

Succinylation | 葉濃縮蛋白質의 機能性에 미치는 影響

曹永守 · 金鍾奎

慶尙大學校 農科大學

(1983년 7월 20일 수리)

Effect of Succinylation on Functional Properties of Leaf Protein Concentrates

Yeong Su Cho and Jong Kyu Kim

College of Agriculture, Gyeongsang National University, Jinju city

(Received July 20, 1983)

Abstract

This experiment was carried out to investigate the capability of production of artificial milk for leaf protein concentrate (LPC). Chloroplasmic protein and cytoplasmic protein were extracted from leaves of *Dystaenia takeshimana* Nakai and LPC was extracted from leaves of Italian ryegrass to increase the functional properties of LPC as a level of milk casein.

One gram of chloroplasmic protein and cytoplasmic protein and 1g of LPC were succinylated by addition of succinic anhydride 0.1, 0.25, and 1g respectively. Their functional properties were investigated in this experiment.

The results obtained were summarized as follows:

1. The non-succinylated LPC showed a higher value in bulk density than the chloroplasmic protein, the cytoplasmic protein and LPC succinylated by addition of succinic anhydride 0.1, 0.25, and 1g respectively. Nevertheless, succinylation had an enhancing effect as indicated by the rises as the degrees of succinylation was increased.
2. Although solubility of non-succinylated LPC was lower than that of milk casein, succinylation caused an effective increase in the solubility of the protein and LPC.
3. Water absorption and fat absorption of succinylated LPC were twice to eight times higher than those of milk casein. Fat absorption was not influenced to the extent by succinylation as the water absorption. Excessive succinylation resulted in the decrease of both water absorption and fat absorption.
4. Emulsifying activity and emulsion stability were increased in proportion to the succinylated degree of LPC. More than 10% increase in the amount of succinic anhydride resulted in an apparent increase in emulsifying activity and emulsion stability. Besides, the succinylated LPC showed more excellent functional properties in emulsifying activity and emulsion stability than milk.

序 論

食品蛋白質의 개선에는 蛋白質의 營養價를 높이는 경우와 蛋白質의 機能的 性質을 변화시키는 경

우가 있다.

Protein modification에는 물리적인 방법, 화학적인 방법 및 효소에 의한 방법^{18, 19, 24} 등이 있다. 그 중에서 chemical modification에는 acylation, alkyla-

tion, esterification, amidation 및 oxidation 반응 등이 있으며 acylation반응에는 acetylation, succinylation이 있고 이 방법들은 아미노酸의 특정장기를 수식하여 입체구조와 상호작용, 生物活性을 가진蛋白質의 작용기작의 해명^{9, 10, 14}에 사용되고 있으나, 최근 chemical modification은 食品蛋白質의 개량을 목적으로 한 食品産業에 이용되어 각종 단백질의 品質向上과 폐기자원의 효율화에 기인하는 바가 크다.

식품산업에 chemical modification 方法을 도입하는데 있어 가장 큰 문제점은 독성문제¹⁹로서 아직 이들 방법을 모든 식품단백질에 적용하기에는 불가능한 실정이다. 한편 chemical modification에 의한 유효한 物性의 개량에 이용되고 있다. chemical modification중에서 succinylation은 지금까지 독성문제는 제기되지 않아서 많은 연구자들이 행하고 있는 chemical modification의 한 방법으로 단순하고 효과적인 protein modification으로서 식품단백질의 기능성을 높이기 위한 방편으로 많은 研究^{1, 7, 11, 17, 22}가 이루어져 왔다.

그런데 pH 7-10에서 succinic anhydride로 succinylation을 시키면 아미노酸의 모든 친핵성기 즉, lysine의 ε-amino기, cysteine의 sulfhydryl기, serine과 threonine의 hydroxyl기⁶에서 succinylation이 가

능하다. succinylation된 단백질은 총 음전하량을 증가시키고^{7, 8} 구조를 변화¹⁹ 시킨다. 그리고蛋白質을 subunit로 해리 시키려는 성질을 증가시키고 chemical modification에 의하여 Leaf Protein Concentrate (LPC)의 용해도, 유화성 및 포집성등 物理化學的 변화를 가져오게 된다.³

이에 저자는 Italian ryegrass에서 抽出한 LPC와 섬바디에서 추출한 chloroplastic protein과 cytoplasmic protein이 succinylation을 시키면 식품단백질로서 특히 milk casein과 같은 역할로 이용할 수 있을 것인지를 알아보기 위해서 그 기초 실험을 행하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1 材料

