chelated Ca)

5) Commercial dry-anchovy (only bone)

6) Methionine hydroxy analogue Ca (Novos International, Inc., U.S.A)

7) Acid casein (NZMP Ltd., Wellington, New Zealand) contains 92% crude protein. The casein's calcium level is 19 mg/100 g casein.

8) Others include corn starch, 35%; Soybean oil, 7%; cellulose, 5%; sodium chloride, 0.26; AIN-VX Vitamin Mix, Dyets 310025 (Behlflhem, PA), 1%; mineral mix (Ca free), 3.5%; KH₂PO₄, 0.55%; choline bitartrate, 0.2%; DL-Methionine, 0.2%

Table 2. Analyzed and calculated calcium contents of the calcium sources, and experimental diets

Ca sources and diets	Calcium content (%)	
	Analyzed values	Calculated values
CaCO ₃	—	40.1 ¹⁾
Peptide-Ca	15.3	15.3
Anchovy-Ca	9.04	9.04
MHA-Ca	12.1	12.1
Ca-0% diet	0.0036	0.0038
Ca-30% diet	0.145	0.147
Ca 60% diet	0.288	0.287
Peptide-Ca diet	0.224	0.217
Anchovy-Ca diet	0.231	0.229
MHA-Ca diet	0.200	0.207

1) Theoretical calcium content (%). Reagent grade CaCO₃ (Ca 40.1%)

실험 조사 항목 및 분석 방법

식이 섭취량, 칼슘 섭취량, 체중 증가량 및 식이효율

3주 실험기간 동안 식이섭취량은 매일 식이 급여량과 식이 잔량을 측정하여 계산하였고, 칼슘섭취량은 식이섭취량과 식이 내 칼슘함량을 이용하여 계산하였다. 체중은 최초 개체 선별 시와 실험시작 이후 1주 간격으로 측정하였고 실험 종료시 측정하여 실험 3주간의 체중 증가량을 구하였다. 1마리당 평균 식이 섭취량을 1마리당 평균 체중 증가량으로 나누어 식이효율 (Feed/Gain)을 계산하였다. 소화율 실험에서도 6일간 동일 식이를 공급하며 매일 식이 섭취량과 분변의 배설량을 측정하였고 소화율 실험 초기와 종료 시 체중을 측정하였다.

혈청 칼슘 함량

실험 종료 시, 쥐를 12시간 절식 시킨 후 ethyl ether (Duksan Pure Chemical. Co., Ltd., Korea)로 마취시킨 후 심장에서 5 mL 주사기로 1.5 mL 채혈 후 혈청은 원심 분리기 (1,100 × g, 4°C, J6-MC, Beckman Co., USA)를 사용하여 분리하였다. 혈청 샘플은 -75°C에서 분석 시까지 보관하였다. 혈청 중 칼슘함량 측정은 O-CPC방법에 근거를 둔 kit (MBL Co., Ltd., Korea)를 이용하여 spectrophotometer (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, USA)로 575 nm에서 흡광도를 측정하였다.

BMD, BMC, BBS 및 BS 측정

혈액 채취 후 dry ice로 회생시킨 후 양쪽 대퇴골 (femur)을 적출하였다. 대퇴골에 부착 되어있는 근육, 지방, 인대 등을 제거한 후 무게를 측정하였고, 길이와 직경은 caliper를 사용하여 측정하였다. 시료는 분석할 때까지 -20°C에

서 분석 시까지 냉동 보관하였다.

냉동 보관된 오른쪽 대퇴골 내 BMD 및 BMC 측정은 양 에너지 방사선 골 밀도 측정기 (dual energy X-ray absorptionmetry, DEXA LUNAR Pixmus G.E. Co., Ltd., U.S.A.)를 이용하였다. 6개의 실험군별로 오른쪽 대퇴골 6개를 동시에 촬영하여 대퇴골의 total BMD, total BMC 및 total area를 구하였다. 이러한 대퇴골의 분석은 DEXA software인 LUNAR PIXImus 2.0 program을 이용하여 측정하였다.

BMD와 BMC 측정한 대퇴골 시료는 BBS 측정을 위하여 상온에서 1시간 가량 방치한 후 사용하였다. 이때 뼈의 건조를 막기 위해 밑에 생리식염수를 충분히 적신 종이 타월을 깔았고, 생리식염수에 적신 얇은 kimwipes를 덮어 뼈에서 수분이 증발하는 것을 방지하였다. 대퇴골의 BBS와 BS는 Turner²³⁾의 방법²³⁾으로 Instron 4465 (Instron Universal Testing Instrument, USA)을 이용하여 측정하였다. BS는 three-point loading법으로 측정하였다. Caliper를 이용하여 대퇴골의 길이를 잴 후, 그 중앙부위와 중앙으로부터 양끝으로 같은 거리에 위치한 두 지점을 표시하고, 뼈의 중앙에 load로 힘이 가해졌을 때, 양끝이 두 지점에서 받는 힘의 크기로서 측정하였다. 일반적으로 뼈에 힘을 가하면, 이에 반응하여 deformation이 일어나 load-deformation curve가 그려지며, 이 curve는 elastic deformation region과 plastic deformation region의 두 부분으로 나눌 수 있다. Elastic deformation region에서는 뼈에 가해지는 힘이 증가함에 따라서 deformation이 비례하여 증가하여 직선의 그래프를 나타내며, 이때의 기울기를 elastic stiffness로 하였다. 대퇴골의 breaking strength는 three point loading시 뼈가 받는 힘의 최대값을 취하였다. 뼈에 대한 물리적인 힘의 측정은 다양한 변이가 존재하므로 실험시료의 보관 및 뼈 위치의 배치는 최대한 일정하게 유지하여 실시하였다. 본 실험에 사용된 Instron의 load cell은 500 N으로 crosshead speed는 0.5 mm/s로 하였다. 이 모든 과정은 ASTM standard에 준하여 실시하였다 (Table 3).

대퇴골 내 회분 및 칼슘 함량 측정

대퇴골의 회분 함량은 보관중인 오른쪽 대퇴골 시료를 105°C 건조기에서 24시간 건조시켜 수분을 제거 후, ethylether (Duksan Pure Chemical. Co., Ltd., Korea)로 2회 탈지하였다. 탈지된 시료는 75°C에서 2시간 건조시켜 시료 내 ethylether를 완전히 제거한 후, desiccators에서 1시간 동안 상온으로 방냉시켜 무게를 측정하였다 (fatfree

Table 3. Instron conditions for bone breaking strength and bone stiffness

Items	Conditions
Software	Series IX version 7.51
Test type	Compressive
Units	SI
Cross head speed	0.5 mm/min
Load cell	500 N
Temperature	23°C
Humidity	50%

Table 4. AAS conditions for calcium analysis

Items	Conditions
Lamp mode	BGC-D2
Flame type	Air-C ₂ H ₂
Fuel gas rate	2.0 L/min
Wavelength	422.7 nm
Slit width	0.5 nm
Burner height	7 nm

dry weight). Fat-free dry weight를 회분과 칼슘 함량을 측정하는 기준무게로 사용하였다. 탈지상태의 시료는 acid-washing한 도가니에 넣고 전기회화로에서 (600°C, 8시간) 회화시킨 후, desiccator에서 1시간 상온에서 방냉하여 무게를 측정하여 회분 함량을 계산하였다.²⁴⁾

칼슘 함량은 회분이 든 수기에 6 N HCl 용액을 10 mL 을 넣고 hot plate위에서 30분간 끓여서 무기물을 완전히 용해 시킨 후, 50 mL volumetric-flask에 filter paper (Whatman No. 541, U.K.)를 이용하여 여과하였다. 이것을 증류수로 최종 volume 50 mL까지 맞춘 후 polypropylene tube에 담아 분석 전 까지 냉장실에 보관하였다. 칼슘의 분석은 atomic absorption flame emission spectrophotometer (AA-6701, SHIMAZU Scientific Instruments, Inc., Japan)를 이용하여 대퇴골 내 칼슘함량을 계산하였다 (Table 4). Calcium standard solution (Aldrich, USA)를 사용하여 standard curve ($R^2 = 0.998$)를 구하였다. AAS에 주입하는 모든 용액에 인산 염의 방해작용을 방지하기 위해 1% lanthanum oxide 용액 (La₂O 50 g/L HCl)을 첨가하였다. 실험에 사용된 모든 초자기구들은 10% nitric acid용액에서 48시간 동안 acid-washing하여 사용하였다.

