

발아기간별 맥주맥 단백질의 분획 및 조성변화

서호수 · 조성환
경상대학교 식품공학과

Changes in Chromatographic Fractionation and Composition of the Proteins of Malting Barley Grain during Germination

Ho-Soo Seo and Sung-Hwan Cho

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University

Abstract

Changes in protein distribution, electrophoretic patterns and amino acid composition were investigated during germination of malting barley. Fractionation of the protein complex in ungerminated malting barley resulted in a higher hordein fraction but less glutelin fraction of the protein complex in ungerminated malting barley resulted in a higher hordein fraction but less glutelin fraction as compared to germinated malting barley. As germination proceeded, NPN, globulin and glutelin fractions continued to increase, accompanied by decreases in albumin and hordein fractions. The electrophoretic pattern of malting barley proteins showed three bands (molecular weight range of 15,000~41,000 daltons) in albumin fraction, five bands (19,000~61,000 daltons) in globulin fraction, five bands (18,000~56,000 daltons) in hordein fraction and four bands (20,000~47,000 daltons) in glutelin fraction, exhibiting quantitative changes in each fraction during germination. Amino acid analysis showed that glutamic acid, histidine, aspartic acid, serine, glycine, valine, alanine and leucine were major amino acids of proteins in malting barley grains. Glutamic acid increased slightly, but other amino acids showed no definite trend as germination proceeded.

Key words: germination, malting barley, electrophoretic patterns, fractionation

서 론

맥아맥 단백질은 배아의 효소를 생합성하는 원료물질이며 발효가 진행되는 동안 효소의 기본적인 영양물이 되는 아미노산을 형성한다. 또한, 단백질 자신이나 단백질의 peptide 분해산물은 양조과정의 중요한 부분이며 최종의 맥주에서 원하는 거품의 안정성을 얻게 하는 기능을 한다⁽¹⁾. 곡류에 들어 있는 단백질은 그 함량과 아미노산 조성 등에 따라 곡류의 영양가를 결정할 뿐 아니라, 우량 품종의 선별 및 육종에 이용되며 유전적 상호관계와 품종의 기원을 밝히는 데에도 대단히 중요하다⁽²⁾. 보리자체의 품종이나 경작상태, 유전적차이, 곡립입자의 부위에 따라 단백질의 함량 및 성질은 다르며, 발아도중에도 단백질의 성상은 변한다^(3,4). 곡립중 총단백질의 아미노산의 조성은 용해도별 분획에 있어 단백질 분해율이 발아기간동안 변화하기 때문에, 발아가 진행됨에 따라 그 조성비가 변화하게 된다. 이와 같이 단백질의 각 분획들은 전기영동이나 gel filtration, 아미노산

분석 등의 방법으로 확인하여, 품종간의 변이나 보리의 malting 적성 등을 판별하는데 이용되어 왔다⁽⁵⁻¹⁰⁾. 본 연구에서는 맥아의 효율적 이용과 공정개선 및 맥주제품의 향상을 기하고자, 맥주맥의 발아과정중, 용해도에 따라 다르게 추출되는 단백질의 함량과 각 분획 단백질의 전기영동 pattern 및 아미노산 조성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

1990년 경남 고성에서 재배, 수확한 두줄보리를 지하수를 사용하여 수침과 건침을 반복하여, 46시간 후 침맥도가 43%에 이르렀을 때, 실온 17°C, 습도 95% 이상이 유지되는 발아조에 옮겨 품온이 15°C로 유지되도록 하여 발아를 행한 다음, 발아 1일 3일, 5일, 7일에 각각 일정량 채취한 시료 맥주맥을 5일간 자연건조시켜, Wiley Mill로 60 mesh 이하로 분쇄한 후 냉 acetone(10 ml/g)과 ethyl ether로 탈지한 후 냉동보관하면서 단백질 분석용 시료로 사용하였다.

