

Casein에 의한 腸管内 칼슘吸收의 促進效果와 그 메카니즘

서울대학교 農科大學 이 연 속

칼슘 급원식품으로써의 평가는 식품중의 칼슘 함량과 체내에서의 실제 이용율을 기초로 하고 있는데, 특히 우유 및 유제품은 칼슘 이용율이 매우 높아 가장 우수한 칼슘 급원 식품으로 인정받고 있는 터이다.¹⁾

1950년 후반에 Wasserman²⁾ 등이 고전적인 칼슘 출납법, ⁴⁵Ca의 경구 투여에 의한 ⁴⁵Ca 출납 또는 뼈에의 칼슘의 침착 등의 실험을 통해 우유의 칼슘 이용성에 대해서 검토하였다. 그 결과를 종합하면 우유의 칼슘 이용성은 동물의 종에 따라 크게 다르게 나타났는데 사람, 송아지, 흰쥐의 경우는 우유를 포함하지 않은 식이에 비해 50~200%의 증가를 나타냈다. 한편 닭과 토끼의 경우는 효과가 나타나지 않았다. 또한 송아지에게 우유-건초곡류사료-우유의 순서로 식이를 전환시켰을 때 칼슘 이용율은 90% - 37.5% - 91.6%로서, 식이의 전환과 함께 대단히 빨리 칼슘의 이용율도 전환되었다.

이러한 실험 성적에서 우유 칼슘의 이용율이 다른 식이에 의해 높음은 명백해졌으며 그 이용율이 높은 원인이 동물의 생리적 변화에 기인한다기 보다는 우유 중의 어떤 성분이 장관내 칼슘 흡수에 직접적으로 관여하고 있음이 시사되었다. 따라서 많은 연구자들은 우유의 성분과 장관내 칼슘 흡수와의 관계에 대해서 많은 관심을 가져왔으며 그 성분으로서 주로 lactose,³⁻⁴⁾ lysine,⁵⁻⁶⁾ casein⁷⁻⁸⁾ 등이 검토되어 왔다.

여기서는 우유 단백질인 Casein에 의한 장관내 칼슘 흡수 촉진 효과와 그 메카니즘에 대해서 본인의 연구성적을 중심으로 기술하고자 한다.

1947년 Mellander⁹⁾는 casein의 in vitro 소화에 의해서 부분 분해물인 Phosphopeptides를 분리하고 이 Phosphopeptides가 칼슘, 철 등과 같은 금속이

온에 강한 친화성을 가지며 가용성 복합체를 형성함을 밝히고, 또한 이러한 Ca-phosphopeptide 복합체가 유동물에서 효과적으로 이용될 수 있음을 시사한 바 있다.

그러나 과연 이러한 in vitro에서의 현상이 동물의 소화관 내에서도 일어날 수 있을 것인가에 대해서 오랫동안 의문인 채로 남아 있었다. 이 문제에 대해서 1972년 Naito¹⁰⁾ 등은 Casein을 함유한 식이를 섭취한 흰쥐의 장관 내용물로 부터 Casein Phosphopeptides(C. P. P.)를 분리했으며, 또한 부분 정제하여 그 성질을 규명한 결과 이 C·P·P가 in vitro 계에서 얻은 C·P·P에 거의 유사함을 밝혔다. 이것은 Fig. 1에 표시한 Ribadeau-Dumas¹¹⁾ 등에 의하여 밝혀진 Casein 일차구조 중 C·P·P·부분에 해당한다고 본다. 즉 β -Casein의 N-말단에서 25개의, α -Si-Casein의 43번째에서 79번째까지의 아미노산 잔기를 갖는 분자량 3,000~4,000 정도의 macropeptide이며 특징으로써 Phosphoserine을 많이 포함하며 낮은 N/P ratio를 나타내고 있다.

