

白米飼料로 飼育한 흰쥐의 Plasma 및 Erythrocytes 中の Free Amino Acid Level에 對하여

金 聖 路 · 李 鉉 琪

釜山大學校 家政大學 食品營養學科

A Study on the Free Amino Acid Levels in the Plasma and Erythrocytes of Rats Fed by Rice Diet

Sung Ro Kim · Hyun Ki Lee

Dept. of Food and Nutrition, College of Home Economics, Busan National University.

Abstract

The variations of growth gain and the composition of free amino acid levels in plasma and erythrocytes of young rats(wistar strain ♂) were determined by microbioassay method, feeding diets of rice group and 7% casein group as a control for three weeks.

The results were as follows;

1. The growth gain of control diet group was higher than the rice diet group.
2. The contents of free tryptophan, lysine, and threonine levels in plasma and erythrocytes on rats of 7% casein group were higher than the rice group.
3. In the 7% casein diet group and the rice group, these free amino acids were included more in erythrocytes than in plasma.
4. Therefore, generally feeding by high protein score diet was included more Try, Lys, Thr in plasma and erythrocytes than feeding by low protein score diet. So the high and low of protein score was assumed by the contents of Try, Lys, Thr in plasma and erythrocytes on rats.

序 論

1953年 Denton¹⁾ 등에 의하면 血液 中에서 增加하는 아미노酸의 量은 섭취 아미노酸 pattern에 많은

影響을 받는다는 發表가 있었고, Long necker²⁾에 의하면 증가하는 血漿 遊離 아미노酸(PFAA)의 量은 攝取蛋白質의 아미노酸 組成에 비례한다고 發表하였으며, 1955年 Charkey³⁾는 成人을 2日間 絶食시킨

후의 아미노酸 level은 leucine과 valine은 增加되고, lysine, theronine, tryptophan, methionine, arginine은 減少한다는 報告가 있었으며, 1969年 Snyderman⁴⁾ 등은 低蛋白時에 있어서는 흰쥐의 plasma 중의 遊離 lysine의 level은 低下되고, 遊離 glycine level이 上昇되며, 高蛋白食餌에서는 遊離 proline, tyrosine, phenylalanine, methionine, branched amino acid(leucine, isoleucine, valine)의 level이 높아지며 glycine의 level이 低下된다고 報告되어 있다. 이와 같이 生體 內에서의 遊離 아미노酸이나 그 關聯物質의 含量狀態는 蛋白質의 營養狀態와 매우 밀접한 關聯性을 가진다.

금번 著者는 살의 蛋白質의 營養狀態를 檢討하기 위하여 wistar系 흰쥐 숫놈(♂) 12마리를 使用하여 rice 90% 飼料群(R)과, 對照群으로 7% casein 飼料群(C)의 2群으로 나누어 각각 21日間 飼育하여 各群의 成長狀況과 plasma 및 erythrocytes 중의 遊離 아미노酸 level을 microbioassay 法으로 定量한 그 結果를 報告한다.

實驗方法

1. 飼育實驗

體重 32~36g의 wistar系 흰쥐(♂) 12마리를 飼育鐵網箱子 속에 한 마리씩 넣어 처음 3日間은 stock diet로써 食性を 訓練調節시킨 후 1群當 6마리씩 2群으로 나누어 한 마리씩 鐵製飼育箱子에 넣어 ad-libitum method로 21日間 飼育하였다.

1) 飼料의 組成

Stock diet⁵⁾ (oriental製)의 組成은 corn starch

Table 1. Composition of experimental diets

constituent (%)	casein group(C)	rice group(R)
starch	83	—
casein	7	—
rice	—	90
bean oil	5	5
* salt mixture	4	4
** vitamin mixture	0.85	0.85
choline chloride	0.15	0.15
total	100.00	100.00

38%, vitamin free casein 25%, α-소맥전분 10%, 粉末濾紙 8%, linolic acid oil 6%, 無機鹽類 6%, granulated sugar 5%, vitamin類 2% 등의 混合飼料를 使用하였으며 實驗飼料의 組成成分은 Table 1과 같이 調製하여 使用하였다.