1. 試料調製

本 實驗에 사용된 섬바디 (*Dystaenia takeshimana* Nakai)는 경상남도 종축장에서 1982년 6~7월에 채취해서 Takao Horigome²⁰의 方法으로 葉濃縮蛋白質을 만들었다. 즉, Fig. 1과 같은 과정으로 신선한 섬바디 잎을 물로서 깨끗이 씻은 후 물기를 뽁

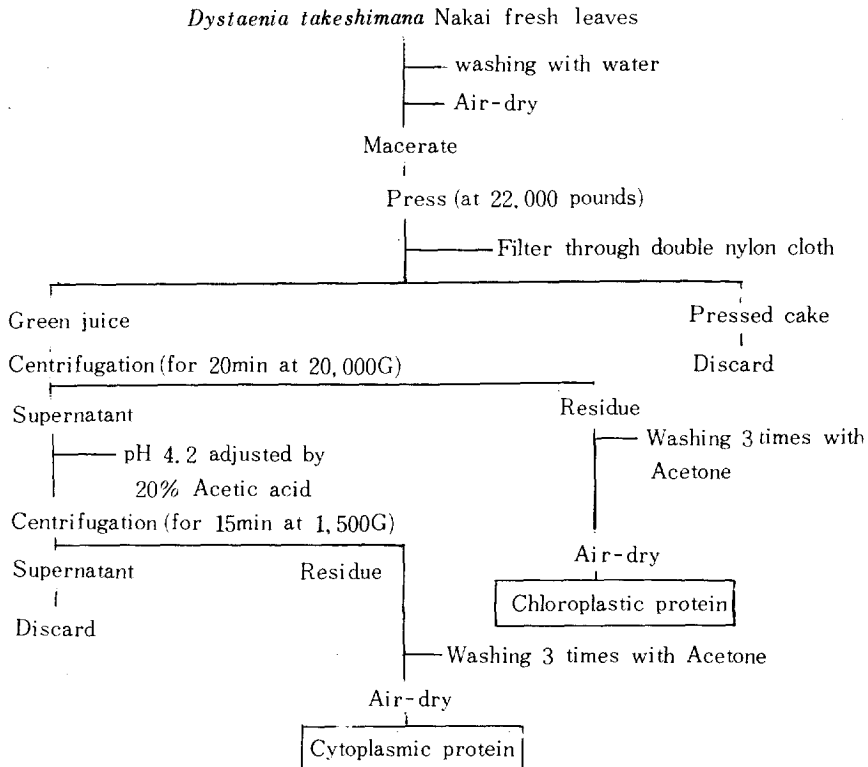


Fig. 1. Procedure for the fractionation of *Dystaenia takeshimana* Nakai leaf protein concentrates.

건으로 제거후 마쇄시키고 압착기로 압착해서 綠汁 (Green juice)을 얻었다. 綠汁을 냉동 원심분리기에서 4℃로 원심분리 시켜서 상등액과 하등액으로 분리시켜서 하등액은 acetone으로 3회 씻은 후 풍건시키고 100mesh채로 쳐서 chloroplastic protein을 만들었고(蛋白質含量 46.2%) 원심분리에서 얻은 상등액은 20% acetic acid로 pH를 4.2로 조정해서 4

C에 一役 방치후 원심분리시켜서 상등액은 버리고 잔사는 acetone으로 3번 씻은 후 풍건시켜서 100mesh채로 쳐서 cytoplasmic protein을 얻었다. 蛋白質含量은 41.5%였다.

Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.)의 葉濃縮蛋白質은 1982년 5~6월 日本 香川県 大川農協에서 Fig.2 와 같은 과정으로 신선한 Italian ryeg-

