

低 pH 值条件下不同大豆蛋白组分聚合性能研究

徐红华 丁 瑞 郭珊珊 马金玉 高子雯 马彩虹
(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 改变蛋白质聚合结构是获得蛋白质不同功能性质的有效手段。研究了低 pH 值(1.5~3.5)条件下大豆蛋白各主要成分(可溶性大豆蛋白、7S、11S、酸性亚基、碱性亚基)热致凝胶的聚合类型。通过流变特性、质构特性、聚合物形态和聚合驱动力的结果可以看出,多数大豆蛋白组分在 pH 值 2.0 时形成柔长细链状的细链凝胶,7S 和酸性亚基纤维化明显,pH 值 3.5 处多为颗粒形、短簇片状的颗粒凝胶;细链凝胶表观粘度降低幅度较颗粒凝胶大,硬度相对较低;细链凝胶的主要驱动力以非共价键的疏水相互作用为主,颗粒凝胶的主要驱动力以共价键二硫键为主。
关键词: 大豆蛋白; pH 值; 聚合性能; 微观结构
中图分类号: TS201.1; TQ936.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2019)12-0380-07

Comparative Experiments of Polymerization Properties for Different Soybean Protein Components at Low pH Value

XU Honghua DING Rui GUO Shanshan MA Jinyu GAO Ziwen MA Caihong
(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Changing protein polymerization structure is an effective means to obtain different functional properties. The aggregation morphology of proteins is highly dependent on their composition and polymerization conditions. Thermal polymerization conditions with pH value below the isoelectric point will bring about great changes in polymerization structure of protein component. The research focused on the aggregate type of heat-induced gels from various components of soy proteins (soluble whole protein, 7S, 11S, acidic subunit, basic subunit) at low pH value (1.5 ~ 3.5). The results of rheological properties, texture properties, polymer morphology and driving force for aggregation showed that most soy protein components formed fine-stranded gels at pH value of 2.0, and the aggregation of acidic subunit and 7S was more fibrillation. The particulate gel networks at pH value of 3.5 were composed of particles or clusters. Compared with particulate gels, the apparent viscosity of fine stranded gels was decreased significantly, with relatively low gel hardness and elasticity. The gelation property of 7S was the worst at the same pH value among different protein components. The main driving force of the fine stranded gels was hydrophobic interaction of non-covalent bond, and covalent disulfide bond for particulate gels. The relationship between the structure and functional properties of different soybean protein components at low pH value provided sound basis for different applications.
Key words: soybean protein; pH value; polymerization; microstructure

0 引言

长期以来,食品蛋白质的研究主要集中在大于等电点的 pH 值条件下,但近年研究表明,低 pH 值条件下部分蛋白质可以自组装形成纳米纤维聚合结构,并且其凝胶性、乳化性、起泡性等功能性质得到

明显改善^[1]。pH 值的变化也会赋予蛋白质不同的聚合结构,例如:乳中的 β-乳球蛋白在等电点附近形成颗粒状聚合物^[2],进一步降低 pH 值,形成链状聚合物^[3],当 pH 值低于 2.5、低离子强度、持续加热时,则形成纤维状聚合物^[4]。也有学者对大豆蛋白进行了相关研究。文献[5-6]研究发现,7S 在 pH

收稿日期: 2019-09-09 修回日期: 2019-09-29
基金项目: 黑龙江省教育厅青年学术骨干项目(1155G10)
作者简介: 徐红华(1969—),女,教授,博士,主要从事食品蛋白质及营养研究,E-mail: xhh3161@126.com

值为 2.0、80℃ 长时间加热时,也可以形成纤维;随后文献[7]将 7S 的亚基 α' 、 α 和 β -亚基分离出来,在 pH 值为 2.0、85℃ 条件下加热,可以形成纤维聚合物;课题组前期研究中也发现,11S 自身不能形成纤维聚合物,但 11S 的酸性亚基在 pH 值 2.0、95℃ 条件下加热 20 h,可以形成淀粉样纤维聚合物^[8]。除了低 pH 值对蛋白质聚合形态的影响以外,蛋白质组成也对功能性质有很大影响。7S 比 11S 的凝胶特性弱,由于网状结构的差异,7S 热致凝胶的硬度比 11S 低,而且易断裂^[9]。综上,大豆蛋白组成不同、相同蛋白组分不同的情况下,聚合结构都可能赋予其不同的功能特性。本文通过研究大豆蛋白不同组分在不同 pH 值条件下形成的热致凝胶,比较分析不同组分、相同组分不同 pH 值条件下聚合物的结构特性、微观形态及其主要驱动力的差异,探讨不同大豆蛋白组分在低 pH 值条件下的自组装聚合结构与功能特性之间的关系,为改善大豆蛋白功能性提供一种新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

