

飼料添加劑中 Niacin의 微生物學的定量法과 化學的定量法の 比較試驗

趙 鍾 厚 · 黃 大 羽

(家畜衛生研究所)

韓 壽 南

서울大學校 農科大學 獸醫學科

(1974년 3월 8일 수리)

Comparative Studies on Microbioassay and Chemical Procedure for Quantitative Determination of Niacin in Feed Additives

Jong Hoo Cho, D.V.M., M.S. and Dae Woo Hwang, D.V.

(Institute of Veterinary Research, Office of Rural Development.)

Suu Nam Han, D.V.M., P.D.

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Seoul National University.

(Received March 8, 1974)

Summary

Mohan's aniline procedure for the quantitative determination of niacin in feed additives containing various vitamins and minerals was compared with microbiological procedure utilizing growth rate of *Lactobacillus arabinosus* 17-5. Microbioassay was more sensitive than chemical procedure to the detection of standard niacin and was applicable to the determination of minute amounts of niacin, while both microbioassay and chemical procedure were discovered to be unsatisfactory by the recovery test for the determination of niacin in feed additives containing much interfering substances. But the possibility of the determination of niacin in feed additives on chemical procedure together with microbioassay was proved.

緒 論

Niacin의 定量法으로는 乳酸菌의 發育을 利用하는 微生物學的 定量法과 芳香族 amine類와 反應하여 生成되는 色素의 濃度를 測定하는 化學的 定量法이 많이 利用되고 있다. 이 중에서 微生物學的 定量法은 感度가 銳敏하여 微量의 niacin定량을 爲해서 現在 가장 많이 活用되고 있는 方法이나 生物組織 또는 各種榮養素와 vitamin類를 含有하는 飼料添加劑中の niacine測定에는 이들 중에 存

在하는 細菌의 成長을 促進하거나 또는 抑制하는 物質에 依하여 誤差를 誘發할 수 있으며¹⁵⁾ 定量에 많은 時間을 必要로하는 短點이었다. 化學定量法은 微生物學的 定量法보다. 感度가 낮으며¹⁵⁾ 또한 生物組織이나 飼料添加劑中 niacin의 抽出時에 生成되는 混合色素에 依하여 niacin의 比色을 妨害하는 短點이 있으며⁵⁾ 反面에 많은 時間이 節約되는 利點 때문에 化學的定量法에 對한 많은 研究가 報告되었다. Niacin의 發色을 爲한 芳香族 amine類로서는 Melnick^{9,10,11)}에 依하여 aniline, Harris 및 Raymond⁶⁾와 Kodicek⁷⁾에 依하여 p-aminoacetop

henone, Bandier 및 Hald¹¹⁾에 의하여 p-methylaminophenol (metol, Photal)을 利用할 수 있음을 報告하였고 Melnick^{9,10,11)}와 Noll 및 Jensen¹³⁾은 aniline法 Harris 및 Raymond⁶⁾와 Kodicek^{7,8)}는 p-aminoacetophenone法, Bandier^{2,3)}와 Dann 및 Handier⁴⁾은 p-methylaminophenol法을 適用하여 各己 植物體, 動物組織, 血液, 尿, 및 飼料中の niacin을 定量할 수 있음을 報告하였다. 어떠한 化學的定量法이라도 抽出中에 生成되는 간섭 色素에 依한 妨害가 誤差를 가져오는 가장 큰 原因이며 아직도 간섭 色素의 除去가 가장 큰 難點으로 되어 있다. Mohan等¹²⁾은 aniline法을 適用하여 niacin의 定量을 妨害하는 各種 vitamin類와 無機物을

多量 含有하는 닭의 飼料添加劑中에서 niacine을 抽出 定量할 수 있음을 報告하였다. 著者는 Mohan等이 報告한 aniline法을 適用하여 國內에서 生産되는 各種 vitamin類와 無機物을 主成分으로한 飼料添加劑中 niacin의 定量可能性을 檢討하고 現在 가장 많이 利用되고 있는 *Lactobacillus arabinosus*의 發育을 利用하는 Snell 및 Wright¹⁴⁾의 微生物學的 定量法과 比較하여 그 成績을 報告하는 바이다.

材料 및 方法

供試飼料添加劑: 賦形劑로서 밀기울을 使用한 飼料添加劑로서 그 成分은 Table 1과 같다.

