

小麦粉에 참깨와 Lysine을 補足한 흰쥐의 肝脂質蓄積과
Plasma 및 肝臟中의 遊離 아미노酸에 對하여

李 明 姬

釜山大學校 大學院 食品營養學科(碩)

A Study of Liver Lipid Accumulation, Free Amino Acid in Plasma and
Liver on Rats Fed Wheat Flour Diet Supplemented With Lysine and Sesame.

Myoung-Hi Lee

*Dept. of Food and Nutrition
Busan National University*

Abstract

The effect of sesame of L-lysine·HCl and sesame supplementing a wheat flour diet on growth, liver lipid content, and on the free amino acid levels in the plasma and liver was studied in young male rats with an initial body weight of 75 ± 3 g.

The free amino acids were analyzed by amino acid auto analyzer (JLC - 6HA, NO. 310).

The results were as follows.

The body weight gain on L-lysine·HCl and sesame supplemented diet was more than weight in the sesame added diet or wheat flour diet groups.

Also the liver lipid contents of rats on a wheat flour diet supplemented with L-lysine·HCl and sesame showed greater increases than the levels in rats on the wheat flour diets.

The rate of liver lipid accumulation was depressed in rats fed L-lysine·HCl supplemented wheat flour containing sesame than in rats fed soybean oil or shortening oil instead of sesame.

The free phe, Tyr, Leu, Ileu, Val, Lys, levels in the plasma of rats administered the wheat flour diets supplemented with 0.25% L-lysine·HCl were higher than those of rats without L-lysine·HCl.

The free phe, Tyr, Asp, His, Lys, contained in the liver were increased, but other free amino acids were decreased according to the L-lysine·HCl amount.

I. 序論

Rose 와 Rice(1939)등은 必須아미노酸의 必要量을 흰쥐, 개에 대해서 求하였고, 또한 Rose는 사람에 대하여 求하였다.

그 후 사람의 各年齡에 있어 必要量이나 여러 動物 특히 家畜의 必要量에 대해 많은 사람의 研究가 行해지고, 여러 食品, 動物 및 사람의 臓器組織 蛋白質의 아미노酸含量(Mitchell, Block^{1,2)}, Orr and Watt³⁾)도 점차로 明白해져 가고 있다.

Osborne(1907)은 밀의 蛋白質을 콩의 蛋白質과 比較하여 lysine의 含量이 적으므로 밀蛋白質의 營養價가 낮은 原因을 이론하고 發表했고, Osborne과 Mendel(1914)⁴⁾은 밀蛋白質에 Lys를 添加하면 營養價가 높아진다고 하였다.

또한 Brock와 Mitchell⁵⁾은 麥類의 第1制限 아미노酸은 Lys이라고 하였고, Rosenberg⁶⁾등은 빵에 Lys를 0~0.8% 補足하였을 때 補足效果를 볼 수 있었다고 하였으며, Elvehjem⁷⁾등은 小麥蛋白質이 飼料의 5.4%로 되는 飼料로서 흰쥐 飼育時 그 肝臟에 脂質이 蓄積하나 이때 L-Lys 0.5%, DL-Lys 0.4%로 補足하면 肝脂質은 일어나지 않는다고 하였다.

Harris⁸⁾등은 밀가루 蛋白質 8% 飼料에 의하면 肝脂質이 生成되나, 이것에 Lys 0.31%를 補足하면 막을 수 있다고 하였다.

그러나 村山⁹⁾등은 밀가루 飼料에 Lys를 0.3% 添加하여 흰쥐를 飼育하였을 때 흰쥐의 成長은 계속되나 肝 중의 tri glyceride(T.G)의 蓄積이 일어난다고 보고한 바 있고, 肝脂質의 蓄積에 미치는 硬化油의 영향에서 大豆油群에서는 蓄積하나 Shortening oil(S.O)群은 蓄積抑制作用이 있다고 하였다.

本研究는 참깨와 Lys를 添加한 小麥飼料로 흰쥐를 飼育하였을 때 일어나는 肝脂質蓄積狀態와 肝臟 및 血漿 中의 遊離아미노酸과의 關係를 檢討하였다.