분과 뇨 칼슘 함량 분석

실험기간 동안 채취한 분 시료는 80°C 건조기에서 24시간 건조시킨 후, 무게를 측정하고 상온에서 5일간 방치하여 풍건물 (air dry matter)상태로 유지하였다. 분시료는

분쇄하여 보관하였고, 뇨 시료는 분석 당일 상온에서 완전히 녹여 사용하였다. 분과 뇨의 칼슘 함량은 상기한 뼈와 동일하게 분석하였다.

생체이용성 (Bioavailability) 평가방법

3처리 표준구의 각 분석항목에 대한 데이터 수치와 칼슘 섭취량 (mg/rat/day) 데이터를 이용하여 1차 회귀방정식을 구하여 standard curve를 구했으며 방정식으로부터 회귀방정식을 유도하였다.

[Equation 1]

$$\text{Body weight gain (g/rat/day)} = 0.064 \times \text{Ca intake (mg/rat/day)} + 3.974 \quad R^2 = 0.774$$

3처리 표준구로부터 구하여진 equation 1을 변형하여 equation 2를 구하였다.

[Equation 2]

$$\text{Theoretical Ca intake (mg/rat/day)} = \frac{\{\text{Body weight gain (g/rat/day)} - 3.974\}}{0.064}$$

Equation 2에 각 실험군의 실제 분석한 body weight gain (g/rat/day) 값을 대입하면 각 실험 군의 이론적 칼슘 섭취량 (T = Theoretical Ca intake)를 구할 수 있고, 실제 실험에서 측정된 각 실험군 칼슘 섭취량 (A = Actual Ca intake)을 이용하여 다음 식에 따라 계산을 하였다.

$$\text{측정항목별 실험군의 생체이용률 (\%)} = \frac{T (\text{실험군의 이론적 Ca intake})}{A (\text{실험군의 실제 Ca intake})} \times 100$$

소화율 (Digestibility)의 평가방법

순 소화율 (true digestibility)은 식이로 공급되는 칼슘의 순수한 소화율을 평가하는 방법으로 Ca-0%군의 분에서 배출되는 칼슘은 식이로 인한 칼슘이 아닌 내생적 (endogenous)인 칼슘이라 가정하여 식이로만 섭취되는 칼슘의 소화율을 평가하는 방법이다. 일반 소화율 (apparent digestibility)은 순 소화율과는 달리 내생적인 칼슘을 고려하지 않고 분 자체에서 나오는 칼슘을 식이에 의한 칼슘이라고 가정하고 소화율을 계산하는 방법이다. 일반 보유율 (apparent retention)의 경우 식이로 섭취되는 칼슘량에서 분과 뇨로 배출 되는 칼슘량을 제외하여 체내에 보유되는 정도를 평가하는 방법으로 다음공식에 의해 계산하였다.²⁵⁾

$$\text{True digestibility (\%)} =$$

$$\frac{\text{Ca intake}-\text{Ca in feces}-\text{endogenous Ca}^*}{\text{Ca intake}} \times 100$$

Apparent digestibility (%) =

$$\frac{\text{Ca intake}-\text{Ca in feces}}{\text{Ca intake}} \times 100$$

Apparent retention (%) =

$$\frac{\text{Ca intake}-\text{Ca in feces}-\text{Ca in urine}}{\text{Ca intake}} \times 100$$

* Endogenous Ca is fecal excretion of Ca-0% diet group

통계분석

모든 실험 결과의 통계분석은 Sigma Stat 2.03 (SYSTAT software INC. Chicago., IL)을 사용하였으며, 결과값은 mean \pm SEM으로 나타내었다. 모든 결과의 분산분석은 one way ANOVA에 의하여 행하였으며, 처리 평균간의 유의성 검증은 Turkey's test에 의해 수행하였다.

결 과

식이섭취량, 칼슘섭취량, 체중 증가량, 식이효율 및 생체 이용성

3주간의 실험식이 급여 후의 각군의 식이섭취량, 칼슘섭

취량, 체중 증가량 및 식이효율은 Table 5에 제시하였다. 식이섭취량은 표준군에서 칼슘 첨가 수준에 따라 점증적인 증가를 보였다 ($p < 0.05$). 칼슘섭취량은 칼슘의 첨가 수준에 따른 식이 섭취량에 비례하여 Ca-60%군이 유의하게 가장 높은 섭취량을 보였다 ($p < 0.05$). 체중 증가량은 식이섭취량이 가장 낮았던 Ca-0%군이 가장 낮았다 ($p < 0.05$). 칼슘섭취량과 체중 증가량은 실험군간 차이가 없었다. 식이효율은 Ca-0%군만 유의적으로 낮았다 ($p < 0.05$). 실험군에서 식이효율은 실험군간 차이가 없었다. 이는 3가지 칼슘 급원이 모두 이용성이 우수하기 때문에 나타난 결과로 여겨진다.

체중 증가량을 이용한 칼슘 급원 별 생체이용성 평가는 Table 6에 제시하였다. 회귀방정식은 $y = 0.064x + 3.974$, 회귀계수 (R^2)는 0.774를 나타냈다. 이러한 회귀계수는 상관관계의 유의적 차이를 검정한 결과, 고도의 유의적 차이가 있었다 ($p < 0.01$). 실험군의 경우 CaCO_3 식이와 동일한 량의 칼슘을 섭취했을 때 생체 이용성이 각각의 칼슘 급원 별로 peptide-Ca군은 25%, anchovy-Ca군은 15%, MHA-Ca군은 35% 더 증가시켰다.

총 골무기질 밀도 (TBMD), 총 골 무기질 함량 (TBMC) 결과 및 생체 이용성

대퇴골 내 실험군별 TBMD, TBMC, 총 골 면적 (total bone area) 및 대퇴골 중심 지정부분 (ROI)에 대한 BMD,

Table 5. Body weight gain, feed intake, calcium intake and FER in rats fed the experimental diets for 3 weeks¹⁾

Measurements	Standard diets (Added Ca, % NRC)			Ca testing sources (Added at 40% of NRC)		
	Ca-0%	Ca-30%	Ca-60%	Peptide-Ca	Anchovy-Ca	MHA-Ca
Body weight gain (g/rat/day)	3.9 \pm 0.3 ^b	5.9 \pm 0.3 ^a	6.5 \pm 0.2 ^a	6.7 \pm 0.2	6.1 \pm 0.6	6.3 \pm 0.5
Feed intake (g/rat/day)	12.0 \pm 0.6 ^b	14.2 \pm 0.8 ^{ab}	14.9 \pm 0.3 ^a	15.7 \pm 0.3	15.2 \pm 0.9	14.6 \pm 0.8
Calcium intake (mg/rat/day)	0.5 \pm 0.0 ^c	20.9 \pm 1.1 ^b	42.9 \pm 1.0 ^a	34.2 \pm 0.6	34.9 \pm 2.2	30.3 \pm 1.7
FER ²⁾	0.32 \pm 0.0 ^b	0.42 \pm 0.0 ^a	0.43 \pm 0.0 ^a	0.43 \pm 0.0	0.39 \pm 0.0	0.43 \pm 0.0