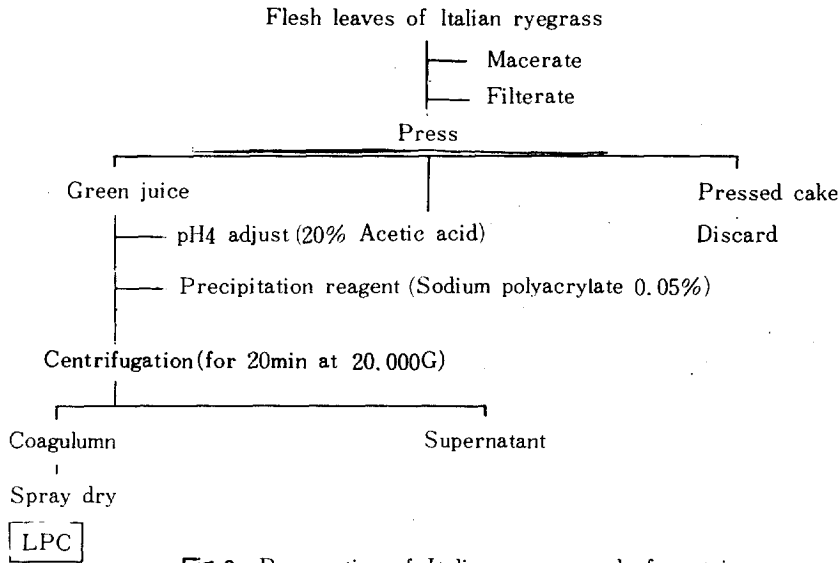


Fig. 2. Preparation of Italian ryegrass leaf protein concentrate.

rass잎을 마쇄한 후 압착기로 압착해서 綠汁을 얻었다. 이 綠汁을 20% acetic acid로서 pH로 조정한 후 침전제(sodium polyacrylate 0.05%)를 사용해서 침전시킨 후 원심분리해서 응고물을 분무건조시키고 100mesh채로 쳐서 葉濃縮蛋白質을 얻었다. 蛋白質含量은 39.4%였다.

2. 方法

1) Succinylation

위와 같은 方法으로 調製된 葉濃縮蛋白質을 Franzen 및 Kinsella의 方法^{3,4}으로 Fig.3 과 같은 과정으로 숙시닐화 하였다. 蛋白質 2g에 0.075M phosphate buffer (pH 7.5) 250ml를 가한 현탁액과 succinic anhydride 0.2, 0.5, 2g을 1시간동안 교반하면서 加하였으며 이 반응중 pH는 3.5M NaOH로서 7.0~7.5로 유지하였고 온도는 실온에서 행했다. 반응용액의 pH가 안정된 다음 4℃에서 24시간동안 수도물로 투석시킨 후 다시 24시간 동안 4℃로 증류수에서 투석하고 숙시닐화된 蛋白質은 동결건조하여 회수해서 100mesh채로 쳐서 얻었다.

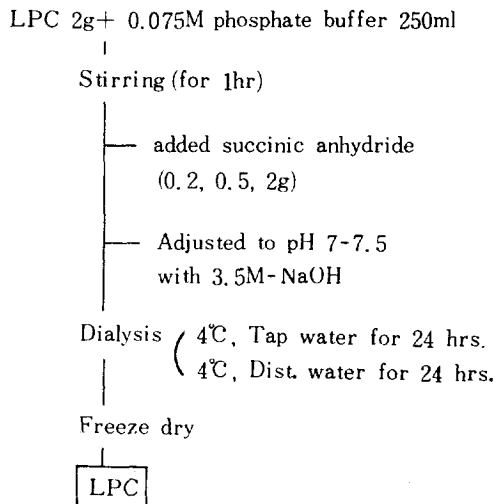


Fig. 3. Procedure of the succinylation method.

2) Bulk density

Wang등²³의 방법에 따라서 10ml용 메스실린더에 시료蛋白質을 채우면서 5cm 높이에서 約15회 打診하여 다음과 같이 計算하였다.

Bulk density = 시료蛋白質의 g / 시료蛋白質의 ml

3) 용해도 (Nitrogen solubility)

Wang등²³의 방법에 따라 시료蛋白質 100mg에 증류수 10ml를 加하고 Waring Blender (Fisher, minisample container 37)로 分散시켜, 이 혼합물을 24℃에서 30분간 수평진탕 (120회/1분, 진폭10cm)한 후 4℃에서 30분간 4,000G로 원심분리하여 상정액을 5ml취해 Kjeldahl법으로 N량을 측정하였으며 이때 pH는 7.0~7.5였다. 용해도는 다음과 같이 計算하였다.

N용해도 (%) = (상정액 5ml中 N × 2 / 시료蛋白質 100mg中 N) × 100

4) 흡수도 (Water absorption)

Lin등¹⁶의 방법에 따라 투명한 눈금있는 원심분리관에 시료蛋白質 1g과 증류수 10ml를 加하고 초음파기(Lab-line Ultratip Cabsolic System)로 1분동안 초음파 처리후 진탕기로 24℃에서 30분간 수평진탕 (120회/1분, 진폭10cm)하고 1,610G로 25분간 원심분리하여 다음과 같은 방법으로 흡수도를 計算하였다.

