

발간등록번호

11-1541000-000718-01

**칼슘 유단백질 킬레이팅화를 통한 고칼슘 유기태화
식품소재 개발 및 이를 이용한
기능성 노인식 분말제품개발**

(The development of organic Ca supplements by
Ca-milk protein chelation
and functional powder Product)

**칼슘-유단백질 킬레이팅 유기태 칼슘제제의 안전성,
체내 이용성 및 효능평가**

(Evaluation of the Safety, Bioavailability and Efficacy of
Organic Calcium Chelated with Whey Protein)

매일유업(주) 중앙연구소

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “칼슘-유단백질 킬레이팅화를 통한 고칼슘 유기태화 식품소재 개발 및 이를 이용한 기능성 노인식 분말제품 개발” 과제(세부과제 “유기태화 칼슘제제의 실험동물에 대한 안전성 및 골격대사에 미치는 효과평가”)의 보고서로 제출합니다.

2010년 12월 17일

주관연구기관명 : 매일유업(주) 중앙연구소

주관연구책임자 : 김 희 경

세부연구책임자 : 김 희 경

연 구 원 : 김 재 홍

연 구 원 : 신 호 재

연 구 원 : 김 민 호

연 구 원 : 김 용 기

연 구 원 : 최 유 영

연 구 원 : 김 영 진

연 구 원 : 최 원 선

연 구 원 : 윤 현 중

연 구 원 : 김 영 호

협동연구기관명 : 서울대학교 식품영양학과

협동연구책임자 : 이 연 숙

연 구 원 : 조 수 경

연 구 원 : 박 미 나

요 약 문

I. 제 목

칼슘-유단백질 킬레이팅화를 통한 고칼슘 유기태화 식품소재 개발 및 이를 이용한 기능성 노인식 분말제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 칼슘-유단백질 킬레이팅화를 통한 고칼슘 유기태화 식품소재 개발

현재 식품산업에 사용되는 무기태 칼슘소재의 경우, 섭취량 대비 최대 40% 이내의 낮은 생체흡수율을 보이는 것으로 알려지고 있다. 또한, 대부분 독성을 보유하고 있어 필요 섭취량 및 생체흡수율(이용률)을 충족시키기 위해 과량을 사용할 수 없는 한계와 애로점을 가지고 있다.

식품산업관련 미네랄 소재 및 제품개발은 법적규제에 있어 화학원료 및 제조법의 사용이 엄격히 제한되기 때문에 제조규정에 따른 연구개발에 어려움을 가지고 있다.

본 연구에서는 이러한 문제를 극복하기 위한 일환으로 유청단백질의 특성에 주목하였는데, 이들의 복합적 특성(열변성, 킬레이팅 기능기 등)을 활용하여 무기태 칼슘을 단백질내 킬레이팅화 함으로서 최종 유기태화 칼슘소재로의 개발하였다.

결국, 상기 문제점을 해결하기 위한 방안으로, 무기태 칼슘의 단점을 해결할 수 있는 대안으로서 칼슘-유기태화 제제 개발을 통하여 최종 칼슘부족에 따른 성장기 및 폐경기 이후 골다공증 등의 노인관련 질병발생 메카니즘 요구성을 해결코 저 하였다.

2. 칼슘-유단백질 킬레이팅 유기태 칼슘제제의 안전성, 체내이용성 및 효능평가

2008년 국민건강영양조사¹⁾에 의하면, 칼슘 섭취량은 전 연령층에서 권장량 대비 평균 섭취량이 부족한 상태이며, 성인 남녀의 칼슘 권장량은 700mg이나 섭취율은 기준대비 65.7% 정도이며, 최대 골질량 형성을 위해 칼슘 섭취가 높아야 할 청소년기의 칼슘 섭취량은 권장량 대비 50% 수준으로 나타났다.

지속적인 칼슘 섭취의 부족은 결국 성인기의 최대 골밀도를 낮추고, 성장기 아동의 골격과 치아의 석회화에 영향을 주어, 성장저하 및 구루병을 초래하며, 결국 노년기 골다공증 빈도를 증가시킨다²⁾.

따라서, 실험동물을 성장기 및 폐경기이후(골다공증 발생) 단계로 구분하고, 무기태 칼슘소재(CaCl, CaCO₃) 대비 개발 Ca-WPS제제가 장단기 섭취시 안전성, 체내흡수율, 골형성 및 골다공증예방 및 치료 관련 메카니즘을 검토하고자 하였다. 결과를 토대로 제형레시피를 확립 및 실용화(제품화)에 최종 목적을 두었다. 동물임상 검정은 성장기 섭취에 따른 안전성, 체내흡수효율 및 골생성 부분으로 구분하여 검정하였으며, 골다공증예방 및 치료효과 실험에 기초 결과로 활용하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 칼슘-유기태화(Ca-WPS)소재용 기질선발 및 킬레이팅 기법연구
 - 가. 칼슘 킬레이팅 기질용 유단백질 선발
 - 나. 상용 무기태화 칼슘제제중 킬레이팅화 칼슘선발
 - 다. 칼슘 킬레이팅 극대화 메카니즘(기능기 극대화) 기법정립
 - 라. 기질 단백질내 고칼슘 킬레이팅제제(Ca-WPS) 제조기법 정립
 - 마. Ca-WPS내 미생물 제공기법 정립

2. Ca-WPS개발간 필수분석법 정립 연구
 - 가. 영양성분 분석법(단백질, 지방, 탄수화물, 미네랄류등) 정립
 - 나. 분자량 분석법(FPLC 분석)정립
 - 다. 칼슘-킬레이팅 관련분석법(XRD, FT-IR, SAM)정립
 - 성상 및 구조분석, 킬레이팅 기능기 검정
 - 라. 미반응 미네랄 및 독성이온(Cl-) 분석(IC분석)정립
 - 마. 미생물 검사(식약청, 식품공전기준)

3. Ca-WPS의 제품적용성 평가연구
 - 가. 상용 무기태 칼슘제제 대비 현장적용 안전성 평가
 - 나. 상용 무기태 칼슘제제 대비 및 물성변화 평가

4. Ca-WPS대량생산방법 정립연구 및 경제성평가 연구
 - 가. 영유아식 식품개발기준(법규제), 대량생산기법 정립
 - 나. 제균형 대량생산기법 정립
 - 다. Ca-WPS 생산 및 제형별 경제성 평가
 - 라. 제형화(정제형, 과립형) 레시피 정립연구

5. Ca-WPS 제품화(제형화 및 레시피 정립)
 - 가. 사업화 적용형 제형정립(타정형, 용액 분산형 과립형)
 - 나. 제형별 레시피 확립 및 대량생산시스템 정립

6. Ca-WPS의 동물임상 효능평가
 - 가. 성장기 흰쥐에서 Ca-WPS제제의 안전성 및 체내흡수 및 유용성 평가(실험1)
 - 나. 골다공증 모델 흰쥐에서 Ca-WPS제제의 안전성 및 골격대사에 미치는 효과평가

IV. 연구개발결과

1. 칼슘-유기태화(Ca-WPS)제제 개발 연구

가. 신규소재 개발에 따른 필수 분석법 정립

본 연구는 신규한 소재개발과 관련된 것으로서, 원료 유단백질 대비 칼슘-유기태화 반응전/후의 분석방법 확립을 통하여 개발제제의 안전성 및 특성을 명확하게 구명할 필요가 있다.

따라서, 개발에 따른 영양성분 변화분석, 유단백질의 변화에 따른 분자량 변화분석, 칼슘과 유단백질간의 킬레이팅 효과분석, 개발제제의 안전성 확보를 위한 미반응 칼슘 및 유해이온 제거 효율 검정분석법 정립 및 유해미생물 검정 및 제어를 위한 미생물 검사법등을 결과와 같이 정립하였다.

| 분석법 정립방법 | 분석법 정립결과 |
|--|---|
| <p>1. 영양성분 분석법 정립</p> <p>가.이론적 접근방법 : 원료 유단백질 대비 칼슘-유기태화 반응전/후의 영양성분 변화확인을 위한 분석방법 확립 필요</p> <p>나. 실험실적 접근방법 : 분석방법 정립</p> | <p>1. 영양성분 분석 방법 정립 완료</p> <p>가. 킬달분석 :조단백질 확인</p> <p>나. GC분석: 지방산 확인</p> <p>다. 조지방분석 : 조지방 확인</p> <p>라. HPLC 분석:당류, 유기산 등 분석</p> <p>마.ICP분석: 칼슘-킬레이팅 결과 분석</p> |
| <p>2. 분자량 변화 분석법 정립</p> <p>가. 이론적 접근방법 : 칼슘-유기태화 반응전/후의 분자량 변화 조사 필요</p> <p>나. 실험실적 접근방법: 분석방법 정립</p> | <p>2. 분자량 변화분석 정립</p> <p>가. FPLC(Peptide)분석 : 분자량 변화 평가</p> <p>나.FPLC(GPC)분석: 비/열처리시 단백질 분자량 이동 패턴 조사</p> |
| <p>3. 칼슘-킬레이팅 효과 분석법 정립</p> <p>가. 이론적 접근방법 : 선발 유단백질 대비 칼슘 킬레이팅 반응전/후 칼슘 킬레이팅에 관련한 기능기 및 구조변화 확인 필요</p> <p>나. 실험실적 접근방법 : 분석방법 정립</p> | <p>3.칼슘-킬레이팅 효과 분석방법 정립 완료</p> <p>가. FT-IR분석: 칼슘-킬레이팅 관련 기능기 분석</p> <p>나. EC측정 : 칼슘 킬레이팅 반응효율 측정</p> <p>다. XRD분석: 킬레이팅 구조분석</p> <p>라. SAM분석: 정상확인</p> |
| <p>4. 미반응 칼슘 및 유해이온 제거 효율 검정분석법 정립</p> <p>가. 이론적 접근방법 : 선발 유단백질 대비 칼슘 킬레이팅 반응후 미반응 칼슘과 독성보유 음이온(염소 이온) 제거 필요</p> <p>나. 실험실적 접근방법 : 분석방법 정립</p> | <p>4. 미반응 칼슘 및 유해 음이온 분석방법 정립 완료</p> <p>가.IC분석: 세척단계별 분취 PERMEATE내 음이온 제거효율(안전성) 평가</p> <p>나. ICP분석 :세척단계별 PERMEATE 및 RETENATE시료내 미네랄 함유량 조사</p> |
| <p>5. 미생물 검사법 정립</p> <p>가. 이론적 접근방법 : 칼슘-유기태화 제제 개발 시 예측되는 감염균 확인 및 제어방법 필요</p> <p>나. 실험실적 접근방법: 미생물 분석방법 정립</p> | <p>5. 미생물 검사법 정립 : 식약청 식품공전 미생물 검사법(기준)</p> <p>가. 총균수 정성시험</p> <p>나. 대장균군 정성시험</p> <p>다. 진균수 정성시험</p> <p>라. 유산균 정성시험</p> |

나. 칼슘유기태화(Ca-WPS)제제 개발연구

본 연구는 식품업계에서 기존 사용하고 있는 무기태화 칼슘소재의 단점(독성으로 인한 안전성, 체내흡수율 및 생체이용률 저하 해결 요구성)을 킬레이팅 기법을 도입한 유기태화 방법으로 해결하고자 하였다. 우유내 단백질류 및 지방산류는 그 특성상 킬레이팅(Chelating) 관련 기능기를 보유하고 있는데, 이 특성을 활용하므로써 첨단 기능성 소재를 개발이 가능함에 주목하였다.

- 1) **유기태화 제조용 기질단백질 선발결과** : 기질 단백질로는 18종의 유단백질중 내열성 및 내산성 평가를 거쳐 치즈제조 후 생산되는 잉여 유청단백질(Whey Protein, 이하 WPS)을 최종선발하였다.
- 2) **킬레이팅용 칼슘선발 결과**: WPS에 킬레이팅을 위한 칼슘소재는 식품산업에서 상용되고 있으면서 식품첨가물로 허가된 무기태화 칼슘소재 6종중 선발하였는데, 우유 안정성평가를 거쳐 물리(응고, 침전, 응집, 부착, 부유 현상) 및 이화학적(pH, EC, 삼투압, 용해성, 당도변화 등) 변화가 가장 적었던 염화칼슘(CaCl₂)를 선발하였다.
- 3) **대량생산시스템(공정)정립**
 - 가) 연구개발에 따른 제조개발대량생산에 있어 제조공정 및 사용재료는 영유아식제조에 따른 법적규제에 준하여 Ca-WPS제제를 최종개발하였다.
 - 나) WPS내 칼슘의 킬레이팅화를 위하여, WPS 고유단백질이 보유한 킬레이팅 관련 기능기들의 노출을 극대화 하도록 최적 반응온도는 80~95℃ 그리고 반응시간은 1시간 이내로 하였다. 이때 유청단백질 대비 칼슘은 1.2당량 비율로 정하였다.
 - 다) Ca-WPS제조 후 잉여칼슘 및 독성 음이온(Cl)의 제거는 NF(Nano Filtering)시스템 세척공정을 정립 확립하였는데, 독성음이온 제거효율은100%였다.
 - 라) WPS내 칼슘킬레이팅 관련 기능기 검출은 FT-IR분석을 실시하여 확인하였으며, 동시에 킬레이팅화에 따른 칼슘과 WPS와의 결합에 따른 화학구조는 X선회절분석(XRD)을, 형태변화 및 입자크기는 SAM조사를 병행하여 실시하였다.
 - 마) FT-IR분석결과 칼슘 킬레이팅 관련 기능기능 -COOH, COO-, -SH 및 -P가 주요한 기능기였으며, 이들의 노출강도에 따라 원료 WPS 대비 칼슘의 킬레이팅효과는 10배~20배의 차이를 보였다. 이중 대량생산시스템 정립공정은 이중 20배 효과를 보인 제조방법을 확정하였다.
- 4) **Ca-WPS의 화학구조분석 결과** : 최종 제조된 Ca-WPS의 Formular를 X-ray Analysis(XRD)를 통하여 조사하여 본 결과, Calcium Potassium Phosphate Hydrate [Ca₂K₂(P₆O₁₈)·6(H₂O)], Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate [Ca₈H₂(PO₄)·6H₂O], Potassium Calcium Hydrogen Phosphate [CaK₃H(PO₄)₂], Brushite [CaPO₃(OH)·H₂O], Calcium Sulfide Phosphate [Ca₁₀(PO₄)₆S] 구조형태(구형입자)를 보유하고 있었으며, 입자크기는 10~100 μm이내였다.
- 5) **Ca-WPS 칼슘킬레이팅효과** : 최종제조된 Ca-WPS제제내 칼슘함유량은 80,000ppm~100,000ppm범위이였으며, 생산수율은 28%였으며, 영양성분 구성치로서 단백질 40%이상, 조지방 3%이내 그리고 당류는 0%를 함유하고 있었다.
- 6) **Ca-WPS 제품화(제형화)레시피 정립결과** : Ca-WPS제형(제품)은 섭취용으로는 정제형(1정/1,000mg), 용액내 첨가시 용해 및 분산이 용이하도록 과립형(1스틱/2,000mg)으로 최종 레시피를 정립하였는데, 제형별 Ca함유량은 100mg으로 정하였다.

2. 칼슘-유단백질 킬레이팅 유기태 칼슘제제의 안전성, 체내 이용성 및 효능평가

본 연구는 유청 단백질과 칼슘이 킬레이션된 새로운 유기태 칼슘제(Ca-WPS)가 성장기 흰쥐와 골다공증 모델 흰쥐에서 안전성, 체내 이용성, 생리기능 및 골격대사에 미치는 영향을 평가하고자 수행되었다.

가. 성장기 흰쥐에서 Ca-WPS 제제의 안전성 및 유용성 평가 [실험 1]

실험 1에서는 성장기 흰쥐에서 개발 유기태 칼슘의 안전성 및 체내 이용성을 무기태 칼슘 급원을 대조군으로 하여 비교하고자 하였다. 4주령 수컷 흰 쥐 (Sprague-Dawley rats) 36마리를 6개의 실험군(n=6/group)으로 설정하였다.

칼슘의 섭취 수준에 따라 정상칼슘(0.5%) 및 고칼슘수준(1.5%)으로 나누고, 칼슘의 급원을 탄산칼슘, 구연산칼슘, 유기태칼슘으로 하여 6주간 실험식이를 급여 후 희생시켰다. 그 결과, 개발 유기태 칼슘제제의 수준별 섭취는 대조군과 비교하여 체중증가, 식이섭취량 및 식이효율에서 유의적인 차이를 보이지 않았지만 다소 성장이 증가한 결과를 나타냈다.

유기태 칼슘군의 혈청중의 칼슘, 인, 마그네슘의 농도는 대조군과 마찬가지로 항상성을 이루어 성장기 정상 범위에 속하였으며, 혈청 ALP의 활성은 유기태칼슘군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하여 성장기 뼈의 대사에 긍정적인 영향을 준 것으로 보였다. 또한 혈액의 간기능 지표(GOT, GPT, T-bilirubin), 신기능 지표(BUN, creatinine, uric acid)를 측정한 결과 유기태 칼슘군이 대조군과 비교하여 부정적인 효과가 나타나지 않았다.

유기태 칼슘군은 대조군보다 칼슘의 흡수율이 증가하여 생체 이용율이 높았다. 유기태 칼슘의 섭취는 성장기 대퇴골의 무게와 강도를 증가시키고, 칼슘의 섭취수준에 따라 증가하여 무기태 칼슘보다 칼슘의 이용성이 우수한 결과를 나타냈다.

나. 골다공증 모델 흰쥐에서 Ca-WPS 제제의 안전성 및 골격대사에 미치는 효과평가[실험2]

실험 2에서는 난소절제와 4주간 저칼슘식으로 유도된 골다공증 모델 흰쥐에서 유기태 칼슘제(Ca-WPS)를 수준별로 급여하여 칼슘의 이용성과 골격대사에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 8주령 암컷흰쥐(Sprague-Dawley rats) 35마리는 난소절제하여 탄산칼슘이 포함된 저칼슘식이(0.1%)를 4주간 급여하여 골다공증 모델을 형성한 후, 4개의 군으로 나누어 저수준(0.1%)의 탄산칼슘 및 유기태 칼슘(저수준; 0.1%, 정상수준; 0.5%, 고수준; 1.5%)이 포함된 실험식이를 4주간 급여후 희생시켰다. 그 결과, 난소절제와 4주간 저칼슘식으로 유도된 골다공증 모델 흰쥐에서 유기태 칼슘섭취군은 탄산칼슘군에 비해 식이 섭취량과 체중증가가 유의적으로 높았다. 혈청의 칼슘 농도는 칼슘 섭취 수준의 영향으로 고수준의 유기태 칼슘군에서 다소 감소되었으나 모든 실험군의 혈청 칼슘 농도는 정상범위에 속해 혈청 칼슘의 항상성이 유지되었다. 지속적인 저수준의 탄산칼슘식은 혈청 ALP의 활성을 증가시켰으나, 유기태 칼슘을 섭취한 경우 유의적으로 감소되었다. 저칼슘 수준의 유기태 칼슘을 섭취한 경우 탄산칼슘을 섭취했을 때 보다 유의적으로 칼슘의 흡수율이 증가하였다. 비록 고칼슘 수준에 따른 칼슘과 인의 흡수율은 감소하였으나, 실제로 체내로 흡수된 칼슘과 인의 함량은 탄산칼슘군에 비해 유기태 칼슘군이 유의적으로 높아서 무기질의 체내 이용성이 증가한 것으로 평가되었다. 유기태 칼슘 섭취의 증가는 요추골의 무게를 증가시키고, 정상 수준 이상의 칼슘 섭취는 요추골의 질량 손실을 예방하는 것으로 나타났다.

다. 종합결론

성장기 동물에서 새로 개발된 유기태 칼슘(Ca-WPS)의 섭취 효과는 성장, 혈청 영양소와 생리기능 지표, 무기질 대사, 지질대사 및 골격대사에 있어서 그 안전성이 인정되었으며, 칼슘의 체내이용성에 있어서도 대조군으로 사용한 칼슘급원에 비해 우수한 것으로 평가되었다. 골다공증 모델 동물에서 개발 유기태 칼슘의 섭취는 대퇴골 및 요추에서 뼈 손실(골격량, 칼슘함량, 뼈 강도 등 모든 측정치)을 감소시키는 효과를 보였다.

이러한 결과는 새로 개발된 유기태 칼슘 제제가 칼슘보충제로서 우수한 것으로 평가할 수 있으며, 특히 골다공증의 예방과 치료에 있어서 유효한 것으로 사료된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

| 연구목표 | 연구성과 |
|---------------------------------------|--|
| 1. 칼슘-유기태화(Ca-WPS)소재용기질선발 및 킬레이팅 기법연구 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 칼슘 킬레이팅 기질용 유단백질 선발(완료) : 치즈제조후 잉여 유청단백질(WPS) 선발 2. 상용 무기태화 칼슘제제중 킬레이팅화 칼슘선발(완료) : CaCl₂ 3. 칼슘 킬레이팅 극대화 메카니즘(기능기 극대화) 기법정립 : 킬레이팅 중대기법 정립(10~20배), 관련기능기(-COOH, -COO⁻, -S, -P) 4. 기질 단백질내 고칼슘 킬레이팅 제제제조기법 정립(완료) : Ca-WPS제제, 칼슘함유량(85,000~110,000ppm) 5. Ca-WPS내 미생물 제균기법 정립(완료) : HTST(85℃, 15초, 1회) |
| 2. Ca-WPS개발간필수분석법 정립연구 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 영양성분 분석법(완료) : 단백질, 지방, 탄수화물, 미네랄류 2. 분자량 분석법(완료) : FPLC 분석 3. 칼슘-킬레이팅 관련분석법(완료) : XRD, FT-IR, SAM : 성상 및 구조분석, 킬레이팅 기능기 검정 4. 미반응 미네랄 및 독성이온(Cl⁻) 분석(완료) : IC분석법 5. 미생물 검사(완료) : 식품공전기준(식약청) |
| 3. Ca-WPS의 제품적용성 평가연구 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 상용무기태화 칼슘제제 대비 현장적용 안전성 및 물성변화 평가(완료) |
| 4. Ca-WPS대량생산방법 정립연구 및 경제성평가 연구 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 영유아식 식품개발 기준(법규제), 대량생산기법 정립(완료) : 시제품 3회, 시작품 2회 생산완료 2. 제균형 대량생산기법 정립(완료) : HTST(85℃, 15초, 1회) 3. Ca-WPS 생산 및 제형별 경제성 평가(완료) : Ca-WPS : 12원/Ca-WPS 1g(칼슘함유량 : 100mg) 4. 제형화(정제형, 과립형) : 15.4원/1정 혹은 1스틱(칼슘함유량 : 100mg) |
| 5. Ca-WPS 제품화(제형화 및 레시피정립) | <ol style="list-style-type: none"> 1. 사업화 적용형 제형정립(완료) : 타정형, 용액 분산형 과립형 2. 제형별 레시피 확립 및 대량생산시스템 정립(완료) |
| 6. Ca-WPS의 동물임상 효능평가 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 무기태 칼슘 대비 유기태화 칼슘(Ca-WPS)의 동물임상(성장기) 효능시험(완료) - 안전성 및 기초효능(섭취량, 체내흡수량 및 흡수효율, 생체이용률조사) 평가 2. 무기태 칼슘 대비 유기태화 칼슘(Ca-WPS)의 동물임상(폐경기) 효능시험 - 골다공증모델(폐경기) 이용 Ca-WPS제제의 효능평가(완료) |

2. 성과활용계획

| 핵심연구결과 | 연구성과활용계획 |
|-----------------------------------|---|
| 1. Ca-WPS 제조 기법 및 대량생산 방법 정립연구 결과 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 개발 KNOW-HOW, 이중 유기태화 미네럴 강화 식품개발에 응용성 확대 <ul style="list-style-type: none"> - 유기태화-철분제제, 유기태화-아연 등 2. 고부가 제품화 연계활용(허가기관(수과원) 검토결과에 준하여 순차적 진행) <ul style="list-style-type: none"> - 1단계 : 식품부산물 고부가제품에 적용(허가사항 필요없음. 효능표시 불가) - 2단계 : 건강보조식품개발에 활용(건기법 절차준수 등재 후 효능표시) - 3단계 : 의약품개발에 활용(인체임상기준 준수, 진행후 적용) 3. 개발 KNOW-HOW 신규 고부가가치 제품화 개발에 적극활용 <ul style="list-style-type: none"> - 개발소재 첨가형 및 개발 킬레이팅기법 적용 제품개발형 구분 |
| 2. Ca-WPS 제품화(제형화 및 레시피 정립)연구결과 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 성장기 및 골다공증 예방 임상결과, 임산부 및 영유아식등 제품군 확대적용 2. 현재제품의 단점보강형 제품군 개발에 적극활용 3. 점차적 유기태화 미네럴 강화 식품개발 개발시 기초자료로 적극활용 (영유아식품, 건강기호식품 등) 4. 연구결과를 기초로 의약품수준의 고부가가치화 식품개발로 연계 |
| 3. Ca-WPS의 동물임상 효능평가 결과 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 정제형 : 고체형 고부가가치 제품군 개발에 적극활용 2. 과립형 : 액체형 고부가가치 제품군 개발에 적극활용 3. 용도용법 응용성 확대에 적극활용 : 동물분야 및 수산분야 4. 신소재로서 적극활용, 기존제품내 첨가를 통하여 기능성 제품개발 및 품질 UP-GRADE화 및 신소재 자체의 신제품개발에 적극활용 5. 고부가 가치 상품화 컨셉 적용 가. 골다공증 예방형 기능성 노인식식품개발 나. 현재제품의 단점 보강형 제품 재개발 6. 국내외 영업 및 판매전략 적극활용(수익극대화) |

SUMMARY

I. Title

The development of organic Ca supplements by Ca–milk protein chelation and functional powder Product.

II. Objective and Significance

Currently in case of inorganic calcium materials used for foods industry well known to low body absorption rate within the maximum 40 % for intake Also, it was difficult for using excess to satisfy recommended nutrient intake.

Low levels of calcium intake for recommended nutrient caused deficit Ca^{++} ion concentration in serum and finally it caused osteoporosis because of consumption Ca^{++} of bone. A case of the adulthood included period of growth phase, especially women after menopause should be decreased bone mineral density because of consumption about 10mg a day. However, commercial inorganic calcium materials reported bioavailability was low compared with intake.

It was very important for calcium concentration maintenance regular in body fluid, if decreased of serum calcium concentration was parathyroid glands(PTH), vitamin activity($[1.25(\text{OH})_2\text{D}_3]$) and increased calcium(Ca^{++}) in cells. According to high blood pressure, obesity, preeclampsia, menstruation syndrome, polycystic ovary syndrome and hyperthyroidism related on osteoporosis occurrence mechanism. and deficiency of calcium takes by–product(being digested) can lead to colorectal cancer and kidney stone. Therefore, calcium deficiency was caused disease (osteoporosis) through resorption from bones and kidney. it was required to alternative regarding prevention through medicine be able to increase of intestinal calcium absorption or method development.

Finally, plans to solve the above–mentioned problem to disadvantage of inorganic calcium through organic Ca development on calcium deficiency of Period of growth and after menopause. we will studied to solve disease occurrence mechanism demand regarding old men such as osteoporosis.

III. Contents and Scope

1. Essential analysis for Ca–WPS chelating material development

A. We established of Essential analysis method for whether nutritious component change confirmation or not for Ca–WPS in contradistinction to sources materials. We established it through classified analysis methods were used HPLC

analysis method for sugars, organic acids, ICP analysis method for mineral analysis, FPLC(Peptide) analysis method for protein analysis, was FPLC(GPC) analysis method for Molecular weight analysis, FT-IR analysis method for functional chelating group, IC analysis method for Surplus calciums and toxicity negative ion removal efficiency, XRD analysis method for chelating Structural analysis and EC analysis method for chelating responses and toxicity negative ion removal efficiency. And then we were apply to study for calaium-milk protein chelating material development.

| Analysis Methods | Results |
|---|--|
| <p>1.Established of Nutritious component analysis method. A. Approach method of theoretical : An analysis method establishment need for nutritious component change confirmation for Ca-WPS preresponse or After response in contradistinction to raw materials. B. Approach method of experiment : Established of analysis method.</p> | <p>1.Establishment completed Nutritious component analysis method A.Kjeldahl analysis : Confirmation of Crude protein B.GC analysis : Confirmation of fatty acid C.Crude fat analysis : Confirmation of Crude fat D.HPLC analysis:Confirmation of Sugars, organic acid E. ICP analysis:Result of calcium chelating analysis</p> |
| <p>2. Established of molecular weight change analysis method. A..Approach method of theoretical : An analysis method establishment need for molecular weight change confirmation for Ca-WPS pre-response or After response. B. Approach method of experiment : Established of analysis method.</p> | <p>2. Established of analysis method. A. FPLC(Peptide) analysis : Assessment of molecular weight B. FPLC(GPC)analysis : Investigation of protein molecular weight and migration pattern in case of heat treatment or not.</p> |
| <p>3. Established of analysis method on Ca-chelating effect. A..Approach method of theoretical : An analysis method need for morphological change and regarding functional Ca-WPS group pre-response or after response in contradistinction to selected milk protein. B. Approach method of experiment : Established of analysis method.</p> | <p>3.establishment completed of analysis method on Calcium chelating effect. A. FT-IR analysis: Analysis of regarding functional Ca-WPS group B. EC measurement: Measurement of Calcium-chelating Response efficiency measurement C. XRD analysis : Analysis of chelating Structural analysis D. SAM analysis : Confirmation of characteristic</p> |
| <p>4. Established of analysis method on residual calciums and toxicity negative ion removal efficiency A.Approach method of theoretical : Need to residual calciums and toxicity negative ion removal Ca-WPS group After response in contradistinction to selected milk protein. B. Approach method of experiment : Established of analysis method.</p> | <p>4.Established of analysis method on residual calciums and toxicity negative ion removal efficiency A.IC analysis: Evaluation of negative ion removal efficiency(safety) in split PERMEATE by a washing step. B. ICP analysis : Evaluation of investigation on mineral content in PERMEATE and RETENATE by a washing step.</p> |
| <p>5. Established of analysis method on microorganism A..Approach method of theoretical : In case of Ca-WPS products development we need forecasted Infection microorganism confirmation and control method. B. Approach method of experiment : Established of microorganism analysis method.</p> | <p>5. Established of analysis method on microorganism : Microorganism analysis method of korea food and drug administration Korean Food standards Codex(standard)]</p> |

b. Making of organic calcium(Ca-WPS)

In this study, we purposed the existing disadvantages of inorganic materials using (safety by toxicity, interior of the body absorption rate , and solution demand of bioavailability ratio decreased) in the organic-mineral method that introduced Chelating technique in the foods industries.

Milk Proteins and fatty acids were utilization and development was possible with this functional characteristic to be maintaining it regarding Chelating in milk. and we used whey proteins which were substrate protein and then used CaCl₂ which were calcium material, and we developed Ca-WPS.

Making Ca-WPS, we treated the protein to maximize the functional group for chelating of intrinsic protein with chelating activity, through maximizing the heat denaturation factor of protein. optimum heat denaturation conditions to achive the increased calcium chelating activity and optimum time 80~95°C in 1 hour.

The result of FT-IR peak analysis on functional group related to calcium chelation of the manufactured Ca-WPS, showed that the important functional groups are -COOH, COO⁻, -SH and -P group. and source of WPC(whey protein) in contrast to difference of preparation method, the calcium chelating activity of Ca-WPS supply a contrast to 10 to 20 folds. Thus, we established the preparation method with maximized chelating activity for manufacturing.

The result of X-ray diffractin analysis(XRD) on the manufactured Ca-WPS, was showed that it was maintaining a form structural a union with Calcium Potassium Phosphate Hydrate[Ca₂K₂(P₆O₁₈)·6(H₂O)], Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate [Ca₈H₂(PO₄)·6H₂O], Potassium Calcium Hydrogen Phosphate [CaK₃H(PO₄)₂], Brushite [CaPO₃(OH)·H₂O], Calcium Sulfide Phosphate [Ca₁₀(PO₄)₆S], and 10~100 μm of particle size.

Calcium content of manufactured Ca-WPS was 80,000ppm~100,000ppm range. and production yield of 28%. and Its nutritional composition of it was above 40% of protein, above 3% of crude fat and 0% of carbohydrate.

ㄷ) Product of Ca-WPS (organic calcium)

We made Ca-WPS product as tablet type and granule type. Calcium concentration of Each type was of 100 mg(of which contained Ca-WPS(Ca-WPS 1~2 g) content.

2. Evaluation of the Saftey, Bioavailability and Efficacy of Organic Calcium Chelated(Ca-WPS) with Whey Protein

This study was performed to evaluate the safety, bioavailability, physiological functions and bone metabolism in growing rats and osteoporotic model rats fed diet containing organic Ca chelated with whey protein(Ca-WPS).

In experiment one, It was aimed to compare safety and bioavailability of control (CaCO₃) and Ca-WPS in growing rats. Four week-old male rats were divided into 6 groups (n=6/group) and fed AIN-93G based experimental diets containing with 3 Ca sources; Ca carbonate, Ca citrate and organic Ca chelated with whey protein (Ca-WPS) at 2 Ca levels; normal (0.5%, w/w) and high (1.5%, w/w) for six weeks. Although intake of developed Ca-WPS did not show significant difference in weight gain, food intake, and food efficacy than control, growth of rats had increased slightly. Concentration of calcium, phosphorus and magnesium in serum were in normal range of growth. ALP activity in serum had significantly decreased compared to CaCO₃. It means that Ca-WPS had beneficial effect in bone development and metabolism. Moreover, there was no negative effect in biomarkers for liver function (GOT, GPT, and T-bilirubin) and kidney function (BUN, creatinine and uric acid). Ca-WPS showed higher bioavailability of calcium compared to CaCO₃, and increased weight and strength of femurs. In experiment two, three different levels of Ca-WPS were fed to osteoporotic model rats, induced by ovariectomy and low calcium diet for four weeks, to see the calcium bioavailability and bone metabolism. Eight week-old female rats were ovariectomized and fed low Ca diet (0.1%) for four weeks to get osteoporotic model. After then, all rats were divided into four groups and fed experimental diets containing low-CaCO₃ (0.1%; L8-CaCO₃, Control) and organic Ca chelated with whey protein (Ca-WPS) at 3 Ca levels; low (0.1%; L8-Ca-WPS), normal (0.5%; N8-Ca-WPS) and high (1.5%; H8-Ca-WPS) for four weeks. As a result, Ca-WPS fed group had significantly higher food intake and weight gain than the group fed 0.1% CaCO₃ for four weeks. Although calcium concentration in serum was slightly decreased in high Ca-WPS fed group than other groups, calcium concentration of all experimental groups were in normal range. Maintained low CaCO₃ diet resulted in increased activity of serum ALP while Ca-WPS diet resulted in significant decrease. Calcium absorption rate had increased in low Ca-WPS fed group than CaCO₃ fed group for eight weeks. It was evaluated that mineral bioavailability was increased since Ca and P were absorbed more in Ca-WPS fed group. High intake of Ca-WPS resulted in increased lumbar weight, and intake of Ca-WPS above normal range can prevent loss of lumbar weight. In conclusion, Ca-WPS proved its stability over growth, hematologic index, physiological function, and mineral, bone, and lipid metabolism in growing rat. It was evaluated that Ca-WPS was superior in Ca bioavailability than control. In osteoporotic model rats, intake of developed Ca-WPS decreased bone loss (bone weight, Ca content, bone strength, and etc) in femurs and lumbar. This result means that newly developed Ca-WPS is a good calcium supplement, in particular, in preventing and treating osteoporosis.

CONTENTS

| | | |
|--|-------|-----|
| Chapter 1. Introduction | ----- | 15 |
| Chapter 2. International and domestic trends of the technical development | ----- | 17 |
| Chapter 3. Results and discussion | ----- | 19 |
| Section 1. Investigation of organic compounds and techniques for Ca-whey protein(Ca-WPS) chelating | ----- | 19 |
| Section 2. Establishment of essential analysis methods for Ca-WPS | ----- | 33 |
| Section 3. Study of Ca-WPS Product applicability evaluation | ----- | 71 |
| Section 4. Study of manufacture process and economic analysis of Ca-WPS | ----- | 75 |
| Section 5. Commercialization of Ca-WPS (Establishment of formulation and chelating technique) | ----- | 79 |
| Section 6 Evaluation of achievement | ----- | |
| Section 7. Evaluation of Applicability of Ca-WPS under clinical trials | ----- | 82 |
| Chapter 4. Achievements and contribution to the related fields | ----- | 144 |
| Section 1. Achievement of research and development | ----- | 144 |
| Section 2. Contribution of research and development | ----- | 145 |
| Chapter 5. Application | ----- | 146 |
| Section 1. Results of study | ----- | 146 |
| Section 2. Plans for application | ----- | 147 |
| Chapter 6. International techniques | ----- | 149 |
| Chapter 7. References | ----- | 153 |

목 차

| | | |
|--|-------|-----|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 | ----- | 15 |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 | ----- | 17 |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 | ----- | 19 |
| 제 1 절 Ca-WPS개발간 필수분석법 정립 연구 | ----- | 19 |
| 제 2 절 칼슘유기태화(Ca-WPS)소재 선발 및 킬레이팅 기법연구 | ----- | 33 |
| 제 3 절 Ca-WPS의 제품적용성 평가 | ----- | 71 |
| 제 4 절 Ca-WPS대량생산방법 시스템 구축 | ----- | 75 |
| 제 5 절 Ca-WPS 제품화(제형화 및 레시피 정립) | ----- | 79 |
| 제 6 절 연구결과에 따른 업적평가(인력양성 포함) | ----- | 81 |
| 제 7 절 칼슘-유단백질 킬레이팅 유기태 칼슘제재(Ca-WPS)의 안전성, 체내 이용성 및 효능평가 | ----- | 82 |
| 제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에 기여도 | ----- | 144 |
| 제 1 절 목표달성도 | ----- | 144 |
| 제 2 절 관련분야의 기여도 | ----- | 145 |
| 제 5 장 연구개발성과 및 활용계획 | ----- | 146 |
| 제 1 절 연구결과 성과 | ----- | 146 |
| 제 2 절 연구결과 활용계획 | ----- | 147 |
| 제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술정보 | ----- | 149 |
| 제 7 장 참고문헌 | ----- | 153 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 칼슘-유단백질 킬레이팅화를 통한 고칼슘 유기태화 식품소재 개발

현재 식품산업에 사용되는 무기태 칼슘소재의 경우, 섭취량 대비 최대 40% 이내의 낮은 생체흡수율을 보이는 것으로 알려지고 있다. 또한, 대부분 독성을 보유하고 있어 필요 섭취량 및 생체흡수율(이용률)을 충족시키기 위해 과량을 사용할 수 없는 한계와 애로점을 가지고 있다.

본 과제와 관련하여 국내 칼슘부족으로 인한 골다공증 환자가 얼마나 되는지 정확한 통계수치는 없으나, 대체로 1998년 기준 약 200만명 정도의 골다공증 환자가 있고, 이중 5~10만명 정도는 골정을 일으키는 것으로 추정하고 있으며 그 발생율은 증가추세인 것으로 보고된 바 있다. 미국의 경우(1994), 전체인구의 10%인 2,500만명이 여기에 해당되고 골정환자 발생율은 해마다 150만명이 발생하는 것으로 발표된바 있다(유춘희, 2002).

국내 골건강상태는 중년이후 노인들에게서 불량해지는 것이 보통이며, 남녀 구분없이 나이가 들수록 골다공증환자의 발병률이 높아져 50세 이상의 여자들에서 25%이상, 80세이상의 경우는 누구나 해당된다고 한다(AndonMB 등, 1994).

현재 이러한 문제의 해결수단으로서 우유 관련제품(유춘희 2002, 강은주 1998) 및 자건대멸(조진호 등 2008)등의 칼슘함유량이 높은 식품섭취를 권하는 방법과 또 다른 대안으로서 무기태 칼슘제제가 첨가된 고칼슘함유 식품을 섭취토록 하고 있다(김옥희, 2002).

식품산업관련 미네랄 소재 및 제품개발은 법적의 규제에 있어 화학원료 및 제조법의 사용이 엄격히 제한되기 때문에 제조규정에 따른 연구개발에 어려움을 가지고 있다.

본 연구에서는 이러한 문제를 회피하기 위한 일환으로 우유 및 유청단백질의 특성에 주목하였는데, 이들의 복합적 특성을 활용하여 무기태 칼슘을 단백질내 킬레이팅화 함으로서 최종 유기태화 칼슘소재로의 개발근거로 삼았다.

첫째로, 유청단백질인 β -lactoglobulin은 60°C이상의 열처리시 열변성이 일어나는데, 가열온도가 높을수록 κ -casein 또는 α -lactoalbumine과 함께 복합체를 형성하는 것으로 보고된 바 있다(Zittle 등 1962). 이는 단백질간 복합체 형성시는 관련 기능이 증가됨으로서 발생하는 것으로 인지되었으므로 이를 본 연구간 킬레이팅 인자로 활용하였다.

둘째로, 유청내 용해성 칼슘은 인산 또는 변성된 단백질과 결합하여 casein micelles안으로 이동하면서 콜로이드상 칼슘으로 전변(conversion)된다고 보고된 바 있다(김영찬, 1983). 이는 콜로이드상 칼슘을 안전하게 고형화 할 수 있는 방안을 고려하게 되었다. 즉, 유단백질내 인산에 칼슘이 고함량으로 안정되게 결합되게 할 수 있는 기능성 인자가 많이 존재함을 생각할 수 있었다.

따라서, 관련 기능기 및 열처리조건 탐구를 통하여 이들을 극대화하면 미네랄을 추가적으로 킬레이팅화 반응이 가능할 것이라는 가설을 설정하게 되었다.

셋째로, 우유를 열처리 전/후(저온 및 고온) 실험동물에게 섭취시켰을 때, 섭취량 대비 우유 단백질과 칼슘의 영양가는 열처리로 인하여 저하되지 않았으며, 오히려 단백질과 칼슘의 이용성이 증대되었다는 보고가 있다(이정아 1995).

이는 유기태화-칼슘제조 후 섭취시 기질단백질과 동시에 칼슘이 고효율로 체내흡수되므

로서 영양가 및 체내이용성이 증대할 것이고, 이는 성장기 및 노인식 관련 기능성 소재로서 개발이 가능할 것이라 가정하였다.

결국, 상기 문제점을 해결하기 위한 방안으로, 무기태 칼슘의 단점을 해결할 수 있는 대안으로서 칼슘-유기태화 제제 개발을 통하여 최종 칼슘부족에 따른 성장기 및 폐경기 이후 골다공증 등의 노인관련 질병발생 메카니즘 요구성을 해결코 저 하였다.

2. 칼슘- 유단백질 킬레이팅 유기태 칼슘제제의 안전성, 체내이용성 및 효능평가

2008년 국민건강영양조사³⁾에 의하면, 칼슘 섭취량은 전 연령층에서 권장량 대비 평균 섭취량이 부족한 상태이며, 성인 남녀의 칼슘 권장량은 700mg이나 섭취율은 기준대비 65.7% 정도이며, 최대 골질량 형성을 위해 칼슘 섭취가 높아야 할 청소년기의 칼슘 섭취량은 권장량 대비 50% 수준으로 나타났다. 지속적인 칼슘 섭취의 부족은 결국 성인기의 최대 골밀도를 낮추고, 성장기 아동의 골격과 치아의 석회화에 영향을 주어, 성장저하 및 구루병을 초래하며, 결국 노년기 골다공증 빈도를 증가시킨다⁴⁾.

칼슘이 기능성 식품으로서 권장되기 위해서는 소장 내에서 흡수율이 높아야 하나, 칼슘은 흡수율이 높지 않은 영양소로 칼슘의 형태 및 섭취량뿐만 아니라 유전적, 생리적 조건에 따라 변할 수 있으며, 일반적으로 성인의 칼슘 흡수율은 25~30% 수준으로 알려져 있다⁵⁾.

칼슘은 식품을 통해 섭취하는 것이 가장 바람직하나⁶⁾, 우리나라 식습관상 유제품의 섭취가 높지 않고, 칼슘 급원식품으로 식물성 식품에 의존도가 높아 섭취기준을 충족시키지 못하는 실정이다⁷⁾⁸⁾ 현재 가장 많이 칼슘 보충제로 이용되고 있는 탄산칼슘은 칼슘의 함유율은 높으나 흡수율이 낮으나 구연산칼슘은 칼슘의 함유율은 낮으나 흡수율이 높아 칼슘보충제로서의 효과가 더 높다고 알려져 있다.

또한 단백질의 가수분해물인 oligopeptide나 칼슘이 결합된 수용성 칼슘 형태인 CPP(casein phosphopeptide)가 소장내 칼슘의 가용화를 촉진시키는 물질로 알려져 있다⁹⁾. Ashmed등¹⁰⁾은 칼슘염이 아미노산과 킬레이션된 칼슘이 소장내에서 흡수될 때 킬레이션된 칼슘이 수용성 상태가 되어 흡수가 더 우수함이 보고하였다.

이러한 상기 내용을 바탕으로 유기태 칼슘의 소재에 대한 연구가 진행되어 왔으며, Choi¹¹⁾는 대두 펩타이드와 칼슘이 킬레이션된 칼슘보충제가 인과 불용성염을 형성하지 않고 소장세포내로 흡수되는 것을 확인하였다. Ken 등¹²⁾은 우유의 유청단백질이 파골세포(osteoclast)의 형성과 뼈의 재흡수를 억제하고, 난소 절제된 쥐에서 뼈의 강도를 증가시켜 골격대사에 영향을 준다는 결과를 제시하였다. 따라서 유청 단백질과 칼슘이 킬레이션된 유기태 칼슘이 무기염인 탄산칼슘보다 체내 이용성 및 골격 대사에 미치는 효과가 더 높을 것으로 예상되었다.

따라서, 실험동물을 성장기 및 폐경기이후(골다공증 발생) 단계로 구분하고, 무기태 칼슘소재(CaCl, CaCO₃) 대비 개발 Ca-WPS제제가 장단기 섭취시 안전성, 체내흡수율, 골형성 및 골다공증예방 및 치료 관련 메카니즘을 검토하고자 하였다. 결과를 토대로 제형레시피를 확립 및 실용화(제품화)에 최종 목적을 두었다. 동물임상 검정은 성장기 섭취에 따른 안전성, 체내 흡수효율 및 골생성 부분으로 구분하여 검정하였으며, 골다공증예방 및 치료효과 실험 및 제품개발에 있어 기초결과로 활용하고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 낙농산업 현황

- 가. 선진 낙농국의 원유 및 관련 유제품의 국내 가격경쟁력은 약 1/2~1/3수준임에 따라 농축산물 FTA와 시장개방에 속도에 따라 국내 낙농산업은 비례하여 피해(낙농분야 : 416~594억원)가 증가될 것임.
- 나. 낙농제품 수출입 현황으로, '07년 무역적자는 약 2억\$[수출 :13천톤(42,241천\$), 총수입량 : 72천톤(233,951천\$)]에 달함.
- 다. 현재 국내 낙농업 현황으로서, 낙농산업 총생산액('07)은 1조 6천억원이고, 젖소사육두수는 점차 감소하고 있으나 규모화 및 젖소두당 산유량 증가로 원유와 더불어 분유류의 재고량이 동시에 급격히 증가되고 있음.
- 라. 현재 국내 낙농산업의 주요 이슈는, 총체적인 고민거리인 잉여 원유('07 기말재고량 : 141천톤)의 안정적인 소비방법을 확보하는 것인데, 생산자는 정부에 전적으로 대책을 의존하고 있으며, 정부 또한 뚜렷한 대안(공급 및 가격관리, 유통 및 품질관리, 소비촉진과 신규 유제품개발)이 없어 결국 국내 낙농산업의 총체적인 피해로 연결되고 있음.

2. 국내 연구인력 현황

- 가. 시장전망에 대한 불확실성으로 극소수 연구자만의 산업화가 배제된 단편적 연구 활동에 치중하고 있음. 또한, 인력공급의 핵심인, 낙농 관련 대학/학과 등 관련분야의 축소 및 폐지 등으로 연구인력 인프라는 점차적으로 축소되고 있음.
- 나. 제조업체의 가격경쟁력 저하로 수입원료 대체 등으로 전반적인 취약성이 증가일로에 있음.
- 다. 기존의 단편적인 연구개발과정을 통합연구개발시스템을 통한 첨단화 소재개발로 가격 경쟁력 확보 및 소비시장의 확대, 고부가가치 제품으로서 응용 및 용도/용법 확대에 필요성에 대하여는 절실히 공감하고 있음.
- 라. 본 연구와 관련된 전문연구원, 연구센터 설립 및 검토 부분은 현재 까지 없음[근거:국가과학기술정보서비스(NTIS), 범부처 국가 R&D현황, 2001~2008]

3. 국내외 관련연구의 현황

- 가. 우유유래 원부자재에 한정되는 소재 제조와 제품생산에 치중하고 있으며, 산업화(대량소비)에 치중되는 기초소재에 주안점을 둔 단편적 연구가 학교(학회)주관으로 수행되고 있음.
- 나. 최근 연구경향은, 우유유래의 소재의 효용가치와 첨단화 개발 요구성이 매우 높음에 따라 기능성(흡수증진형 가수분해물 등, 면역증강형 인지질 등) 연구와 제품개발도 동일한 컨셉에 맞추어지고 있음.
- 다. 본 과제와 관련한 예상되는 주요경쟁국은 낙농선진국인 호주와 뉴질랜드, 미국, 덴마크 및 일본 순이 될 것임.

4. 국내외 관련 농산업의 기술 기반 수준

- 가. 유제품 제조산업의 경우, 기 준비된 기초 원부자재를 구입 및 이를 배합하여 제품화 단계에 맞추어 전체적인 연구개발도 여기에 따라가고 있음.

- 나. 신소재 연구개발 및 산업화에 있어서, 제조시설은 기본 분유제조공정(집유->농축(탈지)->분말]이 필요하며, 소재별 구분에 따른 제조는 추가적으로 별도 시설 및 자금이 막대히 소요되기 때문에 영세 제조업체가 이를 산업화 하기에는 곤란하기 때문에 설사 의지가 있다 하더라도 실천이 어려움.
- 다. 이를 대비하기 위한 국내 낙농업의 기술 및 기반시설을 확보하기 위하여, 정부는 시장의 확대를 통한 안정화 도모(수급관리 및 시장원리 순응 가격결정), 생산성 향상(경영규모화 및 선진화, 젖소개량, 조사료 생산기반 확충)과 우수소비기반 확대(홍보, 학교급식확대) 그리고 소비자 신뢰확보(원유 품질향상 및 안전성 확보) 및, 신규 유제품개발(고부가가치 기능성 우유, 유당 및 유지방 함량에 따른 다양성 있는 시유 제품개발)등 현안문제 해결과 기술기반 확충과는 거리가 멀다 할 수 있음.

5. 칼슘(골다공증) 시장현황

가. 본 연구개발 제제(Ca-WPS) 개발관련 시장성 및 개발현황은 없음.

나. 골다공증 시장전망

골다공증은 뼈 퇴행성질환이며, 골밀도가 감소하고 그에 대한 질적인 변화로 인해 뼈의 강도가 약해져서 골절이 일어날 가능성이 높은 상태이며, 골다공증 시장은 빠른 성장률(CAGR 2.1%)을 보이지 않지만 지속적으로 성장할 전망으로 평가되고 있음. 이는 주요 특허 만기 후에도 전지역적으로 시장이 확대될 것으로 예상되어 매출은 계속 늘어날 전망이다.(Datamonitor, "Commercial Insight: Osteoporosis "(2010.11.).

다. 년도별 시장현황

- 1) 2005 ~ 2009년 현황: '07년 주요 7개 국가(미국, 일본, 5EU)의 골다공증 시장규모는 76억 달러로 최고에 이르렀으며, '09년에는 69억 달러 매출규모를 달성하였으며, 05~'09년 사이 연평균성장률(CAGR)은 2%로 나타나고 있으며, 미국과 유럽에서 가장 보편적인 골다공증 의약품인 alendronate 제네릭 출시로 '08년 매출규모가 8.7% 감소하였음.
- 2) 2010 ~ 2011년 전망 : '10년을 시작으로 골다공증 시장은 특히 미국과 유럽에서 계속 성장할 것으로 예상되고 있으며, 단일클론항체 Prolia(denosumab, Amgen/GlaxoSmithKline)의 출시로 '12년에는 75억달러로 성장할 것으로 전망되고 있음.
- 3) 2012 ~ 2014년 전망 : '12년부터 제네릭의 출시로 골다공증 시장 규모가 감소할 것으로 예측되고, '14년의 매출규모는 70억 달러로 성장할 것으로 전망되나 '11년의 매출규모(76억 달러)에 비해서는 6.3% 감소한 규모가 될 것으로 예측되고 있음.
- 4) 2015 ~ 2019년 전망 : '15년에는 몇몇의 anabolic 치료제가 새로운 시장을 열어 '19년까지 성장세를 지속할 것으로 예상되고, anabolic 치료제로 인해 19년 골다공증 시장의 매출규모는 85억 달러에 도달할 것으로 전망됨

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 필수분석법 정립연구

1. 연구목적

현재 식품산업에 사용되는 무기태 칼슘소재의 경우, 섭취량 대비 낮은 생체흡수율등 비효율적인 특성을 보이는 것으로 알려지고 있다. 또한, 대부분 독성을 보유하고 있어 필요 섭취량 및 생체흡수율(이용률)를 충족시키기 위해 과량을 사용할 수 없는 한계와 애로점을 가지고 있다고 보고 되고 있다.

본 연구는 식품업계에서 기존 사용하고 있는 무기태화 칼슘소재의 단점을 킬레이팅 기법을 도입한 유기태화 방법으로 해결하고자 하였다. 따라서, 기질 유단백질과 무기태 칼슘간 유기태화 제제 개발은 이제까지의 연구개발과는 다른차원의 목표와 수단이 적용됨에 따라 칼슘 반응전/후의 변화확인을 위한 분석방법 정립은 절대적으로 필요하다 할 수 있다.

본 연구간 정립하고자 하는 분석법은, 영양성분 분석(당류, 단백질류, 지방류, 유기산류, 미네랄류 등), 유기태화 제제 개발간 분자량 변화량 확인 분석, 유기태화 반응에 있어 주요한 관련 기능기 확인분석 (FT-IR 분석), 잉여칼슘 및 독성음이온 제거에 따른 효율검정을 위한 분석법(IC분석)과 최종적으로 유기태화 제제(Ca-WPS)제제내 칼슘과 단백질의 결합구조 및 성상 분석(X-선회절분석)에 관한 연계된 일련의 분석법을 전체적으로 정립함으로써 개발제제의 특성을 구명하고자 하였다.

2. 연구수행방법

가. HPLC분석 (당류)

1) 연구수행방법

당류분석 위한 HPLC시스템 및 조건은 표1. 과 같으며, 기본적으로는 식품공전(제10 일반시험법, 5)탄수화물, 2009)에 준하여 실시하였다. 최저검출한계검정은 1%(w/v) 당류(5종, Lactose, Galactose, Glucose, Fructose, Sucrose)를 표준체로 하였는데, 측정간 농도는 당류별 5,000ppm, 10,000ppm, 100ppm, 10ppm, 1ppm 및 0.1ppm희석하여 사용하였다. 검출효율검정은 멸균유내 표준체별 100ppm을 첨가한 후 역시 식품공전법에 준하여 실시하였다.

2) 결과

1) 당류별 최저 검출한계는 10ppm이상이었다(표 2, 그림 1).

2) 당류별 검출효율은 92~108%범위로 조사되어 유의성이 인정되었다(표 2, 그림 2).

결과로서, 본 연구개발간 필수적으로 필요한 당류분석방법은 정립되었다(표2).