그러나 Mellander가 예상한대로 in vivo 즉 장관 내에서 검출된 C·P·P가 실제로 장관내에서도 칼슘과 가용성 복합체를 형성할 수 있는 것인지, 또 칼슘의 장관 흡수에 효율적으로 이용될 수 있는 것인지에 대해서는 증명된 바 없었다. 이와 같은 연구 배경을 가지고 본인 등은 수년간에 걸쳐 장관내 칼슘 흡수에 미치는 C·P·P의 촉진 효과나 그 기작에 대해서 추적해온 결과, Casein을 섭취한 동물의 장관 내에 소화과정에서 C·P·P가 생성되며, 그것이 칼슘 이온과 가용성 복합체를 형성하므로써 칼슘과 다른 음이온과의 불용성 염 형성을 방지함에 따라 장관내 가용성 칼슘의 절대량을 증가시키고, lumen-Blood 간의 칼슘 농도 기울기를 높여

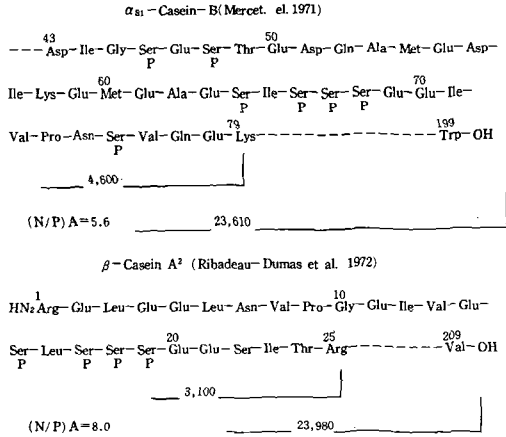


Fig. 1 Primary Structures of Tryptic Casein Phosphopeptides

Passive diffusion의 흡수가 촉진된다고 하는 결론을 얻었으며 다음은 그것에 대한 몇가지 실험결과를 요약하고자 한다.

1. 소장내에 있어서 C·P·P의 생성조건과 생성량

장내 C·P·P. 생성조건과 생성량을 규명하기 위하여 식이 섭취방법, 식이 조성의 영향, 장관내 단백질 분해효소 활성과의 관련등에 관하여 검토함과 함께 20% Casein diet를 meal-feeding하고 장내 생성되는 C·P·P.의 양적변화를 경시적으로 검토하였다.

Fig2에는 소장내용물의 TCA-Soluble fraction을 Sephadex-G25 Gel filtration에 의하여 분획하여 얻은 profile이다. 이 Profile을 보면 크게 둘로 나눌 수 있는데 fraction I은 macropeptides 로써 C·P·P.(인을 포함하는 macropeptides)의 획분이며, fraction II는 저분자 물질의 획분이다. Fig2에서 보면 20% Caseindiet를 meal-feeding한 후, 단시간내에 즉 소화흡수가 왕성한 때에는 C·P·P.가 생성되나 공복기에는 생성되지 않음을 알 수 있다. 이러한 C·P·P.fraction은 meal-feeding에 의해서 뿐 아니라 ad libitum의 섭취방법에 의해서도 나타났다.

소장내 C·P·P.생성에 미치는 식이조성의 영향에 대해서는, Casein과 다른 식이성분 즉 탄수화물,

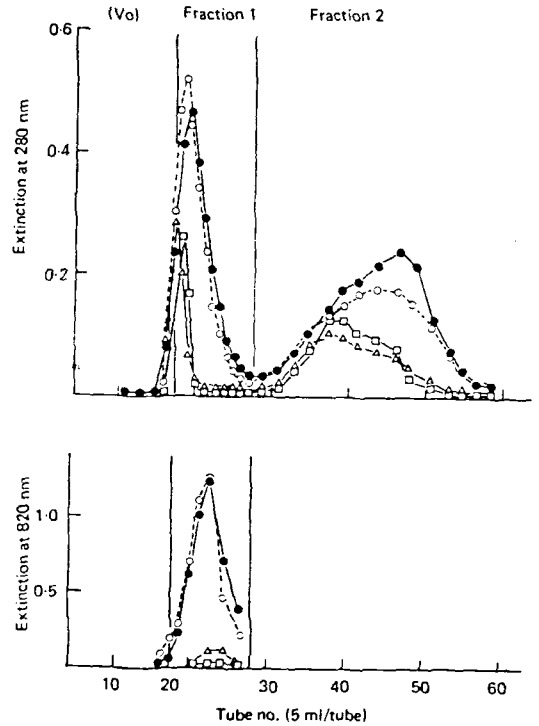


Fig. 2 Changes in the elution patterns with period after meal for intestinal contents after ingestion of 200g casein/kg (basal) diet; 2.5 h (●—●), 5.5 h (○—○), 13.5 h (△—△), 25.5-h (□—□). Vo, void volume; fraction I, large peptides; fraction 2, lower molecular weight components. [Lee et al. Br. J. Nutr. 43: 457(1980)]

지방 등과 혼합하여 Casein 혼합식으로 섭취시켰을 때에는 C·P·P.가 생성되나 Casein 단독투여로는 생성되지 않았다. 그 이유로는 Casein 단독 투여로는 장관내 단백질분해 효소의 활성이 현저하게 증가한 때문이라고 설명될 수 있었다.

