

# 칼슘 소재의 최근 연구동향과 생체어뼈로부터 인산화 펩타이드와 결합된 수용성 천연칼슘제의 개발

이배진<sup>1</sup> · 김세권<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>(주)마린바이오프로세스

<sup>2</sup>해양바이오프로세스연구단장

## Research Trend of Calcium Materials and Development of Water-Soluble Natural Calcium Agents with Phosphorylated Peptide from Fish Bone

Bae-Jin Lee<sup>1</sup> and Se-Kwon Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Marinebioprocess Co., Ltd., Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

<sup>2</sup>Director of Marine Bioprocess Research Center, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

### 서론

칼슘은 인체내 가장 많이 존재하는 대표적인 무기질 원소로서 일반 성인의 경우 체중의 약 2%인 1,200 g 정도를 체내에 보유하고 있다. 체내 칼슘의 99%는 골격과 치아를 형성하고 있으며, 나머지 1% 정도만이 근육의 수축과 이완, 규칙적인 심장박동, 혈액응고, 효소의 활성화, 세포내의 자극과 흥분의 전달과 같은 생리활성 조절기능을 담당하고 있다(1,2).

특히 칼슘은 골다공증 등 골질환(3-6)을 비롯하여 고콜레스테롤증, 동맥경화, 고지혈증, 고혈압 등(7,8)의 만성질환의 발생을 감소시키는데 중요한 역할을 하므로, 인체내 적정량의 칼슘농도가 유지되어야 한다(9).

최근 국민영양조사보고서(10)에 의하면 1일 섭취 권장량중 칼슘은 가장 부족되기 쉬운 영양소 중 하나로 평가되고 있다. 국내 칼슘의 1일 섭취 권장량은 700 mg으로 음식을 통한 칼슘의 꾸준한 섭취가 매우 중요하다. 그러나 고칼슘 식품을 충분히 섭취하더라도 체내에서의 칼슘 흡수율이 매우 낮기 때문에 실질적인 섭취량은 성인의 경우 권장량의 평균 30% 이하, 최대 45% 정도만을 섭취하고 있는 실정이다.

대표적인 상용칼슘제로서는 화학적 합성품인 탄산칼슘(calcium carbonate), 인산칼슘(calcium phosphate) 등의 불용성 칼슘과 염화칼슘(calcium chloride), 구연산칼슘(calcium citrate), 젖산칼슘(calcium lactate), 글루콘산칼슘(calcium gluconate) 등 수용성 유기산 염의 형태로 공급되어왔으며, 천연칼슘 소재로서는 우골 및 돈골분(11-

13), 어골분(14-17), 갑오징어갑(18-21), 난각분(22-24,27,28), 패각분(25,26) 및 해조분말(29)과 다슬기분말(30) 등 분쇄 및 소성에 의한 단순가공 형태의 불용성 칼슘제가 널리 공급되어왔으며, 유기산처리에 의한 수용성 칼슘제의 형태로 이용하려는 시도가 행해지고 있다.

그러나 이러한 칼슘제의 경우 광우병과동(우골분)과, FDA에 의한 중금속오염에 대한 경고(난각분, 패각분), 그리고 식품에 첨가시 불용성 침전에 의한 상품성의 훼손 등으로 천연칼슘제의 경우 생산 및 소비가 급감하였다. 합성품인 수용성 칼슘염의 경우도 인체내 유효 흡수율의 문제로 말미암아 칼슘흡수촉진제인 카제인 인산화펩타이드(casein phosphopeptide: CPP)와 병용해야 하는 구조적인 한계를 노출하고 있어 웰빙시대에 즈음한 소비자의 수요를 충족시키지 못하는 실정에 있다.

이러한 문제점을 해결하고자 최근의 연구는 안전성이 확보되는 천연원료를 중심으로 한 칼슘 소재로부터, 고가인 CPP의 대체 소재개발과 칼슘 흡수촉진제의 병용이 필요없고 체내 흡수율이 높은 천연칼슘제를 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

이하에서는 이와 관련한 최근의 연구동향과 수산가공 부산물인 어뼈로부터 체내흡수율을 획기적으로 높일수 있는 아미노산펩타이드가 결합된 수용성 천연칼슘제의 연구개발에 대하여 소개하고자 한다.