* Containing of salt mixture were as follows (mg/100g diet)

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

** Containing of vitamin mixture were as follows (mg or I.U./100g diet)

α-tocopherol	10.0 mg
vitamin A	400.0 I.U.
vitamin D	200.0 I.U.
thiamine · HCl	0.5 mg
riboflavin	0.5 mg
nicotinic acid	2.5 mg
Ca-pantothenate	2.0 mg
pyridoxine · HCl	0.25 mg
vitamin K	0.05 mg
biotin	0.01 mg
folic acid	0.02 mg
vitamin B ₁₂	0.002 mg
inositol	10.0 mg
ascorbic acid	5.0 mg

2. Plasma 및 erythrocytes의 sampling

1) 採血

各주사기당 heparin sodium(mg/0.05 ml)으로 處理한 20cc 주사기로 흰쥐의 心臟에서 직접 採血하여 3000 r.p.m. 15分間 遠心分離하여 plasma와 erythrocytes의 資料로 하였다. 이 때 마취제로서는 chlo-

roform을 사용하였다.

2) 除蛋白

ㄱ) 血漿의 除蛋白^{5,6)}

위에서 얻은 血漿을 uranyl acetate solution(1.55 g/dl)과 H₂O를 centrifuge에서 1:1:1의 容量比로 混合하여 잘 섞은 다음, parafilm으로 그 주둥이를 봉한 狀態로 30分間 방치한 후 2000 r.p.m. 20分間 遠心分離하여 除蛋白한 濾물을 plasma sample로 얻어 -20°C에서 냉장하면서 FAA의 定量에 使用하였다.

ㄴ) 적혈구의 除蛋白^{5,6)}

위에서 얻은 적혈구에 0.9% NaCl을 3ml 가하여 glassrod로 잘 섞은 다음 3000 r.p.m. 10分間 遠心分離하였다.

위의 같이 濾물을 버린 후 H₂O를 적혈구액의 2倍量 가하여(a液) 30分間 방치한 후 a液과 同量的 sulphosalicylic acid 15% solution을 가하여 잘 섞은 다음 遠心分離하였다(3000 r.p.m. 10 min).

이와 같이 除蛋白한 濾물을 적혈구의 sample로 하였다. 이 濾물을 -20°C에서 냉장하면서 FAA의 定量에 使用하였다. 이들의 血漿과 적혈구의 試料處理를 요약하여 Fig. 1에 나타내었다.

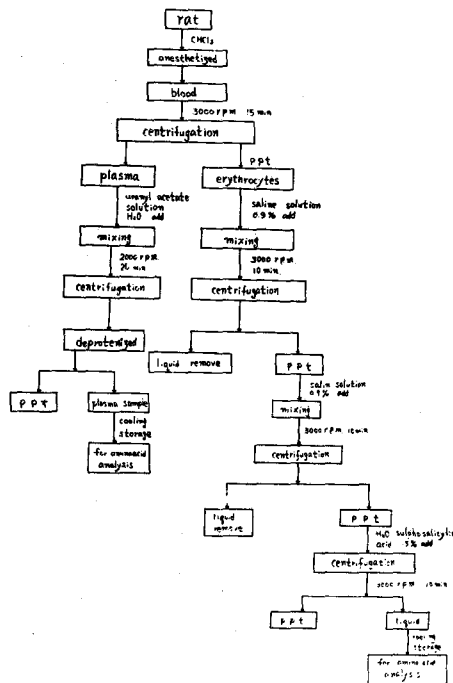


Fig. 1 Sampling of plasma and erythrocytes

3. Plasma 및 erythrocytes의

아미노酸의 含量定量

Try은 Lactobacillus arabinosus 17-5(ATCC 8014), Lys은 Leuconostoc mesenteroides P-60(ATCC 8042), Thr은 Streptococcus faecalis R(ATCC 8043)의 lactobacillus를 使用하였다. 이들 lactobacillus의 發育에 필요한 glucose, salt, vitamin 및 아미노酸을 모두 含有하고 있는 完全合成培地에서 定量코자 하는 目的 아미노산만을 除去한 basal medium(less amino acid medium)을 各各 만들어 이 basal medium 2cc를 內經 15mm의 試驗管에 分注하고 standard와 試料를 Table 2와 같이 分注한 후 各試驗管에 H₂O를 가하여 總液量이 4cc가 되도록 하여 120°C 1kg/cm²에서 10分間 加壓滅菌하였다.

