

Methionine, Threonine, Tryptophane을 添加한 砂糖飼料에 의한 白쥐의 體重增加 및 Plasm, 肝臟中の 遊離아미노酸에 대한 研究

釜山大學校 文理大學 家政學科

李 鉉 琪

(1966. 6. 15 受理)

Studies on the body growth and free amino acids in plasm and liver of rat fed on sucrose diet adding Methionine, Threonine and Tryptophane,

by

Hyun Ki Lee

Dept. of Home Economics, Pusan National University

(Received, June 15, 1966)

Abstract

By the micro-bioassay method, quantitative studies were made on the increment of body weight and changes in free-lysine and threonine contents in the liver and plasm of rats, when they were fed on sucrose diet added with 0.3% DL-methionine, 0.36% DL-threonine and 0.1% L-tryptophane. The results of the experiment were as follows:

(1) The weight gain and growth gain of rats decreased more when they were fed on 0.36% DL-threonine diet (Sth-group) than 0.3% DL-methionine diet (Sm-group). But those gain were increased when they were fed on 0.1% L-tryptophane diet (Str-group).

(2) The contents of free-lysine and threonine in plasm and liver of rats were decreased more when they were fed on 0.36% DL-threonine diet than 0.3% DL-methionine diet. And, those free amino acids were increased greatly when they were fed on 0.1% L-tryptophane diet.

(3) The increment of body weight was the biggest when the free amino acid pattern showed that the contents of free-lysine decreased and threonine increased in the plasm and liver of rats being fed on 0.1% L-tryptophane diet.

序 論

白米에 不足된다고 생각되는 lysine 을 補足하여도 그 果効가 充分치 못하나 lysine 과 threonine 을 添加하면 큰 效果를 認定할 수 있다는 報告⁽¹⁻⁷⁾와 實驗動物 飼料의 아미노酸組成에서 본 methionine, tryptophane 이 不足된다고 생각되는 것에 methionine 과 tryptophane 을 補足하여도 效果가 적으나 lysine 과 threonine 의 添加로 비로소 效果가 있다는 報告⁽⁸⁾가 있으며 또한 lysine, threonine, methionine, tryptophane 의 強化에 대해서 白쥐를 써서 研究한 白쥐의 成長을 指標로 하였을 때 lysine 과 threonine 의 組合에 의해 強化가 가장 效果의이었던 報告⁽⁴⁾ 등이 있으나 著者는 砂糖飼

料에 0.3% DL-methionine 및 0.36% DL-threonine, 0.1% L-tryptophane 을 添加하여 白쥐를 飼育하였을 때 의 그 體重增加와 plasm 및 liver 중의 遊離 lysine 과 threonine 의 含量變化가 體重增加와 어떤 關係가 있나 를 알기 위하여 實驗하였다. 이 遊離 amino acid 의 定 量은 micro-bioassay 法으로 定量하였다.

實 驗

A. 飼育實驗

Wistar 系 白쥐(♂) 40g~50g 仔리를 實驗動物로 使 用하였다.

처음 3日間은 Stock diet⁽⁹⁾로써 飼育한 후 10%-Casein diet 로써 다시 3日間 더 飼育하여 1群 6 마리씩 3

群으로 나누어 鐵網飼育箱子에 한마리씩 넣어 自由로 히 물과 試驗飼料를 먹을 수 있도록 하고 飼育室內溫度는 24°C, 濕度 60%下에서 15日間 飼育하였다.

1) 10%-Casein Diet; 이 飼料의 組成比는 아래와 같이 하였다. Casein 10.0, sucrose 40.0, corn starch 40.0, bean oil 5.0, salt mixture 4.0⁽⁸⁾, vitamin mixture 0.85⁽⁸⁾, choline chloride 0.15%로 하였다.

2) 試驗飼料; 試驗飼料의 組成은 table 1과 같이 하였다.