### 인체내 칼슘의 흡수율

음식물을 통하여 섭취된 칼슘, 인과 같은 무기질은 위

\*Corresponding author. E-mail: sknkim@pknu.ac.kr  
Phone: 051-620-6375, Fax: 051-628-8147

장내에서 강산인 위산(pH 1.5~2)에 의해 이온화되지만 무기질의 주 흡수기관인 소장은 중성(pH 7.8)영역으로서, 위장을 거쳐 이동해온 이온화된 칼슘은 과량의 인산이온과 제결합함으로써 인산칼슘(calcium phosphate)을 형성하게 되고, 불용성염인 인산칼슘은 인체내로 흡수되지 못하고 체외로 배출됨으로써 칼슘흡수를 저하시키는 주요 인이 되고 있다(31).

Fig. 1은 인체내 칼슘의 각 소화기관별 부분 흡수율을 나타내고 있는 것으로, 경구 섭취된 칼슘의 총량 1,000 mg 중 20%인 200 mg정도만이 유효하게 흡수되고 있음을 나타낸다.

칼슘이 체내에서 흡수되기 위해서는 칼슘의 주 흡수기관인 소장내에서 점막세포를 통과할 때 반드시 가용성 형태로 존재해야 흡수될 수 있다는 것이 일반적인 이론이다. 그러나 소장 내는 중성영역이므로 필수 무기질인 칼슘이 이온상태로 존재한다는 것은 불가능한 일이다. 따라서 칼슘은 특수한 구조물에 의존하지 않고서는 점막에서 이온의 상태를 유지할 수 없다. 즉 위장에서 생성된 수용성 미네랄 이온은 특수한 구조를 가진 화합물의 보호를 받지 못하면 십이지장을 통과하는 동안 과량의 인산이온과 결합하여 불용성 염을 형성하기 때문이다(32).

체내 칼슘 농도의 항상성은 조골세포(osteoblast), 파골세포(osteoclast), 부갑상선호르몬(PTH), 에스트로젠(estrogen), 칼시토닌(calcitonin) 등의 작용에 의해 유지되며, 음식물에 의한 칼슘 섭취량과 소화기관으로부터의 흡수량(resorption), 뼈의 침착량(accretion)과 뼈로부터의 용출량(resorption), 신장에서의 재흡수량(reabsorption)의 균형에 의한 조절작용으로 골형성(bone formation)과 골흡수(bone resorption)가 반복적으로 수행되며, 골형성시 칼슘과 인은 1.6대 1의 비율로서 뼈를 형성한다(33).

음식물을 통한 칼슘과 인의 적당한 섭취는 골격형성 및

순환기 대사에 매우 중요하며, 음식물 중 칼슘과 인의 비율이 1대1일 때 칼슘의 흡수율은 최대가 되지만 우리나라의 경우 인의 섭취량은 칼슘의 섭취량보다 항상 높아 정상적인 식이 섭취에 의하여 칼슘의 비율을 일정하게 유지한다는 것은 사실상 어렵다. 그러므로 성인의 경우 최대 칼슘과 인의 비율이 2:1을 상회하지 않도록(인의 상대적인 섭취량을 일정수준 이하로) 권장하고 있는 실정이다.

인(P)이 적당하면 (칼슘:인=1:1) 칼슘에 의한 골형성이 용이하나 과잉일 경우 장내에서 과량의 칼슘과 결합하여 칼슘의 흡수를 방해하는 요인이 될 뿐만 아니라 신장에서 활성 비타민 D가 합성되는 것을 막아 칼슘 흡수를 이중으로 방해하는 결과를 초래하게 된다. 그러나 쌀을 주식으로 하는 우리의 음식문화에서는 인의 섭취 비율이 칼슘보다 압도적으로 많으며, 현대 식생활 문화의 두드러진 현상인 패스트푸드와 가공식품(라면, 햄버거, 햄, 소시지) 및 콜라와 같은 탄산식품의 범람은 이들 제품의 보존성과 기호성의 증진을 위하여 첨가되는 인산염의 섭취를 높이며 이는 칼슘과의 섭취 비율에 있어 극심한 불균형을 초래하게 한다(34).

그러므로 이들 고 인산 함유 식품에 대하여 단지 칼슘량의 절대량을 높이기 위한 방편의 일환으로 칼슘강화제를 첨가하는 것은 바람직하지 않으며, 국민의 건강에 대하여 일정한 사명의식을 가져야 할 식품인(food maker)으로서 무책임한 일이 아닐 수 없다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위한 노력의 일환으로서도 인체내 섭취된 과량의 칼슘과 결합되지 않고 유효하게 흡수될 수 있는 칼슘제 개발의 필요성이 대두된다.

