

녹엽단백질 급여가 흰쥐 혈청 콜레스테롤 및 유리 아미노산 농도에 미치는 영향

조영수[†] · 김성규 · 김도훈 · 정순재 · 차재영*

동아대학교 생명자원과학부

*佐賀大學農學部應用生物科學科

Leaf Protein Affect the Concentration on Serum Cholesterol and Free Amino Acids in Rats

Young-Su Cho[†], Sung-Kyu Kim, Doh-Hoon Kim, Soon-Jae Jeong and Jae-Young Cha*

Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan 604 714, Korea

*Department of Applied Biological Science, Saga University, Saga 840, Japan

Abstract

Leaf protein (LP) was prepared by centrifugation the green juice from Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) at acid precipitation. LP was compared with casein and soybean protein isolate for their concentration of serum lipids and free amino acids in Wistar male rats for 2 weeks. Each protein source was incorporated into cholesterol free, low-fat diet to provide a protein level of 20%. A comparison of serum amino acids in leaf protein-fed vs. casein-fed rats showed that, glycine was the only amino acid having a higher concentration whereas concentration of other amino acids were lower in the leaf protein-fed rats compared with the casein-fed rats. Further alanine was significantly lower in the leaf protein-fed rats compared with the casein-fed rats, and the protein-induced differences in glycine and alanine concentration of unfed rats were reproducible. Concentration of several amino acids, particularly valine, leucine and tyrosine, also changed when serum cholesterol concentrations varied, but these effects could not be explained by our experiments. The results suggest that a change in serum concentration of glycine and alanine of unfed rats may be related to the change in serum cholesterol concentration. These data also suggest appear to function in a similar way to soybean protein in their hypocholesterolemic action.

Key words : leaf protein, casein, soybean protein, serum lipid, free amino acids.

서 론

단백질 및 아미노산은 생체구축물질, 생리활성물질 또는 침투압 조절과 완충작용이 있는 물질로서 특히 중요한

다. 그러므로 단백질은 인체에 있어서 필수적인 영양소이지만 최근 기후 환경변화 등에 의하여 수급량이 불안정하며, 아울러 인구증가에 따라 개발도상국에서는 섭취량이 부족하게 현재의 실정이다. 따라서 양질의 경제적인 단백

[†] Corresponding author

질 자원을 개발하는 연구는 대단히 중요하다고 인식되어 오래전부터 실행되어지고 있다. 미래의 새로운 단백질 원으로서 연구 대상인 단백질 자원으로는 미생물단백질(SCP), 어류단백질 농축물(FPC), 녹엽단백질 농축물(LPC) 등을 들 수 있다. 여기서 녹엽단백질은 비교적 균형을 취한 아미노산조성을 하고 있고, 본래는 대두단백질에 필적하는 영양가를 가지고 있지만[14], Leaf Protein(이하 LP) 제조과정에서 단백질의 열화가 일어나 영양가가 저하되고 있다. 열화를 방지하기 위하여 갈변을 방지시켜 녹엽단백질을 조제하고 섭취 시의 영양 생리학적 측면에서 안전성을 검토하기 위하여 원료초로서 일반적으로 널리 사용되어지고 있는 알팔파 및 이탈리아인 라이그라스로부터 추출한 LP에는 혈청 콜레스테롤 저하 작용이 있다는 것을 저자는 보고하였다[8]. 아울러 LP에 공존하고 있을 것으로 추측되는 물질 중에서 LP와 결합하고 있는 섬유소[6], 페놀산류[9], 식물성 에스트로겐 작용 물질인 coumestrol[4]에는 흰쥐의 혈청지질 저하작용이 없다는 것을 밝혔다. 그리고 제조 과정 중에서 일어나는 효소적 갈변에 의한 영향에 대한 것[3]과 갈변물질에 의한 것[5]도 저하 작용이 없다는 것을 밝혔으며, 사포닌 함량에 의한 영향도 검토한 결과 LP에 함유된 양으로서는 저하 작용에 영향이 없다는 것[7]을 보고하였다. 따라서 LP의 혈청 지질 저하작용은 단백질 자체의 작용에 의한 것이라고 생각되어져, 이러한 생각을 지지해 주는 것으로서는 LP의 아미노산 조성중 arginine, lysine, glycine, methionine의 함량 비율이 대두 단백질의 그것과 유사한 것[18,19]을 들 수 있다.

여기서 본 연구는 위에서 서술한 제한적인 점을 더욱 확인하기 위하여 사포닌을 함유하지 않은 이탈리아인 라이그라스로부터 갈변을 방지하여 white LP를 제조, 흰쥐에 급여, 혈청 지질 농도 및 혈중 유리 아미노산 패턴에 대하여 단백질원으로 대두단백질 및 카제인과 비교하였으며 아미노산 조성의 차가 혈청 콜레스테롤 농도에 대하여 어떠한 관련이 있는지를 검토하였다.