Table 1 The Composition of the Experimental Diet

Group of diet	Composition
Sm	Basal diet (included 0.3% DL-methionine)
Sth	Sm + 0.36% DL-threonine
Str	Sth + 0.1% L-tryptophane

3) Basal Diet

Table 2 The percentage composition of the Basal Diet

Constituent	Amount (%)	Remarks
Casein	8.0	
DL-methionine	0.3	
※ Salt mixture	5.0	
※※ { Vitamin mix. (fat soluble)	5.0	mix in corn oil
※※ { Vitamin mix. (water soluble)	0.25	mix in sucrose (less niacin)
Choline chloride	0.15	
Sucrose	81.3	

※ The method of salt mixture was as table 3:

Table 3 The Composition of the salt mixture

Constituent	Amount (mg./100g-diet)
CaCO ₃	29.29
CaHPO ₄ ·2H ₂ O	0.43
KH ₂ PO ₄	34.31
NaCl	25.06
MgSO ₄ ·7H ₂ O	9.98
Fe(C ₆ H ₅ O ₇)·6H ₂ O	0.623
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.156
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.121
ZnCl ₂	0.02
KI	0.0005
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.0025

※※ The method of vitamin mixture was as table 4:

Table 4 The Composition of the vitamin mixture

Constituent		Amount (mg./100g-diet)
Fat in soluble	α-tocopherol	10.0mg
	Vitamin A	400.0 I.U
	Vitamin D	200.0 I.U
Water in soluble	Thiamin·HCl	0.5mg
	Riboflavin	0.5mg
	Nicotinic acid	2.5(Less)
	Ca-phantothenate	2.0mg
	Pyridoxine·HCl	0.25 "
	Vitamin K	0.05 "
	Eiotin	0.01 "
	Folic acid	0.02 "
	Vitamin B ₁₂	0.002 "
	Inositol	10.0 "
Ascorbic acid	5.0 "	

B. 遊離아미노酸

1) Sampling; 遊離 lysine 및 threonine 을 定量하기 위하여 다음과 같이 試料를 調製하였다.

Plasm Sample; 各注射器當 heparin sodium(mg./0.05ml)로써 注射器內部를 적신 후 건조시킨 注射器로써 chloroform 으로 마취한 白쥐의 心臟에서 직접 採血하여 內徑 1.5cm 의 centrifuge tube(15ml用)에 넣어 島津遠心分離器(15ml×4本用)를 써서 곧 遠心分離(3,000 r. p. m, 15min.)하여 plasm 를 分離하였다.

除蛋白⁽⁹⁾; plasm 1, uranyl acetic acid(1.55g/dl) 1, 증류수 1 의 容積比로 混合하여 잘 저은 후 50ml 의 centrifuge tube 에 넣어 島津遠心分離器(50ml×8本用)로써 分離(3000 r. p. m, 15min.)하여 濾물을 free amino acid 의 定量用 plasm sample 로 하였다.

Liver Sample; 採血을 끝낸 白쥐를 곧 解剖하여 採肝하였다. 各群別로 10g 의 肝을 分取하여 各各 1%-picric acid 100ml 와 混合하여 homogenizer 하여 50ml centrifuge tube 에 넣어 遠心分離(3000r. p. m, 15min)하였다. 이 濾물을 別途로 준비한 樹脂(Dowex 2-X8, Mesh 200~400, Type Cl)를 pH6.8로 調節하기 위하여 1N-HCl로 反쪽하여 Fig.1 과 같은 column 에 넣어 증류수로 씻어 pH6.8로 調節한 후 濾過紙를 樹脂 濾斗에 한장 깔고 試料를 원심분리한 위의 肝濾물을 넣어 column 을 통과시킨 후 다시 증류수 소량으로 씻은 후 0.2N-HCl 3ml 로써 5회 씻은 濾液을 pH6.8 (B. T. B)로 再調節한 후 200ml로 定容하여 micro-bioassay 用 liver sample 로 하였다.

