

白米와 蕎麥粉 混食의 營養價改善에 對한 研究(2)

— 白米와 蕎麥粉의 混合飼料로 飼育한 흰쥐의 Growth Gain과
血漿 및 肝臟中の 遊離아미노酸 Level에 對하여 —

李 鉉 琪 · 李 淑 熙 · 全 英 洙

釜山大學校 文理科大學 家政學科

Improving the Nutritional Value of Mixed Diet of Rice and Buckwheat(2)

— Growth Gain and the Level of Free Amino Acids in Plasma and
Liver of Rats Fed on Rice Diet Adding Buckwheat —

Hyun-Ki Lee · Sook-Hee Rhee · Young-Soo Jun

Department of Home Economics, Busan National University

Abstract

Wistar strain male rats were divided into four different diet groups and the control group was fed on 7-percent casein diet (C), the second with a mixture of 80% of rice and 20% of buckwheat (RW), the third with rice only (R), and the fourth with a mixture of rice and buckwheat of equal nitrogen level (RWS).

Each diet group consisted of 6 rats was fed for three weeks by the ad libitum feeding method. The results of the experiment, i. e., the growth gain and change in the level of free amino acids in the plasma and liver determined by the micro-bioassay method were as follows.

1. The group C showed the largest growth gain and the rest did in the order of RW group, R group, and RWS group.
2. Rats fed on diet of high protein score showed high level of free amino acids tryptophan, lysine, and threonine in the plasma and liver except for the case of lysine in the liver.
3. Protein score would be estimated by the level of free amino acids in the liver and plasma.

序 論

Denton¹⁾ 등에 의하면 血液 中에서 增加하는 아미노酸的 量은 攝取蛋白質에서 供給된 아미노酸 量에 比例하고, 그 pattern의 變化는 攝取 아미노酸 pattern에 많은 影響을 받는다는 發表가 있었고, Long necker²⁾에 의하면 增加하는 血漿 遊離아미노酸(PFAA)의 量은 攝取 蛋白質의 아미노酸 組成에 比例한다고 發表하였고, White head³⁾等 또는 Holt⁴⁾等에 依하면 低蛋白 營養時의 小兒의 PFAA의 變動은 必須아미노酸(EAA)의 현저한 低下, 그 中 특히 valine, leucine, isoleu-

cine, methionine 등의 低下가 심하며, Kirsch⁵⁾ 등에 의해서도 흰쥐에 있어서 거의 같은 傾向이 나타난다고 報告되어 있다.

李⁶⁾는 雜穀混食과 粉食의 chemical score 改善方法에 對하여 微生物定量法으로써 各各 그 EAA를 定量하여 chemical score를 算出하고 아미노酸 pattern similarity를 구하였다. 特히 쌀과 메밀가루를 混食 할 때는 20%의 메밀가루를 섞을 때가 chemical score를 가장 높힐 수 있다고 發表한 바 있으며, 또한 흰쥐 飼育實驗으로써 쌀에 20% 메밀가루를 섞었을때가 쌀 단독으로 먹었을 때 보다 더 成長率이 높음을 立證하여

그 결과를發表⁷⁾한 바 있으나, 금번 著者は 쌀에 메밀가루 20%를 섞은 飼料로서 흰쥐를 飼育하였을 때 그 growth gain의 우수함을 再確認하고 이에 血漿과 肝臟 中の FAA의 level의 變量을 보기 위하여 對照群으로 casein 7% 飼料群(C), 쌀 80%에 메밀가루 20%를 섞은 飼料群(RW), 쌀만의 飼料群(R), 쌀과 메밀가루의 질소 level을 같게한 飼料群(RWS)으로써 wistar系 흰쥐 숫놈 6마리씩을 1群으로 하여 飼育實驗을 하였고, FAA의 定量은 微生物定量法으로 定量하였으므로 그 결과를 報告한다.

