

노중의 산가용성 펩타이드에 의한 식이 단백질 이용효율의 추정

남택정

부산수산대학교 식품영양학과

Estimation of the Efficiency of Dietary Protein Utilization Based on the Urinary Excretion of Acid-Soluble Peptides in Rats

Taek-Jeong Nam

Dept. of Nutrition and Food Science, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

Abstract

Nutritional factors affecting the urinary excretion of acid-soluble peptides(ASP) in rats were studied using protein-free diet, gluten diet, casein diet, and gluten supplemented with lysine and threonine(GLT) diet. The content of urinary ASP was lowest in protein-free diet group among the four kinds of diets above. But the amino acid pattern of urinary ASP in the four dietary groups were similar each other, suggesting that urinary ASP is mainly from endogenous origin under these nutritional conditions. The efficiency of dietary protein utilization was significantly lower in gluten diet than that of casein diet or GLT diet. Those findings suggest that the rate of urinary excretion of ASP-form amino acids can be employed as an index of protein metabolism, particularly as a simple index in the assessing the status of protein nutrition.

Key words : urinary acid-soluble peptides, protein nutrition, rat

서론

노중에는 체내에서 일어나는 각종 대사의 최종생성물이 배설되고 있으며, 뇨성분을 분석하는 것은 영양평가의 점에서 많은 중요한 정보를 제공하고 있다. 그 중에서도 미량성분인 펩타이드의 배설이 잘 알려져 있지만¹⁻³⁾, 펩타이드의 실태나 체내에서 단백질 대사와의 어떤 관계가 있는가에 대해서는 미지의 부분이 많다. Ansorge와 Hanson⁴⁾은 사람의 뇨에서 35종류의 펩타이드를 분리하여 그것들이 proline 혹은 hydroxyproline을 함유하는 collagen의 분해산물인 것을 증명했고, 또 그들은 이들 펩타이드의 단백질

분해효소에 대한 안정성을 조사한 결과, 높은 효소농도, 장시간의 incubation에도 상관없이 2% 이하 정도 밖에 분해하지 않았으므로 체내에서 극히 소화되기 어려운 펩타이드인 것을 밝혔다. 그러나 그들은 노중 펩타이드 배설이 식이 혹은 생리적 인자에 의해 어느 정도 영향을 받을 것인가에 대해서는 언급하지 않았다.

Prockop와 Kivirikko⁵⁾는 Prager병 처럼 collagen대사의 이상일 때에는 poline함유 펩타이드의 배설량이 현저하게 높아진다는 것을 보고하였으며, Asatoor 등¹⁰⁾도 Wilson병 환자의 경우 정상인보다 펩타이드의 양이 유의적으로 많았다는 것을 보고했다. Noguchi

등¹³⁾은 무단백질 식이의 흰쥐와 사람의 노중 펩타이드 배설량은 metabolic body size에 비례하고 있고 또 펩타이드의 배설량은 무단백질 섭취때 보다 단백질 섭취 조건에서 2배 정도 증가하는 것 등을 밝히면서 노중 펩타이드가 내인성 대사 생성물로서 체 단백질 대사의 분해상태 지표로 된다는 것을 제안하고 있다. 또, Takahashi 등¹⁵⁾은 단백질 분해 저해제인 bestatin을 흰쥐에 투여하여 펩타이드의 배설량을 조사한 결과 대조군에 비하여 3배 정도 증가한다는 보고 등을 통하여 볼 때, 노중 펩타이드의 배설은 체내 생리적 및 영양적 조건에 따라 영향을 받고 있는 내인성 대사 생성물이라는 것을 알 수 있다. 따라서 노중 펩타이드의 배설량을 안다는 것은 체 단백질의 대사 상태를 추정할 수 있음을 시사하고 있다. 이상의 배경에서 본 연구는 체 단백질 대사 상태의 추정이 가능한 산가용성 펩타이드(acid-soluble peptides, ASP)를 지표로 하여 식이 단백질의 체내 이용효율에 관하여 검토하였다.