试验采用的大豆(*Glycine max*)原料品种为东农 42 号大豆,经研磨、过筛、脱脂制备脱脂豆粉。其它化学试剂均为分析纯(AR)试剂。

试验使用的主要仪器有:GL-21M 型离心机,上海精密仪器研究所;DK-98-II A 型恒温水浴锅,天津市泰斯特仪器有限公司;pHS-3C 型精密 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;AL204 型分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;LNK-872 型多功能快速消化器,江苏省宜兴市科教仪器研究所;KDN-102C 型半自动定氮仪,上海纤检仪器有限公司;JEM-1200EX 型透射电子显微镜,日本日立公司;S-3400N 型扫描电子显微镜,日本日立公司;DTT-6C 型电泳仪,北京六一仪器厂;DYCZ-28A 型电泳槽,北京六一仪器厂;UV-240IPC 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司;PE Pyris6 型差示扫描量热仪,美国 PE 公司;H-1 微型漩涡混合器,上海精科实业有限公司;F-4500 型荧光分光光度计,日本日立公司;旋转流变仪,英国马尔文公司;DS-1 型高速组织捣碎机,上海精科实业有限公司;LGJ-1 型冷冻干燥机,上海医用仪器分析厂;TA-XT2 PLUS 型物性测定仪,英国 Stable Micro System 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原料成分的测定

脱脂豆粉蛋白含量参照 AOAC 991.20^[10]测定。

1.2.2 蛋白样品的制备

脱脂豆粉的制备:将大豆磨碎后过 40 目筛,所得的豆粉按照文献[11]脂肪的测定方法脱除脂肪,最后将脱脂豆粉风干,重新过 40 目筛,得到蛋白质分数为 40.83% 的脱脂豆粉。

可溶性大豆蛋白(以下简称全蛋白)的制备:将脱脂豆粉与水按照液料比 10 mL/g 混合,分别将其调制不同的 pH 值,室温(20℃)下搅拌 1 h,4℃ 下离心(10 000 g,20 min)处理,取上清液,即为相应 pH 值下水可溶性全蛋白溶液。

7S 和 11S 的分离制备:将得到的水可溶性全蛋白溶液调 pH 值到 6.4,4℃ 条件下冷沉 12 h,4℃ 下冷冻离心(10 000 g,20 min),得到的沉淀即为 11S 的粗提物。将 11S 沉淀复溶,分别将其调制不同的 pH 值,室温下搅拌 1 h,4℃ 下离心(10 000 g,20 min)处理,取上清液待用。收集可溶性蛋白的上清液,调 pH 值到 4.8,8℃ 下离心(6 500 g,20 min)处理,得到的沉淀即为 7S 粗提物。将 7S 沉淀复溶,分别将其调制不同的 pH 值,室温下搅拌 1 h,4℃ 下离心(10 000 g,20 min)处理,取上清液待用^[12]。

酸性亚基和碱性亚基的分离制备:酸性亚基和碱性亚基的分离^[13]由大豆球蛋白(11S)开始。用 30 mol/L 的 pH 值 8.0 的 Tris 缓冲液将大豆球蛋白(11S)稀释到 0.005 g/mL,然后加入 β -巯基乙醇使其浓度为 15 mol/L,90℃ 加热处理 30 min,冷却到室温后,4℃ 下离心(10 000 g,20 min)处理,所得的沉淀即为碱性亚基。将沉淀复溶,分别将其调制不同的 pH 值,室温下搅拌 1 h,4℃ 下离心(10 000 g,20 min)处理,取上清液待用。收集除掉碱性亚基的上清液用 2 mol/L HCl 调 pH 值到 4.8,4℃ 离心(6 500 g,20 min)处理,沉淀物即为酸性亚基。将沉淀复溶,分别将其调制不同的 pH 值,室温下搅拌 1 h,4℃ 下离心(10 000 g,20 min)处理,取上清液待用。

1.2.3 凝胶的制备

利用凯氏定氮法测定溶液的蛋白质含量,将溶液的蛋白质质量分数调至 3.0%,再用 1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L HCl 将溶液调至相应的 pH 值,全蛋白 90℃,7S 80℃,11S、酸性亚基、碱性亚基 95℃,分别水浴 10 h,取出立即冷却,4℃ 冰箱保存 12 h。

1.2.4 表面疏水性

采用 ANS 荧光探针法^[14]进行测定。分别将不同蛋白样品用磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 值 7.0)依次稀释至 0.1、0.05、0.025、0.012 5 mg/mL 后,取不同质量浓度样品的溶液 6 mL,分别加入 25 μ L 8 mmol/L 的 ANS 溶液(用 0.01 mol/L、pH 值

