

*Institut für Ernährungsforschung der Landwirtschaftlichen Universität
zu Poznań (Polen) (Direktor: Prof. Dr. St. Stawicki)*

Problematik der Verwendung des Protozoons *Tetrahymena pyriformis* zu Untersuchungen über den Nährwert von Eiweißstoffen

W. Janitz und S. Grodzka-Zaptytowska

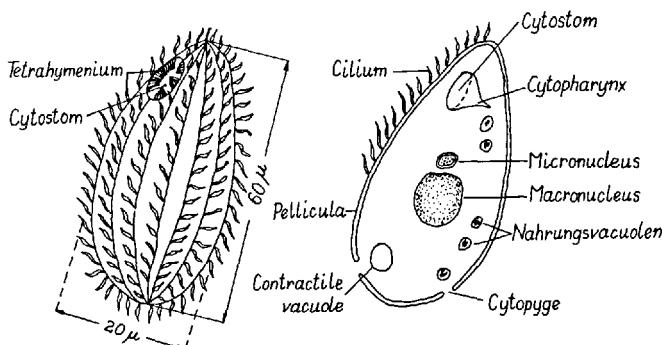
(Eingegangen am 19. April 1982)

Bedenken hinsichtlich Präzision und Zeitaufwand bei bisherigen biologischen Methoden zur Bewertung des Nährwertes von Eiweiß erfordern ständige Vervollkommenung der Methoden und Forschungen nach neuen Lösungen. Die auf diesem Gebiet unternommenen Vorhaben dürfen sich nicht nur auf die methodische Rationalisierung beziehen, sondern auch auf Forschungen über Möglichkeiten, neue Organismen anzuwenden, die relativ bezüglich des für den Menschen charakteristischen Ernährungsbedarfs ähnlich reagieren.

In den letzten Jahren stieß das Protozoon *Tetrahymena pyriformis* auf lebhaftes Interesse. Es wurde in zahlreichen Untersuchungen (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) bewiesen, daß der Aminosäurebedarf dieses Einzellers dem Bedarf des Menschen und der Ratte entspricht. Das mit der Bewertung des Nährwertes von Eiweiß unter Anwendung dieses Einzellers verbundene Untersuchungsverfahren ist bedeutend weniger zeitaufwendig und billiger im Vergleich mit den bei Ratten angewandten klassischen Methoden. Es herrscht die Ansicht, daß das Protozoon *Tetrahymena pyriformis* bei den allgemein üblichen (im halbautomatischen System) Bestimmungen des Nährwertes von Eiweiß verwendet werden kann (unter Berücksichtigung der Erfassungsmöglichkeit des Gehaltes an assimilierbaren („available“) Aminosäuren). Kenntnis und Verbreitung des bisher auf diesem Gebiet Bekannten scheinen überaus zweckdienlich zu sein.

Tetrahymena pyriformis – Struktur, Physiologie und Laborzüchtung

In der protozoologischen Systematik gehört das Protozoon *Tetrahymena pyriformis* dem Typ Ciliatae, Klasse Holotrichia, Ordnung Hymenostomata an. Es gehört zu der allgemeinen Süßwasserart mit großem Anpassungsvermögen auf dem Gebiet der Ernährungsart. In der Natur ernährt es sich mit Bakterien oder mit tierischen Geweben. In der Laborzucht können auch synthetische Nährstoffe utilisiert werden. Es hat eine birnenförmige Gestalt mit zugespitztem vorderem Pol. Der ganze Körper hat eine Größe von etwa $20 \times 60 \mu$. Die Struktur der Mundöffnung (Zytopstom) und das Vorhandensein von die Haut (Pellicula) deckenden Zilien bilden eine charakteristische, morphologische Eigenheit dieses Organismus gegenüber anderen Einzellern. Nahrung wird durch die Mund-

Abb. 1. *Tetrahymena pyriformis*.

öffnung unter Mitwirkung von vier wallenden Häutchen (Tetrahymenium) aufgenommen. Die Mundöffnung geht in den Schlund (Zytopharynx) über; die hinuntergeschluckte Nahrung kommt in die kugelförmigen Vakuolen (Nahrungs vakuolen), in die das Zytoplasma die Verdauungsenzyme absondert. Unverdaute Nahrungsreste werden durch eine Öffnung (Zytopype) in der Pellicula ausgeschieden. Der Wasserüberschuß, der aufgrund der Osmose in das ganze Protozoon eindringt, sammelt sich unter der Pellicula in den sog. kontraktilen Vakuolen, die sich jeweils nach etlichen Sekunden zusammenziehen und sich durch eine kleine Öffnung in der Pellicula entleeren (Abb. 1).