實驗 方法

1. 飼育 實驗

体重 40~54g의 wistar系 흰쥐 숫놈 24마리를 4群으로 나누어 飼育鐵網箱子 속에 한마리씩 넣어 室內 온도 대략 24°C 條件하에서 ad libitum-feeding method로 21日間 飼育하였다. 처음 2日間은 stock diet⁹⁾ (oriental 酵母 工業製)로써 飼育하였다. stock diet의 組成은 corn starch 38%, vitamin free casein 25%, α-小麥澱粉 10%, 粉末濾紙 8%, linolic sarada oil 6%, 無機鹽類 6%, granulated sugar 5%, 비타민類 2%로 하였다.

1) 飼育組成 各群의 實驗飼料 組成은 table 1과 같이 調製하였다.

Table 1. The composition of the experimental diet

Constituent	Casein group (C)	Rice group (R)	Rice 80%+ buckwheat 20% group(RW)	Nitrogen same levels group (RWS)
Starch	83	—	—	15
Casein	7	—	—	—
Rice	—	90	72	60
Buckwheat	—	—	18	15
Oil	5	5	5	5
Salt mixture*	4	4	4	4
Vitamin mixture**	0.85	0.85	0.85	0.85
Choline chloride	0.15	0.15	0.15	0.15
Total(%)	100.00	100.00	100.00	100.00

*Containing(mg/100g diet): CaCO₃, 29.29; CaHPO₄·2H₂O, 0.43; KH₂PO₄, 34.31; NaCl, 25.06; MgSO₄·7H₂O, 9.98; Fe(C₆H₅O₇)·6H₂O, 0.623; CuSO₄·5H₂O, 0.156; MnSO₄·H₂O, 0.121; ZnCl₂, 0.02; KI, 0.0005; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0.0025.

**Containing(mg/100g diet): α-tocopherol 100; Vitamin A 400.0 IU; Vitamin D 200.0 IU; Thiamin·HCl 0.5; Riboflavin 0.5; Nicotinic acid 2.5; Ca-Phanthothenate 2.0; Pyridoxine·HCl 0.25; Vitamin K 0.05; Biotin 0.01; Folic acid 0.02; Vitamin B₁₂ 0.002; Inositol 10.0; Ascorbic acid 5.0.

2. 遊離아미노酸의 定量

1) 血漿 및 肝臟의 試料處理

採血 Heparin sodium(mg/0.05ml)로 處理한 注射器로써 fasting 16hr 후의 흰쥐를 chloroform으로 마취시킨 후 心臟에서 直接採血하여 3,000 r. p. m, 15 min. 원심분리하여 血漿을 얻었다.

採肝 心臟에서 피를 뽑은 후 腹部를 갈라서 肝臟을 採取하였다.

2) 除蛋白

血漿의 除蛋白^{8,9)} 血漿과 uranyl acetate(1.55g/dl)

와 H₂O를 1:1:1의 容積比로 混合하여 잘 섞은 다음 원심분리(3,000 r. p. m, 15min.)하여 濾물을 除蛋白한 血漿으로써 얻어 -20°C에서 冷藏하면서 FAA의 定量에 使用하였다.

肝臟除蛋白 피크린酸에 의한 除蛋白法¹⁰⁾에 의하여 試料를 調製하였다. 즉 各群別로 6g의 肝을 分取하여 바로 갈아서 1%-피크린酸 100cc와 混合한 후 원심분리(3,000 r. p. m, 15min.)하여, 濾물을 별도로 준비한 column(樹脂: Dowex 1-X8Cl)을 N HCl로 처리한 것)으로 濾過하여 pH 6.8(B. T. B)로 調節한 후 100cc