단백질의 분획

단백질의 분획은 Osborne 등⁽¹¹⁾의 방법을 변형시킨

Corresponding author: Sung-Hwan Cho, Department of Food Science & Technology, Gyeongsang National University, 900 Gajwa-dong, Chinju, Gyeongnam 660-701, Korea

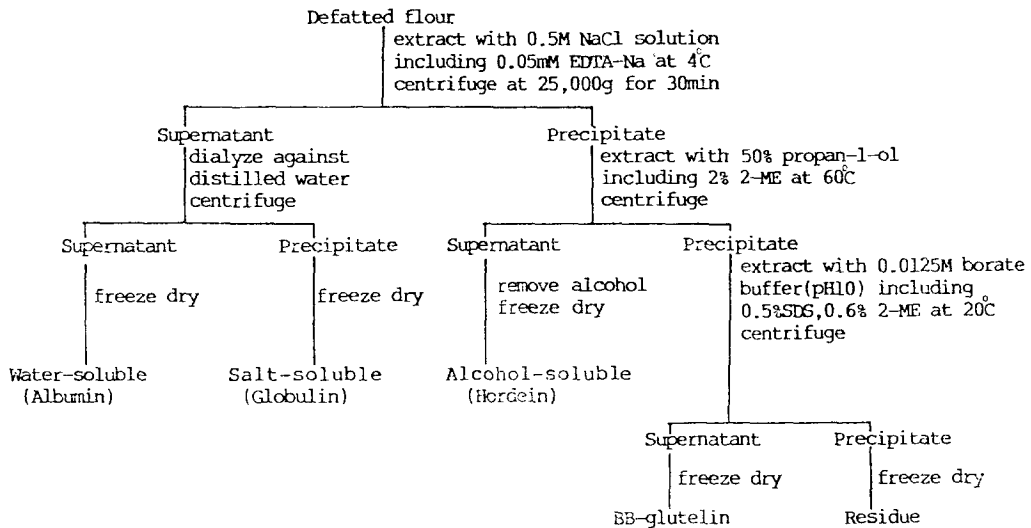


Fig. 1. Flow diagram of modified Osborne fractionation

El-Negoumy 등⁽¹²⁾의 방법으로 Fig. 1과 같이 행하였다. 즉, 탈지한 시료 5g에 0.05 mM EDTA-Na를 함유한 0.5 M NaCl 용액 50 ml를 가하여 4°C에서 magnetic stirrer로 교반하면서 2시간 추출한 다음, 원심분리하여 상등액을 얻었다. 잔사는 다시 동량의 동일용매와 증류수로 각각 1시간씩 같은 방법으로 추출, 원심분리하여 먼저 얻은 상등액과 합한 다음, 48시간 동안 증류수로서 투석시킨 후, 원심분리하여 상등액을 albumin 분획, 잔사를 globulin 분획으로 하였다. 또한, 수용성과 염용성 분획을 추출하고 남은 잔사는 동결건조하여 이 중, 정확히 1g을 취하여 원심분리관에 넣고 2% 2-mercaptoethanol을 함유하는 50% propan-1-ol로 추출한 다음, 원심분리하여 그 상등액을 감압하에서 rotary evaporator로써 alcohol을 제거한 다음, 투석하고 동결건조하여 hordein 분획으로 하였다. 잔사는 다시 20°C에서 0.5% SDS, 0.6% 2-mercaptoethanol을 함유하는 0.0125 M borate buffer(pH 10)로 추출한 후 원심분리하여 상등액을 투석하고 동결건조하여 glutelin 분획으로 하였다.

단백질의 정량

단백태 질소는 Coomassie Brilliant Blue G-250을 이용한 Bradford의 방법⁽¹³⁾으로 측정하였으며, 단백질 함량은 bovine serum albumin(Bio-Rad Co.제품)을 표준물질로 하여 얻은 표준곡선에서 상대흡광도 결과치와 비교하여 정량하였다.