Tetrahymena pyriformis vermehrt sich durch einen geschlechtlichen Prozeß, die sog. Konjugation. Einige Formen dieses Protozoons besitzen keinen Kleinkern (Mikronukleus), und dann verläuft die Fortpflanzung auf dem Wege der Teilung transversal zur Längsachse des Körpers. Das Vermehrungstempo ist sehr groß.

Verschiedene Stämme von Protozoen können gezüchtet werden. In der Untersuchungspraxis werden hauptsächlich die Stämme *Tetrahymena pyriformis* W sowie *Tetrahymena thermophila* WH₁₄ angewendet, die im Amerikanischen Zentrum für die Sammlung von Musterkulturen (ATCC) in Rockwill gezüchtet wurden. Die Zucht des Protozoons *Tetrahymena*

Tab. 1. Chemische Zusammensetzung der Substrate für die Zucht des Protozoons *Tetrahymena pyriformis*.

Festes Substrat	Flüssiges Substrat		
Dextrin	- 8,0 g	Pepton	- 5,0 g
CH ₃ COONa	- 0,6 g	Trypton	- 5,0 g
Hefeextrakt	- 5,0 g	K ₂ HPO ₄	- 0,2 g
Leberextrakt	- 0,6 g	redestilliertes Wasser	- 1,0 l
Trypton	- 5,0 g		
Agar	- 16,0 g	pH = 7,2	
redestilliertes Wasser	- 1,0 l		
pH = 7,2-7,4			

kann man auf flüssigem Substrat (Nährbouillon) bei 25 °C und auf festem Substrat (Agar) bei 18 °C durchführen. Der beschränkte Nährstoffvorrat des Substrats sowie die Möglichkeit einer Selbstvergiftung mit den Komponenten des Stoffwechsels erfordern ständige Übertragungen des Protozoons auf frische Nährböden. In Bouillonnährböden erfolgt die Auswechselung des Substrats im allgemeinen nach 7 Tagen und in Agarnährböden nach 30 Zuchttagen (Tab. 1).

All diese Prozeduren, angefangen von der Vorbereitung des Substrats bis auf die Übertragung des Protozoons, bedürfen aseptischer Bedingungen.

Bestimmung des Nährwertes von Eiweißstoffen unter Anwendung des Protozoons Tetrahymena pyriformis

Das Prinzip der Bewertung des Nährwertes von Eiweiß unter Mitwirkung von Tetrahymena läßt sich auf Bestimmung des relativen Koeffizienten der Wachstumskapazität RNV (relative nutritive value) zurückführen (5, 9, 10).

$\frac{\log \text{Menge der im untersuchten Eiweiß vermehrten Organismen} - \log \text{Menge der in das untersuchte Eiweiß eingeführten Organismen}}{\log \text{Menge der im Mustereiweiß vermehrten Organismen} - \log \text{Menge der in das Mustereiweiß eingeführten Organismen}}$

$$\text{RNV} = \frac{\log \text{Menge der im untersuchten Eiweiß vermehrten Organismen} - \log \text{Menge der in das untersuchte Eiweiß eingeführten Organismen}}{\log \text{Menge der im Mustereiweiß vermehrten Organismen} - \log \text{Menge der in das Mustereiweiß eingeführten Organismen}} \times 100$$

Um eine regelmäßige Entwicklung des Protozoons zu sichern, muß der Gehalt an Eiweiß im Substrat um etwa 0,3 mg N je 1 ml Substrat schwan-

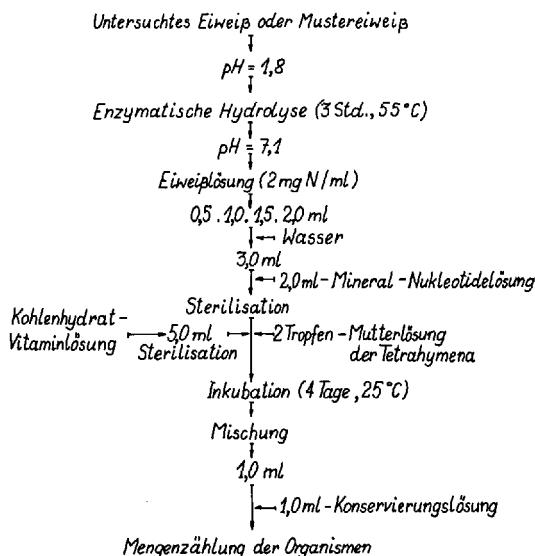


Abb. 2. Schema des analytischen Verfahrens bei Bestimmung des Nährwertes von Eiweiß unter Anwendung des Protozoons *Tetrahymena* (16).