Table 2. Quantity of standard amino acid and samples in each tube

test tube No.	1	2	3	4	5	6
standard A.A. (Try. 10 γ/ml)	0 γ	1 γ	2 γ	3 γ	4 γ	5 γ
plasma	0.1cc	0.2cc	0.3cc	each 1 γ added		
erythrocytes	0.1cc	0.2cc	0.3cc	each 1 γ added		
standard A.A. (Thr. 10 γ/ml)	0 γ	2 γ	4 γ	6 γ	8 γ	10 γ
plasma	0.2cc	0.4cc	0.6cc	each 2 γ added		
erythrocytes	0.2cc	0.4cc	0.6cc	each 2 γ added		
standard A.A. (Lys. 10 γ/ml)	0 γ	3 γ	6 γ	9 γ	12 γ	15 γ
plasma	0.2cc	0.4cc	0.6cc	each 3 γ added		
erythrocytes	0.2cc	0.4cc	0.6cc	each 3 γ added		

接種한 젖산균은 sample 분주 하루 전에 미리遠心分離用 15 ml 試驗管에 5 cc의 液體培養培地로 32°C에서 24時間 培養한 것을 2000 r.p.m. 15分間 遠心分離하여 菌體를 無菌生理食鹽水(0.9% NaCl Soln.)로써 懸濁시킨 後 2000 r.p.m. 15分間 遠心分離하여 菌體를 無菌狀態에서 洗滌하였다. 이와 같은 방법으로 3번 洗滌한 後 이것을 無菌生理食鹽水로써 懸濁하여 heavy inoculum 으로 하여 5 ml 주사기로 2방울씩 各試驗管에 接種하였다. 接種後 부란기 안에서 32°C 72時間 培養하였다. 培養을 끝낸 후 菌의 活性을 停止시키기 위하여 中탕으로 5分間 끓였다가 식힌 후, 菌이 生成한 젖산의 量을 5 ml micro autoburette를 使用하여 Try은 1/10 N NaOH 로 Lys 과 Thr 은 1/20 N NaOH 로 滴定하였다. 이 때 使用한 指示藥은 0.2% bromthymol blue와 0.2% neutral red 의 混合指示藥을 使用하였다. 그 定量順序를 Fig. 2에 要約한다.

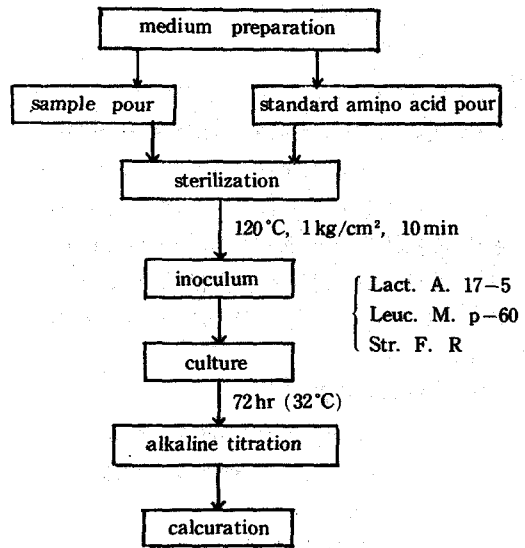


Fig. 2. Determination of amino acid by microbioassay

Table 3. The composition of liquid medium uniform for Lactobacillus

Lactobacillus components	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	—
* salt A (cc)	5.0	5.0	—
* salt B (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
0.9% NaCl (cc)	—	—	2.5

Make to 500cc(pH 6.8) after add.

* Salt A and salt B method were shown as in Table 4.

** Vitamin mixture method was shown as in Table 5.

1) 培地の 調製

本實驗에 使用한 液體培地の 調製 및 組成法은 Table 3과 같이 하였다.

Table 4. The composition of salt A and salt B (g/l)

	constituent	amount
salt A	KH ₂ PO ₄	25
	K ₂ HPO ₄	25
salt B	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	10
	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0.6
	MnSO ₄ · 7 H ₂ O	0.6

Table 5. The composition of vitamin mixture solution (γ/1)

constituent	amount
thiamine · HCl	1000
riboflavin	1000
pyridoxine	1000
pyridoxal	200
Ca-pantothenate	1000
nicotinic acid	1000
p-amino benzoic acid	200
biotin	10
folic acid	10

2) Basal medium의 調製

Steel의 bacto assay medium⁷⁾ (Recommended for the microbiological assay of threonine using streptococcus faecalis R)과 田村 medium⁸⁾를 使用하였다.

γ) Leuconostoc mesenteroides P-60과 Streptococcus faecalis R를 위한 basal medium의 組成은 Table 6과 같다.