7.0 的磷酸盐缓冲液配制),经振荡后静置 15 min,再测定样品的荧光强度。实验中激发波长 $\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$,发射波长 $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$,夹缝为 5 nm。以荧光强度对蛋白质质量浓度制图,初始段斜率即为蛋白质分子的表面疏水性指数。

1.2.5 游离巯基

蛋白溶液中游离巯基的测定方法参照文献[15]的方法,并加以改进。取 0.25 mL 大豆蛋白聚合物溶液(20 mg/mL)加入到 5 mL Tris - Gly 缓冲溶液(0.086 mol/L Tris, 0.09 mol/L 甘氨酸, 0.004 mol/L 乙二胺四乙酸,pH 值 8.0 和 8 mol/L 尿素)中,然后再向其中加入体积为 20 μL 的 2,2-dinitro-5,5-dithiodibenzoate (DTNB)试剂,振荡混匀,在室温下静置 15 min,利用紫外分光光度计在 412 nm 波长下测定吸光度,以不加蛋白样的溶液做空白调零。游离巯基质量摩尔浓度计算公式为

$$S_H = 73.53A_{412}D/C$$

式中 S_H ——游离巯基质量摩尔浓度, $\mu\text{mol/g}$

A_{412} ——412 nm 下的吸光度

C ——固形物质量浓度,mg/mL

D ——稀释系数

1.2.6 透射电镜

参考文献[16]的方法,使用透射电子显微镜(TEM)测定样品的微观结构。将蛋白样用去离子水稀释成蛋白质量分数为 0.2% 的待测样品,取一滴稀释液滴于透射电镜专用铜网上吸附 15 min,多余的部分用滤纸移除,室温下干燥 10 min,80 kV 电压下用透射电镜进行分析。

1.2.7 扫描电镜

参考文献[17]的方法,实验操作步骤如下:
①固定:取凝胶约 1 cm^3 左右,加入 pH 值 6.8、2.5% 的戊二醛进行固定,然后置于 4℃ 冰箱中保存。
②切片:用液氮将样品冷冻,小心用刀片切断横截面。
③冲洗:用 pH 值 6.8 磷酸缓冲液反复冲洗 3 次,每次 10 min。
④脱水:分别用体积分数为 30%、50%、70%、90%、100% 的乙醇脱水,每次 10 ~ 15 min,乙醇体积分数为 100% 时脱水 3 次。其他体积分数时各一次。100% 的乙醇中要加入吸水剂。
⑤置换:100% 乙醇 10 min,100% 乙醇与叔丁醇体积比 1:1 一次,纯叔丁醇一次,各 10 min。
⑥冷冻干燥。
⑦镀金:选择要观察的面进行固定,离子渐射镀金。
⑧上镜观察,取相。

1.2.8 质构测定

本实验采用 TA - XT2 型物性测定仪测定凝胶的质构,它通过模拟人的触觉感应,分析检测触觉中的物理特性。参考文献[18]的方法,采用直径为

35 mm 的 P35 型探头以恒定的速率施加于样品上,记录穿透厚度达到一定值时所用的力。实验参数:测前速度 1.0 mm/s;测试速度 1.7 mm/s;测后速度 2.0 mm/s,感应力设为 50 N,测试距离为 10 mm。

1.2.9 流变学测定

表观粘度测定:参照文献[19]的方法,略有修改。采用马尔文流变仪稳态测试系统测试表观粘度,选择夹具直径为 60 mm 的平行板,平行板之间的夹距为 500 nm,取 3.0% 样品分散液缓慢倾注充满夹具,溢出的部分用专用的塑料刮勺刮去,盖好保温套,剪切速率范围 0.01 ~ 100 s^{-1} 。

粘弹性测定^[20]:选择夹具直径为 60 mm、夹角为 0.5° 的锥形板,通过应力扫描,确定应力为 0.050 61 Pa。

1.3 数据处理分析

实验数据采用 Origin 2017 进行制图和 IBM SPSS Statistics v 20.0 软件对实验数据进行 ANOVA 方差分析,检验差异显著性($P < 0.05$)。数据均以平均值 $\pm$ 标准差表示($n = 3$)。