ken (6). Das zu untersuchende Eiweiß muß zerkleinert, entfettet und enzymatisch hydrolysiert werden (4, 11, 12, 13). Als Standardeiweiß wird generell Casein genommen (14, 15). Es wurde aber auch schon vorgeschlagen, das Casein durch eine genau festgelegte (quantitativ und qualitativ) Lösung freier Aminosäuren zu ersetzen (7, 13). Das Standardeiweiß oder das zu untersuchende Eiweiß bildet in Verbindung mit einer Zusammensetzung von Vitaminen, Kohlenhydraten, Nukleotiden und Spurenelementen das Entwicklungssubstrat für das Protozoon (6, 7, 13, 15, 16). Die Entwicklung des Protozoons auf dem Untersuchungssubstrat und auf dem Mustersubstrat verläuft bei 20 °C oder 25 °C im Dunkeln ca. 4 Tage lang (66–96 Stunden). Bewertungskriterium für den Nährwert des Eiweißes ist die Menge der vermehrten Protozoen (Abb. 2).

Man hat eine Reihe von Methoden zur Mengenbestimmung der vermehrten Protozoone geprüft. Eine der ersten war die Methode der mikroskopischen Zählung einzelner Organismen mittels Hämozytometer (5). Jetzt schlägt man vor, bei dieser Methode den Zähler von Coulter (16, 17) („Coulter counter“) anzuwenden. Viele Autoren (18, 19) empfehlen die Methode der Messung der Intensitätsabschwächung des Lichtes, das die Lösung (Substrat mit dem Protozoon) durchdringt (Trübungsmessung, Turbidometrie). Andere Methoden berücksichtigen die Auswertung metabolischer Eigenschaften des Protozoons. Dies sind: Ammoniak-Stickstoff-Akkumulation (20), Reduktion von Triphenyltetrazoliumchlorid (2, 3), Sauerstoffabsorption (21, 22), Biolumineszenz der Adenosintriphosphorsäure (23, 24) sowie Konzentrationsmessung von Tetrahymanol (25, 26). Die erwähnten Methoden wurden unterschiedlich beurteilt. Es herrscht jedoch die Ansicht vor, daß die größte Präzision die Methode der Mengenzählung einzelner Organismen unter dem Mikroskop aufweist (19). Verhältnismäßig hohe Messungspräzision wird auch der Messung der Ammoniak-Stickstoff-Akkumulation zugeschrieben. Der Koeffizient der Korrelation dieser Methode mit der klassischen Methode – der mikroskopischen Zählung – beträgt $r = 0,94$ (19).

Probleme bei der praktischen Auswertung

Die durch Anwendung des Protozoons *Tetrahymena* bestimmten Werte des relativen Koeffizienten der Wachstumsleistung (RNV) des untersuchten Eiweißes werden vor allem dem in Versuchen mit Ratten erzielten Koeffizienten der Wachstumsleistung (PER) gegenübergestellt. Daraus ergibt sich die Grundlage für die Ableitung von mathematischen Beziehungen, die die Berechnung des Wertes PER unter Anwendung des experimentell bestimmten Koeffizienten RNV ermöglichen. Evancho u. a. (16) stellten unter Anlehnung an die an vielen Lebensmitteln durchgeföhrten Untersuchungen fest, daß eine Korrelation zwischen PER und RNV besteht. Sich auf diese Abhängigkeit stützend, leiteten sie die Formel $PER = + 0,286 + 0,022 \text{ (RNV)}$ [$r = 0,90$] ab. Evans u. Mitarb. (27) bestimmten die Regressionsgleichung für Eiweiß aus Fleisch und Fleischerzeugnissen mit $RNV = 9,67 + 0,89 \text{ (PER)}$, $r = 0,62$ (Abb. 3). In diesen Untersuchungen wurde der Nachweis erbracht, daß in bezug auf Muskeleiweiß die Indexzahl RNV einen höheren Korrelationsgrad mit den chemischen Aminosäurenindexzahlen (TEAA, EAA) für den Nährwert von Eiweiß aufweist als der an Ratten ausgeführte Test auf PER (Tab. 2). Dieselben Autoren