전기영동

Phast System™ electrophoresis kit(Pharmacia, Sweden제품)을 이용하여 그 catalog중, Separation Technique File No.110⁽¹⁴⁾의 방법에 의해서 SDS-PAGE를 행하였다. 즉, 13 mm stacking gel zone, 32 mm gradient

gel zone, 두께 0.45 mm의 slab gel을 이용하였으며, 0.20 M SDS-Tris-tricine buffer(0.55% SDS, pH 5.5)를 전개용매로 사용하였다. 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)의 시료 buffer에 단백질 농도가 30 ng/μl 되도록 조절하여 2.5% SDS와 50% 2-mercaptoethanol(ME)를 가하여 100°C에서 5분간 가열한 다음, 0.01% bromphenol blue를 가하여 tracking dye가 anode buffer strip에 도달할 때까지 전개시켰다. 전개가 끝난 다음 staining solution으로 0.1% PhastGel Blue R을 함유하는 30% methanol과 10% acetic acid의 혼합용액을, destaining solution으로 methanol-acetic acid-distilled water(3 : 1 : 6, v/v/v)을 사용하여 염색 및 탈색을 행하였다. 이와 동시에 각 분리단백질의 분자량을 비교, 측정하기 위하여 Bio-Rad제품인 phosphorylase b(92,500 dalton), bovine serum albumin(66,200 dalton), ovalbumin(45,000 dalton), carbonic anhydrase(31,000 dalton), soybean trypsin(21,000 dalton) 및 lysozyme(14,000 dalton)을 표준 단백질로 사용하여 시료단백질과 동시에 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 다음, GS-300 Transmittance/Reflectance Scanning Densitometer로써 scan speed 6.5 cm/min, chart speed 2 mm/sec, signal output range 1 V의 조건으로 450 nm에서 scanning하였다. 상기한 방법으로 얻어진 표준물질의 상대적이동도(R_m)를 측정하고 단백질분자량 크기별 R_m값을 semi-log paper에 plot한 분자량 calibration curve에 의하여 시료단백질의 분자량을 측정하였다.

아미노산 조성의 분석

단백질시료 25 mg을 분해용 시험관에 넣고 6 N-HCl을 20 ml 가하고 N₂ gas로 10분간 충전하여 산소를 제거한 후 밀봉하여 110°C에서 22시간 가수분해시켰다. 가수분

Table 1. Protein distribution of malting barley germination (%)

Fraction	Days of germination				
	0	1	3	5	7
Albumin	18.6	16.0	14.4	14.2	12.5
Globulin	15.4	22.4	30.1	37.1	36.4
Hordein	23.2	22.8	15.6	14.4	10.8
Glutelin	8.2	10.5	12.0	11.0	12.4
Residue	24.3	12.6	11.2	9.6	8.5
Nonprotein nitrogen	5.2	10.9	12.8	11.0	16.5
Total	94.9	95.2	96.1	97.3	97.1

해산물을 여과한 다음 여과액을 vacuum rotary evaporator를 이용하여 50°C에서 HCl과 물을 완전히 증발시키고 sodium citrate buffer(pH 2.2)를 이용해서 25 ml로 채운 다음, 0.45 µm membrane filter로서 여과하고 40 µl를 취하여 아미노산 자동분석기(LKB-4150, Sweden 제품)로서 분석을 행하였다¹⁵⁾. 또한, 산분해에 의하여 파괴되기 쉬운 cystein과 methionine의 측정은 performic acid 산화법¹⁶⁾을 이용하였다.

결과 및 고찰

단백질 분획

단백질의 용해성은 시료와 용액의 비율, 온도, 용매의 특성 등 여러 조건에 따라 큰 차이가 있으나 Osborne 방법으로 맥주맥의 발아기간에 따른 단백질을 분획·정량한 결과는 Table 1과 같다. 즉, 발아하지 않은 원료 맥주맥에서는 용매에 가용성인 단백질층, hordein이 가장 높은 비율로 존재하였으며, 다음으로 albumin의 비율이 높았고 glutelin이 가장 적은 부분을 이루고 있는 것으로 나타났다. 1일 발아시킨 것은 발아시키지 않은 것보다 더 높은 nonprotein nitrogen(NPN) 함량을 보였으나 albumin, hordein 및 residue 분획에서 낮은 값을 나타내었다. 발아가 진행됨에 따라 발아 3일까지 NPN 분획 함량은 증가하다가 발아 5일째 약간 감소 후, 발아 7일째에는 크게 증가하였으며 albumin 및 hordein은 발아 전기간동안 지속적인 감소현상을 나타내었다. globulin 분획은 발아가 진행되었을 때, 발아 5일까지 급격한 증가를 보여 총단백질의 거의 40%를 차지하였고, 발아 7일에 다소 감소하였다. glutelin 분획은 커다란 변화는 없었지만 발아 3일까지는 증가하였으나, 발아 5일째 일시 감소하였으며 7일째 다시 증가하는 양상을 보였다.

