

Protease 처리가 누에번데기 단백질 추출 및 기능성에 미치는 영향

권효정 · 이경환 · 김정환¹ · 천성숙² · 조영제 · 차원섭*
상주대학교 식품공학과, ¹엔아이피 바이오텍, ²영남대학교 식품가공학과

Effect of Protease on the Extraction and Properties of the Protein from Silkworm pupa

Hyo-Jung Kwon, Kyoung-Hwan Lee, Jeung-Hoan Kim¹, Sung-Sook Chun²,
Young-Je Cho and Won-Seup Cha*

Department of Food Engineering Sangju National University, Sangju 742-711, Korea

¹NIP Biotech. Mungyeong, 742-749, Korea

²Department of Food Science & Technology Yeungnam University, Gyeongsan 712-711, Korea

Received August 11, 2006; Accepted October 9, 2006

To extract insoluble proteins from silkworm pupa meal, the meal was treated with protease produced by *Bacillus* sp. JH-209. The extraction of insoluble silkworm pupa protein was enhanced at alkaline pHs ranged from 7 to 11 by treatment with the protease. The optimum extraction temperature was 40°C for in soluble protein treated with protease. The optimum protease treatment time for extraction of protein was 11 hrs and optimum amount of enzyme treated for extraction of protein was 60 Unit, respectively. The treatment of enzyme extracted more protein than ordinary extraction method without protease. The foaming capacity, foaming stability, emulsion capacity, and emulsion stability of silkworm pupa meal protein extracted by the treatment of the enzymes increased at all pH ranges. Further more oil absorption as well as water absorption capacities of the protein extracted by the treatment of the enzymes were also increased.

Key words: extraction, physical properties, silkworm pupa protein, protease

서 론

잠사공장에서 나오는 부산물로서 오늘날 고단백 식품으로 많은 관심의 대상이 되고 있는 번데기는 주로 동물의 사료와 비료로 쓰여 왔으며, 우리나라에선 시중에서 어린이를 상대로 소매상들이 증자한 번데기를 간식으로 판매하고 있다. 또한 그 모체인 누에가 춘잠과 추잠으로 1년에 2회 생산되기 때문에 거의 연중 공급되고 있는 번데기는 독특한 이취가 있어 일반식품으로 개발되지 않고 있으나¹⁾ 번데기의 영양에 대해서는 이미 본초강목에서 “잠용을 볶아서 먹으면 풍과 여윈 것을 고칠 수 있다.”고 소개되고 있으며, 동의보감에도 천연 자양 강장 식품인 누에 번데기는 한방에서 잠용자(蠶踊子)라고 부르며 성질이 고르고 맛이 달며 독이 없으니 풍과 여윈 것을 다스린다고 하였다. 그리고 당뇨병이나 회충 없애는 약효도 있다는 것이 기

재되어 있음을 미루어 볼 때 사람이 식용해 온 역사가 오래인 것을 알 수 있다. 최근 Park과 Park은²⁾ 번데기 농축단백질의 기능성을 대두 농축단백질과 비교 연구한 결과, 유효성, 지방흡수성 및 점도는 대두 단백질보다 높고 또한 아세틸화와 숙시닐화에 의한 화학적 변형결과 기능성이 향상되었다고 보고하였다. 일반적으로 단백질의 낮은 기능성을 향상시키기 위해서는 물리, 화학적방법 및 효소에 의한 방법이 이용되고 있다. 이 중 산에 의한 가수분해는 질소용해도와 풍미를 향상시키나 중화처리 결과 염의 농도가 증가하는 단점이 있으며, 알칼리에 의한 가수분해는 유해물질을 파괴시키지만 과다한 알칼리 처리시 lysinoalanine과 같은 독성물질이 생산되고 소화를 저해하는 단점이 있다³⁾. 더욱이 이러한 화학적 방법은 기능성은 향상시키지만 아미노산의 파괴와 단백질의 저하도 동반되므로, Richardson⁴⁾은 효소에 의한 가수분해가 단백질의 기능성을 향상시키는데 있어서 더욱 효과적이므로 화학적 변형 방법에 대한 유용한 대체방법이 될 것이라고 제안하였다. 또한 효소적 변형이 온화한 조건하에서 특이성을 가지고 안전하므로 식품에 대한 이용이 공식적으로 인정되고 있으며 이 방법에 의해 대두,