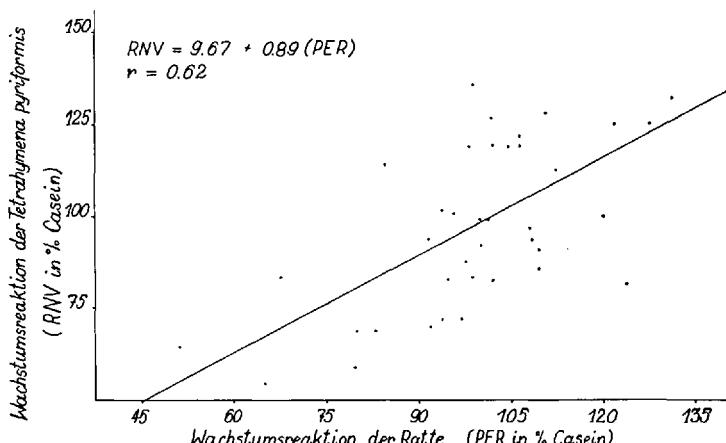


Abb. 3. Beziehung zwischen RNV und PER für Fleisch und Fleischerzeugnisse (27).

stellten in einer anderen Publikation (28) fest, daß Veränderungen des Nährwertes des Eiweißes im Fleisch, das verschiedenen „kulinarischen“ Verfahren (Schmören) unterzogen wurde, mit Hilfe des Protozoons *Tetrahymena* aufs genaueste kontrolliert werden können.

Konzentration und Grad der enzymatischen Hydrolyse von Eiweiß sind Grundfaktoren, die die Korrelation zwischen RNV und PER determinieren. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren stellten Dryden u. a. (29) fest, daß der unter Mitwirkung des Protozoons bestimmte Wert für PER folgende Formel haben muß: $PER = f \times (\text{Wachstum von } Tetrahymena \text{ pyriformis} \times \text{Grad der enzymatischen Hydrolyse „in vitro“})$. Der Umrechnungskoeffizient „f“ hängt von der Konzentration des Eiweißes im Nähr-

Tab. 2. Beziehung zwischen Aminosäurengehalt im Fleisch und in den Fleischerzeugnissen und dem Wert PER und RNV (27).

Beziehung	Gleichung	Korrelation
- PER -		
Gesamtmenge essentieller Aminosäuren*)	$PER = 27,27 + 1,22$ (TEAA)	0,447
Essentielle Aminosäuren - Index**) (EAA)	$PER = 1,16 + 1,21$	0,394
- RNV -		
Gesamtmenge essentieller Aminosäuren*)	$RNV = -51,74 + 2,56$ (TEAA)	0,655
Essentielle Aminosäuren - Index**) (EAA)	$RNV = -104,15 + 2,50$	0,626

*) Total Essential Amino Acids

**) Essential Amino Acid Index - Oser (42)

boden ab. Bei einer Eiweißkonzentration von 0,27 mg N je Milliliter Substrat wurde unter Berücksichtigung der Bedingungen des bei diesen Untersuchungen angewendeten Verfahrens folgende Formel ermittelt:

$$\ln \text{PER} = -11,5621 - 0,75278 \ln x_1 + 2,78605 \ln x_2$$

$$x_1 - \frac{\text{Indexzahl der Menge}}{\text{Menge der Organismen/ml Substrat mit Casein}}$$

$$x_2 - \frac{\text{Indexzahl der enzymatischen Hydrolyse}}{\text{Menge der Organismen/ml Substrat mit untersuchter Probe}}$$

x_2 – Indexzahl der enzymatischen Hydrolyse

Satterlee unternahm mit seinen Mitarbeitern (30) den Versuch einer Unifizierung der bisherigen konzeptionell-methodischen Lösungen durch Einführung der Indexzahl des Nährwertes des Eiweißes, ausgedrückt durch das Symbol T-PER.

$$\text{T-PER} = 7,1116 + 0,0152 (x_1) - 0,2501 (x_2) + 0,0325 (x_3)$$

wobei:

x_1 – Verdaulichkeit des Eiweißes „in vitro“

x_2 – Wachstum des Protozoons (Menge der Organismen) im Substrat mit Mustereiweiß

x_3 – Wachstum des Protozoons (Menge der Organismen) im Substrat mit untersuchtem Eiweiß