2) 아미노酸의 定量

Lysine 의 定量에는 *Leuconostoc mesenteroides* P-60

Table. 5 Composition of Basal Medium Uniform⁽¹⁾

Component	Amount	Component	Amount
Amino acids	mg/l	Salts	g/l
DL-Alanine	200	(a)	(b)
DL-Asparatic acid	400	Na-acetate	1
L-Arginine-HCl	200	Na-Citrate	20
L-Cystine	100	NH ₄ Cl	3
L-Glutamic acid	500	Salt A	mg/l
Glycine	100	KH ₂ PO ₄	500
L-Histidine	100	K ₂ HPO ₄	500
DL-Isoleucine	200	Salt B	mg/l
L-Leucine	100	MgSO ₄ ·7H ₂ O	200
L-Lysine	200	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10
DL-Methionine	200	MnSO ₄ ·4H ₂ O	10
DL-Phenylalanine	200	NaCl	10
L-Proline	100	Vitamins	γ/l
DL-Serine	100	Thiamine-HCl	1000
DL-Threonine	200	Ribofravin	1000
DL-Tryptophane	100	Pyridoxine	1000
L-Tyrosine	100	Pyridoxal	200
DL-Valine	200	Ca-pantothenate	1000
Base	mg/l	Nicotinic acid	1000
Adenine·SO ₄	10	P-amino benzoic acid	200
Guanine·HCl	10	Biotin	10
Uracil	10	Folic acid	10
Xanthine	10		
Glucose(g/l)	20		

adjust to pH 6.8
 (a) for *Lact. arabinosus*, *Lact. fermentic* and *Lcuc.mesenteroides*
 (b) for *Str. faecalis*

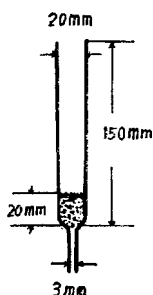


Fig. 1 The Dowex 2-X8 Column for the separation of Amino Acids.

을 使用하였고 threonine의 定量에는 *Streptococcus faecalis* R를 使用하였다. Basal medium은 lysine 用으로서는 田村 medium⁽¹¹⁾을 使用하였고 threonine 用으로는 steel의 bacto assay medium⁽¹²⁾ (difco medium 10g을 生理食鹽水 90ml에 녹여 2分間 가열한 후 100ml로 한 것)을 使用하여 micro-bioassay 法⁽¹⁰⁾으로 定量하였다.

結果 및 考察

A. 體重增加

1) 飼料攝取量: 各群別 白痢를 各級試驗飼料로써 15日間 飼育하였을 때의 群別白痢의 攝取飼料量을 table 6과 같이 積계 取한 Sth群은 平均約 120g이며 많이 취한 Str群은 平均約 170g으로서 每日 平均 8g~11g 정도의 飼料를 먹었다.

Table 6 Quantities of Intake Diet on Rats (g/15-days)

Group	No. of rats						ave.
	1	2	3	4	5	6	
Sm	143	105	125	147	126	149	150
Sth	127	127	115	134	124	110	123
Str	180	189	156	171	168	165	172

2) Growth Gain and Weight Gain: 體重增加는 Fig. 2에 나타났음과 같이 0.3% DL-methionine을

가한 Sm 飼料로 飼育하였을때 보다 이것에 0.36% DL-threonine 을 添加하여 飼育한 白쥐群의 體重增加率이 오히려 좋지 못하였으며 모두 試驗末期부터는 發育이

아주 나빠졌다. 그러나 이 飼料(Sth)에 0.1% L-tryptophane 을 加한 飼料(Str)로 사육한 白쥐群은 그 成長率이 大端히 좋았다.