흡수도 (ml/g) = (흡수된 물의 ml / 시료단백질의 g)

5) 지방흡착도 (Fat absorption)

Lin등¹⁶의 방법에 따라 plastic원심분리관에 시료蛋白質 500mg과 soybean oil 3ml를 加하고 초음파기 (Lab-line Ultratip Cabsolic System)로 1분동안 초음파 처리 후 24℃에서 30분간 방치하고 1,610G로 25분간 원심분리하여 遊離油와 吸着油의 量은 메스실린더로 측정하였다.

6) 乳化能 (Emulsifying activity)

Yasumatsu등¹⁵의 방법에 따라 시료蛋白質 0.7g에 증류수를 10ml 加하고 Waring Blender (Fisher, minisample container 37)로 1분간 分散시키고 이 液에 soybean oil 10ml를 加하고 homogenizer (Virtis No. 23)로 20,000rpm에서 1분간 혼합하여 乳化시킨 후, 1,300G로 5분간 원심분리한 후 측정하였다.

유화능 (%) = (乳化層의 높이 / 원심분리관中 액 전체의 높이) × 100

7) 乳劑의 안정성 (Emulsion stability)

Yasumatsu등¹⁵의 방법에 따라 유화능의 측정과정에서 乳化液 (emulsion)을 80℃에서 30분간 가열

하고 수도물로서 15분간 냉각시킨 후 원심분리하여 計算하였다.

乳劑의 안정性 (%) = (乳化層의 높이 / 원심분리관中 액 전체의 높이) × 100

8) 기타 방법 : 상법에 준했다.

結果 및 考察

Fig. 4에서 보는바와 같이 bulk density는 섬바디에서 추출한 葉綠體蛋白質 및 細胞質蛋白質과 Italian ryegrass에서 추출한 葉濃縮蛋白質이 succinic anhydride 첨가량을 증가시키면 반응시킬때 숙시닐화가 증가함으로서 bulk density는 어느정도 증가하는 추세였다. milk casein과 비교하면 (Table 1) Italian ryegrass에서 succinic anhydride 무처리구에서는 같았고 그의 다른 시료에서는 milk casein보다 낮았다. 한편, Thompson등²²은 whey protein concentrate에서 성분분화는 succinic anhydride 무처리구에서 蛋白質含量이 낮았으며 6 moles로 숙시닐화시킨 것이 12 moles로 숙시닐화시킨 것보다 약간 높은 경향이였다. bulk density가 succinic anhydride 무처리구에서 증가했고 그후 낮았다가 succinic anhydride 첨가량의 증가에 따라 다시 증가하는 경향

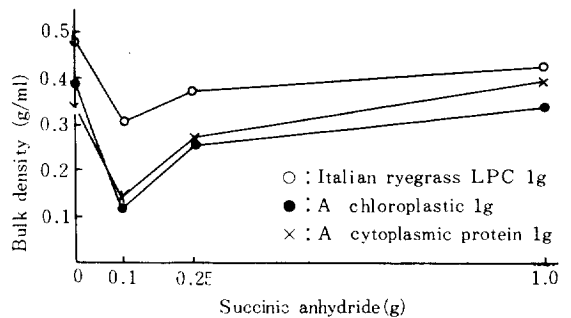


Fig. 4. The bulk density of leaf protein concentrate. A: Dystaenia takeshimana Nakei

Table 1. Some functional properties of milk casein

Table with 2 columns: Property and Value. Properties include Bulk density (g/ml), Solubility (%), Water absorption (ml H2O/g LPC), Fat absorption (ml oil/g LPC), Emulsifying activity (%), and Emulsion stability (%). Values are 0.48, 48.20, 0.53, 0.90, 48.80, and 53.00 respectively.

이었다. 이는 본인의 실험결과와 일치하였으며 Franzen^등³⁾은 alfalfa leaf protein에서 숙시닐화 정도를 높임에 따라 계속 증가하는 추세였다. 그리고 Herman^등¹²⁾은 fish myofibrillar protein에서 숙시닐화 정도의 증가에 따라 증가 현상을 보였다. 이것들은 본 실험과는 다소 차이가 있었으나 숙시닐화 정도를 높임으로서 증가한다는 본인의 실험결과와 일치하였다. 이는 succinic anhydride에서 음이온의 도입으로 생긴 정전기적 반발력은蛋白質의 구조를 변경시키고 polypeptide基가 팽창해서 느슨한 상태 때문에 물분자의 침투가 物理적으로 쉬워지며^{3,4)} 여기에서 음전하의 높은 분포는 중요하며 Haebed^등⁶⁾에 따르면 숙시닐화된蛋白質의 구조는 높은 총전하와 원래 分子内に 있는 단거리 친화력을 polypeptide의 부수적인 unfolding을 가진 단거리의 반발력에 기인하는 것으로 여겨진다.