Table 6. The composition of basal medium for Lys., Thr. (g or ml/100 ml)

constituent	amount
* Lys(Thr)less amino acid mixture	40 ml
glucose	4 g
Na-acetate	4 g
NH ₄ Cl	0.6 g
vitamin mixture	2 ml
** base 1	4 ml
base 2	4 ml
*** salt A	4 ml
salt B	4 ml
adjust to pH 6.8	

* The method of Lysless(Thrless) amino acid mixture was as Table 7.

Table 7. The composition of lysineless(threonineless) amino acid mixture (mg/100 ml)

constituent	amount
dl-alanine	100
l-arginine · HCl	100
dl-isoleucine	100
l-lysine · HCl	100 (less)
dl-methionine	100
dl-threonine	50 (less)
dl-phenylalanine	100
dl-valine	100
l-cystine	50
l-tyrosine	50
dl-serine	50
glycocoll	50
l-leucine	50
l-proline	50
dl-tryptophan	50 all above
l-histidine · HCl	50 melt in N-HCl
l-glutamic acid	250 melt in N-NaOH
dl-aspartic acid	200
adjust to pH 6.8	

** The method of base 1 and base 2 was as Table 8.

Table 8. The composition of base 1 and 2 (mg/l)

	constituent	amount
base 1	adenine sulfate	500
	guanine	500
	uracil	500
base 2	xanthine	500

*** The method of salt A and salt B was as Table 4.

ㄷ) Lactobacillus arabinosus 17-5를 위한 basal medium의 組成은 Table 9와 같다.

Table 9. The composition of basal medium for Try (g or ml/100 ml)

constituent	amount
casamino acid hydrolysate(vitamin free)	2.0 g
glucose	4.0 g
sodium acetate	4.0 g
NH ₄ Cl	0.6 g
l-cystine	1.0 ml
	(2.0 mg/ml in N HCl)
vitamin mixture	2.0 ml
base 1	4.0 ml
base 2	4.0 ml
salt A	4.0 ml
salt B	4.0 ml

adjust to pH 6.8

實驗結果 및 考察

白米로써 흰쥐를 飼育하였을 때의 growth gain 과 血漿과 적혈구 중의 遊離 tryptophan, lysine, threonine 의 含量을 microbioassay 法으로 定量한 結果는 다음과 같다.

1) 體重增加

各群別 흰쥐를 各級 試驗飼料로써 21 日間 飼育한 結果를 Table 10 에 나타내었다. 各마리당 攝取한 飼料의 범위는 253~285 g 으로서 하루 平均 12.1~13.6 g 을 攝取하였다.

Table 10. Quantities of intake diet on rats.

diet group	1	2	3	4	5	6	avg
C-group	275.8	265.3	271.4	275.3	255.1	272.2	269.18
R-group	255	255.5	253.2	285.1	278.1	281.6	268.1

이들 各마리當의 發育狀態를 Fig. 3 에 나타낸다.

Fig. 3 에서 나타난 것과 같이 casein 7% 를 使用한 群이 rice 群보다 成長狀態가 더 좋았다. 2 群의 平均發育狀態를 좀더 明確하게 나타내기 위하여 Fig. 4 로 나타내었다.

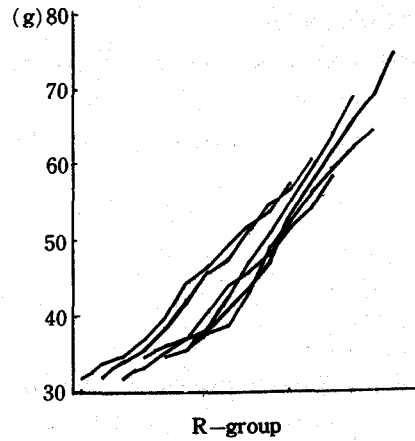
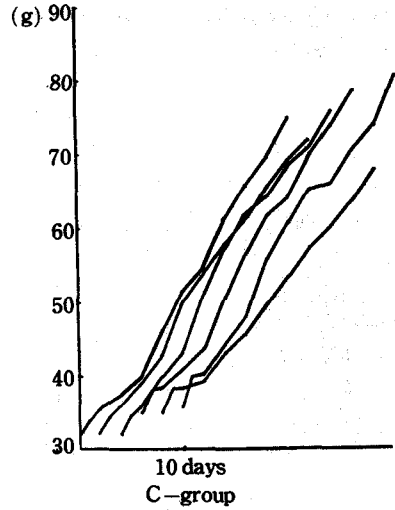


Fig. 3. The composition of growth body weight of rats (g/21 days)