Die Mannigfaltigkeit von Konzeptionen zur praktischen Bestimmung des Nährwertes von Eiweiß unter Anwendung des Protozoons *Tetrahymena* resultiert aus der individuellen – von einzelnen Autoren empfohlenen – Prozedur des analytischen Verfahrens. Dies betrifft vor allem die sog. „Anpassungsfähigkeit“ des Eiweißes an die Zuchtbedingungen für das Protozoon. Die damit verbundenen Schwierigkeiten ergeben sich aus der Tatsache, daß der Grad der Verwertung des Eiweißes durch das Protozoon *Tetrahymena* unter anderem vom Vorhandensein anderer chemischer Komponenten in der untersuchten Probe und vom Grad der enzymatischen Hydrolyse des Eiweißes der Probe abhängig ist. In den Musterversuchen bemühte man sich, diese Bedingtheiten zu klären. Unter Berücksichtigung des Vorhandenseins anderer Komponenten außer Eiweiß in der untersuchten Probe zog man vor allem technologische Zusätze in Betracht. Evans u. a. (11) bewiesen, daß Fett die Entwicklung des Protozoons einschränkt. Schon früher stellten Rølle und seine Mitarbeiter (31) fest, daß einige Fettsäuren und nach Conner und seinen Mitarbeitern (32) auch Sterine die Entwicklung des Protozoons hemmen können. Holz und Conner (33) rechnen manchen Fettsäuren sogar toxische Eigenschaften zu. Natriumchlorid bei in Fleischerzeugnissen üblicher Konzentration hatte keinen negativen Einfluß auf die Entwicklung von *Tetrahymena* (11). Sutton (34) beobachtete, daß sich in dem Maße, wie sich die Konzentration von Nitrat, Ascorbat, Sorbat, Benzoat und Propionat im Entwicklungssubstrat des Protozoons erhöht, sich dessen Lebensaktivität verringert und sich die Menge einzelner Organismen vermindert (Abb. 4). Hsu u. a. (35) analysierten den Einfluß von Zusätzen auf die Entwicklung von *Tetrahymena thermophila WH*₁₄. Unter den geprüften Arten von Zusätzen war es nur Paprika, das in 1%iger Konzentration nicht toxisch

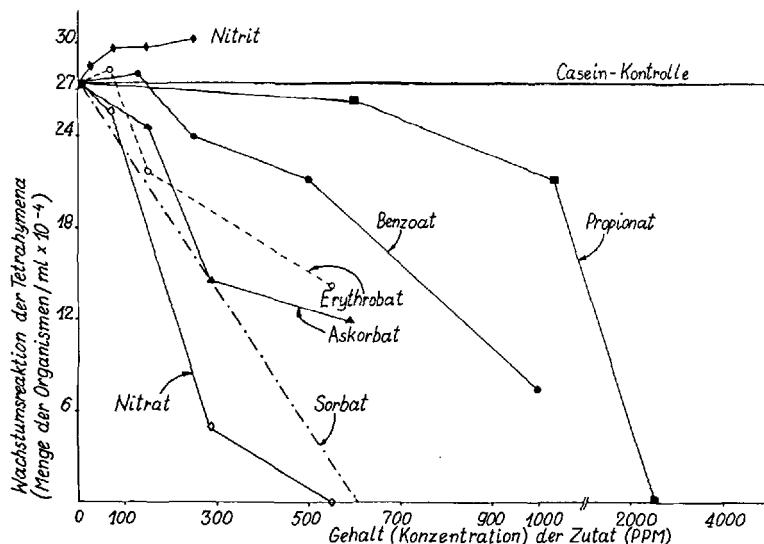


Abb. 4. Einfluß ausgewählter Zusätze zu Nahrungsmitteln auf das Wachstum von *Tetrahymena thermophila* WH₁₄ im Vergleich mit Caseinsubstrat (35).

war (Abb. 5 u. 6). In anderen Untersuchungen (36) wurde bewiesen, daß Chlorogensäure die Assimilierung der Peptide und Aminosäuren erschwert. Im Bereich der sekundären Veränderungen der Eiweiße und Aminosäuren, als deren Assimilierung determinierender Faktor, wurde bisher nur dem Vorhandensein der Aminozuckerkomplexe Beachtung

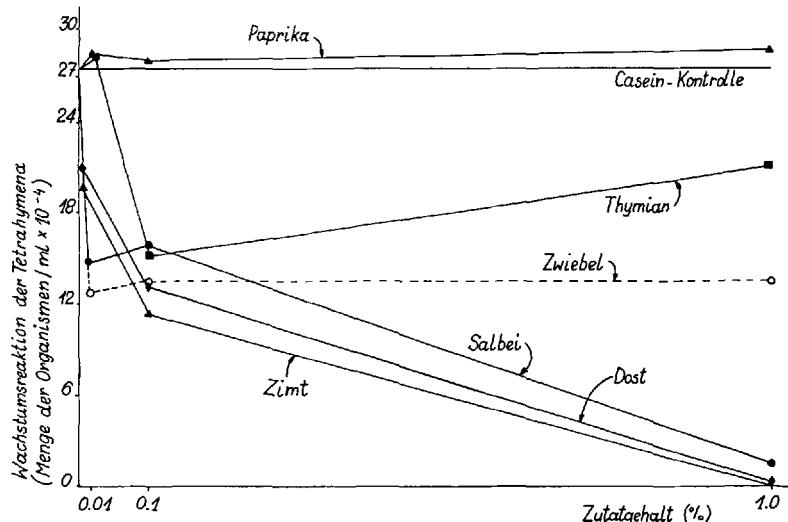


Abb. 5. Einfluß von Paprika, Thymian, Zwiebel, Salbei, Dost (Majoran) und Zimt auf das Wachstum von *Tetrahymena thermophila* WH₁₄ im Vergleich mit Caseinsubstrat (35).