따라서 장관내에 C·P·P.의 생성은 가장 정상적인 식이 섭취 조건하에서 Casein의 단계적 소화 과정에 일시적으로 생성되는 것이며, 그 생성에는 Casein 이외의 식이 성분이 필요하며 직접적으로는 식이의 장관내 이동속도 및 단백질분해 효소 활성의 강약 등에 영향받는 것으로 결론될 수 있다. 또한 생성량에 대해서는 20% Casein diet를 섭취한 직후 흰쥐의 장관내에는 약 5 mg의 C·P·P.가 생성되는 것으로 추정되었다.

2. C·P·P에 의한 장관내 가용성 칼슘의 증가 효과.

정상적인 식이 조건하에서의 동물의 장관내에는 식이 섭취후 단시간 내에 다량의 칼슘이 존재하게 된다. 그러나 그 대부분이 불용성 염을 형성하여 흡수되지 못하고 배설하여 버리고 만다. 따라서 섭취한 칼슘량 만으로는 칼슘의 장관내 흡수를 추정하기는 어려우며, 칼슘 흡수에는 장관내의 가용성 칼슘의 절대량과 그 이용성이 고려되어야 함은 당연한 생각이라 하겠다.

장관내에서 칼슘과 불용성 염 형성에 관여하는 식이 인자로는 수산, 피틴산, 과잉의 인산 등이 보고되어 있으나 장관내에서 칼슘의 가용화, 또는 불용성 염 형성의 저지 등에 관여하는 인자에 대한 보고는 극히 드물다. Mellander에 의한 C·P·P가 칼슘과 가용성 복합체를 형성함이 보고된 이래, Reeves와 Latour¹²⁾, Shörmullar 등,¹³⁾ Naito 등¹⁰⁾에 의해서 C·P·P와 칼슘의 결합성 및 C·P·P에 의한 인산칼슘 불용성 염 형성저지에 관한 지견이 *in vitro* 계에서 얻어졌다.

이에 여기서는 장관내에 생성된 C·P·P도 실제로 장관내 칼슘의 가용화에 효과적으로 작용하는 것인지에 대한 연구결과를 기술하고자 한다.

성장기 흰쥐에게 20% Casein diet, Casein의 아미노산 조성과 같은 아미노산 혼합식(Amino acid diet), Egg albumin diet, Soya-bean protein diet를 급여하고 장관내 가용성칼슘과 인의 함량을 소장상부와 하부로 나누어 측정했다. 그 결과는 Table 1과 Table 2에서 보는 바와 같다. 우선 가용성 칼슘량을 보면(Table 1), 장관내 전 가용성 칼슘량의 80% 이상이 소장부에 존재함을 알 수 있다. 또한 20% Casein diet를 섭취한 경우 다른 식이를 섭취한 경우에 비해 약 20배의 높은 함량을 나타냈으며 주로 소장하부에서 그 차이가 뚜렷했다. 가용성 인의 함량을 보면(Table 2), 20% Casein diet에 의해 다른 식이의 3~6배의 높은 함량을 나타냈다.

이러한 결과에서 Casein diet를 섭취한 후 장관내에 생성되는 C·P·P가 장관내 칼슘의 가용화와 더불어 인산칼슘의 불용성염 형성의 저지에 효과적으로 작용하고 있음이 분명해졌다고 본다. 이렇게 장관내 가용성 칼슘의 절대량을 증가시키는데 C·

Table 1. Expt 2. Soluble calcium in the small intestinal contents of rats at 2.5 h after ingestion of diets containing casein, amino acid mixture, egg albumin or soya-bean protein as the protein source

(Mean values with their standard errors for four rats/group)