*Corresponding author
Phone: 82-54-530-5262; Fax: 82-54-530-5269
E-mail: wscha@sangju.ac.kr

땅콩 및 면실 등에서 기능성 및 영양가의 향상이 보고 되어 있다.^{5,6)}

따라서 본 연구에서는 protease활성이 우수한 *Bacillus* sp. JH-209균주를 이용하여 단백질분해효소의 처리가 번데기 단백질 추출 및 기능성에 미치는 영향을 검토하고, 식품단백질원으로서의 이용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

시료의 조제. 누에번데기는 시중에서 구입하여 동결 건조시킨 후 40 mesh로 분쇄하여 4°C의 저온실에 보관하면서 실험에 사용하였다.

누에번데기 단백질의 추출. 누에번데기 단백질 추출을 위한 효소처리는 *Bacillus* sp. JH-209 으로부터 생산한 specific activity가 244.32 units/mg인 protease를 실험에 사용하였으며, protease의 활성측정은 Anson⁷⁾과 Hagihara⁸⁾의 방법에 따라 실시하였다. 누에번데기 단백질 추출을 위한 효소처리에는 protease를 4~60 unit까지 변화시키면서 누에번데기에 처리하여 실시하였다. 즉, 누에 번데기박 5g에 buffer 92 ml와 효소액 8 ml를 가하여 37°C에서 10시간 반응을 시키고 반응이 끝난 액을 여과하여 단백질용액으로 사용하였다.

단백질 추출에 미치는 pH의 영향. 효소액 처리 전에 측정된 누에번데기 단백질 추출량을 대조구로 하고, 누에 번데기박에 pH 3.0과 4.0은 25 mM phosphate HCl 완충액으로, pH 5.0과 6.0은 25 mM citric acid-sodium citrate 완충액으로, pH 7.0과 8.0은 25 mM sodium phosphate 완충액 그리고 pH 9.0~11.0은 25 mM boric acid-NaOH 완충액과 효소액을 가하여 10시간 동안 반응시키고 반응이 끝난 액을 여과한 후에 여액의 총 단백질 양을 Lowry 등⁹⁾의 방법으로 정량하였다.

단백질 추출에 미치는 온도의 영향. 최적 pH에서 효소액 처리 전 누에번데기박의 단백질 추출량을 대조구로 하여 누에 번데기박에 효소를 가하여 20~80°C까지의 각 온도단계에서 10시간 반응시키고 반응이 끝난 액을 여과한 후에 여액의 총 단백질 양을 Lowry 등⁹⁾의 방법으로 정량하였다.

단백질 추출에 미치는 효소 반응시간의 영향. 최적 pH와 온도에서 효소액 처리 전 누에번데기박의 단백질 추출량을 대조구로 하여 누에 번데기박에 효소를 처리하여 1~12시간 동안 교반하고 반응이 끝난 액을 여과한 후에 여액 중의 총 단백질 양을 Lowry 등⁹⁾의 방법으로 정량하였다.

단백질 추출에 미치는 처리효소량의 영향. 최적 pH와 온도에서 첨가 효소량이 단백질의 추출에 미치는 영향을 알아보기 위하여 효소의 양을 4~60 unit까지 효소량을 증가시키면서 단백질의 추출량을 Lowry 등⁹⁾의 방법으로 측정하였다.

추출 단백질의 분리. 추출된 단백질용액에 70% 황산암모늄을 가해 단백질을 침전시키고 원심분리하여 회수하였으며, 회수된 단백질은 증류수로 48시간 동안 투석하고 동결 건조시켜 단백질 시료로 하였다.

거품형성력 및 안정성. 거품형성력은 각 단백질 0.5g에 증류수 50 ml씩을 가하여 Cho와 Chun¹⁰⁾의 방법에 따라 측정하였다.

