热诱导大豆蛋白纤维聚集体的分离及性质研究

陈震东，陈嘉琦，王金梅，杨晓泉

（淀粉与植物蛋白深加工教育部工程研究中心，华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

摘要：酸性热处理条件下，随着大豆分离蛋白(SPI)自发形成纤维聚集体，仍有部分未自组装聚集的多肽分子存在其中，二者比例对蛋白功能性质产生较大影响。本文以超滤手段对热诱导大豆蛋白纤维聚集体和多肽进行大量分离，确定分离方法并研究两者的理化性质。结果表明：100 ku 超滤膜反复分离两次即能获得较好的分离效果；SPI 经热处理后，其等电点溶解度提高，但中性 pH 下溶解度变小，且蛋白水解致使其表面电位绝对值明显提高；分离所得纤维聚集体的氨基酸组成和表面电位与热处理蛋白相似，在等电点和中性 pH 溶解度更低；多肽则含有较少疏水氨基酸和较多负电氨基酸，在 pH 2.0~9.0 溶解度较好，其在酸性 pH 下电荷量和静电排斥力较低，导致其以无定形聚集体的形式存在，而中性 pH 其电荷量较高导致多肽分子间相互作用减弱，聚集体解离。

关键词：大豆分离蛋白；纤维聚集；多肽；分离；功能性质

文章篇号：1673-9078(2015)6-172-177 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.027

Properties of Isolated, Thermally Induced Soy Protein Fibrillar Aggregates

CHEN Zhen-dong, CHEN Jia-qi, WANG Jin-mei, YANG Xiao-quan

(Research and Development Center of Food Proteins, Department of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Soy protein isolate (SPI) spontaneously forms fibrillar aggregates under acidic heat treatment; however, certain peptides still do not self-assemble into aggregates and the ratio between fibrillar aggregates and peptides has a great impact on functional properties of the protein. Fibrillar aggregates and peptides were separated in bulk by ultrafiltration, in order to study their physicochemical properties. The results showed that 100 ku ultrafiltration membrane can produce a good separation effect after two separation cycles. After heat treatment, SPI solubility at the isoelectric point increased, but that at neutral pH decreased. Additionally, protein hydrolysis caused the absolute value of the surface potential to increase. Amino acid composition and surface potential of fibrillar aggregates were similar to those of heated SPI, but its solubility at isoelectric point and neutral pH decreased significantly. Peptides contained fewer hydrophobic amino acids and more negatively charged amino acids; solubility at pH 2.0 to 9.0 was relatively higher, while the electric charge and electrostatic repulsive force were lower at acidic pH, leading to the amorphous formation of aggregates. Thus, high charge at neutral pH results in weakened interactions among peptides and the dissociation of amorphous aggregates.

Key words: soy protein isolate; fibrillar aggregates; peptides; separation; functional properties

大豆蛋白以其良好的营养价值和优越的功能性质常用作食品配料广泛应用于食品体系当中。加工过程中的热处理常常会引起蛋白质变性，进而影响其功能性质，这一过程常伴随着蛋白热聚集的发生，受环境因素强烈影响。鉴于蛋白聚集行为是建立其结构与功能关系的桥梁，明确并定向操控特定条件的蛋白热聚集行为，对开发优异的蛋白功能配料有重要的现实意义。一般认为，中性 pH 条件下加热，蛋白分子内部的疏水基团部分暴露，发生聚集生成大分子量的无定形聚集体。在低 pH（2.0）和低离子强度下加热，蛋白分子表面的高电荷导致较强的静电排斥，促使分子发生自组装形成纤维聚集体，其具有典型的交叉 β-折叠结构(cross β-sheet) [1]。纤维聚集因其良好的流变性，主要用作增稠剂和凝胶填充物[2~3]；近年研究还发现，纤维聚集可以有效地稳定油水/汽水界面，其界面剪切模量明显高于天然蛋白[4]。

为了调控蛋白纤维聚集体的性质，研究者对纤维聚集行为进行了探究，特别对于蛋白浓度[5]、离子强

收稿日期：2014-11-03

基金项目：国家自然科学基金项目（31301432）；中央高校基本科研业务费项目(SCUT，2013ZM0052)

作者简介：陈震东(1989-)，男，硕士研究生，主要从事蛋白质化学和综合利用研究

通讯作者：王金梅(1982-)，女，主要从事蛋白质化学和综合利用研究

度[6]和剪切处理[7]对纤维聚集形成的影响研究更为深入。目前广泛认为，纤维聚集形成是多步骤的过程，蛋白纤维化伴随着构象的改变和蛋白的水解。酸热条件下，蛋白水解，所得部分多肽自组装成纤维聚集，随着加热延长，纤维聚集体不断生长[8]，但仍有部分未组装的多肽存在于其中。与动物蛋白相比，植物蛋白纤维聚集的研究较少，且只限于纤维聚集进程层面，未对其性质进行详细报道。Tang 等[9]报道大豆 7S 球蛋白比 11S 球蛋白更易于形成纤维聚集，且静电屏蔽对纤维聚集的进程有改善[10]。