표1. HPLC 분석시스템 및 분석조건

| 분석시스템 구성 (Agilent HPLC) | 분석조건 |
|------------------------------|--|
| . Degasser : Model G1322A | .Column : Carbohydrate (5um,4.6 x 150mm) |
| . QuatPump : Model G1311A | . Mobile Phase :ACN(75):ddH ₂ O(25) |
| Autosampler:Model G1313A | .Flow Rate:1.0ml/min. |
| . Detector (RI):Model G1365B | .Column Temp. : 35℃ |
| . Detector (RI):Model G1365B | .Injection Vol.: 20ul |

표2. 검출한계 및 검출효율 검정결과

| 표준체별 조성내역 | 최저검출한계 (ppm) | 검출효율 (%) |
|-----------|-----------------|-------------|
| Lactose | 10 | 108 |
| Galactose | 10 | 97.9 |
| Glucose | 10 | 92.5 |
| Fructose | 10 | 105 |
| Sucrose | 10 | 92.2 |

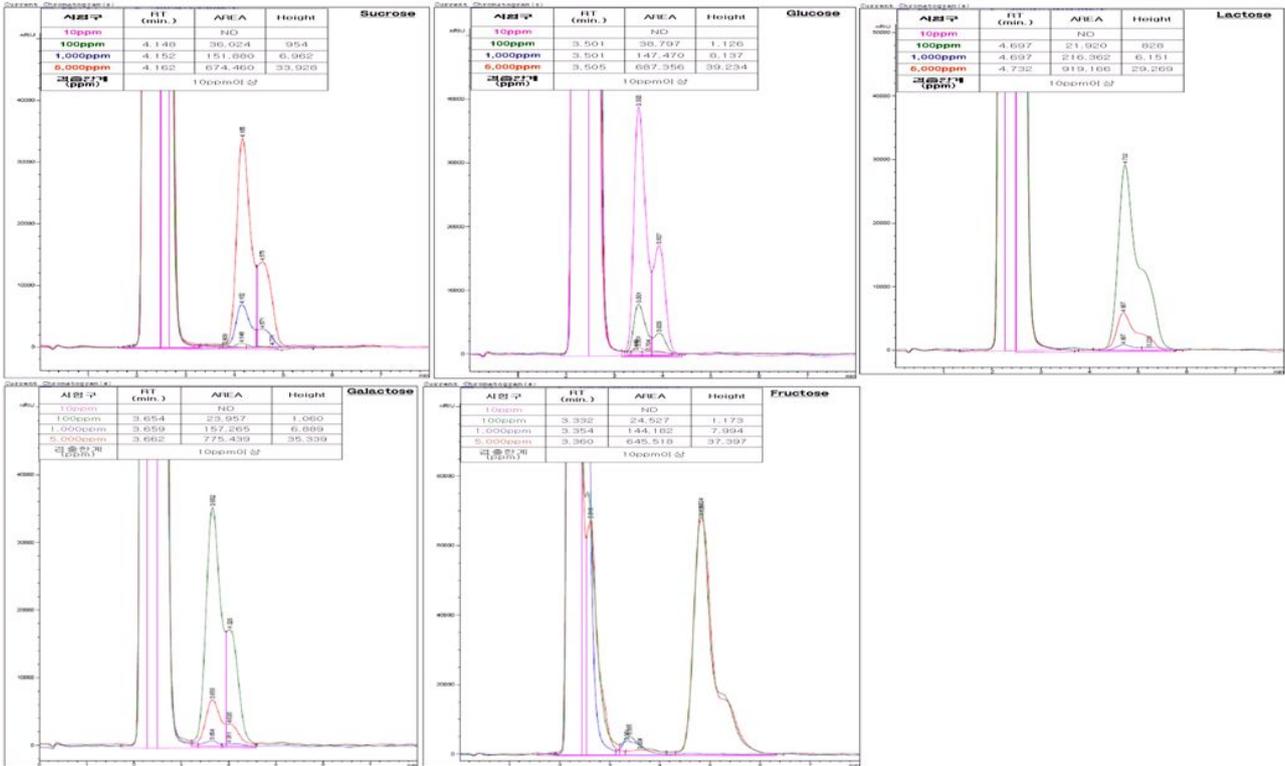


그림 1. 당류 분석법 정립을 위한 당류별 최저검출한계 검정(Peak analysis) 결과

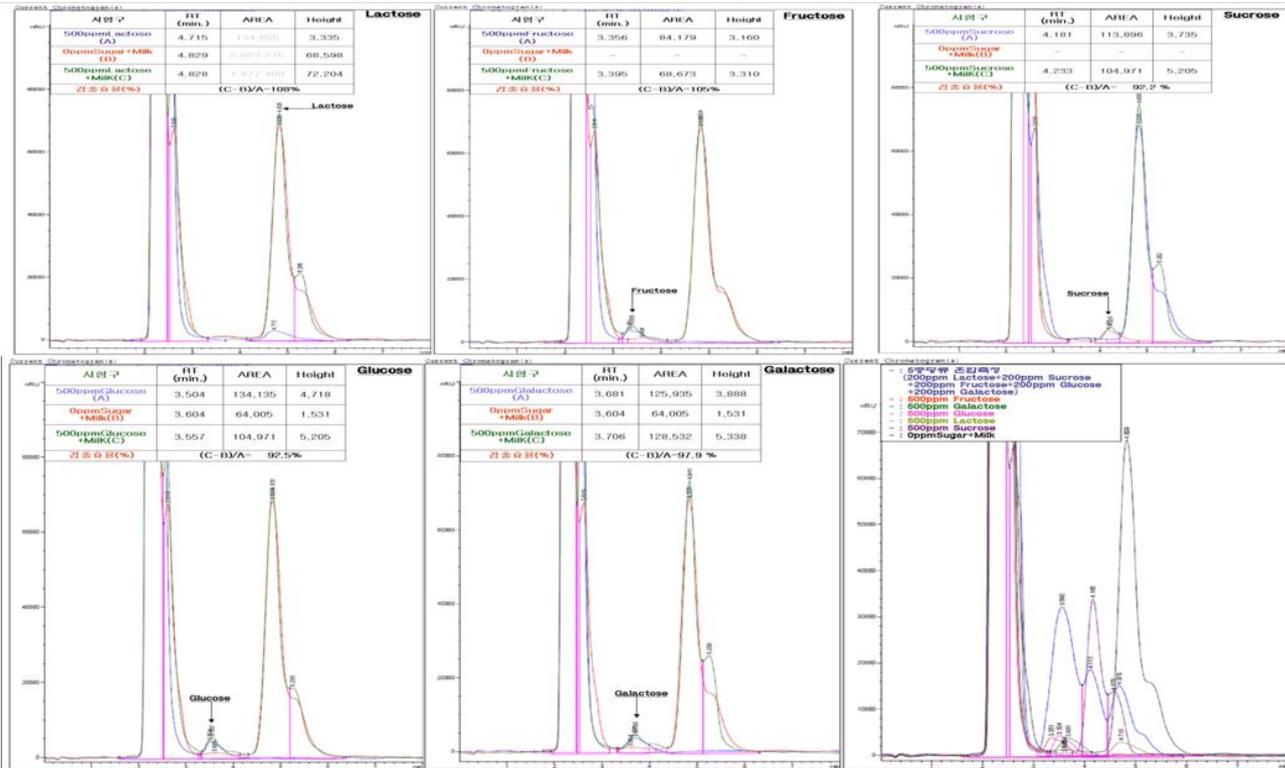


그림 2. 당류 분석법 정립을 위한 당류별 최저검출효율 검정(Peak analysis) 결과

나. HPLC 분석(유기산류)

1) 연구수행방법

유기산류 분석 또한 HPLC분석법을 적용하여 실시하였다(표 3.). 과 같으며 시료로 유기산 대표 표준체 9종을 선별하여, 측정 간 1,000ppm의 Stock solution을 준비하여 희석하여 사용하였다.

분석법 정립 시 적용 유기산은 Tartaric acid(Sigma, USA), DL-Malic acid(Junsei, Japan)을 사용하였으며, 표준체는 표 4.와 같다.

2) 결과

본 연구간 선발칼슘의 킬레이팅 반응을 위한 기질로서 유청단백질을 사용하였는데, 이에 따라서, 유청단백질의 생산을 위한 치즈제조간 사용되는 유기산과 미생물 번식에 의하여 야기될 수 있는 단백질의 변성 등의 영향을 평가하기 위하여 유기산 분석법을 정립하였다.

결과로서, 유기산에 분석을 위한 HPLC(Aminex 컬럼)분석법이 정립되었고, 분석대상 유기산 9종을 대상으로 실시한 검출한계는 1ppm이상이었다.(Fig 3). 또한, 유기산 검출효율은 81~114%범위로 조사되어 유의성이 인정되었다(그림 3-4).

표 3. HPLC 분석시스템 및 분석조건

| 분석시스템 구성 (Agilent HPLC) | 분석조건 |
|-----------------------------|--|
| . Degasser : Model G1322A | .Column : AMINEX HPX-87 (300mm x 7.8mm) |
| . QuatPump : Model G1311A | . Mobile Phase :10mM H2SO4 |
| . Autosampler:Model G1313A | .Flow Rate:1.0ml/min. |
| . Detector(RI):Model G1365B | .Column Temp. : 35℃ |
| . Detector(RI):Model G1365B | .Injection Vol.: 20ul |
| | .Detection(UV): 210nm |

표 4. 유기산 대표표준체 함유량 및 제조사

| 표준체명(9종, 함유량) | 제조사명 |
|--|-------------------------------------|
| 1. Sodium Oxalate(0.8umol) | Organic Acid Standard(Bio-RAD(USA)) |
| 2. Sodium Citrate(4.0umol) | |
| 3. Sodium Malate(8.0umol) | |
| 4. Sodium Succinate(20.0umol) | |
| 5. Sodium Formate(20.0umol) | |
| 6. Sodium Acetate(40.0umol) | |
| 7. Tartaric acid(C ₄ H ₆ O ₆ .H ₂ O) | SAMCHUN(KOREA) |
| 8. D-Lactic acid | GmBH(Germany) |
| 9. L-Lactic Acid | GmBH(Germany) |

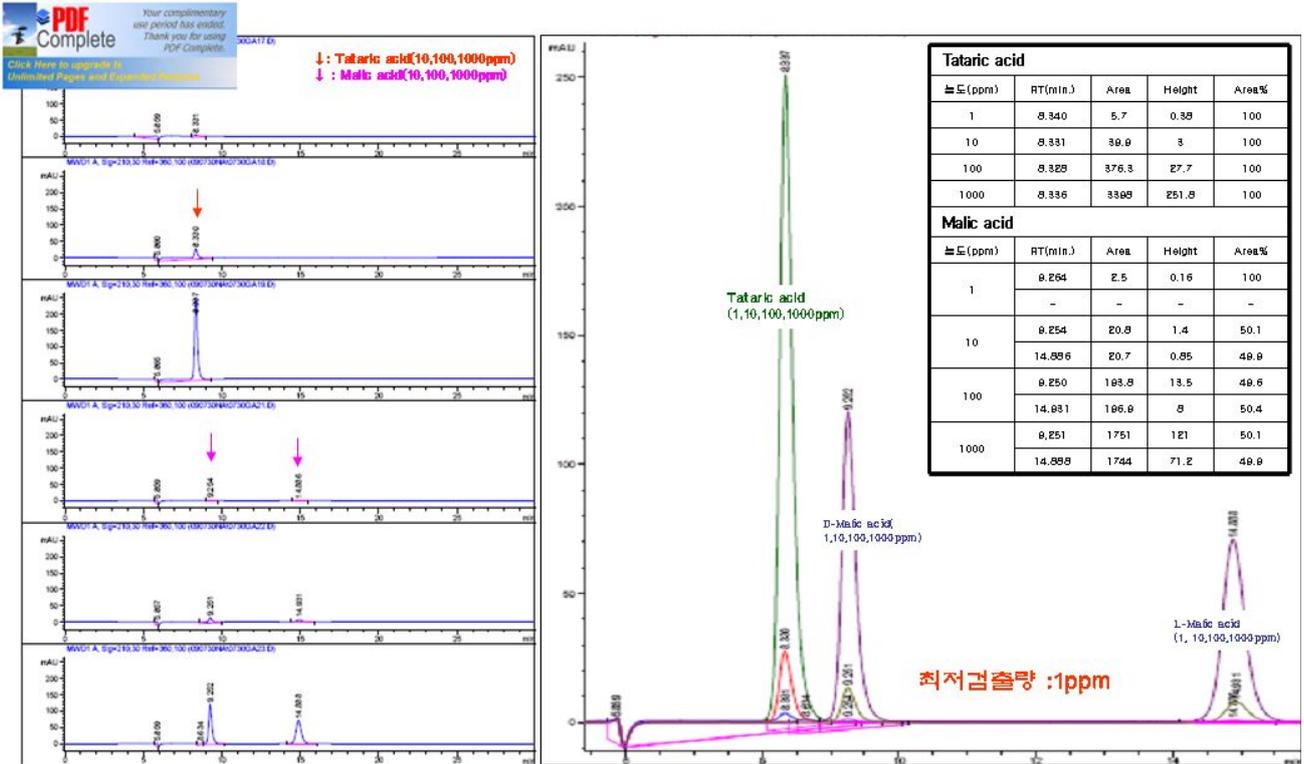


그림 3 . 유기산 분석법 정립을 위한 유기산별 최저검출한계 검정(Peak analysis)결과

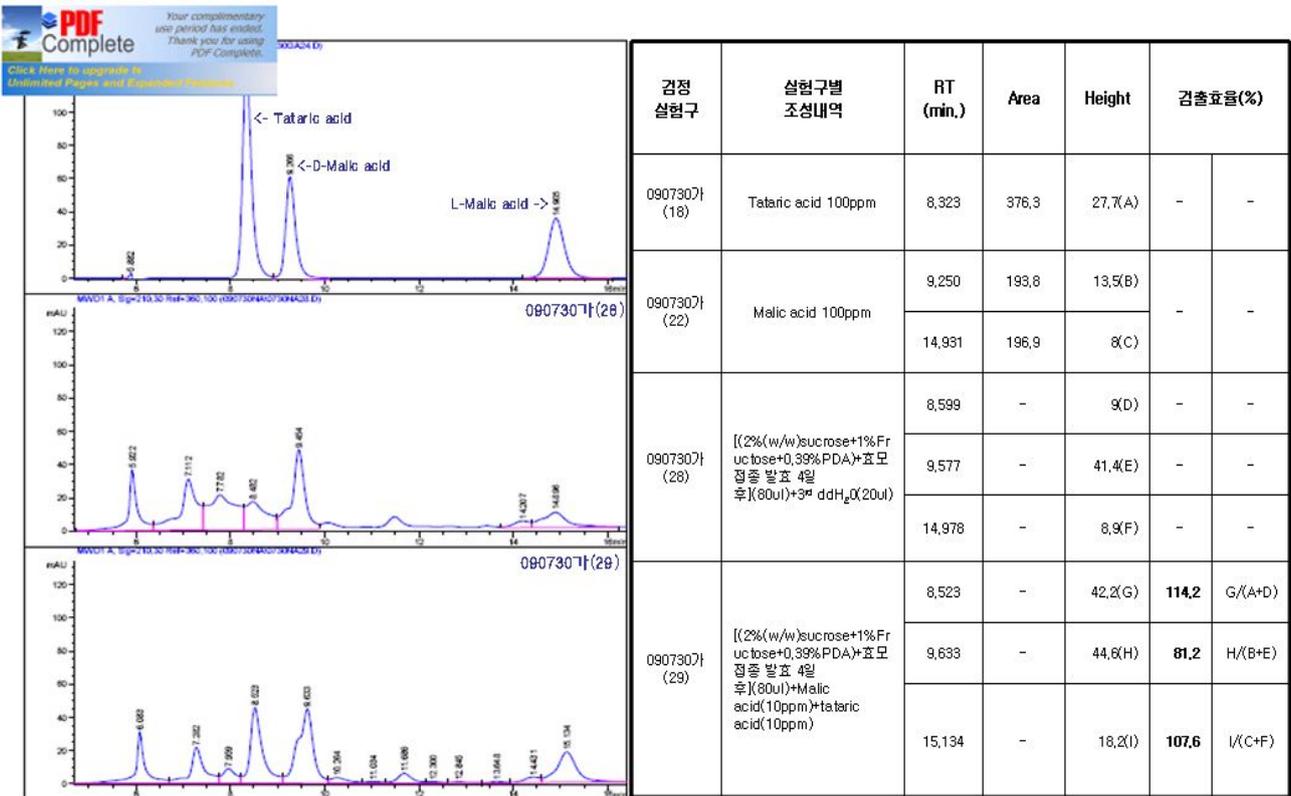


그림 4 . 유기산 분석법 정립을 위한 유기산별 최저검출효율 검정(Peak analysis)결과

다. ICP 분석(미네럴)

1) 연구수행방법

영양성분 분석법 중 미네럴류는 ICP분석법을 적용(ICP-OES시스템, 모델 : Optima 5300DV, Perkin Elmer사, USA) 실시하였으며, 기본분석법은 식품공전(제10 일반시험법, 10)칼슘, 2009)에 준하여 실시하였다.

연구간 사용할 ICP분석기기의 최저검출효율 및 검출한계는 기본적으로 사용하는 ICP분석용 표준용액을 사용하였다.

최저검출효율 및 검출한계를 검정하기 위하여 ICP표준 용액 중 Ca, Fe 및 Mg3종을 선발하여 이들 용액을 0.01ppm, 0.1ppm, 1.0ppm 그리고 10ppm까지 농도별로 조성한 후 이를 시료로 사용하였다.

시료전처리는 마이크로웨이브 시스템 병행적용 하였다. 즉, 분석샘플에서 분취(0.5g)를 하여 가수분해용액 첨가 (70% HNO₃ 7ml+H₂O₂ 1ml)하고 유기물제거(마이크로웨이브 시스템, 190°C 20min)과정을 거치고 Mass-Up(2% HNO₃ 용액첨가, 최종50ml로 조절)통해 ICP 샘플별 3반복 측정하여 결과도출(평균±표준편차)을 하였다.

2) 결과확인

검정방법으로는 우선 조성된 검정용액으로 ICP시스템의 표준검량선을 작성한 후, 이를 시료로 재측정 하므로써 분석시스템의 최저검출한계(ppm) 및 측정효율(%) 비교하였다.

3) 결론

- 1) 3종의 표준시료(Ca, Fe, Mg)에 대하여 측정시, 최저검출한계는 0.10ppm이상였다.
- 2) 검출효율은 전체 표준시료에서 97~109%범위를 보여 유의성이 인정되었다.
- 3) 미네럴별 검출농도는 다른 것으로 나타나 미량인 경우는 표준용액 범위를 조절하여 측정함으로써 검출오차를 줄여야 한다고 판단되었다.
- 4) 결과로서, 본 연구개발간 필수적으로 필요한 미네럴 분석방법은 정립 되었다(표 5).

표 5. ICP분석법 정립을 위한 미네럴별 최저검출효율 및 검출한계 측정결과

| ICP분석법정립용 표준용액(ppm) | Ca | | Fe | | Mg | |
|------------------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
| | 최저검출한계 (ppm) | 검출효율 (%) | 최저검출한계 (ppm) | 검출효율 (%) | 최저검출한계 (ppm) | 검출효율 (%) |
| 0.01 | ND | - | ND | - | ND | - |
| 0.10 | 0.097 | 79 | 0.109 | 109 | 0.108 | 108 |
| 1.0 | 1.049 | 105 | 1.010 | 101 | 1.096 | 109 |
| 10.0 | 10.66 | 106 | 10.44 | 104 | 10.55 | 105 |

라. FPLC(Peptide, GPC) 분석

1) 연구수행방법

칼슘-유기태화 제조간 기질단백질의 분자량 변화 검정을 위한 FPLC분석시스템 및 분석조건은 표 6과 같다. 시험간 표준체로서는 저분자부터 고분자까지 분자량을 보유하고 있는 FPLC Calibration kit를 시험간 사용하였다(표 7).

표준체 시료는 가장 낮은 분자량인 Mw 209인 NAG(N-acetyl glucosamine. 1당체), 분자량이 1,355인 Vitamine B12, Aprotinin(Mw 6,500) Chtochromec(Mw 12,384), Ribonuclease-A(Mw 13,700), Ovalbumin(Mw 43,000), Conalbumin(Mw 75,000), Aldolase(Mw 158,000) 그리고 가장 높은 분자량 수치를 보유한 Myosin(Mw 212,000) 까지 9종을 대상으로 검량선을 작성하였다.

2) 결과확인

본 연구간 칼슘-유기태화 제조간 기질단백질의 분자량 변화 검정은 저분자부터 고분자까지 분자량별 표준체별로 FPLC 측정을 통하여 분자량별 검출시간을 측정하였으며, 이를 기준으로 검출식을 분자량 대비 시간으로 각각 작성하였다. 이를 기준으로 최종 칼슘 유기태화 체제 개발간 분자량변화가 예상되는 시료를 검출식에 대입하여 결과를 확인하였다.

또한, 검량식 대비 동일 분자량의 표준체를 재측정하여 검출효율 측정을 통하여 검량식의 측정효율을 재확인하였다.

3) 결과

표준체를 이용한 FPLC(Peptide, GPC)를 통해 분자량을 기준으로 작성한 검량식은 $y=5616.7x^2-31422x+37263$, 검출시간을 기준으로 작성한 검정식으로는 $y=5616.7x^2-31422x+37263$ 을 정립 완료하였다.

또한, 정립된 검량식 대비 동일 분자량의 표준체를 재측정하여 분자량을 확인시 검출효율은 95~112%의 범위로 나타나 검량식은 정립되었음을 확인하였다.

표 6. 칼슘-유기태화 제조간 기질단백질의 분자량 변화 검정을 위한 FPLC분석시스템 및 분석조건

| FPLC 분석시스템 및 분석조건 |
|--|
| 1. 시스템(AKTA, 스웨덴) : UPC900 +D920+CU950 |
| 2. 운용조건 |
| 가. column(Temp.) : Superdex Pep 10/300GL(35' C) |
| 나. Mobile Phase : Phosphate buffer (50mM Na ₂ HPO ₄ +150mM NaCl+ddH ₂ O 1L) |
| 다. Flow rate : 0.5ml/min. |
| 라. Press : 0.84PSI |
| 마. injection volumn: 100ul(시료 1%용액) |
| 3. 표준체 : FPLC Calibration kit |

표 7. 기질단백질의 분자량 변화 검정용 표준체 내역

| 표준체명 | 분자량 | 비고 |
|----------------|---------|----------------------|
| NAG | 209 | N-acetyl glucosamine |
| Vitamine B12 | 1,355 | Sigma |
| Aprotinin | 6,500 | FPLC Calibration kit |
| Chtochromec | 12,384 | " |
| Ribonuclease-A | 13,700 | " |
| Ovalbumin | 43,000 | " |
| Conalbumin | 75,000 | " |
| Aldolase | 158,000 | " |
| Myosin | 212,000 | " |

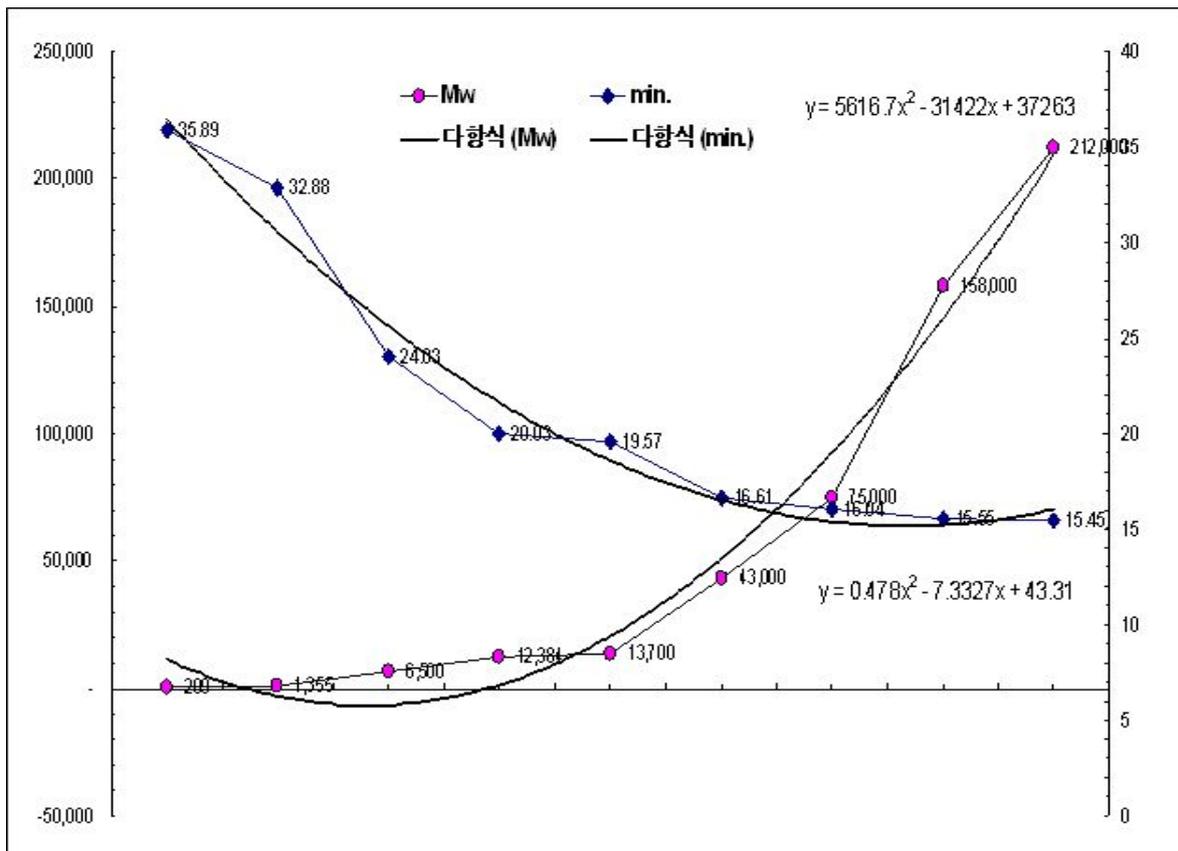


그림 5. 칼슘-유기태화 제조간 기질단백질의 분자량 검정을 위한 FPLC Calibration 작성결과 및 검정식 정립결과

마. FT-IR 분석

1) 연구수행방법

본 연구간 내열성 보유 유단백질인 WPI를 기준으로 미네랄 킬레이팅에 관련한 기능기 확인이 필요하여 FT-IR분석을 통한 킬레이팅 기능기 분석법을 정립하고 저 하였다.

분석간 사용기기는 Bruker Optics IFS66/S기종, 4,000~600Cm⁻¹/Resol 이었으며, 분석 샘플은 KBr-Pellet Disc법에 의해 준비되었으며 실험구 내역 및 분석방법은 표 8.과 같다.

2) 결과

가) 정립 분석법은 FT-IR분석법에 의하여 정립되었다.

나) 정립된 분석법에 의한 분석 결과 Ca의 경우는 이온화 후 유 단백질내 치환 가능 기능기중 (-NH₂, -COOH) -COOH기와 결합하는 것으로 확인되었다(그림 6).

다) 제법에 따라 유단백질 보유기능기중 Ca이온과 결합되는 기능기 극대화 방법(처리구1.) 정립을 완료하였다(그림 6).

라) 정립된 FT-IR분석법을 통하여 내열성 보유 유단백질인 유청분말(아산공장, 유효기간 : 2010.02.03)를 기준으로 미네랄 킬레이팅 도입량별 기능기 확인을 완료하였다.

마) 제법에 따라 칼슘함량 동시증대 및 이중 미네랄의 킬레이팅 기능기 극대화 효과를 확인 정립하였다.(그림 6.) 결과로서 본 연구개발간 필수적으로 필요한 미네랄 킬레이팅에 관련한 기능기 확인을 FT-IR분석을 통한 킬레이팅 기능기 분석법이 정립되었다.

표 8. 기질단백질(WPI) 대비 칼슘 킬레이팅 관련 기능기 검정을 위한 시험조성내역

| 실험구 | 시험조성내역 | 비 고 |
|-------|---|-----|
| 대조구 | 20%CaCl ₂ (정제수 180g+CaCl ₂ 70g) 제조 후 20%CaCl ₂ 100g분취하여 동결건조 후 FT-IR분석(KBr-Pellet Disc법) | |
| 비교구 | 정제수 90dp WPI(Arla Co.,) 10g만을 첨가하여 동결건조 후 FT-IR분석(KBr-Pellet Disc법) | |
| 처리구-1 | WPI(Arla Co., Lot No.: S090213) 10g과 CaCl ₂ 13.23g을 먼저 혼합후 정제수 90g을 추가첨가하여 용해후 동결건조 시켜 FT-IR분석(KBr-Pellet Disc법) | |
| 처리구-2 | 정제수 90g에 CaCl ₂ 1.32g을 녹인 후 WPI(Arla Co., Lot No.: S090213)10g을 첨가하여 반응 시킨 후 동결건조 시켜FT-IR분석(KBr-Pellet Disc법) | |

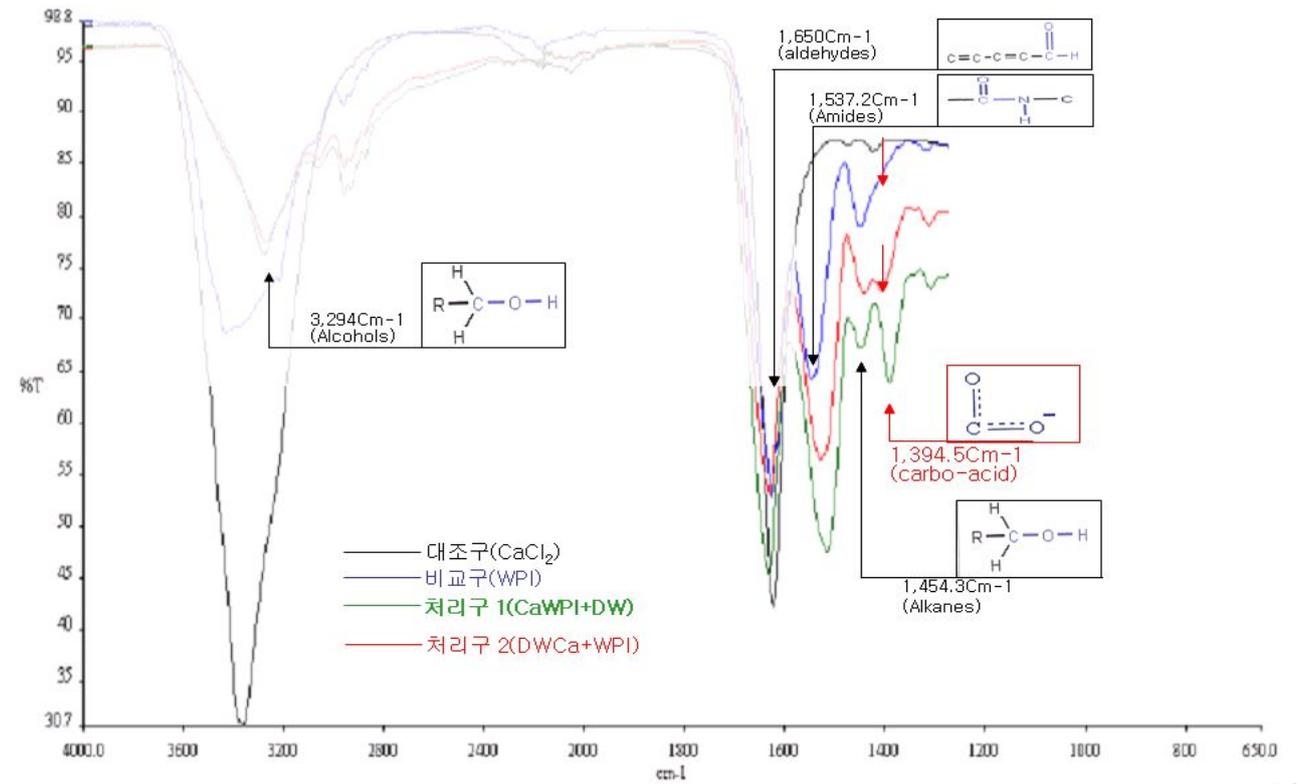


그림 6. 유단백질 보유 기능기중 Ca이온과 결합되는 활성 기능기 판단(↓)을 위한 FT-IR Peak analysis결과

바. X-선 회절분석

1) 연구수행방법

칼슘-유기태화 제조간 대조구 WPS 분말과 함께 유기태화 칼슘 함유 유단백질 분말 (Ca-WPS)의 칼슘의 결합 형태와 킬레이팅 구조를 분석을 위해 X-선회절분석방법(XRD분석)시스템이 사용되었다. 분석조건을 정립하기 위한 시료는 다음과 같이 준비하였다.

대조구(WPS)로서는, 유청분말(매일유업) 50g을 정제수 300ml에 용해한 후 상온조건에서 30분동안 교반(150rpm)하였다. 그리고, 원심분리(10,000rpm, 15°C, 15분)후 동결건조 처리하였다. 처리구(Ca-WPS)로서는 유청분말 50g 대비 CaCl₂·2H₂O 30g을 혼합한 후 정제수 300ml에 용해한 후 89°C조건하에서 30분동안 교반(150rpm)처리하였다. 그리고, 이를 원심분리(10,000rpm, 15°C, 15분)하고 침전물만을 대상으로 다시 멸균수 200ml를 첨가하여 현탁한 후 5회 반복 세척처리 과정을 거쳐 동결건조 처리하였다.

2) 결과 확인

동결처리된 시험구별(WPS, Ca-WPS) 시료는 XRD 분석을 통하여 기질단백질과 칼슘의 킬레이팅 반응에 따른 구조분석을 실시하였다. 분석은 Powder XRD 분석시스템(모델: D8-FOCUS, BURKER사, USA)을 이용하였으며, 권장방법에 의하여 결과를 확인하였다.

3) 결과

유기태 칼슘의 결합 형태는 칼슘 포타슘 포스페이트 하이드레이트(Calcium Potassium Phosphate Hydrate [Ca₂K₂(P₆O₁₈)6(H₂O)]), 칼슘 하이드로젠 포스페이트 하이드레이트(Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate [Ca₈H₂(PO₄)6H₂O]), 아나파이트 (Anapaite [Ca₂Fe+2(PO₄)2H₂O]), 포타슘 칼슘 하이드로젠 포스페이트(Potassium Calcium Hydrogen Phosphate [CaK₃H(PO₄)₂]), 브루샤이트(Brushite [CaPO₃(OH)H₂O]), 칼슘 설파이드 포스페이트(Calcium Sulfide Phosphate [Ca₁₀(PO₄)₆S])인 것을 X-선 회절분석을 통해 확인할 수 있었다.(표 9, 그림 7).

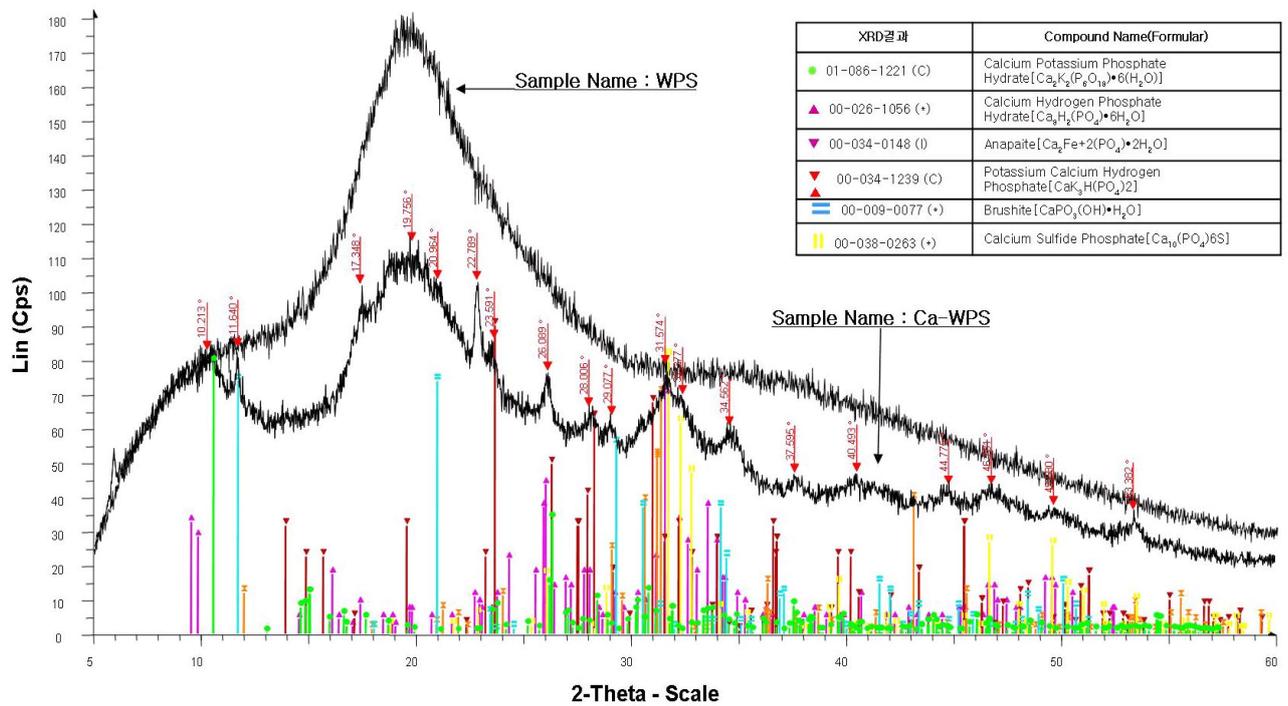


그림 7. 원료유청분말(WPS) 대비 칼슘 유기태화 제제(Ca-WPS)의 화학구조 구조결정분석(XRD anayls)결과

표 9. XRD분석을 통한 칼슘 유기태화 제제의 화학구조 분석결과표

| XRD결과 | Compound Name(Formular) | Y-Scale | d x by | Wavelength | System | a | b | c | alpha | beta | gamma | Bravais L | Space Group |
|-----------------|--|---------|--------|------------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|---------------|-------------|
| 01-086-1221 (C) | Calcium Potassium Phosphate Hydrate [Ca ₂ K ₂ (P ₆ O ₁₈)(H ₂ O) ₆] | 43.56 | 1 | 1.5406 | Monoclinic | 7.266 | 11.833 | 12.3 | 90 | 103.17 | 90 | Primitive | P21/n (14) |
| 00-026-1056 (+) | Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate [Ca ₉ H ₂ (PO ₄) ₆ •6H ₂ O] | 119.95 | 1 | 1.5406 | Triclinic | 9.529 | 18.994 | 6.855 | 92.33 | 90.13 | 79.93 | | |
| 00-034-0148 (I) | Anapaite [Ca ₂ Fe+2(PO ₄)•2H ₂ O] | 49.53 | 1 | 1.5406 | Triclinic | 6.4508 | 6.8187 | 5.9017 | 101.65 | 104.26 | 70.76 | Primitive | P-1 (2) |
| 00-034-1239 (C) | Potassium Calcium Hydrogen Phosphate [CaK ₃ H(PO ₄) ₂] | 38.57 | 1 | 1.5406 | Monoclinic | 9.88 | 5.733 | 7.432 | 90 | 94.1 | 90 | Base-centered | C2/m (12) |
| 00-009-0077 (+) | Brushite, syn [CaPO ₃ (OH)•H ₂ O] | 40.58 | 1 | 1.5406 | Monoclinic | 6.363 | 15.19 | 5.815 | 90 | 118.5 | 90 | Base-centered | Cc (9) |
| 00-038-0263 (+) | Calcium Sulfide Phosphate [Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ S] | 44.59 | 1 | 1.5406 | Hexagonal | 9.4554 | 9.4554 | 6.8405 | 90 | 90 | 120 | Primitive | P63 (173) |

사. IC 분석법 정립(이온분석)

1) 연구목적

칼슘유기태화 제제 제조시, 기발단백질로는 유청분말을 킬레이팅 물질로는 칼슘소재($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)를 사용하게 되는데, 칼슘유기태화 반응이 종료되게 되면 미반응 칼슘과 음이온(Cl^-)이 다량잔존하게 되는데 독성을 보유하기 때문에 반드시 이를 제거하여야 한다. 따라서, 칼슘유기태화 대량생산시스템내 세척공정을 정립하기 위하여 이의 제거효율을 확인하고자 하였다.

2) 연구수행방법

본 분석법은 기본적으로 칼슘 고함량(80,000~100,000ppm) Ca-WPS제조법을 적용하였다, 즉, 유청분말 4.5Kg 대비 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3Kg을 혼합한 후 정제수 10Kg에 용해한 후 89~90°C조건에서 30분동안 교반(150rpm)하였다. 그리고, 이를 NF시스템을 사용하여 필터링작업을 실시하였다. 그리고, 정제수를 10Kg단위로 반복처리하면서 5회 세척처리 과정을 거치는 단계별로 세척액을 분취하여 음이온(Cl)의 제거효율 검정 시료로 사용하였다.

3) 결과 확인

세척단계별 상층액내 음이온(Cl^-)의 제거효율은 IC분석법을 적용하여 검정하였는데, 적용한 IC분석시스템 및 분석조건은 다음과 같다.

- 분석시스템 : Dionex ICS-3000(USA)

- 분석조건

. Eluent : 3~75mM KOH

. Gradient : 0min. (3mM KOH) → 15min. (3mM KOH) → 15 ~ 30 min. (20mM KOH) → 30min. (75mM KOH) → 34min. (75mM KOH) → 34min. (3mM KOH) → 45min. (3mM KOH)

. Eluent Source : EGC-KOH II Cartridge

. Flow rate : 1.2ml/min.

. Detection : Suppressed Conductivity

. Suppressor : Anion Self-Regenerating Suppressor (ASRS 300 x 4mm)

. Applied Current : 223mA

. Injection Volume : 250uL

4) 결과

칼슘 유기태화 제조후 용액내 염소이온(Cl^-)의 검출량은 57,500ppm이었으나, 세척단계가 진행될 수록 검출수치는 감소하였으며 최종 5단계 세척시는 검출량은 0.01ppm으로 나타나 완전히 제거된 것으로 판정되었다. 따라서, 이상의 결과로 볼때 음이온(Cl^-)의 검출방법은 정립되었다(표 10. 그림 8).

표 10. IC분석시스템을 이용한 칼슘유기태화 제조간 세척단계별 음이온(Cl⁻) 제거효과

| 세척단계 | 검출염소이온농도(ppm) | 비고 |
|-------|---------------|-----------------|
| Blank | 0.01 | IC분석전용액 |
| 원액 | 57,500 | 칼슘유기태화 반응후 분리용액 |
| 1 단계 | 22,500 | |
| 2 단계 | 15,000 | |
| 3 단계 | 5,000 | 세척수 : 2차 정제수 |
| 4 단계 | 0.01 | |
| 5 단계 | 0.01 | |

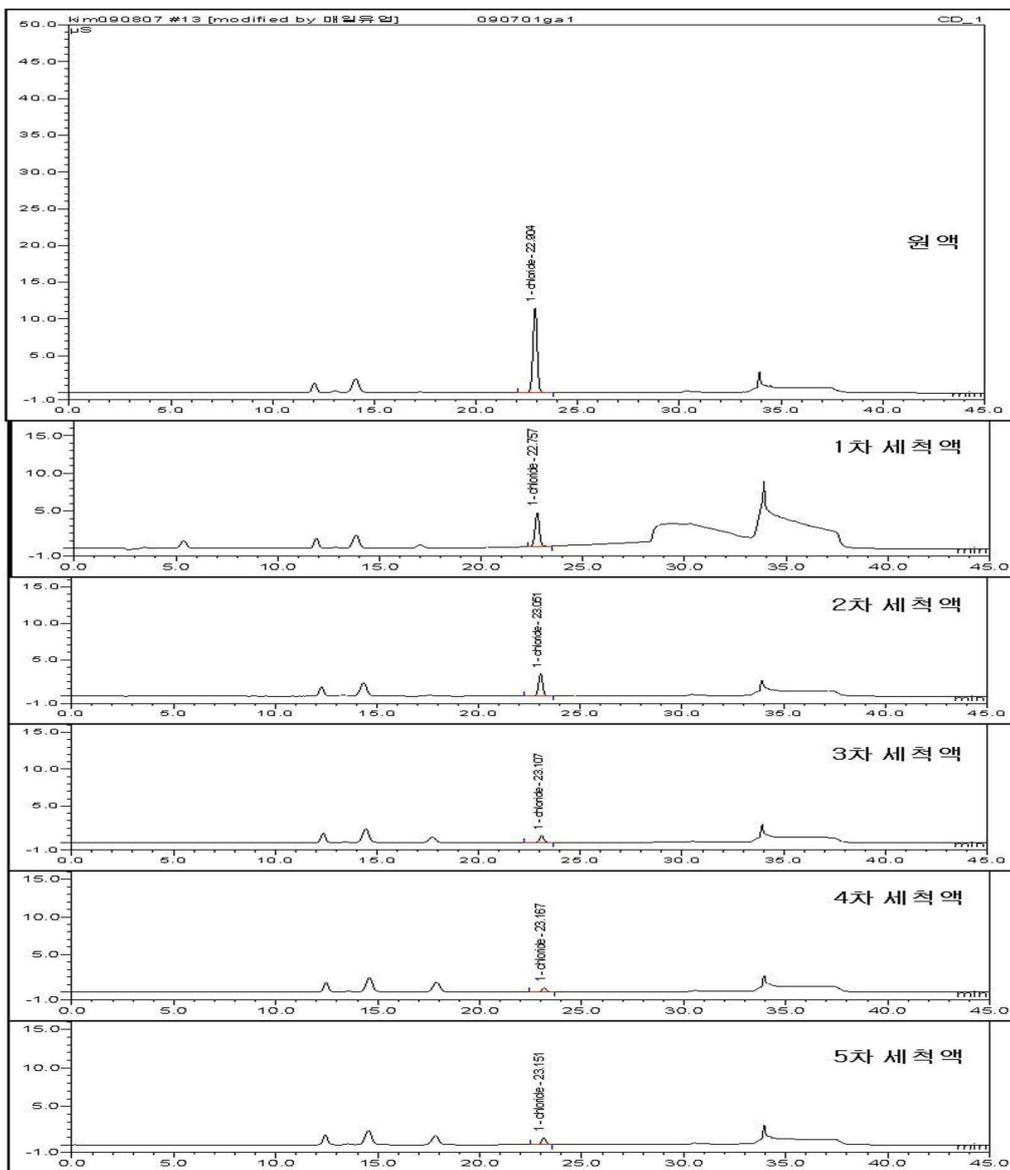


그림 8. IC분석시스템을 이용한 칼슘유기태화 제조간 세척단계별 음이온(Cl⁻) 제거효과

제 2 절 칼슘-유기태화(Ca-WPS)소재 선발 및 킬레이팅 기법연구

1. 연구목적

본 연구는 유단백질에 킬레이트화되어 생체흡수율이 뛰어난 유기태 칼슘 강화 유단백질의 제조기법을 정립하고 저 하였는데, 제조방법이 간단하여 손쉽고 저렴하게 생체흡수율이 뛰어난 유기태 칼슘 급원을 제조할 수 있는 방법을 제공하기 때문에 흡수율이 낮은 무기태 칼슘을 사용하는 식품이나 의약 또는 사료, 비료 등 광범위한 분야에서 무기태 칼슘이 유기태 칼슘급원으로 대체될 수 있고, 이로 인해 무기태 칼슘의 과량 사용으로 인해 식품 등의 물성, 기호, 맛에 영향을 주는 한계를 극복할 수 있게 하고 저 하였다.

2. 연구수행방법

가. 기질유단백질 킬레이팅화 최적 무기태 칼슘 선발

1) 연구목적으로서, 식품첨가물로서 등재되고 상용되고 있는 칼슘소재(6종)를 대상으로 멸균 유내 일정량을 첨가한 후 이를 열처리 전/후에 물리화학 및 물성(응고 현상 등)변화에 미치는 효과평가를 실시하여, 선발 유단백질과의 킬레이팅 반응을 유도할 최적의 무기태화 칼슘을 선발하고 저 하였다.

2) 연구수행방법

기질유단백질 킬레이팅화 최적 무기태 칼슘 선발을 위하여, 식품첨가물로 등재되어 있으며 현재 식품업계에서 사용하고 있는 6종의 상용무기태화 칼슘(탄산칼슘, 구연산칼슘, 젖산칼슘, 제2인산칼슘, 판토텐산칼슘, 염화칼슘)를 구입하여 사용하였다.

기질 유단백질 대비 최적 무기태 칼슘 선발을 위하여, 기질 단백질 시유(매일유업 Fresh mik, 200ml 멸균유) 25ml에 무기태화 칼슘별 0.2g을 첨가한 후 열처리(80℃, 30분, 1회)를 실시하였다. 그리고 열처리 전후에 성상변화 및 물리이화학적 변화와 1일(상온)이 경과 시 첨가칼슘 침전유무 조사를 실시하였다. 대조구로는 정제수를 사용하는 이외에는 동일하게 처리하였다.

물리이화학 특성변화는 pH (Tem.℃), EC(mS), 당도(Soluble Solides, Brix, %), 삼투압변화(Osmolality, mmol/Kg) 및 용해성(Solubility) 항목으로 구분 비교 조사하였다.

칼슘첨가에 따른 물성변화는, 불용성 및 수용성 칼슘종류별 멸균유에 혼합 후 열처리전후에 응고 및 침전현상발생여부를 외관평가를 통하여 결과치로 하였다. 물성변화 결과는 매우 심한 변화를 보이는 경우는+++, 심한 경우는 ++, 초기변화가 보이는 경우는 + 그리고 변화가 없는 경우는 - 로 표시하였다.

3) 결과

가) 물리이화학적 특성조사 결과

pH에 미치는 효과로서, 불용성 칼슘소재는 정제수에 혼합한 경우에서 대부분 pH가 7이상의 알칼리성을 보유하고 있었는데, 이중 탄산칼슘(CaCO_3)를 정제수에 혼합시 pH가 9.75로 조사되어 강알칼리성을 띠고 있었는데, 시유내 동일양의 칼슘 첨가시는 pH의 수치는 6.69로 조사되어 멸균유(pH 6.66)에 의하여 알칼리성을 중화하는 결과를 보였다. 이러한 경향은 전체 불용성 칼슘소재들에서 동일한 경향을 보였다.

칼슘이 보유한 전기전도도(EC,mS)수치를 기준으로 시유내 첨가에 따라 전기전도도의 증감여부를 평가하므로써, 시유의 킬레이팅 반응성을 조사하여 보았다. 우선 시유와 불용성 칼슘류중 탄산칼슘을 용해수에 혼합한 후 고유의 EC를 조사하여 보았더니 시유는 4.75 그리고 탄산칼슘의 경우는 불용성 소재임으로 인하여 0.06로 매우 낮게 나타났다. 그러나, 수용성 칼슘류중 염화칼슘(CaCl_2)는 정제수에 용해 후 측정한 고유의 EC수치를 조사하여 본 결과에서는 EC수치는 11.88로 높게 나타났다. 시유와 칼슘의 반응성이 없는 경우는 시유와 탄산칼슘이 각각 보유한 EC수치는 4.81로 수치가 높아져야 하며, 반대로 반응성이 있는 경우는 4.75 혹은 그 이하의 수치변화를 보여야 한다. 이를 결과로서, 탄산칼슘을 시유내 첨가시 4.78로 조사되어 시유(4.75)대비 50%의 반응성을 보이는 것으로 조사되었는데, 이는 탄산칼슘과 유단백질과의 결합되는 결과로 임을 알 수 있었다. 이러한 경향은 전체 불용성 칼슘류에서 유사하게 나타났다.

수용성 칼슘을 시유내 첨가시는 11.21로 나타나 정제수에 용해시 11.88과 동일한 수치를 보였는데, 이는 시유 25g 대비 염화칼슘은 적어도 0.2g(칼슘함유량 : 0.07g)의 킬레이팅 반응이 유도되었다는 것을 시사하였다. 따라서, 용해성 칼슘류만이 킬레이팅 소재로서 사용이 가능함을 알 수 있었다. 그러나, 수용성 칼슘이라하더라도 젖산칼슘과 판토텐산 칼슘의 경우에서 정제수에 첨가시 2.52와 1.75였는데, 시유내 첨가시는 6.25와 5.30으로 증가되어 있었다. 이는 시유의 고유 EC수치가 4.75였음에 비교하면 첨가된 젖산칼슘과 판토텐산 칼슘의 경우는 시유내 단백질 등과 킬레이팅 효과가 없다는 것을 알 수 있다.

이 결과는 탄산칼슘을 포함한 불용성 칼슘류는 시유내 초기 혼합 시는 반응성이 없는 것처럼 보일 수 있으나, 시간이 경과하면 유단백질과 반응성이 증가할 것으로 예상되고 결국 침전물로서 포장용기 등에 부착 되는 결과를 나타낼 것으로 예측되었다.

따라서, 본 연구에서는 Ca-WPS제조간 칼슘소재와 기질 유단백질과의 킬레이팅화를 짧은시간에 최대한 유도하는데 목적을 두고 있으므로 불용성 칼슘소재는 킬레이팅 소재로서 적합하지 않는 것으로 판단되었다.

시유내 칼슘류 첨가시 당도(Brix)에 미치는 효과를 조사하여 보았더니, 시유(12.49) 대비 탄산칼슘은 12.41, 구연산칼슘 10.99, 제2인산 칼슘의 경우는 11.84로 감소하는 경향을 보였는데, 수용성 칼슘의 경우는 젖산칼슘 13.43, 판토텐산 칼슘은 13.63으로 높게 나타나는 경향을 보였다. 그러나, 수용성 칼슘중 염화칼슘의 경우는 12.41로 조사되어 시유와 유사한 경향을 보였다.

시유내 칼슘소재 첨가시 삼투압에 미치는 효과로서, 시유는 246mmol/Kg였는데 불용성 칼슘류를 시유내 첨가시 241~251의 범위를 보여 차이가 안정되지 않았다. 이는 역시 불용성임에 따라 시유내 삼투압 변화에 크게 관여하지 않았다는 것을 시사하였다.

그러나, 수용성 칼슘의 경우는 정제수에 용해시 90~94수치를 보였는데, 시유내 첨가시는 280~362로 높은 수치를 보였다. 이는 시유 고유의 삼투압 수치가 246이었음을 고려하면 시유와 칼슘의 반응 후 잔존하는 이온에 의하여 유발되었다고 판단되었다. 삼투압은 영유아

를 포함한 장내 영양성분 흡수메카니즘에서 중요한 인자인데, 200~400수치 범위를 벗어나면 설사 등의 임상변화가 발생한다. 따라서, 추후 대량생산시스템 정립시 수용성 칼슘류의 사용시는 반응후 잔조하는 독성 이온제거에 대한 공정을 확립할 필요가 대두되었다(표 1).

나) 물성변화에 미치는 효과 평가

물성변화에 미치는 효과를 살펴보면, 불용성 칼슘류(탄산칼슘, 구연산칼슘, 제 2인산 칼슘)의 경우는 멸균유내 첨가전과 열처리시 불용성으로 인한 유단백질과의 반응이 없었으므로 역시 물성변화 없었다. 그리고, 1일 경과시 불용성 칼슘은 비중차로 인하여 침전 현상이 발생하였다. 수용성 칼슘류(젖산칼슘, 판토텐산 칼슘, 염화칼슘)의 경우, 멸균유내 첨가 후 및 열처리시 응고 및 침전현상 발생이 발생하였으며, 1일 경과시, 칼슘침전 현상 없었다. 기질단백질 대비 칼슘은 수용성일 경우만 유단백질 등과 결합하는 것으로 판단되었으며, 따라서, 본 연구간 최적 칼슘은 CaCl₂으로 선발하였다(그림 1).

표 1. 기질유단백질 대비 킬레이팅화 소재로서의 최적 무기태 칼슘 선발을 위한 물리이화학적 변화 평가결과(멸균유내 칼슘첨가후 열처리 조건, 80℃/30분/1회)

| 시험구 | 물리화학적 성상변화(열처리전) | | | | | 가열처리후(80℃,30min.) 성상변화 | | 칼슘침전 (1일상온방치후) |
|-----------------------------|------------------|------------|---------------------------------|-------------------------|-------------|---------------------------|-----------------|-------------------|
| | pH (Tem.℃) | EC (mS) | Soluble Solides (Brix, %) | Osmolality (mmol/Kg) | Solubility# | 응고 | 침전 | |
| 대조(2차 정제수) | 6.04(23.9℃) | 0.01 | 0 | 62 | - | - | - | - |
| 대조(멸균유) | 6.66(25.6℃) | 4.75 | 12.49 | 246 | - | - | - | - |
| 2차정제수+탄산칼슘 (25g)(0.2g) | 9.75(24.9℃) | 0.06 | 0.7 | 60 | 불용성 | - | +++ (Ca,고유성) | +++ (Ca,고유성) |
| 멸균유+탄산칼슘 (25g)(0.2g) | 6.69(24.5℃) | 4.78 | 12.41 | 251 | 불용성 | - | - | +++ (Ca, 고유성) |
| 2차정제수+구연산칼슘 (25g)(0.2g) | 7.30(24.9℃) | 0.29 | 0.39 | 67 | 불용성 | - | +++ (Ca,고유성) | +++ (고유성) |
| 멸균유+구연산칼슘 (25g)(0.2g) | 6.67(24.4℃) | 4.77 | 10.99 | 246 | 불용성 | - | - | +++ (Ca, 고유성) |
| 2차정제수+제2인산칼슘 (25g)(0.2g) | 7.92(25.2℃) | 0.12 | 0.26 | 64 | 불용성 | - | +++ (Ca,고유성) | +++ (Ca, 고유성) |
| 멸균유+제2인산칼슘 (25g)(0.2g) | 6.69(24.4℃) | 4.78 | 11.84 | 241 | 불용성 | - | - | +++ (Ca, 고유성) |
| 2차정제수+젖산칼슘 (25g)(0.2g) | 7.25(24.9℃) | 2.52 | 0.64 | 94 | 수용성 | - | - | - |
| 멸균유+젖산칼슘 (25g)(0.2g) | 6.26(24.5℃) | 6.25 | 13.43 | 298 | 수용성 | +++ | +++ | - |
| 2차정제수+판토텐산칼슘 (25g)(0.2g) | 7.18(25.2℃) | 1.75 | 0.90 | 90 | 수용성 | - | - | - |
| 멸균유+판토텐산칼슘 (25g)(0.2g) | 6.34(24.3℃) | 5.30 | 13.63 | 280 | 수용성 | ++ | +++ | - |
| 2차정제수+염화칼슘 (25g)(0.2g) | 8.21(25.4℃) | 11.88 | 0.63 | 92 | 수용성 | - | - | - |
| 멸균유+염화칼슘 (25g)(0.2g) | 5.95(25.3℃) | 11.21 | 12.41 | 362 | 수용성 | +++ | +++ | - |

#: 용매(일반수, 멸균유)내 시용칼슘의 용해성 평가

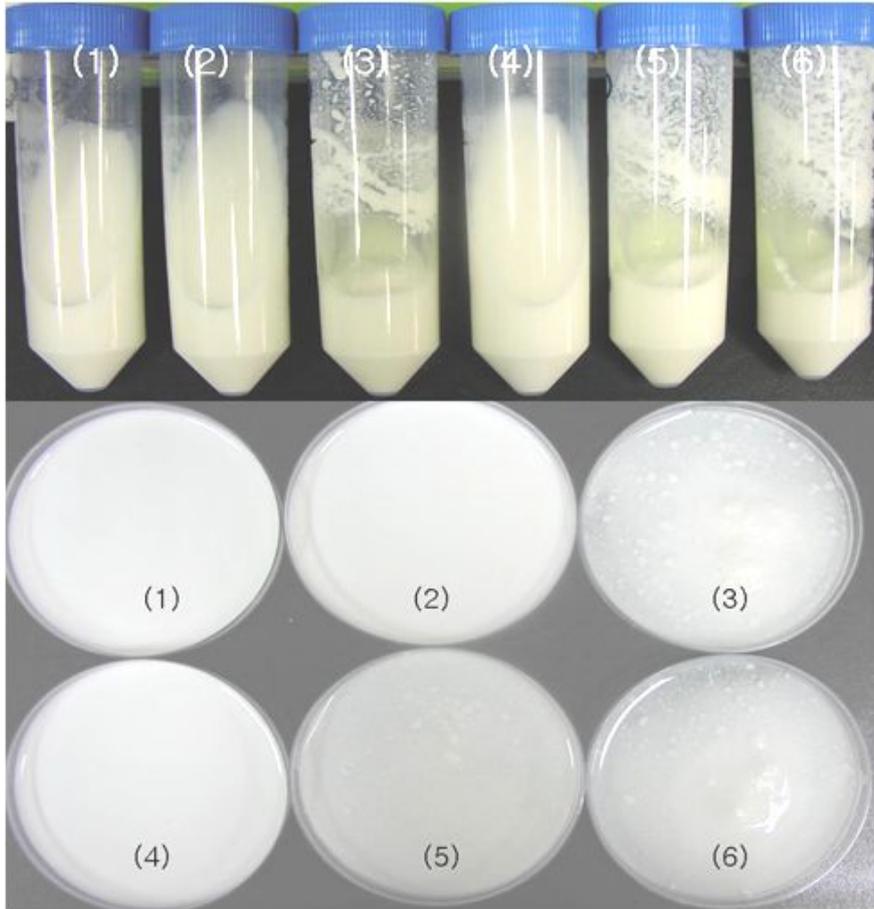


그림 1. 기질유단백질 대비 킬레이팅화 소재로서의 최적 무기태 칼슘 선발을 위한 물성변화 평가결과(멸균유내 칼슘첨가후 열처리조건, 80℃/30분/1회)

(1) : [멸균유(25g)+탄산칼슘(0.2g)]+열처리, (2) : [멸균유(25g)+구연산칼슘(0.2g)]+열처리, (3) : [멸균유(25g)+젯산칼슘(0.2g)]+열처리, (4) [멸균유(25g)+제2인산칼슘(0.2g)]+열처리, (5) [멸균유(25g)+판토텐산칼슘(0.2g)]+열처리, (6) [멸균유(25g)+염화칼슘(0.2g)]+열처리,

나. 칼슘 킬레이팅 기질단백질 선발을 위한 우유소재 단백질내 미네랄 분포조사 결과

1) 연구목적

본 연구는 칼슘-유기태화 제제 개발을 위하여, 우선 선발된 칼슘소재의 킬레이팅화를 위한 기질단백질의 선발을 위하여 실시하였다. 이를 위하여 기 발표 및 보고된 결과를 토대로 유단백질 류를 우선 선발하고 칼슘을 포함한 미네랄 함유량 조사를 통하여 본 개발간 킬레이팅 기질단백질을 선발하고 저 하였다. 선발기준은 칼슘의 함유량이 높으면서 잉여자원으로서 저가 생산이 가능한 재료를 기준으로 하였다.