2 结果与分析

2.1 pH 值对流变学特性的影响

不同 pH 值(1.5、2.0、2.5、3.0)条件下大豆全蛋白热聚合后流变学特性存在很大差异,从图 1(图中 G' 为贮能模量, G'' 为损耗模量)的结果可以看出,同一 pH 值条件下,随着剪切速率的增加,全蛋白的表观粘度降低,并且 pH 值越低,其表观粘度降低幅度越大,尤其是在剪切初期。pH 值 3.0 样品的表观粘度大一些,抗剪切能力强一些,随 pH 值的降低依次递减,pH 值 1.5 时最低。同样,随着频率的增加,粘弹性逐渐升高,pH 值 3.0 样品的弹性模量和粘性模量表现最好,其次是 pH 值 2.0、pH 值 2.5,pH 值 1.5 时最差(图 1)。pH 值改变带来的流变学性质变化可能与大豆蛋白聚合物结构差异有关^[21-22]。

2.2 不同大豆蛋白组分的凝胶质构特性

不同 pH 值会带来大豆全蛋白流变学性能的差异,当把全蛋白分离为 7S、11S、11S 又分离为酸性亚基和碱性亚基,这些不同大豆蛋白组分在相同蛋白不同 pH 值条件下凝胶特性也同样存在很大差异。从表 1 可以看到,全蛋白在 pH 值 3.5 处形成的凝胶硬度是 pH 值 2.0 处形成的 1.19 倍;7S 凝胶的这种差异更加明显,是其 1.91 倍;11S 形成的两种凝胶的倍数关系是 3.16;酸性亚基是 1.827 倍;碱性亚基 2 种 pH 值下形成的热致凝胶硬度差异小,是其 0.742 倍,差异性不明显。上述结果可以发现,对于 pH 值 3.5 的蛋白凝胶来说,其硬度、黏性及咀

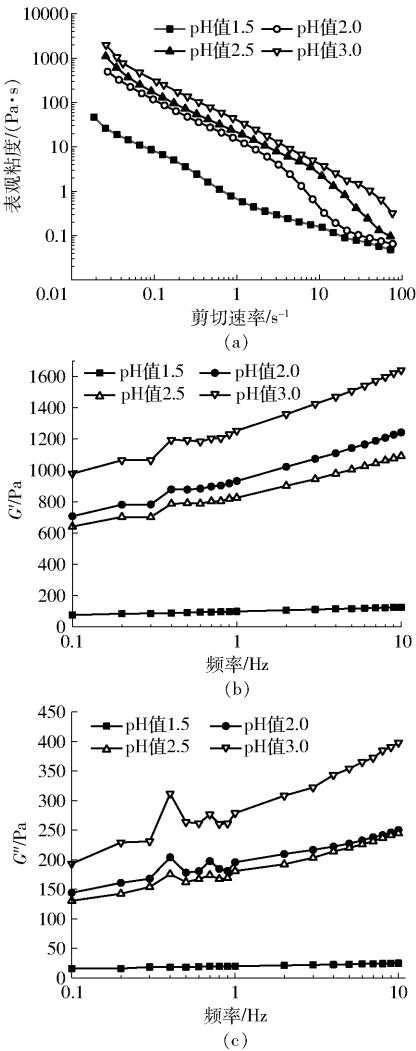


图 1 不同 pH 值样品表观粘度及粘弹性的变化曲线
Fig.1 Apparent viscosity changes of samples at different pH values

嚼性都高于 pH 值 2.0 各种大豆蛋白组分形成的凝胶(表 1)。

2.3 不同大豆蛋白组分的聚合形态

大豆全蛋白、7S、11S、酸性亚基和碱性亚基在不同 pH 值条件下凝胶性能的差异可能与形成的聚合物形态存在很大关系。从透射电镜的结果可以看出,pH 值 2.0 和 pH 值 3.5 两种条件下,蛋白聚合物形态有很大不同,pH 值 2.0 主要以纤维或链状结构为主;pH 值 3.5 则以颗粒或片状团簇结构为主。其中碱性亚基在两个 pH 值条件下聚合物状态差别不大,没有明显的纤维聚合物形成,都是以团簇状聚集。在扫描电镜中可以看到,对于不同大豆蛋白成分的凝胶,其在 pH 值 3.5 处凝胶的结构比在 pH 值 2.0 处凝胶的结构更致密,孔隙度很小且均匀,网状结构更规则,这与其聚合特性也有关,在 pH 值 3.5 处的聚合为颗粒聚合,pH 值 2.0 处的蛋白为线性或链状聚合。其中 7S 和酸性亚基两种蛋白成分在不同 pH 值形成的凝胶微观结构的差异性表现最为明显(图 2)。