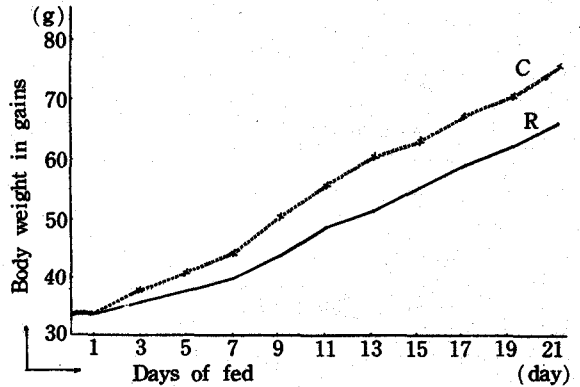


Fig. 4. The average composition of growth gain of rats (g/21 days)

Fig. 4에서 나타난 것과 같이 casein 7%의 群이 weight gain은 Table 11에 나타낸다. rice 群보다 確實히 좋았고, 이들의 growth gain 과

Table 11. The weight gain and growth gain

group	rats	initial B. W (g)	final B. W (g)	* weight gain (%)		** growth gain (g)		growth gain (%)	
				avg.	*** s.e.	avg.	s.e.	avg.	s.e.
C	6	33.7	76.2	15.76	±0.53	42.5	±1.65	226.62	±6.31
R	6	33.7	66.6	12.23	±0.61	32.92	±2.19	197.38	±4.75

* weight gain : increased body weight / 100 g diet

** growth gain : increased body weight / 21 days

*** s.e. : standard error : $\sqrt{\frac{\sum X^2 - n(X)^2}{n(n-1)}}$

2) 標準曲線

Lacto bacillus arabinosus 17-5 로써 tryptophan 을 定量하고, Streptococcus faecalis R 로 threonine 을 定量하고 Leuconostoc mesenteroides P-60 으 로 lysine 을 定量한 값의 standard curve 를 Fig. 5 와 같이 作成하였다.

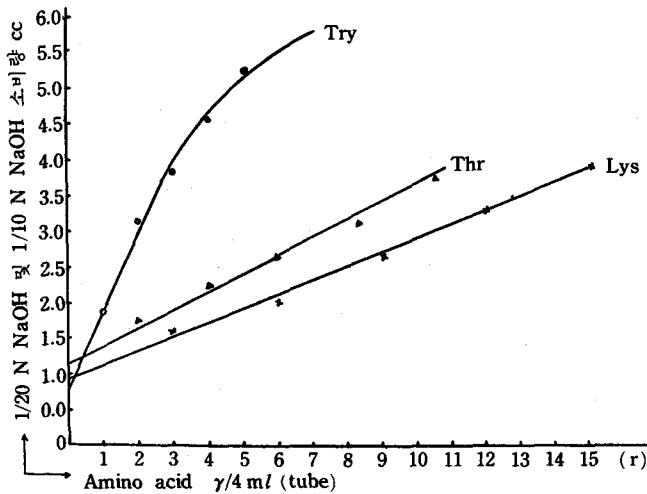


Fig. 5. Dose-response for standard amino acids with L. m. p-60, L. a. 17-5, S. F. R. (72 hrs)

Table 12. Contents of free amino acid in plasma and erythrocytes of rats (mg/100 mg or mg/100 ml)

group of rats	tryptophan		lysine		threonine	
	plasma	erythrocytes	plasma	erythrocytes	plasma	erythrocytes
C	1.98	7.428	11.364	40.128	10.422	22.440
R	1.11	5.172	6.414	34.296	5.889	21.612

3) 遊離 Try, Lys, Thr의 含量
 흰쥐의 血漿 및 적혈구 中の 遊離 아미노酸 含有

量을 Table 12에 나타낸다.
 이 結果를 graph로 다시 整理하면 Fig. 6과 같다.