II. 實驗方法

1. 飼育實驗

體重 75g 前後의 Wistar系 幼稚쥐(♂)를 처음 3日間은 日本 Oriental 製 흰쥐 飼育用 Stock diet로서 飼育한 後 小麥粉飼料群(A), 小麥粉에 참깨 10% 添加飼料群(B), 小麥粉에 참깨 10%와 0.25% Lys-HCl 添加飼料群(C), 小麥粉에 참깨 10%와 0.5% Lys-HCl 添加飼料群(D)의 4群으로 나누어 각群當 4마리씩으로 하여 한마리 씩 鐵製飼育箱子에

넣어 ad-libitum 方法으로 3週間 飼育하였다.

3週間飼育한 흰쥐는 18時間 絶食하여 屠殺 하였다.

1) 飼料組成

豫備飼育實驗用 control diet인 stock diet의組成은 cornstarch 38%, vitamin free casein 25%, α-wheat starch 10%, 粉末瀘紙 8%, linoleic sarada oil 6%, mineral 6%, granulated sugar 5%, vitamin類 2%의組成이며 各群의 實驗飼料의組成은 Table 1과 같이 調製하였다.

Table 1. The composition of experimental diets (%)

Constituent	A	B	C	D
wheat flour	90.0	80.0	79.75	79.50
sesame	-	10.0	10.0	10.0
bean oil	5.0	5.0	5.0	5.0
*salt mixture	4.0	4.0	4.0	4.0
**vitamin mixture	0.85	0.85	0.85	0.85
choline chloride	0.15	0.15	0.15	0.15
L-lysine · HCl	-	-	0.25	0.5
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

* The method of salt mixture was as Table 2.

** The method of vitamin mixture was as Table 3.

Table 2. The composition of salt mixture (mg/100g diets)

Constituent	Amount
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 · H 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

Table 3. The composition of vitamin mixture (mg/100g diets)

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

2. 肝脂質의 定量

흰쥐의 肝을 開腹 採肝하여 各群別로 4g 씩 각마리에서 同量分取하여 homogenation한後 乾燥器(95°C) 내에서 4hr 乾燥시켰다. 이것을 바리로 粉末로 하여 一般精秤方法에 따라 1~3g 即 A는 2.8189g, B는 1.4261g, C는 2.1678g, D는 1.3972g를 精秤하여 圓筒瀘紙에 넣은 후 試料上部를 瀘紙로 덮은뒤 soxhlet extractor에 장치하여 45°C의 恒溫

水槽에서 16hr 동안 ether로서 抽出하였다.

이 抽出物을 精秤하여 이를 肝臟 중의 乾物重量當의 肝脂質 %로 表示하였다. 그 過程을 要約하여 Fig. 1에 나타내었다.

3. Plasma 中의 F.A.A.의 定量試

1) 採 血

採血하기 前에 18時間 絶食시킨 흰쥐를 chloroform으로 마취시킨후 heparin sodium(mg/0.05ml)으로 處理한 20CC 注射器로서 흰쥐의 心臟에서 直接 採血하여 遠心分離(3000r.p.m., 15min)하였다.

이렇게 分離한 上澄液인 Plasma를 Harper氏法¹⁰⁾에 의하여 除蛋白하였다. 即 Plasma에 uranyl acetate solution(1.55g/dl)과 물을 15ml 遠心分離管에서 1:1:1의 容量比로 하여 잘 混合한 後 parafilm으로 管口를 封한 후 常溫에서 30分間 放置하여 다시 遠心分離(2000r.p.m., 20 min) 하여 上澄液을 F.A.A의 定量用試料로 하여 冷藏保管하면서 F.A.A의 定量에 使用하였다.

4. Liver 中의 F.A.A.의 定量試

1) 採 肝

採血을 끝낸 흰쥐의 腹部를 갈라서 얻은 肝臟의一部를 アミノ酸 定量用으로 使用하였다.

2) 肝의 除蛋白

위에서 얻은 肝을 各群別로 5g 씩 각마리에서 同量分取하여 各群마다 picric acid에 의한 除蛋白法¹¹⁾에 따라 1% picric acid solution 100ml를 加하여 混合한 후 homogenizor로 30sec. 2回 homogenization하여 50ml 遠心分離管에 넣어 遠心分離(3000r.p.m., 10 min)하였다. 이때의 上澄液을 別途로 準備한 樹脂 Dowex 1-x8cl (Dow chemical製)를 N-HCl에 잘 반죽한 것을 Allihn tube(15cm × 2cm)에 2cm層이 되도록 넣고 瀘液이 中性이 될 때까지 蒸溜水로써 洗滌한 후 瀘過紙를 Dowex 위에 잘 깔아놓고 除蛋白한 肝의 試料를 넣어 瀘過하였다. 이것을 pH 6.8(B.T.B)로 調節하고 중류수로써 100ml로 mess up한 것을 肝의 free amino acid 定量用으로 하였다. 이들과 같이 처리한 plasma 및 liver sample 등을 冷藏庫에 保管하면서 amino acid의 分析에 使用하였다.