로 定容하여 微生物定量法으로 定量할 肝臟의 試料로 示하였었다. 이들 血漿과 肝臟의 試料處理를 要約하여 Fig. 1

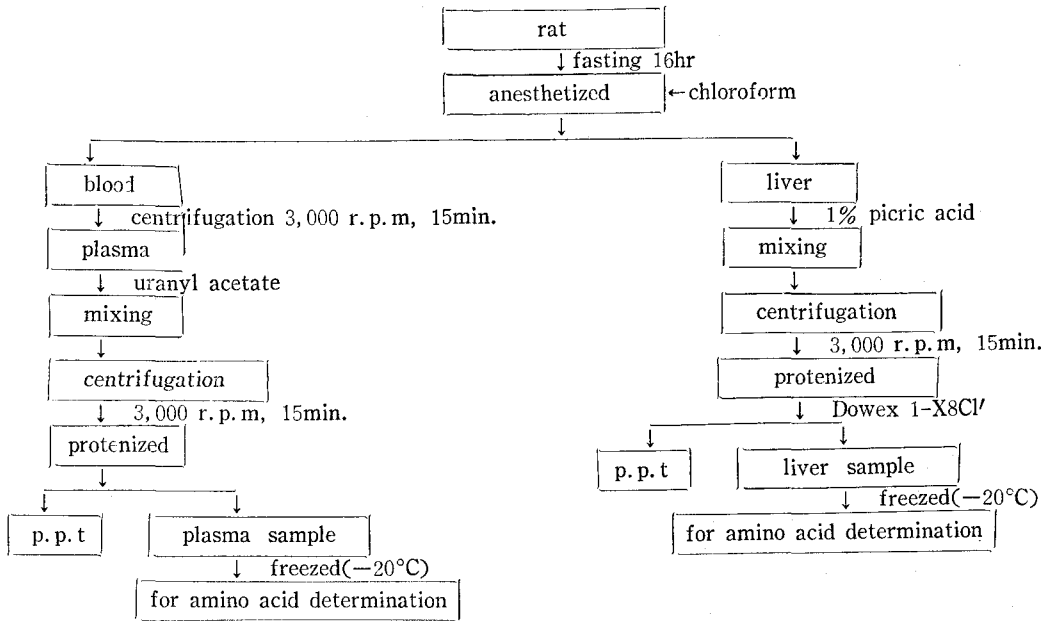


Fig. 1. Sampling of plasma and liver

定量 方法

Lacto bacillus arabinosus 17-5(for Try)과 *Leuconostoc mesenteroides* p-60(for Lys), *Streptococcus faecalis R*(for Thr)의 발육에 필요한 비타민, 아미노酸, 鹽類, 포도당 등의 營養成分을 全部 含有하고 있는 完全 合成培地에서 定量코저 하는 目的 아미노酸 만을 除去한 basal medium을 各各 만들어 이 basal medium 2cc를 內經 15mm의 시험관에 分注하고 Lys과 Thr, Try의 standard를 各各 段階의 量으로 並列 2例의 시험관에 添滴하고 調製한 試料를 다른 4列의 시험관에 段階的 量으로 分注하고 각 시험관에 H₂O를 添加하여 總液量이 4cc씩 되도록하여 120°C 1kg/cm²에서 10分間 加壓 滅菌하였다.

接種菌은 미리 遠心分離用 15ml 시험관에 5cc의 培養培地로서 32°C에서 24時間 培養하여 無菌의으로 殺菌生理食鹽水로써 菌體를 懸濁한 후 다시 원심분리하여 菌體를 이와 같이 反復 洗滌하였다. 이것을 殺菌生理食鹽水로 懸濁하여 heavy inoculum로 하여 各 시험관에 2방울씩 接種하였다.