### 칼슘소재의 연구동향 및 상용기술

#### 상용기술

현재 상용화된 칼슘강화제로는 천연품인 해조칼슘 및 유청칼슘과 합성품으로서 분산형탄산칼슘, 젖산칼슘 및 구연산칼슘이 대표적이며 이들이 전체 칼슘 시장의 80% 이상을 점유하고 있다(35).

종래 천연 소재의 경우, 불용성 칼슘소재인 생물체(우골, 돈골, 어골)의 골분과 패각(굴껍질 등)분, 난각(달걀, 타조알 등)분 등을 소성 및 단순 분쇄하는 기술에서, 최근 나노입자(nano particle)화 시키는 기술 등을 중심으로 발전하고 있으며, 화학적 합성품으로써는 불용성의 단점을 보완하기 위한 분산과 유화기술 등 침전방지용 기술과 유기산 염의 형태에 의한 수용화 기술을 중심으로 발전하여 상용화하고 있다(2003, 동경국제식품첨가물대전). 그러나 수용성의 유기산 칼슘은 유리된 칼슘이온이 식품, 특히 유제품 중의 단백질과 결합하여 망상구조로 단백질의 거대분자를 형성하여 침전함으로써 단백질의 안정성을 저

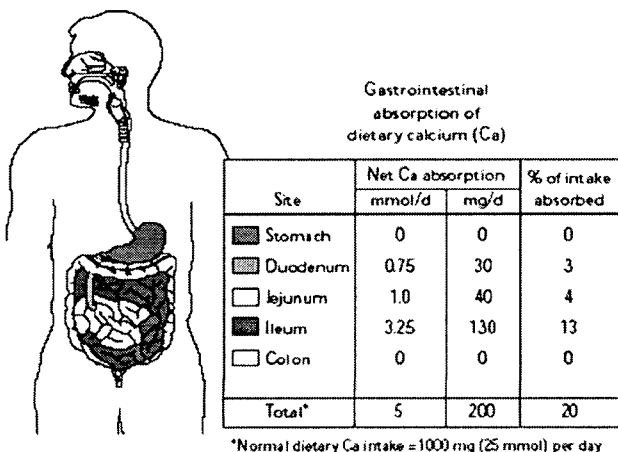


Fig. 1. The absorption rate of dietary calcium in digestive organ, adapted (50)

해하고 아린맛 등의 이미(異味)가 발생하기 때문에 일정량 이상 첨가가 불가능하므로 사용할 수 없게 된다. 그리고 물에 녹지 않는 탄산칼슘, 인산칼슘, 난각칼슘, 산호칼슘, 해조칼슘 등은 칼슘이 이온상태로 해리되지 않아 다량으로 첨가하여도 단백질의 안정성에는 문제가 없으나, 이러한 무기질 칼슘은 전반적으로 비중이 높아 유제품 중에 분산시킬 경우 단시간에 침전하기 때문에 식품의 미관과 제품의 특성에 악 영향을 줌으로서 첨가량이 제한되어 다량으로 사용할 수 없는 단점들이 있다. 국내시장의 경우 우유, 두유 및 유스류 시장을 대표로한 (기능성)음료시장에서의 칼슘강화제의 수요가 두드러지는 가운데 침전방지용 분산(유화)기술 제품인 탄산칼슘이 우유 및 두유류에 널리 활용되고 있으며, 수용성 유기산염의 형태에 의한 젯산칼슘, 구연산칼슘 등이 유스류 등에 널리 이용되고 있다.

한편 칼슘제 자체의 흡수율의 한계를 개선시키기 위하여 첨가되는 칼슘흡수촉진제인 CPP는 20여 년간 상용되고 있는 유일한 소재인데, CPP는 우유속의 인산단백질(phospho protein)인 카제인을 단백질 분해 효소인 트립신으로 가수분해하고, 이과정에서 생성된 부분 가수분해물인 인산화펩타이드(phospho peptide)로서 카제인의 구성아미노산인 세린(serine)잔기가 인산화(phosphorylation)되어 있어 소장내의 칼슘이온과 결합, 수용성 복합체를 형성함으로써 칼슘의 체내 흡수를 용이하게 해주는 물질로 알려져 있다(36). 즉 소장 내에서 유리된 인산이온과 칼슘이온의 결합을 경쟁적으로(불용성 인산칼슘의 형성을) 방해함으로써 수용성인 인산화펩타이드에 결합된 칼슘의 형태로서 인체내 흡수를 돕는 역할을 하게 되는 것이다(37-41).