1) Data are means \pm SEM. Means with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$)

2) FER (Food efficiency ratio): Body weight gains (g)/Feed intake (g) for 3 weeks

Table 6. Ca bioavailability based on body weight gain in rats fed the diets containing various Ca sources

Measurements	Ca testing sources ¹⁾		
	Peptide-Ca	Anchovy-Ca	MHA-Ca
Body weight gain (g/rat/day) ²⁾	6.7	6.1	6.3
Actual Ca intake (mg/rat/day) ³⁾	34.2	36.9	31.6
Theoretical Ca intake (mg/rat/day) ⁴⁾	42.6	42.6	42.6
Estimated bioavailability of calcium ⁴⁾	125	115	135

1) Added at 40% of NRC

2) Calculated by feed intake (mg/rat/day) \times ratio of calcium content in experimental diet

3) Calculated by equation ($y = 0.064x + 3.974$, $R^2 = 0.774$)

Theoretical Ca intake (mg/rat/day) = {Body weight gain (g/rat/day) - 3.974} / 0.064

4) Calculated as bioavailability (%) = Theoretical Ca intake/Actual Ca intake \times 100

BMC, bone area 값은 Table 7에서와 같다. 표준군내 TBMD, TBMC 및 total bone area은 칼슘을 가장 많이 섭취한 Ca-60%군에서 가장 높게 나타났다 ($p < 0.05$). 또한 사료 내 칼슘 수준이 증가함에 따라 점진적으로 증가하였다. 유기태 칼슘 중 TBMD와 TBMC는 anchovy-Ca군이 가장 높은 값을 나타냈다.

표준군간 대퇴골의 중심부분을 동일한 면적으로 지정 (ROI = region of interest)하여 측정한 값을 보면, BMD값은 Ca-60%군이 가장 높았고 칼슘섭취수준에 따라 직선적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). 실험군 간의 BMD와 BMC값은 유의한 차가 없었지만, Ca-60%군과 비교했을 Peptide-Ca,

anchovy-Ca군은 유사한 수치를 보여주었다. 결국 TBMD, TBMC, BMD 및 BMC값은 총 칼슘 섭취량이 가장 높았던 Ca-60%군이 가장 높게 나타나서 대퇴골에서의 무기질의 침착 정도는 식이 내 칼슘 함량에 비례적인 증가함을 알 수 있었다. 실험군에서는 그 차이는 매우 적었다.

BMD와 BMC값을 이용한 생체이용성 평가 결과는 각각 Table 8, 9 및 Fig. 1, 2에서와 같다. BMD값을 이용한 회귀방정식은 $y = 0.001x + 0.045$, R^2 는 0.916를 나타냈다. 실험군의 경우 CaCO_3 식이와 동일한 량의 칼슘을 섭취했을 때 peptide-Ca군은 63%, anchovy-Ca군은 69% 그리고 MHA-Ca군은 71% 더 증가시킬 수 있었다. BMC값을

Table 7. Total bone mineral density (TBMD), total bone mineral content (TBMC), total bone area, bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC), bone area in rats fed the experimental diets for 3 weeks

Measurements	Standard diets (Added Ca, % NRC)			Ca testing sources (Added at 40% of NRC)		
	Ca-0%	Ca-30%	Ca-60%	Peptide-Ca	Anchovy-Ca	MHA-Ca
Total ¹⁾						
TBMD (g/cm ²)	0.039	0.0633	0.0875	0.0794	0.0822	0.0753
TBMC (g)	0.365	0.661	0.981	0.883	0.886	0.824
Bone area (cm ²)	9.36	10.44	11.21	11.12	10.77	10.95
ROI ²⁾						
BMD (g/cm ²)	0.042 ± 0.003 ^c	0.084 ± 0.002 ^b	0.110 ± 0.003 ^a	0.101 ± 0.002	0.104 ± 0.007	0.097 ± 0.005
BMC (g)	0.005 ± 0.000 ^c	0.010 ± 0.000 ^b	0.014 ± 0.001 ^a	0.013 ± 0.000	0.013 ± 0.001	0.011 ± 0.001

1) Sum of group's total data

2) Data are means ± SEM. Means with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$)

ROI: region of interest

Table 8. Ca bioavailability based on bone mineral density (BMD) in rats fed the diets containing various Ca sources

Measurements	Ca testing sources ¹⁾		
	Peptide-Ca	Anchovy-Ca	MHA-Ca
BMD (g/cm ²) ²⁾	0.101	0.104	0.097
Actual Ca intake (mg/rat/day) ³⁾	34.2	34.9	30.3
Theoretical Ca intake (mg/rat/day) ³⁾	56	59	52
Estimated bioavailability (%) of Ca ⁴⁾	163	169	171

1) Added at 40% of NRC

2) Calculated by feed intake (mg/rat/day) × ratio of calcium content in Actual diet

3) Calculated by equation ($y = 0.001x + 0.045$, $R^2 = 0.916$). Theoretical Ca intake (mg/rat/day) = {BMD (g/cm²) - 0.045} / 0.001

4) Calculated as bioavailability (%) = Theoretical Ca intake/Actual Ca intake × 100

Table 9. Ca bioavailability based on bone mineral content (BMC) in rats fed the diets containing various Ca sources

Measurements	Ca testing sources ¹⁾		
	Peptide-Ca	Anchovy-Ca	MHA-Ca
BMC (mg) ²⁾	13	13	11
Actual Ca intake (mg/rat/day) ³⁾	34.2	34.9	30.3
Theoretical Ca intake (mg/rat/day) ³⁾	35.6	35.6	26.5
Estimated bioavailability (%) of Ca ⁴⁾	107	102	87

1) Added at 40% of NRC

2) Calculated by feed intake (mg/rat/day) × ratio of calcium content in experimental diet

3) Calculated by equation ($y = 0.221x + 5.133$, $R^2 = 0.935$). Theoretical Ca intake (mg/rat/day) = {BMC (g) - 5.133} / 0.221

4) Calculated as bioavailability (%) = Theoretical Ca intake/Actual Ca intake × 100

이용한 회귀방정식은 $y = 0.221x + 5.133$, R^2 는 0.935를 나타냈다 (Fig. 2). 실험군의 경우 CaCO_3 식이와 동일한 량의 칼슘을 섭취했을 때 peptide-Ca군은 7%, an-chovy-Ca군은 2% 더 높았다. 회귀 계수의 유의성 검정결과는 고도의 유의적 차이가 있었다 ($p < 0.01$).

대퇴골 길이, Breaking strength (BBS), Stiffness (BS) 및 생체 이용성

대퇴골 길이, BBS 및 BS는 Table 10에 제시하였다. 대퇴골의 길이, 중심부 최대 직경 및 최소 직경의 경우 그룹 간 유의한 차이를 보이지 않아 칼슘의 섭취 정도에 따른

뼈의 길이 성장에는 큰 영향을 주지 않음을 보여 주었다. 뼈의 변형이 일어난 후 뼈가 부러지기까지 시간당 힘의 변화량을 측정하는 BS값의 경우 Ca-0%군이 유의적으로 적었다 ($p < 0.05$). 뼈에 걸리는 최대 부하 값인 BBS값의 경우 실험군 간 유의적인 차이가 없었다.

