

◇總說◇

蛋白質 品質評價를 爲한 迅速方法

柳 洪 秀 · 李 康 鎬*

釜山水産大學 食品營養學科 釜山水産大學 食品工學科
(1985년 5월 11일 접수)

Rapid *In Vitro* Methods for Protein Evaluation

Hong-Soo Ryu and Kang-Ho Lee*

Department of Nutrition and Food Science, National Fisheries Univ. of Pusan

**Department of Food Science and Technology, National Fisheries Univ. of Pusan*

(Received May 11, 1985)

Abstract

The protein nutritional quality of foods has become an important factor to food processors with the advent of nutritional labeling regulations for foods. Then, as is true today, the officially approved assay for protein nutritional quality was the rat based protein efficiency ratio(PER) bioassay. The PER bioassay requires a minimum of 28 days to performe, and is therefore not applicable to routine quality assurance use by the food industry. Within the past ten years there has been a research emphasis placed on the development of rapid, inexpensive, biological and/or chemical based assays for protein nutritional quality. It was hoped that if a rapid assay could be developed and thoroughly tested, it could be used in lieu of the PER bioassay in the day-to-day quality assurance screening of food ingredients and products. The rapid assays developed in the hope of attaining this goal have been based on micro-organisms, proteolytic enzymes, and amino acid profiles, as well as combinations of the above. In this review, it will be described and briefly discussed many of procedures which had contributed conceptually as well as practically to the development of *in vitro* methods for the evaluation of protein quality. Special emphasis will be placed on the C-PER(computed protein efficiency ratio) assay which combines data from *in vitro* protease digestion and amino acid composition to predict protein nutritional quality designed by Satterlee et al.(1980), and the DC-PER(discriminant computed PER) which is a method of estimating protein quality based on rat assay and *in vitro* digestibility obtained using solely essential amino acid data will be also introduced.

1. 서 언

일반적으로 단백질의 품질을 측정하는 목적은 첫째로 단백질식품이 지니는 영양적인 잠재력을 바탕으로 이들 상호간의 순위를 정하거나, 이들 단백질식품을 전처리, 가공, 저장했을 때 발생하는 영양가의

변화를 예측하는 데 있으며, 두번째로 식품단백질이 나이의 혼합물들이 다양한 연령층의 신체 유지나 성장에 필요한 아미노산으로 전환되는 가능성을 예측하는 데 있다고 할 수 있다.¹⁾

식품단백질의 품질은, 포함되어 있는 아미노산의 총량과 조성, 정확하게 말하자면 필수아미노산의 함

량과 분포상태에 의하여 기본적으로 결정되나, 이와 더불어 이들 단백질의 소화율(또는 이용율) 및 소화 속도에 의해 결정되기도 한다. 또한 같은 품질의 단백질이라 할지라도 실험대상이 되는 생물체의 연령, 건강, 심리적인 조건 및 주위환경에 의하여 결과가 다양하게 나타난다고 알려져 있다.

단백질의 품질을 평가하기 위하여 지금까지 제안, 개발된 생물체 이용법(*In Vivo Assay*) 중에는 小動物(특히 흰쥐)을 이용한 단백질효율비(PER, protein efficiency ratio), 생물가(BV, biological value), 성장율(growth index), 총단백질비율(NPR, net protein ratio), 총단백질 이용율(NPU, net protein utilization), 소화율(true and apparent digestibility), 상대단백가(RPV, relative protein value) 및 상대질소 이용율(RNU, relative nitrogen utilization) 등과 腎臟의 transaminase의 활성을 측정하는 방법들을 들 수 있는데, 이 중 FDA와 AOAC가 권장, 공인하고 있는 표준 단백질 품질측정법은 1919년 Osborne 등이 제안한 단백질효율비(PER)라¹⁾ 할 수 있다. 그러나 단백질효율비(PER)를 측정하여 단백질 품질을 측정할 경우에는 다음과 같은 문제점이 제기되는데 즉, 섭취된 모든 단백질이 성장에만 이용되지 않으며 투여한 단백질의 양에 따라 그 결과가 다양하게 계산된다는 점,^{2,3)} 다른 방법으로 측정했을 때 같은 품질을 나타낼지라도 공존하고 있는 다른 성분의 함량(calcium 등)에 따라 그 값이 달라지며,⁴⁾ 小動物로 실험하기 때문에 그 결과를 成人에게 적용하기 보다는 幼兒하게 적용할 수밖에 없는 제한성을 가진다.⁵⁾ 이 방법의 기술상의 문제로는 28일 이상의 장시간 소요, 넓은 실험공간, 실험환경 및 장소의 차이에 따른 再現性의 결여와 실험자의 숙련도에 따른 결과의 다양성 때문에 이를 대체할 수 있는 다른 방법, 즉 시험관적인 방법(*In Vitro Assay*)이 고안되기에 이르렀다. 지금까지 고안, 개발된 시험관적인 방법을 대별하면 다음과 같이 세가지로 구분할 수 있다.

1) 총아미노산 또는 필수아미노산의 분석 정량과 개별 아미노산의 이용율을 측정하는 화학적인 방법(Chemical Assay)

2) 효소가수분해와 아미노산 조성을 함께 이용하는 방법(Enzymatic Hydrolysis Assay)

3) 미생물 이용법(Microbiological Assay)

본 고찰에서는 이상적인 시험관적 방법이 갖추어야 할 조건과, 이 방법들의 필요성을 다루는 동시에, 지금까지 개발된 중요 시험관적 방법의 장단점을 소개하여 실질적인 응용법을 모색하고자 한다.

아울러 비교적 최근에 개발되었던 비가지 효소를 이용한 *in vitro* digestibility 측정법⁶⁾, C-PER(computed protein efficiency ratio) 및 DC-PER(discriminant computed protein efficiency ratio)방법⁷⁾ 소개하여, 동물실험실이 제대로 구비되지 못한 식품공장이나 대학을 비롯한 제 연구기관에서의 단백질 품질평가에 조금이나마 도움을 주고자 한다.

2. 신속방법의 필요성과 구비조건

1) 신속방법의 필요성

표준 단백질품질 측정법인 단백질효율비(PER)가 지니는 여러가지 문제점으로 인하여, 식품을 연구하는 대학이나 제 연구기관 및 식품가공업계가 이를 채택하기 위하여는 어려움이 있다. 또한 다양한 단백질식품소재의 개발이 활발하게 진행되고, 보다 정확한 아미노산 분석기술이 發達되고 있는 현 실정에 비추어, 인체에 필요한 단백질 및 아미노산 권장량에 이들 단백질소재가 적합하는가를 신속하게 판정해야 할 것이다. 기술, 설비 투자에 소홀한 우리나라 연구시설 실정에 비추어, 보다 넓은 공간과 많은 경비가 소요되는 小動物 이용법은 우리가 있으므로 이를 대체가능한 신속방법이 필히 도입, 이용되어야 할 것이며, 균일품질의 단백질식품을 생산해야만 하는 식품공장에서는 그 제품의 단백질량은 비교적 손쉽게 측정이 가능하지만, 동물실험법으로 품질을 측정하려면 제품이 생산되어 나오는 시간에 비하여 비교되지 못할 정도로 장시간 소요되므로 신속방법이 필요할 것이다. 또한 소비자들에게 보다 품질이 좋은 단백질식품이 공급되기 위한 최적 가공조건(열처리, 저장, 첨가물 및 다른 재료와의 혼합비율 등)은 신속측정법으로만 그 설정이 가능할 것이며, 식물재배업자, 축산업자, 어류양식업자들도 보다 좋은 품질의 단백질재료를 생산해 내기 위한 사료조건 및 품종개량을 위해서도 신속방법이 필수적이라 할 수 있다.⁸⁾

2) 이상적인 신속방법의 구비조건

여러 문제점이 있는 rat-PER 방법을 대체하기 위한 신속방법이 갖추어야 할 조건에 관하여 Bodwell⁹⁾ 과 미국 농무성의 식품안전성 및 품질관리 지침(FSQS, food safety and quality control)에서는¹⁰⁾ 다음과 같이 그 구비조건을 제시한 바 있다.