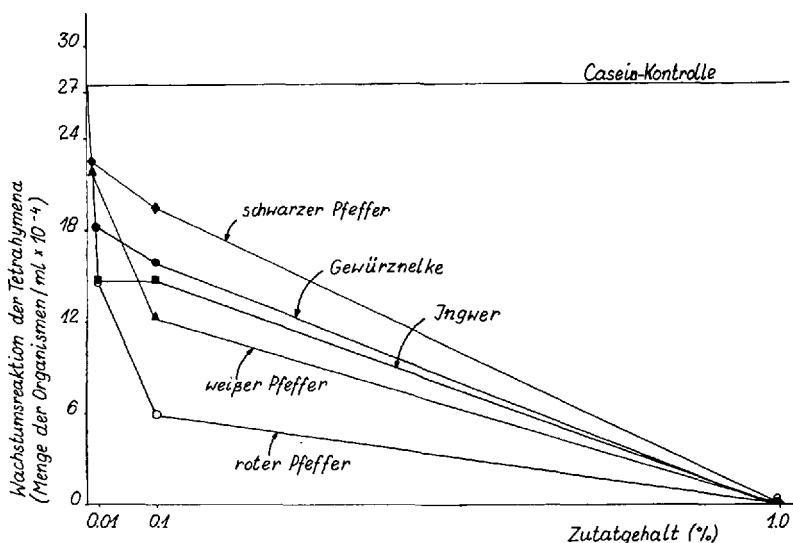


Abb. 6. Einfluß von schwarzem, weißem und rotem Pfeffer, von Gewürznelken und Ingwer auf das Wachstum von *Tetrahymena thermophila WH₁₄* im Vergleich mit Caseinsubstrat (35).

geschenkt. Warren und Labuza (37) sowie Wang u. a. (38) erzielten Ergebnisse, die davon zeugen, daß das Protozoon *Tetrahymena* wahrscheinlich die Fähigkeit zur Verwertung von Produkten der Maillard-Reaktion besitzt. Wir meinen allerdings, daß dies noch immer Annahmen sind und daß dieses Problem noch zusätzliche Untersuchungen erfordert. Bestätigung für diese Zweifel sind Resultate von Untersuchungen über Gehaltsveränderungen an assimilierbaren Aminosäuren in einer ganzen Reihe von Nahrungsmittelprodukten, die einer Wärmebehandlung unterzogen wurden.

Stott und Smith (7) verglichen die Genauigkeit der Bestimmungsverfahren für verfügbares Lysin unter Anwendung von *Tetrahymena pyriformis* mit der Methode mit Fluordinitrobenzol. Es wurde festgestellt, daß in Rohstoffen und Erzeugnissen mit hohem Gehalt an Lysin (8 g/16 g N), z. B. im Fleisch, die Methode unter Mitwirkung des Protozoons ausreichend präzis ist, aber in Rohstoffen mit niedrigerem Gehalt an Lysin bessere Ergebnisse bei der klassischen Methode mit Fluordinitrobenzol erreicht wurden.

Shepherd u. a. (13) bewiesen durch Einführung einer Reihe von Rationalisierungen die Möglichkeit der Bestimmung des verfügbaren Methionins, Tryptophans und Lysins. Die Präzision der Lysin-Messung unter Anwendung des Protozoons entsprach den bei Untersuchungen an Hühnchen erzielten Ergebnissen.

Wesentlicher Faktor beim analytischen Verfahren zur Bestimmung des Nährwertes von Eiweiß unter Anwendung des Protozoons *Tetrahymena* ist die enzymatische Einleitungshydrolyse des Eiweißes. Rockland und Dunn (1) sowie Viswanatha und Liener (4) haben bemerkt, daß das Protozoon zur proteolytischen Zersetzung von nativen globulären Eiweißstof-