유화력 및 유화안정성. 유화력과 유화안정성은 각 단백질 0.6

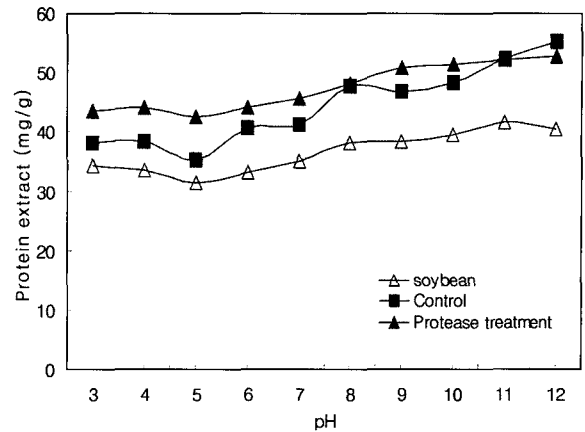


Fig. 1. Effect of pH on extraction of protein from silkworm pupa meal treated with protease (Silkworm pupa meal was treated at 35°C for 10 hr with 40 units of protease).

g에 증류수 10 ml씩을 각각 가하여 Cho 등¹¹⁾의 방법에 따라 측정하였다.

유지 및 수분흡착력 측정. 유지 및 수분흡착력은 단백질 1g에 증류수 또는 corn oil 10 ml를 각각 가한 후 Cho 등¹¹⁾의 방법에 따라 측정하였다. 흡착력은 1g의 시료에 흡착된 증류수나 대두유의 부피를 ml수로 나타내었다.

결과 및 고찰

단백질의 추출조건

pH의 영향. pH가 효소 처리에 의한 누에번데기 단백질의 용해도에 미치는 영향을 시험한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 누에 번데기로부터 추출된 단백질의 양은 동일 조건의 대두단백질에 비해 높은 함량을 나타내었으며, Park과 Park²⁾이 탈지대두박보다 번데기의 단백질 함량이 높아 용출했을 때, 1.2배나 더 많은 단백질을 얻을 수 있다고 보고한 것과 유사한 결과를 나타내었다. 누에 번데기박의 단백질을 10시간 동안 추출한 결과 Fig. 1에서와 같이 대조구의 경우 pH 5에서 35.36 ± 1.99 mg/g으로 최저값을 보이다가 pH가 높아짐에 따라 추출량이 점차 증가하여 pH 11과 12에서 52.30 ± 0.40과 52.23 ± 1.14 mg/g으로 가장 높은 값을 보였다. 그리고 효소처리의 경우는 pH 5~9에서 대조구의 35.36 ± 1.99~46.81 ± 0.30 mg/g에 비해 42.50 ± 2.42~50.87 ± 0.84 mg/g으로 상당히 높은 추출량을 나타내었다. 본 연구에 사용된 번데기 단백질의 등전점은 pH 5 부근이고 이때 용해도가 최저가 되므로, 이때의 용출율을 높이기 위해 작용 pH가 약산성인 protease를 사용하였으며, pH 5~9 사이에서 protease의 반응에 의해 단백질의 추출량이 증가하는 것은 효소의 작용에 의하여 일어나는 현상인 것으로 판단하였다. 이러한 결과는 Lee와 Kim¹²⁾이 natto protease가, 그리고 Choi 등¹³⁾이 미생물 protease가 효소의 최적작용 pH에서 단백질의 추출율을 최대로 증가시켰으며, Chun 등^{14,15)}이 효소처리가 불용성단백질의 추출에 더 효과적이었다는 보고와 유사한 결과를 나타내었다.