재료 및 방법

실험동물

체중 90g전후의 Wistar계 숫쥐를 5마리씩 1군으로 하여 대사 cage에 1마리씩 넣어 사육하였다. 동물 사육실은 온도 22±2℃, 상대습도 60±5%로 조절하였고, 명암은 12시간 cycle조명(8:00~20:00)으로 하여 사료와 물은 자유 섭취시켰다.

식이 및 사육조건

실험 식이의 조성은 Table 1과 같으며, 무단백질 식이(protein-free, PF)외의 각 단백질 식이(gluten, G; casein+methionine, C; gluten+lysine+threonine, GLT)는 단백질 함량이 흰쥐의 단백질 필요량을 거의 만족시키는 12%가 되게 조정하였고¹⁶⁾, G식이에 glutamic acid의 첨가는 질소 함량을 맞추기 위한 것이었다. 사육 조건은 처음 5일간은 12% C식이로써 예비 사육한 후에 각각의 실험사료로써 7일간 섭취시켰다(Fig. 1).

뇨의 전처리

흰쥐를 대사cage에 넣고 삼각 플라스크에 10ml의

Table 1. Composition of experimental diets (%)

Ingredients	PF*	G*	C*	GLT*
Gluten		12.0		12.0
Casein			12.0	
Glutamic acid		1.0		
Lysine HCl				0.9
Threonine				0.2
Methionine			0.2	
β-Corn starch	85.0	72.0	72.8	71.9
Soybean oil	5.0	5.0	5.0	5.0
Cellulose powder	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture**	4.0	4.0	4.0	4.0
Vitamin mixture*	1.0	1.0	1.0	1.0

*PF : protein-free diet

G : gluten diet

C : casein diet

GLT : gluten supplemented lysine and threonine diet

**The mineral and vitamin mixtures (obtained from Orinetal Yeast Co., Tokyo) were prepared according to Rogers & Harper(1965)

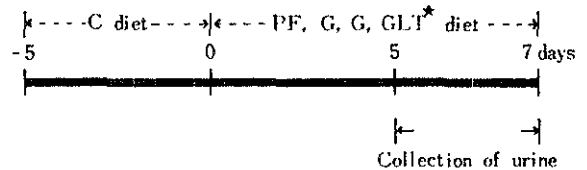


Fig. 1. Experimental design.

*PF : protein-free diet

G : gluten diet

C : casein diet

GLT : gluten supplemented lysine and threonine diet

10% sulfosalicylic acid를 미리 넣어, 각 식이군을 5일째 부터 7일째 까지 2일간 채뇨했다. 채뇨후, sulfosalicylic acid의 최종농도가 2%되게 탈이온수를 가하여 희석하고 여과(Whatman No 44)해서 Dowex 50W×4 (H⁺ form)을 채운 칼럼(2.4×17cm)에 통과 시키므로써 sulfosalicylic acid와 염을 제거했다. 그리고 3N 암모니아수로 펩타이드와 아미노산을 용출시켜서 그 용출액을 회전진공증발기로써 감압건조 후, 탈 이온수에 용해시켜 산가용성 획득분으로 하였다.

산가용성 펩타이드 구성(ASP-form) 아미노산의 분석

산가용성 획득분의 일정량을 6N HCl로써 가수분해(110℃, 24시간)하여 회전진공증발기로써 염산을 제

거한후, 아미노산 자동분석기(Hitachi, 835-50형)로써 분석했다. 그리고 산가용성 획분의 유리 아미노산을 정량하여 가수분해 전후의 차에 의하여 계산된 아미노산량을 ASP-form 아미노산량으로 하였다. 뇨중의 질소량은 semi-micro Kjeldahl법으로 측정하였다.

유의성 검증

Data를 one way analysis of variance로 처리한후 follow-up procedure로써 Duncan's multiple range test²⁷⁾를 실시하였다.