전체적으로 볼 때, 염용해성 단백질인 globulin과 NPN분획의 상대함량은 발아함에 따라 증가하며 alcohol 용해성 단백질인 hordein분획의 상대함량은 계속적으로 감소하였다. 이 결과는 3일 동안 발아시킨 라이필이 발아시키지 않은 것보다 더 높은 NPN 함량을 보였고 alco-

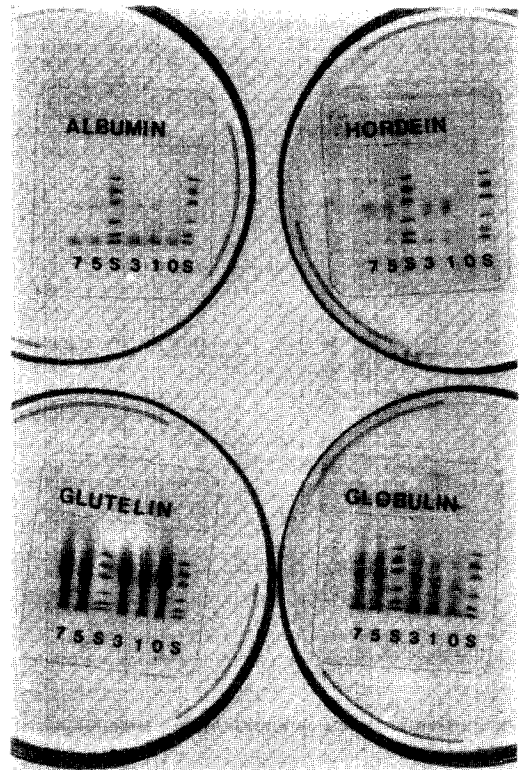


Fig. 2. SDS-PAGE electrophoretic patterns of malting barley proteins

Each figure in the bottom represents a germinating period. S: Standard proteins. Molecular weight of standard proteins from bottom to top; 14,400, 21,000, 31,000, 45,000, 66,200, 92,500 daltons.

hol 용해성 단백질인 prolamin과 기타 단백질에서는 낮은 값을 나타내었으며, 발아가 진행됨에 따라 NPN 함량은 계속 증가하여 발아 8일 이후에는 총단백질의 40% 이상까지 증가하였으며 prolamin은 거의 사라졌다는 보고¹⁷⁾와 일치하는 경향을 보여주었다. 아울러, Tsai 등¹⁸⁾은 옥수수줄 발아시키는 동안 prolamin(zein)이 크게 감소한다고 보고하였으며, Dalby 등¹⁹⁾도 밀, 보리, 라이필, 호밀 및 귀리가 발아하는 동안 prolamin 분획이 크게 감소하는 것으로 보고하고 있어 맥주양조시 이들 단백질은 용액중으로 이전되어 양금을 만들어 맥주의 품질을 유지하는데 해를 끼치고, 세균의 성장을 촉진시키므로¹⁹⁾ 발아를 행하여 이들 단백질의 함량을 줄이는 것이 양조상 중요한 문제라고 생각된다.

전기영동 pattern

Osborne의 방법을 변형시켜 분획하여 얻은 각 분획의 PhastSystemTM에 의한 electrophoretic pattern은 Fig. 2와 같고, 이들 각 분획별 구성단백질의 변화를 비교·검토하기 위하여 GS-300 densitometer를 이용하여 sca-