(1) 실험실 간이나 동일 실험실 안에서라도 실험 시기에 따른 再現性이 있을 것 (2) 실험기간이 짧은 것(최고 2주 이내, 되도록이면 2일 이내) (3) 가

Table 1. Simple correlations¹ between protein score and the results of bioassay

	BV	PER	NPU	Protein score	
				1970 ²	1973 ³
BV	1.0000				
PER	0.9039	1.0000			
NPU	0.9216	0.9420	1.0000		
Protein score(1970)	0.8668	0.8932	0.9882	1.0000	
Protein score (1973)	0.8521	0.8938	0.8734	0.8379	1.0000

1. $P > 0.01$ requires a coefficient of 0.684 for significance
2. Protein score calculated using FAO(1970) recommended amino acid profile
3. Protein score calculated using FAO(1973) recommended amino acid profile From Hackler¹⁴⁾

격이 저렴할 것 (4) 동·식물단백식품이나 혼합단백식품에 두루 적용이 가능할 것 (5) 품질 고평가를 막론하고 일관성 있는 적용이 가능할 것 (6) 고도의 실험기술이 요구되지 않을 것 (7) AOAC가 지정한 rat-PER 결과와 연관을 맺을 수 있을 것 등으로 요약될 수 있다. 上記와 같은 제조건에 완벽하게 적합한 신속방법은 지금까지 개발되지 못했으나, 개별적인 식품단백질에 보다 합리적으로 적용될 수 있는 방법이 선택 또는 개발되어 왔다.

3. 화학적방법(Chemical Assay)

1) 화학가(Chemical score) 및 단백질가(Protein score)

식품단백질의 아미노산 조성을 이용하여 품질을 측정하는 방법으로는 1946년 Mitchell과 Block이¹³⁾ 제안한 화학가 계산법과, 같은 이론에 근거를 둔 단백질가 계산법을 들 수 있다. 화학가는 全卵(whole egg), 단백질가는 FAO/WHO Expert Group이 제안한 필수 아미노산 조성을 표준으로 계산, 선택한 제한아미노산(limiting amino acid)의 백분율로 품질을 결정한다. 이 방법들은 비교적 짧은 시간 안에 생물실험 결과와 상관계수 0.684($P \leq 0.01$) 이상의 비교적 상관성이 높은 결과를 얻을 수 있어 BV에 대해 0.876(화학가)¹²⁾, 0.866(단백가)—단백질 품질 측정에 유용한 방법으로 알려져 왔다(Table 1). 그러나 이 방법들은 소화율과 아미노산의 이용율은 전혀 고려하고 있지 않기 때문에 가공단백식품의 품질 측정에는 불리하며, 화학가의 경우 Table 2와 같이 동물성단백질은 과대 평가되고, 식물성단백질이나 황 함유 아미노산이나 valine이 제한아미노산이 되는 단백질은 과소 평가되는 경향을 보인다. 또한 이 방법들은 표준단백질의 종류, 아미노산 분석 방법에 따라 그 값

Table 2. Comparison of the chemical score, BV, and NPU value of food proteins

Protein	Chemical score	Protein score	BV	NPU
Whole egg	100	100	98	97
Lactalbumin	69	63	84	82
Soy flour	41	53	75	72
Casein	62	62	68	66
White flour	28	43	52	52

From Sheffner¹⁴⁾

이 현저한 차이를 보이는데, 이러한 제 단점들은 MacLaughlan 등이¹³⁾ lysine, methionine 및 cystein함량을 이용한 단순화학가(simplified chemical score)에서도 발견된다. 근본적으로 화학가나 단백질가는 인체의 성장에 요구되는 단백질 품질 측정에 그 이론적인 근거를 두고 있으므로 부분적인 단백질 품질측도 밖에 되지 못한다. 그러므로 인체의 성장 및 대사활동과 소화율이 감안된 보다 정확한 또 다른 방법이 개발되어야 할 것이다.

2) 필수아미노산 지수(EAAI, Essential Amino Acid Index)와 개량필수아미노산 지수(MEAAI, Modified Essential Amino Acid Index)

특정한 아미노산이 결핍되어 있는 단백질이 이론적으로 품질 zero로 계산되는 화학가나 단백질 측정법을 개선하기 위하여, 11가지 필수 아미노산을 이용하여 1951년 Oser는¹⁵⁾ EAAI를 제안하였으며 뒤에서 Mitchell¹⁶⁾은 EAAI를 개량하여 MEAAI를 제안하였다. EAAI와 MEAAI의 이론적인 근거와 표준단백질(全卵)은 같으나, EAAI는 필수아미노산 중에서 tyrosine을 포함시키지 않고 대신 arginine을 포함시키고 있으며, MEAAI는 arginine을 제외시키고 tyrosine을 포함시키고 있다. 또한 EAAI는 개별아미노

Table 3. Comparison of the EAAI and MEAAI of food proteins with their biological value

Protein source	EAAI ¹	BV ¹	Protein source	MEAAI ²	BV ²
Milk(cow)	88	90	Egg albumin	84	97
Casein	88	72	Casein	92	68
Lactalbumin	89	84	Lactalbumin	92	84
Whole egg	100	96	Whole egg	100	98
Beef	84	76	Defatted egg	93	97
Fish	80	85	Brewer's yeast	72	66
Gelatin	25	25	Peanuts	69	57
Soy beans	83	75	Soy flour	82	74
Sesame	73	71			
Oats	72	65			
Wheat	64	67	White flour	65	52

1. From Oser¹⁹, 2. From Mitchell and Beadless¹⁷, Mitchell and Block¹⁸ and Mitchell¹⁹

산의 全卵단백지수(egg ratio)를 최소 1%, 최고 100%로 조절하고 이들의 기하적 평균치를 계산한 반면 MEAAI는 egg ratio의 log치의 산술평균을 구하고 이의 antilog치로서 계산하는 것이 다르다. EAAI나 MEAAI는 화학가나 단백질과의 달리 성장 및 신체 유지(대사)에 필요한 아미노산들까지 고려했기 때문에 BV에 대한 상관계수가 0.948로 높게 나타나는 결과를 보이기는 하나,¹⁵⁾ 소화율을 고려하지 않았기 때문에 가공단백식품을 비롯한 대부분의 단백질에 있어서 BV 보다 과대 평가되는 단점이 있다(Table 3). 그러나 이들은 단백질의 잠재적생물가(potential biological value) 최대치를 예측하거나, 제한필수아미노산을 밝히는데 유용하며 품질개선 식품에 첨가되는 단백질의 효과를 밝히는데 유용한 방법이라 할 수 있다.