온도의 영향. 온도의 변화에 따라 효소처리에 의한 누에번데기 단백질의 추출에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 누에번데

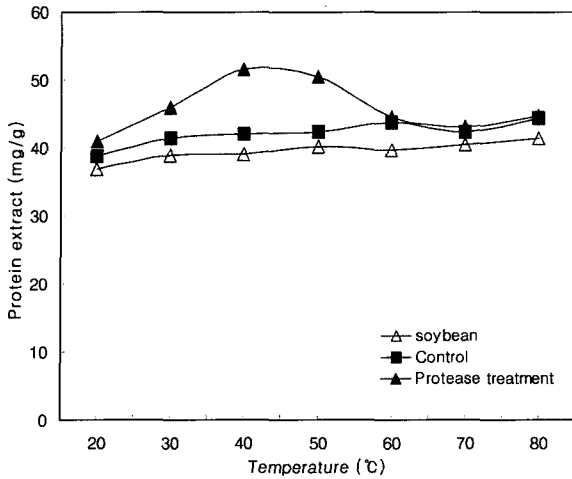


Fig. 2. Effect of temperature on extraction of protein from silkworm pupa meal treated with protease (Silkworm pupa meal was treated for 10 hr with 40 units of protease).

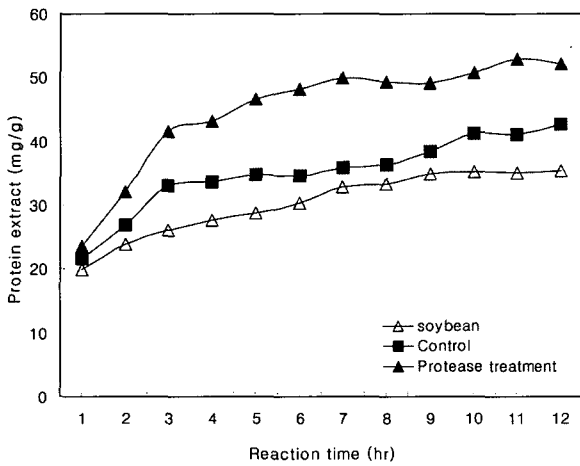


Fig. 3. Effect of reaction time on extraction of protein from silkworm pupa meal treated with protease (Silkworm pupa meal was treated at 35°C and pH 7 with 40 units of protease).

기를 pH 7에서 효소를 가하고 20°C에서 80°C까지 온도를 변화시키며 10시간 동안 단백질을 추출하여 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 대두박의 경우 용출량이 온도가 높아짐에 따라 $36.93 \pm 2.27 \sim 41.27 \pm 1.30$ mg/g으로 증가하는 것으로 나타났으며, 번데기 단백질의 경우도 대조구가 온도가 높아짐에 따라 추출량이 $38.72 \pm 2.51 \sim 44.37 \pm 1.85$ mg/g으로 완만하게 증가하였으나 protease처리구의 경우 40~50°C에서 $51.59 \pm 2.40 \sim 50.45 \pm 0.61$ mg/g으로 급격하게 상승하다가, 그 이상의 온도에서는 추출량이 떨어지는 경향이였다. 이는 최적온도가 40°C인 이 효소가 고온에서 효소의 활성이 실활되어 효소의 작용이 이루어지지 않은 결과로 판단되었으며 Choi 등¹³⁾은 단백질 추출에서 효소처리 시 최적 작용온도에서 추출율이 증가한다고 보고하였으며, Chun 등^{14,15)}은 효소작용온도 이상의 고온에서 효소를 작용시켰을 때 효소의 실활에 의해 추출율이 저하된다고 한 보고와 비슷한 결과였다.

반응시간의 영향. 효소작용시간에 따른 단백질의 추출량 변

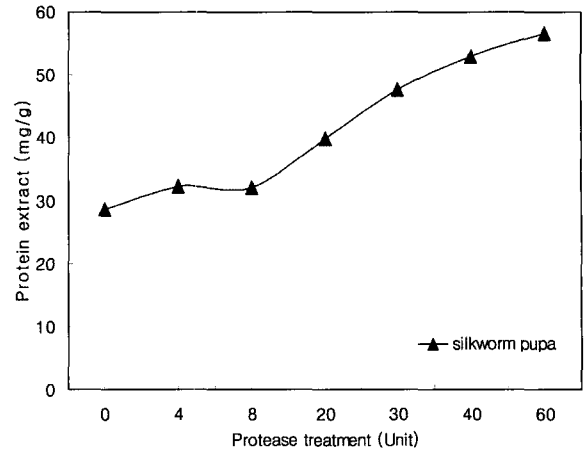


Fig. 4. Effect of enzyme concentration on extraction of protein from silkworm pupa meal treated with protease (Silkworm pupa meal was treated at 35°C for 10 hrs and pH 7 with 4~60 units of protease).