Table 1. Chemical composition of feed additives (Per Kg)

Vitamin A	1,500,000 I.U.	Choline Chloride	60,000 mg
Vitamin D ₃	300,000 I.U.	Iron(Fe)	3,000 mg
Vitamin E	500 I.U.	Manganese (Mn)	12,000 mg
Vitamin K ₃	330 mg	Copper (Cu).....	600 mg
Vitamin B ₂	800 mg	Iodine (I ₂).....	180 mg
Vitamin B ₆	260 mg	Zinc (Zn).....	7,800 mg
Vitamin B ₁₂	1,250 mg	Cobalt (Co)	180 mg
Vitamin C	1,000 mg	Calcium Sulfate (CaSO ₄)	7,200 mg
Lysine	6,000 mg	U.G.F.	10,000 mg
Ca-Pantothenate	1,000 mg	B.H.T.	23,000 mg

Niacin의 添加·供試飼料添加劑를 1kg式 4區分하여 標準 niacin을 1群에는 100mg, 2群에는 150mg, 3群에는 200mg, 4群에는 400mg을 各各 添加하고 均等히 配合하여 各群에 對하여 化學的定量法과 微生物學的定量法으로 niacin을 定量하여 回收率을 求하였다.

Niacin의 化學的定量: Mohan¹²⁾의 aniline法을 適用하였고 比色은 Junior-Coleman Spectrophotometer(Model, 6A)를 利用하여 波長 420m μ 에서 吸光度를 測定하여 計算하였다.

Niacin의 微生物學的定量: 菌株로서 *Lactobacillus arabinosus* 17-5를 利用한 Snell 및 Wright¹⁴⁾의 方法을 基礎로 하여 比濁法에 依하여 定量하였다¹⁵⁾ 即 試料에 N-H₂SO₄를 加하여 niacin을 抽出한 後 pH 4.5로 調節, 濾過하여 蛋白沈澱物과 不純物을 除去하고 pH 6.8로 調節한 試驗液을 一定量式 取하여 niacin 定量用基礎培地를 同量 加한다음 滅菌後 菌液을 接種하고 37°C에서 18~24時間 培養하여 Junior-Coleman Spectrophotometer로 420m μ 에서 透過率을 測定, 定量하였다.

結 果

Niacin의 化學的定量: 鹽酸 aniline에 依한 niacin의 測定感度を 調査하기 爲하여 標準 niacin의 各濃度別 吸光度를 測定한 結果 Fig. 1과 같으며 1~10 μ g의 測定範圍가 가장 適合하였다. 鹽酸 aniline에 依한 發色度의 安定性을 調査한 結果 Fig. 2와 같으며 鹽酸aniline을 添加後 1分에 最高에 達하여 1分30秒동안 維持되었으며 2分 30秒後에는 徐徐히 退色하였다. niacin을 添加한 各群에 對한 niacin의 回收率은 Table 2.와 같으며 飼料添加劑中 niacin의 含量이 많을수록 回收率이 正確하였으며 平均 115.56%의 回收率을 보였다.

Niacin의 微生物學的定量: *Lactobacillus arabinosus* 17-5를 利用한 niacin의 測定感度を 調査하기 爲하여 標準 niacin의 濃度別 發育曲線을 透過率 測定에 依하여 作成한 結果는 Fig. 3.와 같으며 0~0.4 μ g의 測定範圍가 가장 適合하였다. niacin을 添加한 各群에 對한 niacin의 回收率은 Table 3.와