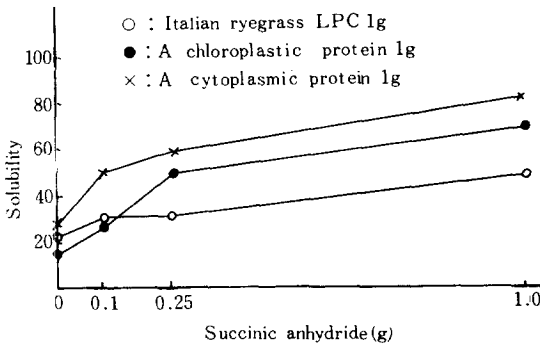


Fig. 5. The solubility of leaf protein concentrate
A: *Dystaenia takeshimana* Nakai

용해도는 Fig. 5에서와 같이 숙시닐화가 증가하므로 용해도가 높았다. 여기서 숙시닐화 시키지 않은 葉濃縮蛋白質과 milk casein과 비교해 보면 casein에 비해서 용해도가 낮은 반면 숙시닐화를 시킨 각구에서는 Italian ryegrass 葉濃縮蛋白質 시료 1g당 succinic anhydride 1g의 반응구에서 삼바디 葉綠體蛋白質에서는 시료 1g당 succinic anhydride 0.25g이상 반응구에서 그리고 삼바디 細胞質蛋白質에서는 시료 1g당 succinic anhydride 0.1g이상 첨가반응구에서 milk casein보다 높은 경향이었다.

한편 Chen^등²⁾은 fish protein concentrate에서 McElwain^등¹⁷⁾은 single cell protein concentrate에서 Franzen^등³⁾은 alfalfa leaf protein concentrate에서의 보고와 Beuchat¹⁾의 peanut flour에서 이들은 각 pH별로 용해도를 측정하였고 본인의 실험은

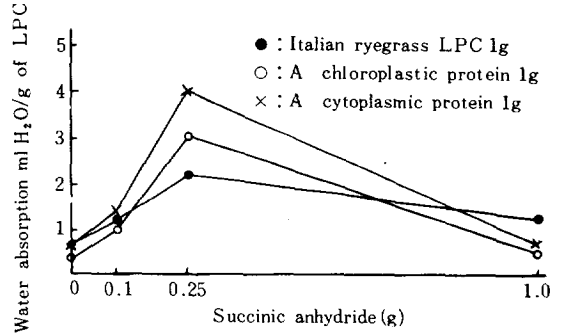


Fig. 6. The water absorption of leaf protein concentrate
A: *Dystaenia takeshimana* Nakai

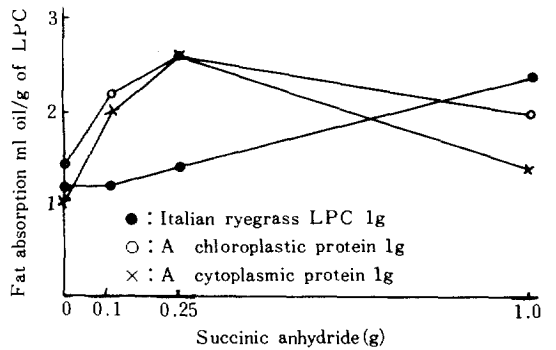


Fig. 7. The fat absorption of leaf protein concentrate
A: *Dystaenia takeshimana* Nakai

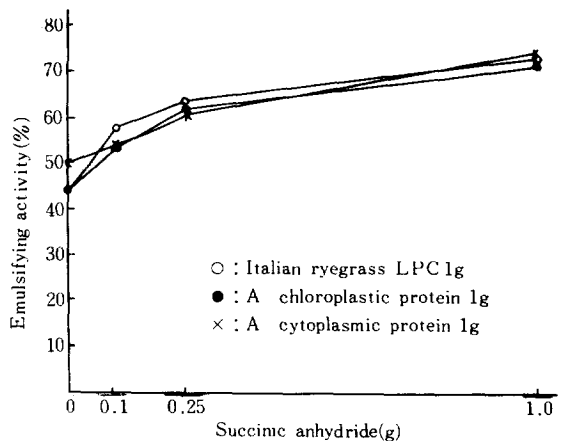


Fig. 8. The emulsifying activity of leaf protein concentrate
A: *Dystaenia takeshimana* Nakai