fen nicht fähig ist und daß Inhibitoren für Trypsin und Hämagglutinin auf seine Verdauungsenzyme nicht einwirken. Die Messung der Wachstumsreaktion von *Tetrahymena pyriformis* auf dem Substrat mit nicht hydrolysiertem Eiweiß korreliert mehr mit dem Grad der Lösbarkeit dieses Eiweißes als mit seinem realen Nährwert (11). Die Wahl des Enzyms oder gleichzeitig einiger proteolytischer Enzyme zwecks Erreichung relativ hoher Hydrolyseraten des untersuchten Eiweißes bedeutet ein wesentliches, methodisches Problem. Es wird vorgeschlagen, Enzyme pflanzlicher und tierischer Herkunft anzuwenden. Unter zahlreichen Vorschlägen verdienen Untersuchungen über die Verwertung von Bromelin Beachtung. Baker u. Mitarb. (39) gehen von der Annahme aus, daß Bromelin in Verbindung mit dem aktiven SH-Gruppen besitzenden Reduktionsaktivator alle Anforderungen erfüllt, die sich aus der Einführungshydrolyse der angewandten Eiweiße ergeben. Als Aktivator für Bromelin wird die Anwendung von Mercaptobbernsteinsäure vorgeschlagen, die ebenfalls günstig das untersuchte Eiweiß durch Spaltung von Disulfidbrücken, die die enzymatische Hydrolyse des Eiweißes erschweren, beeinflußt. Viele Autoren empfehlen, mehrere Enzyme gleichzeitig anzuwenden (40, 41). Satterlee und seine Mitarbeiter (30) schlagen eine Enzymzusammenstellung vor, deren Bestandteile Trypsin, Chymotrypsin, Peptidase sowie Bakterienprotease sind.

Wie aus der angeführten Literatur zu entnehmen ist, ist das Problem der Verwendung des Protozoons *Tetrahymena* zu Untersuchungen über den Nährwert des Eiweißes noch nicht völlig gelöst. Die bisherigen Versuche zur Wahl eines objektiven Prinzips des analytischen Verfahrens werden vor allem durch die Kompliziertheit der physikalisch-chemischen Eigenschaften des zu untersuchenden Nahrungsproduktes erschwert. Die Empfindlichkeit des Protozoons z. B. auf das Vorhandensein anderer Nahrungskomponenten außer Eiweiß kann einen bedeutenden Fehler bei der Messung des Nährwertes dieses Eiweißes verursachen. Man glaubt jedoch, daß die besten Ergebnisse vor allem bei Untersuchungen von Eiweiß aus Lebensmitteln, wie Fleisch, Getreide, Eiweißkonzentrate und Eiweißisolaten, zu erzielen sind.

Zusammenfassung

Es wurde ein Überblick über die Möglichkeiten gegeben, das Protozoon *Tetrahymena* bei Untersuchungen über den Nährwert von Eiweißstoffen aus Lebensmitteln anzuwenden. Die Struktur des Protozoons sowie die elementaren Anforderungen an seine Züchtung im Labor wurden dargestellt. Besonderes Augenmerk richtete sich auf zahlreiche Vorschläge zu den analytischen Methoden. Die Vielfältigkeit von Lösungen in diesem Bereich beeinflußt die Variabilität der Ergebnisse und der damit verbundenen Forschungsfolgerungen. Das Vorhandensein von technologischen Zusätzen im untersuchten Eiweiß der Lebensmittel beschränkt in bedeutendem Maße die Möglichkeit einer Anwendung des Protozoons.

Summary

A survey has been provided about the possibilities of using the protozoon *Tetrahymena* in studies on the nutritional value of food proteins. The structure of the protozoon and the elementary requirements regarding its cultivation under laboratory conditions are described. Particular emphasis has been laid on a great many proposals concerning analytical methods. The variability of solutions in this

field influences the variability of the results and thus the resulting consequences for research. The presence of technological additives in the investigated food protein reduces the possibility of using the protozoan considerably.

Schlüsselwörter: *Tetrahymena pyriformis*, biologische Bewertung des Eiweißes, T-PER, T-RNV