3) 기타 아미노산 조성 이용법

PER을 예측하기 위한 신속방법을 개발하기 위해 1974년 Alsmeyer 등은²⁰⁾ 소량(12종류)의 쇠고기와 결체조직단백질을 시료로 하여 다음과 같은 3종류의 회귀방정식들을 제안하였는데(Table 4), 이 방정식들은 쇠고기 가공품에는 잘 맞으나 이와 식물성 단백질을 혼합한 경우에는 부정확하다고 보고하였다.

Table 4. Regression equations for predicting PER

Equation 1.	$PER = 10.684 + 0.456(LEU) - 0.047(PRO)$
Equation 2.	$PER = -0.468 + 0.454(LEU) - 0.105(TYR)$
Equation 3.	$PER = 1.816 + 0.435(MET) + 0.780(LEU) + 0.211(HIS) - 0.944(TYR)$

From Alsmeyer et al.²⁰⁾

이것은 단백질의 종류에 따른 소화율의 차이 뿐만 아니라 소량의 시료 때문에 발생된 적용범위의 제한성 때문이다.²¹⁾

한편, Lee 등도²²⁾ 결체조직의 함량이 다양한 축육 단백질의 PER을 예측하기 위해 다음과 같은 방정식을 제안하였는데, 이 방정식도 Alsmeyer 등의 방정식과²⁰⁾ 같이 단순한 축육 제품에만 잘 적용될 뿐이다.

$$PER = -0.02290(\text{collagen content}^*, \text{mg/g sample}) + 3.1528$$

*collagen 함량은 hydroxyproline 함량으로 계산

4) 유효성 아미노산 측정법 (Available Amino Acid Assays)

(1) 유효성 황합유아미노산

많은 단백질의 제한 아미노산으로 알려진 cystine이나 methionine의 산화형은 인체에 전혀 유효하지 않으며, 쥐의 경우에만 부분적으로 유효한 현상—예를 들면 methionine sulfoxide나 methionine은 유효하지만 극심한 산화에 의해 발생된 methionine sulfone은 전혀 이용 불가능—을 이용하여 아미노산의 산화가 진행된 가공단백식품의 품질 측정이 가능하다고 알려져 왔다.²³⁾ 유효성 cysteine은 가공단백식품 중의 全 cysteine을 DTT(dithiothreitol)로 환원시킨 cysteine을 원래 있었던 cysteine과 함께 DTNB(5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid)로 정량하는데^{24, 25)} 이는 cysteine과 cysteine의 산화형인 cysteic acid는 DTNB와 작용하지 않는 성질을 이용한 것이다. 유효성 methionine의 측정법으로는 비색정량법과^{26, 27)} 비색정량법의 효소가수분해 과정을 생략한 dimethyl-sulfoxide 반응법²⁸⁾ 및 cyanogen bromide 반응법²⁹⁾

있다. Dimethylsulfoxide(Me_2SO) 반응법은 단백질 중의 산화되지 않은 methionine기는 Me_2SO 를 dimethyl sulfide(Me_2S)로 환원시키는 성질을 이용한 방법으로 H_2O_2 또는 가열처리한 단백질식품의 rat-PER과 BV에 잘 일치한다고²⁸⁾ 보고되고 있다(Table 5).

Table 5. The influence of hydrogen peroxide on the nutritive value of fish protein

	H_2O_2 added(g/kg)		
	0	20	40 days
Methionine(g/kg) protein)	3.09	1.22	0.41
Methionine sulfoxide	0.41	2.12	2.48
Methionine sulfone	0.00	0.17	0.31
NPU			
N. digestibility(%)	92.3	91.8	90.6
BV	94.8	86.3	85.4

From Sjoberg and Bostram³⁰⁾

또한 cyanogen bromide(CNBr) 반응법은 산화된 methionine은 CNBr과 반응하여 methylthiocyanate (MeSCN)를 형성하지 않는 성질을 이용한 것으로 콩단백질의 유효성 methionine 측정에 유리하다. 이상의 유효성 황함유아미노산의 개별적인 측정은 비교적 단시간 걸린다는 장점은 있으나 이 결과와 관련된 생물실험 data가 부족하기 때문에 가열에 의하여 품질 저하가 일어난 단백질식품에만 적용 가능한 제한성이 있다.

(2) 유효성 lysine

일반적으로 많은 lysine을 함유하고 있는 동물성 단백질은 가공저장 중 lysine의 ϵ -amino group이 활성이 높은 다른 group과 (주로 carbonyl group) 반응하여 효소가수 분해가 가능한 소위 "tagged lysine"을 형성하고 lysine의 유효성(availability)을 저하시킨다. 이런 원리를 이용하여 가공단백식품의 품질 측정 척도로써 유효성 lysine의 함량이 측정되는데, 이의 화학적 측정방법으로는 lysine의 ϵ -amino group이 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene(FDNB)과 반응하여 생긴 dinitrophenyl-lysine(DNP-lysine)을 정량하는 FDNB법과^{31~37)} trinitrobenzene sulphonic acid(TNBS)가 ϵ -amino group과 반응하여 trinitrophenyl-lysine을 형성하는 원리의 TNBS법을^{38~44)} 들 수 있다. 이외에 *o*-methylisourea를 이용하는 방법,^{45,46)} methacrylate 이용법,^{47,48)} sodium borohydride법^{42,49)} 및 furosine 이용법⁵⁰⁾ 있는데 이 중 가장 보편화된 방법이 FDNB법과 TNBS법이다. FDNB-reactive lysine의 장점은 상당량의 糖과 共存하는 단백질식품(땅콩,

Table 6. The effect of heat processing on protein utilization of soy milk as measured by PER and available lysine procedure

Min. at 121°C	PER	FDNB reactive lysine(g/16g N.)
0	0.65±0.11	6.0
5	2.24±0.05	6.0
10	2.20±0.08	6.0
20	2.00±0.08	5.9
40	1.83±0.10	5.7
60	1.74±0.04	5.5
120	1.37±0.06	5.0

From Hackler et al.⁵⁴⁾

대두, 우유 등)의 가공 중 일어나는 품질 변화를 예민하게 측정할 수 있는 장점은 있으나(Table 6), fructose-lysine 유도물질은 아주 적은 양의 DNP-lysine을 생성하며, 어육이나 축육이 보강된 단백질식품에서는 생물학적 결과와 전혀 다른 결과를 보이며^{51~53)}, DNP-lysine은 산가수분해 도중 유실되는 단점이 있다³⁷⁾. 한편 TNBS법은 FDNB 법과는 달리 시약으로 인한 사용자의 위험성이 줄고 수용성 또는 유리 lysine의 유효도를 측정하는 장점이 있으나, 산가수분해 중 DNP-lysine 보다 TNP-lysine이 쉽게 분해되며, TNBS는 이미 maillard 반응에 관여한 ϵ -amino group과 여전히 반응하는 단점이 있다. 이상과 같은 화학적인 방법에 의외에 효소가수분해법, *Tetrahymena* 이용법이 있으나 유효성 lysine으로 품질을 측정할 때는 단백질식품 종류에 따른 방법의 선택성이 常存하는 동시에 같은 시료라 할지라도 시도방법에 따라 결과가 다양하게 나타난다(Table 7 및 Table 8). 이 이외에 산성용매에 현탁시킨 단백질 중의 염기성 아미노산이 음전하의 azo dye와 작용하여 발생한 protein-dye complex로 인하여 소실되는 염료의 양을 측정하여 단백질 유효도를 측정하는 dye binding capacity(DBC)법이 있는데^{56~58)}, 이는 비교적 저렴, 신속하게 단백질 품질변화를 측정할 수 있으나,