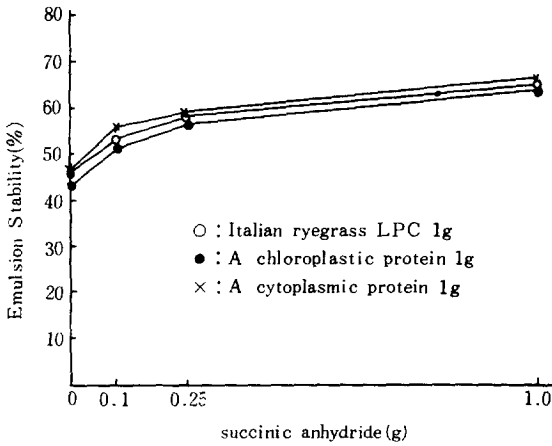


Fig. 9. The emulsion stability of leaf protein concentrate.
A: *Dystaenia takeshimana* Nakai

pH7.0~7.5범위에서 측정하였는데 이를 前者들과 비교해 보면 pH7.0~7.5사이에서의 용해도는 前者들의 증가한다는 보고와 일치하였다. 이는 蛋白質의 숙시닐화는 음이온 아미노잔기를 양이온잔기로 전환시키고 succinic anhydride 음이온에 의해 총 음전하로 변화시켜 蛋白質의 물리화학적 성질이 바뀌는 결과로 수용용해도가 증가된 것으로 여겨지며 숙시닐화된 蛋白質의 구조는 높은 총전하와 원리 분자내에 있는 단거리 친화력을 polypeptide의 부수적인 unfolding을 가진 단거리 반발력의 결과로 생긴다.⁴ 그러나 중성pH에서 숙시닐화할때 lysine의 암모늄 양이온은 succinic anhydride음이온으로 바뀌며 정전기적 반발력은 침가되어진 카복실기와 인접한 원래의 카복실기 사이에 일어나며 단백질과 단백질 상호작용을 별로 가지지 않게 되며 수용액의 용해도를 증가시키기 위하여 단백질과 물과의 상호작용이 증가되므로 총 음전하는 amino의 숙시닐화 정도에 비례하며 증가는 derivatization정도에 달려 있지 않나 여겨지며 아미노酸의 모든 친핵성기, 즉 Fig.10과 같이 lysine의 ε-amino기 (pKa=10.5), tyrosine의 phenol기 (pKa=10.1), histidine의 imidazol기 (pKa=6.0), cystein의 sulfhydryl기 (pKa=8.3), threonine의 hydroxyl기가 succinic anhydride와 pH 7~10사이에서 반응을⁶ 해서 숙시닐화가 많이 되면 될수록 succinic anhydride가 많이 결합해서 카복실기가 증가하며 카복실기는 pH7.0~7.5에서 해리가 많이 일어나기 때문에 용해도가 증가되는 것으로 추측되어진다. 한편 Fig. 10에서 나타난 반응식에서 succinic anhydride가 蛋白質내의 많은 관능기와 반응한다는 것을 알고있지만 그중에서 cystein의 th-

iol기 tyrosine의 수산화와는 잘 반응되고 hydrox- amino酸 중 serine, threonine도 반응이 일어나나 이는 어렵게 일어나며, pH8 이상에서는 tyrosine의 O- 숙시닐화물은 방치만 하여도基가 떨어져 나간다.⁶ 그러므로 숙시닐화 반응은 pH에 상당히 민감하므로 약알칼리 즉 pH7.0~8.1사이에서 조정하는 것이 중요한 것으로 여겨진다.

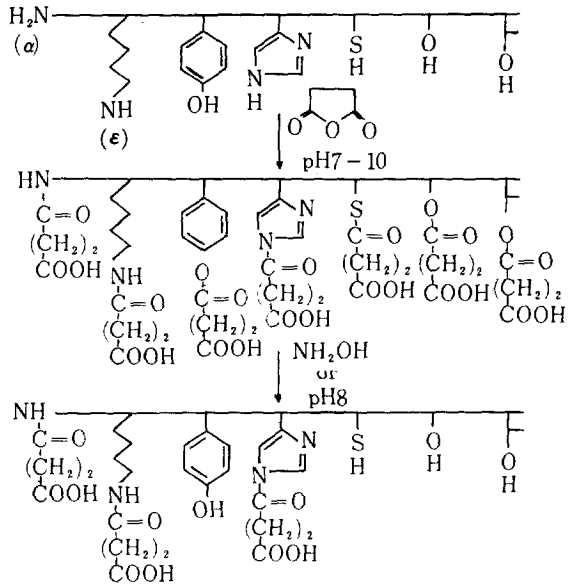


Fig. 10. Succinylation of amino group and side chain of amino acids by succinic anhydride.