재료 및 방법

이탈리아인 라이그라스 white LP조제

본 실험의 LP조제에 사용한 목초는 Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.)로써 출수 전의 잎과 줄기를 사

용하여 카터로 3cm 크기로 절단 후, 목초 중량과 같은량의 물에 갈변방지를 위하여 0.5% ascorbic acid 용액을 가하면서 chopper에서 2회 마쇄시켰다. 마쇄물을 마로 만든 자루에 넣어 수동 압착기에서 압착시켜 녹색의 즙액과 섬유소 부분을 분리하였다. 얻어진 녹색즙액의 pH를 조정하지 않고, 고속냉동 원심분리기 (Hitachi, Himac, Centrifuge)로 5℃ 10,000rpm에서 30분간 원심분리하여, 즙액으로부터 grana 녹엽체 파편을 제거하였다. 상징액인 담황녹색의 즙액을 모아 20% HCl용액을 사용하여 즙액의 pH를 4.2로 조정하여 단백질을 응고시켜 하루밤 냉장소에 방치시킨 후, 단백질을 분취시켰다. 분취시킨 단백질 응고물을 아세톤으로 6회, 믹서를 사용하여 추출 세정후 디에칠에테르에서 3회 세정후 건조시켜 갈변 방지된 회백색의 이탈리아인 라이그라스 white LP를 얻었다. 그리고 대조군으로서 동물성 단백질인 카제인 (Vitamine free casein, Sigma 사제)과 80% 에탄올 추출처리 분리 대두 단백질 (Fuji-Pro R, Fujifurina protein, Osaka, Japan)을 사용하였다.

실험동물 및 사육조건

실험은 1과 2로 나누어서 실시하였다. 실험동물은 4주령의 90g 전후의 Wistar계 흰쥐 수컷을 사용하였으며, 본 실험 시작전 1주일간 시판용 식이 (Nippon Clea, CE-2)로서 예비 사육후 개별 체중을 측정, 각 군이 균등하게 5마리씩 분리시켜 스테인레스 개별 케이지에서 14일간 실험용 식이로서 사육한 후 실험 최종일에 15시간 절식시킨후 에테르 마취하에서 경동맥에서 채혈, 30분간 실온에서 방치시킨후, 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리 혈청지질분석에 사용하였다. 사육환경은 온도 22±2℃, 습도 60%로 조절하였고, 조명은 12시간 (07:00~19:00)으로 하였으며 물과 식이는 자유급여시켰다. 실험 1의 식이조성은 Nagata[20] 등의 보고를 참고로한 식이로서 Table 1과 같다. 단백질 시료의 혼합비율은 단백질 시료의 질소함량, 단백질 소화율을 고려하여 LP 25.5%, 대두단백질 22.5%, 카제인 20.0%로 하였다. LP의 소화율은 이탈리아인 라이그라스 white LP의 소화율이 카제인, 대두단백질의 소화율보다 7~9% 낮았기 때문에 10% 낮게 설계하였다. 실험 2는 단백질원을 카제인 15%와 카제인 20%와 그에 상응하는 대두단백질 23.5%를 실험1의 식이 조성에 따라 설계하였다. 한편 부검은 채혈한 후 복부 정중선을 따라 개복하

Table 1. Composition of experimental diets (%)

Ingredient	Dietary group		
	Italian ryegrass white leaf protein	Soybean protein	Casein
Italian ryegrass white leaf protein*	25.5	-	-
Soybean protein	-	22.5	-
Casein	-	-	20.0
Corn oil	1.0	1.0	1.0
Mineral mixture**	4.0	4.0	4.0
Vitamin mixture***	1.0	1.0	1.0
Cellulose powder	2.0	2.0	2.0
Sucrose	66.5	69.5	72.0

* Made with attempt to prevent browning.

** Phillips-Hart 's salt mixture.

*** Oriental vitamin mixture.

여 장기중 간장과 맹장을 적출하여 칭량하였고, 단백질 소화율은 시험기간 최후 3일간 분을 모아서 동결건조시킨후 분석하고, 섭취 질소량과 분중질소량으로부터 단백질의 소화율을 산출하였으며 체중은 4일에 한 번씩 증가량을 확인하였다.

화학분석

질소는 Micro Kjeldahl법에 의했으며, 수분 및 조회분은 AOAC공정 분석법[1]으로 정량하였다. 시료 단백질의 아미노산 분석은 단백질 시료 약 10~20mg을 가수분해용 시험관에 정평하여 6N-HCl 6ml를 가하여, 질소가스를 충전시키면서 탈기, 봉관하고, 110℃에서 24시간 가수분해시킨 후, 개관하여 염산을 제거, pH 2.2 sodium citrate buffer에 용해시켜 25ml로 정용한후 아미노산 자동 분석기 JLC-6AH (Nippon Densi Co, Japan)로 분석하였다. cystine은 performic acid로 산화시킨후 가수분해시켜 cysteic acid로서 정량하였다. 한편 혈중유리 아미노산은 6% sulfosalysilic acid 용액과 혈청을 등량 혼합, 하루밤 방치후 4,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상정액 1ml를 pH 2.2 sodium citrate buffer 2ml 과 혼합한 것을 분석용 시료로서 아미노산 자동분석기 JLC-6AH (Nippon Densi Co., Japan) 로 분석하였다. 그러나, lysine과 orothernine은 표준법 (50℃) 에서 분리되지 않았기 때문에 칼럼온도를 30℃로 유지하면서 분석하였다. 즉, 염기성 아미노산의 경우는