Table 7. Lysine levels (mg/g N) in four samples of milk power

Sample	Acid hydrolysis	FDNB	Enzymatic pre-digestion	Rat growth assay
Good quality	500	513	519	506
Slightly damaged	475	400	388	381
Scorched	425	238	281	250
Severely scorched	380	119	144	125

From Mottu and Mauron³⁵⁾

Table 8. Comparison of available lysine values estimated by using different assays

Protein source	Available lysine(g/16 g N.)			
	<i>Tetrahymena</i> ¹		FDNB	Rat growth assay
	+	-		
Fish meal	4.8	7.0	6.1	6.9
Meat meal	1.1	3.1	4.1	4.2
Groundnut meal	2.1	3.0	3.0	3.2
Soybean meal	4.2	4.4	5.4	5.0
Cod muscle	6.4	8.6	8.5	10.9
Cod muscle(heated)	1.0	5.0	5.6	4.3
Casein	8.1	-	8.4	8.6

From Shorrocks and Ford⁵⁵⁾

deoxyfructosyl lysine units와 같은 당-아미노 반응 최종생물에 의한 품질 저하는 측정할 수 없는 단점이 있다.^{42,59)}

4. 미생물 이용법(Microbiological Assays)

미생물을 이용한 단백질 품질 평가법으로는 개별 아미노산의 유효도를 측정하는데 사용하는 박테리아 (*Leuconostoc mesenteroides*,⁶⁰⁻⁶²⁾ *Streptococcus faecalis*^{61,63,64)}, *Streptococcus zymogenes*⁶⁵⁻⁶⁸⁾ 이용법과 원생 동물(*Tetrahymena*) 이용법이 있다.

박테리아를 이용한 품질측정의 제 방법들은 개별 아미노산(methionine)의 유효도를 측정하거나 각 시료 간의 상대적인 순위를 결정하는데 유리하나, 전체적인 단백질의 품질을 측정하는데 좋지 못하며 또한 小動物을 이용한 생물학적 품질 측정결과와 높은 상관관계를 가지지 않는 단점이 있으므로(Table 9) 이런 방법들의 사용에 신중해야 한다.⁶⁷⁾

원생동물인 *Tetrahymena*는 단백질분해 이용능력이

Table 11. Effect of sample preparation on correlation of RNV (*Tetrahymena*) with rat-PER

Food sample number	Relative nutritive value(RNV)			Average RNV	PER
	Pepsin digest	Pepsin digest supernatant	Defatted pepsin digest		
1	20	-	-	20	-0.55
2	58	50	46	51	0.65
3	68	61	64	64	1.30
4	92	86	97	92	2.00
5	78	86	75	80	2.50
6	126	115	108	116	3.00
7	103	102	100	102	3.50
8	112	120	108	113	4.30
Correlation coefficient	0.8569	0.9548	0.8712	0.9478	-
P	-	>0.4	0.1		

From Landers⁷⁹⁾

Table 9. Relative values of different protein for *Streptococcus zymogenes*¹ and for rat^{2,3}

Test protein	RNV ¹	NPU ²	NPR ³
Casein	99	84	3.92
Dried whole egg	94	95	4.66
Dried skim milk	99	78	3.77
Soy protein	56	63	2.71
Fish meal	52	54	2.85
Meat meal	39	40	0.98
Wheat gluten	54	54	2.79

From Ford⁶⁵⁾

강하며⁶³⁾ 유일한 아미노산 공급원으로서 손상되지 않은 단백질을 서서히 이용할 뿐더러⁶⁹⁾ growing rat 와 아주 비슷한 아미노산 요구 양상을 보이기 때문에⁷⁰⁾ 단백질 품질 평가에 많이 이용되어 왔다. 이 방법으로는 여러 연구자들에 의해 小動物을 이용한 결과와 높은 상관성을 지닌 결과를 얻을 수 있다고 알려져 있으며⁷¹⁻⁷⁵⁾(Table 10), 두 가지의 개별아미노산(lysine, methionine)의 유효성을 측정하는데 유

Table 10. Relative nutritive values (*Tetrahymena pyriformis*) of some food expressed as PER

	PER	RNV <i>Tetrahymena</i> calculated as PER	
		Without pre-digestion	Digestion with papain
Casein	2.0	2.0	2.0
Soybean	2.3	2.4	2.5
Oat	2.2	2.4	2.6
Rice	1.7	0.8	1.5
Wheat	1.5	1.2	1.5
Maize	1.2	0.7	1.2

From Baum⁷⁵⁾

Table 12. Requirements for EAA(g/16g N.) in *Tetrahymena*, growing rats, infants and children

Amino acid	<i>Tetrahymena</i> ¹	Rat ²	Infants ³	Child ³ (10~12 years)
ILE	6.6	4.17	3.50	3.70
LEU	5.3~6.6	6.25	8.00	5.60
LYS	4.0	5.80	5.25	7.50
MET+CYS	2.1~3.2	5.00	2.90	3.40
PHE+TYR	~	6.67	6.30	3.40
THR	6.6	4.17	4.40	4.40
TRP	1.1	1.25	0.85	0.46
VAL	5.6	5.00	4.70	4.10

1. From Røll⁸⁶)

2. From NRC(National Research Council) (1978)

3. From FAO/WHO(1973)

리한 방법이다.^{55,77,78}) 또한 단백분해효소를 이용하여 부분적으로 가수분해시킨 단백질을 *Tetrahymena* 성장에 이용하면, rat-PER과 아주 상관성이 높은 결과를^{79~81,83}) 얻을 수 있는데 (Table 11), Sutton⁸²)과 Baker 등⁸³)은 이를 이용한 단백효율비(T-PER)를 제안하기도 하였다. 단백질 품질평가에 *Tetrahymena*를 이용하면 이상과 같은 유리한 점들이 있음에도 불구하고, 아미노산 요구량이 사람이나 growing rat와 다르다는^{86,87}) (Table 12) 이외에 배지에 첨가되는 첨가물(propionates, benzoates 또는 nitrate와 같은 meat-curing adjuncts)에 의하여 그 성장이 영향을 받으며⁸²), 효소가수분해 전처리의 유무 또는 cell counting 방법에 따라 그 결과가 달라지는 단점이 있으며,^{76,80,84,85}) incubation 하는 시간에 따라 서로 다른 결과를 보인다.