BS와 BBS값을 이용한 칼슘의 생체이용성 평가결과는 Table 11, 12과 Fig. 3, 4에서와 같다. BS값을 이용한 회귀방정식은 $y = 2.295x + 24.16$, R^2 는 0.805를 나타냈다. 실험군의 경우 CaCO_3 식이와 동일한 량의 칼슘을 섭취했을 때 peptide-Ca군은 -4%, anchovy-Ca군은 14% 및 MHA-Ca군은 38% 더 증가시킬 수 있음을 보였다. BBS값을 이

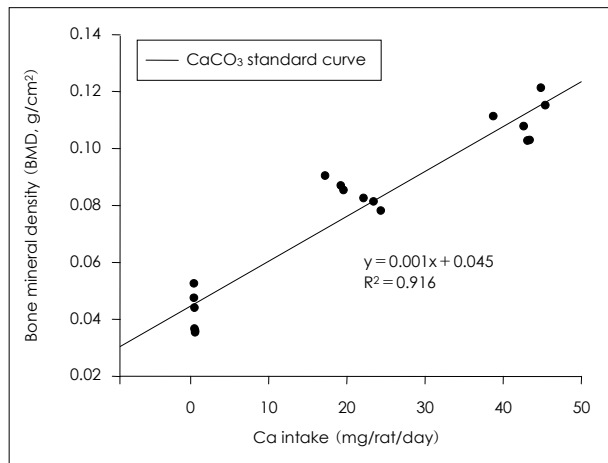


Fig. 1. Relationship between BMD and Ca intake from calcium standard diets groups.

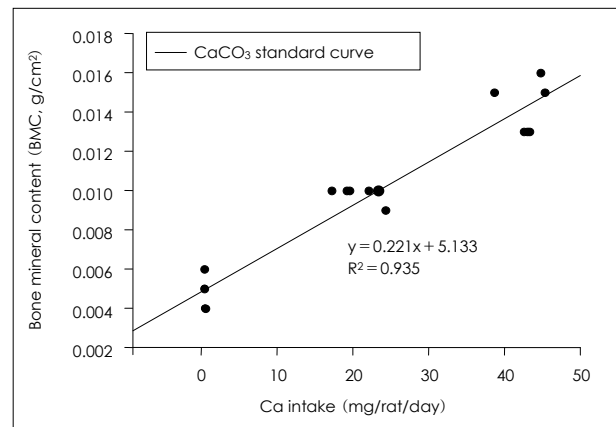


Fig. 2. Relationship between BMC and Ca intake from calcium standard diets groups.

Table 10. Bone length, bone stiffness (BS) and bone breaking strength (BBS) in rats fed the experimental diets for 3 weeks¹⁾

Measurements	Standard diets (Added Ca, % NRC)			Ca testing sources (Added at 40% of NRC)		
	Ca-0%	Ca-30%	Ca-60%	Peptide-Ca	Anchovy-Ca	MHA-Ca
Bone length (mm)	28.3 ± 0.24	29.5 ± 0.26	29.7 ± 0.09	29.7 ± 0.20	30.4 ± 1.90	29.27 ± 0.48
Midshaft diameter	max, mm	3.53 ± 0.11	3.57 ± 0.08	3.64 ± 0.11	3.61 ± 0.08	3.71 ± 0.08
	min, mm	2.81 ± 0.07	2.83 ± 0.04	2.85 ± 0.03	2.89 ± 0.06	2.91 ± 0.07
BS, N/mm	15.6 ± 2.4 ^b	91.5 ± 9.7 ^a	113 ± 6.9 ^a	99.6 ± 6.3	109 ± 9.7	121 ± 12.6
BBS, N	11.1 ± 1.9 ^c	43.4 ± 2.8 ^b	54.0 ± 3.3 ^a	53.4 ± 2.1	55.6 ± 2.6	53.3 ± 3.1

1) Data are means ± SEM. Means with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 11. Ca bioavailability based on bone stiffness (BS) in rats fed the diets containing various Ca sources

Measurements	Ca testing sources ¹⁾		
	Peptide-Ca	Anchovy-Ca	MHA-Ca
BS (N/mm) ²⁾	99.6	109	121
Actual Ca intake (mg/rat/day) ³⁾	34.2	34.9	30.3
Theoretical Ca intake (mg/rat/day) ³⁾	32.9	39.9	42.1
Estimated bioavailability (%) of Ca ⁴⁾	96.	114	138

1) Added at 40% of NRC

2) Calculated by feed intake (mg/rat/day) × ratio of calcium content in experimental diet

3) Calculated by equation ($y = 2.295x + 24.16$, $R^2 = 0.805$). Theoretical Ca intake (mg/rat/day) = {BS (N/mm) - 24.16} / 2.295

4) Calculated as bioavailability (%) = Theoretical Ca intake/Actual Ca intake × 100

Table 12. Ca bioavailability based on bone bone breaking strength (BBS) in rats fed the diets containing various Ca sources

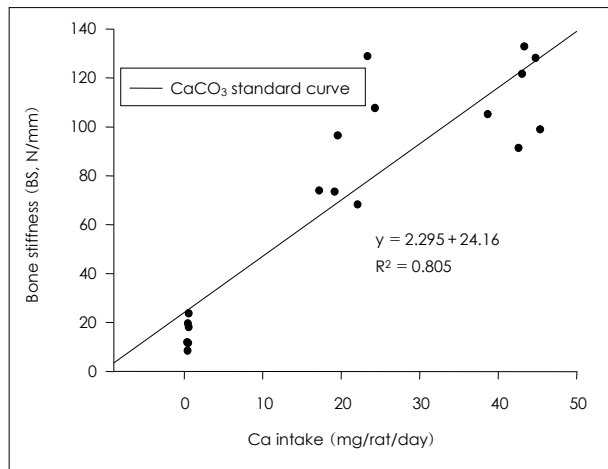
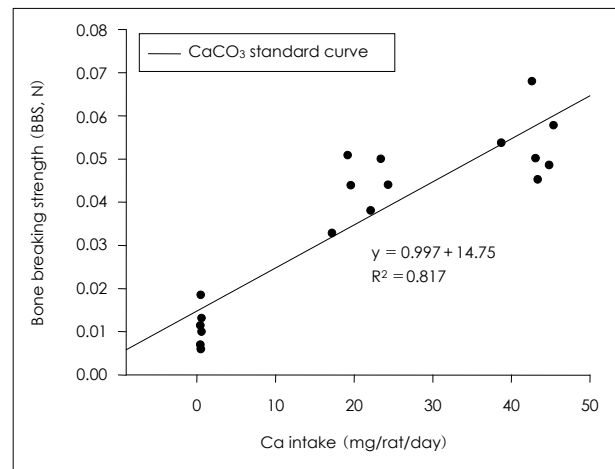
Measurements	Ca testing sources ¹⁾		
	Peptide-Ca	Anchovy-Ca	MHA-Ca
BBS, (N) ²⁾	53.4	55.6	53.3
Actual Ca intake (mg/rat/day) ³⁾	34.2	34.9	30.3
Theoretical Ca intake (mg/rat/day) ³⁾	38.7	40.9	38.7
Estimated bioavailability (%) of Ca ⁴⁾	113	117	127

1) Added at 40% of NRC

2) Calculated by feed intake (mg/rat/day) × ratio of calcium content in experimental diet

3) Calculated by equation ($y = 0.997x + 14.75$, $R^2 = 0.817$). Theoretical Ca intake (mg/rat/day) = {BBS (N) - 14.75} / 0.997

4) Calculated as bioavailability (%) = Theoretical Ca intake/Actual Ca intake × 100

**Fig. 3.** Relationship between BS and Ca intake from calcium standard diets groups.**Fig. 4.** Relationship between BBS and Ca intake from calcium standard diets groups.**Table 13.** Bone weight, ash, calcium and serum calcium in rats fed the experimental diets for 3 weeks¹⁾