Dietary protein	Casein		Amino acid		Egg albumin		Soya-bean protein	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Soluble Ca(mg)								
Portion of intestine :								
Upper†	0.36	0.06	0.27	0.04	0.28	0.02	0.24	0.03
Lower‡	2.28	0.09 ^a	1.16	0.06 ^b	1.19	0.13 ^b	0.82	0.05 ^c
Total	2.64	0.10 ^a	1.43	0.07 ^b	1.47	0.13 ^b	1.06	0.05 ^c
Percentage of dietary Ca §								
Portion of intestine :								
Upper†	54.8	4.4 ^a	32.8	0.4 ^b	39.0		33.3	2.7 ^b
Lower‡	43.9	2.1 ^a	24.1	2.1 ^b		0.8 ^b	14.2	0.6 ^c
Total	44.7	2.5 ^a	25.3	2.0 ^b	20.4	0.4 ^b	16.6	1.0 ^c

a, b, c, Values within the same horizontal row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

† Duodenum and jejunum.

‡ Ileum.

§ (Soluble Ca/PFG in the small intestinal content)/(Ca/PEG in diet) × 100,

(Lee et. al. Br. J. Nutr. 43 : 457(1980))

Table 2. Expt 2. Soluble phosphorus in the small intestinal contents of rats at 2.5h after ingestion of diets containing casein, amino acid mixture, egg albumin or soya-bean protein as the protein source

Dietary protein	(Mean values with their standard errors for four rats/group)							
	Casein		Amino acid		Egg albumin		Soya-bean protein	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Soluble phosphorus(mg)								
Portion of intestine :								
Upper †	0.29	0.05 ^a	0.12	0.02 ^b	0.12	0.01 ^b	0.25	0.03 ^a
Lower ‡	1.50	0.11 ^a	0.14	0.01 ^b	0.28	0.05 ^c	0.31	0.03 ^c
Total	1.79	0.12 ^a	0.26	0.03 ^b	0.40	0.05 ^{bc}	0.56	0.05 ^c
Percentage of dietary P §								
Portion of intestine :								
Upper †	43.9	3.4 ^a	20.7	1.0 ^b	25.9	1.8 ^b	50.0	5.8 ^a
Lower ‡	28.0	3.2 ^a	4.6	0.7 ^b	8.2	0.6 ^c	8.2	0.9 ^c
Total	29.6	3.2 ^a	6.9	1.0 ^b	10.8	0.4 ^c	12.8	1.5 ^c

a, b, c, Values within the same horizontal row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

† Duodenum and jejunum.

‡ Ileum.

§ (Soluble phosphorus/PEG in small intestinal content)/(phosphorus/PEG in diet) × 100.

(Lee. et. al. Br. J. Nutr. 43 : 457(1980))

P·P가 그 역할을 담당하고 있다는 근거로는 다음과 같은 것을 들 수 있다. 첫째 casein의 아미노산 조성과 똑같은 아미노산 조성을 갖고 있는 amino acid diet 또는 가용성 칼슘의 증가는 보이지 않았으므로 Casein diet에 의한 가용성 칼슘의 증가가 casein 구조 중의 특정한 아미노산에 기인하지 않는다고 본다. 둘째, egg albumin diet와 Soya-protein diet를 섭취한 후에도 인을 포함하지 않은 macropeptides가 생성되는데 이들 식이에서는 가용성 칼슘의 증가는 보이지 않았으므로 일반적인 macropeptides의 관여라고는 볼 수 없다. 셋째, Casein 단독 투여했을 때에는 장관내에 C·P·P가 생성되지 않았는데, 이 때에는 가용성 칼슘의 증가는 보이지 않았으므로 Casein 자체의 관여라고는 볼 수 없다. 넷째, 장관내용물의 pH를 측정해 본 결과 다른 시험식이에 비해 Casein diet에 의해서 오히려 pH가 높게 나타났다. 이로써 pH의 저하에 의한 칼슘의 가용화라고는 할 수 없다. 이러한 것들을 종합해 보면 Casein diet에 의한 가용성 칼슘의 증가에는 C·P·P가 직접 관여된 것이라고 설명될 수 있다.

3. 전 소장내에서의 칼슘흡수에 있어서 C·P·P의 효과.

그러면 casein diet를 섭취한 후 장관내에서의 가용성 칼슘의 증대가 직접 칼슘흡수에 유효하게 이용될 수 있을 것인가.