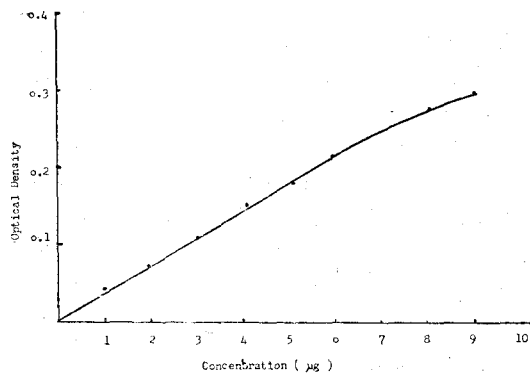


Fig. 1. Standard curve of niacin by chemical procedure

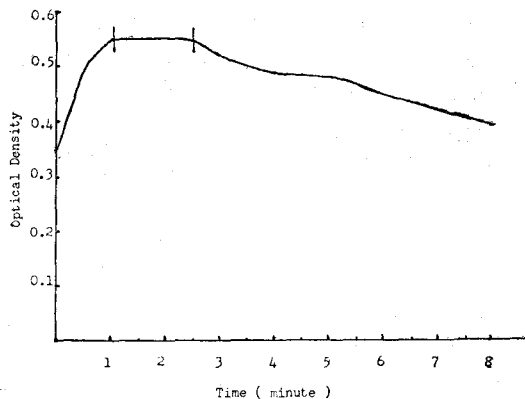


Fig. 2. Stability of yellow color formed with aniline chloride

Table 2. Recovery of niacin concentration by chemical procedure

Groups	Duplication	Concentration of Niacin (mg/kg)	Conc. of Niacin by Chem. Proc.	Recovery of Niacin (%)	Average
1	A	100	125.00	125.00	123.61
	B	100	122.22	122.22	
2	A	150	169.93	113.36	109.63
	B	150	158.86	105.90	
3	A	200	233.37	116.67	119.23
	B	200	244.40	122.22	
4	A	400	444.44	111.11	104.56
	B	400	432.08	108.02	
Average(%)					115.56

Table 3. Recovery of niacin concentration by microbioassay procedure

Groups	Duplication	Concentration of Niacin (mg/kg)	Conc. of Niacin by microbioassay (mg/kg)	Recovery (%)	Average (%)
1	A	100	130.0	130.00	125.65
	B	100	121.3	121.30	
2	A	150	172.75	115.16	115.41
	B	150	173.5	115.66	
3	A	200	230.0	115.00	115.13
	B	200	230.5	115.25	
4	A	400	463.2	115.80	113.93
	B	400	448.2	112.05	
Average(%)					117.65

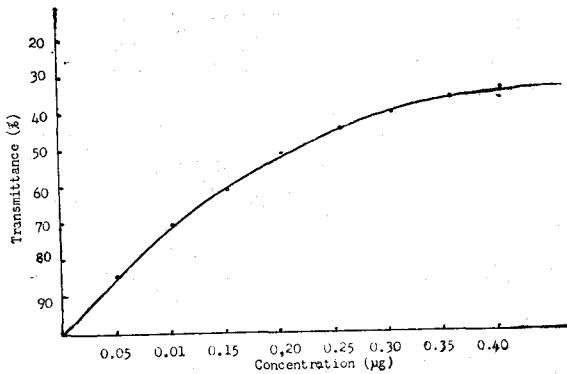


Fig. 3. Standard curve of niacin by microbio assay procedure

같으며, 회수율은 100mg 添加群을 除外하고는 niacin의 添加量에 關係없이 一定하였고 平均 회수율은 117.65%였다.

考 察

Aniline法에 의한 niacin의 測定感度は 微生物學의 定量法보다 낮았으며 이것은 Kodicek⁷⁾, Melnick^{9,10,11)} Mohan¹²⁾ 등의 成績과 대체로 一致하며 Bandier 및 Hald¹⁾가 報告한 化學的 定量感도보는 매우 낮았다. 鹽酸 aniline에 의한 niacin의 發色도는 鹽酸 aniline溶液添加後 1分後에 最高에 達하여 1分 30秒동안 維持하였으며 Mohan¹²⁾ 등이 報告한 成績과 一致하였고 正確한 比色을 爲해서는 正確한 時間에 迅速한 測定이 絶對로 必要하였다. *Lactobacillus arabinosus*에 의한 微生物學的 定量法의 測定感도는 매우 높았으며 Snell 및 Wright¹⁴⁾가 報告한 測定感도와 잘 一致한다. 微量의 niacin定량을 爲해서는 微生物學的 定量法이 化學的 定量法보다 確實히 優秀한것으로 생각된다.

化學的 定量法에 의한 飼料添加劑中 niacin의 抽出時에 生成되는 黃色 내지 暗色の 간섭色素은 niacin 定량의 가장 큰 妨害가 되었으며 niacin을 多量 添加한 群은 稀釋培率을 높일수 있으므로 稀釋度가 커짐에 따라 간섭 色素의 濃度도 低下하며 그러므로 niacin의 含量이 많을수록 誤差가 적어질 것이다. 이러한것은 100mg 添加群에서 회수율 123.61%로 誤差가 컸고 niacin의 添加量 增加함에 따라 誤差가 줄어서 400mg 添加群에서는 104.56%