2.4 聚合驱动力

对于全蛋白、7S 和 11S 的变化规律,在热处理 1 h 时,表面疏水性达到最大,随后的加热处理过程,表面疏水性呈下降趋势,而酸性亚基和碱性亚基在加热过程中,表面疏水性均呈下降趋势。产生这种差异可能是由于其分子结构的差异。5 种蛋白样品表面疏水性在不同 pH 值条件的变化均从小到大依次为 pH 值 1.5、pH 值 2.0、pH 值 3.0、pH 值 3.5 (图 3)。由于未加热前不同 pH 值的表面疏水性接

表 1 不同样品的质构特性比较

Tab.1 Comparison of textural properties of different samples

pH 值	特性	全蛋白	7S	11S	酸性亚基	碱性亚基
2.0	硬度/g	(849.943 ± 4.099) ^a	(420.273 ± 0.319) ^a	(566.648 ± 18.114) ^a	(733.716 ± 19.839) ^a	(971.472 ± 4.928) ^a
	弹性指数	(0.974 ± 0.004) ^a	(0.878 ± 0.081) ^a	(0.931 ± 0.003) ^a	(0.984 ± 0.005) ^a	(1.209 ± 0.251) ^a
	黏性指数	(260.093 ± 15.356) ^a	(140.070 ± 7.145) ^a	(104.771 ± 1.482) ^a	(156.335 ± 16.351) ^a	(150.442 ± 2.313) ^a
	咀嚼性指数/(g·mm ⁻¹)	(253.323 ± 15.929) ^a	(128.118 ± 0.501) ^a	(93.984 ± 4.597) ^a	(153.193 ± 15.825) ^a	(116.820 ± 12.288) ^a
3.5	硬度/g	(1 008.233 ± 43.937) ^b	(803.071 ± 11.793) ^b	(1 788.656 ± 5.187) ^b	(1 341.090 ± 40.393) ^b	(721.233 ± 4.928) ^b
	弹性指数	(0.893 ± 0.105) ^a	(0.918 ± 0.012) ^a	(0.961 ± 0.002) ^b	(0.886 ± 0.003) ^b	(0.940 ± 0.024) ^a
	黏性指数	(292.303 ± 35.996) ^a	(189.297 ± 2.764) ^b	(318.715 ± 3.339) ^b	(231.883 ± 5.979) ^b	(205.573 ± 27.828) ^a
	咀嚼性指数/(g·mm ⁻¹)	(257.211 ± 1.416) ^a	(173.890 ± 4.790) ^b	(307.433 ± 2.855) ^b	(167.615 ± 1.361) ^b	(193.933 ± 31.138) ^b

注:不同 pH 值同一参数 a、b 表示差异显著(P < 0.05)。

近,进而说明 pH 值越低疏水相互作用能力越强。相对于 pH 值 3.5 处形成的颗粒凝胶,在 pH 值 2.0 处细链凝胶的疏水相互作用是主要作用力,而 pH 值 3.5 处颗粒凝胶的这种非共价作用力弱(图 3)。

对于共价键-二硫键的变化而言,在不同大豆蛋白样品中,热处理带来的游离巯基变化规律是一致

的,都有明显下降趋势且从小到大依次为 pH 值 3.5、pH 值 3.0、pH 值 2.0、pH 值 1.5(图 4)。其中酸性亚基和碱性亚基由于在分离过程中加入 β-巯基乙醇的作用,断开了二硫键,其游离巯基的含量明显高于可溶性全蛋白和 7S、11S(图 4)。但是其变化规律仍然一致。在加热的过程中游离巯基相互结