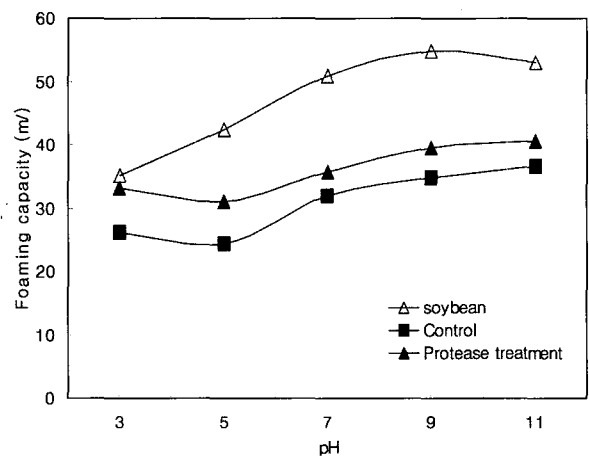


Fig. 5. Foaming capacity of protein from silkworm pupa meal with enzyme treatment.

화를 살펴보기 위하여 누에번데기에 효소를 가하고 40°C에서 1~12시간 동안 추출하였다. 실험결과 Fig. 3에서와 같이 번데기 박 단백질 용출률이 대두박보다 높았으며, 대조구와 효소처리구 모두 반응초기에는 추출량이 급속도로 증가하다가 처리 11시간 이후부터 추출량의 증가가 완만해지기 시작하였다. Choi 등¹³⁾이 참깨박에 protease를 처리했을 때와 Chun 등^{14,15)}이 참깨박에 phytase와 protease를 처리했을 때 효소처리 시간이 경과할수록 초기 추출물이 증가하다가 증가율이 점차 완만해진다고 보고하였으며 본 실험결과와 유사하였다.

처리효소량의 영향. 첨가 효소량에 의한 추출물의 변화를 살펴보기 위하여 protease를 4~60 unit까지 처리하는 효소의 양을 달리하면서 10시간 효소 처리하여 단백질의 추출에 미치는 영향을 살펴본 결과 Fig. 4에서와 같이 protease를 20 unit 처리 시 까지 대조구에 비해 단백질 용출량이 크게 증가하지 않았으나, 30 unit 처리 시 47.65 ± 2.84 mg/g를 나타내었으며, 40 unit 이상 처리 시 $52.93 \pm 3.24 \sim 56.56 \pm 2.39$ mg/g으로 대조구에 비해 2배 이상의 증가율을 나타내었다.

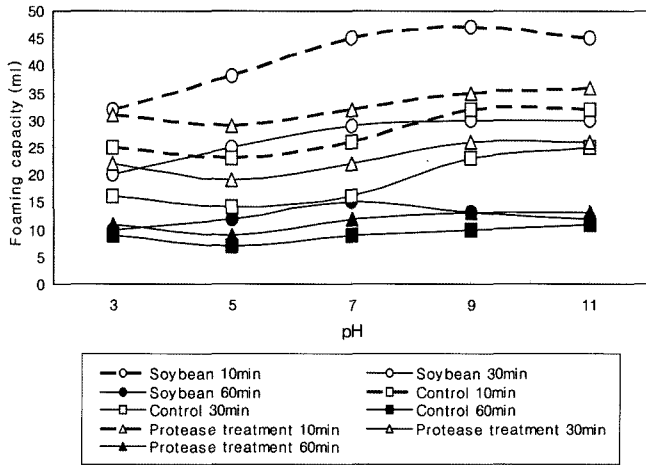


Fig. 6. Foaming stability of protein from silkworm pupa meal with protease treatment.