결과 및 고찰

식이 단백질의 질에 의한 체중 증가량의 차이

예비 사육 후 각 단백질을 식이시킨 7일째 흰쥐들의 체중 증가량을 Table 2에 나타내었다. 무단백질 식이를 제외하고 질적으로 우수한 C식이 군과 비교할때 lysine이나 threonine이 부족한 G식이 군은 유의적으로 체중 증가량이 적었으며 G식이에 lysine과 threonine을 첨가하였을 때는 C식이 군과 거의 차이가 없었다.

ASP-form 아미노산 배설에 미치는 식이단백질의 영향

G식이, C식이, 그리고 GLT식이를 시켰을 때 뇨중에 배설되는 산가용성 펩타이드량은 무단백질 식이를 시킨 것 보다 2배 이상 많았고, 또 어느 식이군에서나 많이 배설되는 ASP-form 아미노산은 glycine, gix (glutamine+glutamic acid), proline, hydroxypro-

Table 2. Body weight of rats fed on a protein-free diet(PF), or diets containing 12% gluten (G), gluten supplemented with lysine and threonine (GLT), or casein(C)

Diet	Body weight(g)	
	Initial	Final
PF	112.0±1.4*	99.2±1.2**
G	114.4±0.7	117.6±1.5 ^b
C	111.8±1.5	136.8±4.0 ^c
GLT	114.4±1.2	139.2±1.8 ^c

* Values are means with their standard errors for five rats per group

**^{a,b,c} Groups with unlike superscript letters were significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

line, asx (asparagine+aspartic acid) 등이었다. 따라서 뇨중의 펩타이드는 위의 아미노산들이 많이 함유되어 있는 종류들로 추정된다. 그리고 PF식이군의 ASP-form 아미노산 pattern과 G식이군, C식이군, GLT식이군의 ASP-form 아미노산 pattern을 비교할 목적에서 각 단백질 식이군의 ASP-form 아미노산 배설량을 종축에, 또 PF 식이군의 ASP-form 아미노산 배설량을 횡축에 plot한 것이 Fig. 2, 3, 4이다. 각각에 대하여 상관계수를 구하면 G식이군 r=0.990, C식이군 r=0.998, GLT식이군 r=0.996이고 어느 식이조건에서나 펩타이드를 구성하고 있는 아미노산이 거의 같은 비율로 증가하며, 또 높은 상관이 있는 것을 알 수 있다. 즉 식이조건에 따라 ASP를 구성하는 아미노산의 배설량은 변화해도 아미노산 조성에는 변화가 거의 없다는 것을 말할수 있겠다. 이것은 뇨

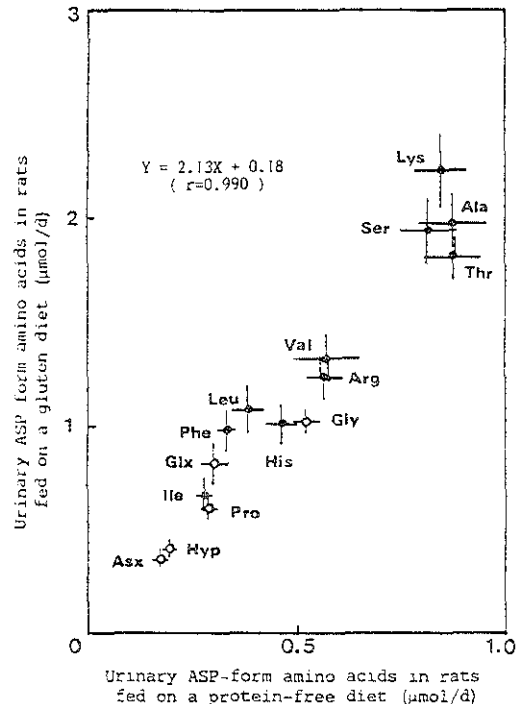


Fig. 2. The amino acid pattern of urinary acid-soluble peptides(ASP) from rats fed on a gluten diet compared with that of rats fed on a protein-free diet. Values are means with their standard errors for five rats for each group. Vertical lines represent the standard errors of the means for the rats fed on the gluten diet and horizontal lines those for the rats fed on a protein-free diet. (o), Values are reduced to a scale of one-tenth the actual size.