#### 최근의 연구동향

최근의 연구동향을 살펴보면 광우병 파동 및 FDA에 의한 중금속 오염에 대한 경고와, 웰빙(well-being)시대 화학적 합성품의 기피현상과 함께 인체내 유효 흡수율을 고려하는 소비자의 수요에 부응하는 측면에서 안전성이 확보된 천연소재를 중심으로 칼슘 흡수율 향상을 위한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

천연소재인 수산동물의 골편과 패각 및 난각 등을 이용한 수용성 염인 유기산 칼슘의 제조를 위한 방법으로서 갑오징어 갑과 다슬기 회분을 이용한 초산칼슘(calcium acetate)과 타조알 껍질을 이용한(42) 젯산칼슘의 제조방법 및, 굴패각을 이용한 젯산칼슘과(특허출원:10-2002-0012307호) 염화칼슘, 불가사리를 이용한 아미노산펩타이드와 칼슘의 혼합조성물에 대한 연구(특허출원:10-2001-0044347호)가 진행된 바 있다. 그러나 초산칼슘의 경우 식품첨가물공전에 의하면 칼슘강화제 이외의 목적으로

사용되며, 갑오징어갑(오적골)의 경우에는 식품원료로써 인증이 되고 있지 않으며(식품의약품안전청의 질의회신), 난각 및 패각을 이용한 젯산칼슘의 경우 제조과정상 난각의 제거 및 경제성의 문제로 인하여 상용화가 어려운 실정에 있다.

한편 어류의 뼈를 이용한 천연칼슘제의 개발에 있어 일본의 경우 어류의 뼈를 초산에 침적시킴으로써 연화시키는 방법에 의한 수용성 칼슘의 제조방법(일본 특허 제 6-319487호)이 개발 되었지만 공정이 복잡하고, 액체형태의 음료로의 이용에만 한정되어 상용화에 실패하였다. 국내의 경우 어골분, 수용성칼슘 및 칼슘흡수촉진 펩타이드를 제조하는 방법(특허 제10-0403284호, 제10-0399722호) 등이 개발되었지만 특정 가수분해효소를 첨가내장으로부터 추출해야 하는 등 공정이 복잡하고, 수용성 칼슘의 경우 제품 수율이 낮아 경제적인 관점에서 상용화가 어려웠다.

한편, 고가(40,000~400,000원/kg)로 인하여 칼슘제와의 병용에 한계점을 노출시키는 칼슘흡수촉진제인 CPP의 대체 소재의 개발을 위한 연구가 다양하게 진행되고 있으며, 이중 달걀 난황의 인당단백질(phosphoglyco protein)인 포스피틴(phosvitin)을(43) 이용한 포스비틴 포스포펩타이드(phosvitin phospho peptide: PPP)의 제조에 관한 연구(공개특허 제10-2005-0013787호)와 어류의 근육단백질을 특정 효소로 분해하여 얻은 수용성의 가수분해 펩타이드와 수용성인 키토산 올리고당을 화학적으로 수식한 인산화키토올리고당(44) 및 인산화펩타이드를 칼슘흡수촉진제로서 이용하기 위한 연구(45)가 진행된 바 있다. 이들 연구는 칼슘과 인산의 강한 결합력을 역 이용한 방법으로서 CPP제조기술과 동일한 원리를 적용시킨 연구 사례이다. 이중 PPP는 포스피틴을 단백질 분해 효소인 트립신 또는 카이모트립신(chimotrypsin)으로 가수분해하고, 이 과정에서 생성된 부분 가수분해물인 인산화펩타이드를 의미한다. 즉 PPP는 포스피틴의 구성 아미노산 중 40%를 차지하는 세린 잔기가 인산화 되어 있어 소장내의 가용성 칼슘과 결합, 수용성 복합체를 형성함으로써 칼슘의 체내 흡수를 용이하게 해주는 역할을 하게 된다. 그러나 PPP는 난황으로부터의 분리 공정 및 수율 등 경제성의 고려시 CPP를 대체하기는 어려운 실정이다.