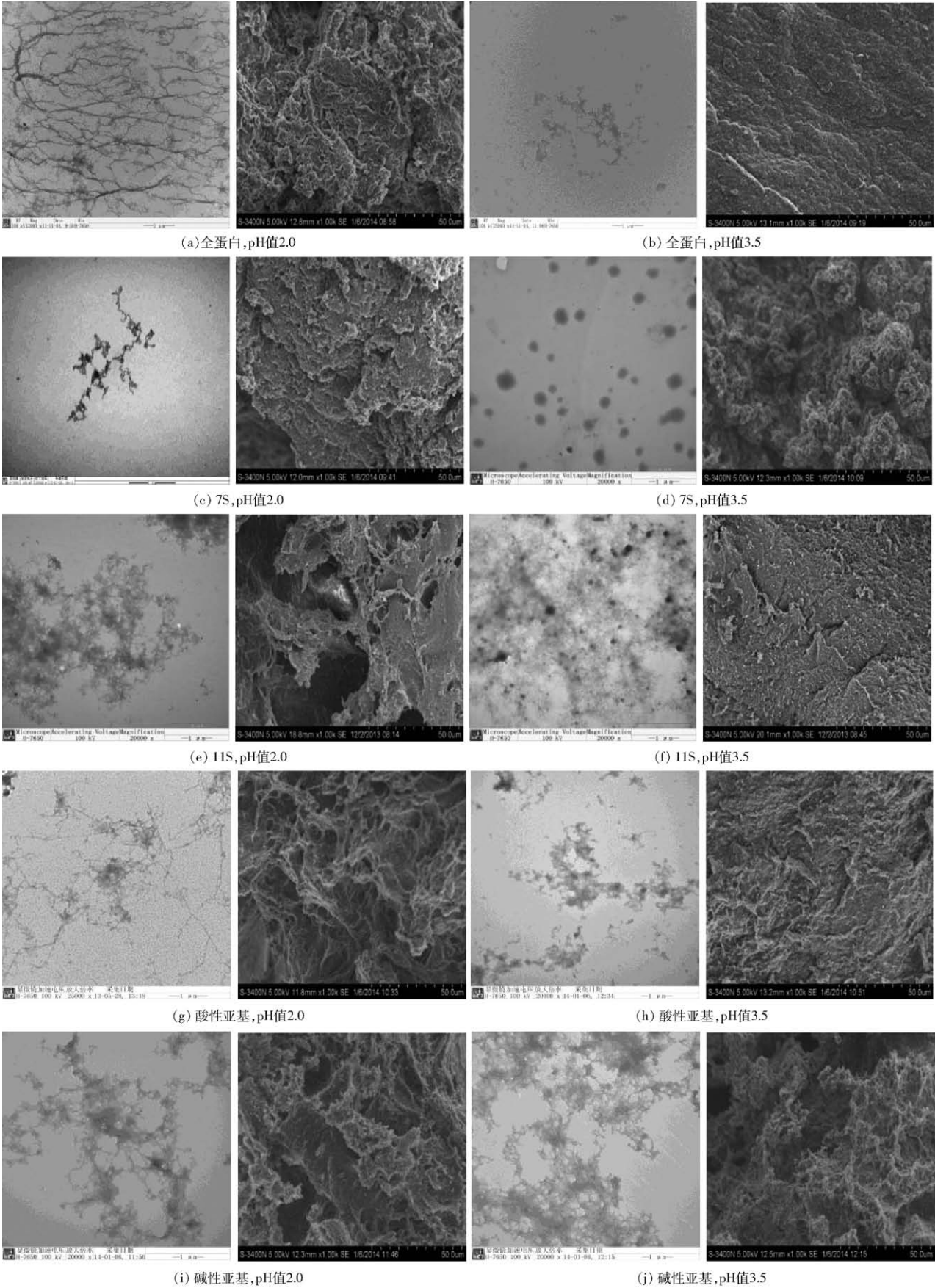


图 2 不同 pH 值的各种蛋白加热的透射电镜和扫描电镜图像

Fig.2 Transmission electron microscopy images and SEM pictures of aggregates with different morphologies formed by heating proteins under different conditions