칼럼온도 50℃와 30℃ 양쪽에서 분석을 하였다. 혈청 중의 cystein 양은 양이 적어서 3종류 급여 단백질군에서 모두 측정되지 않았다. 총 콜레스테롤 농도는 효소법을 이용한 kit (Sterozyme 545, Fuji Lebio Co., Tokyo Japan) 로서, 트리글리세라이드 농도는 triglyceride G-test kit (Wako Pure Chemical Co., Osaka Japan) 로 HDL-콜레스테롤 농도는 heparine-Mn 침전법을 이용한 HDL-Cholesterol test kit (Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan) 로서 분석하였다. LDL-콜레스테롤 함량은 총 콜레스테롤 농도에서 HDL-콜레스테롤을 뺀 Friedewald의 식으로 계산하였다 [10]. 분중 콜레스테롤 함량은 Kates 방법[17]에 따라서 추출, 혈청 총 콜레스테롤과 같은 방법으로 측정하였으며, 분중 담즙산은 Kalek 등[16]의 방법에 따라서 추출, 담즙산 측정용 시약 kit (Kyokuto bile acid reagent, Kyokuto Seiyaku Kogyo Co., Tokyo Japan) 로서 측정하였다. 실험 결과 통계처리는 각 분석 항목에 따라 평균 ± 표준편차를 구하였으며 처리군별로 평균치간의 유의성은 Duncan의 다중 검정법으로 5% 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 이탈리아인 라이그라스 white LP의 질소 함량 및 구성 아미노산 조성

Table 2에는 갈변을 방지하여 조제한 white LP의 질소, 조회분함량 및 아미노산 조성을 표시하였다. 무수물중 단백질 함량은 89.44%로서 대두단백질 시료와 거의 차가 없을 정도로 향상되었다. 이번 white LP는 산침전법에 의하여 분취하여 앞의 실험에 의한 열응고에 의하여 분취한 것과의 차이도 있고, 줄기 및 잎을 분쇄할 때 아스코르빈산 용액을 사용하여 갈변을 방지시킨 것이 LP의 질소함량을 높인 하나의 원인으로 생각되어져 전보[13]에서 서술한 것과 같이 갈변화가 단백질의 질소함량을 저하시킨다는 결과와 일치한다. Jones 등[15]은 Fraction-1-단백질의 분리 때 폴리페놀 산화물의 형성을 방지하는 것의 중요성을 기술하고 있는것과도 관련있는 것으로 생각되어진다. 아미노산 조성을 보면 전보[12]의 이탈리아인 라이그라스 white LP의 아미노산 조성과 매우 유사한 것으로보아, 가열응고 LP와 산침전에 의한 LP분취법에서 아미노산의 영양가 손상은 나타나지 않은 것으로 생각되어진다.

Table 2. Amino acid composition of Italian ryegrass white LP made with attempt to prevent browning

	mg amino acid per g-N	g amino acid per 100g recovered amino acids
Lys	424	6.48
His	183	2.80
Arg	423	6.47
Asp	657	10.04
Thr	330	5.04
Ser	268	4.10
Glu	847	12.93
Pro	323	4.94
Gly	348	5.32
Ala	449	6.86
Val	458	7.00
Met	165	2.52
Ile	344	5.26
Leu	594	9.08
Tyr	319	4.88
Phe	410	6.27
Total	6542	100.00

Nitrogen and crude ash contents on dry matter basis (%) : nitrogen 14.31, crude ash 3.45.

2. 실험 1 : 단백질 수준 20.0% 식이를 급여했을때의 혈중 콜레스테롤 및 유리 아미노산 농도

Table 3에는 이탈리아 라이그라스 white LP, 대두단백질 및 카제인을 급여한 흰쥐의 식이섭취량, 체중증가량, 분배설량, 단백질의 소화율을 나타내었다. 식이 섭취량에는 차가 없었으며, 체중증가량은 이탈리아 라이그라스 white LP 및 대두단백질 2군이 카제인군에 비해 낮았으나, LP군은 유의차가 인정되었다(P<0.05). 단백질 소화율에서는 차