추출 단백질의 기능성

기포 형성력 및 기포 안정성. 효소처리 누에번데기 단백질의 기포 형성력을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 모든 처리구에서 pH 5 부근에서 기포형성력이 최소값을 나타냈으며, 번데기박 단백질의 경우 대두박 단백질에 비해 기포력이 떨어지는 것으로 나타났으며, Park과 Park²⁾도 대두단백질의 기포형성력이 번데기단백질 보다 높다고 보고하였다. 그러나 번데기 단백질의 경우 protease처리에 의해 기포형성력이 향상되는 것으로 나타났다. 기포 안정성도 Fig. 6에서와 같이 번데기박 단백질이 대두박 단백질에 비해 안정성이 떨어지는 것으로 나타났고, 대조구와 protease처리 구 모두 30분 방치 시에 기포 부피가 약 50% 수준으로 떨어졌다. Cha와 Yoon¹⁶⁾은 대두박에 protease처리 시 기포형성력이 급격히 증가한다고 보고하였고, Kinsella¹⁷⁾는 단백질의 기포팽창력과 안정성은 단백질의 용해도에 따라 좌우되고 등전점 부근에서 가장 낮다고 하였으며, 다량의 불용성 단백질이 기포 형성력에 영향을 미칠 수 있다고 추측하였다. 대조구보다 효소처리구의 안정성이 높게 나타난 것은 protease처리에 의하여 다량의 가용성 단백질이 추출되어 더 많은 공기를 포함할 수 있기 때문에¹⁸⁾ 기포형성력이 다소 높아진 것으로 생각된다. 이러한 기포력의 차이는 단백질의 구조와 관련이 깊으며, 추후 번데기 단백질 구조와 관련된 심도 있는 연구가 진행이 되어야 할 것으로 판단된다.

유화력과 유화안정성. 누에번데기박에 protease를 작용시킨 후에 추출한 단백질을 pH별로 그유화력의 차이를 측정된 결과는 Fig. 7과 같다. 단백질의 유화력은 대두단백질보다 높게 나타났으며, Park과 Park²⁾은 대두박 단백질의 유화력이 51.0%이고, 번데기박 단백질의 유화력이 62.8%로 번데기박 단백질의 유화력이 더 높다고 보고한 것과 유사한 결과가 나타났다. 번데기박 단백질의 경우 대조구와 효소처리구 모두 등전점이라 판단되는 pH 5 부근에서 가장 낮았으며 알칼리성으로 갈수록 조금씩 증가하였으나, pH에 따른 차이는 상당히 크게 나타났다. 단백질의 유화성은 많은 요인 즉, 기름의 첨가속도, 온도, pH, 단백질의 형태, 용해도 및 농도, 사용되는 기름의 종류, 그리고 수분함량 등에 의해서 영향을 받는다고 알려져 있다^{19,20)}. Cha와

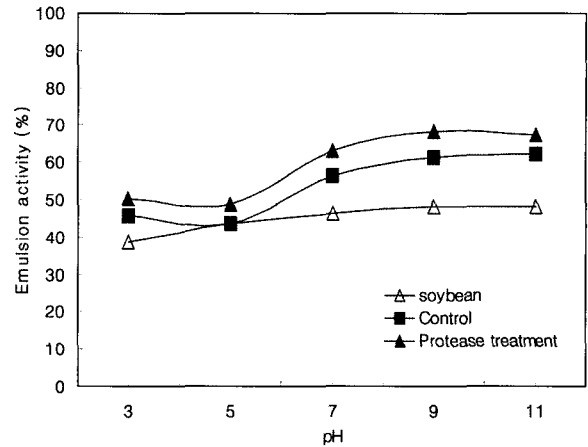


Fig. 7. Emulsion capacity of protein from silkworm pupa meal with enzyme treatment.