다음은 성장기 흰쥐에게 casein diet, amino acid diet, egg albumin diet 또는 100% casein을 meal-feeding 한 후 소장 내용물이 일정하게 유동하고 있는 상태에서(즉 casein diet를 섭취시켰을 때 소장내에 C·P·P가 존재하고 있는 조건하에서) ⁴⁵CaCl₂를 Stomach tube에 의해 경구 투여한 후, 소장 전역에 따른 칼슘 흡수량을 비교 검토한 결과이다.

Table 3에서 보면 소장에서의 30분간의 칼슘흡수량(⁴⁵Ca를 투여한 후 30분의 값에서 60분의 값을 빼값으로 장관으로부터의 30분간의 칼슘소실량)에 있어서 Casein diet에 의해 egg albumin diet의 약 2배의 높은 칼슘흡수량을 보였으며, ⁴⁵Ca의 방사능으로 평가했을 때는 약 10배 정도의 높은 흡수량을 보였다. 이러한 현상은 Casein diet와 amino acid diet 또는 100% Casein과 비교했을 때에도 마찬가지

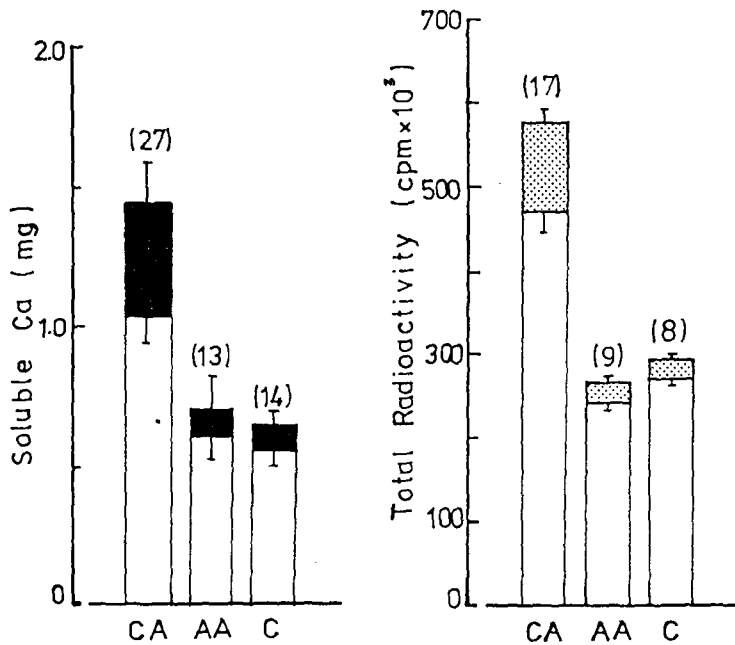


Fig. 3 Net Absorption of Ca and ⁴⁵Ca from the Soluble Fraction of Ligated Intestinal Contents during 30-min.

CA; 20% Casein; AA; 20% Amino Acid; C; Casein Alone Net Absorption of Ca (■) & ⁴⁵Ca (□)

() : % of Initial Ca.

Injection of ⁴⁵Ca : 678.6 × 10³ cpm for CA Group : 322.2 × 10³ cpm for the Other, 0.5ml, 37°, pH 7.0.

지로 Casein diet에 의해 훨씬 높은 흡수량을 나타냈다.

이로써 장관으로부터의 칼슘흡수는 Casein diet에 의해서 현저히 촉진되며 특히 소장하부의 기여가 크며, 가용성 칼슘의 증대가 흡수에 효과적으로 작용하고 있음이 장관내에서 명백해졌다고 볼 수 있다.

4. 소장하부 Closed segment에서의 칼슘흡수에 있어서 C·P·P.의 효과

장관내에서 칼슘 흡수에 관해서는 수많은 연구 논문이 있는데, 대체로 장관으로부터의 칼슘 흡수는 소장 전역에 걸쳐 일어나며 단위 장 길이당 흡수율은 12지장에서 최대이며 하부로 갈수록 효율은 감소하며, 상부에서는 active transport가 하부에서는 passive diffusion이 주요한 흡수 메카즘으로 보

고되어 왔다.

여기서는 칼슘의 장관 흡수에 따른 C·P·P.의 효과를 보다 명확히 규명하기 위해서 C·P·P.가 다량 존재하고 있으며 주로 passive diffusion에 의한 흡수 메카즘에 작용하고 있는 소장하부에 있어서 in situ 칼슘 흡수를 검토해 본 결과를 요약하였다.