따라서 이 방법은 여러 실험 조건의 표준화가 이루어졌을 때, 구성성분을 이미 알려져 있는 단백질 식품(첨가물 zero)의 품질 평가에 유리할 것으로 기대된다.

5. 효소가수분해법(Enzymatic Hydrolysis Assays)

단백질의 품질은 식품으로 섭취된 단백질이 단백질분해효소에 분해되어 나오는 아미노산의 유효도에 의하여 결정되는데, 이 때의 필수아미노산의 양은 품질 측정의 좋은 척도가 될 수 있다.⁸⁸)

효소가수분해에 의한 유리아미노산 pattern과 생물학적인 실험결과와 연결시킨 최초의 시도는 1956년 Sheffner 등의 PDR(pepsin digest residue) index⁸⁹)와 1964년 Akesson과 Stahmann의 PPD(pepsin pancreatin

Table 13. Comparison of the PDR and PPDI with biological results

Food protein	BV	PDR	PPDI	PDR/digestibility
Whole egg	97	100	100	101
Egg albumin	82~97	95	89	95
Lactalbumin	84	82	85	84
Casein	69~78	65	78	67
Heated soybean	75	71	68	74
Yeast	66	61	74	66
Wheat flour	52	51	54	51

From Sheffner¹⁴)

digest) index⁹⁰) 등을 들 수 있는데, 이 방법들에 의한 결과는 BV와 높은 상관성을 가진다¹⁴) (Table 13). 이와 같은 효소가수분해는 가수분해산물에 의해 효소작용이 저해됨으로, 투석,⁹¹) gel여과^{92,93}) 유리된 아미노산을 제거하여 이 방법들이 개선되었다. 즉, Mauron^{94,95})은 PPDD(pepsin pancreatin digest dialy-zate) index를 제안하여 BV와 높은 상관관계를 보이는 결과를 얻었다고 하였다. 효소가수분해를 이용한 단백질의 소화율 측정은 papain 이용법,^{96,97}) pepsin-trypsin 이용법⁹⁸), EUD(ultrafiltrate digest) system⁹⁹) 및 multienzyme system¹⁰⁰) 등을 들 수 있으며, 최근에는 four-enzyme system¹⁰¹) 개발되어 rat apparent digestibility와 높은 상관성을 보인다 (Table 14).

Table 14. Correlation coefficients and (level of significance) comparing protein digestibilities for protein foods

	Rat apparent dig.	Four <i>in vitro</i> dig.
For all study foods		
Human <i>in vivo</i> apparent digestibility	0.957(99%)	0.859(95%)
Rat <i>in vivo</i> apparent digestibility		0.781(90%)
For nonlegume foods		
Human <i>in vivo</i> apparent digestibility	0.997(99%)	0.877(95%)
Rat <i>in vivo</i> apparent digestibility		0.840(95%)
For legume foods		
Human <i>in vivo</i> apparent digestibility	0.997(99%)	0.811(95%)
Rat <i>in vivo</i> apparent digestibility		0.761(90%)

From Rich et al.¹⁰¹)

6. Four-Enzyme System, Computed PER(C-PER) 및 Discriminant Computed PER(DC-PER)

1) Four-Enzyme System

단백분해효소의 가수분해로 인해 유리된 carboxyl group 등으로 인해 저하되는 pH 정도를 측정하여 rat apparent protein digestibility와의 상관관계식을 유도한 multienzyme automated assay는¹⁰⁰⁾ Maga 등¹⁰²⁾ 및 Rhinehart¹⁰³⁾의 신속단백질소화율 측정법을 개량한 것으로, 23종의 단백질식품을 대상으로 trypsin, chymotrypsin 및 amino-peptidase를 이용한 가수분해(37°C, 10분)를 시도하여 rat-apparent digestibility와 높은 상관성($r=0.90$)을 지닌 결과를 얻을 수 있다.¹⁰¹⁾ 또한 이방법은 trypsin inhibitor의 함량과 가열처리의 영향에 아주 민감한 장점이 있으나 이를 개발할 때 사용된 시료의 60% 이상이 식물성단백질이며 동물성단백질도 낙농제품이 주가 되었으므로 이 방법을 육단백질이나 난류단백질에 적용하면 *in vivo* 결과에 비해 낮은 소화율을 보인다. 이런 결점을 보완하기 위해 Satterlee 등^{6,104)}은 동물성단백시료를 대폭 보강하고(50종 이상), bacterial protease (*Streptomyces griseus*)를 첨가하여 20분간의 가수분해를 시도한 방법을 제안하였다(four-enzyme system). 이 방법은 상기의 장점 이외에 보다 광범위한 단백질 시료에 적용 가능하다는 점이 있으나, 이미 부분적인 가수분해가 일어난 발효식품(yoghurt, 젓갈 등)이나, 이론적으로 소화율 54% 이하의 시료에는 적

용이 불가능하며, 해조와 같은 점성이 높은 물질을 함유한 식품은 높은소화율을 나타내는 단점이 있다.¹⁰⁵⁾ 또한 이 방법은 동물성단백질에는 약간 낮은 소화율을, 식물성단백질에는 높은 소화율을 나타내어 단백질식품 군에 따라 상관성이 달라지는 Hsu 등의 방법¹⁰⁰⁾이 지니는 단점을 완전히 극복하지 못하고 있다.

Four-enzyme system의 실험방법을 요약하면 Figure 1과 같다.

2) Computed PER(C-PER)과 Discriminant Computed PER(DC-PER)

아미노산 조성만으로 rat-PER을 대체하려는 여러 시도 중, 비교적 정확하다고 알려진 C-PER 방법은⁷⁾ 처음 Hsu 등의 방법¹⁰⁰⁾ 측정된 소화율과 아미노산 분석결과를 토대로 PER을 계산한 방법¹⁰⁶⁾ 개량하여 four-enzyme system에 의한 소화율, 판별함수(discriminant function) 등의 개념을 도입하여 아미노산조성과 함께 PER을 계산한 방법이다.^{7,104)} 이 방법은 72시간 이내에 rat-PER에 근접하는 PER을 계산해낼 수 있으나, 측정되는 *in vitro* 소화율에 크게 영향을 받으므로 전항 1)에서 지적한 장단점을 그대로 지니고 있으나 이 방법은 소화율과 아미노산 조성에 따라 식품단백질은 4群으로 나누고 식물성단백질, 두류단백질, 식물성-동물성 혼합단백질, 동물성 단백질 각 群에 따른 다른 C-PER 방정식을 수립하였으므로 단점이 많이 보완되었다. 한편 Jewell 등은¹⁰⁷⁾ 아미노산 조성만으로 판별분석법(discriminant analysis)을 도입하여 예측소화율(predicted digestibility)과

Weight 80-100 mesh ground sample and ANRC Na-casein as control (gram/% N.)

↓ Add 10 ml of glass distilled water (G.D.W.)

Allow to hydrate for at least 1 hour, but no more 24 hours, at 5°C

Prepare three enzyme solution (1.6 mg trypsin + 3.1 mg chymotrypsin + 1.3 mg peptidase/ml G.D.W.)

↓

Equilibrate three-enzyme, sample and control solution to pH 8.0 at 37°C

Add 1ml of three-enzyme solution to sample and control solution

Stirr the solutions for 10 minutes exactly, in a 37°C water bath

Add 1 ml of bacterial protease solution(7.95 mg enzyme/ml G.D.W.)