接種後 32°C에서 72hr 부랑기 안에서 培養하였다. 培養이 끝난 것은 5分間 煮沸하여 이것을 micro-auto-

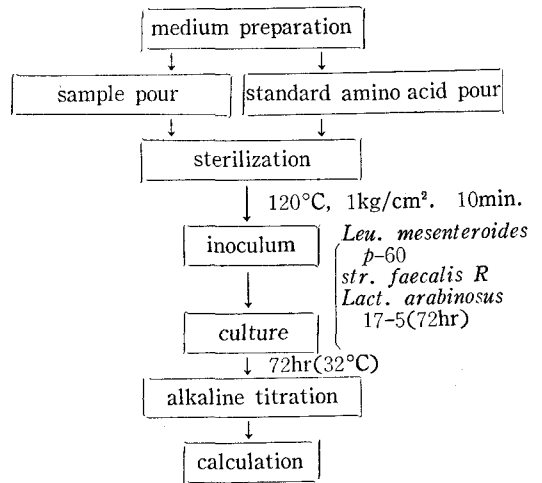


Fig. 2. Determination of amino acids by microbioassay

matic biuret로서 菌의 response를 菌이 生成한 젖酸의 量을 Try는 1/10N NaOH로 Lys과 Thr은 1/20N NaOH로써 滴定하였다. 이때 指示藥으로서는 0.2% brom thymol blue와 0.2% neutral red의 混合指示藥을 使用하였다. 從軸에 response, 橫軸에 아미노酸 量을 取하여 dose-response를 만들었다. 또한 檢液의 滴定值

를 dose-response 상에 代入하여 FAA의 含有量을 算出하였다. 그 定量順序를 要約하면 Fig. 2와 같다.

1) Basal Medium의 調製方法

Steel의 bacto assay medium¹¹⁾ (Recommended for the micro-biological assay of threonine using *streptococcus faecalis R*)와 田村學造 medium¹²⁾法을 使用하였다. 그 組成 및 調製方法을 table 2에 나타내며 또한 Lactobacillus의 medium uniform의 方法을 table 3에 나타낸다.

Table 2. The composition of basal medium uniform

Component	Amount
Amino acids	mg/L
DL-alanine	200
DL-asparatic acid	400
L-arginine·HCl	200
L-cystine	100
L-glutamic acid	500
glycine	100
L-histidine	100
DL-isoleucine	200
L-leucine	100
L-lysine	200
DL-methionine	200
DL-phenylalanine	200
L-proline	100
DL-serine	100
DL-threonine	200
DL-tryptophane	100
L-tyrosine	100
DL-valine	200
Base	mg/L
adenine·SO ₄	10
guanine·HCl	10
uracil	10
xanthine	10
glucose(8/L)	20
Salts	g/L
	(a) (b)
Na-acetate	20 1
Na-citrate	— 20
NH ₄ Cl	3 3

Salt A	mg/L	
KH ₂ PO ₄	500	—
K ₂ HPO ₄	500	5000
Salt B	mg/L	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200	800
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10	40
MnSO ₄ ·4H ₂ O	10	160
NaCl	10	40
Vitamins	γ/L	
thiamine·HCl	1000	
ribofravin	1000	
pyridoxine	1000	
pyridoxal	200	
Ca-pantothenate	1000	
nicotinic acid	1000	
P-amino benzoic acid	200	
biotin	10	
folic acid	10	

adjust to pH 6.8

(a) for *Lact. arabinosus* and *Leuc. mesenteroides*

(b) for str. faecalis

Table 3. The composition of medium uniform for Lactobacillus

Component	Lactobacillus		
	L. m. P-60	L. a. 17-5	S. f. R
yeast extract(g)	5.0	5.0	5.0
pepton(g)	5.0	5.0	5.0
glucose(g)	5.0	5.0	5.0
sodium acetate(g)	5.0	5.0	—
saltA(cc)*	5.0	5.0	—
saltB(cc)*	5.0	5.0	—
vitamin mix. (cc)	5.0	5.0	—
K ₂ HPO ₄ (g)	—	—	1.0
liver extract(g)	—	—	5.0
sodium citrate(g)	—	—	3.0
single salt(cc)	—	—	2.5

Make to 500cc(pH 6.8) after add.

Agar-agar 1~3%

*Salt A and salt B method were shown as in Table 2.

實驗結果 및 考察

白米와 메밀飼料로써 흰쥐를 飼育하였을 때의 growth

gain과 血漿과 肝臟 中の 遊離 Try Lys Thr 含有量을 微生物定量法으로 定量한 結果는 아래와 같다.