각각의 식이를 시험 섭취한 후 장관용물이 장관내에 존재하고 있는 상태에서 소장하부만을 ligation하여 장loop를 만들고, 그 장loop내에 ⁴⁵Ca를 직접 투여하는 방법으로 식이에 따른 칼슘 흡수 효과를 비교하였다.

Fig3에서 보는 바와 같이 30분간의 칼슘 흡수량 (⁴⁵Ca투여 후 0분의 값에서 30분의 값을 뺀 값으로 장loop로부터 30분간의 칼슘의 소실량)에 있어서 Casein diet를 급여했을 때는 amino acid diet 또는

100% Casein 을 급여했을 때 보다 약 4배의 흡수량과 2 배의 흡수효율을 나타냈다.

이와 같이 Casein diet 에 의해서 소장하부의 칼슘 흡수가 현저하게 촉진되는 것이 명확해졌는데, 이것은 장관내의 가용성 칼슘의 증대가 직접 소장관공과 혈액간의 농도 기울기를 높여 passive diffusion의 흡수메카니즘이 촉진된 것으로 결론될 수 있다.

5. 장관내 C·P·P 생성에 미치는 lactose의 영향.

지금까지 많은 연구에서 우유의 칼슘흡수 인자로서 lactose 가 크게 인정되어 왔으며, 또한 장관내 칼슘 흡수에 따른 유당의 촉진 작용 메카니즘에 대해서도 여러가지 가설이 제창되어 왔다. 그 대표적인 것으로 장관내 pH 저하설, lactose-칼슘 복합체 형성설, 대사저해설(정막투과설) 등을 들 수 있으나, 가설은 주로 in vitro 실험 결과에 근거를 둔 것으로 실제 생리적 조건하에서는 증명된 바 없으며 각각 설명하기 어려운 모순점을 가지고 있어서 아직 정설은 확립되어 있지 않다. 이러한 점을 고려하여 실제로 분유식을 섭취할 때 C·P·P의 생성과 lactose의 관련을 규명하기 위하여, lactose를 함유하지 않은 분유식(lactose-free powdered milk)에 10% lactose 또는 30% lactose를 첨가하여 C·P·

P의 생성과 장관내 칼슘 흡수에 대한 효과를 검토하였다. 이때 lactose를 포함하지 않은 분유식에서는 Casein diet와 마찬가지로 C·P·P가 생성되고 가용성 칼슘의 증가와 함께 소장 하부에서의 칼슘 흡수도 증가되었으나 10% 또는 30%의 lactose를 첨가했을 때는 이러한 제 현상은 나타나지 않았다.

이것은 장관내의 칼슘의 가용화 및 흡수에 따른 C·P·P의 촉진효과에 lactose는 무관계임을 나타낸 것이라 보겠다.

이상의 여러가지 실험 성적에서 우유중의 칼슘의 이용성이 높은 원인의 하나가 Casein의 소화과정에서 생성되는 C·P·P의 존재이며, 이 C·P·P는 장관내에서 칼슘과 다른 음이온과의 불용성염의 형성을 방지하여 장관내의 가용성 칼슘량을 증가시키며, lumen·blood 간의 칼슘 농도 기울기를 높여 passive diffusion의 흡수를 촉진시킨다고 하는 장관내 칼슘흡수에 따른 C·P·P의 촉진 효과가 밝혀졌으며, 이러한 C·P·P의 효과가 lactose와는 독립적인 것도 밝혀졌다. 최근 Wasserman 등에¹⁴⁾ 의해서 C·P·P의 효과가 병아리 소장내에서도 규명되었는데, 특히 Casein의 인공소화에 의하여 분리 정제된 C·P·P를 병아리 소장내에 직접 투여했을때 칼슘 흡수가 현저하게 촉진되었음이 보고되었다.