이들 plasma와 liver 試料의 調製過程을 Fig.2에 要約하였다.

5. Amino acid의 定量

Spackman 등(1953)의 方法에 따른 Amberlits CG-120 樹脂 Colum을 利用한 日本電子會社製 애

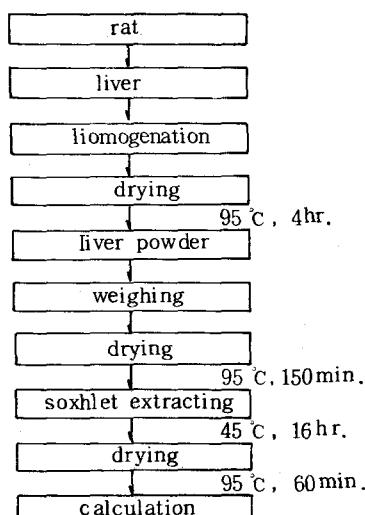


Fig. 1. Determination of liver lipid

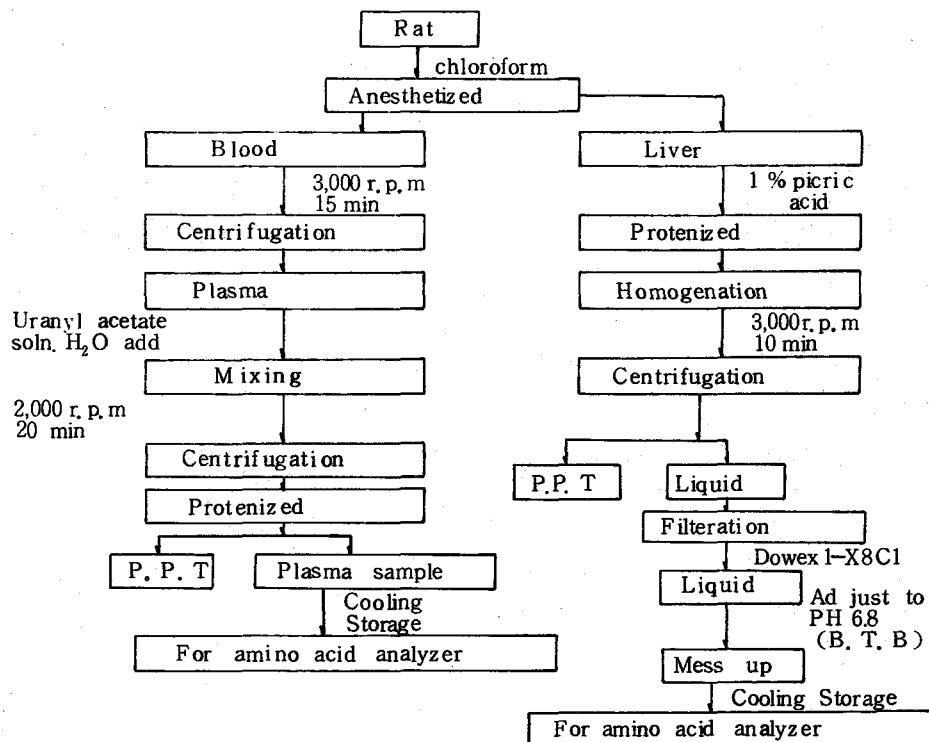


Fig. 2. Sampling of plasma and liver

미노酸自動分析計(JLC-6AH, No 310)로써 분석하였다.

Table 4. The weight gain and growth gain of rats for 3 weeks

group	weight gain (g / 100g diet)*	growth gain (g / 3 weeks) **	growth gain (%)
(s.e) ***	(s.e)	(s.e)	
A	1.38 ± 0.21	2.3 ± 1.23	103.07 ± 1.97
B	1.45 ± 0.76	3.5 ± 1.80	104.95 ± 2.73
C	4.12 ± 0.94	10.55 ± 2.43	113.88 ± 3.42
D	5.98 ± 1.37	15.5 ± 3.79	121.70 ± 6.35

* Weight gain : increased body weight g / 100g diet

** Growth gain : increased body weight g / 3 weeks

*** s.e. : standard error

III. 實驗結果 및 考察

1. 體重增加

各群別로 3週間 飼育하였을 때의 飼料攝取全量은 223~264g 이었으며, 이는 하루 平均 10.61~12.57 g을 摄取한 셈이었다.