가 작았으나, 분산이 작기 때문에 3군간에 5%수준에서 유의차가 인정되었다. 그러나 white LP의 소화율은 92.6%로서 대두단백질 (93.7%)에 매우 가깝고, 갈변을 방지하지 않고 조제한 이탈리아 라이그라스 white LP의 87.9% 보다 향상되었다. 이러한 것도 전보에 의한 보고[12]에서와 같이 잘 일치되고, 효소적 갈변반응이 이탈리아 라이그라스 LP의 소화율을 저하시켰다고 생각된다. Table 4에는 이탈리아 라이그라스 white LP, 대두단백질, 카제인을 급여한 흰쥐의 혈청지질농도 및 분중 지질농도를 표시하였다. 혈청 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤에 대해서보면, 카제인군에 비하여 이탈리아 라이그라스 white LP군은 유의적으로 낮은 값을 나타내고, 대두 단백질군과 같은 정도의 농도이다. 트리글리세라이드도 총 콜레스테롤 농도와 같은 경향을 나타내고 있다. 이와 같이 전보의 결과[12]와 관련시켜 보면, 알팔파 및 이탈리아 라이그라스 미분획, 분획 LP의 전체에 대하여, 카제인에 비하여 일관적으로 대두 단백질과 같이 혈청 총 콜레스테롤, 트리글리세라이드를 강하시키는 것이 인정되었다. 다음으로 분중 지질농도에서 콜레스테롤 배설 농도를 보면, 카제인 급여군에 비하여, LP 급여군의 분중콜레스테롤 농도는 5% 수준에서 유의적으로 증가하였으나, 대두단백질군에 비하여 증가하였으나 유의적인 차는 인정되지 않았다. 또, LP 군의 담즙산 농도는 역으로 5% 수준에서 저하하였다. 이러한 결과는 전보에서 보고한 결과와 같은 경향이다. 즉, LP 급여에 의하여 분중 콜레스테롤 농도의 증가는 혈청 총 콜레스테롤 강하의 하나의 원인으로 되기 때문이다. 그러나, 종래의 보고에 있어서, 대두 단백질 및 웨이 단백질을 급여시킨 흰쥐에 있어서, 분중 콜레스테롤의 증가를 동반하지 않고도 혈청 콜레스테롤의 강하가 나타나는 경우도 있기 때문에

Table 3. Feed intake, body-weight gain, fecal weight and protein digestibility in rats given Italian ryegrass white LP, soybean protein or casein (Mean ± S. D. for five rats/group)

	Dietary group		
	Italian ryegrass white leaf protein*	Soybean protein	Casein
Feed intake (g/14 days)	158.5 ± 2.0	159.8 ± 0.3	158.2 ± 1.0
Body-weight gain (g/14 days)	52.8 ± 1.5 ^a	54.3 ± 2.0 ^{ab}	56.4 ± 2.1 ^b
Fecal weight (g/3 days)	1.01 ± 0.08 ^b	0.96 ± 0.06 ^{ab}	0.79 ± 0.04 ^a
Protein digestibility	92.6 ± 0.4 ^a	93.7 ± 0.5 ^b	95.3 ± 0.5 ^c

a, b, c : Values with different superscripts on the same horizontal line are significantly different at p<0.05.

*: Made with attempt to prevent browning.

녹엽단백질 급여가 흰쥐 혈청 콜레스테롤 및 유리 아미노산 농도에 미치는 영향

Table 4. Serum and fecal lipids in rats given Italian ryegrass white LP, soybean protein or casein (Mean ± S. D. for five rats)

	Dietary group		
	Italian ryegrass white leaf protein*	Soybean protein	Casein
Serum lipids (mg/100ml)			
Total cholesterol	75.2 ± 6.8 ^a	77.2 ± 9.5 ^a	112.1 ± 10.2 ^b
HDL-cholesterol	34.2 ± 2.9	31.6 ± 3.2	35.4 ± 1.9
LDL-cholesterol	40.7 ± 8.1 ^a	45.6 ± 9.1 ^a	77.2 ± 8.1 ^b
Triglyceride	120.1 ± 8.5 ^a	137.6 ± 20.6 ^a	198.5 ± 12.3 ^b
Fecal lipids (mg/day)			
Total cholesterol	2.31 ± 0.33 ^b	1.86 ± 0.23 ^b	1.36 ± 0.21 ^a
Bile acid	0.51 ± 0.10 ^a	0.85 ± 0.16 ^b	0.89 ± 0.23 ^b

a, b, c : Values with different superscripts on the same horizontal line are significantly different at p<0.05.

* : Made with attempt to prevent browning.

[23,24] 분중 콜레스테롤 배설농도가 혈청 콜레스테롤 강하작용과 어떠한 관련이 있다고 하더라도, 혈청 총 콜레스테롤 강하작용의 전부를 설명하는 것은 아니라고 생각된다. 그리고, 트리글리세라이드의 강하는 다른 이유에 의한

것으로 생각되어진다.

Table 5에는 각 단백질 급여군의 14일간 섭취 아미노산 및 흡수 아미노산량을 Table 6에는 혈중 유리아미노산양을 표시하였다. 흡수아미노산량은 섭취 아미노산량에 각

Table 5. Amount of amino acids ingested and absorbed in rats given Italian ryegrass white LP, soybean or casein