1) 体重增加

各群別 흰쥐를 各級試驗飼料로써 21日間 飼育한 結

果를 table 4에 나타내었다. 各 마릿당 攝取한 飼料의 範圍는 185.5~221g로써 하루 平均 9.2~11.5g을 攝取 하였었다.

Table 4. Quantities of in take diet on rats

Diet group	1	2	3	4	5	6	av.
C-group	202.6	190.2	200.9	258.1	230.7	243.5	221
RW-group	233.5	196	221.3	252.3	175.1	241	219.9
R-group	176.5	227.5	251	191	216.5	224	214.4
RWS-group	182.8	180.1	177.3	195.9	157	219.7	185.5

이들의 群別 發育狀態를 Fig.3에 나타낸다.

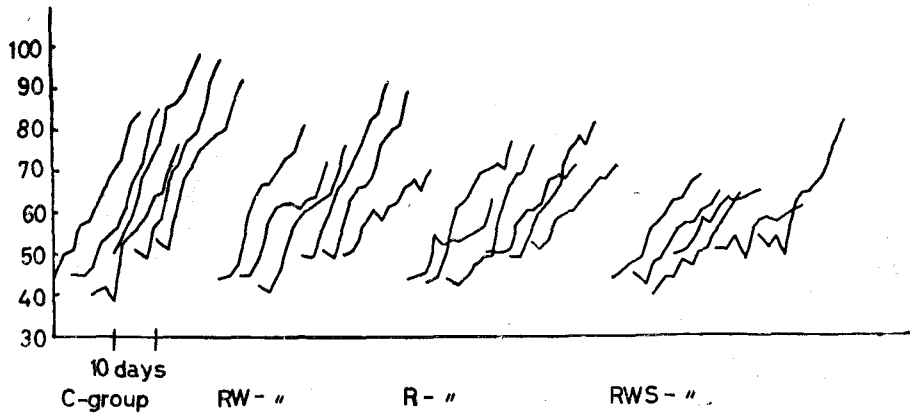


Fig. 3. The composition of growth body weight of rats(g/21 days)

growth gain과 weight gain: Fig.3에서 나타낸 것과 같이 casein 7% diet를 사용한 對照群이 가장 좋았었고 그 다음은 쌀 80%에 메밀가루 20%를 섞은 飼料群(RW), 쌀만의 飼料群(R), 쌀과 메밀가루의 질소level을 같게한 飼料群(RWS)의 順位였다.

各 群의 平均 發育狀態를 좀 더 明確하게 나타내기 위하여 Fig.4로 나타내었다.

Fig.4에서 나타낸 것과 같이 對照群의 發育狀態가 가장 좋으며, 그 다음은 쌀 單獨으로 먹었을 때 보다 쌀 80%에 메밀가루 20%를 섞어 먹었을 때가 成長率이 더 좋았으며, 쌀과 메밀의 질소 level을 같게한 飼料 때 보다도 더 좋았었고, 成長率이 가장 낮은 群은 쌀과 메밀의 질소 level을 같게 한 群이였었다. 이때의 growth gain과 weight gain值를 table 5에 나타낸다.

2) 標準曲線

Lacto bacillus arabinosus 17-5로써 tryptopan을 定量하고 *Str. faecalis* R로 threonine을 定量하고 *Leuc- qnostoc mesenteroides* p-60으로 lysine을 定量한 값의

Standard curve를 Fig.5와 같이 作成하였다.

3) 遊離 Try, Lys, Thr의 含量

백쥐의 血漿 및 肝臟 中の 遊離아미노酸의 含有量을 table 6에 나타낸다.