各群의 成長狀態를 보면 Table 4와 같이 growth gain과 weight gain은 單獨小麥粉인 飼料群A에 比해 小麥粉에 참깨를 10%를 添加한 B群이 약간 좋았고, B群에 0.25% L-Lys·HCl을 添加한 C群은 A, B群에 比해 월등하게 좋았고, B群에 0.5% L-Lys·HCl을 添加한 D群은 增加率이 第一 좋았다. 이것은 Rosenberg⁶, 山村⁹ 등이 Lys添加에 따른 效果를 認定하는 結果와 같은 傾向을 나타내었다. 이 結果를 Fig. 3에 나타내었다.

2. 肝脂質含量

群別飼料 A, B, C, D로 飼育한 細胞의 肝臟脂質의 含量을 Soxhlet extractor로 ether로 抽出하여 얻은 結果를 Table 5에 나타내었다.

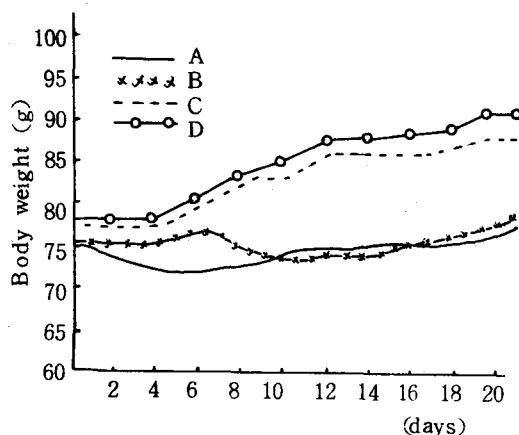


Fig. 3. Body weight change in growing rats (g/3 weeks)

Table 5. Liver lipids (% dry liver)

Group	Liver lipids*
A	7.45
B	12.50
C	15.92
D	22.65

* Liver lipids are expressed as percent of dried liver

Table 5에서 볼 수 있는 바와 같이 單獨飼料인 A群에 있어서는 liver lipid은 불과 約 7%였으나 이 飼料에 참깨 10%를 添加한 C群 및 B群에 0.5% Lys·HCl을 添加한 D群등은 모두 liver lipid이增加함을 볼 수 있었다.

Lys 및 참깨 添加群에 있어서 liver lipid의 含量은 乾物重量으로 約 13~23%의 含量이었다. 이 現象은 平野¹²⁾ 등이 Lys添加白米飼料로 飼育하였을 때 흰쥐의 liver lipid의 留積量은 20~25%의 含量이었다고 報告한 結果와 거의 같은 傾向을 나타내었을 뿐만 아니라 山田¹³⁾ 등의 報告와도 一致한 結果였다. 또한 山田¹³⁾ 등이 小麥飼料에 Lys을 0.3%

添加한 飼料로 흰쥐를 飼育하였을 때 그 成長은 개선되나 肝臟에 tri glyceride이 留積이 일어난다는 報告와도 一致하였다.

松浦¹⁴⁾의 Lys添加小麥飼料에 의한 흰쥐의 肝脂質蓄積에 미치는 食飼脂肪의 영향에서 發表된 soybean oil을 添加했을 때와 이것에 0.3% Lys을 添加했을 때 liver lipid(T.G)의 變化는 10.1 ± 1.6 , 35.5 ± 4.1 (Mg/g wet liver)였으며, shortening oil과 이것에 0.3% Lys을 添加하였을 때의 liver lipid(T.G)의 蓄積狀態는 15.5 ± 1.8 , 28.7 ± 2.2 (Mg/g wet liver)에서 볼 수 있음과 같이 참깨와 이것에 Lys을 0.25% 또는 0.5% 添加한 群들의 liver lipid의 蓄積值는 12.5%, 15.9%로써, shortening oil이나 soybean oil보다 sesame oil이 肝脂質蓄積의 抑制率이 좋음을 알 수 있다. 即 참깨添加群과 Lys添加群의 比는 15.9/12.5(참깨군) shortening oil에 있어서는 2.9/15.5(S.O), 大豆油에 있어서는 그 比率이 35.5/10.1(大豆油)의順으로 肝脂抑制效果를 알 수 있었다.