	Italian ryegrass white LP		Soybean protein		Casein	
	intake	absorption	intake	absorption	intake	absorption
Feed intake (g)	158.5		159.8		158.2	
Protein level in feed (%)	25.5		22.5		20.0	
Nitrogen content of protein (%)	12.57		13.83		13.90	
Nitrogen intake (g)	5.08		4.95		4.40	
Protein digestibility (%)		92.6		93.7		95.3
Lys	2.15	1.99	1.98	1.86	2.23	2.13
His	0.93	0.86	0.84	0.79	0.89	0.85
Arg	2.15	1.99	2.23	2.09	1.10	1.05
Asp	3.34	3.09	3.66	3.43	2.17	2.07
Thr	1.68	1.56	1.31	1.23	1.36	1.30
Ser	1.36	1.26	1.69	1.58	1.78	1.70
Glu	4.30	3.98	6.59	6.18	7.27	6.93
Pro	1.64	1.52	1.98	1.86	3.93	3.75
Gly	1.77	1.64	1.36	1.27	0.58	0.55
Ala	2.28	2.11	1.47	1.38	0.91	0.87
Cys	(0.38)*	(1.35)*	0.40	0.37	0.14	0.13
Val	2.33	2.16	1.76	1.65	2.13	2.03
Met	0.84	0.78	0.37	0.35	0.83	0.79
Ile	1.75	1.62	1.76	1.65	1.77	1.69
Leu	3.02	2.80	2.62	2.46	2.85	2.72
Tyr	1.62	1.50	1.26	1.18	1.76	1.68
Phe	2.08	1.93	1.79	1.68	1.61	1.53
Total	33.62	31.14	33.07	31.01	33.31	31.77

*: Calculated from the cysteine value in unfractionated leaf protein.

각의 단백질 시료의 소화율을 곱한 것이다(Table 3). 섭취 총량, 흡수총량은 카제인군이 약간 많지만, 3군간에 큰 차이는 없었다. 개개의 아미노산에 대하여 보면, LP 군은 glutamic acid의 양이 다른 2군보다 적고, 대두 단백질군에는 methionine이 다른 2군의 약 반이하로 적고, arginine 양도 약 반정도로 적은 것 등이 눈에 띄는 점이다.

다음은 혈중 유리아미노산량을 (Table 6) 보면 첫째로 아미노산 함계량이 LP 군, 대두 단백질군 같이 카제인군보다 5% 수준에서 유의적으로 낮았다. 둘째로 ornithine, lysine, histidine, arginine, aspartic acid, threonine, serine에 대해서는 3군간에 차는 없었지만, glycine 만이 LP 군, 대두 단백질군에 있어서 카제인군에 비하여 5% 수준에서 유의적으로 높고, 나머지 아미노산은 5% 수준에서 유의적으로 낮았다. 셋째로, LP 군과 대두단백질군의 아미노산 패턴이 매우 유사성을 나타내었다. 그러나 이러한 것이 혈청지질 강하작용과 어떠한 관련이 있는가에 대해서는 여전히 검토를 요하는 것이며, 특히 많은 아미노산에 있어서

카제인군이 5% 수준에서 유의적으로 높았던 것은 단적으로 LP 및 대두 단백질의 아미노산의 이용율이 낮기 때문일지도 모른다.

3. 실험 2 : 카제인 수준 15.0% 및 20.0%의 식이를 급여했을때 혈중 콜레스테롤 및 유리아미노산 농도

대두단백질 23.5%, 카제인 20.0%, 카제인 15.0%의 3군의 식이를 급여했을때의 식이섭취량, 체중증가량, 혈청 콜레스테롤 및 트리글리세라이드 농도를 Table 7에 표시하였다. 카제인 15.0% 군에 약간의 식이를 남긴 것도 있었으나 섭취총량은 다른 군들간에 유의차는 없었다. 체중증가량도 카제인 15.0% 군이 낮은 경향이 보였지만, 유의차는 인정되지 않았다. 아마, 카제인의 제한 아미노산인 methionine 의 영향이 체중증가에 영향을 미치는 경계수준이 15.0%일 것으로 추정된다. 그러나, 혈청 총 콜레스테롤 농도는 식이중 단백질 함량을 어느정도 변동시키더라도 변화되지 않는 것으로 생각되어진다. 한편, 트리글리세라이

Table 6. Concentration of serum free amino acids in rats given Italian ryegrass white LP, soybean protein or casein (Mean±S. D. for five rats/, moles/100ml of serum)

Amino acid	Dietary group		
	Italian ryegrass white leaf protein	Soybean protein	Casein
Orn	9.1 ± 2.3	9.6 ± 1.9	11.5 ± 1.6
Lys	60.4 ± 5.7	64.4 ± 7.2	75.9 ± 12.0
His	7.6 ± 1.8	8.2 ± 0.8	9.0 ± 1.4
Arg	13.5 ± 2.0	14.8 ± 3.2	14.7 ± 2.3
Asp	3.7 ± 1.1	4.1 ± 1.2	5.1 ± 0.6
Thr	108.9 ± 13.6	101.1 ± 19.8	108.4 ± 7.5
Ser	40.2 ± 7.2	42.0 ± 6.6	40.2 ± 2.9
Glu	39.1 ± 7.1	36.1 ± 3.7	47.8 ± 3.7
Pro	20.0 ± 6.2	32.2 ± 6.6	56.0 ± 4.8*
Gly	38.4 ± 5.0	31.4 ± 4.4	20.7 ± 2.8*
Ala	54.5 ± 13.2	65.4 ± 9.7	85.2 ± 5.1*
Val	21.0 ± 4.2	28.0 ± 4.7	39.3 ± 3.3*
Met	8.5 ± 0.7	7.8 ± 0.7	12.2 ± 0.7*
Ile	9.9 ± 1.2*	13.9 ± 2.3	19.2 ± 1.9*
Leu	16.8 ± 2.3	20.5 ± 3.9	30.6 ± 2.3*
Tyr	13.0 ± 2.7	15.4 ± 1.3	23.2 ± 1.2*
Phe	7.8 ± 1.8	8.1 ± 1.2	10.4 ± 0.7*
Total	471.8 ± 58.3	503.0 ± 66.1	609.4 ± 37.5*

*: Significantly different from the corresponding values of Italian ryegrass LP and soybean protein groups (p<0.05).