2) 연구수행방법

기질 단백질 선발을 위하여 22종의 우유유래의 단백질류 및 부산물을 수집하여 이를 시험간 재료로 사용하였다. 시험간 수집한 재료는 시유, 멸균유, WPS(매일유업), WPI(Arla사), 사이알릴올리고당, 상용 락토페린류[DMV-LF(SD), MORINAGA LF(FD), TATURA-LF(FD), TATUA-LF(FD), FONTERA-LF(FD), MG-LF(SD)], α -Lactalbumin, 유지방구막단백질, 고단백유청분말, 가수분해유청단백질, 탈염유청분말, 우유인지질, 유당, 초유단백분말, Lactic Casein, 탈지분유 그리고 전지분유이다.

3) 결과확인

22종의 기질 단백질류 및 부산물내 존재하는 칼슘 및 미네랄 분석을 ICP분석을 통하여 검정하였으며, 조사항목은 Ca, P, Cu, Fe, Mg, Mn, K, Na 및 Zn으로 9종을 분석대상으로 하였다(표 2).

4) 결과

칼슘을 포함한 대표적 미네랄을 기준으로 구성 유단백질별 함유량을 확인하여 본 결과, 전체적으로 Ca > P > K > Na > Fe > Zn > 기타 순으로 경향을 보였다.

유단백질별 고유 칼슘보유량(mg/Kg)의 경우는, 단백질 구성차이 및 제조공법에 따라 함유량 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 기질 단백질별 칼슘의 함유량을 조사하여 보았더니, 우유인지질은 0.6ppm, Lactoferrin류는 100ppm 이내의 범위를 탈염유청 탈염유청분말(507mg/Kg) < 가수분해유청분말(775mg/Kg) < 고단백유청분말 (2,054mg/Kg) < WPI(1,264mg/Kg) < 유지방구단백질(4,211 mg/Kg) < α -Lactalbumin (4,851mg/Kg) < 시유(9,660mg/Kg) < 멸균유 (9,972mg/Kg) < 전지분유(10,280 mg/Kg)의 순으로 나타났다.

우선 시유와 멸균유내 칼슘함유량을 조사하여 보았더니 1,136ppm~1,163ppm의 범위로 조사 되었는데, 기존 보고(한국영양학회, 2000) 결과와 유사하기 조사되어 결과의 유의성은 인정되었다. 이를 기초로 기질단백질내 칼슘함유량을 비교하여 보았더니, 초유유청분말의 경우는 17,430ppm, 탈지분유는 15,480ppm, 전지분유 10,280ppm 그리고 사이알릴올리고당의 경우는 12,820ppm으로 높은 수치를 보였지만 자체가 고가의 원료임으로 인하여 본 연구간 기질단백질 소재로서 제외하였다.

그리고, 치즈제조 후 건조시킨 유청분말(매일유업)내 칼슘함유량은 5,038ppm, α -Lactalbumin의 경우는 4,851ppm, 유지방구막단백질은 4,200ppm, 고단백유청분말 제제는 2,054ppm의 칼슘함유량 수치를 보였는데, 이외의 재료는 기질단백질서 칼슘함유량 선발기준

이하였으므로 제외하였다.

치즈생산 후 열풍건조한 유청분말의 칼슘수치가 5,000ppm이상이었는데, 유청분말 기본 구성 단백질이 α -Lactalbumin, 유지방구막단백질 및 고단백유청분말 등이고 이들의 칼슘함유량이 높았음을 판단하면 유청분말자체를 기질단백질로 사용함이 가장 타당하다고 결론 내릴 수 있었다. 그러나, 동일하게 치즈부산물로 생산한 WPI(Arla사, 덴마크)의 경우, 단백질 함유량을 90%이상 함유되게 정제한 경우에서 칼슘검출량은 1,264ppm이었다. 이는 적어도 유청단백질내 1,200ppm의 칼슘을 킬레이팅이 가능함을 시사하였으며, 유기태화 소재개발간 기질단백질 제조는 치즈생산시부터 개발공정이 필요함을 알 수 있었다.

따라서, 유청분말내 높은 칼슘수치를 함유하고 있으면서, 잉여소재로서 저가로 제조가 가능하다는 점, 주관기관에서 치즈생산 후 대량생산이 가능하다는 점 등 경제성 부분 등을 종합적으로 고려할 때, 본 연구간 기질단백질로서 유청분말이 최적 소재임이 확인되었다.

표 2. 칼슘 킬레이팅 기질단백질 선발을 위한 우유소재 단백질내 미네랄 분포조사 결과

| 乳단백질종류 | ICP측정결과(mg/kg) | | | | | | | | | 비고 |
|-----------------------|----------------|--------|-------|-------|-------|------|--------|--------|-------|-------------|
| | Ca | P | Cu | Fe | Mg | Mn | K | Na | Zn | |
| 시유 | 1,136 | 918 | 1.89 | 0.65 | 92.3 | 0.18 | 1,870 | 519 | 4.29 | |
| 멸균유 | 1,163 | 896 | 1.94 | 0.46 | 101 | ND | 1,894 | 526 | 3.49 | |
| WPS(매일유업) | 5,038 | 3,717 | ND | 17.4 | 766 | ND | 8,714 | 6,236 | ND | 치즈부산물 |
| WPI(Arla사) | 1,264 | 1,24 | ND | 12.2 | 453 | ND | 6,423 | 5,867 | ND | 단백질 90%이상 |
| 사이알릴올리고당 | 12,820 | 11,540 | ND | 10.03 | 4,524 | ND | 13,500 | NT | 4.45 | |
| DMV-LF(SD) | 0.762 | 395.8 | ND | 221.0 | ND | ND | ND | NT | 1.81 | Lactoferrin |
| MORINAGA LF(FD) | 639.4 | 138.6 | 2.507 | 266.2 | 76.62 | ND | 3.04 | NT | 4.144 | |
| TATURA-LF(FD) | 106.9 | 71.74 | ND | 184.9 | 55.83 | ND | 7.53 | NT | 3.27 | |
| TATUA-LF(FD) | 86.93 | 76.45 | ND | 200.5 | 10.79 | ND | 8.47 | NT | 3.38 | |
| FONTERA-LF(FD) | 13.13 | 95.49 | ND | 180.0 | 0.281 | ND | 3.99 | NT | 1.67 | |
| MG-LF(SD) | 10.72 | 317.6 | ND | 169.5 | ND | ND | 14.47 | NT | 9.41 | |
| α -Lactalbumin | 4,851 | 4,453 | ND | 4.02 | 976.0 | ND | 3,755 | NT | 5.62 | |
| 유지방구막단백질 | 4,211 | NT | ND | 31.76 | 1,016 | ND | NT | NT | NT | |
| 고단백유청분말 | 2,054 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | |
| 가수분해유청단백질 | 775 | 4,888 | 2.36 | 5.22 | 133 | ND | NT | 15,140 | 56.43 | |
| 탈염유청분말 | 507 | NT | ND | ND | 436 | ND | NT | NT | NT | |
| 우유인지질 | 0.609 | NT | ND | ND | NO | ND | NT | NT | NT | |
| 유당 | 562 | 858.4 | ND | ND | 90.51 | ND | 177.20 | 72.31 | ND | |
| 초유단백분말 | 17,430 | 27,940 | 0.67 | 11.49 | 1,718 | ND | 4,404 | 1,303 | 141.8 | |
| Lactic Casein | 415.2 | 19.45 | 1.55 | 3.9 | 34 | ND | 59.48 | ND | 51.25 | |
| 탈지분유 | 15,480 | NT | ND | 16.65 | 2,095 | ND | NT | NT | NT | |
| 전지분유 | 10,280 | NT | ND | ND | 1,550 | ND | NT | NT | NT | |

SD:Sprayer Dry, NT : Not Testing, ND :Not Detection

다. 선발 기질 단백질의 칼슘킬레이팅 능력 조사

1) 연구목적

본 연구에서는 18종 우유유래 단백질내 칼슘 및 미네랄류의 분포조사를 통하여, 칼슘 킬레이팅 반응을 위해 최종 선발된 유청단백질(Whey Protein Separation, 이하 WPS) 대비 선발칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)을 농도별 및 온도조건별 처리시 킬레이팅 능력을 조사함으로써 최적 킬레이팅 조건을 확인하고 저 하였다.

2) 연구수행방법

본 연구간 사용된 기질단백질인 유청은 주관기관에서 제조한 농축유청을 살균 또는 가열처리 없이 분무건조한 유청분말(Whey Protein Separation, 이하 'WPS'라 함)을 유기태화 칼슘 강화 유단백질 제조에 이용하였으며, 선발칼슘의 첨가량과 반응온도 조건(저온 및 고온을 다르게 하여 실시하였다.

가) 기질단백질과 칼슘의 킬레이팅 최적화 조건 확립

실시에 1은 WPS 50g과 염화칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1g을 분말 혼합하고, 200 g의 탈이온수(pH 6.7)에 120 rpm으로 1시간 교반 후(교반 후 pH 4.8), 80℃까지 승온시켜 30분 간 교반하면서 열처리하였다. 그리고, 열처리한 시료를 15℃에서 10,000 rpm으로 15 분 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전물에 증류수 200 ml를 첨가하고 진탕시킨 후 다시 같은 조건으로 원심분리하는 세척공정을 4회 반복한 후 동결건조하여 유기태화 칼슘 강화 유단백질을 제조하였다.

실시에 2는 WPS 50g에 염화칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 30g을 분말 혼합하는 것을 제외하고는 실시예1과 동일하게 시료를 제조하였다.

비교예 1로서, WPS 50g과 염화칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1g을 분말 혼합하고, 200 g의 탈이온수(pH 6.7)에 120 rpm으로 1시간 30분 교반 후(교반 후 pH 4.87), 상온(25℃)에서 10,000 rpm으로 15 분 원심분리하여 상등액을 제거하고 증류수 200 ml를 첨가한 후 진탕 후 다시 같은 조건으로 원심분리하는 세척공정을 4회 반복한 후 동결건조하였다. 즉, 실시예 1과 동일하되 가열처리 공정만 제외시키고 시료를 제조하였다.

비교예 2는 WPS 50g에 염화칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 30g을 분말 혼합하는 것을 제외하고는 비교예1과 동일하게 시료를 제조하였다.

비교예 3은, 덴마크 ARLA사에서 판매하는 분리유청단백(Whey Protein Isolate, 이하 WPI) 50g에 염화칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 20g을 분말 혼합하는 것을 제외하고는 실시예1과 동일하게 시료를 제조하였다.

비교예에 사용한 WPI는 유청을 분리한 후 살균, 한외여과 및 분획을 거쳐 분무건조한 것으로, FPLC를 이용해 실시예의 WPS와 분자량을 비교한 결과 WPS는 분자량 13,000 ~ 20,000 사이의 단백질 분포를 나타냄에 비해, WPI는 단백질의 열변성으로 인하여 분자량이 20,000~40,000사이로 분포되어 있었다.

비교예 4는 덴마크 ARLA사에서 판매하는 WPI 50g에 염화칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 20g을 분말 혼합하는 것을 제외하고는 비교예 1과 동일하게 시료를 제조하였다.

나) 결과확인

시험구간 기질단백질과 칼슘의 킬레이팅 능력은 여기 동결건조한 시료를 대상으로 ICP 분석결과를 비교하여 최적 반응조건을 선발하였다. 분석대상 미네럴은 Ca과 P을 우선 대상으로 하였다. 전체 시험간 대조시료로서는 시유(멸균유, 매일유업, 200ml Fresh milk)를 대상으로 열안전성 및 미네럴 분석을 실시하였다(표 3.).

기질단백질과 칼슘의 킬레이팅 최적화 조건확립 결과를 토대로 시험구별 동결처리한 시료 각 10g을 증류수 200ml에 용해시킨 후 대조구로 사용된 시유와 함께 78℃, 30분간 가열처리한 후 가열전후의 성상변화를 확인함으로써 열안전성을 확인하였다.

열처리전후 외관평가를 통하여 응고, 침전, 겔화여부, 부착 및 부유현상 유무로 구분하여 조사하였는데, +++는 매우 심함, ++는 심함, +의 경우는 변화 발생 그리고 -는 가 변화 없음으로 구분하여 결과를 정리하였다(표 4).

다) 결과

실시에 및 비교예의 세척공정에서 유단백질과 반응하지 않은 칼슘은 제거되므로, 상기 분석된 칼슘 및 인의 함량은 유단백질에 킬레이트화된 칼슘의 함량으로, 수용성 칼슘 첨가량이 동일한 실시에 1 및 비교예 1, 그리고 실시에 2와 비교예 2을 비교했을 때, 유단백질과 수용성 칼슘을 반응시킨 후 열처리시킨 실시에 1 및 2에서만 킬레이트 칼슘의 함량이 수용성 칼슘의 첨가량에 비례하여 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이와는 달리 실시에와 동일한 함량의 수용성 칼슘이 첨가되었으면서도 열처리 단계를 거치지 않은 비교예 1 및 2에서는 킬레이트화된 칼슘 함량의 증가를 관찰할 수 없었다.

가열처리되지 않은 유청분말(WPS)을 사용한 실시에와 달리 가열살균처리과정을 거친 분리유청단백(WPI)을 사용한 경우는 수용성 칼슘과 반응이 거의 없었고(비교예 3), 수용성 칼슘과 반응시킨 후 열처리를 하더라도 킬레이트화된 칼슘함량은 거의 증가하지 않았다(비교예 4).

결과로서, 기질 단백질의 사전 열처리 여부와 칼슘첨가량 및 반응온도가 칼슘 유기태화(Ca-WPS)의 제조간 중요한 핵심인자임이 확인되었다.

따라서, Ca-WPS제제 대량생산시스템간 원료인 유청분말은 사전 열처리 혹은 최저 열처리 조건으로 하는 생산공정을 확립할 필요가 있으며, 킬레이팅 반응을 유도하기 위한 기질단백질(건조유청분말 1기준)대 칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 칼슘함유량 : 34%)의 혼합비율은 0.6 배 비율로 하며, 킬레이팅화 반응온도는 80℃조건이상에서 30분 이상의 반응시간을 부여하는 조건으로 설정하였다.

표 3. 기질단백질과 칼슘의 킬레이팅 최적화 정립조건별 칼슘함유량 증강효과

| 시험군 | 칼슘(mg/kg) | 인(mg/kg) |
|-----------|---------------|------------|
| 대조구(비열처리) | 1,136.8±25.8 | 918.8±10.6 |
| 대조군(열처리) | 1,167.3±11.1 | 894.7±23.1 |
| 실시예 1 | 57,240±3,298 | 11,410±496 |
| 실시예 2 | 104,600±4,804 | 58,790±652 |
| 비교예 1 | 37,410±2,606 | 44,490±803 |
| 비교예 2 | 31,090±2,089 | 36,450±111 |
| 비교예 3 | 4,883.8±107.1 | 211.2±2.36 |
| 비교예 4 | 5,253.7±42.1 | 262.5±3.60 |

표 4. 기질단백질과 칼슘의 킬레이팅 최적화 정립에 따른 열처리후 외관(안전성)평가 결과

| 시험군 | 응고 | 침전 | 겔화 | 부착 | 부유 |
|---------|----|-----|-----|----|----|
| 대조구(시유) | - | - | - | - | - |
| 실시예 1 | - | ++ | - | - | - |
| 실시예 2 | - | ++ | - | - | - |
| 비교예 1 | - | ++ | - | - | - |
| 비교예 2 | - | ++ | - | - | - |
| 비교예 3 | ++ | +++ | +++ | - | ++ |
| 비교예 4 | - | - | - | - | - |

라. 칼슘 킬레이팅 반응용 기질 단백질(유청액 제조)

1) 연구목적

본 연구는 유청단백질에 수용성 칼슘 분말을 혼합시킨 후, 60 ~ 100 °C로 가열처리하는 것을 특징으로 하는 유기태화 칼슘 강화 유단백질의 제조방법이라 할 수 있다.

연구간 기질단백질로는 카제인 제조시 부산물로 생성되는 유청(acid whey), 치즈 제조시 부산물로 생성되는 유청(cheese whey) 어느 것이나 사용될 수 있으나, 본 연구에서는 주관기관이 주력제품으로 생산하고 있는 치즈제조 후 잉여 유청을 기본으로 사용하였다.

그러나, Ca-WPS생산시스템에서 선발칼슘인 CaCl₂와 유청단백질 반응후 미반응 칼슘과 독성이온(Cl이온)의 제거는 공중보건학적 안전성에 있어 위해요소이다. 따라서, 이를 제거하는 세척시스템으로서 NF(Nano-filtering)시스템을 적용토록 시스템을 구축하였는데, 이를 사용시 유청액이 보유하고 있는 지방류가 저해요인(막힘현상)으로 작용한다. 따라서 본 연구에서는 치즈제조 후 유청액 제조방법과 지방을 제거하는 공정을 확립 및 적용하므로써 기질단백질로 상용할 수 있는 무지방 유청분말을 생산연구를 실시하였다.

2) 연구수행방법

가) 치즈제조에 따른 유청액 생산

본 연구간 선발에 대하여 열처리(70°C 기준) 전/후에 있어 칼슘의 킬레이팅 효고를 사전 검정하여 보았다. 결과로서, 유청 제조공정중 또는 제조 후 유청을 60°C 이상의 온도로 가열처리하는 경우, 유청 단백질이 변성되어 칼슘 성분과 킬레이팅 되는 비율이 급격히 감소하므로, 가열처리되지 않은 유청 또는 변성되지 않은 유청단백질 사용하여야 함을 알수 있었는데, 이를 적용한 기본 유청액 제조 공정도는 다음과 같다(그림 2).

| 공정 | 주요기기 | 공정내용 |
|-----------------|---|---|
| 원유검사 | Milcoscan Charm II | 일반성분검사, 관능검사, 가수검사, 항생제검사등을 실시하여 합격유를 선별한다. |
| 원유수유 / 저장 | Milk Tank | 원유검사 합격유만을 수유하여 Milk Tank에 저장한다. |
| 표준화 및 살균, 냉각 | Separator Standardisation Unit Bactofuger Homogeniser Pasteuriser | 원유를 표준화시키고 살균한 다음 냉각시켜 저장한다. |
| 주유 투입 | | 생산공정에 따라 균주, 젖당을 첨가하고 절단하여 커드와 웨이를 만든다. |
| 균주(Starter) 첨가 | | |
| 응유효소(Rennet) 첨가 | Coagulator | |
| 절단(Cutting) | | |
| 웨이 분리 | 커드 | 웨이와 커드를 분리하여 커드는 제품을 만들기 위한 다음공정으로 보낸다. |
| Balance Tank 저장 | | |
| 농축 (Evaporator) | Whey Evaporator | |
| 냉각 (Cooling) | | 농축웨이 당도 32%, 냉각온도 4°C |
| 저장 (Storage) | Whey Tank | 농축 냉각된 웨이를 Whey tank에 저장한다. |

그림 2. 우유로부터 치즈를 제조 후 유청액 생산공정도

나) 칼슘킬레이팅 기질 단백질 무지방 유청분말 제조방법 연구

(1) 연구목적 : Ca-WPS생산시스템에서 선발칼슘인 CaCl_2 와 유청단백질 반응 후 미반응 칼슘과 독성이온(Cl이온)의 제거는 공중보건학적 안전성에 있어 위해요소이다.

따라서, 이를 제거하는 세척시스템으로서 NF(Nano-filtering)시스템을 사용도록 시스템을 구축하였다. 기본적으로 치즈생산 후 건조유청분말내 주요영양성분은 지방(평균 7%), 단백질(평균 7%)과 유당(50~60%)의 기본구성을 보유하고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 이를 그대로 사용시는 유청액이 보유하고 있는 지방류가 NF시스템 적용시 저해요인(막힘현상)으로 작용한다.

본 연구에서는 치즈제조 후 유청액내 지방류를 제거하는 공정관련 및 최종 무지방 유청분말을 개발하는 연구를 실시하였다. 또한, 동시에 유청분말내 지방제거에 따른 영양성분(미네랄, 조지방, 조단백질 및 탄수화물)의 변화량도 동시에 비교 검정하였다.

(2) 연구수행방법

이를 위하여 시스템은 3개시스템(원심분리시스템, NF시스템 그리고 크림분리시스템)을 대상으로 검토하였다(그림 3.).

(가) 대조구 : 치즈제조 후 농축유청액(총고형분 TS : 3.2)을 열풍건조한 유청분말을 그대로 대량생산시스템에 적용하되 원심분리시스템(GEA, Wesfalia separator AGset, Swiss)을 적용하고 이를 다시 열풍건조한 경우에서의 지방제거율을 조사하였다.

(나) 비교구 : 치즈제조 후 농축유청액(TS : 3.2)을 열풍건조한 유청분말을 Ca-WPS 대량생산시스템에 적용하되 NF시스템(Falling Film Evaporator Heated By M.V.R., Germany)을 적용에 따른 지방제거율을 조사하였다.

(다) 처리구 : 치즈제조 후 생산되는 유청액을 총고형분 기준 30~32되게 농축한 후 이를 우유 크림분리기()에 1회 처리(유청액내 거대지방구를 기본적으로 제거)하고 이를 다시 열풍건조한 경우에서의 지방제거율을 조사하였다.

(3) 결과확인

각 시스템별 처리전후 샘플을 각각 채취한 후 이를 동결건조처리(Freeze Dryer EYELA FD-81, Japan)를 거친 시료를 대상으로 미네랄 함유량(ICP분석법), 조지방(Gerber법, 수의과학 검역원 2007), 조단백질(Kjeldahl Method, 식품첨가물공전 2008) 및 탄수화물(Lactose, HPLC 분석) 함유량을 비교 검정하였다.

(4) 결과

원심분리기(대조구)를 사용한 경우 처리전 지방함유량이 7%였음을 기준으로 비교할 때 원심분리기 처리시 지방은 제거되지 않았으며, 오히려 22%로 농축되는 결과를 보였다.

NF시스템을 적용한 경우, 4%의 지방량이 검출되어 당초 7%에 비하여 3%는 제거되는 결과를 보였다. 즉, NF시스템 적용시 NF필터를 통과할 수 있는 미세지방구는 제거되었으나, 거대 지방구의 경우는 입자크기가 큼으로 인하여 미제거된 이유로 판단되었다. 또한, NF시스템의 적용시는 오히려 거대지방구로 기인한 NF필터의 막힘현상 발생으로 인하여 50%이상의 농축유청액 손실요인이 발생함으로서 크림분리기 처리를 통하여 미세지방구를 제거하는

사전 공정이 필요로 함을 알 수 있었다.

크림분리시스템을 적용한 경우, 처리전 지방량(7%)대비 4%의 지방량이 검출되었는데, 이는 미세지방구인 것으로 판단되었는데, 치즈제조 및 농축유청액 생산 공정 중 원유 균질화 처리로 인해 당초 지방구가 미세화 됨으로서 크기가 감소한 것으로 판단되었다. 따라서, 미세지방구까지 제거된 무지 유청분말의 제조는 크림분리 시스템처리 이후 반드시 NF시스템 처리공정이 연계되어야 함을 추가적으로 확인하였다. 처리방법에 따라 지방함량 변화 이외 영양성분의 변화는 없었다. 따라서, Ca-WPS대량생산을 기질 단백질로서 무지유청분말 생산공정은 다음과 같이 설정되었다. 즉, 농축유청액(총고형분 30~32 기준)에 대하여 1차 제거 시스템은 크림분리기를 적용하여 거대지방구를 제거한 후 이를 건조분말화 하고, 건조 유청분말과 Ca을 킬레이팅 반응 후 세척단계에서 NF시스템을 적용함으로써 미세지방(잔존하는 지방)과 독성이온(Cl) 및 미반응 칼슘을 동시에 제거하는 방법을 대량시스템 공정조건으로 설정하였다(표 5).

표 5. 크림분리기 적용에 따른 무지방 유청분말 제조결과

| 분석항목 | 시험구별 분석결과 | | | 비 고 | |
|-------------|-----------|-------|--------|------------------|----------------|
| | WPS(원료) | 탈지WPS | Ca-WPS | | |
| 미네랄 함유량(%) | 0.5 | 0.5 | 10 | ICP분석(Ca 기준) | |
| 단백질(%) | 14 | 12 | 12 | 킬달분석 | |
| 대조구 | 7 | - | 22 | 원심분리시스템 | |
| 조지방(%) | 비교구 | 7 | - | 4 | NF시스템적용(평택공장) |
| | 처리구 | 7 | 4 | - | 유지방분리시스템(광주공장) |
| 탄수화물(당류, %) | 60 | 60 | 60 | HPLC(Lactose 1종) | |
| 수분함량(%) | 2.9 | 2 | 3.3 | 수분측정기 | |



농축유청액(고창, TS 32) -> 유지방 제거(광주공장) -> 제균(HTST, 80°C 15초), 및 분말화(SD)
 그림 3. 칼슘 킬레이팅 반응용 기질 단백질인 무지유청분말(제균) 생산공정

다) WPS 및 Ca-WPS내 유해미생물 제균기법 연구(HTST시스템)

(1) 연구목적

본 연구에 있어 최종 Product는 기능성 노인식 분말제품이기 때문에 Ca-WPS는 그 자체가 제품이 될 수 있다. 그러나, 식품으로서 유청류의 사용을 위한 규제사항(수의과학검역원. 제2 축산물 기준 및 규격, V 가공품 기준법, 1 유가공품, 하 유청류, (3)성분규격. 2007.)으로서 세균수는 20,000 cfu이하/ g여야 하며 대장균군의 경우는 음성이여야 한다고 규정하고 있다. 즉, 유청액 자체가 고영양성분이므로 세균에 대한 감염이 예측되므로 이에 대한 제균대책이 필요하다 할 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 칼슘유기태화 제조간 HTST(High Temperature Short Time)시스템의 온도 및 시간조건을 조절하여 일반조건 대비 제균성을 평가하였다.

(2) 연구수행방법

제균대책을 정립하기 위하여, 주관기관 건조유청분말 생산시스템 HTST시스템과 현재 영양성분의 변화를 유발하지 않으면서 제균효과가 뛰어나다고 알려진 초고압(HPP)시스템을 적용후 이의 효과를 비교검정 하였으며 최적 제균공정으로 설정코져 하였다. 검정을 위한 시험구는 다음과 같이 설정하였다. 대조구(HTST시스템 무처리)으로서, 우선 농축유청액(TS :32)의 총균수 및 대장균수 조사 후 이를 건조(Spray Dryer, 175℃ 조건)화 공정을 적용한 건조분말내 균수의 변화를 측정하였다. 처리구-1은 동일한 시료에 대하여 동일 HTST시스템을 적용하되 다만 온도 및 처리시간을 75℃, 15초로 실시하였으며, 처리구-2는 HTST 조건을 80℃,15초로 변경실시하였다.

(3) 결과확인

HTST시스템의 처리온도 및 처리시간에 따른 제균효과는 축산물시험방법(수의과학검역원. 제2 축산물 기준 및 규격, V 가공품 기준법, 1 유가공품, 하 유청류, (4)시험방법. 2007.)에 준하여 실시하였다.

(4) 결과

대조구의 경우는 처리전 및 후에 총균수와 대장균군의 변화가 없었다. 그러나, 대비구 대비 처리구-1과 처리구-2의 제균결과로서 처리구-1의 경우는 일부균이 생존하는 결과를 보임으로서, 결국 처리구-2인 80℃에서 15초 처리한 경우가 가장 제균효과가 우수한 것으로 확인되었다. 따라서, Ca-WPS 대량생산간 제균조건은 최종공정에서 처리구-2조건으로 실시하는 공정조건으로 설정하였다(표 6).

표 6. HTST(High Temperature Short Time)시스템의 처리온도 및 시간조건에 따른 제균효과 조사결과

| 분석항목 (cfu/g) | HTST처리조건에 따른 제균효과(cfu/g) | | |
|-----------------|--------------------------|-------------------|-------------------|
| | 대조구 | 처리구-1 | 처리구-2 |
| 일반세균(처리전) | 2.7×10^7 | 2×10^4 | 7.5×10^6 |
| 일반세균(처리후) | 2.5×10^7 | 80 | ND |
| 대장균군(처리전) | 1.4×10^2 | 1.2×10^3 | 2.3×10^3 |
| 대장균군(처리후) | 1.8×10^2 | ND | ND |
| 처리방법 | HTST 무처리 | HTST(75℃,15초)처리 | HTST(80℃,15초)처리 |

ND: Not Detection

마. HPP시스템의 Ca-WPS내 세균기법 정립연구(HPP, 초고압 멸균시스템)

1) 연구목적

본 연구는 식품으로서 유청류의 사용을 위한 규제사항(수의과학검역원, 제2 축산물 기준 및 규격, V 가공품 기준법, 1 유가공품, 하 유청류, (3)성분규격, 2007.)으로서 세균수 항목(총균수 : 20,000 cfu이하/ g, 대장균군: 음성) 충족을 위하여, HTST 시스템 이외 HPP(High Pressure Protection)시스템을 적용하여 처리전후의 세균성을 평가하였다.

즉, 세균대책을 정립하기 위하여, 현재 제품의 영양성분의 변화를 유발하지 않으면서 세균 효과가 뛰어나다고 알려진 초고압(HPP)시스템의 효과를 검정함으로써 최적 세균공정으로 적용가능성을 확인코져 하였다. 검정을 위한 시험구 및 시험방법은 다음과 같다.

2) 연구수행방법

HPP시스템의 세균효과를 점정하기 위하여, 전남식품산업연구센터(전남 나주)에서 보유중인 HPP시스템(모델명 :QFP-35L, QUINTUS사, 스웨덴)을 시험간 사용하였으며, 세균성 검정을 위한 기질단백질로서 대량생산시스템을 적용하여 생산한 Ca-WPS를 시험간 사용하였다.

세균성 검정용 공시균 및 처리조건으로서 세균 4종을 사용하였으며(*E.sakazakii*, *E.coli* O157:H7, *B.cereus*, 장내세균(White colony, 미동정), 효모는 2종(*S. cerevise* JKK091002, *Getricum*)을 각각 배양 후 이를 기질단백질(Ca-WPS)내 동일균수를 산정하여 혼합 감염처리하는 조건으로 실시하였다.

실험구는 다음과 같이 조성하였다. 즉, 대조구로서는 Ca-WPS분말내 용해수를 비침가 조건으로 하였으며, 실험구 조성은 Ca-WPS분말(1 기준)대비 멸균 생리식염수를 1.1, 1.5, 1.8, 2.0, 2.5, 5, 7 및, 9 비율로 용해 후 여기에 4종 공시균을 복합 감염시킨 조건에서 HPP처리하였다.

비교구로서는 Ca-WPS내 혼합균을 동일하게 접종시킨 후 Ca-WPS총량 대비 2배의 70%에 탄올을 투여하고 6시간이 경과후 항균효과를 평가하였다.

그러나, 효모의 경우는 순수분리 각각 효모분말을 기준으로 HPP만 1회처리한 경우와 효모분말(1) 대비 생리식염수9 비율로 혼합후 HPP를 1회처리하는 조건으로 하여 역시 HPP시스템의 세균효과를 검정하였다.

세균효과를 검정하기 위한 HPP처리조건은 권장처리방법에 따라 500MPa 압력조건에서, 15분동안 1회처리하는 조건으로 전체 시험구에 실시하였다.

3) 결과확인

HPP시스템의 세균효과를 확인하기 위하여, 시험구별 HPP처리전 균수를 확인한 후 HPP처리후 생존균수를 확인함으로써 결과를 확인하였다. 결과확인 방법은 식품공전(2008)의 미생물시험법의 일반세균 및 진균수 검정법에 준하여 실시하였다(표 7).

4) 결과

비교구로서 에탄올 처리구의 세균효과는 처리전 대비 약 40%의 범위를 효과를 나타내었다.

HPP시스템처리에 따른 시험구별 세균효과로서, 공시균중 효모균류 및 그림음성세균에(*E.sakazakii*, *E.coli* O157:H7, 장내세균(White colony, 미동정)대하여는 효과가 100% 입증되었지만, 그람양성균(*B. cereus*)의 경우는 세균효과가 거의 없는 것으로 확인되었다.

Ca-WPS분말제품내 존재하는 세균사멸 효과관정을 위하여, Ca-WPS분말만 처리한 대조구에서 공시균 전체에서 세균효과가 인정되지 않았다.

용해수 첨가비율에 따른 HPP시스템의 세균효과 검정결과, 용해수 첨가량별 유해세균에 대한 유의성은 인정되지 않았다.

결론으로서 HPP시스템은 Ca-WPS대량생산간 세균시스템으로 적합하지 않는 것으로 인정되었다.

표 7. 농도별 조성된 Ca-WPS내 감염세균(세균 및 효모)에 대한 HPP의 세균효과 조사결과

| 공시균별 시험구 | | 세균처리조건 | 세균효과(cfu/g) | |
|--|--------|---|----------------------|---------------------|
| | | | HPP처리전 | HPP처리후 |
| 대조구 | | Ca-WPS 공시균(세균) 감염처리(대조, HPP 무처리) | 2.5x10 ^{7@} | 3.4x10 ⁷ |
| 비교구 | | Ca-WPS 100g+70%EtOH 500g->6시간 경과후 | 2.5x10 ^{7@} | 1x10 ^{3#} |
| 3중혼합세균 -배지 : PCA | HPP-1 | Ca-WPS분말내 공시균(세균) 감염처리후 초고압처리 | 2.5x10 ^{7@} | 8x10 ^{6#} |
| | HPP-2 | Ca-WPS분말(1): 생리수(1) 혼합후 HPP 1회처리 | 2.5x10 ^{7@} | 1x10 ^{5#} |
| | HPP-3 | Ca-WPS분말(1): 생리수(1.5)혼합후 HPP 1회처리 | 2.5x10 ^{7@} | 2x10 ^{5#} |
| | HPP-4 | Ca-WPS분말(1): 생리수(1.8)혼합후 HPP 1회처리 | 2.5x10 ^{7@} | 9x10 ^{4#} |
| | HPP-5 | Ca-WPS분말(1): 생리수(2.0) 혼합후 HPP 1회처리 | 2.5x10 ^{7@} | 7x10 ^{4#} |
| | HPP-6 | Ca-WPS분말(1): 생리수(2.3)혼합후 HPP 1회처리 | 2.5x10 ^{7@} | 2x10 ^{4#} |
| | HPP-7 | Ca-WPS분말(1): 생리수(2.5)혼합후 HPP 1회처리 | 2.5x10 ^{7@} | 5x10 ^{4#} |
| 효모 (<i>Geotricum</i> ,PDA배지) | HPP-8 | 순수분리 <i>Geotricum</i> 분말(대조, 무처리) | 3.0x10 ¹² | ND |
| | HPP-9 | 순수분리 <i>Geotricum</i> 분말 HPP 1회처리 | 1.2x10 ¹² | ND |
| | HPP-10 | 순수분리 <i>Geotricum</i> 분말(1):생리수(9) 혼합후 HPP 1회처리 | 1.0x10 ¹¹ | ND |
| 효모 (<i>S.cereviase</i> JKK091002 ,PDA배지) | HPP-11 | 순수분리 <i>S.cereviase</i> JKK091002분말(대조, HPP무처리) | 80x10 ⁹ | ND |
| | HPP-12 | 순수분리 <i>S.cereviase</i> JKK091002분말 HPP 1회처리 | 1.2x10 ¹² | ND |
| | HPP-13 | 순수분리 <i>S.cereviase</i> JKK091002분말(1): RO수(9) 혼합후 HPP 1회처리 | 1.0x10 ¹¹ | ND |

ND: Not Detection, @ : 4종 공시균 혼합감염[감염균수 : 2.5x10⁷, *E.sakazakii*, *E.coli* O157:H7, 장내세균(White colony, 미동정), *B.cereus*], # : 검출균(*B.cereus*)

바. HPP시스템의 초유분말내 감염균에 대한 제균 및 물성변화 검정

1) 연구목적

본 연구는 식품으로서 유단백질류의 제품화에 있어 중요 규제사항 충족을 위하여, HTST 시스템 이외 HPP(High Pressure Protection)시스템을 적용시 제균성을 평가함과 동시에 제품의 안전성(물성변화)에 미치는 효과를 검정하였다(표 8).

즉, 제품의 영양성분의 변화를 유발하지 않으면서 제균효과가 뛰어나다고 알려진 초고압(HPP)시스템 효과를 검정함으로써 제품의 물성변화를 유발하지 않으면서 제균효과를 보유하는 생산시스템을 선발하고 저 하였다. 검정을 위한 시험구 및 시험방법은 다음과 같다.

2) 연구수행방법

HPP시스템의 제균효과를 점정하기 위하여, 전남식품산업연구센터(전남 나주)에서 보유중인 HPP시스템(모델명 :QFP-35L, QUINTUS사, 스웨덴)을 시험간 사용하였으며, 제균성 검정을 위한 기질단백질로서 초유분말(Fonterra사, 제품코드명 : NZMP, 뉴질랜드)을 시험간 사용하였다.

시험에 앞서 초유분말내 감염된 세균을 우선 검정하여 보았더니, *Bacillus.spp*계열의 특징을 보이는 세균이 5.8×10^2 cfu/g으로 검출되었으나, 사전 제균처리는 실시하지 않으므로 인위적으로 감염시킨 그람음성세균과의 HPP처리에 따른 제균효과를 비교하였다.

제균성 검정용 공시균 및 처리조건으로서 *E.sakazakii*, *E.coli* O157:H7 그리고 *B.cereus*을 각각 배양 후 이를 기질단백질(초유시료)내 동일균수를 산정하여 혼합 감염처리(1×10^4 cfu) 하는 조건으로 실시하였다. 그러나, 장내세균(White colony, 미동정)은 별도로 처리하였으며 처리조건은 동일하게 실시하였다.

시험구는 다음과 같이 조성하였다. 즉, 대조구로서는 초유분말내 용해수를 비침가 조건으로 하였으며, 시험구 조성은 초유분말(1 기준)대비 멸균 생리식염수를 2.5, 5, 7 및 9 비율로 용해 후 여기에 3종 공시균을 복합 감염시킨 조건에서 HPP처리하였다. 그리고, 이중 초유분말 용해액((1: 생리식염수 9)에 대하여 HPP처리 전후 영양성분(Lactose) 및 색상변화를 조사하였다.

전체시험간 HPP처리조건은 압력은 권장처리방법에 따라 500MPa 압력조건에서, 15분동안 1회처리하는 조건으로 실시하였다(표 9).

3) 결과확인

HPP시스템의 제균효과를 확인하기 위하여, 우선 시험구별 HPP처리전 균수를 확인하고 이어서 HPP처리후 생존균수를 확인함으로써 결과를 확인하였다. 결과확인 방법은 식품공전(2008)의 미생물시험법의 일반세균 검정법에 준하여 실시하였다.

또한, HPP처리 전후에 물성변화에 미치는 효과는 색상변화, 응고 및 응집 현상을 구분하고 매우심한경우는 +++, 심한 경우 ++, 보통인 경우는 +, 그리고 변화가 없는 경우는 -로 표시하여 결과를 제시하였다(표 10).

4) 결과

가) HPP시스템처리 제균효과 평가결과로서, 공시균중 그람음성세균인 *E.sakazakii*와 *E.coli* O157:H7대하여는 효과가 100% 입증되었지만, 그람양성균(*B. cereus*)의 경우는 제균효

과가 인정되지 않았다.

추가적으로, 초유분말에 초기 감염되어 있던 Bacillus계열과 인위적으로 감염처리한 그람음성세균에 대한 HPP처리를 통하여 확인 검정을 실시한 결과에서도, 역시 그람양성균류에 대하여 제균효과가 인정되지 않았다. 따라서, HPP시스템은 그람양성세균에 대하여는 사용이 불가능한 것으로 최종 확인하였다(그림 4).

나) HPP처리에 따른 물성 및 성장 변화검정결과, 초유분말기준 용해수의 첨가량이 적을수록 겔화현상과 경화현상이 심하게 나타나는 것으로 조사되었고, 용해수 처리농도와 상관없이 색상은 옅은 갈색을 나타내었다(표 11).

다) HPP처리에 따른 초유내 영양성분 변화를 Lactose를 기준으로 조사하였더니 HPP처리전은 9.97%가 검출되었는데, HPP처리후는 7.58%가 검출되어 약 24%가 감소되는 결과를 보였다, 따라서 HPP처리시 영양성분의 변화를 유발하는 것으로 조사되었다(그림 5).

라) HPP처리에 따른 물성변화를 최소한 유발하는 용해수 첨가농도는 초유분말 대비 5배 이상의 용해수 첨가가 필요로 한 것으로 판단되었으며, HPP적용시는 대상원료 및 제품특성에 따라 구분 사전 정밀검토가 필요로 한 것으로 판단되었다.

다) 결론으로서, 본 연구개발간 Ca-WPS 및 유단백질을 제품화함에 있어 중요한 안전성과 제균효과 보장에 있어 HPP시스템은 적절한 시스템으로 인정되지 않았다.

표 8. HPP시스템의 초유분말내 감염균에 대한 제균 및 물성변화 검정을 위한 시험조성표

| 시험구 | | HPP 제균처리조건 |
|--|-----------------------|--|
| HPP-0 | | 초유분말내 초기균수(Bacillus계열, 미동정) |
| HPP-1 | | 초유분말 HPP처리(생리식염수 미첨가) |
| HPP-2 | | 초유분말(1m 초기균수 보유) : 생리식염수(9) 혼합후 HPP처리(1회) |
| HPP-3 [@] | 초유분말내 고유균수 | 초유분말내 초기균수 (Bacillus계열, 그람양성균) |
| | <i>E.sakazakii</i> | [초유분말(1) : 생리식염수(9) 혼합] + 균(x10 ⁴ cfu) 접종후 HPP처리(1회) |
| | <i>B.cereus</i> | [초유분말(1) : 생리식염수(9) 혼합] 균(x10 ⁴ cfu) 접종후 HPP처리(1회) |
| | <i>E.coli</i> O157:H7 | [초유분말(1) : 생리식염수(9) 혼합] + 균(x10 ⁴ cfu) 접종후 HPP처리(1회) |
| HPP-4 ^{&} (장내세균, White colony) | | [초유분말(1) : 생리식염수(9) 혼합] + 장내세균 1종(비동정) 접종후 HPP처리(1회) (그람음성균) - 초유분말초기균 포함 |

표 9. HPP시스템의 초유분말내 감염균에 대한 제균효과 조사결과

| 시험구 | HPP 제균효과(cfu/g) | |
|------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| | HPP처리전 | HPP처리후 |
| HPP-0 | 5.8x10 ² | NT |
| HPP-1 | 5.8x10 ² | 5.8x10 ² (Bacillus계열) |
| HPP-2 | 5.8x10 ² | 8.0x10 ² (Bacillus계열) |
| HPP-3 [@] | 초유분말내 고유균수 | 8.0x10 ¹ (Bacillus계열) |
| | <i>E.sakazakii</i> | ND |
| | <i>B.cereus</i> | 7.4x10 ⁴ # |
| | <i>E.coli</i> O157:H7 | ND |
| HPP-4 ^{&} | 1.4x10 ⁶ | ND |

ND: Not Detection, NT: Not Testing, @ : 3종 공시균 혼합감염 [*E.sakazakii*, *E.coli* O157:H7, *B.cereus*], # : 검출균(*B.cereus*), & : 장내세균(White colony, 미동정) 처리구

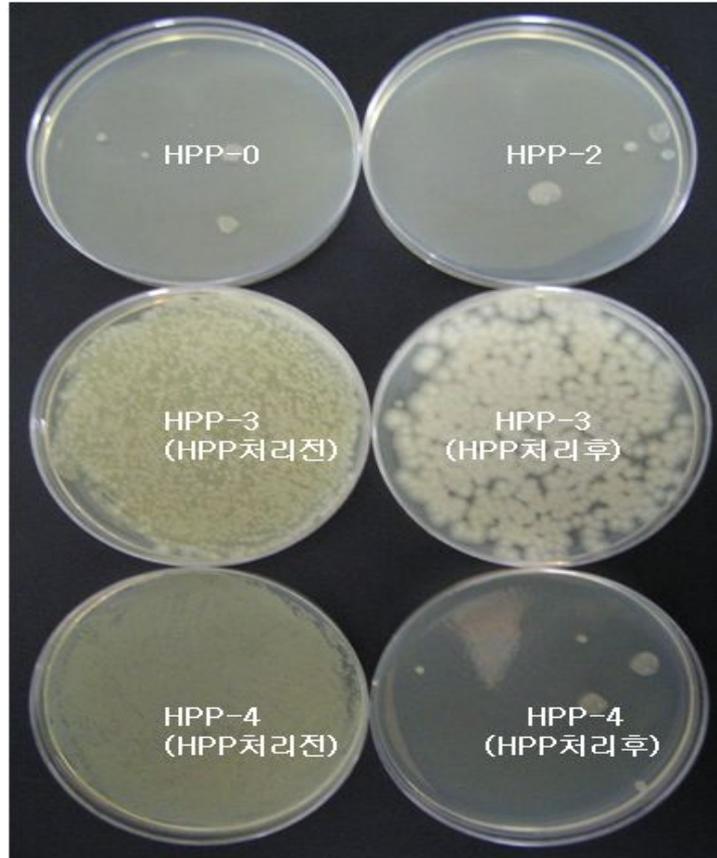


그림 4 . HPP시스템의 초유분말내 감염균에 대한 제균효과 조사결과

HPP-0[초유분말내 초기균수(Bacillus계열, 미동정)], HPP-1[초유분말 HPP처리(생리식염수 미첨가)], HPP-2[초유분말(1, 초기균수 보유) : 생리식염수(9) 혼합후 HPP처리(1회)], HPP-3[3종균혼합, 초유분말(1): 생리식염수(9) 혼합]+균($\times 10^4$ cfu) 접종후 HPP처리(1회), 초유분말초기균 포함], HPP-4[장내세균, White colony, 초유분말(1):생리식염수(9) 혼합]+장내 세균 1종(비동정) 접종후 HPP처리(1회), 그람음성균, 초유초기균수 포함]

표 10 . HPP시스템의 초유분말내 감염균에 대한 제균 및 물성변화 검정결과

| 시험구 | | 균종별HPP처리에 따른 제균효과(cfu/ml) | | | | HPP처리에 따른 성상변화 | |
|----------------|--------|---------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|----------------|------|
| | | Gram (-) | | | Gram(+) | 응고(경화) | 색상변화 |
| | | <i>E.sakazakii</i> | <i>E.coli</i> H7:O157 | WC | <i>B.cereus</i> | | |
| HPP (1:2.5) | HPP처리전 | 2.5x10 ⁶ | 3.2x10 ⁶ | 1.6x10 ⁶ | 4.8x10 ⁴ | ++ | ++ |
| | HPP처리후 | NT | NT | NT | NT | +++ | +++ |
| HPP (1:5) | HPP처리전 | 4.8x10 ⁶ | 6.2x10 ⁶ | 2.4x10 ⁶ | 6.0x10 ⁴ | - | + |
| | HPP처리후 | ND | ND | ND | 1.0x10 ⁴ | ++ | +++ |
| HPP (1:7) | HPP처리전 | 1.2x10 ⁷ | 1.1x10 ⁷ | 1.1x10 ⁶ | 4.2x10 ⁴ | + | + |
| | HPP처리후 | ND | ND | ND | 1.2x10 ⁴ | + | + |
| HPP (1:9) | HPP처리전 | 1.2x10 ⁷ | 1.4x10 ⁷ | 1.4x10 ⁶ | 4.0x10 ⁴ | - | + |
| | HPP처리후 | ND | ND | ND | 7.4x10 ⁴ | - | + |

- WC : White ccolony (장내세균, 미동정)

-성상변화 : 무현상-, 초기발생+, 심함++, 매우심함+++

- 초고압 처리조건 : 500MPa,15분 (초고압처리기, QFP-35L, QUINTUS사, 스웨덴)

- NT :Not Testing, -ND :Not Detection

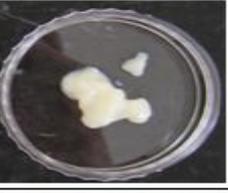
| 시험구 | HPP처리에 따른 성상(응고 및 색상)변화 | | |
|------------|---|--|---|
| HPP(1:2.5) |  |  |  |
| HPP(1:5) |  |  |  |
| HPP(1:7) |  |  |  |
| HPP(1:9) |  |  |  |
| | (대조) | (HPP처리전) | (HPP처리후) |

표 11 . 농도별 용해조건에 따른 초유분말의 HPP처리에 따른 물성변화 확인결과
 대조 : 시유), HPP(1:2.5): 초유분말(1) :생리식염수(2.5), HPP(1:5): 초유분말(1):생리식염수(5),
 HPP(1:7): 초유분말(1) :생리식염수(7), HPP(1:9): 초유분말(1) :생리식염수(9)비율 희석후 HPP처리,

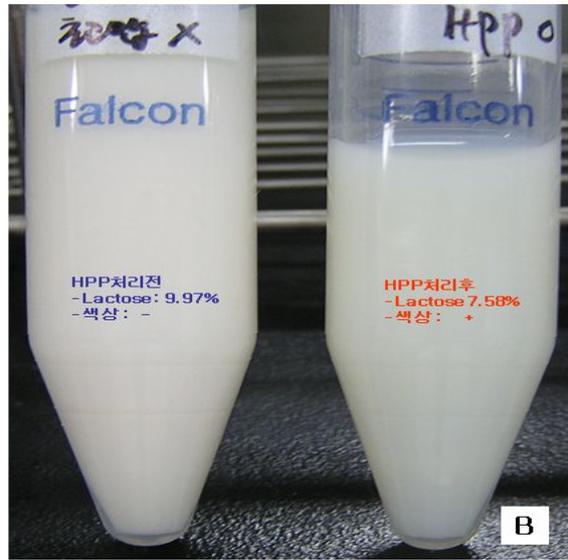
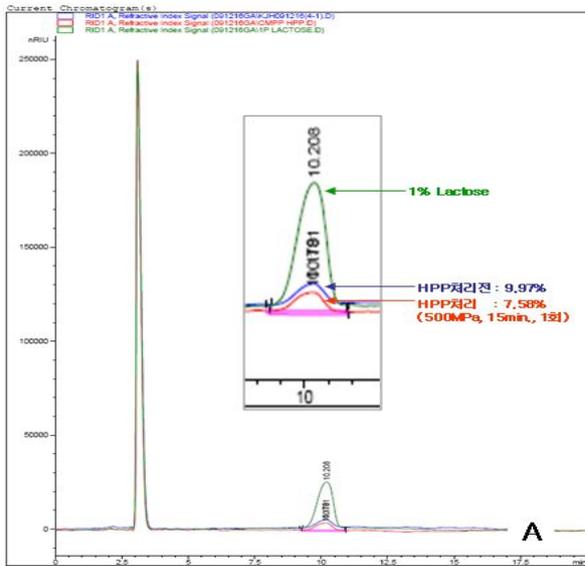


그림 5. 초유분말(2%, w/w) 용해액에 대하여 HPP처리에 따른 영양성분(Lactose) 및 색상변화 (초유분말1 : 생리식염수9)

사. 칼슘 킬레이팅 관련 기능기 극대화 효과 및 정상변화 판정

1) 연구목적

본 연구는 선발칼슘과 선발 기질단백질(유청분말)을 이용 칼슘-유기태화 체제를 제조함에 있어 설정된 제조방법을 적용하였는데, 칼슘함유량을 낮게(30,000~5,000ppm) 또는 높게(100,000ppm이상) 킬레이팅 반응이 유도되도록 확립된 제조기법을 적용시 킬레이팅 반응과 관련된 기능기의 변화, 형태적인 변화 및 구조분석을 동시에 검정하고 저 하였다,

2) 연구수행방법

실험구조성내역은 다음과 같다.

대조구로서는, 유청분말(매일유업) 50g을 정제수 300ml에 용해한 후 상온조건에서 30분동안 교반(150rpm)하였다. 그리고, 원심분리(10,000rpm,15℃,15분)후 동결건조 처리하였다.

비교구로서는 칼슘함유량이 낮게 킬레이팅 반응이 유도되도록 비열처리 방법을 적용하였다. 즉, 유청분말 50g 대비 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20g을 혼합한 후 정제수 300ml에 용해한 후 상온조건에서 30분동안 교반(150rpm)하였다. 그리고, 이를 원심분리(10,000rpm,15℃,15분)하고 침전물만을 대상으로 다시 멸균수 200ml를 첨가하여 현탁한 후 5회 반복 세척처리 과정을 거쳐 동결건조 처리하였다.

처리구는 칼슘함유량이 최대 80,000~100,000ppm이 되도록 반응조건(고온 처리)을 부여하여 제조하였는데, 칼슘킬레이팅 반응시 고온(89℃)조건하에서 30분동안 교반(150rpm)처리하는 조건을 제외하고는 비교구와 동일하게 실시하였다.

그리고, 처리구만을 대상으로 세척단계별 상층액만을 분취하여 음이온(Cl)의 제거효율 검정 시료로 사용하였다.

3) 결과 확인

동결처리된 시험구별 시료는 칼슘함유량(ICP분석)과 FT-IR분석을 실시하여 킬레이팅 관련 기능기를 분석하였으며, 형태특성을 파악을 위하여 SEM(Scanning Electron Microscope) 관찰을 하였다. 또한, XRD 분석을 통하여 기질단백질과 칼슘의 킬레이팅 반응에 유량이 따른 구조분석을 실시하였다. 그리고, 세척단계별 상층액내 음이온(Cl)의 제거효율은 IC분석법을 적용하여 검정하였다. 또한, 최초 유청분말 대비 최종 세척(5단계) 및 이를 동결건조 후 무게차이를 비교하여 생산수율을 확인하였다.

4) 결과

칼슘 킬레이팅 효율이 낮은제조법(30,000~50,000ppm)과 높은 제조법(80,000~100,000ppm)으로 구분하여 제조방법에 따른 킬레이팅 관련 기능기를 확인하여 보았더니, 칼슘 치환 기능기 $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, COO^- , $-\text{SH}$ 및 $-\text{P}$ 인 것으로 확인되었다. 그러나, 칼슘 킬레이팅 효율이 낮은제조법의 경우는 $-\text{NH}_2$ 와 $-\text{COOH}$, COO^- 가 주로 관여하는 것으로 판단되었는데, 반응온도가 높으면 추가적으로 $-\text{SH}$ 및 $-\text{P}$ 도 관여하는 것으로 조사되었다(표 12, 그림 6,7).

칼슘 킬레이팅 효율이 낮은 제조법보다는 높은 제조법의 경우가 킬레이팅 관력 기능기는 극대화되는 것으로 평가되었는데, 대조대비 10배(낮은 제조법)에서 최대 20배(높은 제조법)가 증가

되는 효과를 보였으며, Fe, Mn, Mg 및 Zn 등 미량원소량의 킬레이팅 함량도 역시 제조법에 따라 증가하는 결과를 확인하였다.

세척단계별 잉여미네랄 및 염소제거 공정을 확인하여 본 결과, 세척단계가 진행될수록 독성이 온인 염소이온과 미반응 미네랄이 제거되는 결과를 보였는데, 4차이상의 세척단계를 거치는 경우 100% 제거효율을 보였다. 이 과정에서 Na, K도 대부분 제거되는 결과를 확인하였다.

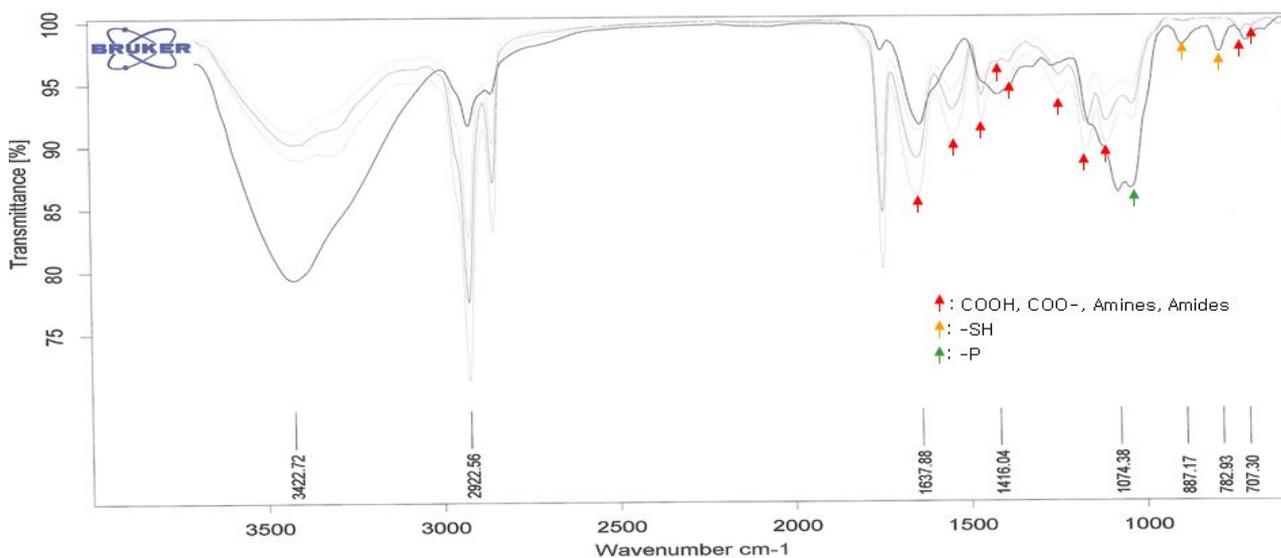
칼슘 킬레이팅에 따른 형태변화를 살펴보았더니, 대조 유청분말의 경우는 정형화된 형태가 없었으나 칼슘 유기태화제제의 경우는 구형형태를 보였으며, 입자 크기는 10~100 μm의 범위를 보였다.