Table 5를 graph로 나타내면 Fig. 4와 같다.

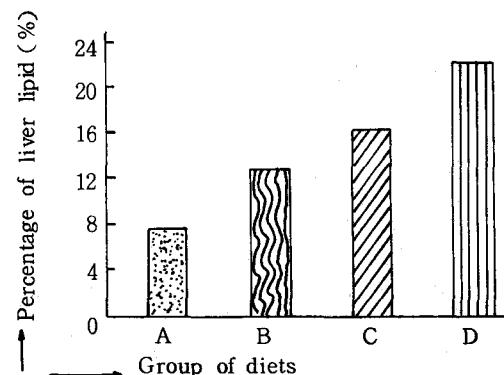


Fig. 4. Contents of liver lipid (dry base)

3. Plasma 中의 FAA의 含量

各群別로 採血한 後 Harper氏¹⁰⁾法에 의하여 ur-

Standard

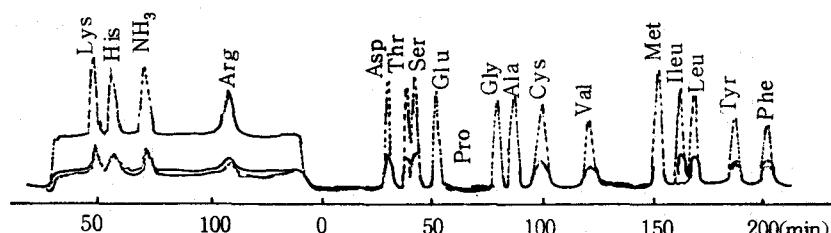


Fig. 5. Chromatogram of standard free amino acids

anyl acetate 溶液으로 除蛋白하여 얻은 Plasma 試料를 아미노酸·自動分析計 (JLC 6AH No 310) 로 씨定量하였다.

이때 鹽基性아미노酸 定量分析에서 pH 5.28, 0.35 N Na-citrate buffer solution 으로 하였고, 酸性아미노酸은 pH 3.30, 0.2 N Na-citrate 溶液 및 Met에서 Phe까지는 pH 4.25, 0.2 N Na-citrate buffer solution 을 使用하였다.

Standard amino acid mixture의 Chart를 Fig. 5에 나타낸다.

Plasma 중의 free amino acid 를 分析定量한 값은 Table 6에 나타내었다.

Table 6. The contents of plasma free amino acids on rats ($\mu\text{mol}/100 \text{ml}$)

Group	A	B	C	D
Phe.	4.65	6.15	5.43	6.85
Tyr.	3.38	5.23	4.27	6.32
Leu.	7.69	15.50	15.50	20.05
Ileu.	5.20	8.53	11.05	7.83
Met.	5.29	5.90	5.62	4.72
Val.	10.45	18.22	17.44	16.35
Cys.	-	-	-	-
Ala.	37.14	12.42	62.32	84.21
Gly.	50.46	42.19	46.00	32.13
Pro.	-	-	-	-
Glu.	16.94	14.67	19.49	23.12
Ser.	-	-	-	-
Thr.	111.32	92.50	99.99	90.24
Asp.	0.26	1.02	1.12	1.42
Arg.	-	-	-	-
NH ₃	-	-	-	-
His.	8.71	7.0	6.81	9.46
Lys.	17.27	37.9	31.47	38.23

Table 6에서 볼 수 있음과 같이 10% 참깨를 添加한 群의 Plasma 中의 FAA(Ala, Gly, Glu, His, Thr)를 除外한 FAA(Phe, Tyr, Leu, Ileu, Met, Val, Lys) 등은 單獨小麥粉飼料群보다 增加 現象을 보였고, 또한 A, B群에 比하여 Lys를 添加한 C, D群은 Phe, Tyr, Leu, Ileu, Val, Asp, Lys 등은 增加 現象을 보였고, 그 밖의 PAA 등은 減少 現象을 나타내었으며 Cys, Pro, Ser, Arg의 含量은 흔적 정도 였었다.

Lys 添加의 增加에 따라 Plasma 中의 FAA와 Lys의 含量도 增加됨을 볼 수 있었다. 이것은 村松¹⁵⁾ 등이 gluten에 0.6% Lys를 添加했을 경우 Plasma FAA의 Pattern에 대해 發表한 바와 一致하는 結果를 나타내었다.