### 생체 어뼈를 이용한 인산화펩타이드와 결합된 수용성 천연칼슘제의 개발

#### 연구개발 배경

상용되는 대부분의 칼슘제가 인체 유효 흡수율을 고려하지 않은 제품으로서 고가의 칼슘흡수촉진제인 CPP의 병용이 불가피 하지만 이는 경제적인 측면에서 문제가 아

낼 수 없다. 즉 첨가되는 칼슘(10,000~20,000원/kg)의 부분적인 흡수촉진을 위하여 칼슘흡수촉진제(CPP: 40,000~400,000원/kg)를 병용하여야 한다는 것이다.

어뼈는 광우병 과동과 원양회유 어종인 어류의 뼈를 이용함으로써 중금속 오염에 대한 우려를 불식시킬 수 있는 천연 생체 칼슘소재로써 널리 인식되어 왔다. 또한 초저온 냉동상태의 신선한 수산가공부산물(생선가쓰용 민태 및 횃감용 참치)에서 유래되는 어뼈에는 천연 미네랄성분(칼슘, 인, 마그네슘, 철 등)과 콜라겐(collagen)을 주성분으로 하는 생리활성 단백질이 다량 함유되어 있으므로 칼슘소재로서는 최적의 천연소재가 아닐 수 없다. 특히 칼슘흡수촉진제의 병용이 불필요한 생리활성 칼슘제의 제조를 위하여 CPP의 제조원리를 응용하기 위한 필수조건인 인산과 구성 아미노산인 세린을 포함하는 단백질(콜라겐)을 함유함으로써 인산화펩타이드가 결합된 수용성 천연칼슘제를 제조하기 위한 기초를 제공하고 있다.

핵심기술의 구성

**원료(어뼈)의 선정, 가수분해 펩타이드와 칼슘(Ca) 및 인(P)의 추출과 회수:** 수산가공부산물 중에서 민태뼈(hoki frame)의 경우에는 참치뼈와 같이 대량으로 원료 확보가 용이하고 어취도 나쁘지 않을 뿐만 아니라 어뼈의 크기가 적당하여 칼슘의 회수가 용이하여 민태뼈를 원료로 선정하였다. 민태뼈의 일반성분의 조성을 보면 생시료의 경우, 수분의 함량은 71.0%였으며, 어육과 뼈 중에 함유되어 있는 단백질(콜라겐 70%)의 전체 함량은 16.5%를 차지하였고 회분은 뼈의 무기질 성분으로 인해 전체의 10%를 상회 하였으며, 그중에서 칼슘은 50%이상 함유되어 있었다.

어뼈를 구성하고 있는 콜라겐은 구성 무기질인 수산화아파타이트(hydroxyapatite;Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>)와 강력한 결합체를 이루어 일반 효소에 의해 분해되기 힘들지만(46), 수산화아파타이트의 기본 구성분자인 칼슘, 인 등이 유기산에 의해 용출되면서 육 및 뼈의 단백질이 효과적으로 분해가 되었으며, 칼슘도 단백질 분해산물과 함께 용이하게 회수할 수 있었다.

**가수분해 펩타이드와 칼슘의 결합 능력:** 가수분해 펩타이드의 칼슘의 결합능력은 인산과 칼슘의 강력한 결합력을 이용한 펩타이드의 인산화여부에 의하여 결정된다. 인산화여부를 확인하기 위하여 가수분해 및 인산화공정 이후 FT-IR 스펙트럼을 비교 확인한 결과 가수분해물과 인산화 가수분해물들과의 차이는 인산기(phosphate group)가 존재하는 1,000~1,300 cm<sup>-1</sup>에서 발견되었으며, 그 피크(peak)는 가수분해물에서는 확인되지 않았지만 인

산화 가수분해물에서 발견되었다(47,48).

즉 P=O 결합은 1,300 cm<sup>-1</sup>에서, P-O-C 결합은 1,100~1,200 cm<sup>-1</sup>에서, 알킬기(alkyl group)와 결합된 -O-P는 1,000 cm<sup>-1</sup>에서 흡수띠를 나타내었다. 이러한 흡수띠들은 가수분해물에서는 확인되지 않았지만 인산화 가수분해물에서는 모든 시료에서 확인되었다.

제조공정

인산화펩타이드가 결합된 칼슘의 제조방법을 칼슘흡수촉진제인 CPP의 제조공정과 비교하여 설명하면 다음과 같다.

전 세계적으로 상용되는 CPP의 생산공정(CPPⅢ형)은 Fig. 2의(A)에 의한 5단계의 공정 시스템으로 구성되어 있다.