칼슘과 기질단백질간의 생화학 결합에 따른 WPS에 대비 Ca-WPS의 Formular를 X-ray analysis(XRD)를 통하여 조사하여 본 결과, WPS는 정형화된 형태를 나타내지 못하였으나, Ca-WPS제제의 경우는 입자형성과 더불어 입자내 칼슘과 기질 단백질과의 결합에 따른 입자가 형성되었음을 확인할 수 있었다. 그리고, 결합구조는 Calcium Potassium Phosphate Hydrate $[Ca_2K_2(P_6O_{18}) \cdot 6(H_2O)]$, Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate $[Ca_8H_2(PO_4) \cdot 6H_2O]$, Potassium Calcium Hydrogen Phosphate $[CaK_3H(PO_4)_2]$, Brushite $[CaPO_3(OH) \cdot H_2O]$ 및 Calcium Sulfide Phosphate $[Ca_{10}(PO_4)_6S]$ 구조형태를 보유하고 있는 것으로 판명되었다. 이 결과를 기초로 SEM 분석을 통하여 외형구조 및 입자크기를 확인하여 보았더니, 입자크기는 10~100 μm이내의 구형 형태를 보였다.

또한, 유청분말 대비 최종 세척(5단계) 및 이를 동결건조후 무게차이를 비교하여 Ca-WPS의 생산수율을 확인한 결과 28%의 수율을 보였다.

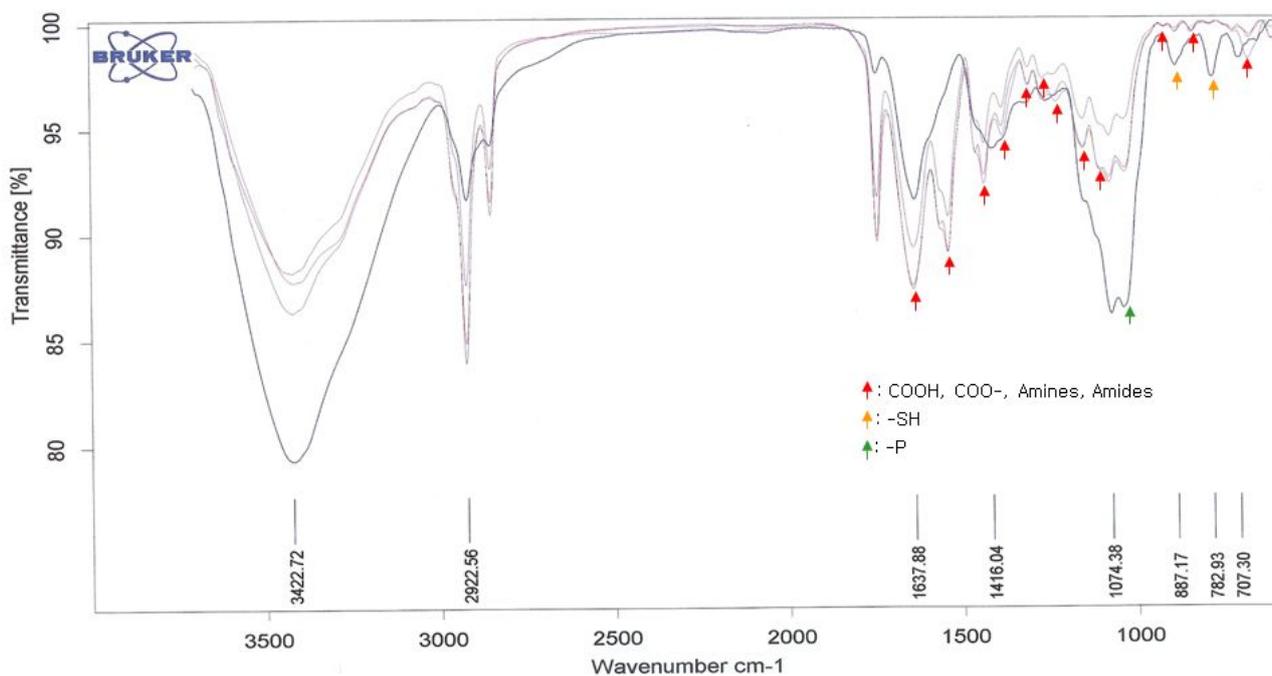
표 12. 칼슘 킬레이팅 극대화 제조법에 따른 관련 기능기 비교평가 결과

| 실험구 | 제조법에 따른 칼슘 도입 관련기능 평가 | | 비고 |
|-----|-----------------------|---|----|
| | 칼슘 킬레이팅 도입량(ppm) | 관련 기능기 | |
| 대조구 | 5,936 | - | |
| 비교구 | 36,450 | - NH ₂ , - COOH, - COO ⁻ | |
| 처리구 | 104,600 | - NH ₂ , - COOH, - COO ⁻ , - SH, -P | |



| | | | |
|--------------------------------------|-------------|-------------|------------|
| D:\FT-IR\2009\06\06104\090601GA(0).0 | 090601GA(0) | sample form | 2009/06/10 |
| D:\FT-IR\2009\06\06104\090601NA1-1.0 | 090601NA1-1 | sample form | 2009/06/10 |
| D:\FT-IR\2009\06\06104\090602NA2-1.0 | 090602NA2-1 | sample form | 2009/06/10 |
| D:\FT-IR\2009\06\06104\090602NA3-1.0 | 090602NA3-1 | sample form | 2009/06/10 |

그림 6. 기질단백질내 저농도 칼슘킬레이팅 제법적용(칼슘: 30,000~50,000ppm)에 따른 관련 기능기평가 결과



| | | | |
|--------------------------------------|-------------|-------------|------------|
| D:\FT-IR\2009\06\06104\090601GA(0).0 | 090601GA(0) | sample form | 2009/06/10 |
| D:\FT-IR\2009\06\06104\090601NA1-2.0 | 090601NA1-2 | sample form | 2009/06/10 |
| D:\FT-IR\2009\06\06104\090602NA2-2.0 | 090602NA2-2 | sample form | 2009/06/10 |
| D:\FT-IR\2009\06\06104\090602NA3-2.0 | 090602NA3-2 | sample form | 2009/06/10 |

그림 7. 기질단백질내 고농도 칼슘킬레이팅 제법적용(칼슘: 80,000~100,000ppm)에 따른 관련 기능기 평가 결과

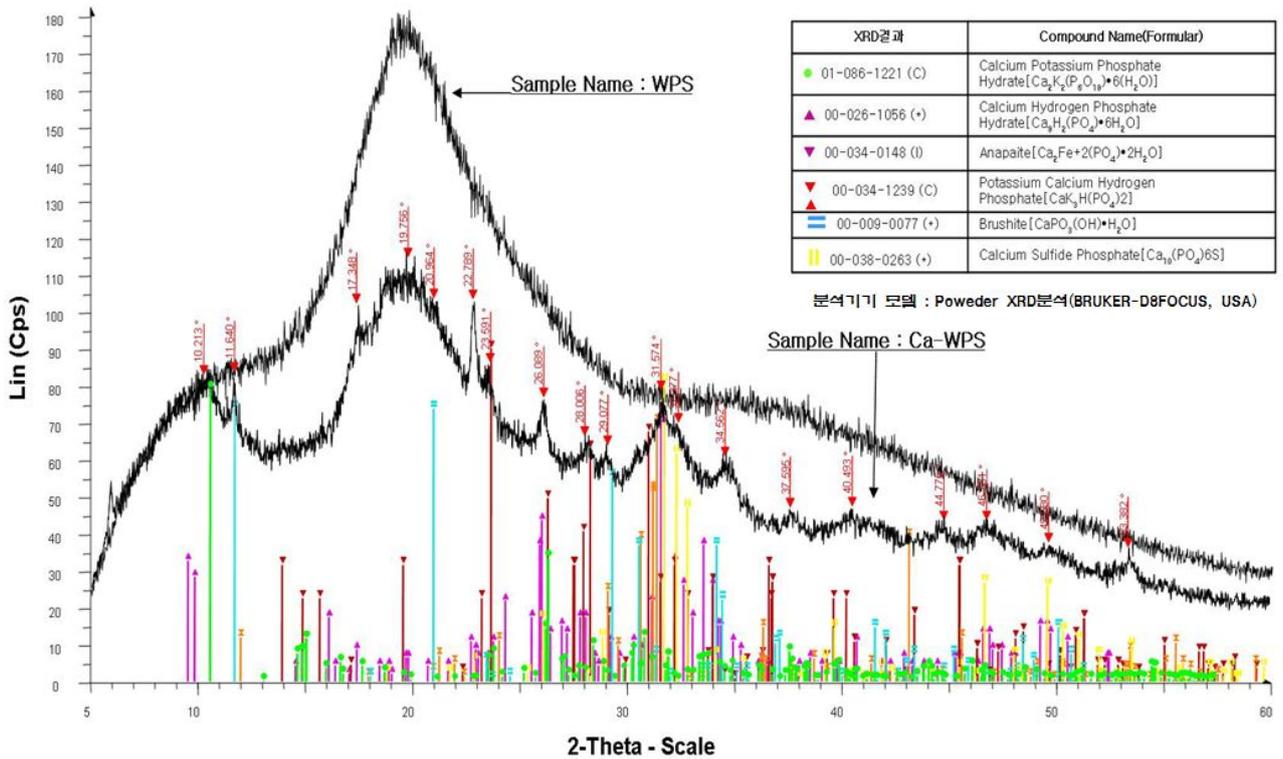


그림 8. 기질단백질내 고농도 칼슘킬레이팅 제법적용(칼슘: 80,000~100,000ppm)에 따른 입자형성 및 구조분석 결과(XRD분석결과)

표 13. 기질단백질내 고농도 칼슘킬레이팅 제법적용(칼슘: 80,000~100,000ppm)에 따른 구조분석 결과표(XRD분석결과)

| XRD결과 | Compound Name(Formular) | Y-Scale | d x by | Wavelength | System | a | b | c | alpha | beta | gamma | Bravais L | Space Group |
|-----------------|---|---------|--------|------------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|---------------|-------------|
| 01-086-1221 (C) | Calcium Potassium Phosphate Hydrate [Ca ₂ K ₂ (P ₂ O ₇) ₆ •6(H ₂ O)] | 43.56 | 1 | 1.5406 | Monoclinic | 7.266 | 11.833 | 12.3 | 90 | 103.17 | 90 | Primitive | P21/n (14) |
| 00-026-1056 (+) | Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate [Ca ₉ H ₂ (PO ₄) ₆ •6H ₂ O] | 119.95 | 1 | 1.5406 | Triclinic | 9.529 | 18.994 | 6.855 | 92.33 | 90.13 | 79.93 | | |
| 00-034-0148 (I) | Anapaite [Ca ₂ Fe+2(PO ₄)•2H ₂ O] | 49.53 | 1 | 1.5406 | Triclinic | 6.4508 | 6.8187 | 5.9017 | 101.65 | 104.26 | 70.76 | Primitive | P-1 (2) |
| 00-034-1239 (C) | Potassium Calcium Hydrogen Phosphate [CaK ₃ H(PO ₄) ₂] | 38.57 | 1 | 1.5406 | Monoclinic | 9.88 | 5.733 | 7.432 | 90 | 94.1 | 90 | Base-centered | C2/m (12) |
| 00-009-0077 (+) | Brushite, syn [CaPO ₃ (OH)•H ₂ O] | 40.58 | 1 | 1.5406 | Monoclinic | 6.363 | 15.19 | 5.815 | 90 | 118.5 | 90 | Base-centered | Cc (9) |
| 00-038-0263 (+) | Calcium Sulfide Phosphate [Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ S] | 44.59 | 1 | 1.5406 | Hexagonal | 9.4554 | 9.4554 | 6.8405 | 90 | 90 | 120 | Primitive | P63 (173) |

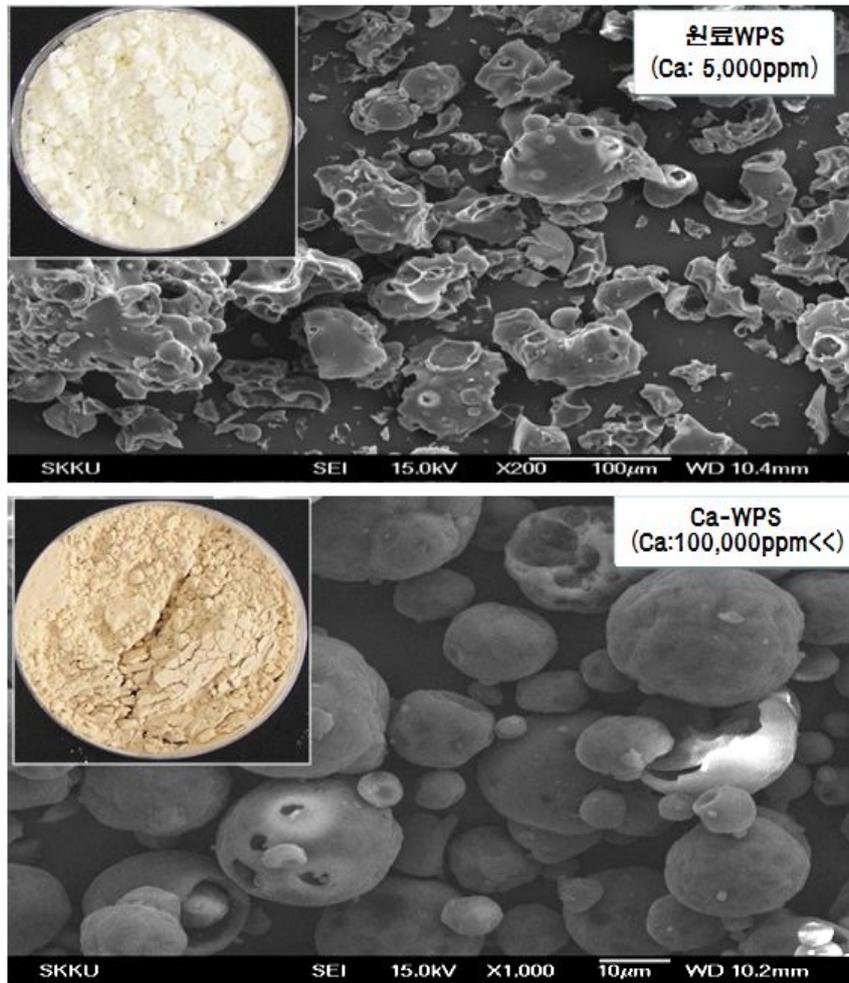


그림 9 . 기질단백질내 고농도 칼슘킬레이팅 제법적용(칼슘: 80,000~100,000ppm)에 따른 형태변화 조사결과(SEM)

아. 유청분말(WPS) 대비 칼슘유기태화(Ca-WPS)제조방법에 따른 생산수율조사 및 Ca 킬레이팅 유기태화 효율 검증

1) 연구목적

칼슘유기태화제 제조 연구결과와 대량생산시스템으로의 연계를 위하여 제조방법별 생산수율 조사결과를 살시코 저 하였다. 이를 위하여 유청분말만을 대상으로, 그리고 유청분말과 선발 칼슘을 첨가 및 미첨가 조건에서 열처리 및 비열처리 조건을 부여하여 확인하였다.,

2) 연구수행방법

대조구는 유청분말(WPS) 25g만을 정제수 200g에 용해시킨 후 교반(상온, 1,000rpm 1hr)하고, 열처리조건 없이 원심분리(10,000rpm, 15min. 15℃)후 침전물에 대하여 5회 정제수 세척을 실시한 후 최종 침전물은 동결건조 처리하였다.

비교구는, 유청분말(WPS) 25g만을 정제수 200g에 용해시킨 후 교반(RT, 1,000rpm 1hr)하면서 가온처리(90℃,30min, 1회)하고, 원심분리(10,000rpm, 15min. 15℃)후 침전물에 대하여 5회 정제수 세척을 실시한 후 최종 침전물은 동결건조처리하였다.

처리구 1은, 유청분말(WPS) 25g과 CaCl₂·2H₂O 10g을 먼저 혼합하고, 여기에 정제수 200g을 추가 투여 용해시킨 후 교반(상온, 1,000rpm 1hr)하고, 열처리조건 없이 원심분리(10,000rpm, 15min. 15℃)후 침전물 대하여 5회 정제수 세척을 실시한 후 최종 침전물은 동결건조 처리하였다.

처리구 2는, 유청분말(WPS) 25g과 CaCl₂·2H₂O 10g을 먼저 혼합하고, 여기에 정제수 200g을 추가 투여하고 용해시킨 후 교반(RT, 1,000rpm 1hr)하면서 가온처리(90℃,30min, 1회)처리하고, 원심분리(10,000rpm, 15min. 15℃)후 침전물에 대하여 5회 정제수 세척을 실시한 후 최종 침전물은 동결건조처리하였다.

3) 결과확인

생산수율 조사는, 시험구별 최초 유청분말(WPS) 대비 5회 서척후 동결건조물의 무게 비율을 비교하여 결과치로 제시하였다(표 14).

물리이화학적 조사는, 시험구별 조성후 열처리 전후에 있어 응고, 침전, 겔화, 부착 및 부유현상의 발생형태의 외관비교(-: 변화없음, + : 변화 발생, ++: 변화심함, +++: 변화 아주 심함)를 통하여 이를 확인하였으며, 동시에 pH변화를 확인하였다. 또한, 세척단계별 EC와 pH의 변화를 확인함과 동시에 최종 동결건조물에 대한 칼슘함유량을 비교하였다(표 15).

4) 결과

처리구별 생산수율을 조사한 경우, 대조구의 경우는 생산수율은 3.08% 그리고 칼슘함유량은 5,038ppm으로 나타났다. 그러나, 처리구 2의 경우는 28.8%의 높은 수율을 보였으며, 이때 칼슘함유량은 78,351ppm이었다. 그리고, 무기태 칼슘을 첨가하지 않았던 비교구의 경우에서 생산수율은 27%로 Ca-WPS제조방법인 처리구 2와 유사한 결과를 보였으나 칼슘함유량은 36,608ppm으로 46%의 킬레이팅 효과는 낮게 나타났다. 이는 유청분말이 보유하고 있는 고유 칼슘량이 열처리에 의해 단백질내로 농축되었음을 알 수 있었다. 그러나, 무기태 칼슘을 첨가하였으나 비열처리 시험구였던 처리구 1의 경우는 칼슘함유량은

87,828ppm으로 가장 높게 나타났으나 수율은 9.2%로 낮게 나타나 열처리 없이도 무기태화 칼슘의 킬레이팅 능력은 높은 것으로 보이나 입자화가 형성되지 않으므로써 세척시 손실이 많은 것으로 조사되었다.

시험구별 세척단계별 음이온 제거능력은 4차 이상의 세척공정을 실시하는 경우 대부분 제거되는 것으로 나타났다. 동시에 5차 세척과정이 종료된 경우에서 시험구별 pH의 변화를 확인하여 보았더니, 무기태 칼슘을 첨가하지 않았던 대조구와 비교구의 pH는 6.42로 중성을 나타내었으나, 무기태 칼슘을 첨가한 처리구 1과 Ca-WPS제제(처리구-2)의 pH는 4.26으로 다소 낮게 나타났다. 따라서, 칼슘이 킬레이팅 반응에 따라 pH의 수치는 다소 낮아지는 것을 확인하였다(표 16).

5차 세척과정이 종료된 시점에서 열처리 조건에 따른 안전성을 살펴보았는데, 비교구는 열처리후에 심한 침전현상과 벽면부착 및 부유현상이 발생하였으나, 처리구의 경우는 안전성에 문제가 발생하지 않았다. 다만, 처리구 2의 pH는 열처리전에 4.72였던 결과에 비하여 4.26으로 더욱 감소하는 경향을 보였다.

결론으로서, Ca-WPS대량생산시스템은 처리구 2조건으로 설정하였을 때, 생산수율이 가장 높으면서 안전성도 확보할 수 있으며, 또한 칼슘함유량도 가장 높은 제조방법으로 최종 결론지었다(표 17).

표 14. 유청분말(WPS) 및 칼슘유기태화(Ca-WPS)의 처리방법별 생산수율 조사결과

| 시험구 | 유청분말시료(g, A) | 유기태화후 시료 동결건조물(g, B) | 수율%, (B/A)x100 |
|-------|--------------|----------------------|----------------|
| 대조구 | 25 | 0.77 | 3.08 |
| 비교구 | 25 | 6.75 | 27 |
| 처리구1 | 25 | 2.3 | 9.2 |
| 처리구 2 | 25 | 7.2 | 28.8 |

표 15. 유청분말(WPS) 및 칼슘유기태화(Ca-WPS)의 처리방법별 물리이화학적 특성변화 조사

| 시험구 | 비열처리 | | | | | 열처리(90℃,30min., 1회) | | | | | 비고 | | | |
|------|------|----|----|----|----|---------------------|----|----|----|----|----|------|--------------|--------------|
| | 응고 | 침전 | 겔화 | 부착 | 부유 | pH | 응고 | 침전 | 겔화 | 부착 | | 부유 | pH | |
| 대조구 | - | - | - | - | - | 6.42 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | WPS : 비열처리 |
| 비교구 | - | - | - | - | - | 6.42 | - | ++ | - | + | ++ | 6.29 | WPS : 열처리 | |
| 처리구1 | - | - | - | - | - | 4.72 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | Ca-WPS :비열처리 |
| 처리구2 | - | - | - | - | - | 4.72 | - | - | - | - | - | 4.26 | Ca-WPS : 열처리 | |

-: 변화없음, + : 변화 발생, ++: 변화심함, +++: 변화 아주심함

표 16. 세척단계별 EC(s/m) 및 pH 변화(잉여 미네랄 및 독성이온 제거효과)

| 시험구 | 원액 | 1차 | 2차 | 3차 | 4차 | 5차 |
|------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 대조구 | 1.406/6.42 | 0.109/6.90 | 0.023/6.95 | 0.011/6.86 | 0.008/7.35 | 0.004/7.20 |
| 비교구 | 1.406/6.42 | 0.186/6.77 | 0.164/6.97 | 0.065/7.14 | 0.016/7.29 | 0.021/7.26 |
| 처리구1 | 2.0/4.72 | 0.575/5.77 | 0.307/6.58 | 0.040/6.95 | 0.034/7.13 | 0.019/7.32 |
| 처리구2 | 2.0/4.72 | 1.851/5.15 | 0.342/5.72 | 0.220/5.96 | 0.126/6.02 | 0.021/6.77 |

- 참 고 : 수도수(0.036/7.26), 1차 정제수(0.003/7.23)

표 17. 유청분말(WPS) 및 칼슘유기태화(Ca-WPS)의 처리방법별 칼슘함유량 조사결과

| 시험구 | ICP 측정결과(mg/Kg) | | | | | | | | | |
|------|------------------|----------------|----|--------------|---------------|----|----------------|-----------------|-------------|---------------|
| | Ca | P | Cu | Fe | Mg | Mn | K | Na | Zn | S |
| WPS | 5,038 ±5.6 | 3,717 ±69 | ND | 17.4 ±1.1 | 766 ±253 | ND | 8,714 ±79.8 | 6,236 ±123 | 15 ±10 | 1,054 ±484 |
| 대조구 | 5,403 ±2.1 | 3,487 ±731 | ND | 34.3 ±0.2 | 725 ±117 | ND | 33 ±0.5 | 2,830 ±671.6 | 68 ±0.7 | 1,520 ±325 |
| 비교구 | 36,608 ±163.4 | 7,800 ±388 | ND | 37.6 ±1.7 | 1,001 ±116 | ND | 707 ±174 | 336.5 ±66.9 | 35 ±15.1 | 3,148 ±137 |
| 처리구1 | 87,828 ±921 | 34,036 ±879 | ND | 79.7 ±1.6 | 906 ±198 | ND | 278 ±81 | 147.8 ±29.0 | 25 ±7.0 | 924 ±29 |
| 처리구2 | 78,351 ±1,683 | 17,493 ±198 | ND | 45.7 ±1.0 | 536.3 ±262 | ND | 601 ±112 | 220.4 ±38.0 | 25 ±19.4 | 2,653 ±639 |

자. Ca-WPS제제의 내산 및 내염기성 조사

1) 연구목적

본 연구는 선발 내열성 유청분말(WPS)기준 무기태화 칼슘제조시 용해수를 산성(pH 2.0), 중성(pH 6.7) 및 염기성(pH 10) 조건으로 조절한 뒤 킬레이팅 반응이 종료시 pH변화수치를 확인하고 열처리 조건 부여시 물리·이화학적 및 물성변화 검정을 통한 안전성 평가 및 최종 킬레이팅 결과 확인결과를 비교하여 내산 및 내염기성 평가를 실시코져 하였다.

시험구별 제조되고 건조된 시료에 대하여 우선 칼슘함유량 조사를 실시하고, 다음으로 우유내 동일량(w/w)의 칼슘유기태화 제제(칼슘함유량 차이부여)를 첨가 후 열처리 전후에 물성(내열성/물리·이화학적 변화)변화를 확인함으로써 제품적용성을 확인코져 하였다.

2) 연구수행방법

가) 내산 및 내염기성 조사

본 실험간 기질단백질로는 매일유업에서 생산된 유청분말(WPS)을 사용하였고, 킬레이팅 반응용 무기태화 칼슘은 염화칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 덕산)을 구입하여 사용하였다.

제품안전성 평가를 위한 시유로서는 매일유업 제품중 멸균유(Fresh milk, 200ml)를 구입하여 사용하였으며, 시험간 미생물 등의 오염 등을 고려하여 1회사용을 원칙으로 하였다.

본 연구는 Ca-WPS 제제 대량생산공정을 적용하여 실시하였다. 즉, 선발 내열성 유청분말(WPS)기준 무기태화 칼슘제조시 용해수를 산성(pH 2.0), 중성(pH 6.7) 및 염기성(pH 10) 조건으로 조절한 뒤 킬레이팅 반응이 종료 시 pH변화수치를 확인하므로써 내산 및 내염기성 결과를 확인하였다. 이를 위한 시험구는 다음과 같이 조성하였다.

대조구 1은, 유청분말 50g과 pH 6.7인 멸균정제수를 400g을 첨가 용해시킨 후 1시간동안 교반(120rpm)이 완료되면 pH를 측정하였다. 또한, 칼슘 킬레이팅 효과를 검정하기 위하여, 교반공정이 완료되면 이어서 원심분리(10,000rpm, 15℃, 15분)공정을 실시하였으며, 침전물에 대하여 2차 정제수를 사용 5회 반복 세척작업 후 동결건조하였다.

비교구 1은, 유청분말 50g과 20g($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Mw 146.99, Ca : 27.3%)를 혼합하고 여기에 pH 6.7 멸균정제수를 400g을 첨가 용해시킨 후 1시간동안 교반(120rpm)이 완료되면 pH를 측정하였다. 또한, 내산 내염기 조건에서 칼슘 킬레이팅 효과를 검정하기 위하여, 교반공정이 완료되면 이어서 원심분리(10,000rpm, 15℃, 15분)공정을 실시하였으며, 침전물에 대하여 2차 정제수를 사용 5회 반복 세척작업 후 동결건조하였다.

비교구 2는 유청분말 50g과 20g($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Mw 146.99, Ca : 27.3%)를 혼합하고 여기에 pH 2.0으로 조절된 멸균정제수를 400g을 첨가 용해시킨 후 1시간동안 교반(120rpm)이 완료되면 pH를 측정하였다. 또한, 내산 조건에서 칼슘 킬레이팅 효과를 검정하기 위하여, 교반공정이 완료되면 이어서 원심분리(10,000rpm, 15℃, 15분)공정을 실시하였으며, 침전물에 대하여 2차 정제수를 사용 5회 반복 세척작업 후 동결건조하였다.

비교구 3은 유청분말 50g과 20g($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Mw 146.99, Ca : 27.3%)를 혼합하고 여기에 pH 10으로 조절된 멸균정제수 400g을 첨가 용해시킨 후 1시간동안 교반(120rpm)이 완료되면 pH를 측정하였다. 또한, 내염기성 조건에서 칼슘 킬레이팅 효과를 검정하기 위하여, 교

반공정이 완료되면 이어서 원심분리(10,000rpm, 15℃, 15분)공정을 실시하였으며, 침전물에 대하여 2차 정제수를 사용 5회 반복 세척작업 후 동결건조하였다.

처리구 1은, 유청분말 50g과 20g($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Mw 146.99, Ca : 27.3%)를 혼합 후 여기에 pH 6.7으로 조절된 멸균정제수 400g을 첨가 용해시킨 후 1시간동안 교반(120rpm)이 완료하고, 열처리(75℃, 30분, 1회)공정을 실시한 후 pH를 측정하였다. 또한, 칼슘 킬레이팅 효과를 검정하기 위하여, 교반공정이 완료되면 이어서 원심분리(10,000rpm, 15℃, 15분)공정을 실시하였으며, 침전물에 대하여 2차 정제수를 사용 5회 반복 세척작업 후 동결건조하였다.

처리구 2는 유청분말 50g과 20g($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Mw 146.99, Ca : 27.3%)를 혼합 후 여기에 pH 2.0로 조절된 멸균정제수 400g을 첨가 용해시킨 후 1시간동안 교반(120rpm)이 완료하고, 열처리(75℃, 30분, 1회)공정을 실시한 후 pH를 측정하였다. 또한, 내산조건하에서 칼슘 킬레이팅 효과를 검정하기 위하여, 교반공정이 완료되면 이어서 원심분리(10,000rpm, 15℃, 15분)공정을 실시하였으며, 침전물에 대하여 2차 정제수를 사용 5회 반복 세척작업 후 동결건조하였다.

처리구 3은 유청분말 50g과 20g($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Mw 146.99, Ca : 27.3%)를 혼합 후 여기에 pH 10으로 조절된 멸균정제수 400g을 첨가 용해시킨 후 1시간동안 교반(120rpm)이 완료하고, 열처리(75℃, 30분, 1회)공정을 실시한 후 pH를 측정하였다. 또한, 내염기성 조건하에서 칼슘 킬레이팅 효과를 검정하기 위하여, 교반공정이 완료되면 이어서 원심분리(10,000rpm, 15℃, 15분)공정을 실시하였으며, 침전물에 대하여 2차 정제수를 사용 5회 반복 세척작업 후 동결건조하였다. 전체시험간 pH 조절은 1N-HCl 및 5% (w/v) NaOH용액으로 조절하였다.

전체시험간 WPS 및 Ca-유기태화 동결건조시료는 ICP분석과 제품적용성 평가를 위해 시유 첨가실험에 적용하였고, 칼슘유기태화 반응종료 및 제품적용성 평가를 위한 열처리조건은 78℃ (30분)에서 1회 처리하는 조건으로 실시하였다.

나) 제품적용성 평가

본 연구는 가)항의 시험구별 제조한 WPS 및 Ca-유기태화 동결건조시료는 ICP분석과 제품적용성 평가를 위해 시유 첨가실험에 적용하였는데, 시유 50g 대비 동결건조분말 0.5g비율로 혼합하는 조건으로 실시하였다. 또한, 칼슘유기태화 반응종료 및 제품적용성 평가를 위한 열처리조건은 75~78℃ (30분)에서 1회 처리하는 조건으로 실시하였다.

대조구 1은, 시유를 동결건조하여 준비한 시료를 시유 50g에 혼합하여 조성하였다.

대조구 2는, 열처리 시유(75℃, 30분, 1회)를 동결건조시료로 준비하여 시유 50g에 첨가하는 조건으로 조성하였다.

비교구 1은, 유청분말 0.5g을 시유 50g에 혼합하고 비열처리 조건으로 조성하였다

비교구 2는, 유청분말 0.5g을 시유 50g에 혼합한 후 열처리(75℃, 30분, 1회)조건으로 조성하였다

처리구 1은, 유청분말 50g과 20g($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)과 pH 6.7 조절정제수를 400g 첨가 용해 및 교반(1시간, 120rpm)공정이 완료 후, 원심분리 침전물을 세척(5회, 정제수)하여 동결건조시료로 준비하였다. 그리고 동결건조 시료 0.5g을 시유 50g에 혼합하고 비열처리 조건으로 조성하였다

처리구 2는, 유청분말 50g과 20g($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)과 pH 6.7 조절 정제수를 400g 첨가 용해 및 교반(1시간, 120rpm)공정이 완료 후, 원심분리 침전물을 세척(5회, 정제수)한 후 동결건조

시료로 준비하였다. 그리고 동결건조 시료 0.5g을 시유 50g에 혼합하고 이어서 열처리(75°C, 30분, 1회)조건으로 조성하였다

처리구 3은, 유청분말 50g과 20g(CaCl₂·2H₂O)과 pH 6.7 조절 정제수를 400g 첨가 용해 및 열처리(75°C, 30분, 1회)후 교반(1시간, 120rpm)공정과 원심분리 침전물을 세척(5회, 정제수)후 동결건조시료로 준비하였다. 그리고 동결건조 시료 0.5g을 시유 50g에 혼합하고 비열처리 조건으로 조성하였다

처리구 4는, 유유청분말 50g과 20g(CaCl₂·2H₂O)과 pH 6.7 조절정제수를 400g 첨가 용해 및 열처리(75°C, 30분, 1회)후 교반(1시간, 120rpm)공정과 원심분리 침전물을 세척(5회, 정제수)후 동결건조시료로 준비하였다. 그리고 동결건조 시료 0.5g을 시유 50g에 혼합하고 이어서 열처리(75°C, 30분, 1회)조건으로 조성하였다

처리구 5는, 유청분말 50g과 20g(CaCl₂·2H₂O)과 pH 2.0 조절정제수를 400g 첨가 용해 및 교반(1시간, 120rpm)공정이 완료 후, 원심분리 침전물을 세척(5회, 정제수)후 동결건조시료로 준비하였다. 그리고 동결건조 시료 0.5g을 시유 50g에 혼합하고 비열처리 조건으로 조성하였다

처리구 6은, 유청분말 50g과 20g(CaCl₂·2H₂O)과 pH 2.0 조절 정제수를 400g 첨가 용해 및 교반(1시간, 120rpm)공정이 완료 후, 원심분리 침전물을 세척(5회, 정제수)후 동결건조시료로 준비하였다. 그리고 동결건조 시료 0.5g을 시유 50g에 혼합하고 이어서 열처리(75°C, 30분, 1회)조건으로 조성하였다

처리구 7은, 유청분말 50g과 20g(CaCl₂·2H₂O)과 pH 2.0 조절 정제수를 400g 첨가 용해 및 열처리(75°C, 30분, 1회)후 교반(1시간, 120rpm)공정과 원심분리 침전물을 세척(5회, 정제수)후 동결건조시료로 준비하였다. 그리고 동결건조 시료 0.5g을 시유 50g에 혼합하고 비열처리 조건으로 조성하였다

처리구 8은, 유청분말 50g과 20g(CaCl₂·2H₂O)과 pH 2.0 조절정제수를 400g 첨가 용해 및 열처리(75°C, 30분, 1회)후 교반(1시간, 120rpm)공정과 원심분리 침전물을 세척(5회, 정제수)후 동결건조시료로 준비하였다. 그리고 동결건조 시료 0.5g을 시유 50g에 혼합하고 이어서 열처리(75°C, 30분, 1회)조건으로 조성하였다

처리구 9는, 유청분말 50g과 20g(CaCl₂·2H₂O)과 pH 10 조절정제수를 400g 첨가 용해 및 교반(1시간, 120rpm)공정이 완료 후, 원심분리 침전물을 세척(5회, 정제수)후 동결건조시료로 준비하였다. 그리고 동결건조 시료 0.5g을 시유 50g에 혼합하고 비열처리 조건으로 조성하였다

처리구 10은, 유청분말 50g과 20g(CaCl₂·2H₂O)과 pH 10 조절정제수를 400g 첨가 용해 및 교반(1시간, 120rpm)공정이 완료 후, 원심분리 침전물을 세척(5회, 정제수)후 동결건조시료로 준비하였다. 그리고 동결건조 시료 0.5g을 시유 50g에 혼합하고 이어서 열처리(75°C, 30분, 1회)조건으로 조성하였다

처리구 11은 유청분말 50g과 20g(CaCl₂·2H₂O)과 pH 10 조절 정제수를 400g 첨가 용해 및 열처리(75°C, 30분, 1회)후 교반(1시간, 120rpm)공정과 원심분리 침전물을 세척(5회, 정제수)후 동결건조시료로 준비하였다. 그리고 동결건조 시료 0.5g을 시유 50g에 혼합하고 비열처리 조건으로 조성하였다

처리구 12는, 유청분말 50g과 20g(CaCl₂·2H₂O)과 pH 10정제수를 400g 첨가 용해 및 열처리(75°C, 30분, 1회)후 교반(1시간, 120rpm)공정과 원심분리 침전물을 세척(5회, 정제수)

후 동결건조시료로 준비하였다. 그리고 동결건조 시료 0.5g을 시유 50g에 혼합하고 이어서 열처리(75°C, 30분, 1회)조건으로 조성하였다(표 20).

3. 결과확인

시험구별 제조된 건조시료의 미네랄 분석은 기본적으로 Ca에 한정하여 ICP분석을 실시하였고, 우유내 첨가 후에 열처리시 물성변화 조사항목으로서는 우유입자의 변화조사, 당도 변화, 삼투압 측정, 점도변화 및 pH와 전기전도도 항목으로 정하여 비교분석하였다.

항목별 결과확인을 위한 측정기기로 Size측정(μm)은 Lazer Particle analysis(MODEL SALD-2001(SHIMAZU사, 일본)를 당도측정은 Refractometer(Model ATAGO RX5000 α , Japan), 삼투압 측정은 VAPRO5520(WESCOR 사, 미국), 점도측정은 VIBRO Viscometer(Model SV-10, Japan)를 사용하였고, pH 및 EC 측정은 WM-22EP(DKK-TOA사, 일본)기종을 사용하였는데 측정방법은 기종별 권장방법에 준하여 실시하였다.

전체시험구의 동결건조전 시료는 물리이화학 특성을 조사하였으며, 동결건조 후 시료는 ICP 분석 및 시유첨가에 따른 저품적용성 평가에 사용하였다

시유 및 칼슘 킬레이팅 소재별 열처리전후 동결건조 준비한 시료를 시유 50g 대비 1g씩 첨가하는 조건에서 열처리 전후를 구분하여 안전성을 비교평가 하였다. 안전성 평가와 관련하여 항목으로는 응고, 겔화, 벽면부착, 부유현상 및 침전현상 발생유무를 비교검정 하였으며, 결과 제시는 매우심한 경우는 +++, 심한경우는 ++, 발생초기는 + 그리고 발생하지 않은 경우 -로 구분 표기하였다.

4. 결과

가) 내산 및 내염기성 평가결과

선발 내열성 유청분말(WPS)기준 무기태화 칼슘제조시 용해수를 산성(pH 2.0), 중성(pH 6.7) 및 염기성(pH 10) 조건으로 조절한 뒤 킬레이팅 반응이 종료 시 pH변화수치를 확인하므로써 내산 및 내염기성 결과를 확인하였다(표 18).

결과로서 pH를 2.0, 6.7 및 10으로 조절한 용해수를 이용하여 칼슘유기태화 반응을 종료시 대조구의 경우는 pH 6.7이었으나, 처리구의 열처리에 상관없이 4.6~4.8로 나타났는데, 이는 칼슘유기태화 제조공정에서 산성 및 염기성 상관없이 중화능력을 보유하고 있는 특성을 확인하였다. 그러나, 산 및 알카리 용액을 지속적으로 첨가하거나 농도를 증가하는 경우 안전성에 있어 문제가 발생할 수 있을 것으로 예측된다.

산 및 염기성 조건에서 제조한 칼슘유기태화 제제의 안전성을 평가하기 위하여, 78°C에서 열처리를 실시하여 보았더니 칼슘 킬레이팅 효율이 극대화 될 수록, 비중차이를 나타내어 용액상 침전현상이 증가하는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 고유 유단백질 열변성에 따른 부착, 부유, 겔화 및 응고 등의 현상과는 많은 차이를 보임으로서 칼슘유기태화에 따른 비중증가로 인한 특성으로 인정되었으며, 제품화 적용시도 비중문제를 제외하고는 안전성에 있어 문제가 없을 것으로 판단되었다.

내산 및 내염기성 조건에서 제조된 시험구별 칼슘 킬레이팅 효과를 비교하여 보았더니, 유청분말은 자체가 5.308ppm의 함유하고 있었지만 열처리시는 9,936ppm으로 증가되어

열변성 인자에 의하여 약 50%의 킬레이팅 증가효과를 얻을수 있는 것으로 조사되었다

이를 기준으로 동일 무기태화 칼슘을 혼합하고 중성, 산성 및 염기성 조건에서 칼슘함유량을 열처리전과 후단계로 비교하여 보았다.

결과로서, 열처리전 중성과 산성 조건은 55,000~60,000ppm 범위로 검출결과를 보였었는데 염기성 조건은 95,630ppm으로 가장 킬레이팅 능력이 뛰어남을 알 수 있었다.

이를 기준으로 열처리시 결과를 살펴보았더니 중성 및 산성조건에서는 약 110,000ppm의 수치를 보임으로서 역시 기본유기태화 반응간 약 60,000ppm의 킬레이팅 효과가 열처리공정을 통하여 추가적으로 50,000ppm이상을 더 증강시킬 수 있음을 알 수 있었다. 그러나, 염기조건에서 열처리전은 95,630ppm으로 칼슘이 검출되었는데 열처리 후는 61,000ppm으로 나타나 오히려 약 40,000ppm을 감소시키는 것으로 조사되었다. 이는 알카리성 물질이 단백질을 용해시키는 고유특성과 지방류의 경우는 비누화 반응을 유발한다는 것을 고려할 때 충분한 이유가 되었다. 따라서, 유청분말 및 칼슘유기태화 공정에 있어 염기성 조건은 안전성이 결여되어 있다고 판단되었는데 제품화 적용에 있어 알카리제제의 경우는 사용을 피하여야 함을 생각하게 되었다(표 19).

나) 제품적용성 평가결과

내산 내염기성 유기태화 제조 후, 제품 적용성을 평가하기 위한 목적으로 제품(시유대상) 내 첨가시 칼슘함유량은 증가하되 제품안전성(물리이화학적 변화 등) 저해결과가 발생하는지 평가하였다.

결과로서, 실험구별로 칼슘함유량을 사전인지하고 있는 칼슘유기태화 제제를 시유내 첨가시, 비례하여 검출 칼슘량 또한 증가하였다. 또한, 물리이화학적 변화에 미치는 영향이 있는지를 살펴본 결과, 삼투압(대조 255mmol/kg 대비), pH(대조 6.8 대비), 입자크기(대조 0.612um 대비) 및 당도변화(대조 12.65Brix 대비)에 미치는 영향은 대조 대비 차이가 없었다. 그러나, 전체 처리구중 칼슘유기태화 제제를 첨가한 경우, 1일이 경과시 칼슘킬레이팅화에 따른 비중차이로 침전현상이 발생하였으나, 우려할 만한 수준은 아닌 것으로 평가되었다. 따라서, 제품 적용성을 평가하기 위한 목적으로 칼슘유기태화 제제를 제품내 첨가시 칼슘함유량은 증가하되 제품안전성은 문제가 없는 것으로 평가되었다(표 21).

표 . 칼슘 유기태화 반응조건에서 내산 및 내염기 처리에 따른 이화학적 변화조사

| 시험구 | WPS (g) | CaCl ₂ .2H ₂ O 첨가량(g) | 용해수(ddH ₂ O) | | 용해후 pH변화 (WPS+CaCl ₂ +ddH ₂ O) | 비고 |
|-------|------------|--|-------------------------|-----|---|------|
| | | | g | pH | | |
| 대조구 | 50 | 20 | 400 | 6.7 | 6.7 | WPS |
| 비교구 1 | 50 | 20 | 400 | 6.7 | 4.8 | 비열처리 |
| 처리구 1 | 50 | 20 | 400 | 6.7 | 4.8 | 열 처리 |
| 비교구 2 | 50 | 20 | 400 | 2.0 | 4.6 | 비열처리 |
| 처리구 2 | 50 | 20 | 400 | 2.0 | 4.6 | 열 처리 |
| 비교구 3 | 50 | 20 | 400 | 10 | 4.8 | 비열처리 |
| 처리구 3 | 50 | 20 | 400 | 10 | 4.8 | 열 처리 |

- 열처리 조건 : 75℃(30분, 1회)처리

표 18. 내열성 유단백질(유청)내 칼슘 킬레이팅 도입(열처리 전/후)에 따른 형태적 변화

| 시험구 | 칼슘함유량 (ppm) | 열안전성평가결과(열처리조건: 78℃, 30분, 1회) | | | | | |
|------|----------------|-------------------------------|----|----|----|----|---|
| | | 응고 | 침전 | 겔화 | 부착 | 부유 | |
| 열처리전 | 대조구 | 5,308 | - | - | - | - | - |
| | 비교구 1 | 59,936 | - | ++ | - | - | - |
| | 비교구 2 | 55,630 | - | ++ | - | - | - |
| | 비교구 3 | 95,630 | - | ++ | - | - | - |
| 열처리후 | 대조구 | 9,936 | - | - | - | - | - |
| | 처리구 1 | 107,000 | - | ++ | - | - | - |
| | 처리구 2 | 103,000 | - | ++ | - | - | - |
| | 처리구 3 | 61,000 | - | ++ | - | - | - |

표 19. 내산 내염기성 유기태화 칼슘소재의 시유첨가에 따른 칼슘함유량 변동내역

| 시험구 | 제품적용성 평가용 시유 및 칼슘함량 | | 시유내 칼슘-유기태화소재 첨가량(동결건조시료) | | 비고 |
|--------|------------------------|--------------------|------------------------------|-------------------|------|
| | 첨가량 (g) | 고유칼슘량 (mg/50ml) | 첨가량 (g) | 칼슘함량 (mg/0.5g) | |
| 대조구 1 | 50 | 49.9 | 0 | 0 | 비열처리 |
| 대조구 2 | 50 | 51.2 | 0 | 0 | 열처리 |
| 비교구 1 | 50 | 49.9 | 0.5 | 2.65 | 비열처리 |
| 비교구 2 | 50 | 51.2 | 0.5 | 2.65 | 열처리 |
| 처리구 1 | 50 | 49.9 | 0.5 | 4.97 | 비열처리 |
| 처리구 2 | 50 | 51.2 | 0.5 | 4.97 | 열처리 |
| 처리구 3 | 50 | 49.9 | 0.5 | 53.5 | 비열처리 |
| 처리구 4 | 50 | 51.2 | 0.5 | 53.5 | 열처리 |
| 처리구 5 | 50 | 49.9 | 0.5 | 27.82 | 비열처리 |
| 처리구 6 | 50 | 51.2 | 0.5 | 27.82 | 열처리 |
| 처리구 7 | 50 | 49.9 | 0.5 | 51.5 | 비열처리 |
| 처리구 8 | 50 | 51.2 | 0.5 | 51.5 | 열처리 |
| 처리구 9 | 50 | 49.9 | 0.5 | 47.82 | 비열처리 |
| 처리구 10 | 50 | 51.2 | 0.5 | 47.82 | 열처리 |
| 처리구 11 | 50 | 49.9 | 0.5 | 30.5 | 비열처리 |
| 처리구 12 | 50 | 51.2 | 0.5 | 30.5 | 열처리 |

-열처리 조건 : 75℃, 30분, 1회 처리

표 20. 내산 내염기성 검정시료(동결건조, 칼슘-킬레이팅 소재)의 시유내 첨가 및 열처리(전/후)시 칼슘함유량 및 물리이화학적 변화검정을 위한 조성표

| 실험번호 | 칼슘변화량 (ppm) | 열안전성평가결과(열처리조건: 75℃, 30분, 1회) | | | | 비고 |
|--------|----------------|-------------------------------|-----|-----------------|----------|------|
| | | 삼투압(mmol/Kg) | pH | Size(um) | 당도(Brix) | |
| 대조구 1 | 8,507 | 255 | 6.4 | 0.612± 0.154 | 12.65 | 비열처리 |
| 대조구 2 | 8,857 | 264 | 6.6 | 0.608± 0.153 | 12.60 | 열처리 |
| 비교구 1 | 7,986 | 288 | 6.6 | 0.629± 0.153 | 13.51 | 비열처리 |
| 비교구 2 | 8,127 | 288 | 6.6 | 0.640± 0.151 | 13.57 | 열처리 |
| 처리구 1 | 11,000 | 247 | 6.6 | 0.643± 0.149 | 12.87 | 비열처리 |
| 처리구 2 | 9,285 | 249 | 6.6 | 0.755± 0.259 | 12.73 | 열처리 |
| 처리구 3 | 10,130 | 253 | 6.7 | 0.680± 0.188 | 12.88 | 비열처리 |
| 처리구 4 | 9,284 | 256 | 6.8 | 0.646± 0.147 | 12.86 | 열처리 |
| 처리구 5 | 10,290 | 248 | 6.8 | 0.646± 0.145 | 12.88 | 비열처리 |
| 처리구 6 | 7,982 | 248 | 6.8 | 0.644± 0.141 | 12.86 | 열처리 |
| 처리구 7 | 11,410 | 254 | 6.8 | 0.626± 0.142 | 12.80 | 비열처리 |
| 처리구 8 | 9,135 | 254 | 6.8 | 0.624± 0.144 | 12.69 | 열처리 |
| 처리구 9 | 11,520 | 244 | 6.6 | 0.635± 0.146 | 12.86 | 비열처리 |
| 처리구 10 | 10,880 | 244 | 6.7 | 0.683± 0.232 | 12.68 | 열처리 |
| 처리구 11 | 13,050 | 252 | 6.8 | 0.647± 0.163 | 12.78 | 비열처리 |
| 처리구 12 | 12,260 | 248 | 6.6 | 0.694± 0.230 | 12.85 | 열처리 |

제 3 절 Ca-WPS의 제품적용성 평가

1. 연구목적

본 연구의 목적은 내열성 및 내산성 보유 Ca-WPS소재를 정립된 유기태화 기법에 준하여 기질 단백질인 유청단백질 대비 칼슘함유량이 다르게 각각 제조한 후 제품적용성 평가를 대표적으로 우유를 대상으로 평가하였다.

평가는 시험구별 제조되고 건조된 시료에 대하여 우선 칼슘함유량 조사를 실시하고, 다음으로 우유내 동일량(w/w)의 칼슘유기태화 제제(칼슘함유량 차이부여)를 첨가 후 열처리 전후에 물성(내열성/물리/이화학적 변화)변화를 확인함으로써 제품적용성을 확인하고자 하였다.

2. 연구수행방법

본 실험간 기질단백질로는 매일유업에서 생산된 유청분말(WPS)을 사용하였고, 킬레이팅 반응용 무기태화 칼슘은 염화칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 덕산)을 구입하여 사용하였다. 시유로서는 매일유업 제품중 멸균유(Fresh milk, 200ml)를 구입하여 사용하였으며, 시험간 미생물 등의 오염 등을 고려하여 1회사용을 원칙으로 하였다. 칼슘함유량별 차이를 부여한 칼슘 유기태화 제조는 다음과 같은 시험구로 조성되었다.

대조구 1은, 멸균유 50g을 열처리공정 없이 동결건조하였다.

대조구 2는 멸균유 50g을 분취하여 열처리(89℃, 30분, 1회)후 동결건조실시하였다.

비교구 1은 유청분말 25g과 0.5g($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)를 혼합하고 여기에 2차 정제수 100g을 첨가 용해시킨 후 1시간동안 교반(120rpm)하고 원심분리(10,000rpm, 15℃, 15분)공정을 실시하였으며, 침전물에 대하여 2차 정제수를 사용 5회 반복 세척작업 후 동결건조하였다,

비교구 2는 유청분말 25g과 5.5g($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)를 혼합하고 여기에 2차 정제수 100g을 첨가 용해시킨 후 1시간 동안 교반(120rpm)하고 원심분리(10,000rpm, 15℃, 15분)공정을 실시하였으며, 침전물에 대하여 2차 정제수를 사용 5회 반복 세척작업 후 동결건조하였다,

비교구 3은 유청분말 25g과 25g($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)를 혼합하고 여기에 2차 정제수 100g을 첨가 용해시킨 후 1시간 동안 교반(120rpm)하고 원심분리(10,000rpm, 15℃, 15분)공정을 실시하였으며, 침전물에 대하여 2차 정제수를 사용 5회 반복 세척작업 후 동결건조하였다,

처리구 1은 유청분말 25g과 0.5g($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)를 혼합하고 여기에 2차 정제수 100g을 첨가 용해시킨 후 1시간 동안 교반(120rpm)하고, 열처리(89℃, 30분, 1회)공정을 실시하였다. 그리고, 원심분리(10,000rpm, 15℃, 15분)공정을 실시하였으며, 침전물에 대하여 2차 정제수를 사용 5회 반복 세척작업 후 동결건조하였다,

처리구 2는 유청분말 25g과 5.5g($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)를 혼합하고 여기에 2차 정제수 100g을 첨가 용해시킨 후 1시간 동안 교반(120rpm)하고, 열처리(89℃, 30분, 1회)공정을 실시하였다. 그리고, 원심분리(10,000rpm, 15℃, 15분)공정을 실시하였으며, 침전물에 대하여 2차 정제수를 사용 5회 반복 세척작업 후 동결건조하였다,

처리구 3는 유청분말 25g과 15g($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)를 혼합하고 여기에 2차 정제수 100g을 첨가 용해시킨 후 1시간 동안 교반(120rpm)하고, 열처리(89℃, 30분, 1회)공정을 실시하였다. 그리고, 원심분리(10,000rpm, 15℃, 15분)공정을 실시하였으며, 침전물에 대하여 2차 정제수를 사용 5회 반복 세척작업 후 동결건조하였다,

전체 시험구별 동결건조시료는 ICP분석과 제품적용성 평가를 위해 시유 첨가실험에 적용하였는데, 시유 50g 대비 동결건조분말 1g비율로 혼합하는 조건으로 실시하였다.

제품적용성 평가를 위한 열처리조건은 89~90°C (30분)에서 1회처리하는 조건으로 실시하였다.

3. 결과확인

시험구별 제조된 건조시료의 미네랄 분석은 기본적으로 Ca에 한정하여 ICP분석을 실시하였고, 우유내 첨가후에 열처리시 물성변화 조사항목으로서는 우유입자의 변화조사, 당도 변화, 삼투압 측정, 점도변화 및 pH와 전기전도도 항목으로 정하여 비교분석하였다.

항목별 결과확인을 위한 측정기기로 Size측정(μm)은 Lazer Particle analysis(MODEL SALD-2001(SHIMAZU사, 일본)를 당도측정은 Refractometer(Model ATAGO RX5000 α , Japan), 삼투압 측정은 VAPRO5520(WESCOR 사, 미국), 점도측정은 VIBRO Viscometer(Model SV-10, Japan)를 사용하였고, pH 및 EC 측정은 WM-22EP(DKK-TOA사, 일본) 기종을 사용하였는데 측정방법은 기종별 권장방법에 준하여 실시하였다.

전체시험구의 동결건조전 시료는 물리이화학 특성을 조사하였으며, 동결건조 후 시료는 ICP 분석 및 시유첨가에 따른 저품적용성 평가에 사용하였다

시유 및 칼슘 킬레이팅 소재별 열처리전후 동결건조 준비한 시료를 시유 50g 대비 1g씩 첨가하는 조건에서 열처리 전후를 구분하여 안전성을 비교평가하였다. 안전성 평가관련하여 항목으로는 응고, 겔화, 벽면부착, 부유현상 및 침전현상 발생유무를 비교검정하였으며, 결과제시는 매우심한 경우는 +++, 심한경우는 ++, 발생초기는 + 그리고 발생하지 않은 경우 -로 구분 표기하였다(표 2).

4. 결과

가. 칼슘 유기태화에 따른 Ca-WPS내 칼슘함유량 조사결과

시험구별 칼슘 킬레이팅 효과를 평가하여 보았더니, 비열처리 시유(대조구 1)의 칼슘함유량은 1,136ppm이었는데, 열처리 시유(대조구 2)의 경우는 1,167ppm으로 조사되어 열처리에 따른 시유의 칼슘함유량 변화는 차이가 없었다.

유청분말 25g 대비 칼슘을 0.5g, 5.5g 그리고 15g을 처리한 경우에서 비열처리 시험구들의 칼슘함유량을 확인하여 보았더니 37,410ppm(비교구 1), 68,230ppm(비교구 2) 그리고 31,190ppm(비교구 3)으로 나타났다. 여기에 비하여 열처리시는 57,240ppm(처리구 1), 52,770ppm(처리구 2) 그리고 가장 높은 농도인 15g의 칼슘을 킬레이팅 반응시켰던 처리구 3의 경우는 104,600ppm으로 나타났다. 이는 유청분말 25g(1 기준) 대비 킬레이팅 반응을 위한 칼슘으로 15g(0.6 당량, 순수 칼슘함유량 : 4g)을 혼합 후 열처리시 최초 칼슘량(160,000ppm 기준) 대비 65%(104,600ppm)가 킬레이팅화 되었다는 것을 알 수 있었으며, 가장 적절한 혼합비율인 것으로 판단되었다.

나. 칼슘 유기태화에 따른 물리이화학적 특성조사결과

시험구별 열처리전후의 물성 및 이화학적 변화를 비교하여 보았다. 대조구의 열처리전후

의 pH는 6.60에서 6.68로 증가하면서 동시에 시유내 물질들의 입자사이즈 또한 0.614에서 0.694 μm 로 그리고 점도 또한 역시 증가하는 경향을 보여 열처리시 열변성이 유발되면서 많은 물성변화가 발생하였다는 것을 생각할 수 있었다(표 1).