†: Significantly different from the isoleucine value of soybean protein group.

녹엽단백질 급여가 흰쥐 혈청 콜레스테롤 및 유리 아미노산 농도에 미치는 영향

Table 7. Feed intake, body weight gain, serum lipids in rats given diets containing two different levels of casein or diet containing soybean protein (Mean±S. D. for five rats)

	Dietary group		
	Soybean protein 23.5%	Casein 15%	Casein 20%
Feed intake (g/14 days)	136.0± 1.7	134.1± 2.6	137.0± 0
Body weight gain (g/14 days)	30.6± 2.4	25.6± 3.4	31.0± 3.7
Serum lipids			
Total Cholesterol (mg/100ml)	68.5± 3.8 ^a	84.3±11.1 ^b	85.8± 5.8 ^b
Triglyceride (mg/100ml)	123.1±11.7 ^a	146.8±33.6 ^a	261.7±49.3 ^b

a, b: Values with different superscript letters on the same horizontal line are significantly different (p<0.05).

드는 식이의 카제인 함량을 20.0%로 부터 15.0% 로 감량시켰을 때 5% 수준에서 유의적으로 저하하고, 대두 단백질군과 유의차는 없을 정도로 되었다. 이때의 혈중 유리 아미노산량을 표시한 것이 Table 8 이다. 최초로, 대두 단백질군과 카제인 20.0% 군과를 비교하면, 대두 단백질군은 glycine만 높고, 다른 아미노산은 차이가 없든지, 혹은 유의적으로 낮아, 실험1의 경우와 매우 유사한 패턴이 얻어져, 혈중 유리 아미노산은 재현성이 있는 것이 인정되었다. 따라서 실험1에 비해 유리 아미노산의 합계치가 적고,

양자의 차도 적은 것은 실험2의 식이 섭취량이 적고, 체중 증가량도 적었기 때문으로 생각되어진다. 다음은 카제인 15.0% 급여군의 아미노산을 보면, 대두 단백질군에 비교하여 대부분의 아미노산에 있어서 차이는 인정되어지지 않고, 아미노산의 합계값도 거의 같았으나, glycine이 유의적으로 낮고 methionine 이 유의적으로 높은 경향은 카제인 20.0% 군과 변함이 없었다. 즉, 혈중 유리 아미노산량은 급여단백질의 양에 의하여 결정되지만, 특수아미노산(본 실험의 경우는 glycine 과 methionine) 의 농도는 단백질

Table 8. Concentration of serum free amino acids in rats given diets containing two different levels of casein or diet containing soybean protein (Mean±S. D. for five rats)

Amino acid	Dietary group		
	Soybean protein 23.5%	Casein 15%	Casein 20%
Lys+Orn	36.1±5.2	45.9± 5.8	37.1± 6.1
His	4.2±0.8	5.9± 1.2	4.4± 0.7
Arg	9.5±2.2 ^b	8.5± 1.8 ^b	5.7± 1.1 ^a
Asp	2.4±0.4	2.1± 0.5	2.5± 0.5
Thr	48.5±4.8	49.7± 3.5	49.4± 5.5
Ser	26.3±2.6	22.7± 1.7	21.8± 3.7
Glu	16.4±1.9	16.7± 1.0	16.0± 1.6
Pro	13.3±3.6 ^a	28.4± 6.7 ^b	17.1± 8.1 ^{ab}
Gly	19.9±0.9 ^b	12.7± 2.1 ^a	15.6± 2.4 ^a
Ala	27.2±2.8 ^a	35.4± 2.9 ^b	29.8± 3.8 ^{ab}
Val	10.0±1.5 ^a	19.7± 2.1 ^b	12.8± 3.7 ^a
Met	2.5±0.2 ^a	5.5± 0.5 ^b	4.5± 1.0 ^b
Ile	5.5±1.3 ^a	9.3± 1.0 ^b	6.5± 1.4 ^a
Leu	8.2±1.4 ^a	15.0± 1.9 ^b	9.6± 2.5 ^a
Tyr	7.9±1.2 ^a	11.0± 1.0 ^b	8.3± 1.2 ^a
Phe	3.3±0.6 ^a	4.9± 0.6 ^b	3.8± 1.0 ^{ab}
Total	241.2±8.0 ^a	293.4±13.6 ^b	244.9±15.3 ^a

a, b: Values with different superscript letters on the same horizontal line are significantly different (p<0.05).