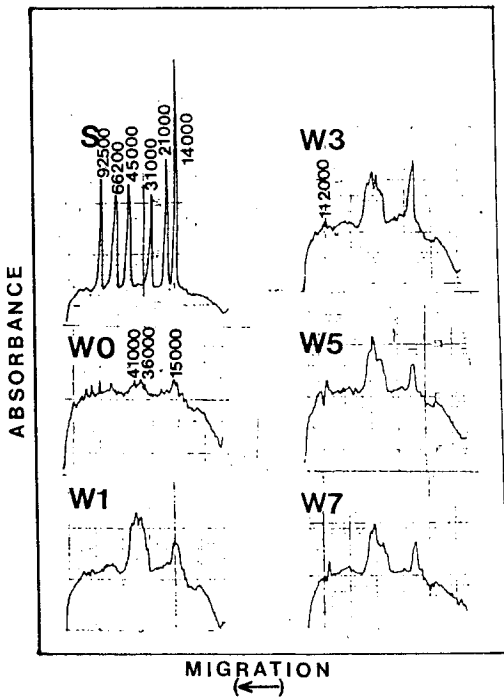


Fig. 3. Densitometric tracings of the reduced albumin fraction

S; standards of molecular weight, W0; ungerminated seeds W1, W3, W5, W7; seeds germinated for a period of 1 day, 3 days, 5 days and 7 days, respectively

ning한 densitogram은 Fig. 3-6과 같다.

즉, 표준물질의 이동으로부터 각 단백질의 이동을 비교한 결과, albumin 분획을 미발아 맥주맥에서는 분자량이 15,000, 36,000 및 41,000 dalton인 3개 분리대로 구성되어 있었으며, 1일 발아시킴으로서 모든 분리대의 함량이 크게 증가하였다. 또한, 3일 발아시에는 112,000 dalton의 고분자량분리대가 새롭게 생성되어 발아 7일까지 다소 증가하였다. 36,000 dalton 분리대는 발아함에 따라 급격한 증가를 보인 뒤 조금씩 감소하고 있었으며, 15,000 dalton 분리대는 발아 3일에 최대 peak를 이루었다. globulin 분획은 미발아 맥주맥에서 주요 분리대는 분자량이 19,000, 23,000, 29,000, 35,000 및 61,000 dalton의 5개 분리대로 구성되어 있었으며, 발아함에 따라 41,000 dalton의 분리대가 생성되어 다소 증가하였다. 23,000 dalton의 분리대는 미발아 맥주맥에서는 높게 나타났지만 발아가 진행됨에 따라 조금씩 감소하여 발아 5일째 완전히 소멸하였다. hordein 분획은 미발아 맥주맥에서 주로 분자량이 18,000~56,000(18,000, 26,000, 39,000, 43,000, 56,000) dalton의 단백질로 구성되어 있었다. 1일 발아시에 56,000 dalton 분리대는 낮게 나타났고, 39,000과 43,000 dalton 분리대는 크게 증가하였으며 26,000 dalton 분리대는 발아가 진행됨에 따라 점차

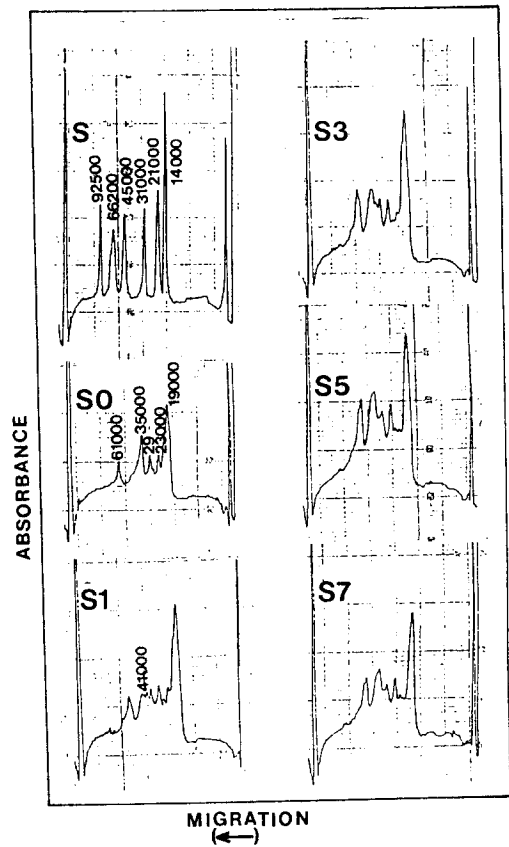


Fig. 4. Densitometric tracings of the globulin fraction

S; standards of molecular weight, S0; ungerminated seeds, S1, S3, S5, S7; seeds germinated for a period of 1 day, 3 days, 5 days and 7 days, respectively