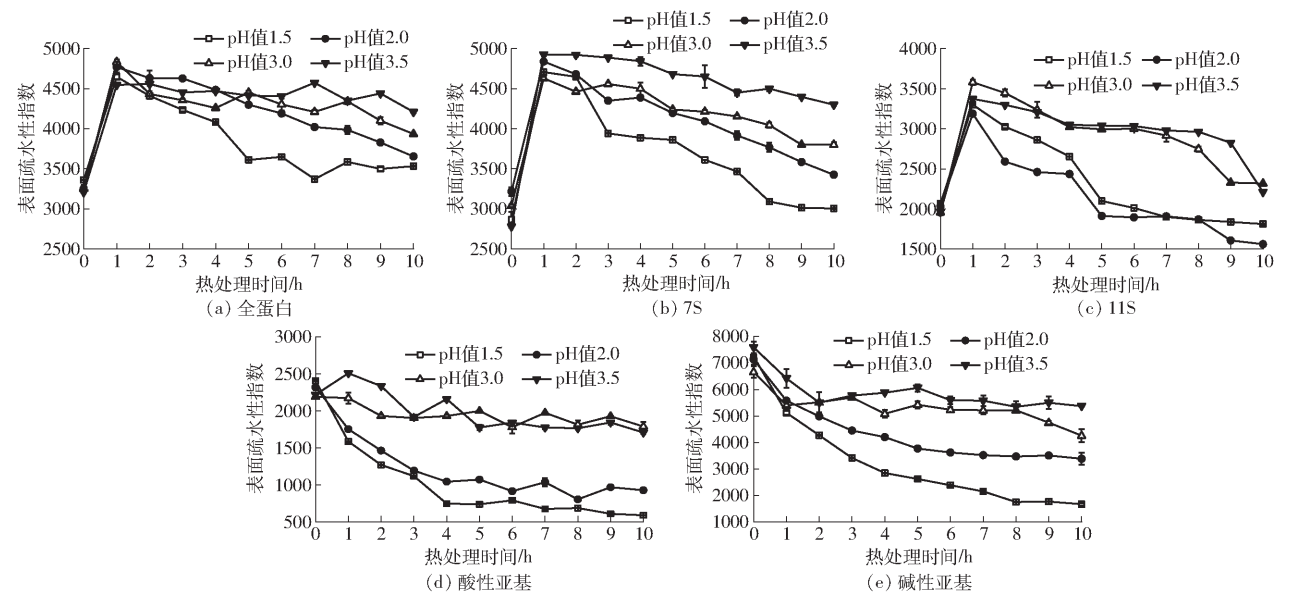


图 3 不同蛋白样品表面疏水性变化曲线

Fig. 3 Surface hydrophobic change of different protein samples

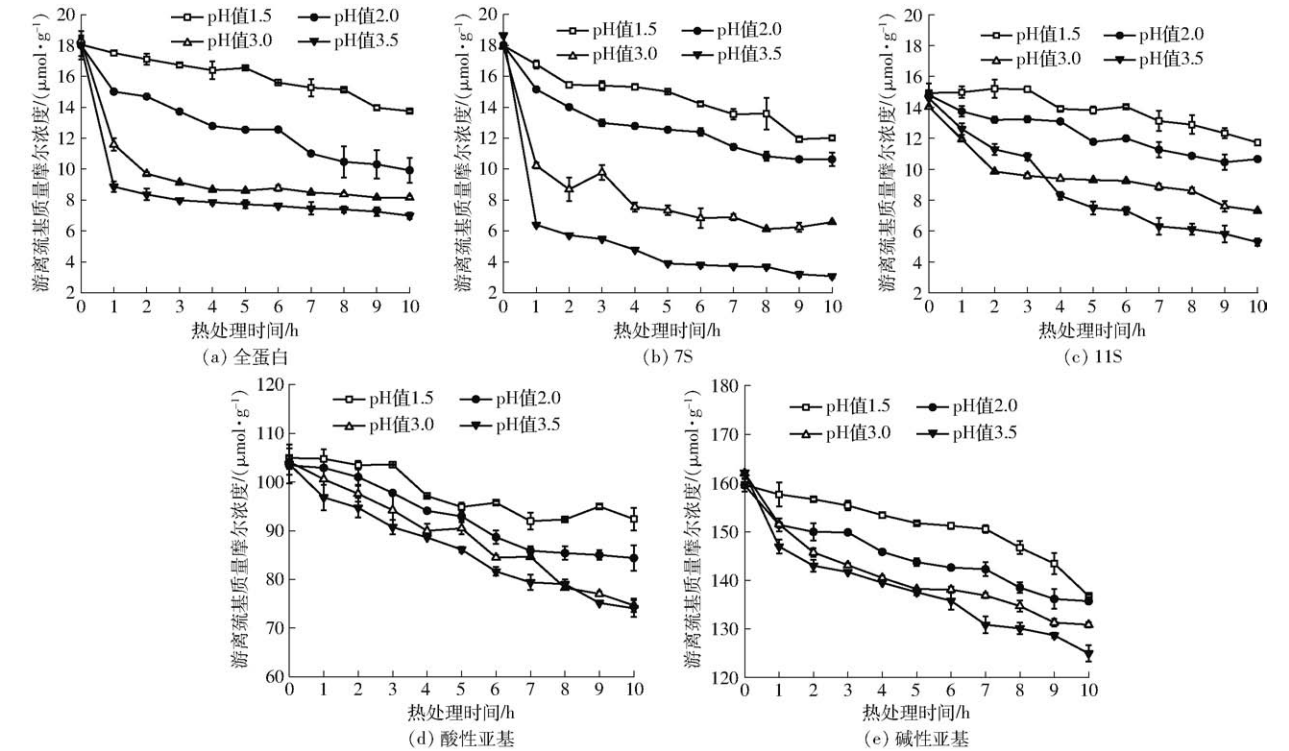


图 4 不同蛋白样品的游离巯基变化曲线

Fig. 4 Free sulfhydryl group change of different protein samples

合形成二硫键,造成游离巯基的数量减少,pH 值越低的样品其减小程度越小。低 pH 值条件下形成的细链凝胶其二硫键作用相对颗粒凝胶要弱,即相对颗粒凝胶共价作用弱,非共价作用较强。