Transfer the solutions to a 55°C water bath and incubate for 9 min.

Transfer the solutions back to the 37°C water bath

Insert the pH electrode and read pH after 20 min. incubation

If the pH of control was 6.42 ± 0.05 at 20 min.

Proceed to take each sample and read pH

Calculation: % digestibility = $224.84 - 22.56X$

where X: pH after 20 min. incubation

Fig. 1. Procedure for calculating the *in vitro* digestibility using four-enzyme system.

DC-PER을 계산하여 소화율의 경우는 four-enzyme system 보다 2.2배, PER은 C-PER 보다 1.5배 정확했다고 보고하였다.

즉 lysine, leusine, aspartic acid, proline 및 ammonia 함량만으로 단백질을 분류한 뒤, 이에 대한 예측소화율 방정식을 수립하여 계산된 소화율을 근거로 C-PER과 유사한 방법(계산식만 다름)으로 계산하는 것으로서 C-PER과 함께 AOAC가 공인하는 rat-PER을 대체할 수 있는 가능성이 높은 방법이라 할 수 있다.¹⁰⁴⁾

그러나 DC-PER은 여러 연구자들이 지적하였듯이 강인한 세포벽을 지닌 식품(single cell protein, 해조류)식품,^{108, 109)} 상당량의 trypsin inhibitor가 존재하는 식품, 극심한 가열처리를 받은 식품이나 성분상 호간의 작용에 의해 품질저하가 일어난 식품에 대하여는 과대 평가되는 경향을 보여, 이런 식품에서는 C-PER 보다 불리하다고 여겨진다(Table 15).

Table 15. Comparison of rat-PER, C-PER and DC-PER for different protein foods

	Rat-PER	C-PER	DC-PER
ANRC casein ¹	2.5	2.7	2.6
Beef round	2.8	2.4	2.5
Egg white	2.5	2.5	2.5
Lactalbumin	2.4	2.5	2.6
Corn	0.7	0.6	0.5
Soy isolate	1.3	1.3	1.5
Wheat gluten	0.3	1.2	0.7
Squid ²	2.9	1.9	2.9
Oyster	1.9	2.0	2.2
Laver	1.7	2.1	2.1
Pollock	3.0	2.6	2.7
Shrimp	2.9	2.6	2.7

From Jewell et al.¹⁰⁷⁾

From Ryu and Lee¹⁰⁹⁾

7. 결 언

급증하는 인구에 비하여, 단백질 생산량의 증가는 획기적인 새로운 단백질 자원의 개발없이 거의 불가능한 현재의 상태로는, 이미 개발 이용되고 있는 단백질 자원의 효율적인 이용이 간접 생산으로서 보다 바람직한 해결책이라 할 수 있다. 또한 일반 대중의 영양과 건강에 대한 지식 수준이 높아감에 따라 단순히 단백질량만으로 단백질식품을 권장, 선전하는 시기는 이미 지났다고 생각된다. 이러한 주요한 두 가

지 문제를 해결하기 위해 보다 신속하고 효율적인 단백질 품질평가법이 요청되는 것이다. 지금까지 개발 소개된 여러 신속방법들은 공통적으로 표준 단백질 품질측정방법인 rat-PER에 비하여 신속, 간단, 저렴한 경제적인 장점 이외에 제한아미노산의 인지 및 첨가되는 단백질의 보완효과 등을 보다 정확하게 측정할 수 있었다. 그러나 대부분의 방법들이 아미노산의 이용율, 효소가수분해에 의해 이미 유리된 아미노산의 소화에 대한 영향 또는 소화속도, 다른 식품성분들과 공존했을 때 변화하는 소화현상 등을 소홀히 다루어 왔기 때문에, 이들 단백질의 이론적인 최대 이용율을 측정하는데 그쳤다고 할 수 있다. 또한 rat-PER 보다는 보다 실제적 human bioassay에 대한 표준 data의 빈곤 및 함유되어 있는 독성물질 또는 소화방해요소 등을 감안하지 않은 경우가 허다하여 그 신빙성이 결여되어 있었던 것은 사실이다. 그러므로 보다 보편적인 신속방법의 개발 및 적용을 위해서는 첫째, 이미 개발되어 있는 신속방법의 실험조건 표준화작업, 단백질식품 群에 따른 적절한 실험방법 선택에 대한 지침 확립, 둘째, 표준 단백질 품질 측정방법의 개량 및 다른 생물학적 방법으로서의 대체 등이 수행되어야 할 것이며, 셋째, 단백질 품질에 대한 우열을 정확하게 판정할 수 있는 지표가 설정되어야 할 것이며, 넷째, 단백질 단독으로 실험대상에 올리는 것을 피하고 실제적인 식생활에서 여러 식품성분들과 같이 섞여 이용되는 상태에서의 이용율에 대한 기초실험이 뒤따라야 할 것이다.

문 헌

- 1) Harper, A.E.: *Importance of Protein Quality in the United States Diet*, In "Protein Quality in Humans; Assesment and In Vitro Estimation", Bodwell, C.E., Adkins, J.S. and Hopkins, D. T. eds., AVI Pub. Co. Inc., Westport, 19 (1981)
- 2) Osborne, T.B., Mendel, L.B. and Ferry, E.L.: *J. Biol. Chem.*, **37**, 223(1919)
- 3) Block, R.J. and Mitchell, H.H.: *Nutr. Abstr. Revs.*, **16**, 249(1946)
- 4) Mitchell, H.H.: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **16**, 696(1944)
- 5) Fried, I.: *Food Tech.*, **31**, 85 (1977)
- 6) Satterlee, L.D., Marshall, H.F. and Tennyson J.M.: *J. AOCS*, **56**, 103(1979)