이를 기준으로 이화학적 변화를 확인하여 보았더니, EC수치는 열처리전 0.519에서 열처리후에 0.522mS로 증가하였는데, 이는 당도 및 삼투압 수치들 역시 증가하는 경향을 보였다. 이러한 열처리에 의해 단백질 열변성이 일어나면서 이온성 물질이 용매내로 증가되는 이유로 판단되었다.

비열처리에 따른 물리이화학적 특성 조사결과를 기준으로 비교구와 처리구간 결과를 비교하여 보았다. 0.5g의 칼슘을 처리한 경우에서 열처리 전후에 pH, EC, 당도 및 삼투압의 변화는 인정되지 않았으나, 유청분말 점도와 입자사이즈만 증가하는 경향을 보였다.

칼슘의 첨가량을 증가시킨 시험구의 경우에서 EC, 삼투압의 수치는 열처리 후에 다소 증가하는 경향을 보였는데, 당도와 점도는 다소 감소하는 결과를 보였다. 이러한 결과를 비교구 및 처리구별 칼슘 킬레이팅 효과가 칼슘처리농도 및 열처리에 따라 비례하여 증가하였던 결과와 연계하여 보면 유청분말내 유단백질, 지방류 및 미네랄류 등이 동시에 킬레이팅화 되면서 입자화되고 이에 따라 무기물 및 단백질 등의 구성인자들이 감소됨으로 되는 이유인 것으로 판단되었다.

다. Ca-WPS제제 제품적용성 평가결과

시유 및 칼슘 킬레이팅 소재별 열처리전후 동결건조 준비한 시료를 시유 50g 대비 1g씩 첨가하는 조건에서 열처리조건을 부여하였는데, 열처리 전후를 구분하여 대조구와 비교하여 안전성을 비교평가하여 보았다.

결과로서, 응고, 겔화, 벽면부착 및 부유현상은 나타나지 않았으나 칼슘 킬레이팅에 따라 Ca-WPS제제가 고유적으로 보유한 비중차이로 인한 침전현상이 전체적으로 나타났다. 또한, 대조 대비 유기태화 소재 첨가시 입자크기가 증가 현상보였는데, 이는 대량생산시스템 적용시 균질기 공정을 삽입하므로서 해결가능할 것으로 판단되었다. 또한, 시유 대비 pH, EC, 삼투압, 당도 및 점도 변화는 없는 것으로 조사되어 최종 개발 Ca-WPS제제는 제품적용성에서 문제가 없는 것으로 판단되었다.

표 1. 시험구별 칼슘 유기태화제제 시유첨가 및 열처리에 따른 물리이화학적 변화조사

| 시험구 | | Ca 함유량 (동결건조.ppm) | 물리이화학적 정상변화(칼슘유기태화 소재->시유 첨가결과) | | | | | |
|------|-------|----------------------|---------------------------------|------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------|--------------|
| | | | pH (Temp, °C) | EC (mS) | Soluble Solides (Brix, %) | Osmolality (mmol/Kg) | Viscosity (cP) | Size (µm) |
| 열처리전 | 대조구 1 | 1,136±25 | 6.60(25.7) | 0.519 | 12.28 | 241 | 2.61 | 0.614± 0.162 |
| | 비교구 1 | 37,410± 2,606 | 6.57(25.7) | 0.241 | 12.39 | 236 | 2.81 | 1.918± 0.482 |
| | 비교구 2 | 68,230± 5,105 | 6.50(26.3) | 0.247 | 12.80 | 238 | 2.21 | 1.923± 0.482 |
| | 비교구 3 | 31,090± 2,089 | 6.52(26.1) | 0.242 | 12.30 | 234 | 2.05 | 2.029± 0.483 |
| 열처리후 | 대조구 2 | 1,167±11 | 6.68(23.7) | 0.522 | 12.85 | 248 | 2.66 | 0.694± 0.230 |
| | 처리구 1 | 57,240± 3,298 | 6.56(25.7) | 0.240 | 12.44 | 239 | 2.23 | 2.070± 0.493 |
| | 처리구 2 | 52,770± 3,031 | 6.15(25.8) | 0.256 | 12.53 | 242 | 2.19 | 1.875± 0.484 |
| | 처리구 3 | 104,600± 4,804 | 6.42(25.9) | 0.259 | 12.24 | 243 | 2.12 | 1.823± 0.480 |

표 2. 시험구별 칼슘 유기태화제제 시유첨가 및 열처리에 따른 안전성 평가결과

| 시험구 | | Ca 함유량 (동결분말, ppm) | 열안전성평가결과(가열전후 정상변화, 89°C, 30분, 1회) | | | | |
|------|-------|-----------------------|------------------------------------|----|----|----|----|
| | | | 응고 | 침전 | 겉화 | 부착 | 부유 |
| 열처리전 | 대조구 1 | 1,136±25 | - | - | - | - | - |
| | 비교구 1 | 37,410± 2,606 | - | ++ | - | - | - |
| | 비교구 2 | 68,230± 5,105 | - | ++ | - | - | - |
| | 비교구 3 | 31,090± 2,089 | - | ++ | - | - | - |
| 열처리후 | 대조구 2 | 1,167±11 | - | - | - | - | - |
| | 처리구 1 | 57,240± 3,298 | - | ++ | - | - | - |
| | 처리구 2 | 52,770± 3,031 | - | ++ | - | - | - |
| | 처리구 3 | 104,600± 4,804 | - | ++ | - | - | - |

제 4 절 Ca-WPS대량생산시스템 구축

1, 연구목적

본 연구에서는 “칼슘-유기태화(Ca-WPS)소재 선발 및 킬레이팅 기법연구” 연구결과를 토대로 칼슘 유기태화 제제(Ca-WPS) 대량생산시스템을 구축하고, 이를 적용하기 위하여 3차 시제와 2차 시작품을 제조하였다.

2. 연구수행방법(칼슘-유기태화 제제 대량생산시스템 정립부분)

Ca-WPS제제 대량생산공정 시스템은 10단계로 정리되었다.

- 1 단계는, 치즈제조공정에 따른 부산물인 유청액(TS : 2%) 용액을 TS 30~32로 농축하여 농축유청을 제조하는 단계이다.
- 2 단계는, 농축유청액내 지방을 크림분리기로 제거하는 단계이며, 이는 기질 유청단백질과 무기태화 칼슘의 킬레이팅 반응후 세척시 NF시스템의 NF필터의 막힘을 예방하기 위함이기 때문에 주요한 핵심공정이라 할 수 있다.
- 3 단계는 무지유청액을 건조분말화 하기 위한 Spray Drying공정이며, 이때 균질화 및 제균공정이 동시에 진행되는 단계이다. 제균공정은 HTST(High Temperature Short Time, 85℃, 15초, 1회) 시스템을 적용한다.
- 4단계는 건조 유청분말과 킬레이팅 반응을 위한 칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)을 혼합하는 단계인데, 이때 혼합비율은 유청분말(1 기준) 대비 칼슘제제는 0.6비율이 적절하다.
- 5단계는 칼슘과 기질 유청단백질간 1차 유기태화반응을 유도하는 단계인데, 정제수를 유청분말 무게 대비 4배수를 투입하고 용해 및 교반하는 단계인데 1,000rpm이상의 교반속도로 1시간을 반응시킨다. 이때 목표 칼슘킬레이팅량(85,000~100,000ppm)의 50%가 반응하는 단계이다.
- 6 단계는 열처리를 통하여 칼슘의 킬레이팅 효과를 2배이상 증가(85,000~100,000ppm)시키면서 Ca-WPS제제의 입자화(미네랄 올리고펩타이드 TYPE)를 유도하는 단계이다. 이 단계의 중요성은 입자화가 완료되면 물리 및 이화학적 변화에 크게 안정화가 가능하기 때문에 핵심적인 단계이다.
- 7 단계는 미반응한 잉여칼슘 및 독성이온(염소이온)제거를 위한 세척단계이며, 이때 사용하는 시스템은 NF시스템을 사용하고, 정제수를 사용하여 5회 반복 세척함으로써 미반응 칼슘 및 이온을 제거하는 단계이다. 이때 사용되는 필터는 Nano필터로서 이온 및 염류 분자량 100~1,000범위 및 입자크기는 0.002um이하의 경우는 용매와 같이 제거되지만 이외는 제거되지 않으므로 칼슘유기태화 제제 생산시 세척시스템으로 중요하다.
- 8단계는 균질화 공정이다. 칼슘유기태화 반응간 유청단백질의 입자는 1.8um까지 성장한다, 따라서 균질화를 통하여 0.2~0.6um까지 균일화를 유도하는 단계이다.
- 9 단계는 제균공정이며 HTST(High Temperature Short Time, 85℃, 15초, 1회) 시스템을 적용한다. 이는 칼슘-유기태화 제제 생산을 위한 원료가 고영양성분으로서 미생물의 오염이 쉽게 될 수 있다. 또한, 칼슘유기태화 제제 자체가 원료이면서 완제품이므로

로 제균에 대한 공정이 절대적으로 필요하다 할 수 있다.
10단계는 건조분말화 단계이며, 175℃에서 시간당 200Kg생산비율로 건조한다.

3. 결과확인

최적화 칼슘-유기태화 대량생산시스템 적용 공정도에 따라 시작품을 다음과 같이 제조하여 보았다.

가. 무지농축유청분말 제조

- 1 단계 : 우선 치즈제조 후 생산되는 유청액을 총고형분 함유량이 35.1%(조지방 함유량 2.5%)되게 1,100K(pH 6.06, 산도 0.34)을 농축시켰다.
- 2 단계 : 이어서 이를 우유 크림분리기(Tetra Park사, Tetra Centri[®] AirTight 모델)에서 1회 통과공정을 거쳐 농축유청액내 거대지방구를 제거함으로써 미세지방구만 함유된(NF필터 통과가능 Size) 조지방 함유량 0.9%의 저지방 농축유청액을 제조하였다.
- 3 단계 : 이어서 균질화 및 HTST(High Temperature Short Time, 85℃, 15초, 1회)시스템을 적용한 제균작업(처리전 총균수 : 7.2×10^6 cfu/ml)을 완료(총균수 : 0 cfu/ml) 하였다.
- 4단계 : 그리고, 열풍건조(175℃, 200Kg/hr)공정을 거쳐 최종 저지방 유청분말 340Kg(수분함유량 2.6%, 조지방 : 2%)을 제조하였다. 결과로서, 농축유청액 대비 저지방 유청분말 생산수율은 31%였다.

나. 칼슘-유기태화(Ca-WPS)제제 대량생산

- 1 단계 : 10톤 반응기에 저지방 유청분말(WPS) 500Kg와 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 200Kg을 충전한 후 30분간 혼합하였다.
- 2 단계 : 혼합공정이 완료되면 여기에 정제수 4,000Kg을 추가 투입한 후 상온조건에서 5,000rpm 속도로 1시간 동안 교반하면서 용해과정을 진행하였다.
- 3 단계 : 교반공정 완료되면 반응기의 온도를 90~94℃범위로 승온시킨 후 승온이 완료되는 시점에서 30분동안 반응시킴으로서 칼슘-유기태화 반응을 종료시켰다.
- 4 단계 : 칼슘-유기태화 반응공정이 종료되면 NF시스템을 거쳐 우선 잉여 칼슘 및 염소이온을 제거하였으며, NF시스템을 통과한 칼슘-유기태화 세척물은 10톤 저장조로 이송시킨 후 정제수 5톤을 충전함으로써 1차 세척작업을 완료하였다. 이 과정을 5회 실시하여 잉여 칼슘 및 염소이온이 100% 제거된 칼슘유기태화 제제를 제조하였다(IC측정).
- 5단계 : 잉여 칼슘 및 염소이온 제거공정이 완료되면 정제수를 추가로 투입하여 총고형분 20%의 칼슘-유기태화 희석액을 제조하였다.
- 6단계 : 균질화 공정으로서, 총고형분 20%의 칼슘 유기태화 희석용액을 균질기를 통과시켜 입자사이즈가 0.2~0.6um까지 균질화를 완료 하였다(Particle Lazer analyzer 분석).
- 7단계 : 균질화 공정이 완료되면 HTST시스템을 온도조건 85℃에서 15초 속도로 통과시켜 제균작업을 완료하였으며, 미생물 검출결과 불검출로 판정되었다(미생물시험법).
- 8단계 : 제균공정이 완료되면 최종 건조분말화 공정을 실시하였는데, 175℃에서 시간당 200Kg생산비율로 열풍건조 하였다.

9 단계 : 열풍공정이 완료된 칼슘-유기태화 제제는 100Kg 생산되었는데, 무지유청분말 대비 생산수율은 28.8%였다.

4. 결과

가. 칼슘-유기태화(Ca-WPS) 제제 대량생산시스템 공정도는 그림 1.과 같다.

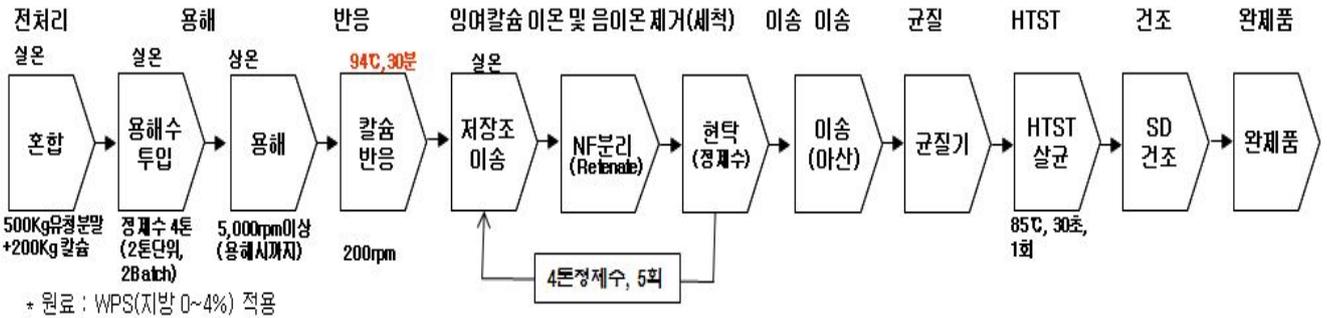


그림 1. 칼슘-유기태화(Ca-WPS) 제제 대량생산시스템 및 공정도

나. Ca-WPS대량생산시스템 적용 제품생산결과(경제성 평가)

원료 저지방 WPS 대비 Ca-WPS의 칼슘킬레이팅 효과를 비교하여 보았더니, WPS의 경우 칼슘의 함유량이 5,038ppm이었는데 Ca-WPS제제는 87,828ppm으로 높게 나타났으며 칼슘의 킬레이팅 효과가 증가하면서 관련기능기인 P과 S이온 또한 높은수치로 증가하였으나, Mg, K와 Na의 함량은 감소하였는데, 세척간 제거됨으로 인한 것으로 판단되었다.

표 1. 정립 대량생산시스템 적용 제조한 Ca-WPS 제제의 킬레이팅 효과(대량생산 시스템 적용)

| 시험구 | ICP 측정결과(Mean±SD., mg/Kg) | | | | | | | | | | 비고 |
|--------|---------------------------|------------|----|-------|-----------|-----------|-------------|------------|----|-----------|-----------------|
| | Ca | P | Cu | Fe | Mg | Mn | K | Na | Zn | S | |
| WPS | 5,022 ±167 | 5,516 ±136 | ND | ND | 1,604 ±16 | ND | 26,239 ±482 | 7,359 ±129 | ND | 1,666 ±30 | 지방 WPS 7%함유 |
| Ca-WPS | 87,828 ±243 | 16,524 ±62 | ND | 19 ±1 | 276 ±5 | 0.2 ±0.08 | 246 ±29 | 158 ±4 | ND | 4,380 ±97 | 원료: 4% 지방함유 WPS |

- ND : Not-Detection

다. Ca-유기태화제제의 SPEC.

- 1) 색상 : 옅은 미색의 분말제품
- 2) 이미. 이취 : 유청냄새 및 유청맛
- 3) pH : 6.06(Ca-WPS 분말 1%(w/w) 정제수 희석액 조건에서 측정)
- 4) 입자 Size : 10~100 μm(20~80 mesh)
- 5) 칼슘함유량(ppm) : 85,000~100,000ppm
- 6) 음이온(Cl⁻) 검출량(ppm) : < 0.01

7) 미생물 검출(HTST시스템 공정적용): 99%이상

- 총 균 수 : 음성

- 대장균군 : 음성

라. 대량생산에 따른 경제성 평가

1) 생산수율 : 28% (원료 WPS 대비)

2) Ca-WPS 생산단가 : 10,000원/Kg(원료비 기준)

- 산출근거 : 유청분말(2,000원/1Kg x 450Kg) + 칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,000원/Kg x 200Kg)

3) 칼슘 100mg함유량 대비 경제성(Ca 100mg함유/1.2g) : 11.20원 /1.2g당

제 5 절 개발 Ca-WPS제제의 제품화(제형화 및 레시피 정립)

1. 연구수행방법

본 연구는 개발된 Ca-WPS를 원료로 하여 제품화를 위한 제형 및 제형별 레시피를 설정하였다. 제형화 성상으로는 바로 섭취가 가능한 정제형 그리고 액상제품내 첨가시 분산과 용해가 쉽도록 한 과립형으로 하여 레시피를 정립하였다.

이를 위하여, 건강기능성 식품제조회사이면서, 정제형 및 과립형 생산시설을 보유하고 관련 제품개발에 관한 KNOW-HOW를 충분히 보유하고 있는 아미코젠사(경남 진주소재)에 의뢰하여 제형별 레시피를 정립하였다.

제형별 레시피 조건으로서, 정제형은 1정(750mg/1정)으로, 과립형은 1포(Stick 포장)당 2,000mg으로 정하였고 이때 첨가되는 Ca-WPS(칼슘함유량 : 87,000ppm)의 칼슘함유량은 정제형은 50mg, 과립형은 100mg이 되도록 조건을 부여하였다(그리 1).

제형별 섭취에 따른 조건으로서, 정제형은 위내에서 분해되어 위장관내에서 흡수되도록 제형화 조건을 부여하였고, 과립형은 액상음료를 통한 섭취를 기준으로 하였으므로 액상제품내에서 혼합이 용이토록 하는 조건으로 정하였다.

제형별 제품은 추후 영유아부터 성인까지 전연령대에 적용이 가능하도록 영유아식 제품제조기준으로 하여 사용재료는 식품공전(식약청, 2010) 및 식품첨가물공전(한국식품공업협회,2007)에 등재된 재료만을 엄선하여 최종 레시피 조성을 완료하였다.

2. 결과

가. 과립형 유기태화 칼슘제제 및 정제형 유기태화 칼슘제품의 레시피는 표 2.과 같다.

나. 경제성 평가결과로서, 정제형 1정(750mg) 및 과립형 1포(Stick)당 제조단가는 10~15 원으로 단일제품으로 사용하든지, 타제품에 첨가하는 경우라도 생산원가에 미치는 영향은 없는 것으로 평가 되었다.

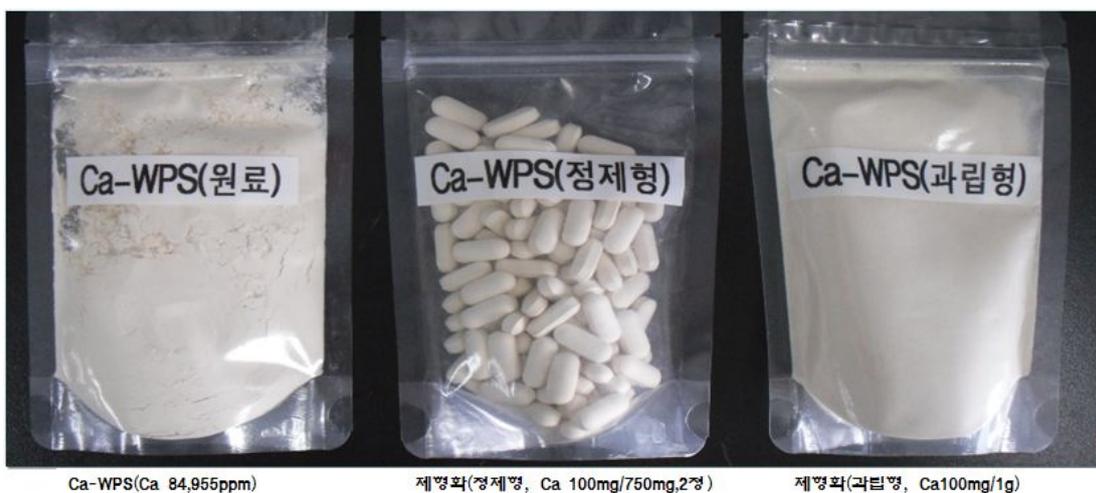


그림 1. 대량생산시스템 적용 제조된 Ca-WPS와 이를 이용한 기능성 제품

표 1. 칼슘 유기태화(Ca-WPS) 제제의 제형화 및 레시피 정립결과(TYPE : 과립형)

| 제품명 | Ca-WPS(과립) | | | 제형 1 STICK(포) | | 과립 | |
|------|---|--------|----------|------------------|------|------------|--|
| | 원료명 | 배합비 | mg | 단가(원) | Ca함량 | 50kg 제조(g) | Ca 100mg/2,000mg |
| 조성비 | Ca-WPS | 60.00 | 1,200.00 | 4.0 | 102 | 30.00 |  샘플과립 사진 Size : << 20mesh |
| | 폴리덱스트로즈 | 26.00 | 520.00 | | | 13.00 | |
| | 이소말트 | 10.00 | 200.00 | | | 5.00 | |
| | 스테아린산마그네슘 | 2.000 | 40.00 | | | 1.00 | |
| | HPMC | 2.000 | 40.00 | | | 1.00 | |
| | 합계 | 100.00 | 2,000.00 | | | 15.4 | |
| 생산수율 | 50kg 과립제조시 생산수율: 95% 수율 적용(타점갯수: 23,750 stick/2g) | | | | | | |

표 . 칼슘 유기태화(Ca-WPS) 제제의 제형화 및 레시피 정립결과(TYPE : 정제형)

| 제품명 | Ca-WPS(정제) | | | 제형 (정) | | 정제 | |
|------|---|---------|---------|-----------|------|------------|--|
| | 원료명 | 배합비 | mg | 단가(원) | Ca함량 | 50kg 제조(g) | Ca 50mg/750mg/정 |
| 조성비 | Ca-WPS | 80.00 | 600.00 | 4.3 | 50 | 40.00 |  샘플타정 사진 가로(긴쪽) 약 1.8cm, 세로 0.8cm 두께 약 0.5cm |
| | 결정셀룰로오스 | 82.50 | 82.50 | | | 5.50 | |
| | 폴리덱스트로스 | 5.00 | 37.50 | | | 2.50 | |
| | HPMC | 3.00 | 22.50 | | | 1.50 | |
| | 미산화규소 | 1.00 | 7.50 | | | 0.50 | |
| | 합계 | 100.000 | 750.000 | | | 10.9 | |
| 생산수율 | 50kg 타정시 생산수율: 95% 수율 적용(타점갯수: 63,333점) | | | | | | |

제 6 절 연구결과에 따른 업적평가(인력양성포함)

본 과제 수행에 따른 업적은 다음과 같다.

1. 특허부분 : 특허출원 2건 완료

- 특허 1 : 유기태화 칼슘 함유량이 높은 유단백질의 제조방법
(출원번호 : 10-2009-0112661. 2009.11.20.)
- 특허 2 : 골다공증예방 효과를 가지는 유기태화 칼슘강화 유단백질
(출원번호 : 진행중 : 2010.12.15. 선임특허변리사 특허청 접수완료)

2. 논문 : 국제학회 2건(포스터 발표 완료), 국내학회 1건(투고 중)

1) 유기태화 칼슘(Ca-WPS)제제 개발부분

- 가) 본 연구결과는 국내외적으로 식품관련회사 뿐만 아니라, 관련산업 전반에서 절실히 요구되는 바, 고품질 제품생산과 마케팅에 활용할 것이므로, 특허등록후 논문발표부분을 제외한 모든자료는 비밀보존을 원칙으로 할 것임. 따라서, 절차에 의거 비밀유지 요청과정을 실시할 것임.
- 나) 특허확보가 완료 후, 논문, 특허, 보고서원문, 기술요약정보부분은 “국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정”에 의거 등록 및 기탁을 할 수 있으며, 추후 논문 및 특허진행 결과는, 매년 활용보고서 제출 시 보고 할 것임.

2) 유기태화 칼슘제제(Ca-WPS)의 안전성, 체내 이용성 및 효능평가

가) 1차 연구결과 : 유기태 칼슘의 성장기 흰쥐에서 안전성평가

- 국제학회명: Journal of American College of Nutrition), Poster발표 (2010.10.01)
- 제목: Bioavailability of novel organic calcium supplements by calcium-milk chelation in growig rats.

나) 2차 연구결과 : 유기태 칼슘의 골다공증 흰쥐에서 칼슘이용성 평가

- 게재학회명: Journal of American Societies For Experimental Biology. poster발표 (2011.04.게재예정)
- 제목: Efficacy of novel organic calcium supplements on the bone metabolism in ovariectomized osteoporosis rat model

다) 난소절제 골다공증 흰쥐모델에서 유기태 칼슘보충제가 칼슘 이용성과 생리 기능에 미치는 효과(2010.12.15. 한국영양학회지 투고완료)

3) 과제를 통한 인력양성 및 고용창출현황

가) 인력고용(주관기관 연구소 근무) : 2인(석사급 연구원)

- 근무처 : 매일유업 중앙연구소 김재홍 연구원, 김민호 연구원

나) 인력양성 : 석사 1인

- 서울대학교 식품영양학과 조수정(2011.02. 석사 취득예정)
- 논문 : 난소절제 골다공증 흰쥐모델에서 유기태 칼슘보충제가 칼슘 이용성과 생리 기능에 미치는 효과

제 7 절 칼슘-유단백질 킬레이팅 유기태 칼슘제재 (Ca-WPS)의 안전성, 체내 이용성 및 효능평가

1. 연구배경 및 목적

2008년 국민건강영양조사¹³⁾에 의하면, 칼슘 섭취량은 전 연령층에서 권장량 대비 평균 섭취량이 부족한 상태이며, 성인 남녀의 칼슘 권장량은 700mg이나 섭취율은 기준대비 65.7% 정도이며, 최대 골질량 형성을 위해 칼슘 섭취가 높아야 할 청소년기의 칼슘 섭취량은 권장량 대비 50% 수준으로 나타났다. 지속적인 칼슘 섭취의 부족은 결국 성인기의 최대 골밀도를 낮추고, 성장기 아동의 골격과 치아의 석회화에 영향을 주어, 성장저하 및 구루병을 초래하며, 결국 노년기 골다공증 빈도를 증가시킨다¹⁴⁾.

칼슘이 기능성 식품으로서 권장되기 위해서는 소장 내에서 흡수율이 높아야 하나, 칼슘은 흡수율이 높지 않은 영양소로 칼슘의 형태 및 섭취량뿐만 아니라 유전적, 생리적 조건에 따라 변할 수 있으며, 일반적으로 성인의 칼슘 흡수율은 25~30% 수준으로 알려져 있다¹⁵⁾.

칼슘은 식품을 통해 섭취하는 것이 가장 바람직하나¹⁶⁾, 우리나라 식습관상 유제품의 섭취가 높지 않고, 칼슘 급원식품으로 식물성 식품에 의존도가 높아 섭취기준을 충족시키지 못하는 실정이다¹⁷⁾¹⁸⁾ 현재 가장 많이 칼슘 보충제로 이용되고 있는 탄산칼슘은 칼슘의 함유율은 높으나 흡수율이 낮으나 구연산칼슘은 칼슘의 함유율은 낮으나 흡수율이 높아 칼슘보충제로서의 효과가 더 높다고 알려져 있다.

또한 단백질의 가수분해물인 oligopeptide나 칼슘이 결합된 수용성 칼슘 형태인 CPP(casein phosphopeptide)가 소장내 칼슘의 가용화를 촉진시키는 물질로 알려져 있다¹⁹⁾. Ashmed등²⁰⁾은 칼슘염이 아미노산과 킬레이션된 칼슘이 소장내에서 흡수될 때 킬레이션된 칼슘이 수용성 상태가 되어 흡수가 더 우수함이 보고하였다.

따라서 이러한 내용을 바탕으로 유기태 칼슘의 소재에 대한 연구가 진행되어 왔으며, Choi²¹⁾는 대두 펩타이드와 칼슘이 킬레이션된 칼슘보충제가 인과 불용성염을 형성하지 않고 소장 세포내로 흡수되는 것을 확인하였다. Ken 등²²⁾은 우유의 유청 단백질이 파골세포(osteoclast)의 형성과 뼈의 재흡수를 억제하고, 난소 절제된 쥐에서 뼈의 강도를 증가시켜 골격대사에 영향을 준다는 결과를 제시하였다. 따라서 유청 단백질과 칼슘이 킬레이션된 유기태 칼슘이 무기염인 탄산칼슘보다 체내 이용성 및 골격 대사에 미치는 효과가 더 높을 것으로 예상되었다.

따라서, 실험동물을 성장기 및 폐경기이후(골다공증 발생) 단계로 구분하고, 무기태 칼슘소재(CaCl, CaCO₃) 대비 개발 Ca-WPS제제가 장단기 섭취시 안전성, 체내흡수율, 골형성 및 골다공증예방 및 치료 관련 메커니즘을 검토하고자 하였다. 결과를 토대로 체형레시피를 확립 및 실용화(제품화)에 최종 목적을 두었다. 동물임상 검정은 성장기 섭취에 따른 안전성, 체내흡수효율 및 골생성 부분으로 구분하여 검정하였으며, 골다공증예방 및 치료효과 실험에 기초결과로 활용하고자 하였다.

2. 연구내용 및 방법

가. 성장기 흰쥐에서 Ca-WPS 제제의 안전성 및 체내 흡수 및 유용성 평가 [실험 1]

(1) 실험 설계와 동물사육

갓 이유한 3주령의 수컷 흰쥐(Sprague Dawley rats, male, Orientbio Co. Ltd., Sungnam, Korea) 36마리를 실험 조건을 일정하게 하기 위해 1주일간 정상식으로 적응시킨 후, 각 군의 평균 체중을 일정하게 맞추어 6마리씩 6군으로 완전임의배치 하였다.

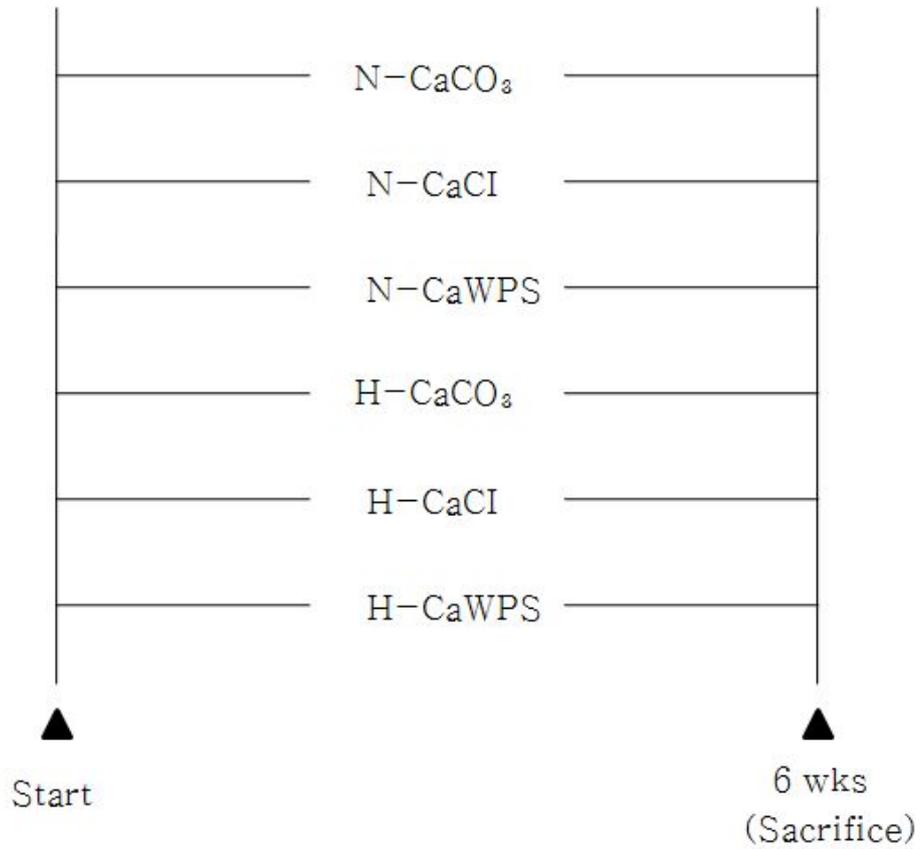
칼슘의 섭취 수준에 따라 정상 및 고수준으로 나누고 급원에 따라서는 탄산칼슘군(CaCO_3)을 대조군, 구연산 칼슘군(CaCl)과 유기태 칼슘군(CaWPS)을 실험군으로 설정하였다 (Figure.1).

칼슘 수준은 정상 칼슘 수준인 식이중 0.5%를 기준으로, 고칼슘은 1.5%로 설정하였다. 실험 식이는 6주간 공급하였으며, 실험식이와 식수는 자유급여법(ad libitum)으로 급여하였다. 실험동물 사육실 환경은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $65 \pm 5\%$ 로 유지하였으며, 명암은 12시간 주기(light; 6:00 a.m ~ 6:00 p.m)로 조절하였다.

실험동물의 구입과 사육의 모든 과정은 서울대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee ; IACUC)의 승인을 받고 규정에 따라 실행하였다.

(2) 실험식이

실험 식이는 기본적으로 AIN-93G 정제식이 패턴을 따랐다(표 1). 식이 내 칼슘을 두 수준 [Normal Ca:0.5%, High Ca: 1.5%]으로 나누었다. 실험식이의 칼슘과 인의 함량에 칼슘과 인의 비율을 1:2 ~ 2:1의 범위내에 들도록 조정하였다. 칼슘의 급원으로 CaCO_3 (Samchun Chemical Co. Ltd., Phyungtaek, Korea), 구연산 칼슘(Junsei Chemical Co. Ltd., Japan)을 이용하였으며, 유기태 칼슘제는 매일 유업 주식회사(Maeil Dairy Industry Co. Ltd., Phyungtaek, Korea)에서 제공받아 실험에 이용하였다. 유기태 칼슘제의 조성은 단백질 43%, 지방 22%, 칼슘 8%, 인 4%등을 포함하고 있었다. 이를 근거로 모든 실험군의 단백질과 지방의 함량이 일정하도록 조정하였다. 새로 개발된 유기태 칼슘 보충제의 성분이 유청 단백질과 칼슘이 킬레이션되어 있어 기본 단백질의 급원을 카제인 대신 분리 유청단백질(WPI)로 하여 총 단백질의 함량을 20%로 조정하였고, 지방 급원으로는 기본 대두 단백질과 함께 유기태 칼슘 보충제에 함유된 지방 함량을 고려하여 우유 지방인 무염버터(Maeil Dairy Industry Co. Ltd., Phyungtaek, Korea)를 첨가하여 총 지방의 함량이 7%가 되도록하였다. 장관 내 식이 이동 marker로서 PEG(polyethylene glycol 4,000, Samchun Chemical Co. Ltd., Phyungtaek, Korea)를 실험식이 조성에 포함시켰다.



| | |
|--|--|
| N- CaCO ₃ : 0.5% Ca, CaCO ₃ | H- CaCO ₃ : 1.5% Ca, CaCO ₃ |
| N-CaCl: 0.5% Ca, Calcium Citrate | H-CaCl: 1.5% Ca, Calcium Citrate |
| N-CaWPS: 0.5% Ca, Calcium chelated with Whey Protein | H-CaWPS: 1.5% Ca, Calcium chelated with Whey Protein |

Figure 1. Outline of experimental design(Expt.1)

Table 1. Composition of experimental diets (Exp.1) (g/kg diet)

| Ingredient | Normal Ca (0.5%) | | | HighCa(1.5%) | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|--------|-----------------------|---------------------|--------|---------|
| | N-CaCO ₃ ⁵⁾ | N-CaCl | N-CaWPS ⁶⁾ | H-CaCO ₃ | H-CaCl | H-CaWPS |
| Cornstarch | 490.7 | 479.3 | 481.3 | 445.9 | 411.9 | 417.7 |
| WPI | 200 | 200 | 173.1 | 200 | 200 | 119.4 |
| Sucrose | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Soybean oil | 56.2 | 56.2 | 56.3 | 28.7 | 28.7 | 28.7 |
| Unsalted butter | 13.8 | 13.8 | – | 41.3 | 41.3 | – |
| fiber | 50.0 | 50.0 | 50.0 | 50.0 | 50.0 | 50.0 |
| Min.mix. ²⁾ (Ca free) | 35.0 | 35.0 | 35.0 | 35.0 | 35.0 | 35.0 |
| Vit.mix. ³⁾ | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 |
| Calcium Source ⁴⁾ | 12.5 | 23.8 | 62.5 | 37.5 | 71.5 | 187.5 |
| KH ₂ PO ₄ | 6.3 | 6.3 | 6.3 | 26.1 | 26.1 | 26.1 |
| L-cysteine | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| Choline bitartrate | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| TBHQ | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.008 |
| PEG | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 |

¹⁾ Experimental diets in Expt. 1 were prepared according to AIN-93G composition.

²⁾ Mineral mix (Ca free) : AIN-93G-MX.

³⁾ Vitamin mix : AIN-93-VX.

⁴⁾ Calcium source : CaCO₃ , Calcium Citrate and Calcium chelated with Whey protein

⁵⁾ N-CaCO₃ : Normal Ca diet (0.5%), CaCO₃ ; N-CaCl: Normal Ca diet (0.5%), Calcium Citrate; N-CaWPS: Normal Ca diet (0.5%), Calcium chelated with Whey Protein; H-CaCO₃ : High Ca diet (1.5%), CaCO₃ ; H-CaCl: High Ca diet (1.5%), Calcium Citrate; H-CaWPS: High Ca diet (1.5%), Calcium chelated with Whey Protein.

⁶⁾ CaWPS : Calcium chelated with Whey Protein. It contains protein 43%, fat 22%, calcium 8% and phosphorus 4% etc.

(3) 시료수집

희생시키기 전 하룻밤 절식 후(overnight-fasting), 식이섭취 조건을 일정하게 하기 위해서 1시간 30분 동안 다시 식이를 급여한 다음 식이 섭취 종료 1시간 후에 0.1% Zoletil(Virbac., Carros, France)로 근육 내 주사(0.04ml/100 B.W)로 마취하여 시료를 채취하였다. 경동맥에서 혈액을 채취하여 4℃에서 보관하였다가, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리(Inverter union 5KR, Hanil Co., Korea)하여 혈청을 분리하였으며, 분석 전까지 -70℃에서 보관하였다. 혈액 채취 후 간, 양쪽 신장, 비장을 적출하여 장기에 부착되어 있는 지방이나 근육을 깨끗이 제거한 후 냉장 생리식염수(0.9% NaCl 용액)로 세척하여 혈액을 제거한 다음 여과지로 물기를 닦고 전자천평으로 생조직의 무게를 측정하였다. 양쪽 대퇴골은 적출한 후 부착되어 있는 근육, 지방, 인대 등 부착물을 모두 제거한 다음 무게와 길이를 측정하였다. 모든 시료는 분석 전까지 -70℃에서 보관하였다. 분은 3일간 매일 동일한 시간에 수집하였으며, 수집된 분은 중량을 측정한 후 -70℃에서 보관하였다.

(4) 시료 분석

(가) 혈청 중 간기능 및 신기능 지표 측정

혈액의 alkaline Phosphatase(ALP), glutamaic oxaloacetic transaminase(GOT), glutamic pyruvic transaminase(GPT), T-bilirubin, blood urea nitrogen(BUN), Creatinine 및 uric acid는 혈액자동분석기(Fully Automated Dry Chemistry System; SPOTCHEM; Daiichi Kagaku Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

(나) 혈청 중의 영양소 함량 측정

혈청 중 총 단백질, 알부민, Ca 함량은 혈액자동분석기(Fully Automated Dry Chemistry System; SPOTCHEM; Daiichi Kagaku Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

(다) 혈청 중의 지질 함량 측정

혈청의 총지질 농도는 Frings and Dunn²³⁾의 방법으로 Spectrophotometer (Beckman DU-530, California, USA)로 540nm에서 비색 정량하였다. 혈청 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤의 농도는 효소시약 kit(Asan Phamaceutical., Hwaseong, Korea)를 이용하여 측정하였다. 혈청 중성지방의 농도는 550nm, 총콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤의 농도는 500nm에서 Spectrophotometer(Beckman DU-530, California, USA)로 540nm에서 비색 정량하였다.

(마) 간과 분 중 지질 함량 측정

간의 중성지방과 총 콜레스테롤의 농도는 Folch²⁴⁾의 방법으로 추출한 지질을 isopropanol에 용해시킨 후 효소 시약 kit(Asan Phamaceutical., Hwaseong, Korea)를 이용하여 Spectrophotometer(Beckman DU-530, California, USA)로 중성지방과 총 콜레스테롤을 각각 550nm, 500nm에서 비색정량하였다. 분변의 총 지질함량과 HDL-콜레스테롤, 총 콜레스테롤의 농도는 간 조직을 이용한 지질 분석 방법에 준하여 측정하였다.

(바) 조직중 칼슘, 인, 마그네슘 및 칼슘 함량 측정

간, 신장, 비장, 대퇴, 요추의 칼슘, 인, 마그네슘 및 칼슘의 함량은 각 조직을 600℃ 회화로에서 건식 회화시킨 다음, 식혀서 시료가 젖을 정도로 질산용액을 떨어트린 후, 다시 3시간 동안 회화하여 얻은 회분을 6N HCl용액으로 용해하였다. 이 용액을 2% LaCl₃·7H₂O 로 희석하여 원자흡광광도계(Automic absorption spectrophotometer ; GBC 904AA, California, USA)로 칼슘은 422.7nm에서, 마그네슘은 202.6nm, 철분은 248.3nm의 파장에서 측정하였다. 인의 전처리는 칼슘의 경우와 동일하며, 몰리브덴 색소법을 이용한 무기인 측정 kit(Bio Clinical system Corporation., Anyang, Korea)를 사용하여 파장 650nm에서 Spectrophotometer(Beckman DU-530, California, USA)로 비색정량하였다. 분은 3일간 동결 건조하여, 건 중량을 측정한 후, 시료를 600℃의 회화로에서 회화시켜 얻은 회분을 조직과 동일한 방법으로 측정하였다. 혈청의 마그네슘은 키시리딜블루-I 법을 이용한 효소시약을 이용하여 660nm에서 Spectrophotometer (Beckman DU-530, California, USA)로 비색정량하였다. 시료수집과 분석에 이용된 모든 초자기구는 10% 염산용액에 담갔다 3차 탈이온수에 3회 이상 헹구어 사용하였다.

(사) 대퇴골 파단력 측정

대퇴골의 파단력은 materials-testing machine(Zwick Z010; Zwick GmbH, Ulm, Germany)를 이용하여, 하중속도는 1mm/min, 지단거리(span)로 13.98mm로 측정하였다.

(5) 통계분석

실험결과는 SPSS 17.0(Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균과 표준오차(mean±SE)로 제시하였다. 군 간의 차이는 P<0.05 수준에서 ANOVA test 후 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다.

나. 골다공증 모델 흰쥐에서 Ca-WPS제제의 안전성 및 골격대사에 미치는 효과평가 [실험2]

(1) 실험 설계와 동물사육

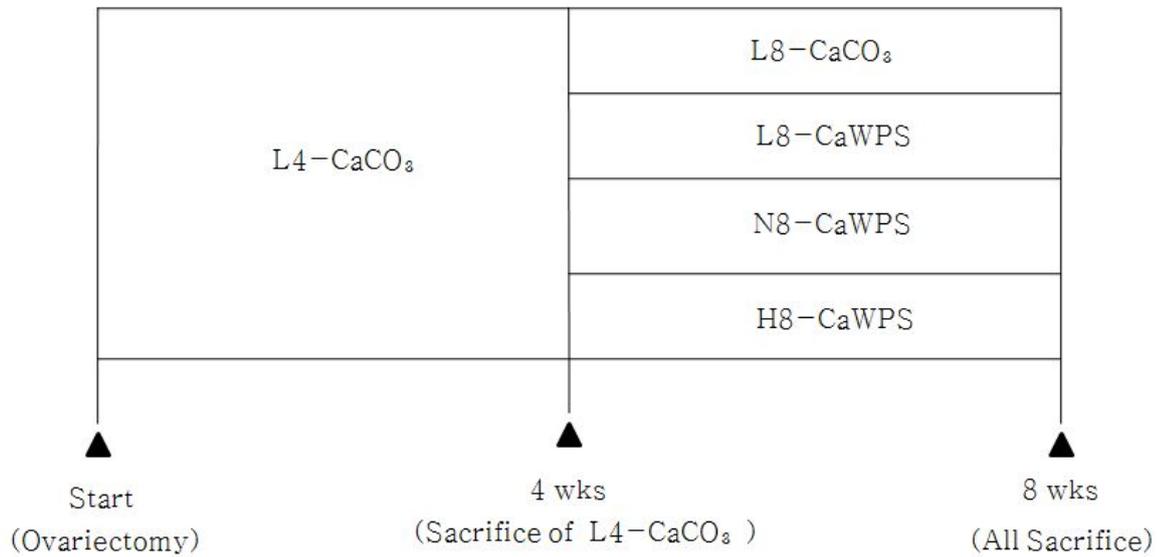
각 군의 평균 체중이 243g인 8주령된 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley female rats: Orient-Bio Co. Ltd., Sungnam, Korea) 35마리를 난소절제술을 실시하였다. 4주간 모든 실험동물에게 칼슘의 급원으로 탄산칼슘이 포함된 저칼슘식이(0.1%, CaCO₃)를 급여하여 골다공증 모델을 설정한 후, 기준군인 Low Ca-CaCO₃(L4-CaCO₃)군을 희생시켰다.

그 이후 Low Ca-CaCO₃(L8-CaCO₃)을 대조군으로, Low Ca-Calcium chelated with Whey Protein(L8-CaWPS), Normal Ca-Calcium chelated with Whey Protein(N8-CaWPS), High Ca-Calcium chelated with Whey Protein(H8-CaWPS)를 실험군으로 설정하여 4주간 실험 식이를 더 공급하였다(Figure 2).

실험식이와 식수는 자유급여법(ad libitum)으로 급여하였고, 실험동물 사육실 환경은 온도 22±2℃, 상대습도 65±5%로 유지하였으며, 명암은 12시간 주기(light; 6:00 a.m~6:00

p.m)로 조절하였다.

실험동물의 구입과 사육의 모든 과정은 서울대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee ; IACUC)의 승인을 받고 규정에 따라 실행하였다.



| | |
|----------------------|---|
| L4-CaCO ₃ | 0.5% Ca, CaCO ₃ , 4wks |
| L8-CaCO ₃ | 1.5% Ca, CaCO ₃ , 8wks |
| L8-CaWPS | 0.5% Ca, Calcium chelated with Whey Protein, 8wks |
| N8-CaWPS | 0.5% Ca, Calcium chelated with Whey Protein, 8wks |
| H8-CaWPS | 1.5% Ca, Calcium chelated with Whey Protein, 8wks |

Figure 2. Outline of experimental design (Exp.2)

(2) 실험식이

실험에 사용된 식이는 AIN-93G 패턴을 따른 정제식이(semi-furified diet)로 조제되었으며, 실험식의 조성표는 표 2에 제시하였다. 식이중의 칼슘 함량은 식이 무게의 0.1%, 0.5%, 1.5%수준으로 하였고, 실험식의 칼슘과 인의 함량에 칼슘과 인의 비율을 1:2 ~ 2:1의 범위 내에 들도록 조정하였다.

칼슘과 인을 제외한 무기질 혼합물(AIN-93G-MX)은 직접 제조하여 사용하였으며, 칼슘의 급원으로 CaCO₃(Samchun Chemical Co. Ltd., Phyungtaek, Korea)과 유기태 칼슘제는 매일 유업 주식회사(Maeil Dairy Industry Co. Ltd., Phyungtaek, Korea)에서 제공받아 실험에 이용하였다.

유기태 칼슘제의 조성은 단백질 43%, 지방 22%, 칼슘 8%, 인 4%등을 포함하고 있었다. 이를 근거로 모든 실험군의 단백질과 지방의 함량이 일정하도록 조정하였다.

실험 기본 식이의 단백질 급원은 casein(Maeil Dairy Industry Co. Ltd., Phyungtaek, Korea)이며, 모든 실험식의 질소함량은 첨가되는 유기태 칼슘보충제의 단백질 함량을 고려하여 총 단백질의 함량이 20%로 동일하게 조정하였다.

지방 급원으로는 기본 대두 단백질과 함께 유기태 칼슘 보충제에 함유된 지방 함량을 고려하여 우유 지방인 무염버터(Maeil Dairy Industry Co. Ltd., Phyungtaek, Korea)를 첨가하여 총 지방의 함량이 7%가 되도록 하였다.

(3) 시료수집

희생시키기 전 하룻밤 절식 후(overnight-fasting), 0.1% Zoletil(Virbac, Carros, France)로 근육내 주사(0.04ml/100g B.W)로 마취하여 시료를 채취하였다. 경동맥에서 혈액을 채취하여 4℃에서 보관하였다가, 3,000rpm에서 20분간 원심분리(Inverter union 5KR, Hanil Co., Korea)하여 혈청을 분리하였으며, 분석 전까지 -70℃에서 보관하였다. 혈액 채취 후 간, 양쪽 신장, 비장을 적출하여 장기에 부착되어 있는 지방이나 근육을 깨끗이 제거한 후 냉장 생리식염수(0.9% NaCl 용액)로 세척하여 혈액을 제거한 다음 여과지로 물기를 닦고 전자천평으로 생조직의 무게를 측정하였다. 양쪽 대퇴골, 요추골(L2-L4)은 적출한 후 부착되어 있는 근육, 지방, 인대 등 부착물을 모두 제거한 다음 무게와 길이를 측정하였다. 모든 시료는 분석 전까지 -70℃에서 보관하였다. 분은 4일간 매일 동일한 시간에 수집하였으며, 수집된 분은 중량을 측정한 후 -70℃에서 보관하였다.

(4) 시료 분석

(가) 혈청 중 간기능 및 신기능 지표 측정

혈액의 alkaline Phosphatase(ALP), glutamaic oxaloacetic transaminase(GOT), glutamic pyruvic transaminase(GPT), T-bilirubin, blood urea nitrogen(BUN), Creatinine 및 uric acid는 혈액자동분석기(Fully Automated Dry Chemistry System; SPOTCHEM; Daiichi Kagaku Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

(나) 혈청 중의 영양소 함량 측정

혈청 중 총 단백질, 알부민, Ca 함량은 혈액자동분석기(Fully Automated Dry Chemistry System; SPOTCHEM; Daiichi Kagaku Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

(다) 조직중 칼슘, 인, 마그네슘 및 칼슘 함량 측정

간, 신장, 비장, 대퇴, 요추의 칼슘, 인, 마그네슘 및 칼슘의 함량은 각 조직을 600℃ 회화로에서 건식 회화시킨 다음, 식혀서 시료가 젖을 정도로 질산용액을 떨어트린 후, 다시 3시간 동안 회화하여 얻은 회분을 6N HCl용액으로 용해하였다. 이 용액을 2% $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 로 희석하여 원자흡광광도계(Automic absorption spectrophotometer ; GBC 904AA, California, USA)로 칼슘은 422.7nm에서, 마그네슘은 202.6nm, 철분은 248.3nm의 파장에서 측정하였다. 인의 전처리는 칼슘의 경우와 동일하며, 몰리브덴 색소법을 이용한 무기인 측정 kit(Bio Clinical system Corporation., Anyang, Korea)를 사용하여 파장 650nm에서 Spectrophotometer(Beckman DU-530, California, USA)로 비색정량하였다. 분은 4일간 동결 건조하여, 건 중량을 측정한 후, 시료를 600℃의 회화로에서 회화시켜 얻은 회분을 조직과 동일한 방법으로 측정하였다. 혈청의 마그네슘은 키시리딜블루-I 법을 이용한 효소시약을 이용하여 660nm에서 Spectrophotometer (Beckman DU-530, California, USA)로 비색정량하였다. 시료수집과 분석에 이용된 모든 초자기구는 10% 염산용액에 담갔다가 3차 탈이온수에 3회 이상 헹구어 사용하였다.

(라) 대퇴골 파단력 측정

대퇴골의 파단력은 materials-testing machine(Zwick Z010; Zwick GmbH, Ulm, Germany)를 이용하여, 하중속도는 1mm/min, 지단거리(span)로 13.98mm로 측정하였다.

(5) 통계분석

실험결과는 SPSS 17.0(Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균과 표준오차(mean±SE)로 제시하였다. 4주 탄산칼슘군과 8주 탄산칼슘군간의 분석은 $P<0.05$ 수준에서 T-test로 분석하고, 8주에서 칼슘급원과 수준에 따른 군간의 차이는 $P<0.05$ 수준에서 ANOVA test 후 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다.

Table 2. Composition of experimental diets (Exp.2) (g/kg)

| Ingredient | Low Ca (0.1%) | | | Normal Ca (0.5%) | High Ca (1.5%) |
|------------------------------------|------------------------------------|----------------------|------------------------|---------------------|-------------------|
| | L4-CaCO ₃ ⁵⁾ | L8-CaCO ₃ | L8-CaWPS ⁶⁾ | N8-CaWPS | H8-CaWPS |
| Cornstarch | 520.0 | 520.0 | 515.21 | 486.05 | 434.61 |
| Casein | 200 | 200 | 194.6 | 173.1 | 119.4 |
| Sucrose | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Soybean oil | 28.7 | 28.7 | 31.5 | 42.5 | 28.7 |
| Unsalted butter | 41.3 | 41.3 | 38.5 | 27.5 | – |
| fiber | 50.0 | 50.0 | 50.0 | 50.0 | 50.0 |
| Min.mix. ²⁾ (Ca,P free) | 35.0 | 35.0 | 35.0 | 35.0 | 35.0 |
| Vit.mix. ³⁾ | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 |
| Calcium Source ⁴⁾ | 2.5 | 2.5 | 12.5 | 62.5 | 187.5 |
| KH ₂ PO ₄ | 6.98 | 6.98 | 7.15 | 7.81 | 29.25 |
| L-cysteine | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| Choline Bitartrate | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| TBHQ | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.008 |

¹⁾ Experimental diets were prepared according to AIN-93G composition.

²⁾ Mineral mix (Ca, P free) : AIN-93G-MX.

³⁾ Vitamin mix : AIN-93-VX.

⁴⁾ Calcium source : CaCO₃ and CaWPS : Calcium chelated with Whey Protein.

⁵⁾ L4-CaCO₃: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%); L8-CaCO₃: Low Ca diet (0.1%) for 8 weeks; L8-CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+Low Ca chelated with Whey Protein for 4 weeks; N8-CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+Normal Ca chelated with Whey protein for 4 weeks; H8-CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+High Ca chelated with Whey protein.

⁶⁾ CaWPS: Calcium chelated with Whey Protein. It contains protein 43%, fat 22%, calcium 8% and phosphorus 4% etc.

3. 연구결과

가. 성장기 흰쥐에서 Ca-WPS 제제의 안전성 및 체내 흡수 및 유용성 평가 [실험 1]

(1) 성장에 미치는 영향

(가) 체중증가, 식이섭취량 및 식이효율

유기태 칼슘섭취에 따른 체중증가는 Figure 3, 식이섭취량 및 식이효율을 Table 3에 제시하였다.

① 무기태 칼슘 대비 유기태 칼슘제(Ca-WPS)의 안전성 평가결과, 유기태 칼슘제는 상용 무기태 칼슘에 비교하여 안전성이 인정되었다.

② 무기태 칼슘 대비 유기태 칼슘제의 안전성 평가를 최종 체중을 기준으로 비교하여 본 결과, 대조군(N-CaCO₃ 기준) 대비 정상농도 N-CaCl₂처리군은 4.8%감소하였으나, N-CaWPS 처리군은 차이가 나지 않았다. 그러나 고칼슘군의 탄산칼슘군(H-CaCO₃)는 6.3%, 구연산칼슘군(H-CaCl) 7.9% 그리고 유기태 칼슘군(H-CaWPS)은 3.2%로 가장 적은 체중감소 효과를 보였다.

③ 유기태칼슘제의 섭취 거부감 및 체중증가, 식이 섭취량 및 식이 효율의 결과로, 탄산칼슘군(N-CaCO₃)과 비교하여 전체 실험군에서 차이점은 인정되지 않았다. 따라서 유기태 칼슘제 섭취에 대한 거부감과 성장 등에 부정적인 영향은 미치지 않는 것으로 사료되었다.