감소하였다. glutelin 분획은 미발아 맥주맥에서 분자량이 20,000, 28,000, 42,000 및 47,000 dalton의 4개 분리대로 구성되어 있었으며, 발아 1일에 160,000 dalton의 고분자량 분리대가 생성되었으나, 발아 3일에 약간 감소 후 발아 5일에 소멸하였다. 원료맥주맥에 거의 존재하지 않았던 28,000 dalton 분리대는 발아 1일부터 증가하여 발아 5일까지 지속되었으나 발아 7일에 소멸하였고, 20,000 dalton 분리대는 발아가 진행됨에 따라 급격한 증가를 보이다가 발아 7일에 현저한 감소를 나타내었다.

아미노산 조성

발아기간별 시료의 영양학적 가치를 확인하기 위하여 아미노산 조성을 분석·정량한 결과는 Table 2와 같다.

이들 시료에서 검출된 아미노산은 모두 17종으로 이중 aspartic acid, serine, glutamic acid, glycine, alanine, valine, leucine 및 histidine 등이 주요한 구성아미노산을 알 수 있었으며, tryptophan을 제외한 필수아미노산을 확인하였다. glutamic acid가 미발아 맥주맥에서

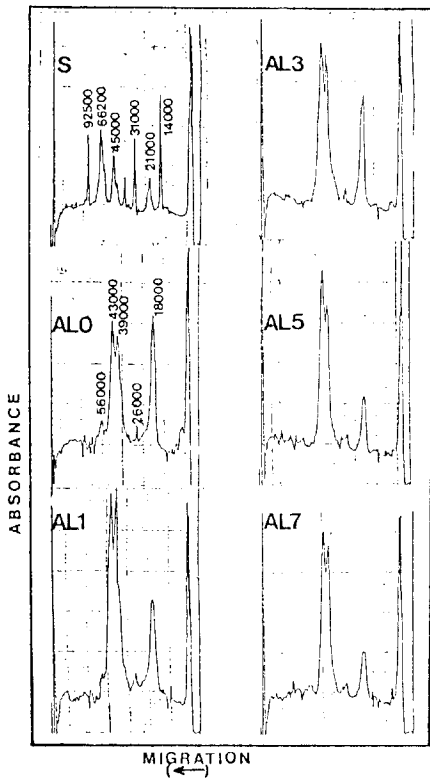


Fig. 5. Densitometric tracings of the hordein fraction S; standards of molecular weight, AL0; ungerminated seeds, AL1, AL3, AL5, AL7; seeds germinated for a period of 1 day, 3 days, 5 days and 7 days, respectively

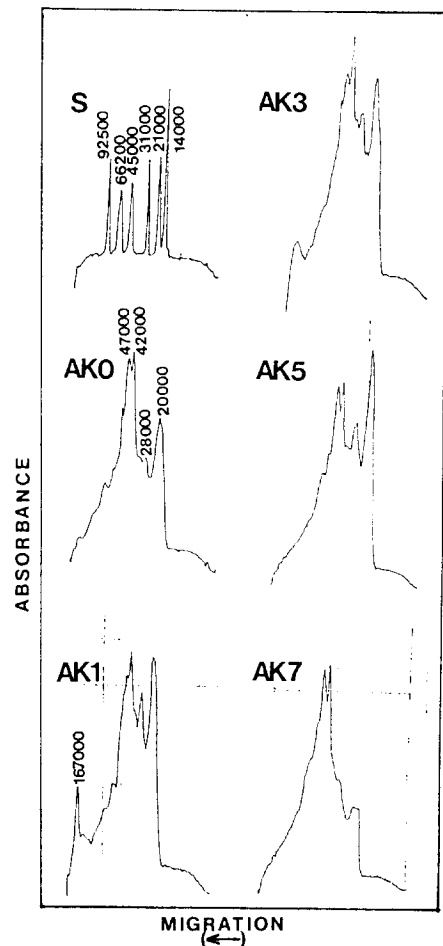


Fig. 6. Densitometric tracings of the glutelin fraction S; standards of molecular weight, AK0; ungerminated seeds, AK1, AK3, AK5, AK7; seeds germinated for a period of 1 day, 3 days, 5 days and 7 days, respectively