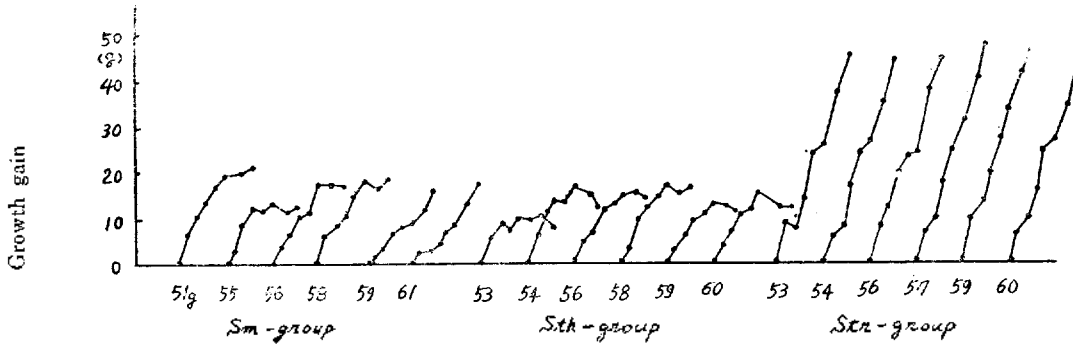


Fig. 2. The Comparison of Growth Gain of Rats (g/15-days)

그 growth gain 과 weight gain 을 Fig.3 과 같이 나타낸다.

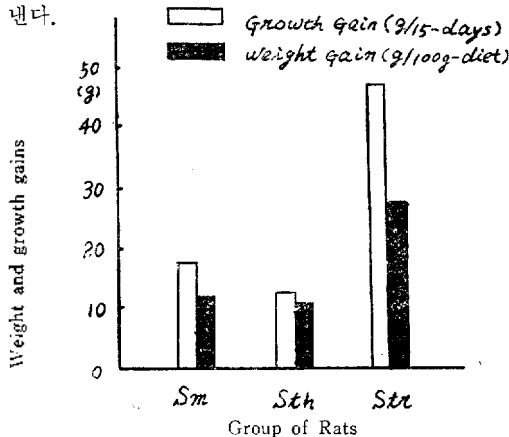


Fig. 3. Growth Gain and Weight Gain of Rats(g/15-days)

B. 標準曲線

Leuconostoc mesenteroides P-60, *streptococcus faecalis* R 의 乳酸菌으로 lysine 과 threonine 을 定量한 것에 대한 standard curve 를 Fig. 4 와 같이 作成하였다.

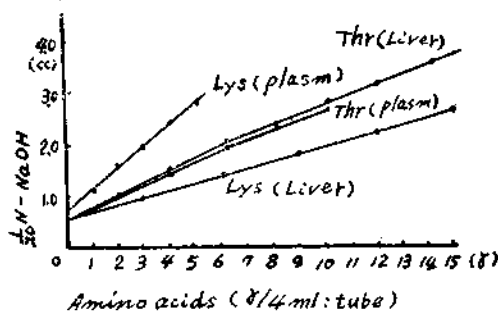


Fig. 4. Dose-response for standard Amino Acids with *Leuc. mesenteroides* P-60 and *Str. faecalis* R (72hr)

C. 遊離 Lysine 및 Threonine 의 含量

各級飼料로 15日間 사육한 白쥐에서 얻은 資料의 得量은 大體로 體重의 범위는 62g~100g 정도였으며 採血量은 한마리당 1.5ml~2.0ml 로써 plasm 의 分離量은 0.7ml~1.0ml 정도였다. 採肝量은 3.2g~7.2g 이었다. 이들 白쥐의 plasm 및 liver 중의 free lysine 과 threonine 의 含量을 micro-bioassay 法으로 定量하여 얻은 값은 table 7 과 같다.

Table 7 The Free Lysine and Threonine contents in Plasm and Liver of Rats(mg/100g)

Group	Lysine		Threonine	
	Plasm	Liver	Plasm	Liver
Sm	7.2	13.4	2.1	7.3
Sth	7.6	14.3	3.3	12.5
Str	6.3	12.0	9.4	22.8

0.36% DL-threonine 添加로 인하여 plasm 및 liver 중의 free lysine 및 threonine 의 含量은 增加되었으나 0.1% L-tryptophane 添加로는 plasm 나 liver 중의 free lysine 은 오히려 減少되었다. 그리고 free threonine 은 plasm 이나 liver 중에서 急增 되었다. 그리고 plasm 이나 liver 중의 이들의 free lysine 이나 threonine 의 含量의 增減의 傾向은 거의 같은 傾向으로 變異됨을 볼 수 있었다. 그 結果를 Fig. 5 에 나타낸다.