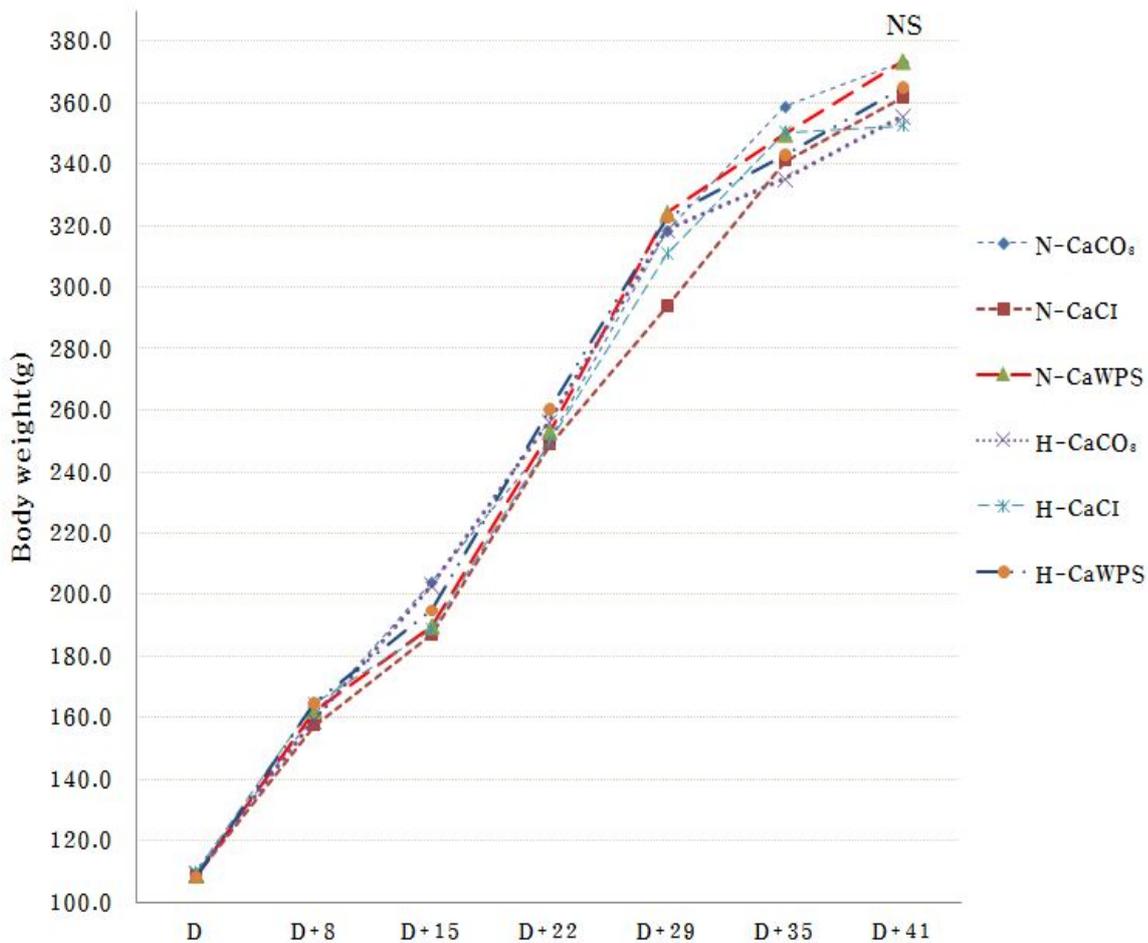


Figure 3. Body weight changes of the rats fed experimental diet for 6 weeks

Values are mean \pm SE of 6 rats per group. N-CaCO₃ : Normal Ca diet (0.5%), CaCO₃ ; N-CaCl: Normal Ca diet (0.5%), Calcium Citrate; N-CaWPS: Normal Ca diet (0.5%), Calcium chelated with Milk Protein; H-CaCO₃ : High Ca diet (1.5%), CaCO₃ ; H-CaCl: High Ca diet (1.5%), Calcium Citrate; H-CaWPS: High Ca diet (1.5%), Calcium chelated with Milk Protein. NS : Not significantly different among groups.

Table 3. Body weight, food intake and food efficiency ratio (FER) of the rats fed experimental diet for 6 weeks

| Groups ⁴⁾ | Initial body weight (g) | Final body weight (g) | Daily food intake (g/d) | Daily Weight gain (g/d) | FER [†] (FI/WG) |
|----------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Normal Ca | | | | | |
| N-CaCO ₃ | 109.3±2.2 ^{1)3)NS} | 373.3±6.5 ^{NS} | 18.7±0.5 ^{NS} | 6.3±0.2 ^{NS} | 2.97±0.04 ^{NS} |
| N-CaCl | 108.8±2.8 | 361.6±11.9 | 18.8±0.6 | 6.0±0.3 | 3.14±0.07 |
| N-CaWPS | 108.9±1.8 | 373.6±8.5 | 19.0±0.4 | 6.3±0.2 | 3.02±0.05 |
| High Ca | | | | | |
| H-CaCO ₃ | 109.7±1.5 ^{NS} | 355.4±13.3 ^{NS} | 19.9±0.8 ^{NS} | 5.9±0.3 ^{NS} | 3.42±0.06 ^{2)a} |
| H-CaCl | 109.7±1.3 | 352.6±8.7 | 20.3±0.7 | 5.8±0.2 | 3.50±0.07 ^a |
| H-CaWPS | 108.1±2.1 | 364.8±13.6 | 19.4±0.4 | 6.1±0.3 | 3.18±0.06 ^b |

¹⁾ Values are mean±SE of 6 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan' s multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 1.

[†]FER(Food efficiency ratio): Food intake(g)/weight gain(g)

(나) 장기 무게

간, 신장, 비장의 무게를 측정한 결과를 Table 4에 제시하였다.

① 정상칼슘군에서 간의 무게는 구연산 칼슘군에서 유의적으로 감소하였으나, 100g 체중으로 보정한 간의 무게는 칼슘의 급원에 따라 유의적인 차이가 없었다. 고칼슘군에서는 정상칼슘군에 비해 모든 칼슘급원에서 간의 무게와 체중당 무게가 감소하였으며, 특히 탄산칼슘군에서 유의적으로 감소하였다.

② 신장의 무게는 칼슘의 급원 및 섭취수준에 따라 유의적인 차이가 없었다. 비장의 무게는 정상칼슘군중에서는 탄산칼슘군이 유의적으로 높았고, 고칼슘군에서는 급원에 따른 차이를 보이지 않았다.

③ 100g 체중당 비장의 무게는 칼슘 급원과 수준에 따른 차이를 보이지 않았다. 따라서 중요한 장기의 성장에 있어서 유기태 칼슘 보충제의 보충이 탄산칼슘이나 구연산칼슘 섭취군과 차이를 보이지 않아서 신체조직 성장에 부정적인 영향을 끼치지 않는 것으로 생각된다.

Table 4. Weight in liver, kidneys and spleen of the rats fed experimental diet for 6 weeks

| Groups ⁴⁾ | Liver | | Kidneys | | Spleen | |
|----------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| | Wet weight (g) | Wet wt/ 100g BW (g/100gBW) | Wet weight (g) | Wet wt/ 100g BW (g/100gBW) | Wet weight (g) | Wet wt/ 100g BW (g/100g BW) |
| Normal Ca | | | | | | |
| N-CaCO ₃ | 15.33±0.26 ^{1)2)a} | 4.08±0.10 ^{3)NS} | 2.86±0.10 ^{NS} | 0.77±0.02 ^{NS} | 0.75±0.03 ^a | 0.20±0.01 ^{NS} |
| N-CaCl | 13.27±0.58 ^b | 3.66±0.09 | 2.73±0.13 | 0.76±0.03 | 0.65±0.03 ^b | 0.18±0.01 |
| N-CaWPS | 15.25±0.41 ^a | 4.04±0.17 | 2.95±0.11 | 0.78±0.03 | 0.68±0.02 ^{ab} | 0.18±0.01 |
| High Ca | | | | | | |
| H-CaCO ₃ | 10.42±0.33 ^b | 2.94±0.08 ^b | 2.74±0.13 ^{NS} | 0.77±0.02 ^{NS} | 0.60±0.05 ^{NS} | 0.17±0.01 ^{NS} |
| H-CaCl | 12.50±0.44 ^a | 3.54±0.06 ^a | 2.66±0.13 | 0.76±0.03 | 0.63±0.05 | 0.18±0.01 |
| H-CaWPS | 12.73±0.46 ^a | 3.46±0.11 ^a | 3.00±0.13 | 0.81±0.04 | 0.66±0.04 | 0.18±0.01 |

¹⁾ Values are mean±SE of 6 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 1.

(2) 혈액 성분에 미치는 영향

(가) 혈청의 칼슘, 인, 마그네슘 농도 및 ALP 활성

실험식이 급여에 따른 혈청의 칼슘, 인 및 마그네슘의 농도의 결과를 Table 5, ALP활성을 Figure 4에 제시하였다.

① 정상 및 고칼슘 식이의 유기태 칼슘군의 혈청 칼슘 농도는 탄산칼슘군과 유의적인 차이를 보이지 않았고, 칼슘의 정상범위(7.2~12.6 mg/dl)내에 있었다²⁵⁾. 혈청 칼슘에서 정상 유기태 칼슘군(N-CaWPS)은 다른 무기태 칼슘군과 유의적인 차이는 없었으나, 고 유기태 칼슘군(H-CaWPS)은 H-CaCl군에 비해 유의적으로 높은 경향을 보여 유기태화 칼슘제제는 장내 흡수를 촉진시키는 생체이용률이 높은 소재로 사료된다.

② 혈청의 인의 농도는 칼슘 급원에 따른 차이는 없었으나, 유기태 고칼슘군의 혈청 인의 농도가 증가하는 경향을 보였다. 이러한 인 농도 증가는 유기태화 칼슘이온의 체내흡수시 장내 존재하는 소화물내 인의 흡수량도 증가하였기 때문이라고 판단되었다.

③ 혈청의 마그네슘 농도는 정상칼슘군에서 칼슘의 급원에 따라 유의적인 차이가 없었으나, 칼슘 섭취 수준의 영향을 받아 고칼슘군의 구연산 칼슘군과 유기태 칼슘군에서 유의적으로 마그네슘의 농도가 증가하였다. 본 실험에서 고칼슘군의 탄산칼슘군을 제외한 유기태 칼슘군과 구연산군에서는 칼슘의 섭취가 높음에도 불구하고, 혈청 내 마그네슘의 농도는 정상칼슘군과 같거나 증가한 결과를 보였다. 대조군(N-CaWPS) 대비 고칼슘 수준의 유기태화 칼슘군(H-CaWPS) 혈청의 인, 마그네슘 농도 증가는 Ca-WPS제제 제조시 킬레이팅 기능기 인의 극대화 유도과 여기에 미네랄(P, Mg)을 높은 농도로 킬레이팅 반응을 유도하였기 때문인 것으로 판단되었다.

④ 골격 형성 지표로 사용되는 ALP 활성은 칼슘섭취 수준에 따라 탄산칼슘군과 비교하여 유기태 칼슘군에서 유의적으로 낮아졌다. 정상 칼슘을 섭취한 군에 비해 고칼슘을 섭취한 군에서 ALP 활성이 낮아지는 경향을 보였다. 본 실험에서는 같은 수준의 칼슘을 섭취하고도 칼슘의 급원에 의한 영향으로 유기태 칼슘군이 탄산칼슘군에 비해 ALP 수치가 감소한 것으로 보아, 유기태 칼슘이 무기염인 탄산칼슘보다 체내 칼슘 상태가 양호함을 암시하며 유기태 칼슘이 성장기 뼈의 대사에 보다 긍정적인 영향을 주는 것으로 보인다.

Table 5. The concentration of Ca, P, Mg and ALP activities in serum of the rats fed experimental diets for 6 weeks

| Groups ⁴⁾ | Ca (mg/dl) | P (mg/dl) | Mg (mg/dl) | ALP [†] (IU/ℓ) |
|----------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|
| Normal Ca | | | | |
| N-CaCO ₃ | 12.4±0.2 ^{NS} | 7.5±0.1 ^{NS} | 3.1±0.1 ^{NS} | 455.5±11.1 ^a |
| N-CaCl | 12.4±0.2 | 7.6±0.2 | 3.1±0.1 | 363.4±15.8 ^b |
| N-CaWPS | 12.1±0.2 | 7.4±0.1 | 3.2±0.1 | 399.4±16.3 ^b |
| High Ca | | | | |
| H-CaCO ₃ | 12.2±0.1 ^{2)a} | 8.2±0.2 ^{NS} | 2.6±0.1 ^c | 440.0±20.4 ^a |
| H-CaCl | 10.7±0.3 ^b | 7.9±0.1 | 4.4±0.0 ^a | 337.6±8.4 ^b |
| H-CaWPS | 11.8±0.1 ^a | 8.4±0.1 | 3.3±0.1 ^b | 373.4±19.1 ^b |

¹⁾ Values are mean±SE of 6 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan' s multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 1.

[†]ALP : Alkaline phosphatase

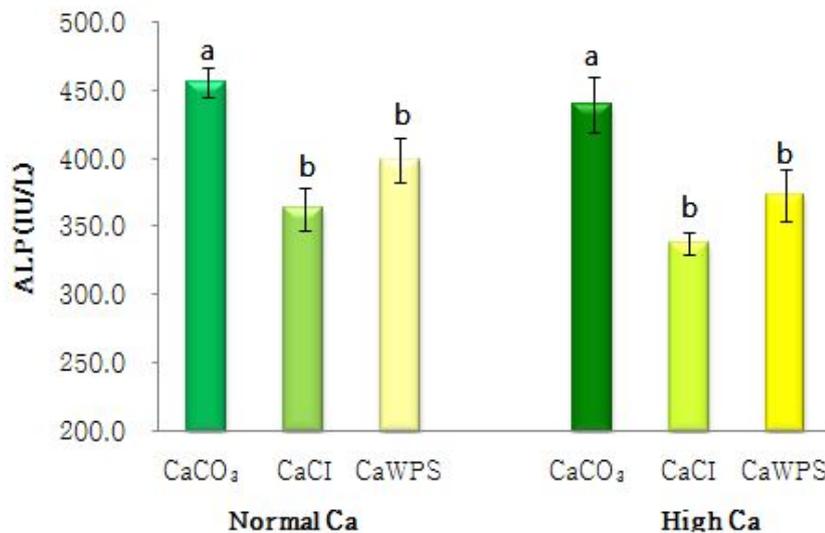


Figure 4. Alkaline phosphatase(ALP) activity in serum of the rats fed experimental diet for 6 weeks

Values are means of 6 rats per group. N-CaCO₃ : Normal Ca diet (0.5%), CaCO₃ ; N-CaCl: Normal Ca diet (0.5%), Calcium Citrate; N-CaWPS: Normal Ca diet (0.5%), Calcium chelated with Whey Protein; H-CaCO₃ : High Ca diet (1.5%), CaCO₃ ; H-CaCl: High Ca diet (1.5%), Calcium Citrate; H-CaWPS: High Ca diet (1.5%), Calcium chelated with Whey Protein. Bars with different letters are significantly different at p<0.05.

(나) 간기능 혈액지표

실험식이 급여에 따른 간기능 지표(알부민, 혈청 총 단백질 및 총 빌리루빈농도)의 변화는 Table 6에, GOT와 GPT의 활성은 Fig 5, 6에 각각 제시하였다.

① 혈청의 GOT 활성은 정상 칼슘군에서는 칼슘 급여에 따른 유의적인 차이는 없었으나, 고칼슘군에서는 유기태 칼슘군이 탄산칼슘군보다 유의적으로 낮았다. GOT는 간세포의 세포질에 있는 효소로 간세포 손상 시 이 효소가 혈액으로 유리되어 정상보다 많이 증가하게 되어, 간접적으로 간에 손상이 있는지 알 수 있는 지표이다. 10주령 SD rats의 GOT 정상 범위는 50~185 IU/ℓ¹³⁾로 정상 칼슘군의 탄산 칼슘군에서의 GOT 활성이 정상범위보다 높았고, 나머지 군은 정상 수치를 나타냈다. 정상칼슘군의N-CaCO₃군에 비해 정상 유기태화 칼슘제를 섭취한 군(N-CaWPS)에서 5.8%, 고칼슘 섭취군의 경우 H-CaCO₃군에 비해 H-CaWPS군이 18%가 각각 감소하였다.

② GPT 역시 GOT와 같이 간 손상을 알 수 있는 간접적인 지표로 사용되며, 모든 군에서의 GPT 활성은 정상 범위(25~84 IU/ℓ)¹³⁾내에 있었으나, 정상 및 고칼슘의 유기태 칼슘군이 탄산 칼슘군과 비교하여 유의적으로 GOT활성이 감소되었다. 혈청 GPT 활성은 정상칼슘을 섭취한 탄산칼슘군에 비해 정상 유기태 칼슘군이 20.5%, 고칼슘 섭취군에서는 탄산칼슘군에 비해 유기태 칼슘군이 25.4% 유의적으로 감소하였다. 그러므로, 본 실험의 결과에서 유기태 칼슘을 섭취한 군이 탄산칼슘군에 비해 혈청의 GOT와 GPT의 활성이 감소하는 경향을 보여, 유기태 칼슘의 섭취는 간기능에도 긍정적인 영향을 미친 것으로 보인다.

③ 영양 상태 및 간기능의 지표가 되는 혈청 알부민 농도는 칼슘의 섭취 및 급여에 따라 유의적인 차이가 없었다. 10주령 SD male rats의 혈청 총 단백질의 정상치는 6.0~7.0g/dl²⁶⁾으로 유기태 칼슘군은 모두 정상 범위내에 있었다.

④ 혈청 총 단백질 농도는 정상칼슘 식이를 섭취한 군에서 칼슘 급여에 따른 유의적인 차이는 없었다. 그러나 고칼슘식이를 섭취한 유기태 칼슘군의 총 단백질 농도는 탄산칼슘군에 비해 유의적으로 증가하는 경향을 보였다.

⑤ T-bilirubin은 간세포 대사장애나 급만성 간염시 혈중 수치가 증가한다. 혈청 T-bilirubin 농도에 있어서 수컷 흰쥐(SD rats)의 정상범위는 0.05~1.57mg/dl로 보고되고 있다²⁷⁾. 모든 군의 T-bilirubin 농도는 정상범위 내에 있었으며, 정상칼슘식이를 섭취한 군에서는 칼슘의 급여에 따른 유의적인 차이는 없었으나, 고칼슘식이를 섭취한 유기태 칼슘군이 탄산칼슘군에 비해서 유의적으로 감소하는 경향을 보였다.

⑥ 이상의 결과로, 정상 및 고칼슘 수준의 유기태 칼슘을 섭취한 군은 탄산칼슘보다 GOT, GPT의 활성 및 T-bilirubin의 농도가 탄산칼슘군에 비해서 전체적으로 낮아서 간 기능에 긍정적인 영향을 준 것으로 사료된다.

Table 6. The effect of organic Ca on parameters of liver function in serum of the rats fed experimental diets for 6 weeks

| Groups ⁴⁾ | GOT [†] (IU/ℓ) | GPT (IU/ℓ) | Albumin (g/ℓ) | T-protein (g/dℓ) | T- bilirubin (mg/dℓ) |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| Normal Ca | | | | | |
| N-CaCO ₃ | 198.2±7.8 ^{1)3)NS} | 34.1±2.8 ^{2)a} | 3.4±0.1 ^{NS} | 5.7±0.1 ^{NS} | 0.70±0.10 ^{NS} |
| N-CaCl | 172.3±9.8 | 30.8±1.6 ^{ab} | 3.3±0.1 | 5.7±0.2 | 0.45±0.03 |
| N-CaWPS | 186.8±7.8 | 27.1±1.0 ^b | 3.3±0.1 | 6.0±0.1 | 0.57±0.09 |
| High Ca | | | | | |
| H-CaCO ₃ | 163.3±6.0 ^a | 31.9±1.1 ^a | 3.4±0.1 ^{NS} | 5.9±0.2 ^b | 0.57±0.08 ^a |
| H-CaCl | 126.2±9.0 ^b | 26.9±0.5 ^b | 3.2±0.1 | 6.2±0.1 ^{ab} | 0.42±0.03 ^b |
| H-CaWPS | 133.9±5.7 ^b | 23.8±0.3 ^c | 3.3±0.1 | 6.5±0.1 ^a | 0.40±0.00 ^b |

¹⁾ Values are mean±SE of 6 rats per group

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan' s multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 1.

[†] GOT : Glutamic oxaloacetic transaminase

GPT : Glutamic pyruvic transaminase

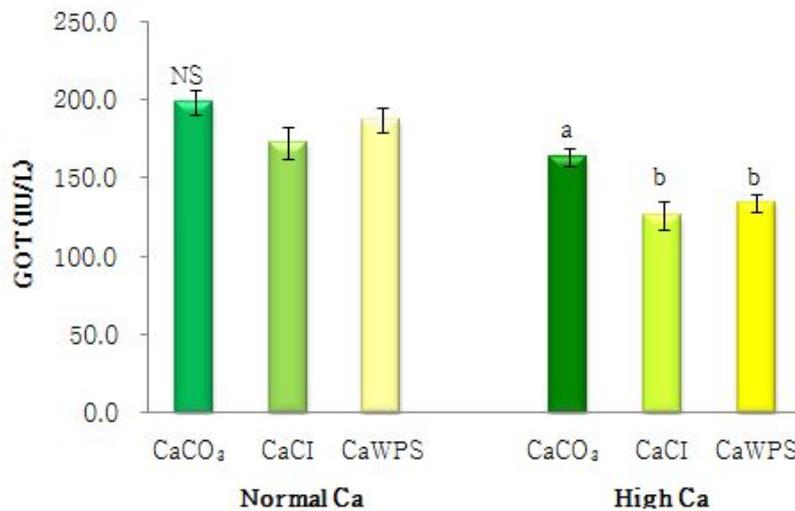


Figure 5. Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) activity in serum of rats fed experimental diet for 6 weeks

Values are means of 6 rats per group. N-CaCO₃ : Normal Ca diet (0.5%), CaCO₃ ; N-CaCl: Normal Ca diet (0.5%), Calcium Citrate; N-CaWPS: Normal Ca diet (0.5%), Calcium chelated with Whey Protein; H-CaCO₃ : High Ca diet (1.5%), CaCO₃ ; H-CaCl: High Ca diet (1.5%), Calcium Citrate; H-CaWPS: High Ca diet (1.5%), Calcium chelated with Whey Protein. Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$. NS : not significantly different among groups.

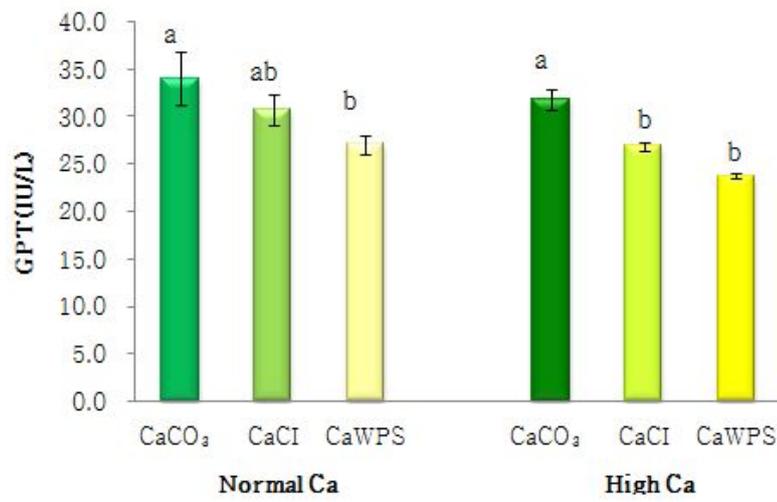


Figure 6. Glutamic pyruvic transminase(GPT) activity in serum of rats fed experimental diet for 6 weeks

Values are means of 6 rats per group. N-CaCO₃ : Normal Ca diet (0.5%), CaCO₃ ; N-CaCl: Normal Ca diet (0.5%), Calcium Citrate; N-CaWPS: Normal Ca diet (0.5%), Calcium chelated with Whey Protein; H-CaCO₃ : High Ca diet (1.5%), CaCO₃ ; H-CaCl: High Ca diet (1.5%), Calcium Citrate; H-CaWPS: High Ca diet (1.5%), Calcium chelated with Whey Protein. Bars with different letters are significantly different at p<0.05.

(다) 신기능 혈액지표

실험식이 급여에 따른 신장 기능의 지표(혈청 BUN, Creatinine 및 uric acid 농도)는 Table 7에 제시하였다.

① 혈청 BUN의 농도에 있어서 수컷 흰쥐(SD)의 정상범위는 11.6~20.2 mg/dl¹⁵⁾로 보고되고 있다. 모든 군의 혈청 BUN 수치는 정상범위를 벗어나지 않았고, 정상칼슘군과 고칼슘군에서 모두 탄산칼슘과 유의적인 차이를 보이지 않았다.

② Creatinine 농도는 칼슘의 섭취 수준과 급원에 영향을 받지 않아 군 간에 유의적 차이가 없었다.

③ Uric acid의 농도는 정상칼슘 식이를 섭취한 군 간에 유의적 차이는 없었으나, 유기태 칼슘군이 탄산칼슘군에 비해 감소하는 경향을 보였으며, 고칼슘 식이를 섭취한 유기태 칼슘군은 탄산칼슘군에 비해 요산의 농도가 유의적으로 낮았다.

④ 따라서, 정상 및 고칼슘 식이를 섭취한 유기태 칼슘군의 BUN, creatinine 및 uric acid의 농도는 정상 범위 내에 있었고, 탄산칼슘군 및 구연산 칼슘군과 비교하여 신장 기능에서도 부정적인 영향이 나타나지 않았다.

Table 7. The effect of organic Ca on parameters of kidney function in serum of the rats fed experimental diets for 6 weeks

| Groups ⁴⁾ | BUN (mg/dl) | Creatinine (mg/dl) | Uric acid (mg/dl) |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Normal Ca | | | |
| N-CaCO ₃ | 14.6±1.6 ^{2)b} | 0.9±0.1 ^{3)NS} | 2.8±0.1 ^{NS} |
| N-CaCl | 19.7±0.7 ^a | 0.8±0.0 | 2.3±0.3 |
| N-CaWPS | 17.3±0.7 ^{ab} | 0.8±0.0 | 2.4±0.2 |
| High Ca | | | |
| H-CaCO ₃ | 21.7±0.7 ^a | 0.9±0.0 ^{NS} | 2.4±0.2 ^a |
| H-CaCl | 18.1±0.7 ^b | 0.8±0.0 | 2.2±0.2 ^{ab} |
| H-CaWPS | 20.2±0.5 ^a | 0.8±0.0 | 1.8±0.2 ^b |

¹⁾ Values are mean±SE of 6 rats per group

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 1.

(3) 지질함량에 미치는 영향

(가) 혈중 지질 농도

혈청 중의 총 지질, 중성지방, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤의 농도는 Table 8에 제시하였다.

① 혈청 중의 총 지질 농도는 정상칼슘군에서 칼슘의 급원에 따른 영향은 없었으나, 고칼슘군에서는 유기태 칼슘군의 총 지질함량이 유의적으로 증가하였다. 혈청의 총 지질농도는 칼슘의 섭취가 증가할수록 더 높은 경향을 보였다.

② 혈청 중의 중성지방의 농도는 정상칼슘군에서는 탄산칼슘군에 비해 구연산 칼슘군과 유기태 칼슘군이 감소하였으나, 고칼슘군에서는 탄산칼슘군에 비해 구연산 칼슘군과 유기태 칼슘군이 유의적으로 증가하였다.

③ 혈청 총 콜레스테롤의 농도는 정상칼슘 수준을 섭취할 경우 칼슘의 급원의 영향을 받지 않았으나, 고칼슘식이의 경우 유기태 칼슘군이 탄산칼슘군에 비해 유의적으로 28% 증가하였다.

④ HDL-콜레스테롤의 농도 정상칼슘군에서는 탄산칼슘군과 차이를 보이지 않았으나, 고칼슘의 유기태 칼슘군은 탄산칼슘과 구연산칼슘군에 비해 HDL-콜레스테롤의 농도가 증가하였다.

⑤ 이상의 결과로 정상 수준의 유기태 칼슘 섭취는 혈중의 지질함량에 미치는 영향이 거의 없으나, 고수준의 유기태 칼슘의 섭취는 성장기 흰쥐에서 혈액의 총 지질, 중성지방, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤의 농도를 증가시켰다.

Table 8. The concentration of serum total lipid, triglyceride, total cholesterol and HDL cholesterol in rats fed experimental diets for 6 weeks

| Groups ⁴⁾ | Total lipid (mg/dl) | Triglyceride (mg/dl) | Total cholesterol (mg/dl) | HDL Cholesterol (mg/dl) |
|----------------------|------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Normal Ca | | | | |
| N-CaCO ₃ | 284.9±20.4 ^{1)3)NS} | 121.2±6.3 ^a | 54.7±2.6 ^{NS} | 27.5±1.1 ^{NS} |
| N-CaCl | 313.2±5.5 | 91.9±4.5 ^b | 51.6±5.7 | 26.1±1.6 |
| N-CaWPS | 302.2±10.8 | 104.7±7.4 ^{ab} | 51.0±4.8 | 27.0±1.0 |
| High Ca | | | | |
| H-CaCO ₃ | 361.6±18.0 ^b | 91.0±3.5 ^b | 50.0±3.7 ^b | 25.8±0.5 ^{ab} |
| H-CaCl | 347.3±14.4 ^b | 116.6±7.6 ^a | 54.8±1.7 ^{ab} | 23.9±1.1 ^b |
| H-CaWPS | 440.9±13.5 ^a | 108.9±3.7 ^a | 64.0±3.7 ^a | 28.7±1.7 ^a |

¹⁾ Values are mean±SE of 6 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 1.

(나) 간조직의 지질함량

간조직의 총 지질, 중성지방, 총콜레스테롤의 함량은 Table 9에 제시하였다.

① 간조직의 총 지질 함량은 칼슘 섭취 수준에 관계없이 유기태 칼슘군이 다른군에 비해 유의적으로 증가하였다.

② 간의 중성지방 함량은 칼슘 섭취 수준에 따라 각 군별로 유의적인 차이는 없었으나, 칼슘의 섭취가 증가할수록 간의 중성지방 함량이 낮아지는 경향을 보였다.

③ 총 콜레스테롤의 함량은 정상칼슘군에서 군간에 유의적인 차이는 없었으나, 고칼슘군에서는 탄산칼슘군에 비해 유기태 칼슘군과 구연산 칼슘군에서 유의적으로 32%가 증가하였다. 그러나, 전체적으로 칼슘섭취가 증가함에 따라 간의 지질함량의 감소폭이 탄산칼슘군과 유기태 칼슘군이 비슷하였다.

Table 9. The contents of total lipid, triglyceride and total cholesterol in liver of rats fed experimental diets for 6 weeks

| Groups ⁴⁾ | Total lipid (mg/g) | Triglyceride (mg/g) | Total cholesterol (mg/g) |
|----------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Normal Ca | | | |
| N-CaCO ₃ | 215.0±7.3 ^{1)2)a} | 14.3±0.5 ^{3)NS} | 4.7±0.3 ^{NS} |
| N-CaCl | 189.2±7.5 ^b | 12.8±1.4 | 4.7±0.2 |
| N-CaWPS | 231.0±9.0 ^a | 14.7±2.0 | 5.5±0.4 |
| High Ca | | | |
| H-CaCO ₃ | 175.3±2.7 ^b | 10.0±0.7 ^{NS} | 2.8±0.2 ^b |
| H-CaCl | 166.3±3.8 ^b | 9.0±1.8 | 3.7±0.4 ^a |
| H-CaWPS | 189.0±2.9 ^a | 11.2±0.7 | 3.7±0.1 ^a |

¹⁾ Values are mean±SE of 6 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 1.

(다) 분 중의 지질함량

분 중의 총 지질량, 중성지방 및 총콜레스테롤의 함량을 Table 10에 제시하였다.

① 실험동물의 하루 평균 분변량은 칼슘의 섭취가 높을수록 유의적으로 증가하였다. ② 분 중의 총 지질량은 정상칼슘군에서 각 군별로 유의적 차이가 없었으나 구연산 칼슘군이 높은 경향을 보였고, 고칼슘군에서도 탄산칼슘군에 비해 유기태 칼슘군과 구연산 칼슘군이 높았으며, 그 중 구연산 칼슘군이 유의적으로 가장 높았다.

③ 분 중의 중성지방은 정상칼슘군에서 유기태 칼슘군이 유의적으로 낮았고, 고칼슘군에서는 유의적인 차이는 없었으나 유기태 칼슘군이 가장 낮았다.

④ 분 중의 총 콜레스테롤의 함량은 정상칼슘군에서 유기태 칼슘이 유의적으로 낮았으나, 고칼슘군에서는 유기태 칼슘군의 총 콜레스테롤이 유의적으로 증가하여 칼슘수준에 따라 다른 경향을 보였다. 따라서 본 연구에 사용된 유기태 칼슘제제는 탄산칼슘에 비해 고칼슘 섭취시 효과적으로 분변으로 지방배설의 효과가 있는 것으로 사료된다.

Table 10. Fecal excretion of total lipid, triglyceride and total cholesterol in rats fed experimental diets for 6 weeks

| Groups ⁴⁾ | dry weight (g/d) | Total lipid (mg/d) | Triglyceride (mg/d) | Total cholesterol (mg/d) |
|----------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Normal Ca | | | | |
| N-CaCO ₃ | 2.5±0.1 ^{3)NS} | 454.0±24.4 ^{NS} | 11.4±0.5 ^{2)a} | 5.8±0.3 ^a |
| N-CaCl | 2.7±0.2 | 507.7±25.7 | 9.8±0.5 ^a | 4.7±0.3 ^b |
| N-CaWPS | 2.6±0.1 | 463.0±28.9 | 7.5±0.8 ^b | 3.5±0.1 ^c |
| High Ca | | | | |
| H-CaCO ₃ | 2.9±0.1 ^b | 442.4±11.4 ^c | 9.4±0.8 ^{NS} | 3.5±0.1 ^b |
| H-CaCl | 3.7±0.1 ^a | 573.8±20.5 ^a | 9.1±0.6 | 3.3±0.1 ^b |
| H-CaWPS | 3.3±0.1 ^b | 522.8±10.8 ^b | 8.8±0.6 | 4.2±0.3 ^a |

1) Values are mean±SE of 6 rats per group.

2) Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

3) NS : Not significantly different among groups.

4) See Table 1.

(라) 지질의 체내 이용성

지질의 섭취량, 지질 흡수량 및 흡수율을 Table 11에 제시하였다.

① 지질의 섭취는 정상칼슘군에서 각 군의 유의적인 차이가 없었으나, 고칼슘군에서는 구연산 칼슘군이 유의적으로 지질섭취가 높았다.

② 분 중으로 배설되는 지질량은 정상칼슘군내에서 유의적인 차이는 없었으나, 고칼슘군의 구연산 칼슘군과 유기태 칼슘군의 지질의 배설이 유의적으로 증가하였다.

③ 지질의 흡수량은 정상 및 고칼슘 섭취군에서 칼슘의 급원에 따른 차이는 없었다.

④ 지질의 흡수율은 정상칼슘군에서는 칼슘의 급원에 따른 영향이 없었으나, 고칼슘군에서는 분 중으로 지질의 배설이 많았던 구연산 칼슘군과 유기태 칼슘군이 유의적으로 지질 흡수율이 낮았다. 그러므로 지질의 흡수에 있어서도 유기태 칼슘은 고칼슘 섭취시 탄산칼슘에 비해 소장 내 지질 흡수를 다소 억제하는 효과가 있는 것을 사료된다.

Table 11. Fecal lipid excretion and apparent lipid absorption in rats fed experimental diets for 6 weeks

| Groups ⁶⁾ | Lipid intake (mg/d) | Fecal lipid excretion (mg/d) | Apparent absorption ⁴⁾ (mg/d) | Apparent absorption ⁵⁾ (%) |
|----------------------|-----------------------------|------------------------------|--|---------------------------------------|
| Normal Ca | | | | |
| N-CaCO ₃ | 1911.9±59.0 ^{3)NS} | 454.0±24.4 ^{NS} | 1457.9±47.4 ^{NS} | 76.3±1.0 ^{NS} |
| N-CaCl | 1897.0±60.2 | 507.7±25.7 | 1389.3±66.7 | 73.1±1.6 |
| N-CaWPS | 1948.7±51.8 | 463.0±28.9 | 1485.5±41.4 | 76.3±1.3 |
| High Ca | | | | |
| H-CaCO ₃ | 1918.0±44.8 ^{2)b} | 442.4±11.4 ^c | 1475.6±41.6 ^{NS} | 76.9±0.6 ^a |
| H-CaCl | 2061.1±42.8 ^a | 586.2±23.1 ^a | 1475.0±61.6 | 71.5±1.6 ^b |
| H-CaWPS | 1899.6±32.4 ^b | 522.8±10.8 ^b | 1401.9±37.3 | 72.8±0.8 ^b |

¹⁾ Values are mean±SE of 6 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ Apparent absorption(mg) = Intake(mg) - Fecal excretion(mg)

⁵⁾ Apparent absorption rate(%) = [Apparent absorption(mg)/ Intake(mg)] × 100

⁶⁾ See Table 1.

(4) 칼슘대사에 미치는 영향

(가) 칼슘의 섭취량, 배설량, 흡수량 및 흡수율

유기태 칼슘섭취에 따른 칼슘의 섭취량, 분 중의 칼슘 배설량 및 칼슘 흡수량을 Table 12, 칼슘 흡수율을 Figure 7에 제시하였다.

- ① 정상과 고 칼슘 수준에서 유기태 칼슘섭취군의 칼슘 섭취량은 대조군과 차이가 없었다.
- ② 분 중의 칼슘 배설량은 칼슘급원의 영향으로 탄산칼슘군에 비해 유기태 칼슘군에서 각각 20%, 15%씩 유의적으로 감소하였다.
- ③ 칼슘의 흡수량은 정상 및 고칼슘식이 수준에서 유기태 칼슘군이 탄산칼슘군에 비해 각각 34%, 23%씩 유의적으로 증가하였다. 또한 칼슘의 흡수량은 식이칼슘 수준에 영향을 받아, 정상칼슘食이를 섭취한 유기태 칼슘군보다 고칼슘 식이를 섭취한 유기태 칼슘군의 칼슘 흡수량이 3.2배 증가하였다.
- ④ 칼슘의 흡수율은 정상 및 고 유기태 칼슘군이 탄산칼슘군보다 각각 34%, 23%씩 유의적으로 흡수율이 증가하였다.
- ⑤ 따라서, 무기태화 및 유기태화 칼슘제제 중 새로 개발된 유기태화 칼슘제제(Ca-WPS)가 칼슘섭취량 대비 체내흡수율이 높은 소재이며, 생체이용률 또한 높은 것으로 판단된다.

Table 12. Daily Ca intake, fecal Ca excretion, daily and apparent Ca absorption of rats fed experimental diet for 6 weeks

| Groups ⁴⁾ | Ca intake (mg/d) | Fecal Ca excretion (mg/d) | Apparent absorption (mg/d) | Apparent absorption rate (%) |
|----------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Normal Ca | | | | |
| N-CaCO ₃ | 94.9±2.7 ^{1)3)NS} | 63.7±3.1 ^a | 31.7±3.5 ^{2)b} | 33.4±2.2 ^b |
| N-CaCl | 94.2±3.1 | 52.5±1.3 ^{ab} | 40.3±2.5 ^{ab} | 41.2±3.0 ^{ab} |
| N-CaWPS | 94.3±2.5 | 50.8±4.2 ^b | 42.5±2.4 ^a | 44.5±2.9 ^a |
| High Ca | | | | |
| H-CaCO ₃ | 292.2±12.9 ^{NS} | 185.0±8.4 ^a | 108.9±3.5 ^b | 36.3±2.4 ^b |
| H-CaCl | 303.9±10.9 | 200.6±9.8 ^a | 107.1±4.4 ^b | 36.0±2.1 ^b |
| H-CaWPS | 301.7±13.6 | 156.3±2.5 ^b | 134.0±3.7 ^a | 44.6±1.9 ^a |

¹⁾ Values are mean±SE of 6 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 1.

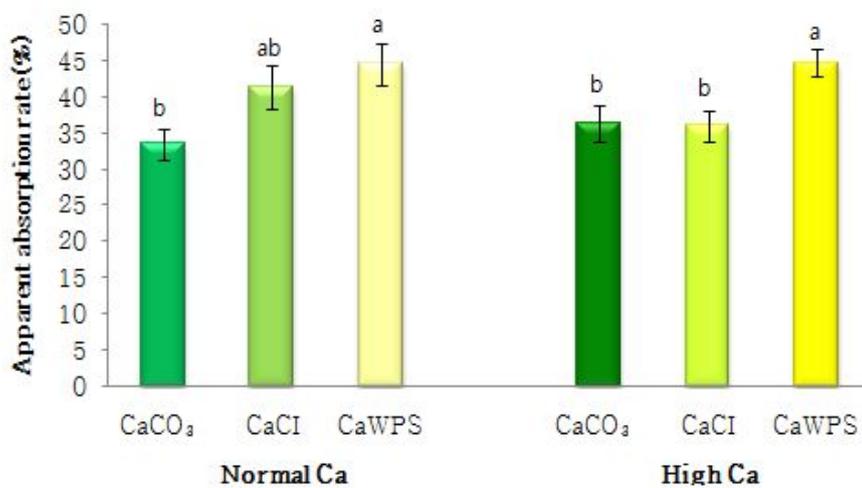


Figure 7. Ca absorption rate of rats fed experimental diet for 6 weeks

Values are means of 6 rats per group. N-CaCO₃ : Normal Ca diet (0.5%), CaCO₃ ; N-CaCl: Normal Ca diet (0.5%), Calcium Citrate; N-CaWPS: Normal Ca diet (0.5%), Calcium chelated with Whey Protein; H-CaCO₃ : High Ca diet (1.5%), CaCO₃ ; H-CaCl: High Ca diet (1.5%), Calcium Citrate; H-CaWPS: High Ca diet (1.5%), Calcium chelated with Whey Protein. Bars with different letters are significantly different at p<0.05.

(나) 인의 섭취량, 배설량, 흡수량 및 흡수율

인의 섭취량, 배설량, 흡수량 및 흡수율을 Table 13에 제시하였다.

① 인의 섭취량과 분 중 인 배설량은 칼슘습원에 따른 차이는 보이지 않았으나, 식이칼슘수준의 영향을 받았다. 정상 칼슘군에 비해 고 칼슘군에서 인의 섭취량과 분 중 인배설량이 유의적으로 증가하였다. 이런 결과는 식이 조성에서 칼슘함량이 증가하면서 인의 함량도 함께 증가하였기 때문으로 사료된다.

② 인의 흡수량은 칼슘 급원별로 유의적인 차이가 없었으나, 인의 섭취가 높은 고칼슘군의 인의 흡수량이 유의적으로 높았다. 그러나 이는 칼슘 수준의 증가에 따른 인 섭취량의 증가에 기인한 것으로 인의 흡수율은 칼슘 급원이나 섭취수준에 따라 실험군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

③ 따라서, 개발된 유기태 칼슘제제(CaWPS)는 정상칼슘 수준이나 고칼슘 수준에서 인의 소장 흡수율에는 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Table 13. Daily P intake, fecal P excretion, daily and apparent P absorption of rats fed experimental diet for 6 weeks

| Groups ⁴⁾ | P intake (mg/d) | Fecal P excretion (mg/d) | Apparent absorption (mg/d) | Apparent absorption rate (%) |
|----------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Normal Ca | | | | |
| N-CaCO ₃ | 56.0±1.6 ^{1)3)NS} | 10.2±0.3 ^{NS} | 45.8±1.6 ^{NS} | 81.8±0.7 ^{NS} |
| N-CaCl | 56.5±1.9 | 9.5±1.1 | 47.0±1.6 | 83.3±1.6 |
| N-CaWPS | 57.0±1.3 | 9.9±1.2 | 47.1±1.2 | 82.7±1.9 |
| High Ca | | | | |
| H-CaCO ₃ | 149.6±6.3 ^{NS} | 29.1±2.6 ^{NS} | 120.5±6.6 ^{NS} | 80.4±1.8 ^{NS} |
| H-CaCl | 152.0±5.4 | 37.2±5.5 | 114.8±7.9 | 78.8±1.8 |
| H-CaWPS | 145.6±3.3 | 40.9±2.9 | 104.8±4.8 | 75.9±1.9 |

¹⁾ Values are mean±SE of 6 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 1.

(다) 대퇴골의 무게, 체중당 무게, 길이 및 파단력

대퇴골의 무게는 Figure 8, 대퇴골의 체중당 길이, 파단력은 Table 14에 제시하였다.

① 정상 칼슘 수준에서는 대퇴골의 무게, 체중당 무게, 길이 및 파단력이 칼슘 급원별로 유의적인 차이가 없었으나, 고칼슘 수준에서는 유기태 칼슘군의 대퇴골의 무게가 탄산칼슘군에 비해 증가하였다. 그러나 체중당 무게, 길이, 파단력에서는 유의적인 차이가 없었다.

② 대퇴골의 체중당 무게는 정상칼슘군보다 고칼슘군에서 높은 경향을 보였고, 대퇴골의 길이는 칼슘의 급원과 섭취 수준에 영향을 받지 않았다. 이것은 칼슘의 섭취량이 골격의 길이를 결정하지 못한다는 Rodriguez 등²⁸⁾의 연구결과와도 일치하였다.

③ 대퇴골의 파단력(breaking force)은 유기태 칼슘군이 대조군(N-CaCO₃)과 비교하여 2.6%(N-CaWPS)~5.7%(H-CaWPS) 범위로 증가하였다. 그러나 탄산칼슘군과 구연산칼슘군 간에는 차이를 보이지 않았다.

④ 결과적으로, 성장기 흰쥐에서 유기태 칼슘제의 섭취는 골격 성장에 있어 길이성장을 제외하고, 뼈의 무게 및 강도를 증가시키는 효과를 나타내었으며, 칼슘 섭취 수준에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 이것은 Ca-WPS제제의 섭취수준에 따라 체내흡수 및 생체이용율이 증가됨에 따라 최종 골격 형성에 기여하는 것으로 조사되었다. 그러므로 골격의 성장 및 강도에 있어서 유기태 칼슘 보충제의 이용성은 탄산칼슘과 구연산 칼슘의 이용성과 대등한 결과를 나타내어 칼슘 보충제로서 기능이 충분하다고 사료된다.

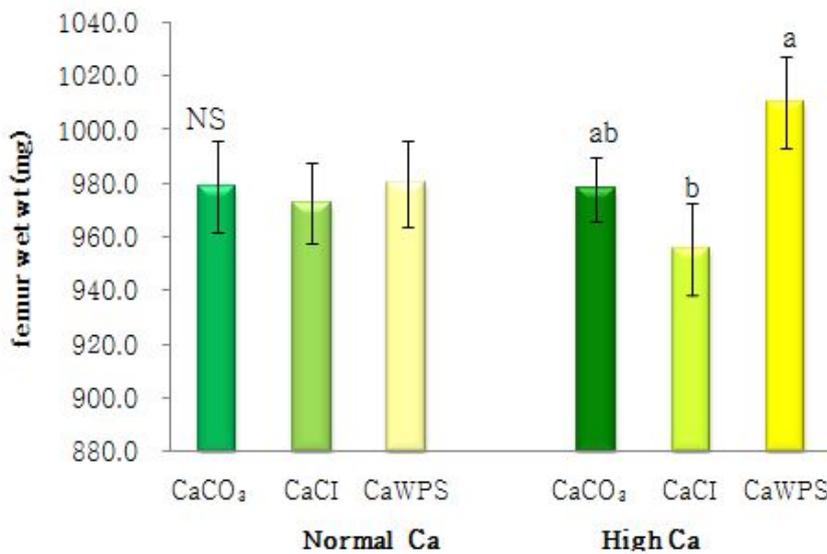


Figure 8. Femur wet weight of rats fed experimental diet for 6 weeks

Values are means of 6 rats per group. N-CaCO₃ : Normal Ca diet (0.5%), CaCO₃ ; N-CaCl: Normal Ca diet (0.5%), Calcium Citrate; N-CaWPS: Normal Ca diet (0.5%), Calcium chelated with Whey Protein; H-CaCO₃ : High Ca diet (1.5%), CaCO₃ ; H-CaCl: High Ca diet (1.5%), Calcium Citrate; H-CaWPS: High Ca diet (1.5%), Calcium chelated with Whey Protein. Bars with different letters are significantly different at p<0.05. NS : not significantly different among groups.

Table 14. Weight, length and breaking force in femurs of rats fed experimental diet for 6 weeks

| Groups ⁴⁾ | Wet weight [†] (mg) | Wet wt/ 100g BW [†] (mg/100g BW) | length [†] (mm) | Breaking force [†] (kg) |
|----------------------|---------------------------------|---|-----------------------------|--|
| Normal Ca | | | | |
| N-CaCO ₃ | 979.2±17.2 ^{1)3)NS} | 262.1±5.7 ^{NS} | 36.8±0.3 ^{NS} | 15.6±0.5 ^{NS} |
| N-CaCl | 972.9±15.3 | 268.3±9.5 | 36.2±0.6 | 15.3±0.5 |
| N-CaWPS | 980.3±16.1 | 265.4±7.7 | 36.7±0.3 | 16.0±0.3 |
| High Ca | | | | |
| H-CaCO ₃ | 978.1±12.0 ^{2)ab} | 277.6±6.4 ^{NS} | 36.8±0.2 ^{NS} | 15.8±0.4 ^{NS} |
| H-CaCl | 956.1±17.1 ^b | 273.8±3.7 | 36.3±0.4 | 15.4±0.4 |
| H-CaWPS | 1010.5±16.8 ^a | 279.5±6.8 | 37.0±0.2 | 16.5±0.6 |

¹⁾ Values are mean±SE of 6 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan' s multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 1.

[†]: Average values of both femurs.

(라) 대퇴골의 회분량, 칼슘, 인, 마그네슘 및 철분 함량

대퇴골의 회분량, 칼슘, 인, 마그네슘 및 철분함량을 Table 15에 제시하였다. 대퇴골의 회분량, 칼슘, 인, 마그네슘 및 철분함량은 칼슘의 섭취 수준 별로 칼슘 급원의 영향을 받지 않았다.

① 칼슘의 섭취 수준에 따라 정상 및 고수준의 유기태 칼슘군의 회분량은 다른 군과 유의적인 차이가 없었다. 정상 유기태 칼슘군과 구연산 칼슘군이 탄산칼슘군보다 회분함량이 높았으며, 고칼슘군에서 유기태 칼슘과 탄산칼슘의 회분양의 차이를 보이지 않았다.

② 대퇴골의 칼슘함량은 칼슘의 급원에 따른 유의적인 차이가 없었으나, 칼슘의 섭취수준이 증가할수록, 대퇴골의 칼슘 함량이 증가하는 경향을 보였는데, 정상칼슘 대비 고칼슘군의 탄산칼슘군 6.6%, 구연산 칼슘군 7.2%, 유기태 칼슘군 7.6%의 칼슘 함량이 증가하였다.

③ 대퇴골의 인 함량도 칼슘섭취 수준별로 칼슘의 급원에 따른 차이는 없었으나, 고칼슘군이 정상칼슘군에 비하여 인의 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 이것은 O 등²⁹⁾의 연구에서 저칼슘을 섭취한 군에서 대퇴골의 인의 함량이 감소하였다는 결과와 일치하며, 이는 칼슘 섭취 증가에 의해 칼슘함량이 증가하면서 인도 함께 침착이 증가한 것으로 보인다.

④ 한편 대퇴골의 마그네슘 함량도 칼슘 급원에 따라서는 군별로 유의적인 차이는 없었고, 칼슘의 섭취가 증가할수록 대퇴골의 마그네슘 함량은 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이를 보이지 않았다. Lee 등³⁰⁾의 연구에서는 난소절제 없이 저칼슘을 섭취한 군이 마그네슘의 함량이 유의적으로 증가하는 결과를 보였고, Evans 등³¹⁾은 쥐의 실험에서 고칼슘 섭취가 마그네슘의 흡수를 낮추는 결과를 보였다.

⑤ 대퇴골의 철분 함량도 칼슘, 인, 마그네슘처럼 칼슘 급원에 따라 유의적인 차이는 없었으나, 고칼슘 식이를 섭취한 군이 정상 수준의 칼슘을 섭취한 군보다 철분 함량이 낮은 경향을 보였다. Tsugawa 등³²⁾의 연구에서도 calcium carbonate, DL-calcium, lactate, L-calcium lactate, powdered oyster shell calcium을 쥐에 공급한 결과 다양한 칼슘의 급원에 따라 대퇴골의 무기질 함량에 차이가 없었다.

대퇴골의 회분량, 칼슘, 인, 마그네슘 및 철분의 함량을 측정한 결과 유기태 칼슘이 성장기 흰 쥐의 대퇴골에서 탄산칼슘과 구연산 칼슘과 비교하여 유사한 성장을 보였으므로 새로운 칼슘 급원으로서의 가치가 충분하다고 본다.

Table 15. Ash, Ca, P, Mg and Fe contents in both femurs of rats fed experimental diet for 6 weeks

| Groups ⁴⁾ | Ash [†] (mg/g wet wt) | Ca [†] (mg/g wet wt) | P [†] (mg/g wet wt) | Mg [†] (mg/g wet wt) | Fe [†] (ug/g wet wt) |
|----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Normal Ca | | | | | |
| N-CaCO ₃ | 374.4±5.5 ^{1)3)NS} | 91.7±1.3 ^{NS} | 50.7±0.8 ^{NS} | 2.4±0.0 ^{NS} | 59.2±2.8 ^{NS} |
| N-CaCl | 385.9±7.7 | 92.7±4.7 | 48.0±2.5 | 2.3±0.1 | 57.1±2.5 |
| N-CaWPS | 385.7±6.4 | 92.6±1.0 | 48.1±1.3 | 2.4±0.1 | 58.4±3.6 |
| High Ca | | | | | |
| H-CaCO ₃ | 387.1±5.4 ^{NS} | 98.2±1.6 ^{NS} | 51.2±1.2 ^{NS} | 2.0±0.1 ^{NS} | 47.4±2.5 ^{NS} |
| H-CaCl | 395.1±11.0 | 99.9±3.2 | 49.3±2.4 | 2.1±0.1 | 50.1±2.0 |
| H-CaWPS | 387.6±4.2 | 100.2±2.8 | 50.1±1.0 | 2.1±0.0 | 53.7±1.3 |

¹⁾ Values are mean±SE of 6 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan' s multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 1.

[†]: Average values of both femurs.

(마) 간조직의 회분량, 칼슘, 인, 마그네슘 및 철분 함량

간조직의 회분량, 인, 마그네슘 및 철분의 함량을 Table 16, 간조직의 칼슘함량을 Figure 9에 제시하였다.

① 간의 회분량은 정상칼슘식이 수준에서 유기태 칼슘군이 다른 군에 비해 유의적으로 회분량이 감소하였다.

② 간의 칼슘함량은 정상칼슘군에서 칼슘의 급원에 의한 유의적인 차이는 없었으나, 유기태칼슘군의 칼슘함량이 탄산칼슘군에 비해 낮은 경향을 보였고, 고칼슘 식이 수준에서도 유기태 칼슘군이 탄산칼슘군에 비해 유의적으로 간의 칼슘 함량이 낮았다.

③ 간의 인 함량은 정상칼슘 식이수준에서 유기태 칼슘군은 다른 군과 유의적인 차이가 없었으나, 고칼슘 식이수준에서는 탄산칼슘군에 비해 유기태 칼슘군의 인의 함량이 유의적으로 감소하였다. 간의 인 함량은 칼슘함량과 함께 칼슘의 섭취수준이 높을수록 증가 경향을 보였다.

④ 간의 마그네슘 함량은 정상 칼슘과 고 칼슘 수준에서 탄산칼슘과 유기태 칼슘군의 마그네슘 함량이 비슷한 수준으로 나타났다.

⑤ 간의 철분함량은 정상칼슘 식이 수준에서는 각 군 간에 유의적인 차이가 없었으나, 고칼슘 식이군에서는 탄산칼슘군에 비해 유기태 칼슘군의 철 함량이 유의적으로 증가하였다.

⑥ 따라서, 철분을 제외하고 간조직의 칼슘, 인 및 마그네슘 함량이 정상칼슘군과 고칼슘군 모두 대조군과 비슷하거나 낮아져서 유기태 칼슘이 간조직의 무기질 침착 등의 부정적인 영향을 끼치지 않는 것으로 보인다.

Table 16. Ash, Ca, P, Mg and Fe contents in liver of rats fed experimental diet for 6 weeks

| Groups ⁴⁾ | Ash (mg/g dry wt) | Ca (ug/g dry wt) | P (mg/g dry wt) | Mg (ug/g dry wt) | Fe (ug/g dry wt) |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| Normal Ca | | | | | |
| N-CaCO ₃ | 39.8±1.5 ^{1)2)ab} | 287.3±11.3 ^{3)NS} | 8.0±0.3 ^{NS} | 584.8±24.1 ^b | 334.9±7.6 ^{NS} |
| N-CaCl | 43.4±1.9 ^a | 281.9±10.5 | 7.7±0.4 | 667.3±19.0 ^a | 315.3±18.2 |
| N-CaWPS | 36.4±1.1 ^b | 248.0±16.2 | 7.0±0.3 | 594.7±24.7 ^b | 355.6±16.1 |
| High Ca | | | | | |
| H-CaCO ₃ | 39.2±1.9 ^{NS} | 388.7±13.4 ^a | 8.7±0.3 ^a | 682.3±22.6 ^a | 232.6±12.7 ^b |
| H-CaCl | 41.5±1.0 | 317.2±12.6 ^b | 8.4±0.3 ^{ab} | 556.6±9.6 ^c | 321.1±11.1 ^a |
| H-CaWPS | 41.7±1.5 | 308.7±7.4 ^b | 7.8±0.2 ^b | 635.5±9.7 ^b | 303.6±16.4 ^a |

¹⁾ Values are mean±SE of 6 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 1.

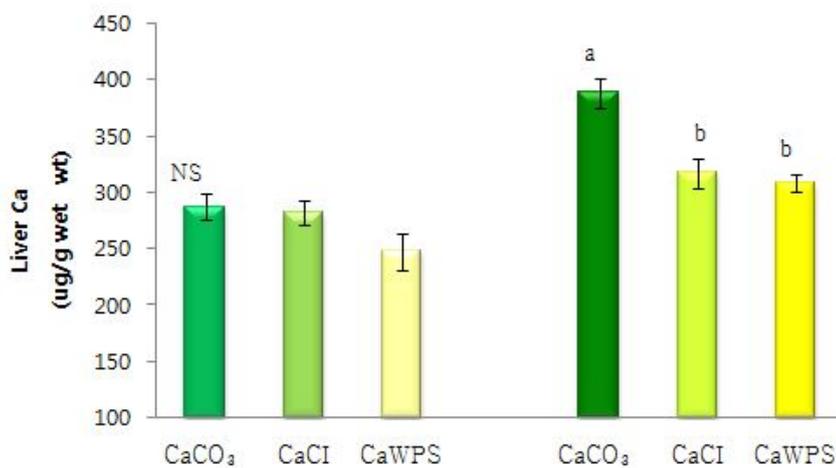


Figure 9. Ca content in liver of rats fed experimental diet for 6 weeks

Values are means of 6 rats per group. N-CaCO₃ : Normal Ca diet (0.5%), CaCO₃ ; N-CaCI: Normal Ca diet (0.5%), Calcium Citrate; N-CaWPS: Normal Ca diet (0.5%), Calcium chelated with Whey Protein; H-CaCO₃ : High Ca diet (1.5%), CaCO₃ ; H-CaCI: High Ca diet (1.5%), Calcium Citrate; H-CaWPS: High Ca diet (1.5%), Calcium chelated with Whey Protein. Bars with different letters are significantly different at p<0.05. NS : Not significantly different among groups.