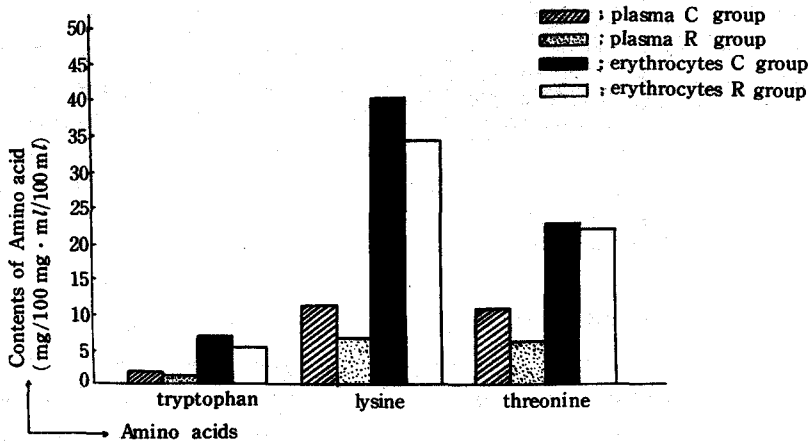


Fig. 6. The contents of free amino acids in plasma and erythrocytes of rats
 (mg/100 mg · ml/100 ml)

Fig. 6에서 나타난 것과 같이 遊離 아미노酸의 plasma와 erythrocytes 中の 含量은 tryptophan, lysine, threonine 모두 control 群이 rice 群보다 높은 含量을 나타내고 있음을 볼 수 있다. Erythrocytes에 있어서는 lysine과 threonine은 약 22~40 mg/100 ml의 높은 含量을 가지나 plasma 中の threonine과 lysine은 약 6~11 mg/100 ml의 含量을 나타내며, tryptophan은 plasma에 있어서 1~2 mg/100 ml의 낮은 含量을 보였고, erythrocytes에 있어서는 약 5~8 mg/100 ml의 含量을 보였다.

이와 같은 傾向은 1953年 Denton¹⁾이 血液 中에서 增加하는 아미노酸 量은 攝取蛋白質에서 공급된 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 Whitehead⁹⁾ 등과 1965年 Holt¹⁰⁾ 등이 發表하고 있는 바와 같이, 低蛋白質 時 血漿 中の 遊離 Lys, Thr 등이 減少되어진다는 結果와 거의 같은 傾向을 나타내고 있었다.

結 論

Wistar系 흰쥐(♂) 12마리를 casein 7% 飼料群(C)과 白米 90% 飼料群(R)으로 하여 各群 6마리

씩을 ad-libitum feeding method로 3週間 飼育하였을 때의 growth gain과 血漿과 적혈구 中の 遊離 아미노酸의 level의 變量을 microbioassay 法으로 定量한 結果는 다음과 같은 結論을 얻을 수 있었다.

① growth gain은 rice 群보다 casein 7% 群이 더 높았다.

② 흰쥐의 血漿과 적혈구 中の 遊離 tryptophan, lysine, threonine의 含量은 모두 casein 7% 群이 rice 群보다 더 높았다.

③ 또한 7% casein 群에서나 rice 群에서나, 이들 3個의 遊離 아미노酸은 모두 plasma보다 erythrocytes 中에 더 많이 含量되어 있음을 알 수 있었다.

④ 따라서 一般的으로 protein score가 높은 蛋白質 飼料로 飼育하였을 때가 낮은 蛋白質 飼料로 飼育하였을 때보다 plasma나 erythrocytes 中에 Try, Lys, Thr이 더 많이 含有됨을 알 수 있었기 때문에 흰쥐의 plasma나 erythrocytes 中の Try, Lys, Thr의 含量狀態로써 protein score의 高低를 推定할 수 있음을 알 수 있었다.

끝으로 本實驗을 指導하여 주신 李 鉉琪 博士님께 感謝드립니다.

References

- 1) Denton, A. E., Gershoff, S. N., and Elvehjem, C. A. : J. Biol. Chem., **204**, 731 (1953)
- 2) Long necker : Arch Biochem. Biophys., **84**, 46 (1959)
- 3) Charkey, L. W., et al. : J. Nutr., **55**, 469 (1955)
- 4) Snyderman, S. E., Kogut, M. D., and Holt, L. E. : The effect of protein intake on the retention of Nitrogen. J. Pediat., **74**, 827 (1969)
- 5) Harper, A. E. : J. Nut., **68**, 405 (1958)
- 6) Bjönesjö, K. B., Beleww, M. and Zarr, B. Scand. J. Clin. Lab. Invest., **18**, 591 (1966)
- 7) Steel, Sauberlich. Reynolds and Baumann : J. Biol. Chem., **177**, 533 (1949)
- 8) Tamura, Tunota et al : J. Agr. Chem. Soc. of Japan., **26**, 464 (1952)
- 9) Whitehead, R. G., and Dean, R. F. : Am. J. Clin. Nutr., **14**, 320 (1964)
- 10) Holt, L. E., and Snyderman, S. E. : Nutr. Abstr. Rev., **35**, 1 (1965)