Table 2. Amino acid composition(g amino acid/100g protein) of malting barley proteins during germination

Amino acids	Days of germination				
	0	1	3	5	7
Asp	6.5	6.4	6.3	6.8	6.7
Thr	4.7	4.5	4.5	4.1	4.7
Ser	6.8	6.2	6.1	5.8	6.4
Glu	26.1	27.1	26.2	26.6	26.5
Pro	3.0	3.1	2.9	3.3	3.5
Gly	7.8	7.6	7.6	7.1	7.2
Ala	6.4	6.3	6.3	6.1	6.3
Cys	0.7	1.0	0.8	1.3	0.8
Val	6.5	6.3	6.1	6.5	6.5
Met	0.8	1.3	1.3	1.2	1.2
Ile	3.8	3.8	3.4	3.8	4.0
Leu	7.2	7.2	6.7	7.1	7.2
Tyr	1.1	1.7	2.2	1.4	1.3
Phe	3.7	4.5	5.1	5.4	4.7
His	8.0	6.4	8.3	7.4	7.1
Lys	4.3	4.1	4.3	4.2	4.2
Arg	2.6	2.5	1.8	1.9	1.7

26.1%로 가장 높은 함량을 나타내었고 발아시켰을 때 다소 증가하였으나 기타 아미노산은 발아에 따른 유의 할만한 변화는 없었다.

일반적으로 맥주맥을 제조하는 공정은 전분을 맥주의 알콜급원인 발효성 탄수화물로 변화시키는 당화성 효소를 생성하는 과정이나, 발아시킨 맥아에는 protease도 함유되어 있어 단백질을 가수분해하여 발효과정 중에 효모성장을 위한 영양소로 또는 방향성물질의 전구체로 작용한다¹⁹⁾. 즉, 맥아즙이나 맥주고형물로 이용되는 주된 보리성분은 전분이며 단백질도 37~45% 정도가 맥아즙에서 발견되고 있으며, 맥주맥 단백질중 albumin, hordein 등의 저장단백질함량이 증가할수록 발아시간을 연장하고 mashing 작업(맥아를 짓기하는 작업)을 수행하는데 어려움을 주어 맥아즙 수율 및 맥주의 수량을 감

소시킬 수 있다⁽¹⁹⁾. 본 실험결과에서 보는 바와 같이, 7 일간의 발아과정을 거치는 동안, globulin과 NPN 함량은 증가한 반면, albumin 및 hordein 함량은 다소 감소하는 경향을 나타내고 있어 발아과정이 양조공정개선과 맥주 품질유지에 필수적인 전처리과정임을 보여주고 있다. 물론, 맥주맥에 함유되어 있는 단백질이 양조과정 및 맥주제품 저장중에 일으킬 수 있는 단백질양금 등 변패현상을 방지하기 위하여서는 발아기간 중의 protease 생성 및 작용기작, 효모의 생육 및 발효능, 양조작업 후 사용기기 및 시설의 clean-out 작업 등과 관련지어, 본 실험결과를 기초로 하여 발아기간별 단백질 조성 및 기능에 관한 연구가 더욱 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

일정조건에서 7일간 발아시킨 맥주맥 단백질을 용매 별로 분리·추출하고 발아기간별, 그 조성변화를 조사한 결과, hordein이 가장 높은 비율로 존재하였고, 발아가 진행됨에 따라 albumin, hordein, residue 함량이 감소하였고, globulin, glutelin 및 NPN 함량은 증가하는 경향이였다. 아울러, 각 단백질 분획들의 전기영동패턴을 보면, albumin 분획은 분자량이 15,000, 36,000 및 41,000 dalton인 3개 분리대로 구성되어 있었으며 36,000 dalton의 분리대는 발아함에 따라 소멸되었다. globulin 분획은 19,000, 23,000, 29,000, 35,000 및 61,000 dalton의 5개 분리대로 구성되어 있었으며 발아시킴으로서 41,000 dalton의 분리대가 생성되었고, 23,000 dalton의 분리대는 발아 5일에 완전히 소멸되었다. hordein 분획은 26,000, 39,000, 43,000 및 56,000 dalton의 5개 분리대로 구성되어 있었고, glutelin 분획은 4개의 분리대(20,000, 28,000, 42,000, 47,000 dalton)로 구성되어 있었다. 아미노산 조성은 glutamin acid, histidine, aspartic acid, serine, glycine, valine, alanine 및 leucine이 주요한 아미노산이었으며 발아에 따른 유의할 만한 변화는 없었다.