뿐만 아니라 Rosenberg⁶⁾ 등이 밀가루빵에 Lys를 0~0.8% 补足한 飼料로 生後 3週에 50g 前後の 흰쥐를 25週間 自由食으로 飼育하여 그 發育 관찰한 바에 의하면 0.4~0.8% Lys 补足群의 發育效果가 확실히 좋으며, 0.2%의 Lys 补足群도 补足치 않은 對照群에 比해서 분명히 發育狀態가 좋았다고 하는 傾向과 같음을 볼 수 있었다.

또한 A, B, C, D 4群 모두 Plasma 中 FAA의 含量狀態는 거의 같은 傾向의 aminogram을 나타냄을 볼 수 있었다.

Table 6의 關係를 aminogram 으로 나타내면 Fig. 6과 같다.

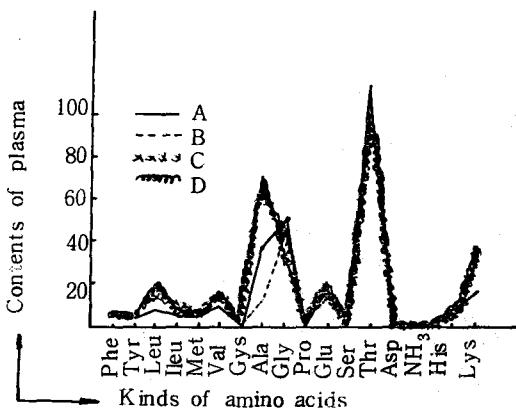


Fig. 6. Aminogram of plasma free amino acids ($\mu\text{mol}/100 \text{ml}$)

4. Liver 中의 FAA 含量

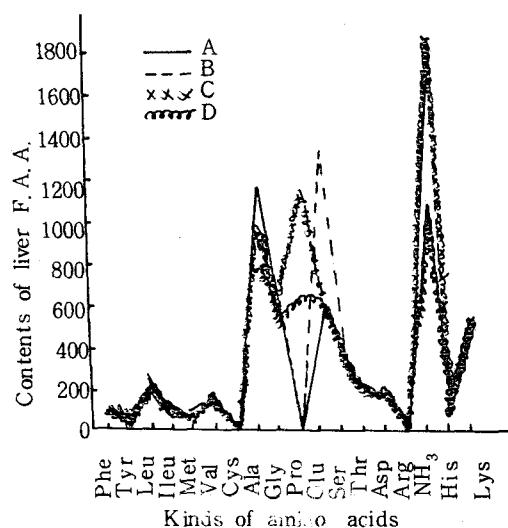
各群別로 採肝하여 波多野¹¹⁾ 氏法에 의하여 即picric acid로 除蛋白한 資料를 Dowex 1-x 8Cl⁻樹脂로 處理하여 얻은 液을 試料로 하여 아미노酸自動分析計로 定量한 값은 Table 7과 같다.

Table 7에서 볼 수 있음과 같이 liver 中의 FAA는 10% 참깨만 添加한 B群의 Liver 中의 遊離 Leu, Ala은 小麥單獨飼料群보다 含量이 減少되었으나 그 밖의 全遊離 아미노酸은 모두 增加 現象을 나타내었다.

또한 A, B群에 比하여 Lys를 添加한 C, D群은 Phe, Asp, His, Lys를 增加하나 그 밖의 遊離 아미노酸은 모두 減少되었다. 다만 Cys, Arg의 含量은

Table 7. The contents of liver free amino acids on rats (μ mol/100 ml)

Group	A	B	C	D
Phe.	80.38	97.36	105.51	93.53
Tyr.	21.84	67.54	79.07	74.09
Leu.	178.47	255.62	235.98	220.05
Ileu.	66.64	93.23	78.01	66.60
Met.	81.88	102.61	42.51	51.44
Val.	132.03	196.89	179.56	160.53
Cys.	-	-	-	-
Ala.	1146.88	908.26	781.12	989.95
Gly.	603.84	681.71	612.90	504.91
Pro.	-	-	1120.96	628.94
Glu.	586.10	1329.06	565.06	621.56
Ser.	381.18	430.27	316.17	343.30
Thr.	150.28	211.82	204.00	147.53
Asp.	157.28	199.47	175.98	181.67
Arg.	-	-	-	-
NH ₃	1053.38	1783.82	1828.61	984.40
His.	72.66	78.04	100.15	73.59
Lys.	411.65	502.98	448.63	489.91

Fig. 7. Aminogram of liver free amino acids (μ moles/100 ml)

흔적정도였다. 이 결과를 Fig. 7에 aminogram로 나타내었다.