Measurements	Standard diets (Added Ca, % NRC)			Ca testing sources (Added at 40% of NRC)		
	Ca-0%	Ca-30%	Ca-60%	Peptide-Ca	Anchovy-Ca	MHA-Ca
Bone weight ²⁾ (g)	0.17 ± 0.01 ^c	0.23 ± 0.01 ^b	0.29 ± 0.01 ^a	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01
Bone ash (%)	30.6 ± 0.8 ^c	41.7 ± 0.7 ^b	48.9 ± 0.3 ^a	47.5 ± 0.4 ^A	46.1 ± 1.0 ^{AB}	45.0 ± 0.2 ^B
Bone calcium (%)	11.8 ± 1.2 ^b	14.7 ± 0.7 ^{ab}	16.7 ± 0.4 ^a	17.0 ± 0.5	17.1 ± 0.7	17.2 ± 0.3
Serum calcium (mg/dL)	6.5 ± 0.2 ^b	9.6 ± 0.3 ^a	9.9 ± 0.4 ^a	10.1 ± 0.2	9.9 ± 0.3	9.9 ± 0.3

1) Data are means ± SEM. Means with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$)

2) Fat free dry weight

용한 회귀방정식은 $y = 0.997x + 14.75$, R^2 는 0.817를 나타냈다. 실험군의 경우 CaCO_3 식이와 동일한 량의 칼슘을 섭취했을 때 peptide-Ca군은 13%, anchovy-Ca군은 17%, MHA-Ca군은 27% BBS 수치를 더 증가시켰다.

대퇴골 무게, 회분, 칼슘 함량, 혈청 칼슘 함량 및 생체이용성

대퇴골 무게, 회분 함량, 칼슘 함량 및 혈청 칼슘 함량에 대한 결과는 Table 13에서와 같다. 표준군에서 대퇴골의 탈지 중량과 회분함량은 Ca-60%군이 유의하게 높은 수치를 나타냈다 ($p < 0.05$). 실험군간 회분함량은 peptide-Ca와 anchovy-Ca 군이 유의하게 높았지만 ($p < 0.05$), 칼슘

함량에는 차이가 없었다. 대퇴골 칼슘 함량은 peptide-Ca, anchovy-Ca 및 MHA-Ca군이 Ca-60%군 보다 높은 칼슘 함량을 보여주었다. 이 결과는 세군은 모두 Ca-60%군 보다 칼슘 섭취량은 적었지만 대퇴골 내 축적된 칼슘함량에 차이가 없었다. 혈청 칼슘 함량은 Ca-0%군을 제외하면 5군에서 모두 일정하게 9~10 mg/dL을 수치가 나와 체내의 칼슘함량은 항상성을 유지한다는 정설과 동일한 결과를 보여 주었다.

회분함량을 이용한 생체이용성 평가는 Fig. 5에 제시하였다. 회분함량 값을 이용한 회귀방정식은 $y = 0.427x +$

32.21, R^2 는 0.980을 나타냈다. 실험군의 경우 CaCO_3 식이와 동일한 량의 칼슘을 섭취했을 때 peptide-Ca군은 11%, anchovy-Ca군은 0%, MHA-Ca군은 6% 더 회분함량을 증가시켰다 (Table 14).

소화율 실험의 식이섭취량, 칼슘섭취량, 체중 증가량 및 식이효율

소화율 측정에서 식이섭취량, 칼슘섭취량, 체중 증가량 및 식이효율을 Table 15에서와 같다. 표준군에서 식이섭취량과 칼슘섭취량은 점증적으로 높게 나타났지만 사료효율에서는 차이가 없었다. 실험군에서는 모든 항목에서 차이를 보이지 않았다.

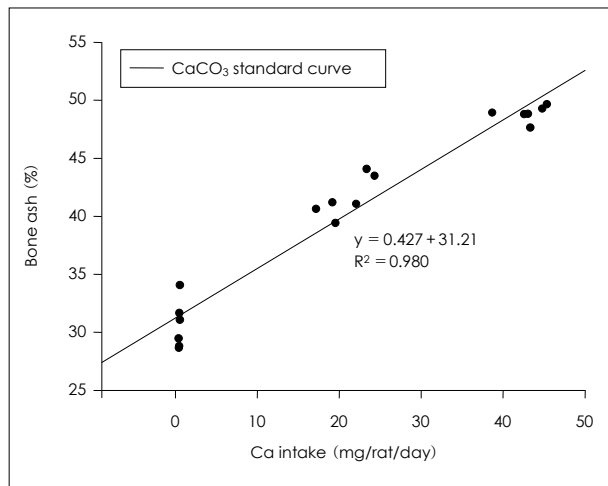


Fig. 5. Relationship between bone ash (%) and Ca intake (mg/rat/day) from calcium standard diets groups.

순 소화율, 일반소화율 및 일반보유율

Table 16에 순 소화율 (true digestibility), 일반소화율 (apparent digestibility) 및 일반보유율 (apparent retention) 결과를 제시하였다. 분내 칼슘 배출량은 Ca-60%군이 섭취량에 비례하여 가장 많이 배출되었다 ($p < 0.05$). 뇨에서 배출 되는 칼슘은 표준군과 실험군 모두에서 차이가 없었고, 순 소화율의 경우 Ca-0%군을 제외한 모든 실험군에서 유의한 차가 없이 90% 이상의 높은 칼슘 소화율을 보였다. 일반소화율은 Ca-30%군이 가장 높은 소화율을 나타냈고 ($p < 0.05$), 실험 3군의 경우 유의한 차가 없이 유사하게 칼슘의 소화가 이루어 졌다. 일반보유율의 경우 Ca-0%군을 제외하고 유의한 차가 없이 모두 90% 이상의 칼슘보유율을 보였다. 본 실험에서 살펴보면 Ca-0%군을 제외한 모든 군에서 90% 이상의 높은 소화율과 보유율을 나타냈는데 이는 저칼슘 식이섭취시 칼슘 흡수량이 증가하는 현상과 관련이 있는 것으로 보인다.

고 찰

본 연구는 서로 다른 칼슘 급원을 사용하여 칼슘 부족으로 인해 발생하는 골 밀도에 대한 영향과 칼슘 공급의 표준으로 사용되는 CaCO_3 를 기준으로 다양한 칼슘 급원의 생체이용성과 소화율을 비교 평가하기 위해 실시하였다. 표준군인 Ca-0%, 30%, 60% 3처리로부터 유도한 칼슘 섭취량에 대한 각 측정항목 분석값으로 회귀방정식을 구하였다 이론적 칼슘섭취량과 실험군의 실제 칼슘섭취량과의 비율을 계산하여 실험군의 생체이용성을 평가하였다. 또한

Table 14. Ca bioavailability based on bone ash in rats fed the diets containing various Ca sources¹⁾

Measurements	Peptide-Ca	Anchovy-Ca	MHA-Ca
Bone ash (%) ²⁾	47.5	46.1	45.0
Actual Ca intake (mg/rat/day) ³⁾	34.2	34.9	30.3
Theoretical Ca intake (mg/rat/day) ³⁾	38.1	34.9	32.3
Estimated bioavailability (%) of Ca ⁴⁾	111	100	106

1) Added at 40% of NRC

2) Calculated by feed intake (mg/rat/day) \times ratio of calcium content in experimental diet

3) Calculated by equation ($y = 0.427x + 31.21$, $R^2 = 0.980$). Theoretical Ca intake (mg/rat/day) = {Bone ash (%) - 31.21} / 0.427

4) Calculated as bioavailability (%) = Theoretical Ca intake / Actual Ca intake \times 100

Table 15. Body weight gain, feed intake, calcium intake and FER in rats fed the experimental diets for 6days¹⁾