문 헌

- Morrison, W.R.: Advances in cereal science and technology. *Amer. Ass. Cereal Chem.*, 11, 221(1980)
- Bietz, J.A.: Recent advances in the isolation and characterization of cereal protein. *Cereal Foods World*, 24 (5), 199(1979)
- Shewry, P.R.: An evaluation of techniques for the extraction of hordein and glutelin from barley seed and a comparison of the protein composition of Bomi and Riso 1508. *J. Exp. Bot.*, 29, 677(1978)
- Dalby, A. and Tsai, C.Y.: Lysine and tryptophan increases germination of cereal grains. *Cereal Chem.*, 53, 222(1976)
- Beames, R.M. and Eggum, B.O.: The effect of type and level of protein, fibre and starch on nitrogen excretion patterns in rats. *Br. J. Nutr.*, 46, 301(1981)
- Shewry, P.R. and Mifflin, B.J.: Characterization and synthesis of barley seed proteins.; In *Seed proteins: Biochemistry, Genetics, Nutritive Value*, Gottschalk, W. and Muller, H.P.(eds.), Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publ., The Hague, The Netherlands. p.143(1983)
- Robert, L.S., Matlashewski, G.J., Adeli, K., Nozzolillo, C. and Altosaar, I.: Electrophoretic and developmental characterization of grain globulins in cultivars of different protein content. *Cereal Chem.*, 60, 231(1983)
- Pomeranz, Y., Eslick, R.F. and Robbins, G.S.: Amino acid composition and malting and brewing performance of high-amylose and Hiproly barley. *Cereal Chem.*, 49, 629(1972)
- Mosse, J. and Baudet, J.: Crude protein content and amino acid composition of seeds: Variability and correlations. *Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr.*, 32, 225(1983)
- Riggs, T., Sanada, M., Morgan, A.C. and Smith, D.B.: Use of acid gel electrophoresis in the characterization of "B" hordein protein in relation to malting quality and mildew resistance of barley. *J. Sci. Food Agric.*, 34, 576(1983)
- Weber, K. and Osborne, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244(16), 4406(1969)
- El-Negoumy, A.M., Newman, C.W. and Moss, B.R.: Chromatographic fractionation and composition of the components of the salt-soluble proteins from Hiproly (CI 3947) and Hiproly Normal(CI 4362) barleys. *Cereal Chem.*, 54(2), 333(1977)
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248(1976)
- PhastSystem™ Electrophoresis Kit Separation Technique File No.110, edited by Pharmacia Laboratory Separation Division s-75182 Uppsala, Sweden (1986)
- Rhodes, A.P. and Gill, A.A.: Fractionation and amino acid analysis of the saltsoluble protein fraction of normal and high-lysine barleys. *J. Sci. Food Agric.*, 31, 467(1980)
- Moore, S.: On the determination of cystin as cysteic acid. *J. Biol. Chem.*, 238, 235(1963)
- Wu, Y.U.: Lysine content of triticale protein increased by germination. *J. Agric. Food Chem.*, 30, 820(1982)
- Tsai, C.Y., Dalby, A. and Johnes, R.A.: Lysine and tryptophan increases during germination of maize seed. *Cereal Chem.*, 52, 356(1975)
- Kim, O.K. and Pomeranz, Y.: Functional and nutritional characteristics of cereal proteins. In *Digestibility and Amino Acid Availability in Cereals and Oilseeds*, Finley, J.W. and Hopkins, D.T.(ed), American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota p.195(1985)