반면 당해기술은 Fig. 2의(B)와 같이 어뼈로부터 핵심 성분(가수분해 펩타이드, 칼슘, 인)의 추출 및 가수분해 공정과 인산화펩타이드의 제조 및 제조된 펩타이드와 칼슘과의 재결합 공정을 단일공정으로 동시에 수행하는 3단계 공정 시스템으로 구성함으로써 경제성과 효율성을 배가시킬 수 있게 되었다. (특허출원 제10-2005-0023889, 및 제10-2005-0023891호 기술을 근거)

또한 제 1단계 및 제 2단계의 제조공정을 효소반응기(bio-reactor)와 한외여과막시스템(ultra-filtering system)의 조합에 의한 연속순환시스템으로 구성하여 고가인 단백질 분해 효소와, 공정부산물의 재이용을 가능하게 하므로써 경제적으로 활용이 가능하게 되었다.

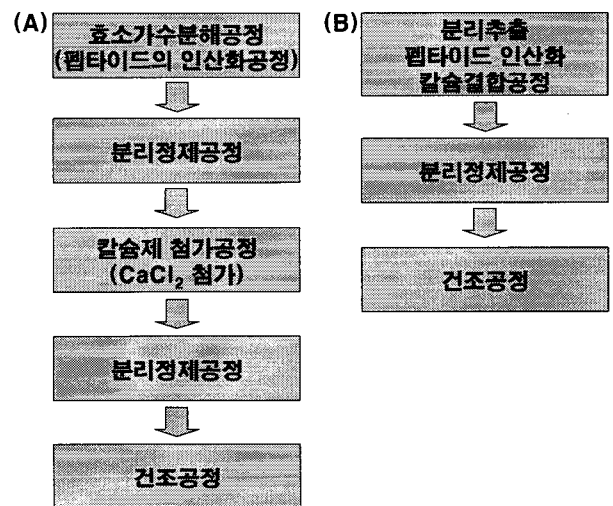


Fig. 2. The comparison of process (A) CPP(III) 생산공정, (B) 인산화펩타이드가 결합된 천연칼슘제

## 결 론

최근 의학의 발달로 고령화 사회로 진입함에 따라 인간의 평균수명이 연장되었으나 골다공증, 류마티스 관절염 등의 퇴행성 질환과 고혈압 등 순환기계 질병으로 고통받는 환자들이 급증하고 있는 실정이다. 또한 현대사회의 바쁜 생활패턴은 잦은 외식과 패스트푸드의 범람과 같은 식생활 문화를 변화시킴으로써 심각한 영양의 불균형 상태를 초래하고 있다. 특히 유제품의 섭취량이 부족한 동양인의 경우 칼슘섭취량의 부족은 더욱 심화되어 성장기의 어린이에서 노인에 이르기까지 사회문제로 대두되고 있으며 이러한 문제점의 해결을 위하여 여러 가지 칼슘강화 식품들이 개발되어 판매되고 있는 실정이다.

그러나 부족한 칼슘을 강화할 목적으로 해조칼슘, 유청칼슘, 분산형 탄산칼슘, 유기산칼슘 등 많은 칼슘강화소재와 칼슘흡수촉진제가 개발 되었지만 인체 유효흡수율의 한계와 경제성의 문제로 인하여 생산자와 소비자의 희망 수요를 완전히 충족시키지 못하고 있는 실정에 있다.

생물 소재인 어뼈는 인간의 뼈와 그 구성성분이 동일하며, 각종 필수 무기질 성분과 생리활성 아미노산 성분을 함유한 천연칼슘의 소재로서 그 유효성이 입증되어 왔으며, 이를 이용한 칼슘제의 효용성에 관한 많은 연구보고가 이루어져 있다(49).

최근 어뼈를 소재로 하여 개발된 「아미노산펩타이드가 결합된 수용성 천연칼슘」은 종래의 수산가공부산물로써 사료용으로 그 용도가 극히 제한되어 있던 어뼈를 고부가 가치 천연 칼슘소재로 전환, 사업화 단계에 들어감으로써 칼슘소재 시장에 신선한 바람을 일으키길 기대한다.