IV. 結論

75g 前後의 Wistar 系 흑쥐(公)를 小麥粉에 참깨와 Lys을 補足한 飼料로 ad-libitum 方法으로 3週間 飼育하였을 때의 肝脂質蓄積과 plasma 및 liver 중의 free amino acid의 含量의 結果는 아래와 같다.

1. Growth gain은 單獨小麥群보다 Lys 添加群이 좋았다.

2. 肝脂質蓄積量은 小麥單獨飼料보다 10% 참깨와 0.25%, 0.5% L-Lys·HCl을 添加한 飼料로 흑쥐를 飼育하였을 때 成長은 개선되나 肝臟脂質의 蓄積이 일어남을 볼 수 있었다.

3. 小麥粉에 大豆油나¹³⁾ shortening oil¹³⁾을 添加하였을 때 보다 참깨를 添加함이 肝脂質蓄積抑制作用이 커졌다.

4. Plasma 中의 F.A.A 含量狀態는 Lys을 添加한 飼料群이 添加치 않은 群에 比해서 Phe, Tyr, Leu, Ileu, Val, Lys 등이 增加現象을 보였었다.

5. 또한 10% 참깨를 添加한 群도 飼料群에 比해 Lys 添加群과 같이 Phe, Tyr, Leu, Ileu, Val, Lys, Met 등이 增加함을 볼 수 있었다.

6. Liver 中의 F.A.A는 A, B群에 比하여 Lys을 添加한 C, D群은 Phe, Tyr, Asp, His, Lys 등은 增加하나, 그 밖의 F.A.A는 모두 減少現象을 나타내었다.

끝으로 本研究를 위하여 직접 指導頗 달하여 주신 釜山大學校 家政大學長 李鉉琪博士님과 아미노酸 分析에 協助하여 주신 味元株式會社 韓相烈 研究部長에게 甚甚한 感謝를 드립니다.

参考文獻

- Block, R.J. and D. Bolling: The amino acid composition of protein and foods, Analytical methods and results, (1951).
- Block, R.J. and K.W. Weiss: Amino acid handbook, methods and results of protein analysis, (1956).
- Orr, M.L. and B.K. Watt: Amino acid content of foods, (1957).
- Osborne, T.B. and L.B. Mendel: J. Biol. Chem., 17, 325 (1914).
- Block, R.J. and H.H. Mitchell: Nutr. Abst. and Rev., 16, 249 (1946).
- Rosenberg, H.R. and E.L. Rohdenberg: Arch Biochem. Biophys., 3, 461 (1952).

- 7) Deshpande, P.D., A.E. Harper and C.A. Elvehjem: J. Nutrition, 62, 503 (1957).
- 8) Harris, R.S. and D.A. Burress: J. Nutrition, 67, 549 (1959).
- 9) 平野隆司, 村山恵美子, 渡邊さきえ, 松浦栄一,
山田幸二: 榮養と食糧, 31, 283 (1978)
- 10) Harper, A.E.: J. Nutrition, 68, 405 (1958).
- 11) 波多野 小澤 麗野: 蛋白質 核酸酵素, 8, 36
(1967)
- 12) 平野隆司, 佐藤美律子, 永山頤子, 松浦栄一,
山田幸二: 榮養と食糧 31, 347(1978)
- 13) 山田幸二, 廣井 勝: 榮養と食糧, 29, 29 (1976)
- 14) 松浦栄一, 平野隆司, 山田幸二: 榮養と食糧,
30, 169(1977)
- 15) 村松敬一郎, 桜井恭助: 榮養と食糧, 25, 266
(1972)
- 16) 山田幸二, 平野隆司: 榮養と食糧, 29, 162(1976)
- 17) 兼松弘, 丸山武紀, 水下染子, 新谷助, 今村正男
: 榮養と食糧, 29, 49(1976)
- 18) Sgoutas, D. and Kummerow, F.: Am. J. Clin
Nutr., 23, 1111 (1970).
- 19) Aoyama, Y., Yoshida, A. and Ashida, K.: J
Nutr., 104, 741 (1974).
- 20) Aoyama, Y., Kondo, H. and Ashida, K.: Agric
Biol. Chem., 39, 215 (1975).