- 7) Satterlee, L.D., Kendrick, J.G., Marshall, H. Marshall, H.F., Jewell, D.K., Ali, R.A., Heckman, M.M., Steinke, H.F., H.F., Larson, P., Phillips, R.D., Sawar, G. and Slump, P.: *Symposium on Protein Quality Evaluation*, 94th Annual Meeting of AOAC, 1 (1980)
- 8) Nesheim, R.O.: *Protein Quality in Relation to Industry's Needs*, In "Protein Quality in Humans; Assessment and In Vitro Estimation", Bodwell, C.E., Adkins, J.S. and Hopkins, D.T. eds., AVI Pub. Co. Inc., Westport, 55(1981)
- 9) Bodwell, C.E.: *Food Tech.*, **31**, 76(1977)
- 10) Murphy, E.W. and Willis, B.W.: *Protein Quality Relation to USDA Regulatory Needs*, In "Protein Quality in Humans; Assessment and In Vitro Estimation", Bodwell, C.E., Adkins, J.S. and Hopkins, D.T. eds., AVI Pub. Co. Inc., Westport, 50 (1981)
- 11) Hackler, L.R.: *In Vitro Indices; Relationships to Estimating Protein Value for the Human*, In "Evaluation of Proteins for Humans", Bodwell, C.E. eds., AVI Pub. Co. Inc., Westport, 59, 60(1977)
- 12) Mauron, J.: *The Analysis of Food Proteins, Amino Acid Composition and Nutritive Value*, In "Proteins in Human Nutrition", Porter, J.W. G. and Rolls, B.A. eds., Academic Press, London and New York, 139(1973)
- 13) MacLauhlan, J.M., Rogers, C.G., Chapman, D.G. and Campbell, J.A.: *Canadian J. Biochem. Physiol.*, **37**, 1293(1959)
- 14) Sheffner, A.L.: *In Vitro Protein Evaluation*, In "Newer Methods of Nutritional Biochemistry, Vol. III", Albanese, A.A. eds., Academic Press, New York and London, 125(1967)
- 15) Oser, B.L.: *J. Am. Diet. Ass.*, **27**, 396(1951)
- 16) Mitchell, H.H.: In "Symposium on Methods for the Evaluation of Nutritional Adequacy and Status", Spector, H., Peterson, M.S. and Friedmann, T.E., National Research Council, Washington, D.C., 13(1954)
- 17) Mitchell, H.H. and Beadless, J.R.: *J. Nutr.*, **40**, 25(1950)
- 18) Mitchell, H.H. and Block, R.J.: In "Proteins and Amino Acids in Nutrition", Sayhun, M. eds., Rheinhold, New York, 46(1948)
- 20) Alsmeyer, R.H., Cunningham, A.E. and Happich, M.L.: *Food Tech.*, **28**, 34(1974)
- 21) Happich, M.L., Swift, C.E. and Naghski, J.: *Equation for Predicting PER from Amino Acid Analysis- A Review and Current Scope of Application*, In "Protein Nutritional Quality of Foods and Feed. Part I. Assay Methods-Biological, Biochemical and Chemical", Friedmann, M. eds., Marcel Dekker, Inc., New York, 125(1975)
- 22) Lee, Y.B., Elliott, J.G., Rickansrud, D.A. and Hagberg, E.B.: *J. of Food Sci.*, **43**, 1359 (1978)
- 23) Njaa, L.R.: *Brit. J. Nutr.*, **16**, 571(1962)
- 24) Pienjazek, D., Grabrek, Z., and Rakowska, M.: *Nutr. Metab.*, **18**, 16(1975)
- 25) Pienjazek, D., Rakowska, M. and Kunachowicz, H.: *Brit. J. Nutr.*, **34**, 163(1968)
- 26) McCarthy, T.E. and Sullivan, M.X.: *J. Chem.*, **141**, 871(1941)
- 27) Tannenbaum, S.R., Barth, H. and LeRoux, J. P.: *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 1352(1979)
- 28) Lipton, S.H. and Bodwell, C.E.: *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 1241(1977)
- 29) Ellinger, G.M. and Duncan, A.: *Biochem. J.*, **155**, 615(1976)
- 30) Sjoberg, L.B. and Bostram, S.L.: *Brit. J. Nutr.*, **38**, 189(1977)
- 31) Sanger, F.: *Biochem. J.*, **39**, 507(1945)
- 32) Lea, C.H. and Hannan, R.S.: *Biochem Biophys. Acta.*, **5**, 433(1950)
- 33) Carpenter, K.J. and Ellinger, G.M.: *Biochem. J.*, **61**, 6(1955)
- 34) Carpenter, K.J.: *Biochem. J.*, **77**, 604(1960)
- 35) Mottu, F. and Mauron, J.: *J. Sci. Food. Agric.*, **18**, 57(1967)
- 36) Milner, C.K. and Carpenter, K.J.: *Cereal Chem.*, **46**, 425(1969)
- 37) Carpenter, K.J.: *Nutr. Abstr. Rev.*, **43**, 423 (1973)
- 38) Kakade, M.L. and Liener, J.E.: *Anal. Biochem.*, **27**, 273(1969)
- 39) Holsinger, V.H., Posati, L.P. and Pallansch, M.J.: *J. Dairy Sci.*, **53**, 1638(1970)
- 40) Ruderus, H. and Kihlberg, R.: *Determination*

- of Available Lysine by Column Chromatography, In "Evaluation of Novel Protein Products", Bender, A.E., Kihlberg, R., Löfqvist, B. and Munk, L. eds., Pergamon Press, Oxford, 195 (1970)
- 41) Posati, L.P., Holsinger, V.H., DeVilbiss, E. D. and Pallansch, M.J.: *J. Dairy Sci.*, **55**, 1660(1972)
- 42) Hurrell, R.F. and Carpenter, K.J.: *Brit. J. Nutr.*, **33**, 101(1975)
- 43) Eklund, A.: *Anal. Biochem.*, **70**, 434(1976)
- 44) Tella, A.F. and Ashton, W.M.: *J. Sci. Food Agric.*, **29**, 447(1978)
- 45) Mauron, J. and Bujard, E.: *Abstr. of 6th Internat. Congr. Nutr.* (Edinburgh), 498(1964)
- 46) Hurrell, R.F. and Carpenter, K.J.: *Brit. J. Nutr.*, **32**, 589(1974)
- 47) Finly, J. and Friedman, M.: *Cereal Chem.*, **50**, 101(1973)
- 48) Friedman, M. and Finley, J.W.: *Vinyl Compounds as Reagents for Available Lysine in Proteins*, In "Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds. Part I. Assay Methods-Biological, Biochemical and Chemical", Friedman, M. eds., Marcel Dekker, Inc., New York, 503(1975)
- 49) Couch, J.R. and Thomas, M.C.: *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 848(1976)
- 50) Erbersdobler, H. and Zucker, M.: *Milchwissenschaft*, **34**, 564(1966)
- 51) Atkinson, J. and Carpenter, K.J.: *J. Sci. Food Agric.*, **21**, 366(1970)
- 52) Doctor, A.M. and Harper, A.E.: *J. Nutr.*, **94**, 289(1968)
- 53) Miller, F.L., Carpenter, K.J. and Milner, C.K.: *Brit. J. Nutr.*, **19**, 547(1965)
- 54) Hakler, L.R., VanBuren, J.P., Steinkraus, K. H., El Rawi, I., and Hand, D.B.: *J. Food Sci.*, **30**, 723(1965)
- 55) Shorrocks, C. and Ford, J.E.: *An Improved Procedure for the Determination of Available Lysine and Methionine with Tetrahymena*, In "Proteins in Human Nutrition", Porter, J.W.G. and Rolls, A.A eds., Academic Press, New York, 207(1973)
- 56) Frankel-Conrat, H., and Cooper, M.: *J. Biol. Chem.*, **154**, 239(1944)
- 57) Frolich, A.: *Nature, Lond.*, **173**, 132(1954)
- 58) Lakin, A.L.: *Evaluation of Protein Quality by Dye-binding Procedure*, In "Proteins in Human Nutrition", Porter, J. W.G. and Rolls, B.A, eds., Academic Press, New York, 179(1973)
- 59) Hurrell, R.F. and Carpenter, K.J.: *Proc. Nutr. Soc.*, **35**, 23(1976)
- 60) Horn, M.J., Blum, A.E., Womack, M. and Gersdorff, C.E.F.: *J. Nutr.*, **48**, 231(1952)
- 61) Horn, M.J., Blum, A.E. and Womack, M.: *J. Nutr.*, **52**, 375(1954)
- 62) Terr, A.E., Virchow, W. and Loughlin, M.E.: *J. Nutr.*, **59**, 587(1956)
- 63) Halevy, S. and Grossowicz, N.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **82**, 567(1953)
- 64) Bunyan, J. and Price, S.A.: *J. Sci. Food Agric.*, **11**, 23(1960)
- 65) Ford, J.E.: *Brit. J. Nutr.*, **4**, 485(1960)
- 66) Ford, J.E.: *Brit. J. Nutr.*, **16**, 409(1962)
- 67) Boyne, A.W., Price, S.A., Rosen, G.D., and Stott, J.F.: *Brit. J. Nutr.*, **21**, 181(1967)
- 68) Lawrie, N.R.: *Biochem. J.*, **31**, 789(1937)
- 69) Rockland, L.B. and Dunn, M.S.: *Arch. Biochem.*, **11**, 541(1946)
- 70) Kidder, G.W. and Dewly, V.C.: In "The Biochemistry and Physiology of Tetrahymena", Hill, D.L. eds., Academic Press, New York, 16(1972)
- 71) Dunn, M.S. and Rockland, L.B.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **64**, 377(1947)
- 72) Fernell, W.R. and Rosen, G.D.: *Brit. J. Nutr.*, **10**, 143(1956)
- 73) Adeison, M.E. and Williams, H.H.: *J. Nutr.*, **44**, 335(1951)
- 74) Boyne, A.W., Carpenter, K.J., and Woodham, A.A.: *J. Sci. Food Agric.*, **12**, 832(1911)
- 75) Baum, F.: *Wizz. Z. Ernst Moritz Arndt-Univ. Freifswald*, **19** 13(1970)
- 76) Shorrocks, C.: Ph. D. thesis of Univ. of Reading, England(1972)
- 77) Stott, J.A. and Smith, H.: *Brit. J. Nutr.*, **17**, 227(1963)
- 78) Stott, J.A. and Smith, H.: *Brit. J. Nutr.*, **20**, 663(1966)