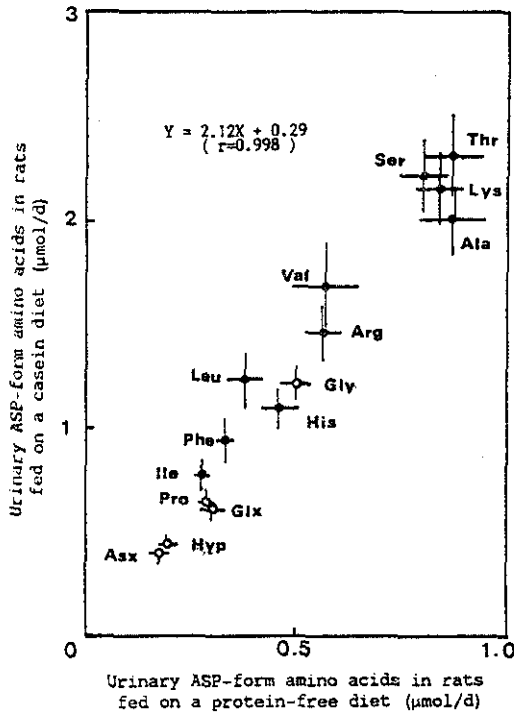


Fig. 3. The amino acid pattern of urinary acid-soluble peptides(ASP) from rats fed on a casein diet compared with that of rats fed on a protein-free diet. Values are means with their standard errors for the rats fed on the casein diet and horizontal lines those for the rats fed on a protein-free diet. (o), Values are reduced to a scale of one-tenth the actual size.

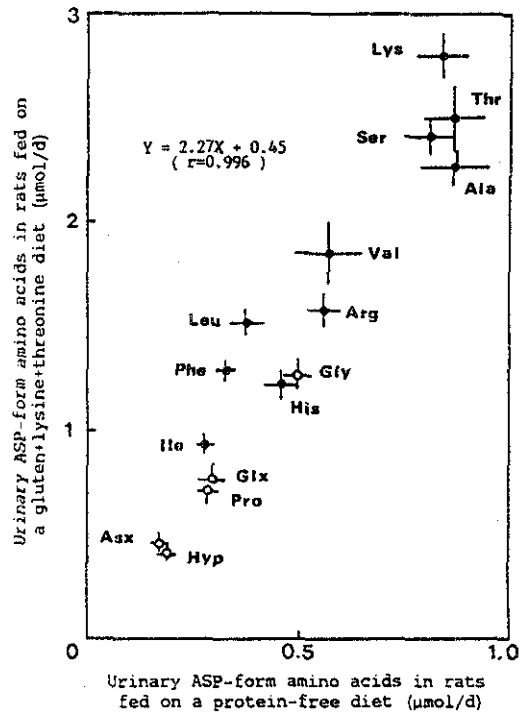


Fig. 4. The amino acid pattern of urinary acid-soluble peptides(ASP) from rats fed on a gluten supplemented lysine and threonine diet (GLT) compared with that of rats fed on a protein-free diet. Values are means with their standard errors for five rats for each group. Vertical lines represent the standard errors of the means for the rats fed on the GLT diet and horizontal lines those for the rats fed on a protein-free diet. (o), Values are reduced to a scale of one-tenth the actual size.

중 ASP가 내인성의 대사 생성물이라는 것을 나타내는 하나의 증거가 될 수 있다¹⁶. 그렇지만 식이 단백질의 일부는 실제로 펩타이드 형태로 흡수되어 다시 일부는 노중에 배설되는 것도 밝혀져 있다¹⁰. 그러나 본 실험의 조건에서 노중 ASP의 아미노산 pattern이 식이 단백질에 의해 거의 영향을 받지 않았다는 것은 실제 식이성의 펩타이드가 노중에 배설되고 있어도 그 양은 전체의 아미노산 pattern에 영향을 미칠 정도는 아니라고 생각되어진다. 단 gelatin을 다량 섭취시켰을 경우에는 주의할 요한다. 이유는 gelatin이 장내에서 다량의 저분자 펩타이드를 생성하여 그 대부분이 펩타이드 형태로 흡수되어 노중에 배설되기 때문이다¹³.