## 감사의 글

본 연구는 해양수산부 마린바이오21사업의 일부지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Allen LH. 1982. Calcium bioavailability and absorption: A review. *Am J Clin Nutr* 35: 738-808.
- Pyun JW, Hwang IK. 1996. Preparation of calcium-fortified soymilk and in vitro digestion properties of its protein and calcium. *Korean Food Sci Technol* 28: 995-1000.
- Cho KJ. 1996. The study of the relationship between food habits and bone state in the elderly. *J Korean Soc Food Nutr* 25: 423-432.
- Lee HJ, Choi MJ. 1996. The effect of nutrient intake and energy expenditure on bone mineral density of Korean women in Taegu. *Korean J Nutr* 29: 622-633.
- Lee HS, Baik IK, Hong ES. 1996. Effect of nutrients intakes on development of osteoporosis in Korean postmenopausal women. *J Korean Diet Assoc* 2: 38-48.
- Oh JJ, Hong ES, Baik IK, Lee HS, Lim HS. 1996. Effects of dietary calcium, phosphorous intakes on bone mineral density in Korean premenopausal women. *Korean J Nutr* 29: 59-69.
- Choi MJ. 2001. Effects of exercise and calcium intake on blood pressure and blood lipids in postmenopausal women. *Korean J Nutr* 34: 417-425.
- Park JA, Yoon JS. 2001. The effect of habitual calcium and sodium intakes on blood pressure regulating hormone in free living hypertensive women. *Korean J Nutr* 34: 409-416.
- Lee SH, Hwangbo YS, Kim JY, Lee YS. 1997. A study on the bioavailability of dietary calcium sources. *Korean J Nutr* 30: 499-505.
- Health Industry Development Division. 2002. Report on 2001 natural health and nutrition survey - Nutrition survey (I). Ministry Health & Welfare. p 152-222.
- Lee YS, Park JH, Cho CW. 1992. Effect of bovine bone powder as a dietary calcium source on mineral bioavailability in rats. *Kor J Rural Living Sci* 3: 26-27.
- Okano T, Tsugawa N, Higashino R, Kobayashi T, Igarashi C, Ezawa I. 1991. Effect of bovine bone powder and calcium carbonate as a dietary calcium source plasma and bone calcium metabolism in rats. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* 44: 479-485.
- Han JS, Lee MH, Kim MS, Minamide T. 2000. The study for utilization of pork bone as calcium reinforcement diet. *J East Asian Soc Dietary Life* 10: 153-159.
- Kim JS, Choi JD, Kim DS. 1998. Preparation of calcium based powder from fish bone and its characteristics. *Agric Chem Biotechnol* 41: 147-152.
- Kim JS, Choi JD, Koo JG. 1998. Component characteristics of fish bone as a food source. *Agric Chem Biotechnol* 41: 67-72.
- Kim JS, Yang SK, Heu MS. 2000. Component characteristics of cooking tuna bone as a food resource. *J Korean Fish Soc* 34: 38-42.
- Kim JS, Cho ML, Heu MS. 2000. Preparation of calcium powder from cooking skipjack tuna bone and its characteristics. *J Korean Fish Soc* 33: 158-163.
- Cho ML, Heu MS, Kim JS. 2001. Food component characteristics of cuttlebone as a mineral source. *J Korean Fish Soc* 34: 478-482.
- Cho ML, Heu MS, Kim JS. 2001. Study on pretreatment methods for calcium extraction from cuttle bone. *J Korean Fish Soc* 34: 483-487.
- Kim HS, Lee MY, Lee SC. 2000. Characteristics of sepia as a calcium source. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 743-746.
- Lee MJ, Kim HS, Lee SC, Park WP. 2000. Effects of sepia addition on the quality of kimchi during fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 592-596.