Measurements	Ca-0%	Ca-30%	Ca-60%	Peptide-Ca	Anchovy-Ca	MHA-Ca
Body weight gain (g/rat/day)	1.33 \pm 0.58	3.38 \pm 0.29	3.04 \pm 0.54	2.67 \pm 0.33	3.38 \pm 0.29	2.67 \pm 0.8
Feed intake (g/rat/day)	13.2 \pm 0.2 ^b	18.3 \pm 0.2 ^a	19.9 \pm 0.9 ^a	18.9 \pm 0.0	20.7 \pm 0.9	17.4 \pm 0.8
Calcium intake (mg/rat/day)	0.5 \pm 0.0 ^c	27.0 \pm 0.4 ^b	57.4 \pm 2.5 ^a	41.2 \pm 0.0	45.2 \pm 2.1	38.0 \pm 1.8
FER ²⁾	0.10 \pm 0.04 ^a	0.18 \pm 0.01 ^a	0.15 \pm 0.02 ^a	0.14 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02	0.14 \pm 0.05

1) Data are means \pm SEM. Means with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$)

2) FER (Food efficiency ratio): Body weight gains (g) / Feed intake (g) for 6 days

Table 16. True - and apparent digestibility, and apparent retention in rats fed the experimental diets for 6 days¹⁾

Measurements	Standard diets (Added Ca, % NRC)			Ca testing sources (Added at 40% of NRC)		
	Ca-0%	Ca-30%	Ca-60%	Peptide-Ca	Anchovy-Ca	MHA-Ca
----- mg/rat/6 days -----						
Calcium intake	3.0 ± 0.1 ^c	162.0 ± 2.1 ^b	343.3 ± 15.1 ^a	274.2 ± 0.1	271.4 ± 12.7	228.0 ± 10.5
Fecal excretion	0.37 ± 0.01 ^b	1.66 ± 0.03 ^b	14.8 ± 3.00 ^a	3.86 ± 0.09	7.95 ± 0.86	5.86 ± 2.25
Urinary excretion	0.32 ± 0.14	0.30 ± 0.05	0.38 ± 0.11	0.38 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.30 ± 0.06
-----Estimated digestibility (%) of calcium based on ²⁾ -----						
True digestibility	—	98.7 ± 0.03 ^a	95.6 ± 0.68 ^b	98.2 ± 0.03	96.6 ± 0.50	97.2 ± 1.11
Apparent digestibility	87.9 ± 0.08 ^c	98.9 ± 0.03 ^a	95.7 ± 0.69 ^b	98.4 ± 0.03	96.7 ± 0.49	97.3 ± 1.11
Apparent retention	77.2 ± 4.69 ^b	98.7 ± 0.06 ^a	95.61 ± 0.65 ^a	98.2 ± 0.03	96.6 ± 0.50	97.2 ± 1.14

1) Data are means ± SEM. Means with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$)

2) True digestibility (%) = (Ca intake - Ca in feces - Ca in feces of Ca 0%) / Ca intake × 100. Apparent digestibility (%) = (Ca intake - Ca in feces) / Ca intake × 100. Apparent retention (%) = (Ca intake - Ca in feces - Ca in urine) / Ca intake × 100

전통적인 방법으로 칼슘공급원의 칼슘 소화율을 직접 측정하였다.

본 연구에서 식이섭취량이나 칼슘섭취량 및 체중 증가량은 섭취하는 식이의 칼슘 함량과 직접적인 영향을 받았다 (Table 1). 즉 식이의 칼슘 함량이 낮을수록 식이섭취량이나 체중 증가량이 감소하였다. 하지만 식이 칼슘의 섭취 상태가 식이섭취량, 체중 증가량 및 식이효율에 미치는 영향에 대해서는 계속적인 연구가 이루어 지고 있지만 아직까지는 많은 이견을 보이고 있다. 낮은 칼슘 섭취가 식이섭취량과 체중 증가량에 미치는 영향에 대한 연구^(26,27)와 고 칼슘 섭취에 따른 영향 연구⁽²⁸⁾에서는 칼슘 수준에 따른 식이 섭취량과 체중 증가량에 유의한 차이가 없다고 보고하였다. 그러나 다른 연구에서는 저 칼슘식이 본 연구에서와 같이 체중 증가량에 영향을 준다는 연구⁽²⁹⁾와 적정 수준의 칼슘 공급이 고 칼슘 공급보다 식이 섭취량 및 체중 증가량이 높다고 보고되었다.⁽³⁰⁾ 이는 동물이 식이칼슘 함량에 대한 반응이 요구량 이하의 저칼슘 식이와 요구량 이상의 고칼슘 식이에 대해 완전히 다른 기작에 의한 것임을 암시한 것으로 여겨진다. 또한 본 실험에서는 Ca-0%군의 경우처럼 저 칼슘 식이보다 더욱 극단적인 Ca 무 첨가 수준의 식이임을 고려해 볼 때 칼슘의 고갈 상태로 인한 생체 내 생리대사에 영향을 주어 식이섭취량 및 체중 증가량이 낮아 질 수 있음을 추측해 볼 수 있다.

식이의 칼슘 함량이 높은 Ca-60%군이 TBMD, TBMC 및 total bone area가 가장 높게 나타났다 ($p < 0.05$, Table 7). 이는 대퇴골에서의 무기질의 침착 정도는 식이 내 칼슘 함량에 비례적인 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 뼈건강 지표로서의 역할을 보았을 때는 BMD와 bone area size가 동시에 높아질 때 강한 뼈라는 많은 연구 결과를 볼 때,^{3, 1-33)} 칼슘 섭취 수준과 BMD, BMC, bone area

size의 양의 비례관계를 보여준 결과와 일치함을 보여준다.³⁴⁾

본 연구에서 BS값의 경우 Ca-0%군을 제외하면 유의한 차이를 보이지 않았다. 뼈에 걸리는 최대 부하 값 인 BBS값의 경우 실험군간 유의한 차를 보이지 않았지만 anchovy-Ca군에서 가장 높은 값을 나타냈다 (Table 10). 이러한 BBS와 BS값은 뼈건강의 지표 중 골질 위험을 결정 할 때 뼈의 질적 지표 (bone quality)로서의 역할을 하고 단지 칼슘 섭취량과 절대적인 양의 비례관계를 가지고 있지 않으며 다양한 요인에 의해 결정되는 값이다.³⁵⁾ 즉 BBS값은 bone matrix의 물리화학적 변화에 의한 mechanical 특징이고, BS값은 부하에 견디는 능력 (load-bearing capacity)의 반영된다.^{36,37)} 본 실험에서도 칼슘 섭취 수준에 다른 BS와 BBS값은 일정한 패턴으로 변화하지 않았고, 다양한 뼈 구성성분과 instron분석 시 발생할 수 있는 다양한 물리적 변이 조건에 영향을 받는다고 추측된다. 그러나 Ca-0%군의 경우는 5개 첨가군과 차이를 보여 칼슘의 섭취가 뼈의 건강에 직결되는 영양소임을 확인 할 수 있었다. 더불어 외부에서 뼈에 가해지는 물리적인 힘을 지탱하는 능력의 측정은 뼈 성장이 왕성한 단계보다는 중장기적인 실험을 통한 확인이 정확하다.¹⁵⁾