질 종류의 영향을 받는 것으로 생각되어진다. 이상의 것으로부터 혈중지질과 혈중유리 아미노산과의 관련을 연관시켜 보면, 유리 아미노산 함게값이 낮은 것은, 콜레스테롤 농도와 관련이 없고, 트리글리세라이드와 관련깊은 것이 생각되어지고, 콜레스테롤과 트리글리세라이드의 강하작용 메카니즘은 다른 것으로 생각되어진다. 이것에 대하여 혈중 유리 glycine, methionine 은 대두 단백질군과 카제인군과의 사이에 카제인 함량의 차이에도 불구하고 특이한 차이가 인정되어 콜레스테롤 농도와의 관련이 추측되어진다. Sugiyama[23] 및 Sanches[21,22] 등은 식이중의 methionine 은 흰쥐의 혈청 콜레스테롤의 상승 작용을 억제하는 효과가 있다는것을 보고하고, 카제인의 콜레스테롤 상승작용은 대두 단백질에 비해 glycine 이 함량이 적고 methionine 함량이 높은 것과 관련있다고 서술하고 있다. 이탈리아인 라이그라스 white LP 및 대두 단백질의 Gly/Met 이 각각 2.11 및 3.67 인데 비하여, 카제인은 0.70 으로 낮고, 이것들의 단백질을 급여한 흰쥐의 혈청 Gly/Met 이 각각 4.51, 4.02, 1.70 과 카제인의 값이 매우 낮다. 이와같이 혈청 glycine, methionine 농도는 식이 단백질의 성질을 반영하고 있고, 단백질의 혈청 콜레스테롤 강하작용 메카니즘을 밝히는 단서가 될 것으로 생각되어진다.

Glutamic acid 는 아미노기 전이 반응 등을 통하여 아미노산 대사에 중요한 작용을 하며, alanine 도 근육으로 에너지를 보내기 때문에 간장과 근육간의 glucose · alanine 회로를 구성하고 있는 아미노산이다[2]. 이러한 점으로부터 생각해 보면 카제인의 alanine 함량이 낮음에도 불구하고 카제인 급여 흰쥐의 혈중 alanine 량이 LP 군 및 대두 단백질군의 경우보다 상승되고 있는 것은 카제인 급여군의 glucose · alanine 회로가 보다 활발하게 작용하고 있는 것을 나타내는 것으로 해석되어 이러한 단백질의 생리작용에 차이가 있는 것을 나타내는 하나의 예라고 볼수 있다. 이러한 결과는 Horigome and Cho[11]의 보고와도 일치하였다.

이상 실험1,2의 결과로부터 혈중 유리 아미노산 패턴을 급여 단백질의 종류에 의하여 어느정도 규제되어지고 있으며, 또 혈중 유리 아미노산 패턴이 혈청 콜레스테롤과 어떠한 관련이 있는 것이 인정되었다. 또 LP 와 대두 단백질의 혈중 유리 아미노산 패턴은 극히 유사한 것으로부터

LP 의 혈청 콜레스테롤 강하작용은 대두 단백질의 작용기와 유사하기 때문에 본 연구의 결과는 단백질의 구성 아미노산이 혈청 콜레스테롤 농도에 영향을 미치는 가설에 대하여 하나의 근거를 부여하는 것으로 생각되어진다.

요 약

이탈리안 라이그라스로부터 갈변을 방지시켜 white LP 를 제조하여 4주령의 Wistar 계 수컷 흰쥐에 14일 급여, 혈청지질농도 및 혈중 유리 아미노산 패턴에 대하여 단백질원으로 대두단백질 및 카제인 급여와 비교하였으며 혈중 유리 아미노산이 혈청 지질농도에 대하여 어떠한 관련이 있는지를 검토하였다. 갈변을 방지하여 조제한 LP 의 질소 함량 및 소화율이 거의 대두단백질 수준까지 높여 단백질의 품질에 대한 영향을 확인하였다. 혈청 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤은 카제인군에 비하여 이탈리아인 라이그라스 white LP 군이 유의적으로 낮고, 대두 단백질군과 같은 수준이었다. 이때 혈중유리아미노산을 비교한 결과, LP 군과 대두단백질군과는 거의 닮은 패턴을 나타내고 카제인군에 대해서는 glycine 만 높고 다른 아미노산은 차가 없든지 유의적으로 낮았다. 그리고, 카제인 수준을 15.0% 로 낮추어 대두 단백질과 비교하였다. 그 결과, 혈청 콜레스테롤 농도는 카제인군이 유의적으로 높고 혈중 glycine 농도가 낮고, methionine 농도의 높은 패턴은 일치하였다.

이상의 결과로부터 혈중 유리아미노산 패턴은 급여 단백질의 종류에 의해 어느정도 규제되어지며 아미노산 패턴은 혈청지질과 어떠한 관련이 있는 것으로 인정되었다. 더욱이, LP 와 대두단백질의 혈중 유리 아미노산 패턴은 매우 유사한 것이 관찰되어 LP 의 혈청 콜레스테롤 강하작용의 메카니즘은 대두 단백질의 메카니즘과 유사한 것으로 생각되어진다.