22. Shin HS, Kim KH. 1997. Preparation of calcium powder from eggshell and use of organic acids for enhancement of calcium ionization. *Agric Chem Biotechnol* 40: 531-535.
23. Shin HS, Kim KH, Yoon JR. 1998. Rheological properties of cooked noodle fortified with organic acid-eggshell calcium salts. *Korean J Food Sci Technol* 30: 1197-1202.
24. Zhao J, Song K. 1997. Preparation of calcium lactate from egg shells. *Modern Chem Ind* 17: 31-33.
25. Kim GH, Jeon YJ, Byun HG, Lee YS, Lee EH, Kim SK. 1998. Effect of calcium compounds from oyster shell bound fish skin gelatin peptide in calcium deficient rats. *J Korean Fish Soc* 31: 149-159.
26. Kang JH, Kim JH, Lee HC. 1996. A study on the development of manufacturing process of high grade precipitated calcium carbonate from oyster shell. *J Kor Solid Wastes Eng Soc* 13: 320-327.
27. Nam KH. 2000. The physiology of ostrich eggs and the effective management for incubation. 2000 Summer Symposium Proceedings of Korean Society of Poultry Science. p 39-46.
28. Ko MK, No HK. 2002. Studies on characteristics of ostrich egg shell and optimal ashing conditions for preparation of calcium lactate. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 236-240.
29. Bae TJ, Kang DS. 2000. Processing of powdered seasoning material from sea tangle. *Korean J Food Nutr* 13: 521-528.
30. Lee MY, Lee YK, Kim SD. 2004. Quality characteristics of calcium acetate prepared with vinegars and ash of black snail. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 593-597.
31. Calvo MS. 1994. The effects of high phosphorous intake on calcium homeostasis. *Adv Nurt Res* 9: 183-207.
32. 지성규. 2000. 바이오미네랄. 식품저널. p 70-97.
33. Lee YS, Kim EM. 1998. Effect of ovariectomy and dietary calcium levels on bone metabolism in rats fed low calcium diet during growing period. *Korean J Nutr* 31: 279-288.
34. Oh SI, Lee HS, Lee MS, Kim CI, Kwon IS, Park SC. 2003. Factors affecting bone mineral status of premenopausal women. *Korean J Community Nutrition* 8: 927-937.
35. 기능식품신문. 2005, 1, 20.
36. Tsuchita H, Suzuki T, Kuwata T. 2001. The effect of casein phosphopeptides on calcium absorption from calcium-fortified milk in growing rats. *Br J Nutr* 85: 5-10.
37. Naito H, Kawakami A, Imamura T. 1972. *In vivo* formation of phosphopeptide with calcium-binding property in the small intestinaltract of the rat fed on casein. *Agric Biol Chem* 36: 409-415.
38. Naito H, Suzuki H. 1974. Further evidence for the formation *in vivo* of phosphopeptide in the intestinal lumen from dietary  $\beta$ -casein. *Agric Biol Chem* 38: 1543-1545.
39. Naito, H. 1990. Casein phosphopeptide: Intra-intestinal formation and significance in the bioavailability of calcium. In *Nutrition: proteins and amino acids*. Yoshida A, Naito H, Niiyama Y, Suzuchi T, eds. Springer, Berlin. p 207-220.
40. Rollema HS. 1992. Casein association and micelle formation. In *Advanced dairy chemistry\*1: Proteins*. Fox PF, ed. Elsevier Applied Science, London. p 111-140.
41. Sato R, Noguchi T, Naito H. 1983. The necessity for thephosphate portion of casein molecule to enhance Ca absorptionfrom the small intestine. *Agric Biol Chem* 47: 2415-2417.
42. Ko MK, No HK. 2002. Preparation of calcium lactate from ostrich egg shell. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 214-245.
43. Bo J, Yoshinori M. 2000. Preparation of novel funtional oligophosphopeptides from hen egg yolk phosvitin. *Agric Biol Chem* 48: 990-994.
44. Kim SK, Park PJ, Jung WK, Moon SH, Mendis E, Cho YI. 2005. Inhibitory activity of phosphorylated chitooligosaccharides on the formation of calcium phosphate. *Carbohydr Polym* 60: 483-487.
45. Jung WK, Park PJ, Byun HG, Moon SH, Ki SK. 2005. Preparation of hoki (*Johnius belengerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. *Food Chem* 91: 333-340.
46. Armstrong WD, Singer L. 1965. Composition and constitution of the mineral phase of bone. *Clin Orth Rel Res* 38: 179-190.
47. Sung HY, Chen HJ, Liu TY, Su JD. 1983. Improvements of functionalities of soy protein isolate through chemical phosphorylation. *J Food Sci* 48: 584-588.
48. 이종순, 홍성일, 전동원. 1994. 인산화 가교 키토산의 합성 및 금속이온 흡착특성(II). 한국섬유공학회지 31: 976-982.
49. Kim YM, Yoon GA, Hwang HJ, Chi GY, Son BY, Bae SY, Kim IY, Chung JY. 2004. Effect of *Bluefin* tuna bone on calcium metabolism of the rat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 101-106.
50. Anderson JJB, Garner SC. 1996. Calcium and phosphorousnutrition in health and disease, Introduction. In *Calcium and phosphorous in health anddisease*. Anderson JJB, Garner SC, eds. CRC Press, New York. p 15.