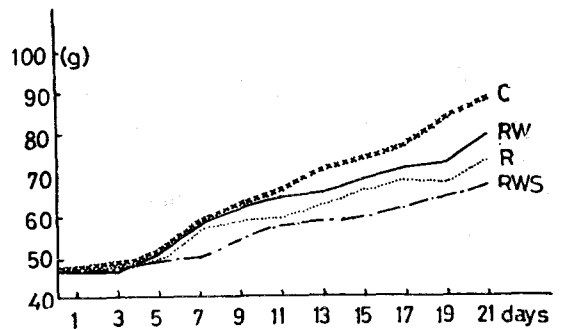


Fig. 4. The averages composition of growth gain of rats(g/days)

Table 5. Growth gain and weight gain of rats(g or%/21 days)

	C-Group		RWS-Group		R-Group		RW-Group	
	av.	s.e***	av.	s.e	av.	s.e	av.	s.e
*Growth gain(g)	41.33±1.91		32.83±3.23		26.00±3.02		20.00±2.72	
Growth gain(%)	187.73±3.62		170.23±7.04		155.65±7.40		142.45±6.49	
**Weight gain(%)	18.81±0.78		14.73±0.50		11.20±1.32		10.53±1.29	

* Growthgain: (Increased body weight/21days)
 ** Weightgain: (Increased body weight/100g diet)
 ***s. e: standard error

Table 6. Contents of free amino acids in plasma and liver of rats(mg/100. mg/100ml)

Group of rats	Try		Lys		Thr	
	Plasma	Liver	Plasma	Liver	Plasma	Liver
C	2.255	3.412	8.240	34.973	4.870	33.888
RW	1.818	4.050	5.352	37.334	1.890	31.945
R	1.362	3.483	2.984	40.800	2.400	32.000
RWS	0.823	3.788	4.187	27.733	2.571	26.220

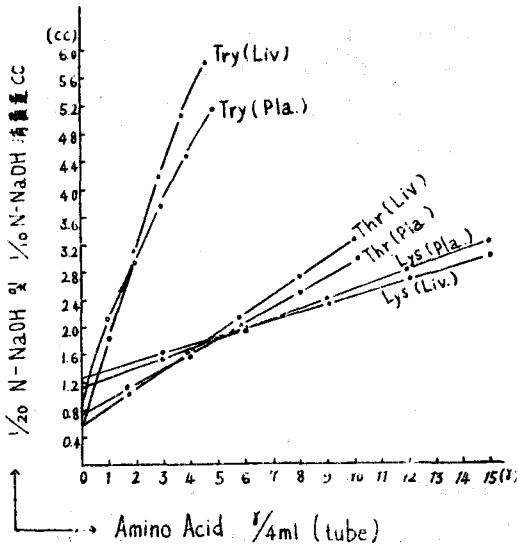


Fig. 5 Dose-response for standard amino acid with *Leue. mesenteroides* p-60, *Str. faeçalis* R, *Lact. Arabinosus* 17-5(72hr)

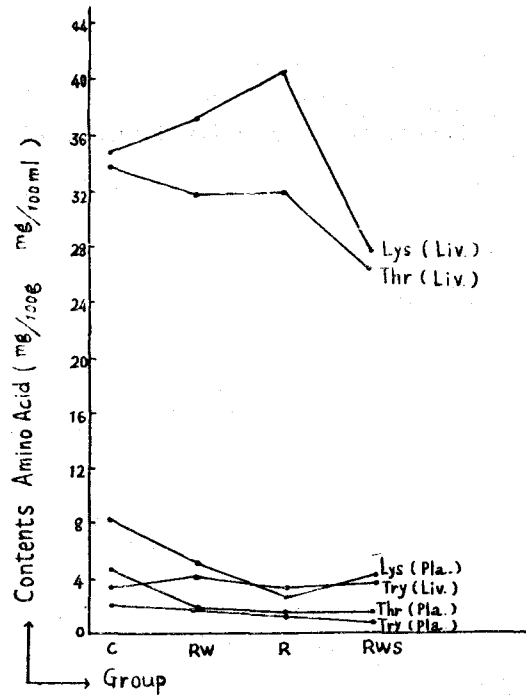


Fig. 6. Contents of free amino acids in plasma and liver of rats(mg/100. ml/100ml)