(바) 신장의 회분량, 칼슘, 인, 마그네슘 및 철분 함량

신장의 회분량, 인, 마그네슘 및 철분 함량을 Table 17, 신장의 칼슘함량을 Figure 10에 제시하였다.

① 신장의 회분량은 정상 칼슘 식이수준에서 군 간에 유의적인 차이는 없었으나, 고칼슘 식이수준에서 유기태 칼슘군의 함량이 탄산칼슘군에 비해 유의적으로 높았다.

② 신장의 칼슘 함량은 정상칼슘식이 섭취시 유기태 칼슘군이 탄산칼슘군에 비해 유의적으로 낮았으나, 고칼슘을 섭취한 경우 유기태 칼슘군은 탄산칼슘군과 차이가 없었고, 구연산 칼슘군에 비해 유의적으로 증가하였다.

③ 신장의 인 함량은 칼슘섭취 수준 및 급원에 따른 차이는 없었다.

④ 신장의 마그네슘과 철분의 함량은 정상칼슘식이를 섭취한 유기태 칼슘군은 구연산 칼슘군에 비해 탄산칼슘과 비슷한 정도의 수준을 보였으며, 칼슘군에서는 칼슘 급원에 따라 유의적인 차이가 없었다.

따라서 고 유기태 칼슘 섭취시에도 대조군인 탄산칼슘군과 비교하여 신장 조직에서 다른 무기질의 유의적인 저하나 과잉 침착 등의 이상증상을 보이지 않았다.

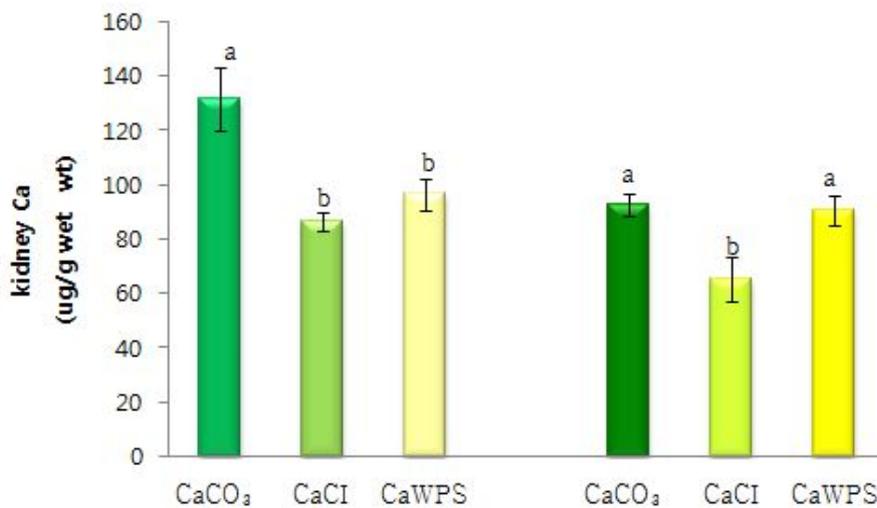


Figure 10. Ca content in kidney of rats fed experimental diet for 6 weeks

Values are means of 6 rats per group. N-CaCO₃ : Normal Ca diet (0.5%), CaCO₃ ; N-CaCl: Normal Ca diet (0.5%), Calcium Citrate; N-CaWPS: Normal Ca diet (0.5%), Calcium chelated with Whey Protein; H-CaCO₃ : High Ca diet (1.5%), CaCO₃ ; H-CaCl: High Ca diet (1.5%), Calcium Citrate; H-CaWPS: High Ca diet (1.5%), Calcium chelated with Whey Protein. Bars with different letters are significantly different at p<0.05.

Table 17. Ash, Ca, P, Mg and Fe contents in kidney of rats fed experimental diet for 6 weeks.

| Groups ⁴⁾ | Ash (mg/g wet wt) | Ca (ug/g wet wt) | P (mg/g wet wt) | Mg (ug/g wet wt) | Fe (ug/g wet wt) |
|----------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| Normal Ca | | | | | |
| N-CaCO ₃ | 14.4±0.5 ^{1)3)NS} | 131.6±11.6 ^{2)a} | 2.1±0.1 ^{NS} | 156.4±6.5 ^a | 213.5±19.2 ^a |
| N-CaCl | 13.3±0.4 | 86.6±3.2 ^b | 2.1±0.0 | 126.0±3.3 ^b | 115.9±6.0 ^b |
| N-CaWPS | 13.1±0.7 | 96.7±5.8 ^b | 2.3±0.1 | 146.5±2.8 ^a | 185.8±9.3 ^a |
| High Ca | | | | | |
| H-CaCO ₃ | 13.4±0.3 ^b | 92.6±4.0 ^a | 2.1±0.1 ^{NS} | 117.7±1.2 ^{NS} | 114.6±4.6 ^{NS} |
| H-CaCl | 14.3±0.5 ^{ab} | 65.5±8.1 ^b | 1.9±0.1 | 123.4±4.0 | 131.7±5.3 |
| H-CaWPS | 15.2±0.5 ^a | 90.8±5.6 ^a | 2.1±0.0 | 121.2±3.1 | 129.1±6.0 |

¹⁾ Values are mean±SE of 6 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan' s multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 1.

(사) 비장의 회분량, 칼슘, 인, 마그네슘 및 철분 함량

비장의 회분량, 인, 마그네슘 및 철분의 함량을 Table 18, 비장의 칼슘 함량을 Figure 11에 제시하였다.

① 정상칼슘 식이를 섭취한 유기태 칼슘군의 비장 회분량은 다른 군과 유의적인 차이가 없었으나, 고칼슘군에서는 유기태 칼슘군이 다른 군에 비해 유의적으로 증가하였다.

② 비장의 인 함량은 칼슘의 섭취 수준과 급원에 따른 차이가 없었다.

③ 비장의 마그네슘은 칼슘섭취 수준의 영향을 받아 정상칼슘식이 섭취는 탄산칼슘군과 유기태 칼슘군간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 고칼슘 식이 수준에서 유기태 칼슘군이 탄산칼슘군에 비해 유의적으로 증가하였다.

④ 비장의 철분 함량 또한 마그네슘과 같은 결과를 보여서 고칼슘군의 경우 유기태 칼슘군이 탄산칼슘군에 비해 유의적으로 증가하였다.

Table 18. Ash, Ca, P, Mg and Fe contents in spleen of rats fed experimental diet for 6 weeks

| Groups ⁴⁾ | Ash (mg/g wet wt) | Ca (ug/g wet wt) | P (mg/g wet wt) | Mg (ug/g wet wt) | Fe (ug/g wet wt) |
|----------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
| Normal Ca | | | | | |
| N-CaCO ₃ | 29.0±1.1 ^{1)2)b} | 79.1±5.8 ^b | 2.6±0.0 ^b | 154.8±3.1 ^a | 191.5±4.1 ^b |
| N-CaCl | 33.8±1.4 ^a | 107.8±4.3 ^a | 2.8±0.1 ^a | 133.7±5.0 ^b | 229.7±7.2 ^a |
| N-CaWPS | 31.2±1.3 ^{ab} | 111.0±5.8 ^a | 2.6±0.1 ^b | 144.7±3.3 ^{ab} | 170.8±7.2 ^b |
| High Ca | | | | | |
| H-CaCO ₃ | 26.1±1.2 ^b | 138.2±13.4 ^{NS} | 2.7±0.1 ^{NS} | 114.2±3.8 ^b | 170.4±6.4 ^b |
| H-CaCl | 26.5±0.9 ^b | 137.3±7.3 | 2.7±0.1 | 127.9±2.7 ^a | 189.9±12.0 ^{ab} |
| H-CaWPS | 30.9±1.1 ^a | 158.9±13.1 | 2.8±0.1 | 138.0±3.4 ^a | 212.4±5.9 ^a |

¹⁾ Values are mean±SE of 6 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 1.

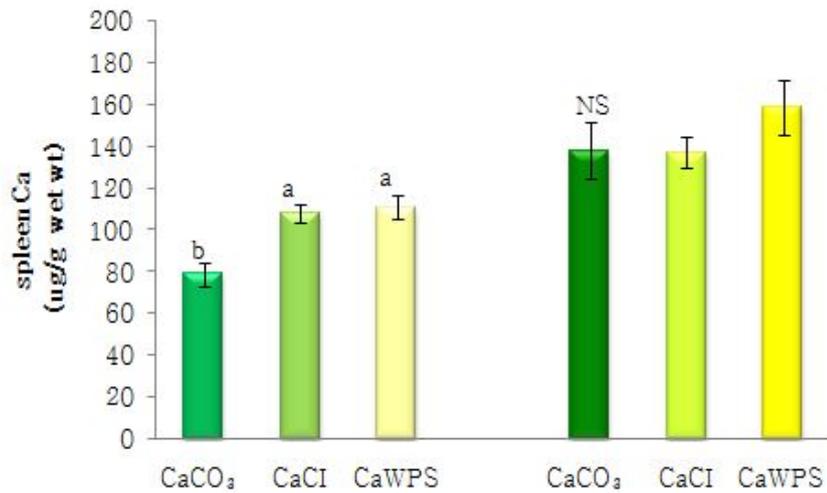


Figure 11. Ca content in spleen of rats fed experimental diet for 6 weeks

Values are means of 6 rats per group. N-CaCO₃ : Normal Ca diet (0.5%), CaCO₃ ; N-CaCI: Normal Ca diet (0.5%), Calcium Citrate; N-CaWPS: Normal Ca diet (0.5%), Calcium chelated with Whey Protein; H-CaCO₃ : High Ca diet (1.5%), CaCO₃ ; H-CaCI: High Ca diet (1.5%), Calcium Citrate; H-CaWPS: High Ca diet (1.5%), Calcium chelated with Whey Protein. Bars with different letters are significantly different at p<0.05. NS : Not significantly different among groups.

나. 골다공증 모델 흰쥐에서 Ca-WPS제제의 안전성 및 골격대사에 미치는 효과평가 [실험2]

(1) 체중 변화에 미치는 영향

(가) 체중 증가량 및 식이섭취량

난소절제와 4주간 저칼슘의 탄산칼슘식이로 유도한 골다공증 모델 흰쥐에게 저칼슘수준의 탄산칼슘을 대조군으로 급여하고, 유기태 칼슘을 저칼슘, 정상칼슘, 고칼슘의 3가지 수준으로 급여한 후 체중 변화를 Figure 12, 식이섭취량, 체중증가에 대한결과를 Table 19에 제시하였다.

① 실험동물의 최종 무게는 칼슘 섭취 수준에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았다.

골다공증 모델(난소절제와 저칼슘식이로 유도)에서 4주 골다공증모델군(L4-CaCO₃)에 비해 8주 탄산칼슘섭취군의 체중은 14.2% 증가하였으며, 유기태 칼슘 섭취군은 칼슘 섭취 수준에 따라 16%~17%의 체중증가를 나타내어 골다공증 모델 설정에 따른 유의성은 인정되었다.

② 그러나 식이 섭취량은 8주간 저칼슘수준의 탄산칼슘을 섭취한 군보다 유기태 칼슘을 섭취한 모든 군에서 유의적으로 증가하였다.

③ 체중 증가는 칼슘 섭취 수준의 영향을 받아 정상 및 고수준의 유기태 칼슘을 섭취한 군에서 유의적으로 가장 높았으며, 탄산칼슘의 체중증가가 가장 낮았다. 본 연구에서 개발 사용된 유기태 칼슘보충제는 유청단백질과 칼슘을 결합시키는 방법에 의해 제조되었기 때문에 칼슘 이외의 다른 유기 영양소가 식이섭취량 및 체중증가에 기여한 것으로 판단된다.

따라서, 유기태 칼슘의 섭취는 골다공증 모델 흰쥐의 식이 섭취량과 체중증가에 부정적인 영향을 보이지 않음에 따라, Ca-WPS제제는 전체농도 처리군(0.1%~1.5%)에서 무독성제제임이 확인되었다.

Table 19. Body weight, food intake and weight gain of osteoporotic rats fed experimental diet for 4 weeks

| Groups ⁴⁾ | Initial body weight (g) [†] | Final body weight (g) | Daily food intake (g/d) | Daily Weight gain (g/d) |
|----------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| L4-CaCO ₃ | 242.7 ± 4.8 ^{1)3)NS} | 317.1 ± 4.1 [*] | 16.8 ± 0.4 ^{NS} | 2.7 ± 0.2 [*] |
| L8-CaCO ₃ | 243.2 ± 5.7 ^{NS} | 362.4 ± 8.4 ^{NS} | 16.4 ± 0.3 ^{2)b} | 2.1 ± 0.1 ^c |
| L8-CaWPS | 243.1 ± 5.8 | 368.1 ± 4.9 | 17.8 ± 0.3 ^a | 2.6 ± 0.2 ^b |
| N8-CaWPS | 243.1 ± 5.6 | 371.5 ± 10.3 | 18.0 ± 0.4 ^a | 3.1 ± 0.1 ^a |
| H8-CaWPS | 243.4 ± 7.1 | 372.5 ± 12.1 | 18.3 ± 0.3 ^a | 3.1 ± 0.2 ^a |

¹⁾ Values are mean ± SE of 7 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 2.

* : P<0.05 significant difference between L4-CaCO₃ and L8-CaCO₃ by t-test.

† : measured at 8 weeks.

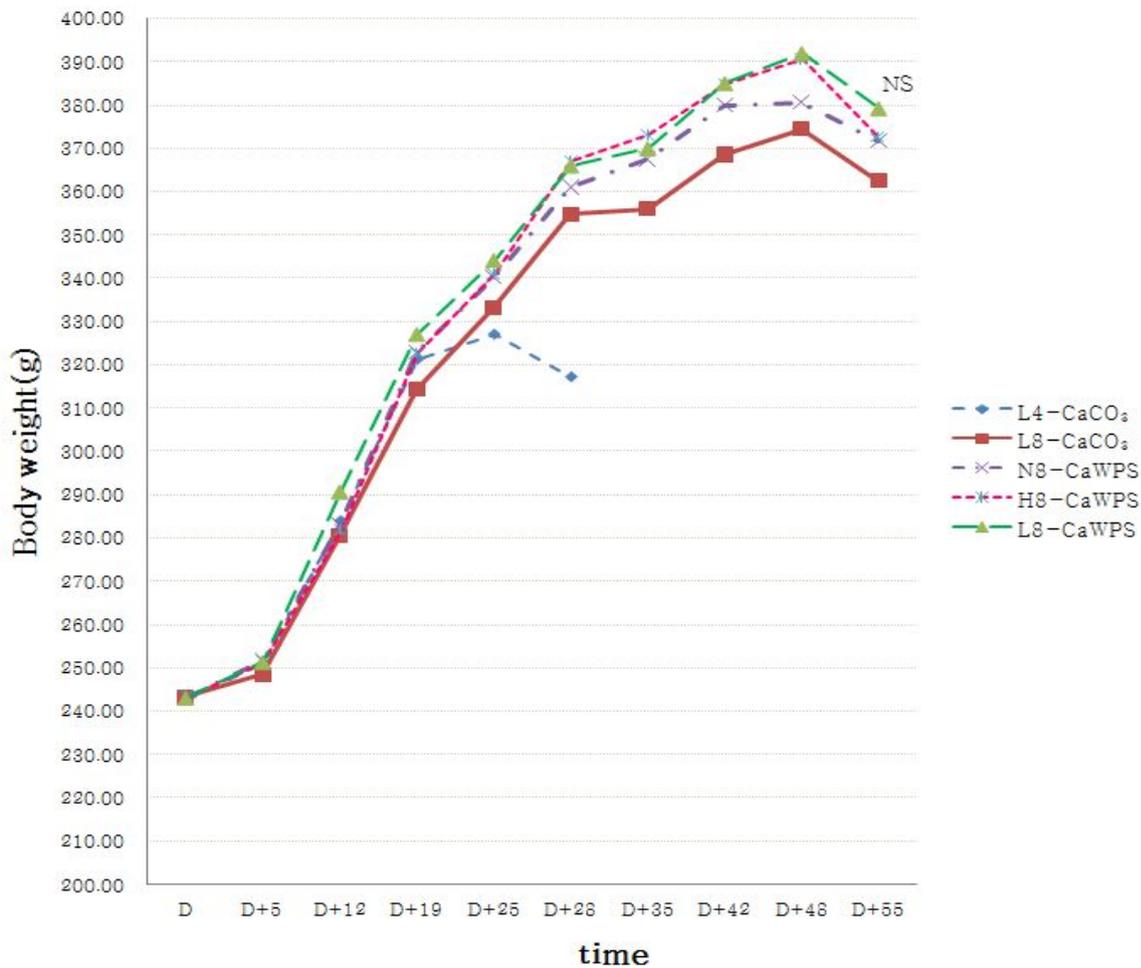


Figure 12. Body weight changes of the osteoporotic rats fed experimental diet for 4 weeks

Values are mean of 7 rats per group. L4-CaCO₃: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%); L8-CaCO₃: Low Ca diet (0.1%) for 8 weeks; L8-CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+Low Ca chelated with Whey Protein for 4 weeks; N8-CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+Normal Ca chelated with Whey protein for 4 weeks; H8-CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+High Ca chelated with Whey protein. NS : Not significantly different all groups except L4-CaCO₃.

(2) 혈액 성분에 미치는 영향

(가) 혈청의 칼슘, 인, 마그네슘 함량 및 ALP 활성

골다공증 모델 흰쥐에게 4주간 저수준의 탄산칼슘과 수준별 유기태 칼슘을 급여한 후 혈청 칼슘, 인 및 마그네슘의 함량을 Table 20, ALP활성에 대한 결과를 Figure 13에 제시하였다.

① 혈청 칼슘의 농도는 칼슘 섭취 수준에 영향을 받아 고칼슘 식이의 유기태 칼슘군에서 칼슘의 농도가 감소되었으나 모든 실험군의 혈청 칼슘의 농도는 정상범위 (7.2~12.6 mg/dl) 내에 있었다.¹³⁾ 혈청의 칼슘 농도는 칼슘의 섭취가 증가하더라도 PTH, calcitriol, calcitonin 등의 조절 호르몬에 의해 엄격하게 항상성이 유지된 것으로 사료된다.

② 혈청 인의 농도는 탄산칼슘군간의 유의적인 차이가 없었으나, 유기태 칼슘의 섭취가 증가할수록 인의 농도도 증가하였다. 이러한 결과는 Ca-WPS제제 제조시 미네랄 킬레이팅 관련기능기로서 -P를 극대화(Ca-WPS제제내 17,4930~58,790ppm 함유)하였고, 폐경기 단계에서는 유기태화 칼슘이 체내로 흡수되면서 동시에 인도 체내흡수되었기 때문인것으로 판단되었다.

③ 혈청의 마그네슘 함량은 칼슘의 섭취 수준과 급원의 영향을 받지 않았다. 고칼슘의 섭취는 동물실험에서 마그네슘의 흡수를 방해하는 것으로 보고되고 있다. Kaup 등³³⁾은 1년간 2.5%의 칼슘을 수컷 흰쥐에게 공급한 결과 대퇴골 및 혈청의 마그네슘 농도가 유의적으로 감소됨을 보고하였다. 그러나 본 실험에서 고칼슘 식이의 유기태 칼슘군은 저 및 정상수준으로 유기태 칼슘과 탄산칼슘을 섭취한 군에 비해 유의적인 차이가 없었다. 그러므로 고수준의 유기태 칼슘은 마그네슘의 흡수율을 저해하지 않는 것으로 생각된다.

④ 골격 형성 지표로 사용되는 ALP는 조골세포에 존재하여 국소의 뼈 무기질의 침착을 항진시키고, 폐경기 골다공증 환자에서는 현저히 증가되며, 여러 연구들이 난소제거 후 ALP의 활성이 증가된다고 제시하고 있다³⁴⁾³⁵⁾. 폐경기가 진행됨에 따라 섭취기간에 따른 저칼슘 수준의 탄산칼슘을 섭취한 군의 골격 형성에 대한 영향을 혈청 ALP 활성의 변화를 통해 보았을 때, 8주간 탄산칼슘을 섭취한 군이 4주간 탄산칼슘을 섭취한 군에 비해 5% 증가되었다. 그러나 유기태 칼슘을 수준별로 섭취하였을 때 29~37%의 감소효과가 있는 것으로 나타났다. 그러나 유기태화 칼슘제제의 수준별 차이는 보이지 않았다.

따라서, 골다공증 이후 지속적인 저수준의 탄산칼슘식이는 ALP의 활성을 증가시키나, 칼슘 섭취수준에 관계없이 유기태 칼슘을 섭취한 경우 ALP의 활성이 유의적으로 감소되어, 난소제거에 의한 골 교체율의 증가를 감소시킨 것으로 보인다. 또한 난소절제 후 에스트로겐의 결핍은 결국 ALP 활성의 증가와 골교체율(bone turnover)의 증가를 초래하지만, 유기태 칼슘은 탄산칼슘과 비교하여 이러한 효과를 억제함에 따라, 유기태 칼슘이 골다공증 치료를 위한 칼슘 보충제로서의 기능이 더 우수하다고 사료된다. 또한 안전성 및 섭취량 대비 생체이용률을 동시에 충족시킬 수 있는 하루 섭취량은 1.5%이내가 가장 효율적일 것으로 사료되었다.

Table 20. The concentration of Ca, P, Mg and ALP activity in serum of the osteoporotic rats fed experimental diets for 4 weeks

| Groups ⁴⁾ | Ca (mg/dl) | P (mg/dl) | Mg (mg/dl) | ALP [†] (IU/ ℓ) |
|----------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------|
| L4-CaCO ₃ | 12.3±0.1 ^{1)3)NS} | 7.5±0.2 ^{NS} | 2.2±0.1 ^{NS} | 189.3±13.2 ^{NS} |
| L8-CaCO ₃ | 12.4±0.2 ^{2)a} | 7.5±0.3 ^b | 2.2±0.1 ^{NS} | 198.8±8.1 ^a |
| L8-CaWPS | 12.2±0.1 ^{ab} | 7.9±0.3 ^b | 2.2±0.0 | 141.3±4.4 ^b |
| N8-CaWPS | 12.0±0.2 ^{ab} | 8.3±0.4 ^{ab} | 2.4±0.1 | 126.7±15.0 ^b |
| H8-CaWPS | 11.7±0.2 ^b | 9.0±0.3 ^a | 2.1±0.1 | 147.8±12.9 ^b |

¹⁾ Values are mean ± SE of 7 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan' s multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 2.

* : P<0.05 significant difference between L4-CaCO₃ and L8-CaCO₃ by t-test. [†] ALP : alkaline phosphatase

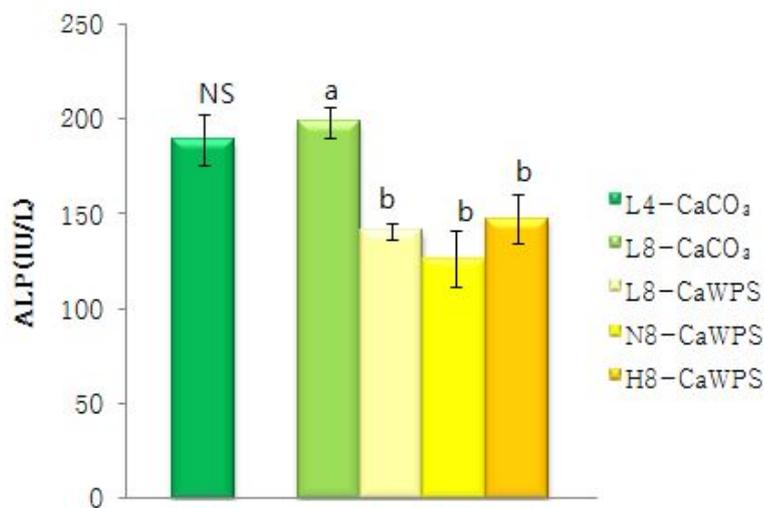


Figure 13. Alkaline phosphatase (ALP) in serum of osteoporotic rats fed experimental diet for 4 weeks

Values are means of 7 rats per group. L4-CaCO₃: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%); L8-CaCO₃: Low Ca diet (0.1%) for 8 weeks; L8-CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+Low Ca chelated with Whey Protein for 4 weeks; N8-CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+Normal Ca chelated with Whey protein for 4 weeks; H8-CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+High Ca chelated with Whey protein. NS : Not significantly different between L4-CaCO₃ and L8-CaCO₃.

(나) 간기능 혈액지표

골다공증 모델 흰쥐에게 4주간 유기태 칼슘을 수준별로 급여한 후 간기능의 지표를 Table 21에 제시하였다.

① GOT의 활성은 4주 골다공증 모델군(L4-CaCO₃)에 비해 8주 탄산칼슘 섭취군(L8-CaCO₃)이 31.3% 증가하였으며, 유기태 칼슘군의 경우 8주 탄산칼슘 섭취군과 비교할 경우, 혈청 GOT의 활성은 1.4~4.4% 범위로 감소하는 것으로 나타나 간에 무리를 주지 않는 것으로 사료되었다.

② GPT 활성은 18주령의 정상 흰쥐의 정상치(39.9~48.3 mg/dl)보다는 낮은 수치를 나타냈다¹³⁾. 그러나 GPT의 활성은 8주 탄산칼슘 섭취군보다 정상칼슘을 섭취한 유기태 칼슘군이 12.9% 감소한 결과를 보였으나, 고농도를 섭취한 유기태 칼슘군은 30.3%가 증가한 것으로 나타났다.

③ 혈청 알부민의 농도는 각 군별로 유의적인 차이는 없었다.

④ 혈청 총 단백질 농도는 8주간 저수준의 탄산칼슘을 섭취한 군에서 유의적으로 높았고, 정상 및 고유기태 칼슘군에서 유의적으로 낮았다.

⑤ 총 빌리루빈의 농도는 칼슘의 종류와 섭취 수준에 의해 영향을 받지 않아 각 군별로 유의적인 차이가 없었다.

⑥ 그러므로 폐경기 이후 유기태 칼슘제는 1.5% 이하의 농도섭취시는 간에 무리를 주지 않음을 알 수 있었으며, 1.5% 이상 농도에서는 간에 대하여 무리를 줄 수 있음을 시사하였다.

Table 21. The effect of organic Ca on parameters of liver function in serum of osteoporotic rats fed experimental diets for 4 weeks

| Groups ⁴⁾ | GOT [†] (IU/ℓ) | GPT (IU/ℓ) | Albumin (g/ℓ) | T-protein (g/dℓ) | T-bilirubin (mg/dℓ) |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| L4-CaCO ₃ | 108.5±7.1* | 27.8±2.6 ^{1)3)NS} | 3.6±0.1 ^{NS} | 6.7±0.1 ^{NS} | 0.64±0.02 ^{NS} |
| L8-CaCO ₃ | 142.5±5.0 ^{NS} | 31.0±2.0 ^{NS} | 3.6±0.1 ^{NS} | 6.9±0.1 ^a | 0.66±0.05 ^{NS} |
| L8-CaWPS | 138.2±7.1 | 35.3±8.2 | 3.7±0.1 | 6.7±0.1 ^{ab} | 0.63±0.04 |
| N8-CaWPS | 136.3±1.7 | 27.0±2.6 | 3.6±0.1 | 6.6±0.1 ^b | 0.73±0.03 |
| H8-CaWPS | 140.5±4.6 | 40.4±6.1 | 3.7±0.0 | 6.6±0.0 ^b | 0.61±0.05 |

¹⁾ Values are mean ± SE of 7 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 2.

* : P<0.05 significant difference between L4-CaCO₃ and L8-CaCO₃ by t-test.

[†] GOT : Glutamic oxaloacetic transaminase

GPT : Glutamic pyruvic transaminase

(다) 신장기능 혈액지표

실험식이에 의한 신장기능 지표를 Table 22에 나타내었다.

① 18주령 암컷 흰쥐(SD)의 혈액 요소 질소(BUN)의 정상 범위는 11.6~25.6 mg/dl¹⁵⁾으로 모든 군의 BUN 농도는 정상 범위내에 있었고, 유기태 칼슘을 섭취한 모든 군이 탄산칼슘군에 비해 유의적으로 낮았다.

② Creatinine의 정상범위는 0.2~1.0 mg/dl¹⁵⁾으로 모든 유기태 칼슘군은 정상범위내에 있었으며, 8주간 저수준의 탄산칼슘을 섭취한 군에 비해 정상과 고수준의 유기태 칼슘군이 유의적으로 Creatinine의 농도가 낮아졌다.

③ 요산(uric acid)의 농도 또한 유기태 칼슘을 섭취한 모든 군이 탄산칼슘에 비해 유의적으로 농도가 낮아졌다.

④ 신기능의 지표가 되는 BUN, Creatinine 및 uric acid는 유기태 칼슘을 섭취한 군이 8주 저탄산칼슘군에 비해 그 농도가 감소함을 확인할 수 있었다. 따라서 유기태 칼슘의 섭취는 칼슘 섭취 수준의 증가에도 불구하고 신장의 기능을 손상시키지는 않는 것으로 사료된다.

Table 22. The effect of organic Ca on parameters of kidney function in serum of osteoporotic rats fed experimental diets for 4 weeks

| Groups ⁴⁾ | BUN (mg/dl) | Creatinine (mg/dl) | Uric acid (mg/dl) |
|----------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|
| L4-CaCO ₃ | 14.0±0.4* | 0.80±0.00* | 2.2±0.0* |
| L8-CaCO ₃ | 15.7±0.5 ^a | 1.08±0.03 ^a | 2.4±0.1 ^a |
| L8-CaWPS | 12.3±0.5 ^b | 1.01±0.05 ^{ab} | 2.1±0.1 ^b |
| N8-CaWPS | 12.3±0.6 ^b | 0.87±0.04 ^c | 2.1±0.1 ^b |
| H8-CaWPS | 12.4±0.2 ^b | 0.90±0.03 ^{bc} | 1.8±0.1 ^c |

¹⁾ Values are mean ± SE of 7 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 2.

* : P<0.05 significant difference between L4-CaCO₃ and L8-CaCO₃ by t-test.

(3) 칼슘 대사에 미치는 영향

(가) 칼슘의 섭취량, 배설량, 흡수량 및 흡수율

골다공증 모델 흰쥐에게 저수준의 탄산칼슘과 유기태 칼슘을 수준별로 급여한 후 칼슘의 섭취량, 분비량을 Table 23, 칼슘 흡수량 및 칼슘 흡수율을 Figure 14에 제시하였다.

① 칼슘의 섭취량 및 분 중의 배설량은 식이 칼슘 수준이 증가함에 따라 유의적으로 증가하였다. 칼슘의 섭취량은 정상칼슘 및 고칼슘을 섭취한 유기태 칼슘군에서 저칼슘을 섭취한 유기태 칼슘군에 비해 각각 5배, 15배 높게 나타났으며, 칼슘 배설량은 정상칼슘 및 고칼슘 유기태 칼슘군에서 각각 5배, 21배 증가하였다.

② 분 중의 칼슘 배설량은 4주 골다공증 모델군과 8주 저탄산칼슘군이 유의적인 차이를 나타내어, 골다공증이 형성된 이후 지속적인 칼슘섭취의 저하는 분 중의 칼슘함량을 증가시켰다. 그러나 저수준의 유기태 칼슘의 섭취는 탄산칼슘보다 분 중으로 배설되는 칼슘의 양을 감소시켰으며, 칼슘의 섭취 수준이 증가함에 따라 분으로 배설되는 칼슘의 양이 증가되었다.

③ 칼슘의 흡수량은 4주 골다공증 모델군에 비해 저칼슘으로 탄산칼슘을 8주간 섭취한 군의 경우 칼슘의 흡수량이 47%가 감소되었으나, 저칼슘의 유기태 칼슘군의 경우 16%가 감소하였다. 또한 칼슘의 흡수량은 식이 칼슘 수준에 영향을 받아 정상 및 고수준의 유기태 칼슘 섭취군의 경우 저칼슘 유기태 칼슘군에 비해 각각 5배, 10배 정도 흡수량이 증가하였다.

④ 칼슘의 흡수율은 칼슘 급원의 영향을 받아 8주간 저수준의 탄산칼슘을 섭취한 군이 4주 골다공증 모델군보다 흡수율이 43% 감소하였으나, 저수준의 유기태 칼슘군은 22%가 감소하였다. 유기태 칼슘의 섭취 수준에 따라서는 저수준과 정상수준의 유기태 칼슘을 섭취한 군에서는 칼슘의 흡수율이 탄산칼슘군에 비해 유의적으로 증가하였지만, 고수준의 유기태 칼슘 섭취군에서는 칼슘 흡수율이 유의적으로 감소하였다.

칼슘의 흡수는 폐경 이후 에스트로겐의 분비 저하로 인해 감소되는 것으로 보고되었으나³⁶⁾, 여러 연구에서 칼슘의 흡수는 난소절제의 영향을 받지 않음을 보고하였다¹⁸⁾³⁷⁾. 본 실험의 결과에서 칼슘 섭취 수준이 증가함에 따라 분변으로 배설되는 칼슘의 양은 증가하여 칼슘의 흡수율이 크게 감소되나 절대 흡수량은 증가하였다. 또한 저칼슘 수준으로 유기태 칼슘을 섭취할 경우 탄산칼슘을 섭취했을 때보다는 유의적으로 칼슘 흡수율이 증가함을 알 수 있었다. 이것은 유기태 칼슘이 칼슘제로서 칼슘의 흡수율을 증가시킬 수 있는 새로운 급원이 될 수 있다는 근거라고 하겠다.

Table 23. Daily Ca intake, fecal Ca excretion, daily and apparent Ca absorption of osteoporotic rats fed experimental diet for 4 weeks

| Groups ⁴⁾ | Ca intake (mg/d) | Fecal Ca excretion (mg/d) | Apparent absorption (mg/d) | Apparent absorption rate (%) |
|----------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| L4-CaCO ₃ | 16.4±0.5 ^{1)3)NS} | 4.3±0.6* | 12.7±0.4* | 74.9±3.4* |
| L8-CaCO ₃ | 16.4±0.3 ^{2)c} | 9.6±0.6 ^c | 6.7±0.4 ^c | 42.7±2.6 ^b |
| L8-CaWPS | 18.3±0.6 ^c | 8.4±0.5 ^c | 10.7±0.8 ^c | 58.1±2.7 ^a |
| N8-CaWPS | 88.4±2.4 ^b | 42.4±1.4 ^b | 51.0±2.0 ^b | 54.5±1.4 ^a |
| H8-CaWPS | 275.5±10.0 ^a | 173.0±13.3 ^a | 102.4±2.6 ^a | 37.7±0.9 ^b |

¹⁾ Values are mean ± SE of 7 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan' s multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 2.

* : P<0.05 significant difference between L4-CaCO₃ and L8-CaCO₃ by t-test.

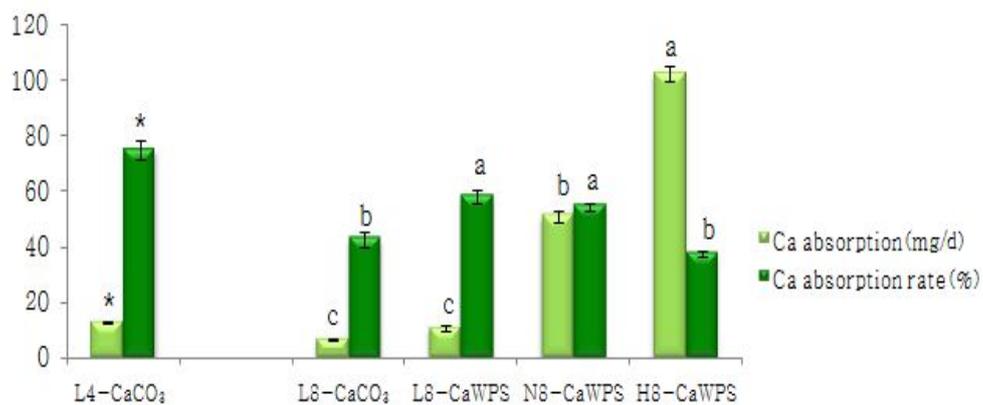


Figure 14. Ca absorption and Ca absorption rate of osteoporotic rats fed experimental diet for 4 weeks

Values are means of 7 rats per group. L4-CaCO₃: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%); L8-CaCO₃: Low Ca diet (0.1%) for 8 weeks; L8-CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+Low Ca chelated with Whey Protein for 4 weeks; N8-CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+Normal Ca chelated with Whey protein for 4 weeks; H8-CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+High Ca chelated with Whey protein. Bars with different letters are significantly different at p<0.05. * : P<0.05 significant difference between L4-CaCO₃ and L8-CaCO₃.

(나) 인의 섭취량, 배설량, 흡수량 및 흡수율

골다공증 모델 흰쥐에게 유기태 칼슘을 수준별로 급여한 후 인의 보유량과 흡수율을 측정된 값을 Table 24에 제시하였다.

① 인의 섭취량은 식이내 인 함량의 영향으로 고칼슘을 섭취한 군이 정상칼슘을 섭취한 군보다 약 2.5배 더 많은 양을 섭취하였다. 인의 배설량은 인의 섭취가 많은 고칼슘군이 정상 및 저칼슘을 섭취한 군에 비해 유의적으로 높았다.

② 인이 흡수량은 칼슘 섭취가 낮으면 칼슘급원의 영향을 받아 탄산칼슘군에 비해 유기태 칼슘군의 흡수량이 유의적으로 증가하였고, 특히 고수준의 유기태 칼슘군에서 흡수율이 증가하였는데, 이는 인의 섭취량이 높기 때문에 절대 흡수량이 증가한 것으로 보인다.

③ 인의 흡수율은 4주 골다공증 모델군보다 8주 저탄산칼슘군에서 유의적으로 증가하였는데 저칼슘 수준의 유기태 칼슘군에서는 이보다 더 증가하였고, 유기태 칼슘의 섭취 수준이 증가하면서 유의적으로 낮아졌다.

④ 본 실험에서 분 중의 인의 배설량은 칼슘 급원에 따라서는 차이가 없었으나 식이칼슘 수준에 따라서는 차이를 보여 칼슘의 섭취 수준이 높아질수록 분 중의 인의 배설량이 높아졌다. 여러 연구들에서 식이칼슘을 증가시키면 분으로의 인의 배설량이 증가한다고 보고하였다(38)39). 칼슘은 장내에서 인등과 결합할 수 있어 저칼슘식을 섭취시 calcium phosphate 형성이 적어 인의 흡수율이 높지만, 고칼슘 섭취시에는 장내에서 불용성 인산칼슘염을 많이 형성하여 분 중의 인의 배설량이 많아진다. 본 실험의 결과도 선행연구들의 결과와 일치하였다.

Table 24. Daily P intake, fecal P excretion, daily and apparent P absorption of osteoporotic rats fed experimental diet for 4 weeks

| Groups ⁴⁾ | P intake (mg/d) | Fecal P excretion (mg/d) | Apparent absorption (mg/d) | Apparent absorption rate (%) |
|----------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| L4-CaCO ₃ | 49.2±0.2 ^{1)3)NS} | 15.5±1.4* | 34.6±1.3* | 74.3±1.3* |
| L8-CaCO ₃ | 49.3±0.9 ^{2)b} | 10.3±0.2 ^c | 38.9±0.6 ^c | 78.9±1.3 ^b |
| L8-CaWPS | 53.3±0.8 ^b | 9.2±0.3 ^c | 45.4±1.0 ^b | 83.3±0.9 ^a |
| N8-CaWPS | 53.1±0.9 ^b | 23.4±0.6 ^b | 28.7±1.4 ^d | 53.1±1.8 ^c |
| H8-CaWPS | 134.0±3.6 ^a | 71.4±1.6 ^a | 60.3±2.2 ^a | 44.4±0.9 ^d |

¹⁾ Values are mean ± SE of 7 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 2.

* : P<0.05 significant difference between L4-CaCO₃ and L8-CaCO₃ by t-test.

(다) 대퇴골의 무게, 체중당 무게, 길이 및 파단력

대퇴골의 무게 및 길이를 Table 25, 파단력을 Figure 15에 제시하였다.

① 골다공증 모델 흰쥐에게 실험식을 급여한 결과 대퇴골의 중량은 군별로 유의적인 차이가 없었으나, 유기태 칼슘 섭취가 증가함에 따라 대퇴골의 무게도 증가하였다.

② 100g 체중당 무게는 8주간 저수준의 탄산칼슘을 섭취를 지속한 군이 4주 골다공증 모델 군에 비해 유의적으로 대퇴골의 체중당 무게가 감소하여 골다공증과 저칼슘의 지속적인 섭취로 인해 골 손실이 일어났음을 알 수 있었다. 그러나, 유기태 칼슘섭취에 의해서는 저 수준에서는 탄산칼슘과 동일한 결과를 보였으나 섭취 수준이 증가할수록 이러한 감소 현상이 보이지 않았다. 또한 8주 저탄산칼슘군에 비해 정상 유기태 칼슘군은 3.8%, 고유기태 칼슘군은 9% 정도의 100g 체중당 대퇴골의 무게가 증가하였다.

③ 그러므로 칼슘염의 종류에 의해서 대퇴골의 무게에 영향을 줄 수 있음을 시사하였으며, 본 실험의 결과로 유기태 칼슘이 대퇴골의 무게 증가에 긍정적인 영향을 준 것으로 예상된다.

④ 대퇴골의 길이는 8주 저탄산칼슘군이 4주 골다공증 모델군과 비교하여 유의적으로 길이가 증가하였고, 유기태 칼슘의 섭취 수준에 따라 대퇴골의 길이는 영향을 받지 않았다. 이는 칼슘 급원 및 칼슘 수준이 골격의 길이를 결정하지 못한다는 Bell & Orr 등⁴⁰⁾의 연구결과와 일치하였다.

⑤ 대퇴골의 파단력은 4주와 8주 저탄산칼슘군간에 유의적인 차이가 없었고, 정상 이상 수준의 유기태 칼슘을 섭취한 군에서 유의적으로 증가하였다. 무기태 칼슘군에서 대퇴골의 파단력 증가에 미치는 유의성은 인정되지 않았으나, 8주 탄산칼슘 섭취군을 기준으로 유기태 칼슘의 섭취 수준이 증가함에 따라 각각 5.45%, 12.6% 및 14.4% 증가하였다.

따라서, 유기태화 칼슘은 생체내 흡수 후 대사과정을 통하여 뼈의 강도를 증가 시킬 수 있음이 확인되었다. 그러므로 폐경기 이후 유기태 칼슘제의 섭취는 골격 성장에 있어 길이 성장을 제외하고 무게 및 강도를 증가시키는 효과를 나타내었으며, 칼슘의 섭취수준에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 이는 유기태칼슘제의 섭취 수준에 따라 체내흡수 및 생체이용률이 공통적으로 증가됨으로 인하여 최종 뼈 형성에 기여하는 것으로 조사되었다. 이 결과는 유기태화 칼슘제제가 성장기의 골생장에 미치는 효과와 유사하였다.

Table 25. Weight, length and breaking force in femurs of osteoporotic rats fed of experimental diet for 4 weeks

| Groups ⁴⁾ | Wet weight [†] (mg) | Wet wt/ 100g BW [†] (mg/100g BW) | length [†] (mm) | Breaking force [†] (kg) |
|----------------------|---------------------------------|---|-----------------------------|-------------------------------------|
| L4-CaCO ₃ | 808.0 ± 22.3 ^{1)3)NS} | 254.8 ± 5.8* | 35.6 ± 0.3* | 11.3 ± 0.3 ^{NS} |
| L8-CaCO ₃ | 839.1 ± 19.5 ^{NS} | 223.6 ± 2.4 ^{NS} | 37.2 ± 0.3 ^{NS} | 11.1 ± 0.3 ^{2)b} |
| L8-CaWPS | 839.6 ± 24.7 | 222.0 ± 6.4 | 36.9 ± 0.4 | 11.7 ± 0.3 ^b |
| N8-CaWPS | 856.9 ± 18.2 | 232.2 ± 10.1 | 37.1 ± 0.3 | 12.5 ± 0.2 ^a |
| H8-CaWPS | 907.0 ± 25.3 | 243.8 ± 3.6 | 37.3 ± 0.2 | 12.7 ± 0.2 ^a |

¹⁾ Values are mean ± SE of 7 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan' s multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 2.

* : P<0.05 significant difference between L4-CaCO₃ and L8-CaCO₃ by t-test.

† : Average values of both femurs

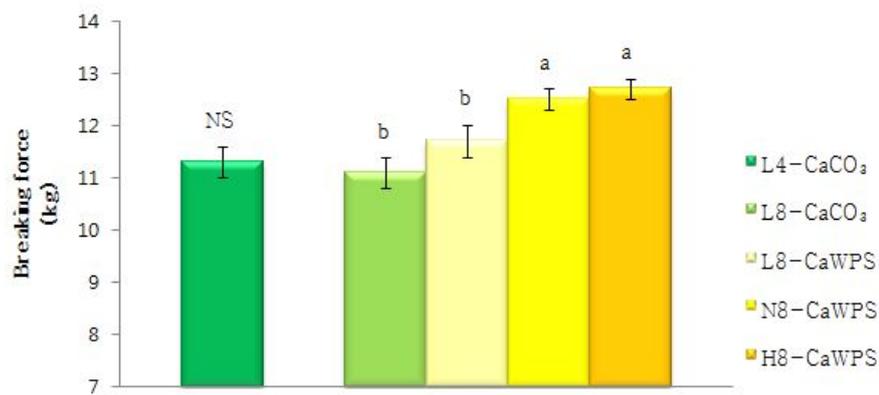


Figure 15. Breaking force in femurs of osteoporotic rats fed experimental diet for 4 weeks

Values are means of 7 rats per group. L4-CaCO₃: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%); L8-CaCO₃: Low Ca diet (0.1%) for 8 weeks; L8-CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+Low Ca chelated with Whey Protein for 4 weeks; N8-CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+Normal Ca chelated with Whey protein for 4 weeks; H8-CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+High Ca chelated with Whey protein. NS : Not significantly different between L4-CaCO₃ and L8-CaCO₃. †: Average values of both femurs

(라) 대퇴골의 회분량, 칼슘, 인, 마그네슘 및 철분 함량

대퇴골의 회분량, 칼슘, 인, 마그네슘 및 철분의 함량을 Table 26에 제시하였다.

① 대퇴골의 회분량은 탄산칼슘군간에 유의적인 차이는 없었으나, 정상 유기태 칼슘군이 8주 탄산칼슘군에 비해 유의적으로 회분량이 증가하였다. 유기태 칼슘 섭취가 증가함에 따라 8주 저탄산칼슘군에 비해 각각 1.9%, 6.4%, 2.8%의 회분량이 증가하였다.

② 대퇴골의 칼슘 함량은 칼슘의 급원과 수준에 따라 각 군별로 유의적인 차이가 없었으나, 8주 탄산칼슘 섭취군에 비해 저, 정상, 고칼슘 수준의 유기태 칼슘군에서는 각각 4.3%, 3.8%, 7.5%의 칼슘함량이 증가하는 것으로 나타났다. 칼슘 급원에 따라서는 유기태 칼슘군이 8주 저탄산칼슘섭취군보다 칼슘함량이 높았고, 유기태 칼슘 섭취 수준에 따라 고유기태 칼슘군이 가장 칼슘함량이 높았다.

③ 대퇴골의 인 함량은 4주와 8주 저탄산칼슘군간에 유의적인 차이는 없었으나, 유기태 칼슘군에서 8주 저탄산칼슘군에서 비해 인의 농도가 낮았고, 특히 정상과 고수준의 유기태 칼슘군에서는 유의적으로 감소하였다. 대퇴골은 칼슘의 섭취가 증가할수록 칼슘함량은 증가하고, 인의 함량은 감소하는 경향이 나타났다.

④ 대퇴골의 마그네슘 함량은 유기태 칼슘제의 섭취 수준이 증가시 낮아지는 경향을 보였으나 군별로 유의적인 차이는 없었다. 8주 저탄산칼슘섭취군의 마그네슘 농도에 비해 유기태 칼슘을 섭취시 칼슘 섭취 수준에 따라 0~6.7% 감소하는 경향을 보였다.

④ 대퇴골의 철분 함량은 8주 저탄산칼슘섭취군에 비해 유기태 칼슘 섭취 수준이 증가함에 따라 각각 7.2%, 5.6%, 10.1% 감소하는 것으로 나타났다. 따라서, 폐경기 이후 골다공증 치료를 위해 유기태 칼슘제의 섭취시 조혈기관의 활성화 혹은 피해를 끼친다고 동시 예측되기 때문에 철분제제의 병용이 필요함을 시사하고 있다. 이는 추가적으로 세세한 연구를 실시할 예정이다.

이상의 결과에서 골다공증 모델 흰쥐에서 유기태 칼슘 섭취의 증가는 대퇴골의 회분양 및 칼슘의 양을 증가시켰다. 그러므로 유기태 칼슘보충제는 골다공증 모델의 골질량 감소를 억제하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

Table 26. Ash, Ca, P, Mg and Fe contents in femurs of osteoporotic rats fed experimental diet for 4 weeks

| Groups ⁴⁾ | Ash † (mg/g wet wt) | Ca (mg/g wet wt) | P (mg/g wet wt) | Mg (mg/g wet wt) | Fe (ug/g wet wt) |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|
| L4-CaCO ₃ | 395.0±5.3 ^{1)3)NS} | 119.3±1.8 ^{NS} | 54.4±2.1 ^{NS} | 3.1±0.1 ^{NS} | 123.7±2.1 ^{NS} |
| L8-CaCO ₃ | 410.9±6.1 ^{2)b} | 122.2±1.6 ^{NS} | 58.4±1.6 ^a | 3.0±0.1 ^{NS} | 116.4±3.1 ^a |
| L8-CaWPS | 418.5±8.5 ^{ab} | 127.5±3.3 | 53.8±1.6 ^{ab} | 2.9±0.1 | 108.0±3.4 ^{ab} |
| N8-CaWPS | 437.1±7.2 ^a | 126.8±2.6 | 51.5±1.6 ^b | 3.0±0.0 | 109.9±3.0 ^{ab} |
| H8-CaWPS | 422.2±5.4 ^{ab} | 131.3±5.4 | 52.8±1.7 ^b | 2.8±0.1 | 104.7±2.9 ^b |

1) Values are mean ± SE of 7 rats per group.

2) Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

3) NS : Not significantly different among groups.

4) See Table 2.

* : P<0.05 significant difference between L4-CaCO₃ and L8-CaCO₃ by t-test.

† : Average values of both femurs.

(마) 요추골의 무게, 체중 당 무게 및 길이

골다공증 모델 흰쥐에게 4주간 유기태 칼슘을 수준별로 급여한 후 요추골의 무게를 Figure 16, 100g 체중당 요추골의 무게 및 길이에 대한 결과를 Table 27에 제시하였다.

① 요추골의 무게는 8주 저탄산칼슘군이 4주 골다공증 모델군보다 11%정도 유의적으로 낮아졌으나, 저칼슘 식이의 유기태 칼슘군은 1.8%만이 감소된 것으로 나타났다. 이는 유기태 칼슘이 탄산칼슘에 비해 골다공증으로 인한 요추골 질량의 감소를 다소 억제하는 효과를 보인 것으로 사료되며, 급원에 따라 요추골의 무게가 영향을 받은 것으로 보인다. 또한 정상 및 고 유기태 칼슘군은 8주 저탄산칼슘군에 비해 각각 13.5%, 13.9% 요추골의 무게가 유의적으로 증가하여 칼슘의 섭취 수준 또한 요추골의 무게에 영향을 주었다. Kim 등⁴¹⁾의 연구에서 성장기 흰쥐에서 저칼슘식이 섭취 후 난소절제한 경우, 요추의 무게는 칼슘 섭취 수준에 영향을 받지 않았다는 결과를 제시하였으나, 본 실험은 성숙기 암컷 흰쥐에게 저칼슘 식이를 급여하였으므로, 칼슘 섭취 수준과 급원의 영향을 유의적으로 받은 것으로 사료된다.

② 요추골의 100g 체중당 무게는 칼슘의 수준과 급원에 따라 군별로 유의적인 차이가 없었으나, 유기태 칼슘제의 섭취가 증가할수록 100g 체중당 요추골의 무게도 증가하는 경향을 보였다. 또한 골다공증 이후 칼슘의 섭취가 증가하여도 요추골의 질량 감소가 이전 수준으로 될 수 없음을 알 수 있었다.

③ 요추골의 길이는 4주 골다공증 모델군을 기준으로 8주 저탄산칼슘군에서 유의적으로 길이가 감소하여, 골다공증 질환이 특히 요추에 영향을 미침을 알 수 있었다. 요추골의 길이는 유기태 칼슘의 섭취 수준에 의해 유의적인 영향을 받지 않았으나, 8주 저탄산칼슘군과 비교하여 유기태 칼슘제를 섭취시 2.7%~4.9%의 길이 성장이 일어났다. 그러나 일단 골다공증이 진행된 후 칼슘 섭취를 증가하여도 요추골의 길이는 감소하는 경향을 보였다.

따라서, 유기태 칼슘 섭취의 증가는 요추골의 무게를 증가시킴에 따라 정상수준 이상의 칼슘 섭취가 요추골의 질량 손실을 예방한다는 것을 알 수 있었다. 그러므로 골다공증으로 인한 척추골절을 예방하기 위해서는 지속적인 칼슘의 섭취 수준이 중요하며, 특히 유기태 칼슘의 섭취는 골 손실을 예방하는데 효과적일 것으로 사료된다.

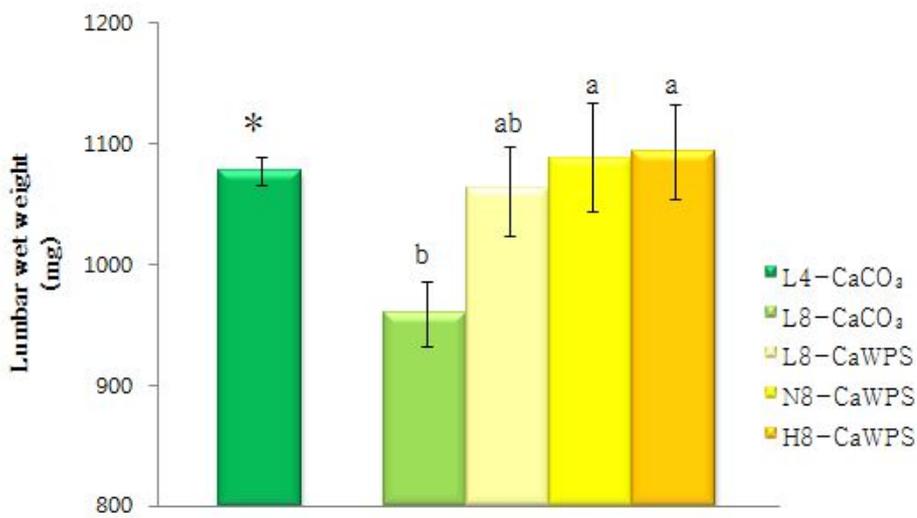


Figure 16. Wet weight in lumbar(L2–L4) of osteoporotic rats fed experimental diet for 4 weeks

Values are means of 7 rats per group. L4–CaCO₃: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%); L8–CaCO₃: Low Ca diet (0.1%) for 8 weeks; L8–CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+Low Ca chelated with Whey Protein for 4 weeks; N8–CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+Normal Ca chelated with Whey protein for 4 weeks; H8–CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+High Ca chelated with Whey protein. Bars with different letters are significantly different at p<0.05. * : P<0.05 significant difference between L4–CaCO₃ and L8–CaCO₃.

Table 27. Weight and length in lumbar(L2–L4) of osteoporotic rats fed experimental diet for 4 weeks

| Groups ⁴⁾ | Wet weight [†] (mg) | Wet wt/ 100g BW [†] (mg/100g BW) | length [†] (mm) |
|----------------------|---------------------------------|---|-----------------------------|
| L4–CaCO ₃ | 1078.0±11.5 ^{1)*} | 332.2±5.1 [*] | 24.1±0.1 [*] |
| L8–CaCO ₃ | 959.3±26.6 ^{2)b} | 273.5±8.2 ^{NS} | 22.6±0.5 ^{NS} |
| L8–CaWPS | 1061.3±37.1 ^{ab} | 280.8±5.8 | 23.2±0.3 |
| N8–CaWPS | 1088.8±44.7 ^a | 283.1±11.7 | 23.7±0.4 |
| H8–CaWPS | 1093.3±38.8 ^a | 293.6±5.3 | 23.6±0.5 |

¹⁾ Values are mean ± SE of 7 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan' s multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 2.

^{*} : P<0.05 significant difference between L4–CaCO₃ and L8–CaCO₃ by t–test.

[†] : Values measured from 2 to 4 of lumbar.

(바) 요추골의 회분량, 칼슘, 인, 마그네슘 및 철분 함량

골다공증 모델 흰쥐에게 4주간 유기태 칼슘을 수준별로 급여한 후 요추골의 칼슘함량을 Figure 17, 요추골의 회분량, 인, 마그네슘 및 철분의 함량을 Table 28에 제시하였다.

① 요추골의 회분량은 칼슘의 급원과 섭취수준에 따라 유의적인 차이가 없었다. 그러나 8주 저탄산칼슘군에 비해 유기태 칼슘군에서 회분량이 2.4~6.6%로 증가하였고, 정상칼슘 수준의 유기태 칼슘군의 회분량이 가장 많았다.

② 요추골의 칼슘 함량은 4주와 8주 탄산칼슘군간에 유의적인 차이가 없었다. 그러나 유기태 칼슘의 섭취 수준이 증가할수록 칼슘의 함량이 증가하는 경향을 보여, 8주 탄산칼슘군에 비해 저, 정상, 고칼슘군의 유기태 칼슘군의 요추골의 칼슘 함량은 각각 5.2%, 14.2% 16.5%로 유기태 칼슘제의 섭취가 증가함에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 고유기태 칼슘군이 8주 저탄산칼슘군보다 칼슘의 함량이 유의적으로 증가함에 따라, 유기태 칼슘의 섭취가 요추골에 칼슘 침착을 증가시킨 것으로 보인다.

③ 요추골의 인의 함량은 칼슘의 급원 및 수준에 따라 유의적인 차이가 없었으나, 유기태 칼슘의 섭취 수준에 따라 요추골의 인의 함량도 증가하는 경향을 보였다.