Literatur

1. Rockland, L. B., M. S. Dunn: Food Technol. **3**, 289 (1949).
2. Anderson, M. E., H. H. Williams: J. Nutr. **44**, 335 (1951).
3. Pilcher, H. L., H. H. Williams: J. Nutr. **53**, 589 (1954).
4. Viswanatha, T., J. E. Liener: Archives Biochem. Biophysics. **56**, 222 (1955).
5. Fernald, W. R., G. D. Rosen: Brit. J. Nutr. **10**, 143 (1956).
6. Stott, J. A., H. Smith, G. D. Rosen: Brit. J. Nutr. **17**, 227 (1963).
7. Stott, J. A., H. Smith: Brit. J. Nutr. **20**, 663 (1966).
8. Rølle, G.: Näringsforskning **17**, 118 (1973).
9. Rosen, G. D., W. R. Fernald: Brit. J. Nutr. **10**, 156 (1956).
10. Rølle, G.: Acta Agric. Scand. **26**, 282 (1976).
11. Evans, E., B. T. Khouw, H. J. Likuski, R. Witty: J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment. **11**, 2, 82 (1978).
12. Farmer, E. L., J. G. Surak, F. W. Knap: J. Food Sci. **43**, 499 (1978).
13. Shepherd, N. D., T. G. Taylor, D. C. Wilton: Brit. J. Nutr. **38**, 245 (1977).
14. Teunissen, D. J.: Analyt. Biochem. **2**, 405 (1961).
15. Landers, R. E.: Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds. Part I, p. 185, Ed. Friedmann, M. Marcell Dekker, Inc. (New York 1975).
16. Evamcho, G. M., H. D. Hurt, P. A. Devlin, R. E. Landers, D. H. Ashton: J. Food Sci. **42**, 444 (1977).
17. Teunissen, D. J.: Appl. Microbiol. **21**, 878 (1971).
18. Schiaffino, S. S., J. J. McGuire, H. W. Loy: J. Ass. Off. Agric. Chem. **41**, 420 (1958).
19. Evans, E., S. C. Carruthers: J. Sci. Food Agric. **29**, 703 (1978).
20. Novozamsky, I., R. van Eck, J. van Schouwenberg: Neth. J. Agric. Sci. **22**, 3 (1974).
21. Ryley, J. F.: Biochem. J. **52**, 483 (1952).
22. Hill, D. L.: "The Biochemistry and Physiology of *Tetrahymena*", p. 75, Academic Press (New York 1972).
23. Wolstrup, J., K. Jensen: J. Appl. Bact. **41**, 243 (1976).
24. Forsberg, C. W., K. Lam: Appl. Environ. Microbiol. **33**, 528 (1977).
25. Mallory, F. B., I. T. Gordon, R. F. Conner: J. Amer. Chem. Soc. **85**, 1362 (1963).
26. Thompson, G. A., R. I. Bamberg, Y. Nozawa: Biochemistry, Easton **10**, 4441 (1971).
27. Evans, E., S. C. Carruthers, R. Witty: Nutr. Rep. Int. **16**, 455 (1977).
28. Evans, E., S. C. Carruthers, R. Witty: J. Food Sci. **44**, 1678 (1979).
29. Dryden, M. J., J. G. Kendrick, L. D. Satterlee, L. J. Schroeder, R. G. Block: J. Food Biochem. **1**, 35 (1977).
30. Satterlee, L. D., H. F. Marshall, I. M. Tennyson: J. Amer. Oil Chem. Soc. **56**, 103 (1979).
31. Rølle, G.: Naringsforskning Arg. **17**, 118 (1973).
32. Conner, R. L., J. R. Landrey, C. H. Burns, F. B. Mallory: J. Protozool. **15**, 600 (1968).
33. Holz, G. G., R. L. Conner: "Biology of *Tetrahymena*" p. 99-122. Ed. A. M. Elliot. Dowden Hutchinson and Ross, Inc. (Stroudsburg, Pa. 1973).
34. Sutton, N. E.: "Protein Efficiency Ratio as Estimated by *Tetrahymena thermophila WH₁₄* and its Limitations", M. S. Thesis, University of Nebraska, Lincoln, NB (1978).

35. Hsu, H. W., N. E. Sutton, M. O. Banjo, L. D. Satterlee, J. G. Kendrick: Food Technol. **32**, 12, 69 (1978).
36. Dryden, M. J., L. D. Satterlee: J. Food Sci. **43**, 650 (1978).
37. Warren, R. M., T. P. Labuza: J. Food Sci. **42**, 429 (1977).
38. Wang, Y. Y., J. Miller, L. R. Beuchat: J. Food Sci. **44**, 540 (1979).
39. Baker, H., O. Frank, I. I. Rusoff, R. A. Morck, S. H. Hutner: Nutr. Rep. Int. **17**, 525 (1978).
40. Frank, O., H. Baker, S. H. Hutner, I. I. Rusoff, R. A. Morck: "Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds", Part I, Assay methods biological, biochemical and chemical, (M. Friedman ed.) pp. 203–209, Marcel Dekker (New York 1975).
41. Hsu, H. W., D. L. Vavak, L. D. Satterlee, G. A. Miller: J. Food Sci. **42**, 1269 (1977).
42. Oser, B. L.: J. Amer. Diet. Assoc. **27**, 396 (1951).

Anschrift der Verfasser:

Dr. W. Janitz und Dipl.-Ing. S. Grodzka-Zapytowska, Institut für Ernährungsforschung der Landwirtschaftlichen Universität zu Poznań, Mazowiecka 48, 60-623 Poznań (Polen).