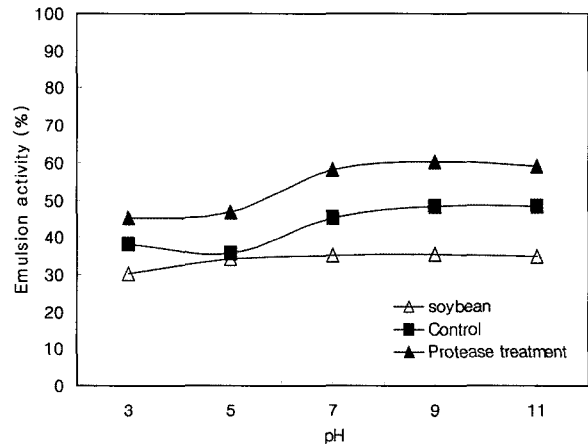


Fig. 8. Emulsion stability of protein from silkworm pupa meal with enzyme treatment.

Yoon¹⁶⁾도 대두단백질에 pepsin 같은 단백질분해효소 처리시에 그 유화력이 약 40~60%까지 급격히 증가한다고 하였다. 효소처리 대두박 단백질의 유화안정성을 살펴보기 위하여 80°C에서 30분간 가열하고 15°C로 식힌 다음 원심분리하여 유화력을 측정된 결과 Fig. 8과 같이 유화력은 대조구의 35.64 ± 1.36~48.20 ± 2.52%에 비해 protease처리구는 45.35 ± 2.14~59.08 ± 2.72%로 효소처리에 의해 유화안정성의 증가를 나타내고 있다. 이와 같은 결과는 효소의 분해작용에 의해 기름과 물 경계면에서 유화를 형성하는데 유용한 펩타이드수와 극성기의 증가^{17,19,21)}에 기인하는 것으로 판단되었다.

유지 및 수분 흡착력. 효소 처리 누에번데기 단백질의 유지 및 수분 흡착력을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 유지 흡착력을 보면 대두박 단백질의 1.48 ± 0.25 ml/g에 비하여 번데기박 단백질의 대조구가 2.27 ± 0.18 ml/g, protease처리구가 2.53 ± 0.17 ml/g로 흡착력이 더 우수함을 알수 있었고, 누에번데기단백질의 흡착력은 효소처리에 의해 대조구에 비해 약 0.3 ml/ 정도의 증가를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 효소 처리된 누에번데기단백질이 입자의 부피가 증가된 fluffy structure를 가지기 때문으로 추측하였다. 수분흡착력은 대두박단백질의 3.27 ±

Table 1. Oil and water absorption capacity of protein from silkworm pupa meal with enzyme treatment

Absorbing material	Absorption volume (ml/g)		
	Soybean	Silkworm pupa	
		Control	Protease treatment
Oil	1.48 ± 0.25	2.27 ± 0.18	2.53 ± 0.17
Water	3.27 ± 0.15	3.06 ± 0.14	3.75 ± 0.52

0.15 ml/g에 비해 번데기박 단백질의 대조구가 3.06 ± 0.11 ml/g으로 상대적으로 낮으나, protease 처리에 의해 3.75 ± 0.52 ml/g로 수분흡착력이 커짐을 알 수 있었다. Park과 Park²⁾은 대두단백질의 오일 흡착력이 1.43 ml/g이며, 번데기박 단백질의 오일 흡착력이 2.86 ml/g으로 번데기박 단백질의 오일흡착력이 매우 높다고 보고하였으며, 본 실험 결과와 유사하였다. 단백질의 수분흡착력에 영향을 미치는 인자는 pH, 이온농도, 단백질 종류, 아미노산 조성, 탄수화물의 존재 등이고, 고도의 가용성 단백질은 수분흡착력이 나빠진다는 보고^{11,19)}가 있다.

초 록

누에번데기에 함유되어 있는 불용성 단백질을 가용성 단백질로 추출시키기 위하여 누에번데기에 *Bacillus* sp. JH-209 균주로부터 생산된 protease를 작용시켰다. 이때 누에번데기 단백질의 추출을 위한 적정 pH는 pH 7~11까지의 알칼리 영역에서 추출율의 증가를 보였다. 최적 온도는 40°C였고, 최적 작용시간은 11시간이었고, 효소의 최적 첨가량은 60 unit 정도였다. 효소처리 된 누에번데기 단백질은 효소처리하지 않은 대조구에 비해 기포력, 기포안정성, 유화력과 유화안정성이 증가하였고, 유지흡착력과 수분흡착력도 대조구에 비해서 높은값을 나타내었다.