ASP가 내인성 대사 생성물인 것을 뒷받침하는 또 하나의 보고로서는 무단백질 식이를 한 흰쥐와 사람

의 1일 아미노산의 배설량은 대부분의 아미노산에 대해서 metabolic body size(체중^{0.75})에 비례해서 배설되고 있다는 것이다¹³. 이것은 내인성 질소 배설량이 metabolic body size에 비례해서 배설되고 있다는 것¹⁹과 함께 고려하면 노중 펩타이드량은 내인성 질소의 배설량에 비례한다고 볼 수 있다. 그러므로 산가용성 펩타이드와 질소의 배설비율로 식이 단백질의 이용효율 계산이 가능하게 되는 것이다.

이와같은 배경에서 식이 단백질의 질을 달리하여 각 단백질의 체내 이용효율을 ASP-form 아미노산의 배설량으로 부터 추정하였다. 즉 흰쥐에 있어서 체내 질소 대사상태를 양적으로 파악하기 위해 다음과 같은 가정을 기초로 하여 계산하였다.

(1) 무단백질 식이의 노중 질소 배설량은 내인성 질소량으로 한다.

(2) 그 외 단백질 식이군의 내인성 질소량은 노중 ASP-form leucine+valine (Fig. 2, 3, 4에서 보면 어느 아미노산이든지 거의 비례적으로 구성되어 있으므로 leucine과 valine을 합한 값을 취하여 계산하였다.) 배설량에 비례하는 것을 가정하여 무단백질 섭취시의 노중질소배설량×식이단백질 섭취시의 ASP배설량/무단백질 섭취시의 ASP배설량=내인성 질소배설량의 식에 의해 계산하였다.

이렇게 해서 계산한 결과 (Table 3), 3종류의 단백질 섭취 군에서 내인성 질소의 배설량은 유의적인 차이가 보이지 않았다. 이것은 정상적인 상태에서 체 단백질의 합성과 분해는 비례한다는 것²⁰과, 또 내인성 질소량을 체 단백질의 분해량으로 볼 때, C식사와 G식사에서 체 단백질 합성 속도가 유의적인 차이가 보이지 않았다는 결과²¹와 거의 같은 경향을 보여주고 있다. 그러나 외인성 질소의 배설량은 G식이 다른 2식이군에 비해 1.5~2.5배 정도 많았다. 즉 gluten단백질이 질적으로 우수하지 못하기 때문에 체내 이용효율이 낮아서 체외로 배설된 질소량이 많다는 것을 의미한다. 각 단백질의 이용효율을 (섭취질소량-외인성질소량/섭취질소량×100)의 계산식에 의해 계산해보면 G식이 74±1%, C식이 93±4%, 그리고 GLT식은 91±2%로 나타났으며, 이것을 다른 연구자들^{22,23}과 비교하면 많고 적음의 차이는 다소 있으나 거의 같은 경향을 보여주고 있다. 이와 같은 시도는 계산의 일부를 가정에 기초를 두고 있지만, 방법적인 면에서는 완전히 새로운 것으로 생각한다. 일반적으로 단백질을 섭취할 경우 노중에 배설되는

질소의 기원이 내인성인지 혹은 외인성인지를 구별하는 것이 어려우나 이 방법은 구별이 가능하다. 즉 노중 질소가 체내 대사과정을 통하여 생성된 내인성 질소인지 아니면 섭취한 단백질원이 흡수되었다가 일부가 이용되지 않고 그대로 노중에 배설된 것인지의 구별이 가능하기 때문에 노중 펩타이드와 질소량의 측정으로 이용율의 판단이 가능한 것이다.