3 结论

(1)低 pH 值会带来不同大豆蛋白组分聚合结构及凝胶形态的差异,多数大豆蛋白组分在 pH 值 2.0 时形成柔长细链状的细链凝胶,7S 和酸性亚基

纤维化明显,pH 值 3.5 时多为颗粒形、短簇片状的颗粒凝胶。

(2)pH 值在等电点以下的变化会带来大豆蛋白组分热聚合结构的改变,进而产生功能性质的变化,细链凝胶表观粘度降低幅度较颗粒凝胶大,硬度相对较低。

(3)细链凝胶的形成中主要作用力是疏水相互作用,二硫键的作用很弱。相反,在颗粒凝胶的形成中,二硫键的作用较细链凝胶强,非共价键作用弱。

参 考 文 献

- [1] 王晶. 乳清浓缩蛋白纳米纤维的制备及其性质研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2013.
- [2] NICOLAI T, DURAND D. Controlled food protein aggregation for new functionality[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2013, 18(4):249–256.
- [3] KAVANAGH G M, CLARK A H, ROSS-MURPHY S B. Heat-induced gelation of globular proteins: Part 3. Molecular studies on low pH β -lactoglobulin gels[J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2000, 28(1):41–50.
- [4] AKKERMANS C, VAN DER GOOT A J, VENEMA P, et al. Micrometer-sized fibrillar protein aggregates from soy glycinin and soy protein isolate [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(24): 9877–9882.
- [5] TANG C H, WANG C S. Formation and characterization of amyloid fibrils from soy β -conglycinin and glycinin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(20): 11058–11066.
- [6] TANG C H, WANG C S, HUANG Q. Improvement of heat-induced fibril assembly of soy β -conglycinin (7S globulins) at pH 2.0 through electrostatic screening [J]. *Food Research International*, 2012, 46(1): 229–236.
- [7] WANG J M, YANG X Q, YIN S W, et al. Growth kinetics of amyloid-like fibrils derived from individual subunits of soy β -conglycinin[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(20):11270–11277.
- [8] 董世荣. 不同大豆蛋白组分自组装纤维形成能力及相互作用的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2014.
- [9] RENKEMA J M S, KNABBen J H M, VLIENT T V. Gel formation by β -conglycinin and glycerin and their mixtures[J]. *Food Hydrocolloids*, 2001, 15(4–6): 407–414.
- [10] AOAC. Official method 991. 20. Nitrogen (total) in milk. Official methods of analysis of AOAC international. 18th rev. ed [M]. Washington, DC: Association of Analytical Communities International, 2014:56–68.
- [11] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T5009. 46—2003 乳与乳制品卫生标准的分析方法[S]. 北京:中国标准出版社, 2003.
- [12] ROBERTS R C, BRIGGS D R. Isolation and characterizations on of the 7S component of soybean globulins[J]. *Cereal Chem.*, 1965, 42: 71–85.
- [13] MING X Q, ZHONG Z K, WANG D H, et al. Soybean glycerin subunits: characterization of physicochemical and adhesion properties[J]. *Agric. Food Chem.*, 2006, 54(20):7589–7593.
- [14] HAYAKAWA S, NAKAI S. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins [J]. *Journal of Food Science*, 1985, 50(2): 486–491.
- [15] BEVERIDGE T, TOMA S J, NAKAI S. Determination of SH-and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent [J]. *Journal of Food Science*, 1974, 39(1):49–51.
- [16] MARK R H K, GLYN L D, ATHENE M D. Amyloid fibril-like structure underlies the aggregate structure across the pH range for β -lactoglobulin[J]. *Biophysical Journal*, 2009, 96(12): 5013–5019.
- [17] AGUIRRE M E, LOBATO C C, BERISTAIN C I, et al. Microstructure and viscoelastic properties of lowfat yoghurt structured by monoglyceride gels[J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2009, 42(5): 938–944.
- [18] ŞANLI T, SEZGIN E, DEVECI O, et al. Effect of using transglutaminase on physical, chemical and sensory properties of set-type yoghurt [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(6): 1477–1481.
- [19] GU X, CAMPBELL L J, EUSTON S R. Influence of sugars on the characteristics of glucono- δ -lactone-induced soy protein isolate gels [J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(2): 314–326.
- [20] LI X Y, LI D, WANG L J, et al. The effect of addition of flax seed gum on the rheological behavior of mixed flax seed gum-casein gels[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88(4):1214–1220.
- [21] NAKAMURA T, UTSUMI S, MORI T. Interactions during heat-induced gelation in a mixed system chemistry[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1986, 50(10): 2429–2435.
- [22] JUNG S, MURPHY P A, JOHNSON L A. Physicochemical and functional properties of soy protein substrates modified by low levels of protease hydrolysis[J]. *Journal of Food Science*, 2005, 70(2): 180–187.