문 헌

1. Yu, T. J. and Lee, K. Y. (1978) Studies on the development of cocoon pupas for food materials. *K.J.N.* **11-1**, 39-43.
2. Park, G. S. and Park, J. R. (1986) Functional Properties of Silkworm Larvae Protein Concentrate. *Korean J. Food Sci. Technol.* **18**, 204-209.
3. Rahama, E. H. and Narasinga Rao, M. S. (1983) Effect of acetylation and succinylation of cottonseed flour on its functional properties. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 352-355.
4. Richardson, T. (1977) Functionality changes in protein following action of enzyme. In *Food proteins. Improvement through chemical and enzymatic modification*. Feeney R. E. and Whitaker, J. R. (eds.), Am. Chem. Soc. Washington, D. C. p. 185.
5. Sekul, A. A., Vinnett, C. H. and Ory, R. L. (1978) Some functional properties of peanut protein partially hydrolyzed with papain. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 855-859.
6. Rahama, E. H. and Narasinga Rao, M. S. (1983) Effect of limited proteolysis on the functional properties of cottonseed flour. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 356-361.
7. Anson, M. L. (1938) The estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physio.* **22**, 79-85.
8. Hagihara, S. (1956) Method of enzymatic analysis. Vol. 2, 237-246, Tokyo, Japan.
9. Lowry, O. H., Rosebrogh, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-271.
10. Cho, Y. J. and Chun, S. S. (2000) Effect of phytase, protease and the mixed enzyme of phytase and protease on the extraction and properties of the protein from abolished soybean meal. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 57-63.
11. Cho, Y. J., Kim, J. K., Cha, W. S., Park, J. H., Oh, S. L., Byun, M. W., Chun, S. S. and Kim, S. H. (1999) Change of physical properties and extraction of sesame meal protein by gamma irradiation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 924-930.
12. Lee, S. M. and Kim, Z. U. (1990) Extraction of proteins from soymilk residue using the enzymes from *Bacillus subtilis*. *Kor. Agric. Chem. Soc.* **33**, 282-286.
13. Choi, C., Chun, S. S. and Cho, Y. J. (1993) Extraction of protein from defatted sesame meal using the enzyme from *Bacillus* sp. CW-1121. *Kor. Agric. Chem. Soc.* **36**, 121-126.
14. Chun, S. S., Cho, Y. J., Cho, K. Y. and Choi, C. (1995) Change of Functional Properties and Extraction of Sesame Meal Protein with Phytase and Protease. *Kor. J. Food Sci. Tech.* **30**, 895-901.
15. Chun, S. S., Cho, Y. J., Son, G. M., Choi, H. J. and Choi, C. (1998) Change of functional properties and extraction of protein from abolished protein resource by protease. *Agric. Chem. Biotech.* **41**, 13-17.
16. Cha, M. H. and Yoon, S. (1993) Modification of functional properties of soy protein isolate by proteolytic enzymes. *Korean J. Food Sci. Tech.* **25**, 39-43.
17. Kinsella, J. E. (1982) Relationships between structure and functional properties of food protein. In *Food Protein*. Fox, P.F. (ed). Applied Sci. Publishers. London. p. 51.
18. Kimball, M. E., Hesien, D. S. T. and Rha, C. (1981) Chymotrypsin hydrolysis of soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* **29**, 872-879.
19. Quaglia, G. B. and Orban, E. (1990) Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates. *J. Food Sci.* **55**, 1571-1575.
20. Dench, J. E., Nilo, R. R. and Caygil, J. C. (1981) Selected functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) flour and two protein isolates. *J. Sci. Food Agric.* **32**, 557-563.
21. Kinsella, J. E. (1979) Functional properties of soy proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **56**, 242-246.