- 79) Landers, R.E.: *Relationship between Protein Efficiency Ratio of Foods and Relative Nutritive Value Measured by Tetrahymena pyriformis W Bioassay Techniques*, In "Proteins Nutritional Quality of Food and Feeds, Part I. Assay Methods-Biological, Biochemical, and Chemical", Friedmann, M. eds., Marcel Dekker, Inc., New York, 185(1975)
- 80) Evancho, G.M., Hurt, H.D., Delvin, P.A., Landers, R.E., and Ashton, D.H.: *J. Food Sci.*, **42**, 444(1977)
- 81) Dryden, M.J., Kendrick, J.G., Satterlee, L.D., Schroeder, L.J., and Block, R.G.: *J. Food Biochem.*, **1**, 35(1977)
- 82) Sutton, N.E.: Master thesis of Univ. of Nebraska-Lincoln, 33(1978)
- 83) Baker, H., Frank, O., Rusoff, I.I., Morack, R.A., and Huntner, S.H.: *Nutr. Report. Int'l.*, **17**, 525(1978)
- 84) Wang, Y.Y.D., Miller, J., and Beuchat, L.R.: *J. Food Sci.*, **44**, 540(1979)
- 85) Maciejewicz-Rys, J. and Antoniewicz, A.M.: *Brit. J. Nutr.*, **40**, 83(1978)
- 86) Røll, G.: *Acta Agric. Scand.*, **25**, 17(1975)
- 87) Røll, G.: *Acta Agric. Scand.*, **26**, 282(1976)
- 88) Stahmann, M.A. and Woldegiorgis, G.: *Enzymatic Methods for Protein Quality Determination*, In "Proteins Nutritional Quality of Foods and Feeds, Part I. Assay Methods-Biological, Biochemical, and Chemical", Friedmann, M. eds., Marcel Dekker, Inc., New York, 211(1975)
- 89) Sheffner, A.L., Eckfeldt, G.A., Spector, H.: *J. Nutr.*, **60**, 105(1956)
- 90) Akeson, W.R. and Stahmann, M.A.: *J. Nutr.*, **83**, 257(1964)
- 91) Mauron, J., Motttu, F., Bujard, E., and Egli, R.H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **59**, 433(1955)
- 92) Ford, J.E. and Salter, D.N.: *Brit. J. Nutr.*, **20**, 843(1966)
- 93) Ford, J.E.: *Some Effects of Processing on Nutritive Value*, In "Proteins in Human Nutrition", Porter, J.W.G. and Rolls, B.A. eds., Academic Press, New York, 515(1973)
- 94) Mauron, J.: *Nutritional Evaluation of Proteins by Enzymatic Methods*, In "Evaluation of Novel Protein Products", Bender, A.E., Kihlber, R., Lofqvist, B., and Munk, L., eds, Pergamon Press, Oxford, 211(1970)
- 95) Mauron, J.: *The Analyses of Food Proteins, Amino Acid Composition and Nutritive Value*, In "Proteins in Human Nutrition", Porter, J.W., G., and Rolls, B.A., eds., Academic Press, London, 139(1973)
- 96) Buchanan, R.A.: *Brit. J. Nutr.*, **23**, 533(1969)
- 97) Buchanan, R.A. and Byers, M.: *J. Sci. Food Agric.*, **20**, 364(1969)
- 98) Saunders, R.M., Connor, M.A., Booth, A.N., Bichoff, E.M., and Kohler, G.O.: *J. Nutr.*, **103**, 530(1973)
- 99) Floridi, A. and Fidanza, F.: *Riv. Sci. Tech. Alim. Nutr. Um.*, **5**, 13(1975)
- 100) Hsu, H.W., Vavak, D.L., Satterlee, L.D., and Miller, G.A.: *J. Food Sci.*, **42**, 1269(1977)
- 101) Rich, N., Satterlee, L.D., and Smith, J.L., and Smith, J.L.: *Nutr. Reports Int'l.*, **21**, 285(1980)
- 102) Maga, J.A., Lorentz, K., and Oneyemi, O.: *J. Food Sci.*, **38**, 173(1973)
- 103) Rhinehart, D.: Master thesis of Univ. of Nebraska-Lincoln (1975)
- 104) AOAC: *Official First Action, J. of AOAC*, **65**, 496(1982)
- 105) Ryu, H.S., Satterlee, L.D., and Lee, K.H.: *Bull. Korean Fish. Soc.*, **15**, 263(1982)
- 106) Hsu, H.W., Sutton, N.E., Banjo, M.O., Satterlee, L.D., and Kendrick, J.G.: *Food Tech.*, **32**, 69(1978)
- 107) Jewell, D.K., Kendrick, J.G., and Satterlee, L.D.: *Nutr. Reports Int'l.*, **21**, 25(1980)
- 108) Satterlee, L.D., Kendrick, J.G., Jewell, D.K., and Brown, W.D.: *Estimating Apparent Protein Digestibility from In Vitro Assay*. In "Protein Quality in Humans; Assessment and In Vitro Estimation", Bodwell, C.E., Adkins, J.S. and Hopkins, D.T., eds., AVI Pub. Co., Inc. Westport, 322(1981)
- 109) Ryu, H.S. and Lee, K.H.: *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **14**, 13(1985)