그러므로 본 연구 조건에서도 노중 펩타이드가 단백질 영양평가의 지표로 될 수 있다는 것을 확인하였다. Haper²⁴, Bodwell²⁵ 그리고 FAO/WHO/UNU²⁶ 등에서 단백질 영양평가를 “보다 빠르고, 보다 적은 비용으로 평가할 수 있는 방법이 필요하다”고 지적하고 있듯이 종래의 N-balance법과 비교하면 이 방법은 훨씬 간단하기 때문에 영양학 분야 뿐만아니라 임상 분야에도 응용이 가능하리라고 생각한다.

그래서 본 연구자는 보다 더 실용적인 방법으로 만들기 위해 총 아미노산의 측정만으로 방법의 대체가 가능한가를 검토해서 더 간략하게하고, 또 아미노산 분석기를 어느 곳에든지 이용할 수 있는 것이 아니기 때문에 아미노산 정량으로 대신하고자 하는 가능성도 검토 중에 있다. 그리고 노중 펩타이드의 기원에 관해서도 아직 밝혀져 있지 않아 이에 대한 연구도 계속되어야 한다고 생각된다.

요 약

식이 단백질의 질적인 차이에 의해 노중에 배설되는 산가용성 펩타이드의 배설과 단백질의 체내 이용효율을 검토하였다. PF식이의 산가용성 펩타이드의

Table 3. Summary of N intake, urinary N excretion and the supposed origin of urinary N in rats fed on various protein diet compared with that of rats fed on a protein-free diet

	PF*	G*	C*	GLT*
Dietary N(mg/d)		221±10**	271±18	292±7
Total urinary N(mg/d)	13±1	106±6 ^a	43±5 ^b	74±4 ^{c***}
Exogenous N	0	71±4 ^a	8±7 ^b	27±5 ^c
Endogenous N	13±1	35±3 ^a	43±3 ^b	46±2 ^b
Efficiency of dietary N(%)		74±1 ^a	93±4 ^b	91±2 ^b

*PF : protein-free diet

G : gluten diet

C : casein diet

GLT : gluten supplemented with lysine and threonine diet

**Values are means with their standard errors for five rats per group.

***^{a,b,c} Groups with unlike superscript letters were significantly different (p<0.05 or less) by Duncan's multiple range test.

배설량과 ASP-form 아미노산 pattern을 G식이, C식이, GLT식이 군과 비교한 결과, 각 단백질식이군에서 산가용성 펩타이드 배설량이 많았지만, 산가용성 펩타이드를 구성하고 있는 아미노산의 조성은 거의 유사하였으므로 노중 펩타이드가 내인성 대사 생성 물질임이 확인되었다. 그리고 노중에 배설되는 산가용성 펩타이드를 토대로 각 식이 단백질의 체내 이용효율을 계산한 결과 G식은 74±1%, C식은 93±3%, GLT식은 91±2%였다.