④ 요추골의 마그네슘 함량은 탄산칼슘군간에 유의적인 차이는 없었고, 정상 유기태 칼슘군이 8주 저탄산칼슘군에 비해 유의적으로 증가하였다.

⑤ 요추골의 철분함량은 칼슘의 급원과 유기태 칼슘 섭취 수준에 영향을 받지 않았으나, 칼슘의 섭취가 증가하면 요추골의 철분함량은 다소 낮아지는 경향을 보였다.

따라서, 유기태 칼슘 섭취의 증가는 요추골의 회분량, 칼슘 및 인의 함량을 증가시켰다. 그러므로 유기태 칼슘이 골다공증으로 인해 악화되는 요추골의 손실을 억제하는데 효과적인 보충제로 이용될 수 있다고 생각된다.

Table 28. Ash, Ca, P, Mg and Fe contents in lumbar (L2-L4) of osteoporotic rats fed experimental diet for 4 weeks

| Groups ⁴⁾ | Ash (mg/g wet wt) | Ca (mg/g wet wt) | P (mg/g wet wt) | Mg (mg/g wet wt) | Fe (ug/g wet wt) |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| L4-CaCO ₃ | 262.4±3.4 ^{NS} | 69.8±1.5 ^{NS} | 32.1±0.8 ^{NS} | 1.62±0.04 ^{NS} | 97.1±7.8 ^{NS} |
| L8-CaCO ₃ | 265.8±5.1 ^{NS} | 71.7±5.4 ^{2)b} | 32.1±1.7 ^{NS} | 1.61±0.04 ^b | 99.4±5.1 ^{NS} |
| L8-CaWPS | 272.3±6.8 | 75.4±2.7 ^{ab} | 33.1±0.6 | 1.65±0.04 ^b | 95.4±2.6 |
| N8-CaWPS | 283.4±7.9 | 81.9±2.1 ^{ab} | 34.6±0.9 | 1.86±0.07 ^a | 95.3±3.9 |
| H8-CaWPS | 273.0±5.4 | 83.6±1.2 ^a | 35.3±1.0 | 1.80±0.08 ^{ab} | 91.0±5.0 |

¹⁾ Values are mean ± SE of 7 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 2.

* : P<0.05 significant difference between L4-CaCO₃ and L8-CaCO₃ by t-test.

† : Values measured from 2 to 4 of lumbar.

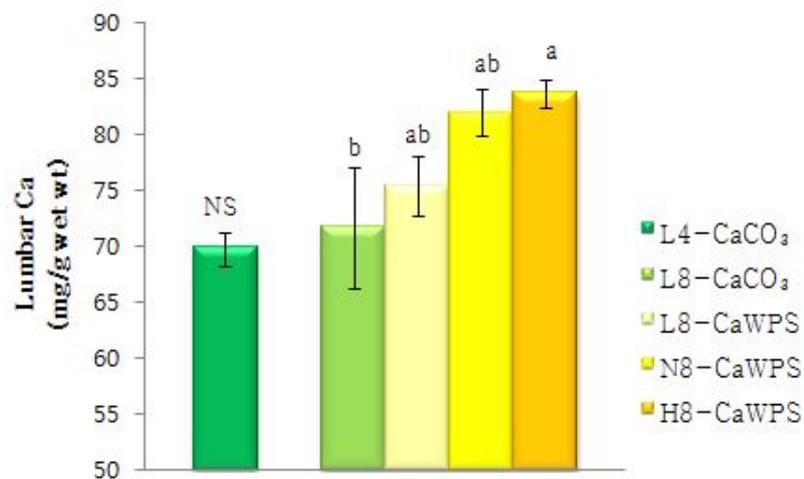


Figure 17. Ca content in lumbar(L2–L4) of osteoporotic rats fed experimental diet for 4 weeks

Values are means of 7 rats per group. L4–CaCO₃: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%); L8–CaCO₃: Low Ca diet (0.1%) for 8 weeks; L8–CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+Low Ca chelated with Whey Protein for 4 weeks; N8–CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+Normal Ca chelated with Whey protein for 4 weeks; H8–CaWPS: Low Ca diet for 4 weeks, CaCO₃ (0.1%)+High Ca chelated with Whey protein. NS : Not significantly different between L4–CaCO₃ and L8–CaCO₃.

(사) 간의 회분량, 칼슘, 인, 마그네슘 및 철분 함량

골다공증 모델 흰쥐에게 4주간 유기태 칼슘을 수준별로 급여한 후 간의 회분량, 칼슘, 인, 마그네슘 및 철분의 함량을 Table 29에 제시하였다.

① 간의 회분량은 8주 저탄산칼슘군이 4주 골다공증 모델군보다 유의적으로 회분량이 증가하였으며, 저수준의 유기태 칼슘군에서 회분량이 증가하였으나, 정상 및 고칼슘 수준의 유기태 칼슘군의 섭취 증가에 의해 회분량이 유의적으로 감소하였다.

② 간의 칼슘함량은 탄산칼슘을 8주간 섭취한 군이 골다공증 모델군보다 12% 유의적으로 칼슘 함량이 증가하였으나, 유기태칼슘군의 경우는 8주 저탄산칼슘군에 비해 유의적으로 낮았고, 유기태 칼슘의 섭취 수준이 증가시 더 유의적으로 감소되었다. 또한 칼슘의 섭취 수준이 증가하면 간의 칼슘 함량이 유의적으로 감소하는 결과를 나타냈으나, Lee 등¹⁸⁾의 연구에서 골다공증 모델 흰쥐에게 고칼슘과 과다칼슘을 급여하였을 때, 식이칼슘 수준의 영향을 받아 간의 칼슘 함량이 증가한 결과와는 달랐다.

③ 간의 인과 마그네슘 함량은 칼슘 급원에 의한 영향은 없었으며, 정상 수준 이상의 유기태 칼슘섭취군이 8주 저탄산칼슘군에 비해 유의적으로 감소하였다.

④ 간의 철분 함량은 칼슘 급원에 따라 유기태 칼슘군이 8주 저탄산칼슘군에 비해 유의적으로 철분의 함량이 감소하였으나, 유기태 칼슘 섭취 수준에 의해서는 유의적인 차이는 없었다.

따라서, 본 결과는 유기태 칼슘의 섭취가 탄산칼슘과 비교하여 간에 칼슘, 마그네슘 및 철분 함량을 감소시킴으로써 조직 침착의 위험성을 감소시킨 것으로 사료된다.

Table 29. Ash, Ca, P, Mg and Fe contents in liver of osteoporotic rats fed experimental diet for 4 weeks

| Groups ⁴⁾ | Ash (mg/g wet wt) | Ca (ug/g wet wt) | P (mg/g wet wt) | Mg (ug/g wet wt) | Fe (ug/g wet wt) |
|----------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| L4-CaCO ₃ | 14.6±1.2 ^{1)3)NS} | 455.6±6.0* | 2.7±0.1 ^{NS} | 458.4±8.6 ^{NS} | 629.5±9.7 ^{NS} |
| L8-CaCO ₃ | 18.6±2.1 ^{2)a} | 508.8±16.8 ^a | 2.6±0.1 ^a | 457.2±12.4 ^a | 650.2±16.3 ^a |
| L8-CaWPS | 18.3±0.2 ^a | 454.5±17.6 ^b | 2.5±0.1 ^a | 464.2±22.2 ^a | 553.3±12.8 ^b |
| N8-CaWPS | 14.0±0.3 ^b | 369.1±7.4 ^c | 2.2±0.1 ^b | 406.9±12.1 ^b | 515.6±18.1 ^b |
| H8-CaWPS | 13.4±0.4 ^b | 390.1±19.4 ^c | 2.4±0.0 ^{ab} | 423.1±8.4 ^{ab} | 510.3±17.4 ^b |

¹⁾ Values are mean ± SE of 7 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 2.

* : P<0.05 significant difference between L4-CaCO₃ and L8-CaCO₃ by t-test.

(아) 신장의 회분량, 칼슘, 인, 마그네슘 및 철분 함량

골다공증 흰쥐 모델에게 유기태 칼슘을 4주간 급여한 후 신장의 회분량, 칼슘, 인, 마그네슘 및 철분의 함량을 Table 30에 제시하였다.

① 4주 골다공증 모델군에 비해 8주 저탄산칼슘군에서 신장의 회분량이 증가하였다. 그러나 유기태 칼슘군에서는 저수준의 유기태 칼슘군이 약간 증가하였지만, 칼슘의 수준의 증가에 의해서 신장의 회분량이 감소하는 경향을 보였다.

② 신장의 칼슘 함량은 4주 골다공증 모델군에 비해 8주간 탄산칼슘을 섭취한 군에서 유의적으로 칼슘의 함량이 증가하였고, 그에 비해 저칼슘 수준의 유기태 칼슘군의 칼슘함량은 8주 탄산칼슘군에 비해 유의적으로 낮았다. 또한 유기태 칼슘의 섭취 수준의 증가로 신장의 칼슘 함량은 더욱 낮아졌다. 골다공증 모델에서 신장 칼슘 함량은 성장기 유기태 칼슘 실험 I의 정상 및 고수준 유기태칼슘군의 신장 칼슘함량에 비해 각각 3.6배, 4.3배 증가한 결과를 보였다.

③ 신장의 인 함량은 칼슘의 급원 및 섭취 수준에 의한 영향은 없었다.

④ 신장의 마그네슘 함량은 칼슘 급원에 의한 영향으로 8주간 저수준의 탄산칼슘을 섭취한 군에 비해 유기태 칼슘군이 유의적으로 낮았다.

⑤ 신장의 철 함량은 다른 무기질과는 달리 정상 수준 이상의 유기태 칼슘군이 8주 저 탄산칼슘군에 비해 증가하는 경향을 보였으나 유의적이지는 않았다. 그러나 이 수준은 성장기 흰쥐에서 같은 식이를 급여했을 때보다 2배 정도 높은 수치였다.

따라서, 위와 같이 신장의 회분량 및 무기질 함량에 있어서 유기태 칼슘 섭취는 간조직에서와 마찬가지로 골다공증으로 인해 유발된 수 있는 조직의 무기질 침착을 감소시키는 것으로 사료된다.

Table 30. Ash, Ca, P, Mg and Fe contents in kidney of osteoporotic rats fed experimental diet for 4 weeks

| Groups ⁴⁾ | Ash (mg/g wet wt) | Ca (ug/g wet wt) | P (mg/g wet wt) | Mg (ug/g wet wt) | Fe (ug/g wet wt) |
|----------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| L4-CaCO ₃ | 16.5±1.3 ^{1)3)NS} | 400.6±11.1* | 2.03±0.06 ^{NS} | 335.2±9.4 ^{NS} | 215.7±11.9 ^{NS} |
| L8-CaCO ₃ | 20.3±3.4 ^{2)a} | 525.3±22.4 ^a | 1.86±0.08 ^{NS} | 337.8±8.0 ^a | 247.0±12.9 ^{ab} |
| L8-CaWPS | 18.3±2.1 ^{ab} | 454.9±21.6 ^b | 2.04±0.13 | 282.7±14.1 ^{bc} | 229.5±4.0 ^b |
| N8-CaWPS | 13.3±0.3 ^b | 347.2±14.7 ^c | 1.98±0.07 | 275.0±7.3 ^c | 263.5±6.8 ^a |
| H8-CaWPS | 11.8±0.4 ^b | 388.7±13.6 ^c | 1.97±0.04 | 305.8±5.5 ^b | 253.7±10.1 ^{ab} |

¹⁾ Values are mean ± SE of 7 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 2.

* : P<0.05 significant difference between L4-CaCO₃ and L8-CaCO₃ by t-test.

(자) 비장의 회분량, 칼슘, 인, 마그네슘 및 철분 함량

골다공증 흰쥐 모델에게 유기태 칼슘을 4주간 급여한 후 신장의 회분량, 칼슘, 인, 마그네슘 및 철분의 함량을 Table 31에 제시하였다.

① 비장의 회분량은 유기태 칼슘의 섭취가 증가할수록 낮아지는 경향을 보여, 정상 및 고칼슘 식이의 유기태 칼슘군이 회분량이 유의적으로 낮아졌다.

② 비장의 칼슘 함량 역시 칼슘의 섭취가 증가함에 따라 유의적으로 감소하였고, 인의 함량은 정상 유기태 칼슘 섭취군에서만 유의적으로 감소하였다.

③ 비장의 마그네슘과 철의 함량은 탄산칼슘군에 비해 유기태 칼슘군에서 증가하는 경향을 보였다.

따라서, 비장 조직 역시 간과 신장 조직에서와 같이 탄산칼슘보다는 정상수준이상의 유기태 칼슘의 섭취가 총 회분량과 칼슘함량을 감소시킴으로써 조직의 무기질 침착을 억제시키는 효과가 있는 것으로 보인다.

Table 31. Ash, Ca, P, Mg and Fe contents in spleen of osteoporotic rats fed experimental diet for 4 weeks

| Groups ⁴⁾ | Ash (mg/g wet wt) | Ca (ug/g wet wt) | P (mg/g wet wt) | Mg (ug/g wet wt) | Fe (ug/g wet wt) |
|----------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| L4-CaCO ₃ | 24.2±0.7 ^{1)3)NS} | 219.7±8.3 ^{NS} | 2.8±0.1 ^{NS} | 313.7±8.4 [*] | 991.9±53.0 ^{NS} |
| L8-CaCO ₃ | 25.4±0.9 ^{2)a} | 200.3±7.3 ^a | 2.6±0.2 ^a | 279.3±8.2 ^b | 1017.7±45.6 ^b |
| L8-CaWPS | 26.0±0.9 ^a | 178.2±6.4 ^b | 2.5±0.1 ^{ab} | 312.5±8.0 ^a | 1287.2±37.2 ^a |
| N8-CaWPS | 18.3±0.6 ^b | 144.0±6.9 ^c | 2.3±0.1 ^b | 267.0±6.3 ^b | 1078.1±20.3 ^b |
| H8-CaWPS | 19.4±0.5 ^b | 155.5±6.9 ^c | 2.5±0.1 ^{ab} | 272.7±6.3 ^b | 1299.3±18.3 ^a |

¹⁾ Values are mean ± SE of 7 rats per group.

²⁾ Values within the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾ NS : Not significantly different among groups.

⁴⁾ See Table 2.

* : P<0.05 significant difference between L4-CaCO₃ and L8-CaCO₃ by t-test.

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에 기여도

제 1 절 목표달성도

본 연구간 개발된 핵심기술은 우유내 유청단백질과 칼슘원료 선발과 이들의 결합(chelating)을 통해 고함량의 칼슘이 함유된 유기태화 칼슘(Ca-WPS) 제조기법 탐구와 대량 생산시스템 구축을 완료함과 동시에 이를 산업화를 위한 제품화에 있어 중요한 레시피 확보와 이를 동물임상실험을 거쳐 효능까지 일련의 시스템을 완료하였다. 이에 따른 연구목표별 달성도는 다음과 같다.

| 연구내용 | 달성도 (%) | 연구개발 수행내용 |
|---|---------|---|
| 1. 필수 분석법 정립 | 100 | 1. 영양성분 분석방법 정립 2. 분자량 변화분석방법 정립 3. 칼슘-킬레이팅 효과 분석방법 정립 4. 미반응 칼슘 및 유해이온 제거 효율 검정 분석법 정립 5. 미생물 검사법 정립 |
| 2. 칼슘유기태화(Ca-WPS)소재용 기질선발 및 킬레이팅 기법연구 가. 대표상용칼슘(7종)의 시유첨가 및 열처리시 물성변화 기초조사 | 100 | 1. 상용 칼슘(7종) 시유첨가 시험실시에 따른 최적 킬레이팅 적용 칼슘선발 2. 물성 조사항목별 분석법 정립 |
| 나. 대표 유제품 구성 단백질류(18종)내 미네랄(10종) 함유량 조사 | 100 | 1. 19(1종 추가, WPI)종 킬레이팅 적합성 사전 조사 2. 미네랄 종류별 함유량 사전 조사(10종,mg/Kg) - Ca, P, Cu, Fe, Mg, Mn, K, Na, S, Zn |
| 다. 내열성 유단백질 선발 | 100 | 1. 내열성 유단백질(2종, WPS 및 WPI)후 1차 선발 2. 최종결과 가. 치즈유래 비열처리 유청분말(WPS) 최종선발 나. 원료(우유)→치즈제조→유청액 분리→ 건조분말제조 시스템(저온 조건) 정립 |
| 라. 선발 내열성 유단백질류 대비 내산/내염기성 조사 | 100 | 1. 선발 내열성 유단백질(WPS)의 칼슘 킬레이팅 효율 저해인자 평가 2. pH 2, 6.7 및 10조건하 평가 |
| 마. 선발 유단백질내 칼슘 킬레이팅 도입 전/후 기능기 판정기법 정립 | 100 | 1. 칼슘 킬레이팅 관련 기능기 파악 2. 킬레이팅 극대화 기능기 확인 3. 킬레이팅 분석법 정립 |
| 바. 선발 유단백질내(WPS)내 칼슘 킬레이팅 기능기(인자) 극대화 기법 정립 | 100 | 1. 킬레이팅 기능기 극대화 제조순서 정립 2. 정립방법적용 칼슘 킬레이팅 효율 검정 |
| 사. 분자량별 유단백질 대상 칼슘 킬레이팅 효과 조사 | 100 | 1. 저분자(가수분해) 유청분말 및 고분자(비가수분해)대상 분자량별 선발 2. 칼슘 킬레이팅 효과 검정 완료 |
| 아. 칼슘 도입후 잉여 미네랄 및 유독성 음이온 제거공정 확립 | 100 | 1. 잉여 칼슘 및 음이온 제거(세척)방법정립 2. 적용방법:원심분리법, NF세척법 비교검정 3. 결과 : NF시스템 적용 |
| 자. 칼슘-유기태화 체제 첨가 시유내 내열성(물리/이화학적 변화)조사 | 100 | 1. 시유 대상 최종 제조 칼슘-킬레이팅 소재의 첨가후 열처리전/후 물리/이화학적 변화 검정 2. 칼슘-유기태화 체제 감염균 제어기법 정립(2년차 연계) |
| 3. Ca-WPS대량생산시스템 정립(영유아식 제조기준) | 100 | 1. 3차시제 및 2차 시작품 제조완료(7항목 적용) -유지방 제거시스템 전립 : 크립분리 -적용 시스템 : NF시스템(미반응 칼슘 및 독성이온제거) -제조조건 확립: HTST조건 정립 |
| 4. Ca-WPS제품화(제형화 레시피 정립) | 100 | 1. 타정(정제)형 레시피 확립 2. 액체 분산과립형 레시피 정립 |
| 5. 동물임상실험 | 100 | 1. 유기태화 칼슘(Ca-WPS)의 동물임상(성장기) 효능시험 -안전성 및 효능(섭취량, 체내흡수량 및 흡수효율, 생체이용률조사) 평가 2. 유기태화 칼슘(Ca-WPS)의 동물임상(폐경기) 효능시험 - 골다공증모델(폐경기) 이용 Ca-WPS체제의 효능평가 |
| 6. 지적소유권 확보 가. 특허출원(목표: 2건) | 100 | 1. 특허출원완료(2건) -특허 1 : 유기태화 칼슘 함유량이 높은 유단백질의 제조방법(출원번호10-2009-0112661, 2009.11.20.) -특허 2 : 골다공증예방 효과를 가지는 유기태화 칼슘강화 유단백질(출원번호 : . 2010.12.15.) |
| 나. 논문투고(목표 :3건) | 100 | 1. 국제학회 2건(포스터 발표 완료), 국내학회 1건(투고 중) |

제 2 절 관련분야의 기여도

본 연구간 개발된 핵심기술은 우유내 유청단백질과 칼슘원료 선발과 이들의 결합(chelating)을 통해 고함량의 칼슘이 함유된 유기태화 칼슘(Ca-WPS) 제조기법 탐구와 대량 생산시스템 구축을 완료함과 동시에 이를 산업화를 위한 제품화에 있어 중요한 레시피 확보와 이를 동물임상실험을 거쳐 효능까지 일련의 시스템을 완료하였다. 연구성과에 대한 관련분야의 기여도는 다음과 같다.

1. 기술적 측면

- 가. 우유 유래 단백질류 및 지방류와 미네랄간 이중 결합을 통한 기능성화 제품 개발 및 활용방향 제시
- 나. 식품산업 요구성 충족형 무기태 미네랄 제제의 단점(독성, 저흡수율 등) 해소형 신규제제 개발기법 체계화 기여
- 다. 저가 잉여 축산물의 신규 이용성 방향제시 및 수익창출기여
- 라. 유기태와 제조방법의 적용시 응용성 및 용도용법 창출에 대한 새로운 지표제시 기여
- 마. 관련 유가공 및 연구자들에 대한 신규연구개발 방향 제시

2. 경제적.산업적 측면

- 가. 유기태화 제제 적용 식품의 고부가 가치화를 통한 산업체의 수익창출 및 국제경쟁력 확보
- 나. 잉여 우유소재의 소요처 창출을 통한 관련 축산업의 추가 수익증대 기여
- 다. 신규시장 개척을 위한 소재 및 응용제품의 개발로 관련산업 경쟁력 증대 기여

3. 공중보건학적 측면

- 가. 무기태 미네랄 제제의 문제해결형 안전식품개발로 공중보건학적 요구성 충족에 기여
- 나. 고기능성 미네랄 제품 섭취에 의한 국민 건강 증진에 기여

제 5 장 연구개발성과 및 활용계획

제 1 절 연구개발성과

본 연구간 개발된 핵심기술은 우유내 유청단백질과 칼슘원료 선발과 이들의 결합(chelating)을 통해 고함량의 칼슘이 함유된 유기태화 칼슘(Ca-WPS) 제조기법 탐구와 대량 생산시스템 구축을 완료함과 동시에 이를 산업화를 위한 제품화에 있어 중요한 레시피 확보와 이를 동물임상실험을 거쳐 효능까지 일련의 시스템을 완료하였다. 이에 따른 연구성과는 다음과 같다.

표 . 연구목표 대비 항목별 연구개발성과

| 연구목표 | 연구개발성과 |
|--|---|
| 1. 칼슘 - 유기 태화 (Ca-WPS)소재용 기질선발 및 킬레이팅 기법연구 | 1. 칼슘 킬레이팅 기질용 유단백질 선발(완료) : 치즈제조후 잉여 유청단백질 (WPS) 선발 2. 상용 무기태화 칼슘제제중 킬레이팅화 칼슘선발(완료) : CaCl ₂ 3. 칼슘 킬레이팅 극대화 메카니즘(기능기 극대화) 기법정립 : 킬레이팅 증대기법 정립(10~20배), 관련기능기(-COOH, -COO ⁻ , -S, -P) 4. 기질 단백질내 고칼슘 킬레이팅 제제제조기법 정립(완료) : Ca-WPS제제, 칼슘함유량(85,000~110,000ppm) 5. Ca-WPS내 미생물 제균기법 정립(완료) : HTST(85℃, 15초, 1회) |
| 2. Ca-WPS개발간 필수분석법 정립 연구 | 1. 영양성분 분석법(완료) : 단백질, 지방, 탄수화물, 미네랄류 2. 분자량 분석법(완료) : FPLC 분석 3. 칼슘-킬레이팅 관련분석법(완료): XRD, FT-IR, SAM : 성장 및 구조분석, 킬레이팅 기능기 검정 4. 미반응 미네랄 및 독성이온(Cl ⁻) 분석(완료) : IC분석법 5. 미생물 검사(완료) : 식품공전기준(식약청) |
| 3. Ca-WPS의 제품 적용성 평가연구 | 1. 상용무기태화 칼슘제제 대비 현장적용 안전성 및 물성변화 평가(완료) |
| 4. Ca-WPS대량생산 방법 정립연구 및 경제성평가 연구 | 1. 영유아식 식품개발 기준(법규제), 대량생산기법 정립(완료) : 시제품 3회, 시작품 2회 생산완료 2. 제균형 대량생산기법 정립(완료) : HTST(85℃, 15초, 1회) 3. Ca-WPS 생산 및 제형별 경제성 평가(완료) : Ca-WPS : 12원/Ca-WPS 1g(칼슘함유량 : 100mg) 4. 제형화(정제형, 과립형) : 15.4원/1정 혹은 1스틱(칼슘함유량 : 100mg) |
| 5. Ca-WPS 제품화 (제형화 및 레시피 정립) | 1. 사업화 적용형 제형정립(완료) : 타정형, 용액 분산형 과립형 2. 제형별 레시피 확립 및 대량생산시스템 정립(완료) |
| 6. Ca-WPS의 동물 임상 효능평가 | 1. 유기태화 칼슘(Ca-WPS)의 동물임상(성장기) 효능시험(완료) - 안전성 및 기초효능(섭취량, 체내흡수량 및 흡수효율, 생체이용률조사) 평가 2. 유기태화 칼슘(Ca-WPS)의 동물임상(폐경기) 효능시험 - 골다공증모델(폐경기) 이용 Ca-WPS제제의 효능평가(완료) |

제 2 절 연구결과 활용계획

본 연구간 개발된 핵심기술은 우유내 유청단백질과 칼슘원료 선발과 이들의 결합(Chelating)을 통해 고함량의 칼슘이 함유된 유기태화 칼슘(Ca-WPS)제조기법 탐구와 대량생산시스템 구축을 완료함과 동시에 이를 산업화를 위한 제품화에 있어 중요한 레시피 확보와 이를 동물임상실험을 거쳐 효능까지 일련의 시스템을 완료하였다. 따라서, 연구간 확보된 유기태화 개발, 동물임상 및 제형화 기술의 KNOW-HOW는 다음과 같이 활용할 계획이다.

1. Ca-WPS제조 KNOW-HOW 및 동물임상결과 활용계획

가. Ca-WPS 제조 및 대량생산시스템 구축 KNOW-HOW활용계획

- 1) 개발 KNOW-HOW, 이중 유기태화 미네랄(철분, 아연 등) 강화 식품개발에 응용성 확대
- 2) 사업화관련 허가자료로 활용(허가기관(수과원) 검토결과에 준하여 순차적 진행)
 - 1단계 : 식품부산물 고부가제품에 적용(허가사항 필요없음. 효능표시 불가)
 - 2단계 : 건강보조식품개발에 활용(건기법 절차준수 등재 후 효능표시)
 - 3단계 : 의약품개발에 활용(인체임상기준 준수, 진행후 적용)
- 3) 신규 고부가가치 제품화 개발에 적극활용(첨가형 및 킬레이팅기법 적용 신규제품개발형 구분)

나. Ca-WPS 제품화(제형화 및 레시피 정립)연구결과 활용계획

- 1) 제형화 : 고체형(정제형) 및 액체첨가형(과립형)으로 구분 고부가가치 적용 제품군 확대 및 용도용법개발 확대
- 2) 용도용법 응용성 확대에 적극활용 : 동물분야 및 수산분야
- 3) 신소재로서 적극활용, 기존제품내 첨가를 통하여 품질 UP-GRADE화 도모 및 신소재 자체의 신제품개발에 적극활용
- 4) 연구결과를 기초로 식품에서 의약품수준으로의 고부가가치화 식품개발로 연계할 것임.

다. Ca-WPS의 동물임상 효능평가 결과 활용계획

- 1). 품목등록 및 제품제조 허가신청(허가기관 :수과원) 자료로 활용
 - 1단계 : 식품부산물 고부가제품에 적용(허가사항 필요없음. 효능표시 불가)
 - 2단계 : 건강보조식품개발에 활용(건기법 절차준수 등재 후 효능표시)
 - 3단계 : 의약품개발에 활용(인체임상기준 준수, 진행후 적용)
- 2) 성장기 및 골다공증 관련 임상결과, 임신부 및 영유아식 등 제품군 확대적용
- 3) 현재제품의 단점보강형(칼슘) 제품군 개발에 기초자료로 적극활용
- 4) 점차적 유기태화 미네랄 강화 식품개발 개발시 기초자료로 적극활용
- 5) 국내외 영업 및 판매전략 적극활용(수익극대화)

2. 사업화 진행시 성과활용계획

가. 사업화함에 있어 국가 과제의 수행이라는 잇점을 살려 국내 및 국외 영업에서 기술우위성을 무기로 하여 이를 최대한으로 활용할 것임

- 나. 소재개발간 다양한 유단백질과 칼슘간 유기태화 개발결과는 이중 미네랄을 유기태화 소재 개발로 추후 연계 활용할 것임.
- 다. 시제품 생산과 제품레시피 배합비율 등의 제조기법 KNOW-HOW는 응용하여 영유아 식 등 제품개발에 적극 활용할 것임.
- 라. 소재의 동물 임상실험결과를 활용하여, 마테팅 능력지원과 응용제품 개발시 사전 메카니즘 파악에 적극활용할 것임

3. 실용화.산업화 활용계획(기술실시등)

- 가. 현재 주관기관(매일유업(주))은 국내대표적인 유업체로서 연구개발결과의 실용화 및 산업화를 위해 필요한 기초원료 및 개발기술을 적용할 수 있는 기반시설 및 인원 등의 인프라를 완벽히 구비하고 있어 별도의 투자가 필요 없음.
- 나. 개발결과의 실용화는 관련산업체중 1곳(매일유업 아산공장, 주사업분야 : 유청분말 제조)를 선정하고 기술이전 및 실용화를 실시할 예정임. 이유로서, 현재 건조공정만을 통하여 저가의 유청분말을 생산하고 이를 판매하고 있으나, 기술이전 실시를 통하여 저가원료인 유청분말을 고부가가치화 제품(Ca-WPS)화 하도록 할 예정임.

4. 특허, 논문등 지식재산권 확보계획

- 가. 본 연구결과는 국내외적으로 식품관련회사 뿐만 아니라, 관련산업 전반에서 절실히 요구되는 바, 고품질 제품생산과 마케팅에 활용할 것이므로, 특허등록(향후 2년 소요예정) 후 논문발표부분을 제외한 모든자료는 비밀보존을 원칙으로 할 것임. 따라서, 절차에 의거 비밀유지 요청과정을 실시할 것이며, 단기 및 장기적 논문 및 특허진행 결과는, 매년 활용보고서 제출 시 보고 할 것임.
- 나. 추후 지식재산권 확보계획 : 현재 개발결과의 고부가가치 제품화를 위하여, 관련허가기관(수의과학검역원)에 자료를 이첩한 상태임. 따라서, 절차협의 결과에 따라 3단계에 준하여 순차적으로 지적재산권(특허 및 논문) 확보와 산업화를 진행할 예정임.
 - 1단계 : 우유(식품)부산물 허가시(허가사항 필요없음. 효능표시 불가)
 - 2단계 : 건강보조식품개발 허가시(동물임상 결과, 건기법준수 등재 후 효능표시 가능)
 - 3단계 : 의약품개발 허가시(인체임상기준 준수, 식품의 의약품화)

5. 추가연구, 타연구에 활용계획

- 가. 본 연구개발간 KNOW-HOW로서 유단백질류별 미네랄간 킬레이팅 관련 메카니즘을 완벽히 파악하였으며 결과 또한 축적된 상태임.
- 나. 따라서, 연구 KNOW-HOW를 활용한 이중 미네랄 유기태화제제 개발을 연계 진행할 것이며, 역시 확보된 동물임상 실험방법과 결과를 기초자료로 활용하여 고부가가치화 소재 및 제품화 개발을 진행 할 것임.

6. 교육.지도.홍보 등 기술확산계획

- 가. 개발 및 임상결과는 사업화에 있어 주요한 판매전략 지침자료로 재편성할 것임.
- 나. 칼슘-유기태화 제제의 산업화를 위한 허가기관의 검증절차가 완료되면, 국내외적 기술을 선도함과 동시에 축산농가 및 관련 축산업의 수익창출에 기여토록 할 것임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 골다공증 시장 현황 및 전망

1. 골다공증 시장전망

골다공증은 뼈 퇴행성질환이며, 골밀도가 감소하고 그에 대한 질적인 변화로 인해 뼈의 강도가 약해져서 골절이 일어날 가능성이 높은 상태이며, 골다공증 시장은 빠른 성장률(CAGR 2.1%)을 보이지 않지만 지속적으로 성장할 전망으로 평가되고 있다. 이는 주요특허 만기 후에도 전지역적으로 시장이 확대될 것으로 예상되어 매출은 계속 늘어날 전망이다(Datamonitor, "Commercial Insight: Osteoporosis "(2010.1).

가. 년도별 시장현황

- 1) 2005 ~ 2009년 현황: '07년 주요 7개 국가(미국, 일본, 5EU)의 골다공증 시장규모는 76억 달러로 최고에 이르렀으며, '09년에는 69억 달러 매출규모를 달성하였으며, 05~'09년 사이 연평균성장률(CAGR)은 2%로 나타나고 있으며, 미국과 유럽에서 가장 보편적인 골다공증 의약품인 alendronate 제네릭 출시로 '08년 매출규모가 8.7% 감소하였다.
- 2) 2010 ~ 2011년 전망 : '10년을 시작으로 골다공증 시장은 특히 미국과 유럽에서 계속 성장할 것으로 예상되고 있으며, 단일클론항체 Prolia(denosumab, Amgen/GlaxoSmithKline)의 출시로 '12년에는 75억 달러로 성장할 것으로 전망되고 있다.
- 3) 2012 ~ 2014년 전망 : '12년부터 제네릭의 출시로 골다공증 시장 규모가 감소할 것으로 예측되고, '14년의 매출규모는 70억 달러로 성장할 것으로 전망되나 '11년의 매출규모(76억 달러)에 비해서는 6.3% 감소한 규모가 될 것으로 예측되고 있다.
- 4) 2015 ~ 2019년 전망 : '15년에는 몇몇의 anabolic 치료제가 새로운 시장을 열어 '19년까지 성장세를 지속할 것으로 예상되고, anabolic 치료제로 인해 19년 골다공증 시장의 매출규모는 85억 달러에 도달할 것으로 전망됨

나. 지역별/클래스별 골다공증 시장 현황 및 전망

1) 지역별 골다공증 시장 현황 및 전망

- 가) 미국 : '09년 매출규모는 36억 달러로 골다공증 시장의 가장 큰 부분을 차지하며, 향후 골다공증 의약품 파이프라인을 볼때 '19년까지 41억 달러 규모로 성장할 전망이다(CAGR 1.3%).
- 나) 일본 : '05년 매출규모는 9.89억 달러에서 '09년 14억 달러로 증가하였으며, 10.1%의 빠른 연평균성장률로 시장규모가 증가하여 19년에는 21억 달러 규모의 시장으로 예상되고 있다.
- 다) 5EU : '09년 매출규모 18억달러였으며, 향후 19년에는 23억 달러로 성장할 전망이다.

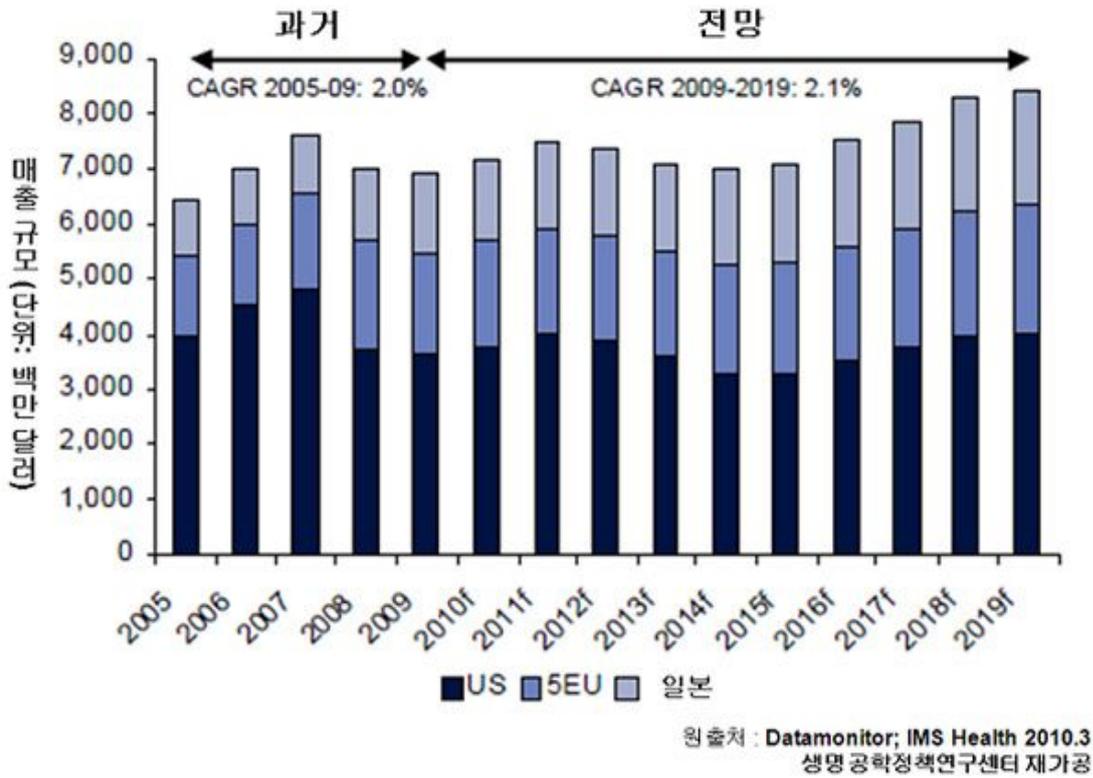


그림 1. 골다공증 시장 매출규모 현황 및 전망('10~' 19)

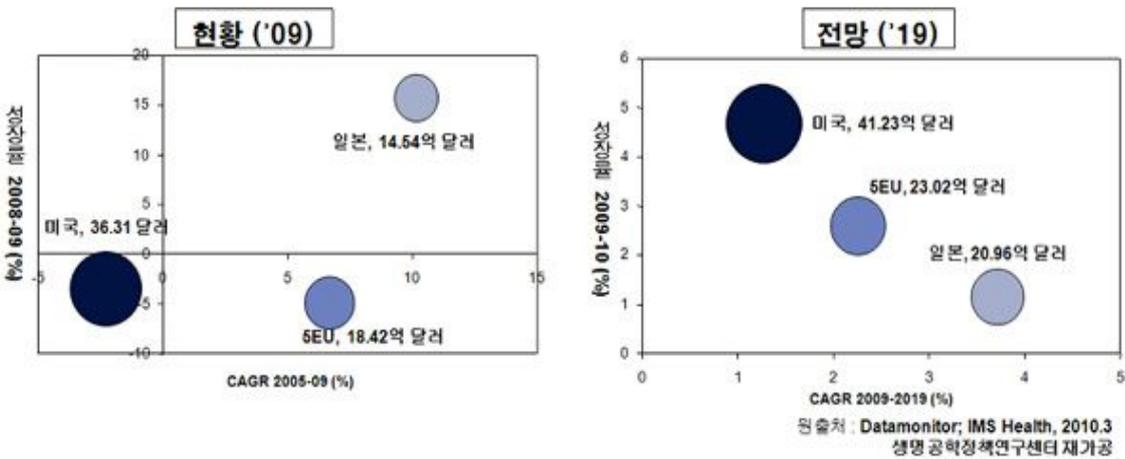


그림 2. 지역별 골다공증 시장매출 규모 현황 및 전망

2) ATC(Anatomical Therapeutic Chemical) 클래스 현황 및 전망

가) (M5B3, bisphosphonates osteoporosis)는 '09년 주요 7개국에서 42억 달러의 매출을 달성한 클래스이며, 제네릭 제품의 출시로 이러한 추세는 '19년까지 감소할 것으로 보여지며 이에 따라 예상되는 매출액은 37억 달러이다.

나) H4E0(parathyroid hormones, anabolic제품): H4E0는 '05년과 '09년 사이 연평균 성장률 13.2%로 빠르게 증가하여 '09년에는 6.89억 달러의 매출을 달성하였으며, 최소

한 3개의 새로운 파이프라인 의약품 출시가 향후 H4E0 클래스의 성장에 긍정적인 영향을 주어 '19년에는 매출규모가 13억 달러로 증가할 전망이다.

다. 기회와 위협분석

1) 기회

- 가) 전체 시장에 걸쳐 anabolic 의약품(H4E0 클래스)은 여전히 유망함.
- 나) 남성 골다공증 시장이 앞으로 많이 성장할 것으로 예상됨.
- 다) 고령화 사회는 골다공증 환자 수의 증가를 의미함.
- 라) 미국 의료개혁안으로 보험혜택 수혜자의 수가 증가되고 처방약품의
- 마) '도넛홀' (donut hole; 처방의약품의 비급여부분)이 폐지됨.
- 바) 주요 제품의 특허 만기로 경쟁률이 다소 완화될 것으로 예상됨

2) 위협

- 가) 제네릭 제품의 출시
- 나) FDA의 엄격해진 의약품 승인 심사 및 마케팅 컨트롤

표 1. 주요 국가별 골다공증 의약품의 특허 만료 기간('10~' 20)

| 브랜드 | 미국 | 일본 | EU |
|---|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Actonel(risedronic acid; Wamer Chilcott/Sanofi-Aventis) | 2014. 6 (US-5583122*PED) | 2010. 4 (JP-02702419-B2) | 2010. 12 (EP-00186405) |
| Bonviva IV(ibandronic acid; Roche/GlaxoSmithKline) | 2010. 9 (US-5662918) | n/a* | 2013. 8 (EP-00656780-B1) |
| Bonviva oral(ibandronic acid; Roche/GlaxoSmithKline) | 2012. 3 (US-4927814) | n/a* | 2011. 6 (EP-00252504) |
| Aclasta (zoledronic acid; Novartis) | 2013. 3 (US-4939130*PED) | n/a* | 2012. 11 (EP-00275821-B1) |
| Evista (raloxifene; Eli Lilly) | 2014. 3 (US5478847) | 2015. 7 (JP-03574210) | 2015. 7 (EP-00670162) |
| Protelos (strontium renalate; Servier) | n/a* | n/a* | 2015. 8 (EP-00415850) |
| Forteo (teriparatide; Eli Lilly) | 2018. 12 (US-6770623) | n/a* | 2018. 12 (EP-00920873) |

단, non applicable, 해당사항 없음

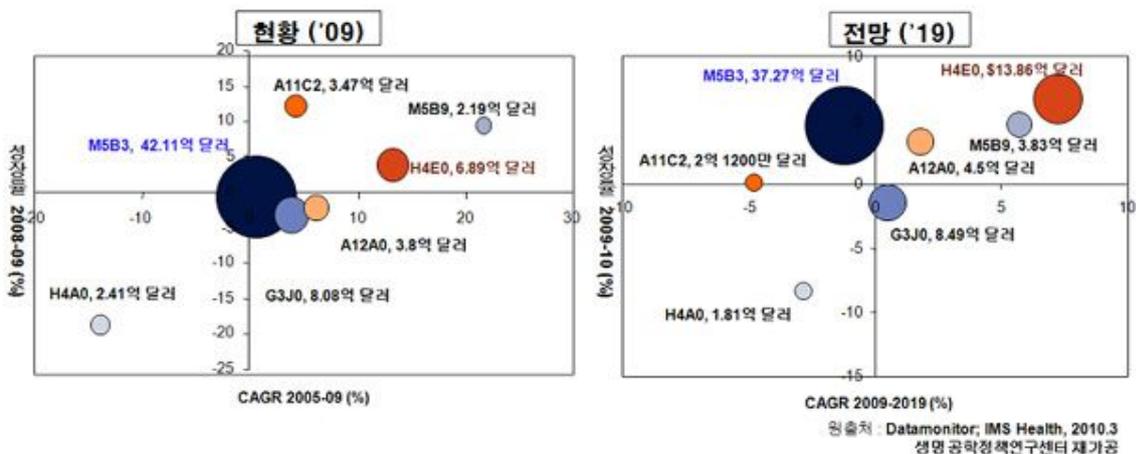


그림 3. 클래스별 골다공증 시장규모 현황 및 전망

라. 골다공증 의약품 파이프라인 : '05년 골다공증 의약품의 파이프라인 비율은 Antiresorptive 53%, Anabolic 35% 그리고 기타 12%였으며, '10년 골다공증 의약품의 파이프라인 비율은 Anabolic 48%, Antiresorptive 43% 그리고 기타 9%의 점유율을 보였다.

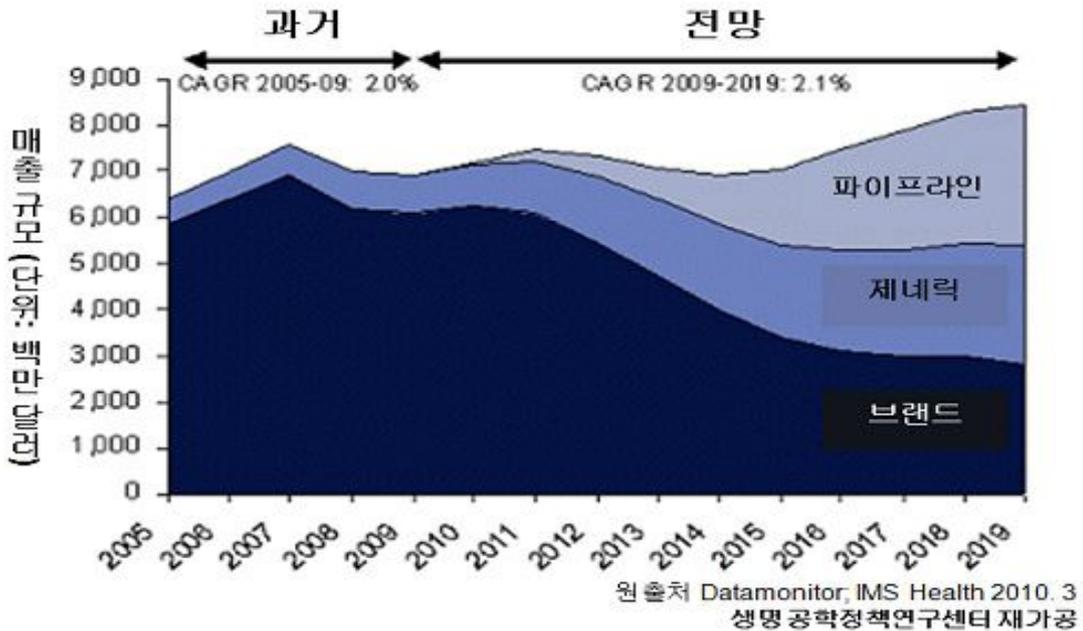


그림 4. 골다공증 의약품 현황 및 전망

마. 결론

- 1) 골다공증 시장은 앞으로 지속적으로 성장할 전망이며, 주요 7개국 시장에서 2.1%의 연평균성장률로 '09년 69억 달러 규모에서 향후 '19년에는 85억 달러 규모로 증가할 것으로 예상되고 있다. 또한, 단일클론항체 Prolia(denosumab, Amgen/GlaxoSmithKline) 등 '10년 출시될 몇몇 유망 파이프 라인으로 '12년까지 75억 달러 규모로 성장할 전망이다.
- 2) 인구의 고령화가 높은 일본 등 emerging 국가들의 지역시장이 유망하며, 일본지역은 '09년 14억 매출규모에서 '19년 21억 규모로 성장할 전망이며, 이 지역시장에 관련 회사들은 파트너십의 방식으로 진출해야 할 것으로 전망된다. 관련 회사들은 BRIC(브라질, 러시아, 인디아 그리고 중국) 국가들의 시장성을 주요하게 고려해야 할 것으로 전망된다('05~'09년 CAGR 19.7%).
- 3) Anabolic 시장이 유망하며 향후 주요특허 만FY 및 제네릭 제품의 출시로 회사들 간의 경쟁률은 다소 완화될 것으로 예상되고, 현재 anabolic 제품은 두 제품(PTHs; parathyroid hormones) 뿐이며 이 제품들은 피하 주사액을 통해서만 신체에 투입되어 많은 불편이 있어 이에 대한 개선과 신약개발이 필요하다 할 수 있다.

제 7 장 참고문헌

I. 칼슘-유단백질 킬레이팅화를 통한 고칼슘 유기태화 식품소재 개발 및 이를 이용한 기능성 노인식 분말제품개발

- 1) 문정환, 홍윤호. Transglutaminase로 처리한 초고온 살균유 침전물의 전자현미경적 관찰. *J Korean Soc Food Soc Nutr.* 33(8), 1359~1366 (2004).
- 2) 인영민, 정인경. 열처리에 의한 우유의 이화학적 품질변화에 관한 고찰. *J. Korean Dairy Technol. Sci.* 19(1), 13~21 (2001).
- 3) 강은주. 과거의 우유 및 유제품의 섭취가 한국노인의 골밀도에 미치는 영향. *KOREA J. FOOD & NUTR.* 11(1), 87~98 (1998).
- 4) 배혁진, 김병용, 김명환. 산에 의한 응고화에 영향을 미치는 인자들과 형성된 응고물의 물리학적 특징. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 35(2), 69~75 (1992).
- 5) 김경미, 홍윤호, 이용규. 우유의 가열처리에 따른 지표물질의 변화. *J Korean Soc Food Soc Nutr.* 21(4), 390~397 (1992).
- 6) 김용교. 우유단백질. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* 4(3), 224~232 (1972).
- 7) 양령, 박석원, 신완철. 우유단백질의 가열에 의한 변성. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* 15(1), 37~45 (1983).
- 8) 이수원, 우유단백질의 유화특성. *Korean Dairy Technol.* 5(1), 32~37 (1987).
- 9) 이정아, 임현숙. 우유의 열처리 정도가 흰쥐의 성장, 단백질 및 칼슘 대사에 미치는 영향. *Korean J Nutrition.* 28(2), 144~151 (1995).
- 10) 유춘희. 한국인의 우유소비 증진을 통한 골다골증 예방효과. *제54회 춘계유가공심포지움 논문 초록집* (2002).
- 11) 여영근, 최병국, 임아영, 김효정, 김수민, 김대곤. 유지방의 특성과 변화. *Korean Dairy Technol.* 16(2), 119~136 (1998).
- 12) 이유라, 홍윤호. 열처리로 야기되는 우유 유청 단백질의 반응. *KOREAN J. FOOD SCI. ANI. RESOUR.* 22(2), 179~182 (2002).
- 13) 이수원, 황보식, 양희진, 남명수, 유제현, 정충일. 우유 Casein 중의 Calcium Phosphopeptide에 관한 연구. *KOREAN J. FOOD SCI. ANI. RESOUR.* 22(1), 55~158 (2002).
- 14) 변진위, 황인경. 칼슘강화 두유의 제조 및 단백질과 칼슘의 체외 소화 특성. *KOREAN J. FOOD SCI.* 28(6), 995~1000 (1996).
- 15) 조진호, 김병기, 한찬규, 정은봉, 조승목. 자건대멸, 칼슘강화 소재를 첨가한 우유 및 칼슘강화 우유가 흰쥐의 칼슘흡수율과 골대사에 미치는 영향. *J Korean Soc Food Soc Nutr.* 37(4), 459~464 (2008).
- 16) 김옥희, 김을상, 유인실. 우리나라 가공식품의 칼슘강화 현황에 관한 조사 연구. *J Korean Soc Food Soc Nutr.* 31(1), 170~176 (2002).
- 17) 정진은. 한국인의 시리얼 섭취 실태와 우유 및 칼슘섭취와의 관련성 연구. *The Korean Nutrition Society.* 39(8), 786~794 (2006)
- 18) 식품의약품 안전청. 2010. 식약Green-info(청소년,영양섭취 불균형속에서도 비만에 대한 왜곡된

생가). 제4호.

- 19) Andon MB, Lloyd T, Matkovic V. Supplementation trials with calcium citrate malate; evidence in favor of increasing the calcium RDA during childhood and adolescence. *J. Nutr.* 124:1412S-1417S.(1994).
- 20) Zittle CA, Thompson MP, Custler JH, Cerbulis J. K-casein-beta-lactoglobuline interaction in solution when heated. *J. Dairy Sci.* 45:807-810(1962).
- 21) 수의과학검역원, 축산물의 가공기준 및 성분규격, V 가공품 기준법, 1 유가공품, (가) 우유류, (4) 조지방(Gerber법). (2007)
- 22) 수의과학검역원, 축산물의 가공기준 및 성분규격, III 일반시험법, 라 지질, (1) 조지방, (가) Rose-Gotlieb법 또는 Bobcock법. (2007)
- 23) 수의과학검역원. 제2 축산물 기준 및 규격, V 가공품 기준법, 1 유가공품, 하 유청류, (3) 성분규격. 2007.
- 24) 수의과학검역원. 제2 축산물 기준 및 규격, V 가공품 기준법, 1 유가공품, 하 유청류, (4) 시험방법. 2007.)
- 25) 식품공전(2008), 제10 일반시험법, 8 미생물시험법, 2) 세균수(일반세균수)
- 26) 식품공전(2008), 제10 일반시험법, 8) 미생물시험법, 9) 진균수(효모 및 사상균수)

II. 칼슘-유단백질 킬레이팅 유기태 칼슘제제의 안전성, 체내 이용성 및 효능평가

- 1) Korean Health Industry Development Institute/Ministry of Health and Welfare. 2009. *2008 national health and nutrition survey report.*
- 2) Smith EL, Gilligan C, Smith PE, Sempos CT. 1989. Calcium supplementation and bone loss in middle aged woman. *Am J Clin Nutr* 50; 833~842.
- 3) Louie DS. 1996. Calcium and phosphorus in health and disease: *Intestinal bioavailability and absorption of calcium.* CRC Press, Boca Raton. p 45.
- 4) Miller GD, Jarvis JK, McBean LD. 2001. The importance of meeting calcium needs with foods. *J Am Coll Nutr* 20(2 Suppl): 168S-185S.
- 5) Lee BY, Chang YK, Cho SH. 1992. Effect of environmental and physiological factors on bone mineral density in postmenopausal women. *Korean J Nutr* 25: 656-667.
- 6) The 13method for safe diet for Korean. 2010. The Korean Nutrition Society Spring Symposium : p 80.
- 7) Sato R, Noguchi T, Naito H. 1986. Casein phosphopeptide enhances calcium absorption from the ligand segment of rats small intestine. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 32: 67-76.
- 8) Ashmead HD. 1991. Comparative intestinal absorption and subsequent metabolism of metal amino acid chelates and inorganic metal salts. ACS Symposium Series, Vol. 45. Chapter 24. p 306-319.
- 9) Choi SY, 2002. Final report of production of soybean phosphopeptide calcium. Ministry of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries. p 3-4.
- 10) Ken K, Yasuhiro T, Hiroaki M, Junichi Y, Yashuhiro M, Hiroshi K, Akira I, Masayoshi K, Seiichiro A, Yukihiro T. 2000. Milk basic protein enhances the bone strength in

- ovariectomized rats. *J Food Biochemistry* 24: 467–476.
- 11) Frings CS, Dunn RM. 1970. A colorimetric method for determination of total serum lipids based in the sulfur–phospho–vanillin reaction. *Am J Clin Pathol.* 53: 89–91.
 - 12) Folch J, Less M, Stanley GHS, 1957, A Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Bio Chem.* 226: 497–502.
 - 13) Mitruka BM, Rawnsley HM. 1981. *Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans.* 2nd ed. Masson Publishing USA. Inc., New York. p160–166.
 - 14) Song CW, Hwang HS, Han SS, 1990, Body weight, hematology, serum chemistry and Urinalysis, *Korean J. of Lab. Ani. Sci.* Vol. 6, No. 1, P 33~43.
 - 15) Kang BH, Son HY, Ha CS, Lee HS. 1995. References values of hematology and serum chemistry in Ktc: Sprague–Dawley Rats. *Korean J. of Lab. Sci.* Vol. 11, No. 2. P 141–145.
 - 16) Rodriguez PN, Friedman SM, Boyer P, de Portela ML. Influence of dietary calcium concentration on body size and bone composition in rats during recovery from malnutrition. *J Am Coll Nutr.* 1998 Feb ;17(1): 86–91.
 - 17) O JH, Lee YS. 1995. Effects of bovine bone ash and bone powder as a dietary calcium source on mineral bioavailability in rats. *J Korean Nutr* 28: 434–441.
 - 18) Lee JH, Lee YS. 1999. Effects of excess calcium and iron intake on calcium bioavailability and physiological function in osteoporotic model rats. *The Korean Society of community Nutrition.* 1999(2). p 87–88.
 - 19) Evans GE, Weaver CM, Harrington DD, Babbs CF. 1990. Association of magnesium deficiency with blood pressure lowering effects of calcium. *J Hypertension* 8: 327–337.
 - 20) Tsugawa N, Okano T, Higashino R, Kimura T, Oshio Y, Teraoka Y, Igarashi C, Ezawa I, Kobayashi T. 1995. 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* 18: 677–682.
 - 21) Kaup SM, Behling AR, Choquette L, Greger JL. 1990. Calcium and magnesium utilization in rats: effect of dietary butterfat and calcium of age. *J Nutr* 120: 266–273.
 - 22) Armandi BH, Bimbaum RS, Juma S, Barengolts E, Kukreja SC. 2000. The synthetic phytoestrogen, ipriflavone, and estrogen prevent bone loss by different mechanism. *Calcif Tissue Int* 66(1): 61–65.
 - 23) Ostrowska Z, Kos–Kudla B, Marek B, Kajdaniuk D, Ciesielaska–Kopacz N. 2002. Dynamic pattern of IGF–I and chosen biochemical markers of bone metabolism in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Regul* 36(1): 9–10.
 - 24) Kinyamu HK, Gallagher JC, Prah J, Deluca HF, Petranick KM, Lanspa SJ. 1997. Association between intestinal vitamin D receptor, calcium absorption, and serum 1,25 dihydroxyvitamin D in normal young and elderly women. *J Bone Miner Res* 12: 922–928.
 - 25) O JH, Lee YS. 1995. Effects of bovine bone ash and bone powder as a dietary calcium source on mineral bioavailability in rats. *J Korean Nutr* 28: 434–441.

- 26) Hoek AC, Lemmens AG, Mullink JWMA, Beynen AC. 1988. Influence of dietary calcium: phosphorous ratio mineral excretion and neurocalcinosis in female rat. *J Nutr* 118:1210–1216.
- 27) Lacour B, Tardivel S, Druke T. 1997. Stimulation by citric acid of calcium and phosphorous bioavailability in rats fed calcium–rich diet. *Miner Electrolyte Metab* 23: 79–87.
- 28) Bell G.H, Orr J. 1941. Strength and size of bone in relation to calcium intake. *J. Physiol* 100: 299.
- 29) Kim EM, Jang YK, Lee YS. 1999. Effect of Ovariectomy and Dietary Calcium Levels on Bone Metabolism in Rats Fed High Calcium Diet during Growing Period. *J Korean Nutr* vol. 32, No. 2: P 150–157.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.