TABLE 3 CALCIUM AND RADIOACTIVITY IN THE SOLUBLE FRACTION OF SMALL INTESTINAL CONTENTS OF RATS FED WITH CASEIN- OR EGG ALBUMIN-DIET

Time after dosage	30 min		60 min		Difference ^d	
	Casein	Egg albumin	Casein	Egg albumin	Casein	Egg albumin
PEG	(mg)					
Upper ^a	2.6±0.2 ^c	2.3±0.1	3.4±0.8	5.2±0.9		
Lower ^b	20.3±1.5	21.1±1.2	19.4±1.0	18.8±0.7		
Total	22.9±1.7	23.4±1.0	22.8±1.7	24.0±1.3		
Calcium	(mg)					
Upper	0.33±0.04	0.24±0.02	0.18±0.04	0.23±0.03	0.15±0.03	0.01±0.03
Lower	1.52±0.06	1.00±0.02**	0.61±0.08	0.44±0.04	0.91±0.13	0.56±0.09
Total	1.85±0.09	1.24±0.02**	0.79±0.11	0.67±0.06	1.06±0.16	0.57±0.11
Radioactivity	(cpm × 10 ⁴)					
Upper	28.5±3.5	25.5±2.9	24.8±3.7	49.9±1.5**	3.7±3.0	-24.4±4.4
Lower	224.0±20.6	71.8±17.4**	74.4±10.4	34.1±7.2*	149.6±18.7	37.7±6.3
Total	252.5±23.2	97.3±19.7**	99.2±10.6	84.0±6.7	153.3±21.4	13.3±10.2

^a Upper; duodenum and jejunum. ^b Lower; ileum. ^c Mean±standard error. ^d Calculated by subtracting the value at 60 min that at 30 min. Significant difference between the casein diet and the egg albumin diet; * P<0.05, ** P<0.01.

(Lee. et. al. Agric. Biol. Chem. 43 : 2009, (1979))

현재까지의 우유중 칼슘이용율을 높이는 인자에 관한 연구 성적을 종합해 보면 lactose, casein, lysine, 등 우유의 어느 특정 성분 만이 관여한다기 보다는 이들 각각의 성분이 공동으로 작용할 가능성도 크다고 생각된다. 예를 들면 C·P·P.에 의해서 장관내 칼슘의 가용화가 촉진되며, lactose에 의해서 소장 점막으로부터의 칼슘 인자가 동시에 작용할 수도 있을 것이다. 또한 우유성분의 직접적인 관여 이외에도 우유중의 칼슘과 인의 함유비가 장내 칼슘 흡수에 매우 적절한 비율임을 들 수 있다.

여기서는 장관내 칼슘 흡수에 따른 C·P·P.의 촉진 효과를 재삼 강조하였으나, 이러한 새로운 제안에 대해서는 앞으로 더욱 많은 연구가 이루어져야 함은 물론이다.

참 고 문 헌

- 1) Casta, D & Motta, S.(1963) Newer Methods of Nutritional Biochemistry. P.429, ed. by A.A. Albanese, Acad. press. New York and London.
- 2) Lengemann, F. W., Comar, C. L. & Wasserman, R. H.(1957), J. Nutr. 61 : 571.
- 3) Dupuis, Y. & Fournier, P.(1963) The Transfer of Calcium and Strontium Across Biological Membranes. P.277, ed. by Wasserman, Acad. Press, New York and London.
- 4) Armbrécht, H. J. & Wasserman, R. H.(1976). J. Nutr. 106 : 1265.
- 5) Wasserman, R. H., Comar, C. L. & Nold, M.M. (1956). J. Nutr. 59 : 371.
- 6) Raven, A. M., Lengemann, F. W. & Wasserman, R. H. (1960). J. Nutr. 72 : 29.
- 7) Mellander, O.(1950), Upsala Läkareforen Förh. 55 : 247.
- 8) Mellander, O. & Fölsch, G(1972). Protein and Amino acid Functions. Intern, Encyclopedia of Food and Nutrition Vol II, P.569, ed. by E. J. Bigwood, Pergamon Press. New York.
- 9) Mellander, O.(1947), Upsala Läkareforen Förh. 52 : 107.
- 10) Naito, H.; Kawakami, A. & Imamura, T. (1972). Agric. Biol. Chem. 36 : 407
- 11) Ribadeaw Dumas, B., Bringnon, G., Grosclaude, F & Mercier, J. C.(1972). Eur. J. Biochem. 25 : 505.
- 12) Reeves, R. E. & Latour; N. G.(1958). Science. 128 : 472.
- 13) Shormüller, J. & Frensenius, R.(1961). Z. Lebensmitt, Untersuch, 114 : 397.
- 14) Mykkanen & Wasserman, R. H.(1980) J. Nutr. Nutr, 110 : 2141.