흡수도는 Fig. 6 과 같이 숙시닐화를 시킨 것과는 시키지 않은 葉濃縮蛋白質이 milk casein (Table 1)보다 높은 경향으로 나타났다. 各 葉濃縮蛋白質 1g당 succinic anhydride의 무처리구와 0.1, 0.25g첨가까지는 증가하는 경향이였으나 1.0g첨가에서는 감소하는 경향이였다. 이는 Beuchat등¹과 Thompson등²²의 보고에서는 숙시닐화를 증가시키에 따라 증가하는 경향이였다. 그 이유는 물흡착력은 단백질을 부분적으로 분자의 팽창과 unfolding에 기인하는 것으로 추측되며 물흡착력의 증가는 숙시닐화를 시킴으로서 蛋白質의 해리정도에 따라 영향을 받은 것으로 여겨지며 본인의 실험에서는 숙시닐화를 시킴으로서 증가하다가 각 시료당 succinic anhydride 1g 수준에서는 감소하는 경향이였다. 이러한 이유는 어떠한 蛋白質의 구조변화에 기인하지 않나 여겨진다. 지방흡착도는 Fig. 7 에서와 같으며 숙시닐화를 시킨 것과 시키지 않은 것 모두 milk casein (Table 1) 보

다 높은 경향이였다. Italian ryegrass 葉濃縮蛋白質 1g당 succinic anhydride를 0.10, 0.25, 1.00g 으로 첨가반응에 따라 증가했으며 섬바디葉濃縮蛋白質은 무처리구부터 1g당 0.10, 0.25g 첨가시까지는 증가하다가 1.00g 첨가시에서는 약간 감소하는 경향이 나타났다. 한편 Thompson등²²의 보고에서는 숙시닐화를 증가시키기에 따라 흡수도보다는 큰 영향을 받지 않지마는 대조구보다는 증가했다. 이는 본 실험과 차이가 있었다.

유화능은 Fig. 8 과 같다. 숙시닐화를 증가시키므로 유화능은 높아지는 경향이였다. succinic anhydride 무처리구에서는 Italian ryegrass 葉濃縮蛋白質과 섬바디葉綠体蛋白質에서는 milk casein (Table 1) 보다 약간 낮은 경향이였으며 시료 1g당 succinic anhydride를 0.10g 이상 첨가반응시키기에 따라서 유화능이 milk casein (Table 1)보다 높아지는 경향이였다. 이는 Franzen등³의 alfalfa leaf protein, Beuchat등¹의 whey protein concentrate 및 McElwain 등¹⁸의 single cell protein concentrate에서도 유화능이 높아진다는 보고와 일치하였다.

유체의 안정성은 Fig. 9에서 보는바와 같이 본 실험에서는 숙시닐화를 시킴에 따라 증가하는 경향을 보였다. milk casein과 (Table 1) 비교해보면 각 시료당 succinic anhydride 0.10g 이상으로 첨가반응시 증가하는 경향이였다. Chen등²의 fish protein concentrate, Franzen등⁴의 soy protein 및 McElwain등¹⁸의 single cell protein concentrate에서도 같은 경향이였다. 또한 용해도가 증가함에 따라서 유화능과 유체의 안정성이 증가한다는 보고³와도 같은 경향이였고 그 원인은 단백질이 수용성이 됨에 따라 지방구 주위에 층을 형성하여 aqueous phase와 결합이 용이하게되며 과립蛋白質 즉 불용성蛋白質은 oil phase와 분리되거나 결합을 방지하거나 또는蛋白質은 불용성이고 유화가 잘 되지 않아 oil 표면에서 뜨게된다. 이와 비슷하게 수용성蛋白質은 fat globule과 단단하게 결합하여 열처리에 더욱 안정한 유화를 하게되는 것⁴으로 추측되어진다.