문 헌

- Hansen, H. and Fittkau, S. : Über peptide im menschlichen Harn. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **313**, 152(1958)
- Ansorge, S., Fittkau, S. and Hanson, H. : Vergleichende untersuchungen über die ausscheidung von peptiden im Harn stoffwechselgesunder Personen. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **324**, 17(1961)
- Skarzynski, B. and Sarnecka-Keller, M. : Peptides in human urine. *Advances in Clinical Chemistry*, **5**, 107(1962)
- Meilman, E., Urivetzky, M. M. and Rapoport, C. M. : Urinary hydroxyproline peptides. *J. clin. Invest.*, **42**, 40(1963)
- Ansorge, S. and Hanson, H. : Zur Ausscheidung von peptiden im menschlichen Harn. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **348**, 334(1967)
- Hanson, H. and Ansorge, S. : Zur ausscheidung von peptiden im menschlichen Harn. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **348**, 347(1967)
- Prockop, D. J. and Kivirikko, K. I. : Relationship of hydroxyproline excretion in urine to collagen metabolism. *Annals of Internal Medicine*, **66**, 1243(1967)
- Takita, T., Miyoshi, K., Kumada, K. and Nishi, H. : systematic separation of human urinary peptides. *Agric. Biol. chem.*, **38**, 745(1974)
- Askenasi, R. : Urinary excretion of free hydroxylysine, peptide-bound hydroxylysine and hydroxylslyl glycosides in physiological conditions. *Clinica Chimica Acta*, **59**, 87(1975)
- Asatoor, A. M., Milna, M. D. and Walshe, J. M. : Urinary excretion of peptides and hydroxyproline in Wilson's disease. *Clin. Sci. Mole. Med.*, **51**, 369(1976)
- Matsuki, H., Yoshio, Y. and Nishi, H. : Forms of aspartic acid in human urine. *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 851(1976)
- Szymanowicz, A., Malgras, A., Randoux, A. and Borel, J. P. : Fractionation and structure of several hydroxyproline-containing urinary peptides, with special reference to some 3-hydroxyproline-containing peptides. *Bioch. Biophys. Acta*, **576**, 253(1979)
- Noguchi, T., Okiyama, A., Naito, H., Kaneko, K. and Koike, G. : Some nutritional and physiological factors affecting the urinary excretion of acid soluble peptides in rats and women. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 647(1982)
- Noguchi, T., Nam, T. J., Kato, H. and Naito, H. : Further studies on the nutritional factors affecting the urinary excretion of acid-soluble peptides in rats. *Bri. J. Nutr.*, **60**, 321(1988)
- Takahashi, S. I., Kato, H., Takahashi, A., Noguchi, T. and Naito, H. : Mode of action of bestatin and leupeptin to induce the accumulation of acid soluble peptides in rat liver in vivo and the properties of the accumulated peptides. The important role of bestatin-and leupeptin-sensitive proteases in the protein degradation pathway in vivo. *Int. J. Biochem.*, **19**, 401(1987)
- National research council : *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*, 3rd ed., National Academy of Sciences, Washington, D. C., p.23(1978)
- Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. : *Principles and procedures of statistics*, McGraw-Hill Book Co., New York(1980)
- 内藤 博, 杉本悦朗, 安本教博, 桐山條八, 菅野道廣, 吉田 昭, 岩井和夫, 船引龍平, 木村條一 : 新栄養化学, 朝倉書店, 東京, p.50(1988)
- Mitchell, H. H. : *Comparative Nutrition of Man and Domestic Animals*, vol. 1, Academic Press, New York and London, p.129(1962)
- Waterlaw, J. C. and Jackson, A. A. : *Nutrition of man*, Waterlow, J. C. (eds.), Churchill Livingstone, London, p.5(1981)
- Nam, T. J., Noguchi, T., Funabiki, R., Kato, H., Miura, Y. and Naito, H. : Correlation between the urinary excretion of acid-soluble peptides, fractional synthesis rate of whole body proteins, and plasma immunoreactive insulinlike growth factor-1/somatomedin C concentration in the rat. *Bri. J. Nutr.*, **63**, 515(1990)
- Hayase, K., Yokogoshi, H. and Yoshida, A. : Effect of dietary proteins and amino acid deficiencies on urinary excretion of nitrogen and the urea synthesizing system in rats. *J. Nutr.*, **110**, 1327(1980)
- Pellett, P. L. and Young, V. R. : *Nutritional Evaluation of Protein Foods*, The United Nations University, Tokyo, p. 50(1980)

24. Haper, A. E. : In "*Protein in Human Nutrition*", Porter, J. W. G. and Rolls, B. A., (eds.), Academic Press, London and New York, p. 349 (1976)
25. Bodwell, C. E. : *Evaluation of Proteins for Humans*, Avi Publishing Co., Westport, Connecticut, p. 119(1977)
26. Food and Agriculture Organization/World Health Organization/United Nations University : *Energy and Protein Requirements*, WHO, Geneva, p. 52 (1985)

(1990년 12월 18일 접수)