표준군에서 대퇴골의 탈지 중량과 회분함량은 Ca-60%이 가장 높은 수치를 보여 주어 ($p < 0.05$) 기존의 연구⁽³⁸⁾와 일치하였다 (Table 13). 실험군간 회분함량은 peptide-Ca, anchovy-Ca군이 유의하게 높았고 ($p < 0.05$), 칼슘함량은 차이가 없었다. 대퇴골 내 칼슘 함량은 칼슘 섭취량에 따른 양의 상관 관계를 보여준 기존 연구⁽²⁷⁾와는 다른 결과를 보여 주었다. 이러한 차이는 동일한 칼슘급원을 가지고 칼슘첨가 비율만을 토대로 비교한 결과로 본 실험은 서로 다른 칼슘 급원에 따른 칼슘 축적량을 평가한 실험이므로 기존 연구와 다른 결과를 보일 수 있다고 생각된다. 또한

혈청 칼슘 함량에서 Ca-0%군에서 보여주는 6.5 mg/dL은 저 칼슘 식이 공급 시 혈청 칼슘 수준 (7.7 mg/dL)에 관한 연구³⁸⁾와 비교해 볼 때 큰 문제점은 보이지 않는 결과로 볼 수 있다. 결국 칼슘의 항상성은 식이로부터 섭취량과 소화관의 흡수량 및 대변 중 배설량, 뼈 축적량과 뼈로부터 용출량, 신장으로부터 재흡수량과 뇨 중 칼슘 배설량 등에 의해 아주 정교하게 조절되는 기작이고 이미 저칼슘 식이를 섭취한 연구에서 혈청 칼슘 농도에 유의한 차이가 없음이 보고되고 있다.³⁹⁾

생체이용성 성적은 MHA-Ca군이 평가항목 여섯 개중 네 부분에서 가장 높은 이용도를 나타냈고, peptide-Ca군이 두 개 평가부분에서 가장 높은 이용도를 보여주었다. 그러나 MHA-Ca군의 경우 칼슘의 공급원이 메치오닌의 요구량에 따라 순수하게 MHA-Ca에 calcium carbonate와 혼합공급한 것이 칼슘 공급원인 점을 감안할 때 순수하게 칼슘 공급원으로 이용성의 향상이라기 보다는 methionine의 생리 활성 작용으로 인한 실험 군의 향상에 기인한 효과라는 측면도 고려할 점이라고 볼 수 있고 추후 정확한 비교 실험이 필요할 것으로 생각된다. 더불어 회귀계수가 높았던 회분함량과 BMC값을 이용한 이용성 평가에서는 peptide-Ca군이 가장 높은 이용성을 보여 주었다.

본 결과에서 주목 할만한 점은 anchovy-Ca와 peptide-Ca군의 생체이용성 결과이다. Anchovy-Ca군의 경우 뼈건 강관련 모든 평가 부분에서 calcium carbonate군보다 뛰어난 이용성을 보여 주었다. 우유의 경우 유당불내증 (lactose intolerance)로 인한 문제와 기호성 문제로 섭취가 용이하지 않을 수 있지만, 멸치의 칼슘 공급원으로서의 이용은 기호성 문제를 제외하면 뛰어난 칼슘 공급원이다. Peptide-Ca군은 거의 항목에서 calcium carbonate군에 비해 우수한 결과를 나타내 뛰어난 칼슘 보충제로서 역할을 할 수 있었다. 결국 calcium carbonate로 칼슘을 섭취하는 것과 비교하여 실험군에서 급여한 칼슘공급원으로 칼슘을 섭취했을 때 칼슘의 이용성은 높아졌다.

소화율의 평가는 서로 다른 칼슘공급원의 섭취, 흡수와 보유 정도를 평가할 수 있고, 칼슘 생체이용성의 진행 단계 중 중요한 단계인 흡수능력에 관한 실험으로 각각의 칼슘 공급원의 소화되는 정도를 평가하는 실험이었다. 일반소화율의 경우 Ca-30%군에서 가장 높은 소화율을 보였고 ($p < 0.05$) 3 실험군의 경우 유의한 차가 없이 유사하게 칼슘의 소화가 이루어 졌다. 일반보유율의 경우 Ca-0%군을 제외하고 유의한 차가 없이 모두 90% 이상의 칼슘보유율을 보였다 (Table 16). 실험에 첨가된 칼슘 수준이 0~60% 수준이었던 점을 감안한다면 저칼슘 식이 섭취시 칼슘 흡

수량이 증가 한다는 연구³⁸⁾와 비슷한 경향을 보였다.

식이성 칼슘은 칼슘 섭취수준에 따라 칼슘의 흡수율과 대변 중 배설량은 큰 차이가 나게 된다. 칼슘 섭취량이 높아지면 내인성 칼슘의 재흡수율이 저하되므로 대변을 통한 칼슘 배설이 증가할 가능성이 있다는 연구⁴⁰⁾와 쥐에 있어 대변을 통한 내인성 칼슘 배설량은 식이성 칼슘 수준이 정상이거나 높을 때 소변을 통한 배설량 보다 5~10배 정도 많다는 연구²⁷⁾도 본 연구 결과를 뒷받침해준다.

특히 이유 직후의 암 쥐에게 식이 중 1.0%와 0.3%의 칼슘을 5일간 공급하는 평형실험을 했을 때, 저칼슘군의 칼슘 배설량은 고칼슘군보다 유의하게 낮고 일반 소화율은 유의하게 높다는 보고⁴¹⁾와 암탉과 인체 실험에서도 저 칼슘의 섭취는 대변 중 칼슘 배설량을 감소시킨다는 연구^{42,43)} 결과와도 일치하였다. 그러나 칼슘의 형태에 따른 칼슘 흡수량 차이가 난다는 연구¹⁹⁾ 결과를 고려하면 칼슘의 흡수량은 일괄적으로 일반화한 수치로 정하기는 어렵고, 칼슘흡수의 positive factor와 negative factor를 함께 고려하여 평가함이 바람직하다고 생각 된다

요 약

본 연구는 CaCO_3 를 표준으로 장내 칼슘 흡수를 촉진하는 peptide-Ca, anchovy-Ca, methionine hydroxyl analogue calcium의 생체이용성과 소화율을 평가하였다. 표준군은 CaCO_3 를 AIN-93G (1993)를 기준으로 칼슘 요구량의 0%, 30%, 60%로 첨가하여 모든 분석 항목에 대한 비교기준으로 삼았다. 실험군은 요구량의 40% 수준으로 각기 다른 칼슘 공급원으로 실험하였다.

실험결과는 대부분 칼슘 함량이 높은 Ca-60%군이 가장 높은 수치를 보여 주어 칼슘의 섭취량과 비례하여 양의 상관 관계를 보여 주었다. 생체이용성 평가에서는 MHA-Ca군이 체중 증가량, BMD, BS, BBS 항목에서 높은 이용성을 보여 주었다. peptide-Ca은 회귀계수가 높은 회분함량 ($R^2 = 0.98$)과 BMC ($R^2 = 0.935$)를 이용한 평가에서 표준군에 비해 11%, 7% 높은 이용성을 보여주었다. Anchovy-Ca군 역시 여러 생체이용성 평가항목에서 높은 이용성을 나타냈다. 이는 동일한 양의 칼슘을 섭취했을 때 실험군이 표준으로 사용된 CaCO_3 보다 높은 칼슘 이용성을 가지고 있음을 의미한다. 하지만 본 연구로는 유기태 칼슘이 어떤 생리 활성 작용을 통해 이러한 결과를 나타냈는지는 알 수 없었으며, 이 부분을 분명하게 규명하는 추가적인 연구가 필요한 것으로 판단된다. 소화를 측정항목에서는 Ca-0%군을 제외하고는 90% 이상 높은 칼슘 소화율을 나타냈다. 소

화율과 보유율에서 peptide-Ca군이 유의한 차이는 없었지만 다른 실험군에 비해 미세하게 높았다. 이러한 차이의 축적으로 인해 생체이용성 평가시 실험군간 차이를 보여 주었다. 결국 공급한 칼슘에 대한 소화 및 흡수의 차이에 의해 뼈 건강관련 지표가 좋아지고 이로 인해 실험군의 생체이용성이 높게 평가 되었다. Peptide-Ca와 순수한 식품 칼슘 급원인 멸치 뼈는 높은 칼슘 이용성을 나타내어, 체내 칼슘 영양개선에 상당한 효과가 있음이 증명되었다.