감사의 글

본 논문은 1997년도 동아대학교 학술연구구성비(공모 과제) 의 지원에 의하여 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. A.O.A.C. 1995. Official Methods of Analysis of the AOAC International 16th ed. pp 222-225. Wilson Boulevard. Arlington, Virginia.
2. Bender, D. A. 1985. *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*. pp139. Chapman and Hall New York.
3. Cho, Y. S. 1994. Effect of proteins modified by enzymically oxidized caffeic acid on the concentration of serum cholesterol of rats. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* **37**. 379-384.
4. Cho, Y. S. and Jung, K. K. 1993. Effect of fed isoflavones on serum cholesterol level in the rat. *Res. Bull. Inst. Agr. Reso. Dong-A Univ.* **2**, 77-81.
5. Cho, Y. S. and Jeong, S. J. 1995. Effect of proteins modified by enzymically oxidized caffeic acid on the concentration of serum cholesterol of rats. part 2. *Korean J. Life Science* **5**. 1-6.
6. Cho, Y. S. and Jeong, S. J. 1995. Effect of fed neutral detergent fiber prepared from leaf protein on serum cholesterol level in the rat. *Res. Bull. Inst. Agr. Reso. Dong-A Univ.* **4**, 89-94.
7. Cho, Y. S. and Horigome, T. 1989. Effect of alfalfa saponin on the serum cholesterol level in rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **18**, 430-434.
8. Cho, Y. S., Horigome, T., Sakaguchi, E. and Uchida, S. 1988. Effect of feeding of leaf proteins on serum cholesterol concentration in rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **41**, 127-132.
9. Cho, Y. S. and Kim, C. K. 1990. Effect of fed phenolic acids in plant on serum cholesterol concentration in rats. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**, 824-827.
10. Friedewald, W. T., Levy, R. I. and Fredrickson, D. S. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge, *Clinical Chemistry* **18**, 499-502.
11. Horigome, T. and Cho, Y. S. 1992. Dietary casein and soybean protein affect the concentration of serum cholesterol, triglyceride and free amino acids in rats. *J. Nutrition*, **122**, 2273-2282.
12. Horigome, T., Cho, Y. S. and Oshima, M. 1990. A study on the hypocholesterolemic activity of various leaf proteins of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) in the rat. *Ital. J. Food Sci.* **4**, 227-233.
13. Horigome, T., Cho, Y. S. and Uchida, S. 1986. Determinantal effect of remaining deproteinized juice quality of leaf protein after hot-air drying. *Jpn. J. of Zootech. Sci.* **57**, 654-662.
14. Horigome, T. and Uchida, S. 1980. An observation on the nutritional quality of leaf protein in connexion with its methionine content. *Jpn. J. Zootech. Sci.* **51**, 429-435.
15. Jones, W. T. and Lyttleton, J. W. 1972. The importance of inhibiting polyphenol oxidase in the extraction of Fraction 1 leaf protein. *Phytochemistry* **11**, 1595-1596.
16. Kalek, H. H., Stellard, F., Kruls, W. and Paumgartner, G. 1984. Detection of increased bile acid excretion by determination of bile acid content in single stool samples. *Clinica Chimica Acta* **140**, 85-87.
17. Kates, M. 1972. *Technique of Lipidology*. North-Holland, Amsterdam, pp 327-329.
18. Kritchevsky, D. 1975. Vegetable protein atherosclerosis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **56**, 135-140.
19. Kritchevsky, D., Tepper, S. A., Czarnecki, S. K. and Klurfeld, D. M. 1982. Atherogenicity of animal and vegetable protein-influence of the lysine to arginine ratio. *Atherosclerosis* **41**, 429-431.
20. Nagata, Y., Tanaka, T. and Sugano, M. 1981. Further studies on the hypocholesterolemic effect of soya-bean protein in rats. *Br. J. Nutr.*, **45**, 233-241.
21. Sanchez, A., Horning, M. C., Shavlik, G. W., Wingleth, D. C. and Hubbard, R. W. 1985. Changes in levels of cholesterol associated with plasma amino acids in humans fed plant proteins. *Nutr. Rep. Inter.* **32**, 1047-1056.
22. Sanchez, A., Horning, M. C. and Wingleth, D. C. 1983. Plasma amino acids in humans fed plant protein. *Nutr. Rep. Inter.* **28**, 497-504.
23. Sauiter, A., Dieng, K., Flament, C., Doucet, S., Suquet, J. P. and Lemonnier, D. 1983. Effect of whey protein, casein, soya-bean and sunflower proteins on the serum, tissue and fecal steroids in rats. *Br. J. Nutr.* **49**, 313-319.
24. Sugano, M., Ishiwaki, N. and Nakashima, K. 1984. Dietary protein dependent modification of serum cholesterol level in rats. *Ann. Nutr. Metab.* **28**, 192-199.
25. Sugiyama, K., Kushima, Y. and Kuramatsu, K. 1985. Dietary sulfur-containing amino acids and glycine as determinant factors in plasma cholesterol regulation in growing rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **31**. 121-125.