로 100%의 회수율에 接近하는 試驗成績과 잘 一致한다. 全 試驗群의 平均 회수율은 115.56%로서 대체로 超過定量되는 誤差를 가져오고 있으며 그러나 市販되는 大部分의 飼料添加劑가 kg當約 5,000mg의 niacin을 含有하고 있으므로 實際로 應用時에는 稀釋度의 增加에 依하여 간섭色素의 妨害를 많이 줄일 수 있으며 比較的 正確한 結果를 얻을수 있으리라고 생각된다. 微生物學的 定量法에 의한 회수율은 全試驗群平均117.65%로 化學的 定量法과 같이 超過定量되는 誤差를 가져왔으며 niacin의 添加가 많을수록 회수율이 100%에 接近하는 傾向은 化學的 定量法과 同一하며 이러한 原因은 飼料添加劑中에 niacin과 同一한 性質을 갖는 niacin 以外の 物質이 存在하거나 또는 細菌의 發育을 促進하는 物質이 存在함을 暗示한다. 各種 vitamin類와 無機物을 多量 含有하는 飼料添加劑中에 存在하는 多量의 niacin의 定량을 爲해서는 化學的 定量法과 微生物學的 定量法 共히 滿足스럽지 못한것으로 보인다. 現在에 많이 活用되고 있는 微生物學的 定量法과 比較하면 操作上의 便宜와 時間의 節約을 가져 올수 있으며 niacin을 多量含有하는 飼料添加劑에 對해서는 充分히 活用할수있다고 생각된다. 化學的 定量法의 正確한 結果를 얻기 爲해서는 간섭色素에 依한 比色時의 誤差를 除去할수 있는 더 많은 研究의 必要性을 느낀다.

結 論

各種 vitamin類와 無機物을 多量 含有하는 飼料添加劑中 niacin을 定量하기 爲하여 Mohan의 aniline法에 의한 化學的 定量法과 *Lactobacillus arabinosus* 17-5를 利用한 微生物學的 定量法을 適用하여 比較試驗한 結果 微量의 niacin定량을 爲해서는 測定感도가 높은 微生物學的 定量法이 더 適合하였으며 niacin을 多量 含有하는 飼料添加劑中 niacin의 定량을 爲해서는 그 方法 共히 滿足스럽지 못하였으나 회수율이 비슷하였으므로 化學的 定量法의 活用在 充分히 可能하였다.

參 考 文 獻

1. Bandier, E. and Hald, J.:XXXII. A Colorimetric reaction for the quantitative estimation of nicotinic acid, *Biochem J.*, 1939, 33:264
2. Bandier, E.: CXXXVII. Quantitative estima-

- tion of nicotinic acid in biological material. *Biochem. J.*, 1939, **33**:1130
3. Bandier, E.: CCXXI. Quantitative estimation of nicotinic acid in urine. *Biochem. J.*, 1939, **33**:1787
 4. Dann, W.J. and Handier, P.: The quantitative estimation of nicotinic acid in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1941, **141**:201
 5. György, P.: *Vitamin Methods. Vol. I.* Academic press Inc., New York, 1950, p. 224
 6. Harris, L.J. and Raymond, W.D.: CCL. Assessment of the level of nutrition. A method for the estimation of nicotinic acid in urine. *Biochem. J.*, 1939, **33**:2037
 7. Kodicek, E.: Estimation of nicotinic acid in animal tissues, blood and certain foodstuffs. I. *Method. Biochem. J.*, 1940, **34**:712
 8. Kodicek, E.: Estimation of nicotinic acid in animal tissues, blood and certain foodstuffs. 2. Applications. *Biochem. J.*, 1940, **34**:724
 9. Melnick, D. and Field, H., Jr.: Determination of nicotinic acid in biological materials by means of photoelectric [colorimetry. *J. Biol. Chem.*, 1940, **134**:1
 10. Melnick, D. and Field, H., Jr.: Chemical determination of nicotinic acid. Inhibitory effect of cyanogen bronide upon the aniline-side reaction. *J. Biol. Chem.*, 1940, **135**:53
 11. Melnick, D.: Collaborative study of the applicability of microbiological and chemical methods to the determination of niacin in cereal products. *Cereal Chem.*, 1942, **19**:553
 12. Mohan, V.S., Reid, B.L. and Couch, J.R.: Niacin determination. Chemical method for estimation of niacin in poultry feeds and premixes. *Journ. Agr. and Food Chem.*, 1959, **7**:42
 13. Noll, C.I. and Jensen, O.G.: The chemical determination of nicotinic acid in milk and milk derivatives. *J. Biol. Chem.*, 1941, **141**:755