Literature cited

- 1) The Korean Nutrition Society, Dietary Reference Intakes for Koreans, Seoul; 2005
- 2) Korea Centers for Disease Control and Prevention, The third Korea National Health and Nutrition Examination Survey (K-NHANES III); 2005
- 3) Allen LH, Wood RJ. Calcium and phosphorus. In: Shils ME, Olson JA M. eds.: Modern Nutrition in Health and Disease, 8th Ed; 1994. p.144-163
- 4) Allen LH. Calcium bioavailability and absorption: a review. *Am J Clin Nutr* 1982; 35: 783-808
- 5) Linder MC. Nutrition and metabolism of major minerals. In: Linder MC, editor. Nutritional biochemistry and metabolism with clinical application. New York; Elsevier; 1991. p.191-214
- 6) Levenson DI, Bockman RS. A review of calcium preparations. *Nutr Rev* 1994; 52: 221-232
- 7) Smith EL, Gilligan C, Smith PE, Sempos CT. Calcium supplementation and bone loss in middle-aged woman. *Am J Clin Nutr* 1989; 50: 833-842
- 8) Coe FL, Parks JH. Recurrent renal calcium. Cause and Prevention. *Hosp Prac* 1986; 30: 49-57
- 9) Yendt ER, Cohanin M, Jarzylo S. Reduced glomerular filtration and a renal tubular Ca leak in womae with primary osteoporosis. *J Bone Min Res* 1989; 4(s): 253-256
- 10) Sobal J, Muncie HL. Vitamin/mineral supplements use among adolescent. *J Nutr Edu* 1988; 20(6): 314-318
- 11) Korean Pharmaceutical Association. Production sheet of medicines pharmaceuticals in Korea. Seoul; 1995
- 12) Heribert J, Watzke A. Impact of processing on bioavailability examples of minerals in foods. *Trends in Food Sci & Technol* 1998; 9: 320-327
- 13) Susan J, Fairweather-Tait SJ. Iron and Calcium Bioavailability. In: Forti editor. Foods and Dietary Supplements. New York. International Life Sciences Institute; 2002. p.360-367
- 14) Fairweather-Tait SJ, Teucher B. Calcium bioavailability in relation to bone health. *Int J Vitam Nutr Res* 2001; 72: 13-18
- 15) Gueguen L, Pointillart A. The bioavailability of dietary calcium. *J Am Coll Nutr* 2000; 2: 119S-136S
- 16) Robert PH. Factors Influencing the Measurement of Bioavailability, Taking Calcium as a Model. Am Society for Nutritional Sciences; 2001
- 17) Sakhaee K, Bhuket T, Adams-Huet B, Rao DS. A meta-analysis of calcium bioavailability: a comparison of calcium citrate with calcium carbonate. *Am J Therapeutics* 1999; 6: 313-321
- 18) Sheikh MS, Anta ACA, Nicar MJ. Gastrointestinal absorptions of calcium from milk and calcium salt. *N Engl J med* 1987; 317: 532-536
- 19) Chung HK, Chang N, Lee HS, Chang YE. The effect of various types of calcium sources on calcium and bone metabolism in rats. *Korean J Nutr* 1996; 29(5): 480-488
- 20) Morohashi T, Sano T, Ohta A, Yamada S. True calcium absorption in intestine is enhanced by fructooligosaccharide feeding in rats. *J Nutr* 1998; 128: 1815-1818
- 21) Harms RH, Russell GB. Adding methionine and lysine to broiler breeder diets to lower feed costs. *J A Poul Res* 1998; 7(2): 202-218
- 22) Lewis AJ. Bioavailability of D-amino acids and DL-Hydroxymethionine. In: Ammerman CB, Baker DH and Lewis AJ, editor. Bioavailability of Nutrients for Animals. San Diego: Academic Press; 1995. p.67-81
- 23) Turner RT. Basic Biomechanical Measurements of Bone. *A Tutorial Bone* 1993; 14: 595-608
- 24) Rath NC, Huff WE, Balog JM and Bayyari GR. Effect of gonadal steroids on bone and other physiological parameters of male broiler chickens. *Poul Sci* 1996; 75: 556-562
- 25) Le'on Gue'guen, MsScAgr. The Bioavailability of Dietary Calcium. *J Am Coll Nutr* 2000; 19(2): 119S-136S
- 26) Kwon OR, Kim MK. Effects of dietary Ca levels and kinds of lipid on the lipid metabolism in the rats. *Korean J Nutr* 1988; 21(5): 324-332
- 27) Lee JH, Moon SJ, Huh KB. Influence of phytate and low dietary calcium on calcium, phosphate and zinc metabolism by growing rats. *Korean J Nutr* 1993; 26(2): 145-155
- 28) Yacowitz H. Effects of dietary calcium upon lipid metabolism in rats fed saturated or unsaturated fat. *J Nutr* 1967; 92: 389-392
- 29) Iacono JM. Effect of varying dietary level of calcium on plasma and tissue lipids of rabbits. *J Nutr* 1974; 104: 1165-1171
- 30) Foley MK. Influence of dietary calcium and cholecalciferol on composition of plasma lipids in young pigs. *J Nutr* 1990; 120: 45-51
- 31) Duan Y, Parfitt AM, Seeman E. Vertebral bone mass, size, and volumetric density in women with spinal fractures. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1796-1802
- 32) Cordey J, Schneider M, Belendez C, Ziegler WJ, Rahn BA, Perren SM. Effect of bone size, not density, on the stiffness of the proximal part of normal and osteoporotic human femora. *J Bone Miner Res* 1992; 7(Suppl2): S437-S444
- 33) Vega E, Ghiringhelli G, Mautalen C, Rey VG, Scaglia H, Zylberstein C. Bone mineral density and bone size in men with primary osteoporosis and vertebral fractures. *Calcif Tissue Int* 1998; 62: 465-469
- 34) Roberfroid MB, Cumps J, Devogelaer JP. Dietary chicory inulin increases whole body bone mineral density in growing male rats. *J Nutr* 2002; 132: 3599-3602
- 35) Mehta S. Bone elasticity and ultrasound velocity are affected by subtle change in organic matrix. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 114-119
- 36) Rath NC. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. *Poultry Sci* 1999; 79: 1024-1032

- 37) Meulen MCH. Understanding bone strength: size isn't everything. *Bone* 2001; 29: 101-104
- 38) Lee SH, Hwangbo YS, Kim JY, Lee YS. A study on the bioavailability of dietary calcium sources. *Korean J Nutr* 1997; 30(5): 499-505
- 39) Ezawa I. Studies on calcium metabolism. *Jap J Home Econo* 1987; 38: 695-703
- 40) Benson JD. Effect of previous calcium intake on adaptation to low and high calcium diets in rats. *J Nutr* 1969; 97: 53-60
- 41) Sammom PE. Role of parathyroid hormone in calcium homeostasis and metabolism. *Am J Physiol* 1970; 218: 479-485
- 42) Roland DA. Calcium metabolism in the laying hen: The calcium status of the hen at night. *Poult Sci* 1973; 52: 351-354
- 43) Matkovic V. Factors that influence peak bone mass formation: A study of calcium balance and the inheritance of bone mass in adolescent females. *Am J Clin Nutr* 1990; 52: 878-888