Fig. 6에서 나타낸 것과 같이 肝臟 中の 遊離 Lys Thr은 4群 모두 100g 當 그 含有量이 25~40mg 정도로서 그 含量이 높음을 볼 수 있었으나, 肝臟 中の 遊離 tryptopan은 겨우 4mg/100g 정도이었고, 血漿에 있어서는 2~8mg/100ml로써 C.R.W. R.WS群 全体를 통하여 含有濃度가 낮음을 볼 수 있었다. 특히 血漿 中の 遊離 Try Lys Thr은 4群飼料 모두 거의 같은 傾向을 볼 수 있었으며, R group에 있어서는 가장 낮은 結果를 나타낸 것은 매우 興味로운 것으로 看做된다. 이와 같은 傾向은 1953年 Denton이 血液中에서 增加하는 아미노酸 量은 攝取蛋白質에서 供給된 아미노酸 量에 比例하고 그 pattern의 變化는 攝取 아미노酸 pattern에 많은 影響을 받는다는 發表와 1964年 white head等과 1965年 Holt等이 發表하고 있는 바와 같이 低蛋白質에 血漿 中の 遊離 Lys Thr등이 減少되어 진다는 結果와 거의 같은 傾向을 나타내고 또한 4群 모두 肝臟에서나 血漿에서나 다 같이 Lys>Thr>Try의 含有傾向을 나타낼 수 있었다.

結 論

wistar系 흰쥐 飼料를 casein 7% 飼料群(C), 白米 80%에 메밀가루 20%를 加한 飼料群(RW), 白米만의 飼料群(R), 白米와 메밀가루의 窒素 level을 같게한 飼料群(RWS)으로 하여 各群 6마리씩을 ad libitum feeding method로 3週間 飼育하였을 때의 growth gain과 血漿와 肝臟 中の 遊離 아미노酸의 level의 變量을 微生物定量法으로 定量한 結果는 다음과 같은 結論을 얻을 수 있었다.

① growth gain은 C群이 가장 높고 RW群, R群, RWS群의 順으로 높았다.

② Protein score가 높은 飼料로 飼育된 흰쥐의 血漿과 肝臟 中の FAA, Try Lys Thr의 level은 높은 傾向을 나타낼 수 있었다. 그러나 肝臟 中の lysine

에 있어서는 반드시 그렇다고 할 수 없었다.

③ 따라서 肝臟과 血漿 中の FAA의 含有 level로써 蛋白質營養狀態를 推定할 수 있음을 알 수 있었다.

끝으로 本實驗은 1972年度 文教部 研究 助成費에 依하여 研究된 것임을 밝혀줌과 同時에 當局과 또한 本原稿整理에 많은 수고를 하여준 本大學 盧基淑嬢에게 感謝의 뜻을 表한다.

References

- 1) Denton, A. E., S. N. Gershoff and C. A. Elvebjen: J. Biol. Chem., **204**, 731(1953)
- 2) Long necker: Arch Biochem. Biophys., **84**, 46 (1959)
- 3) White head: R.G. and Dean, R.F.: Am. J. clin. Nutr., **14**, 320(1964)
- 4) Holt, L.E. and Synderman, S.E.: Nutr. Abst. Rev., **35**, 1(1965)
- 5) Kirsch, R.E. Brock, J.F. and Saunders, S.J.: Am. J. Clin. Nutr., **21**, 820(1968)
- 6) 李鉉琪: 日本營養と食糧 第23卷 第2號 66~71. (1970)
- 7) 李鉉琪: 韓國營養食糧學會 第1卷 第1號 1~4p. (1972)
- 8) Harper, A.E.: J. Nut., **68**, 405(1958)
- 9) Bjönesjö, K.B., Beleww, M. and Zarr, B.: Scand. J. Clin. Lab. Invest., **18**, 591(1966)
- 10) 波多野・小澤・雁野: 蛋白質核酸酵素 **8**, 36 (1967)
- 11) Stel, Sauberlich, Reynolds and Bauman: J. Biol. Chem., **177**, 533(1949)
- 12) Tamura, Tunota et al: J. Agr. Chem. Soc. of Japan., **26**, 464(1952)