結 論

0.3% DL-methionine, 0.36% DL-threonine 및 0.1%

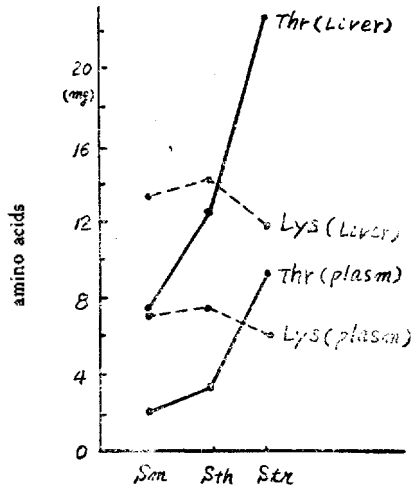


Fig. 5. The Contents of Free Amino Acids in Plasm and Liver of Rats (mg/100g)

L-tryptophane 을 添加한 砂糖飼料로 15日間 白쥐를 飼育하였을 때의 體重增加와 plasm 및 liver 中の free lysine 및 threonine 의 含量과의 關係를 micro-bioassay 法에 의하여 定量的 結果는 다음과 같은 結論을 얻었다.

1) 白쥐의 growth gain 과 weight gain 은 0.3% DL-methionine 飼料로 飼育하였을 때 보다 0.36% DL-threonine 을 添加하였을 때는 오히려 그들 gain 이 減少되어 졌다. 그러나 0.1% L-tryptophane 添加로 그들 gain 은 增加되어 졌었다.

2) 0.3% DL-methionine 飼料에 0.36% DL-threonine 을 添加한 飼料群은 plasm 및 liver 中の free lysine 과 threonine 의 含量은 增加되었으나 0.1% L-tryptophane 을 添加한 飼料群의 free threonine 의 含量은 急增되었

고 free lysine 의 含量은 오히려 減少되었다.

3) Liver 나 plasm 中の free lysine 의 含量이 적고 threonine 의 含量이 큰 比率의 關係에 놓였을때 가장 白쥐의 體重增加가 컸었다.

끝으로 本實驗은 日本國立榮養研究所에서 實驗하였음을 밝혀둔다.

參 考 文 獻

- 1) L. J. Pecora, J. M. Hundley: *J. Nutrition*, **44**, 101 (1954).
- 2) B. Sure: *J. Agr. Food. Chem.*, **2**, 111 (1954).
- 3) M. C. Kik: *J. Agr. Food Chem.*, **4**, 170 (1956).
- 4) C. A. Flvehjem et al: *J. Nutrition*, **62**, 503 (1957).
- 5) H. R. Rosenberg: *Arch. Biochem. Biophys.*, **37**, 461 (1952).
- 6) H. R. Rosenberg et al: *J. Nutrition*, **49**, 263 (1953).
- 7) H. R. Rosenberg, R. Cahle: *J. Nutrition*, **63**, 477 (1957).
- 8) A. E. Harper: *J. Nutrition*, **68**, 405 (1958).
- 9) 波多野, 小澤, 雁野: 蛋白質核酸酵素 Vol. 8, No. 1, 36 (1957).
- 10) 李鉉琪: 大韓化學會誌 Vol. 9, No. 4, 201 (1965).
- 11) Tamura, Tunota, et al: *J. Agr. Chem. Soc. of Japan*, **26**, 464 (1952).
- 12) Steel, Sauberlich, Reynolds and Baumann: *J. Biol. Chem.* **177**, 533 (1949).
- 13) 村田, 宮川, 松川, 池畑, 白砂, 剛照: 榮養と食糧, **11**, 115 (1958).
- 14) 小林, 炭田: 榮養と食糧 **12**, 381 (1960).