要 約

葉濃縮蛋白質(LPC)을 이용해서 人乳를 만들 수 있는 기틀을 마련코저, 葉濃縮蛋白質의 機能的性質을 milk casein 수준으로 높이기 위해 섬바디(Dystaenia tateshimana Nakai) 잎에서 추출한 chloroplastic protein과 cytoplasmic protein 및 Italian ryegrass (Lolium multiflorum Lamb.)에서 抽出한 葉濃縮蛋白質 1g당 succinic anhydride 0.10, 0.25, 1.00 g씩을 加해 숙시닐화시켜 기능성을 조사한 結果는

다음과 같다

1. bulk density는 섬바디잎에서 추출한 chloroplastic protein 및 cytoplasmic protein과 Italian ryegrass에서 추출한 LPC가 succinic anhydride의 무처리구에서 높았으며 숙시닐화 시킴으로 감소한 후 숙시닐화가 증가하므로써 bulk density는 어느 정도 증가하는 추세였다.
2. 용해도는 숙시닐화를 시킨 각 구에서는 Italian ryegrass LPC 1g에 succinic anhydride 1g 첨가반응시 섬바디 chloroplastic protein에서는 시료 1g당 succinic anhydride 0.1g 이상 첨가반응시 milk casein보다 용해도가 높은 경향이였다.
3. 흡수도 및 지방축적에서는 숙시닐화 시킨 것과 시키지 않은 것 모두가 milk casein보다 높은 경향이였다.
4. 유화능과 유체의 안정성에서는 숙시닐화를 시키지 않은 각 LPC가 약간 낮은 반면 숙시닐화 시킴에 따라 milk casein보다도 높고 점점 증가하는 경향이였다.

參 考 文 獻

1. Beuchat, L.R.: *J. Agri. Food Chem.*, **25** (2), 258 (1977)
2. Chen, L.F., Richardson, T., and Amundson, C.H.: *J. Milk Food Technol.*, **38** (2), 89 (1975)
3. Franzen, K.L., Kinsella, J.E.: *J. Agri. Food Chem.*, **24** (5), 914 (1976)
4. Franzen, K.L., Kinsella, J.E.: *J. Agri. Food Chem.*, **24** (4), 788 (1976)
5. Gandhi, S.K., Schultz, J., Boughey, F.W., and Forsythe, R.H.: *J. Food Sci.*, **33**, 163 (1968)
6. Gounaris, A.D., Perlmann, G.E.: *J. Biol. Chem.*, **242** (11), 2739 (1969)
7. Grant, D.: *Cereal Chem.*, **50**, 417 (1973)
8. Habeeb, A.F.S.A., Cassidy, H., and Singer, S.: *J. Biochem. Biophys. Acta*, **29**, 587 (1958)
9. Habeeb, A.F.S.A.: *J. Anal. Biochem.*, **14**, 328 (1965)
10. Habeeb, A. F. S. A.: *J. Arch. Biochem. Biophys.* **121**, 652 (1967)
11. Hass, L. F.: *J. Biochem.* **3**(4), 535 (1964)
12. Herman, S., Groninger, Jr.: *J. Agri. Food Chem.* **21**(6), 978 (1974)
13. Hoagland, P., Boswell, R., and Jones, S.: *J. Dairy Sci.*, **54**, 1564 (1977)
14. Kakade, M. L., Liener, I. E.: *J. Anal. Biochem.*, **27**, 273 (1969)

15. Katsuhaha, Yasumatsu: *Agri. Biol. Chem.*, **36**, 719 (1972)
16. Lin, M., Humbert, E., and Sosulski, F. : *J. Food Sci.* **39** 368 (1974)
17. McElwain, M. D., Richardson, T., Amundson, C. H. : *J. Milk Food Technol.*, **38** (9), 521 (1975)
18. Oppenheimer, H., Barany, K., Hamoir, G., Fenton, J. : *J. Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 108 (1967)
19. Ryan, D. S. : *Am. Chem. Soc.* (Washington D. C.) 67 (1977)
20. Takao Horigome: *Japan J. Zootech.*, **48**, 267 (1977)
21. Tanford, C. : *Formation of Micelles and Biological Membranes* (Willey, New York) (1973)
22. Thompson, L. V., Reyes, E. S. : *J. Dairy Sci.*, **63**, 715 (1980)
23. Wang, J. C., Kinsella, J. E. : *J. Food Sci.*, **41**, 286 (1976)
24. Watanabe, M., Arai, S. : *Japan J. New Food IND.*, **23**(5), 71 (1981)