纤维聚集是由多肽有序排列转化生成的，明确纤维聚集和未聚集多肽的理化性质并准确控制两者的比例，对扩展蛋白纤维化的应用有现实意义。由此，纤维聚集和多肽的分离显得尤为重要。目前，纤维聚集和多肽的分离没有建立起有效的方法。Ardy[11]等使用离心过滤方法小量地分离了 β-乳球蛋白纤维聚集和多肽，并对其 pH 稳定性进行研究。研究发现，纤维聚集和多肽表现不同的 pH 稳定性，多肽在 pH 5.0 发生聚集，引起浊度增大。本文则利用超滤的方法，从热诱导大豆蛋白中较大量地制备出纤维聚集和多肽，并对分离效果以及产物的组成成分和性质进行研究，为扩展蛋白纤维聚集体的开发利用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 原料

低温脱脂豆粕，山东禹王实业有限公司；大豆分离蛋白(SPI)，采用碱溶酸沉的方法制备，经凯氏定氮法测得 SPI 的蛋白含量为 88.94±0.7%(N×5.71，湿基)。

1.2 主要仪器设备

Zeta 电位及纳米粒度分析仪，英国 Malvern 公司；F7000 荧光光度计，日本 HITACHI 公司；UV2300 紫外分光光度计，上海天美公司；CR22G-型冷冻离心机，日本 HITACHI 公司；实验级小型切向流超滤系统，美国 Millipore 公司；Waters 1525 高效液相色谱仪，美国 Waters 公司；MultiMode SPM 原子力显微镜，美国 Veeco 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 大豆蛋白纤维聚集的诱导

纤维聚集形成的诱导参见 Wang 等[1]方法。将 SPI 冻干粉溶解于去离子水中(3%，*m/m*)，室温搅拌 2 h 后，调节溶液 pH 值至 2.0，4 ℃水化过夜。蛋白溶液经过 10000 r/min 离心 30 min 后，以 BSA 为标准蛋白，采用 Lorry 法测定上清液的蛋白含量。用去离子水(预调 pH 2.0)将蛋白上清液稀释到 2%备用。将蛋白溶液置于带密封盖的小瓶中，于 85 ℃的水浴中加热 20 h。加热后的蛋白溶液立即冷却到室温以终止纤维化，并将其置于 4 ℃保存待用。

1.3.2 大豆蛋白纤维聚集和多肽的分离

采用超滤方法进行分离，超滤膜的分子量为 50 和 100 ku。将上述热处理蛋白溶液离心(8000 r/min，30 min)得到上清液，Lorry 法测定其蛋白含量后用去离子水(pH 2.0)稀释至 1%，并将该 100 mL 溶液加入到超滤系统进行超滤分离。当样品槽溶液浓缩到 50 mL 时，往其中加入去离子水(pH 2.0)重新稀释到 100 mL，重复以上超滤分离三次。滤过液体积每隔 25 mL 时，分别取 0.5 mL 浓缩液和滤过液，用于计算两溶液中的蛋白含量，以判断分离过程是否结束。超滤系统中，进液口压力为 30 psi，出液口压力为 10 psi，将得到的浓缩液和滤过液冻干备用。

1.3.3 硫黄素 T(Th T)荧光分析

测试参见 Nilsson[12]方法，将 8 mg Th T 溶解于 10 mL 磷酸缓冲液(10 mM，150 mM NaCl，pH 7.0)，并使用 0.22 μm 的滤膜过滤以除去不溶物质。将 Th T 母液浓度稀释 50 倍后制得工作液(50 μM)。将 40 μL 待测样(10 mg/mL)与 4 mL Th T 工作液混合均匀，待室温反应 2 min 后使用 F7000 荧光光度计测定其荧光强度。激发和发射波长分别为 440 和 482 nm，激发和发射狭缝均为 5 nm，电压为 700 mV。

1.3.4 刚果红(CR)分析

测试参见 Nilsson[12]方法，将,7 mg CR 溶解于 10 mL 磷酸缓冲液(10 mM，150 mM NaCl，pH 7.0)，并使用 0.22 μm 的滤膜过滤以除去不溶物质。将母液浓度稀释为 50 μM 的工作液。将 40 μL 待测样品(10 mg/mL)与 3 mL 工作液混合均匀，待室温反应 30 min 后，使用 UV2300 紫外分光光度计进行波长扫描，扫描范围为 400~600 nm，未加蛋白样品的 CR 工作液作为空白被扣除，得到差减紫外光谱。

1.3.5 原子力显微镜(AFM)[13]

原子力显微镜用于直接观察热处理 SPI、纤维聚集蛋白和多肽，以获得其微观形态和大小等信息。取 2 μL 的样品溶液(10 μg/mL)置于刚剥离的云母片上，室温干燥处理 10 min 后使用 a MultiMode SPM 显微镜进行观察。操作条件：频率为 320 kHz；扫描速度：1.0 Hz；silicon tips 的长度为 125 μm，曲率半径为 42N/m；共振频率为 290 kHz，测试采用轻敲模式。以去离子水样品作为空白样品进行观察用来排除可能的底片污染。

1.3.6 氨基酸分析[13]

取 20 mg 蛋白样品置于安培瓶中，加入 6 mol/L 的盐酸溶液后密封处理，在 110 ℃下水解 24 h 后采用 Waters 美国高效液相色谱仪进行氨基酸分析，色谱条件为：PICO.TA 氨基酸分析柱，柱温 38 ℃，检测波长为 254 nm，流速 1 mL/min。

1.3.7 溶解度

将蛋白样品配制 1 mg/mL 的待测溶液调节溶液 pH 值 2.0~9.0，10000 g 离心 20 min 后取上清液用 Lorry 法测定其可溶性蛋白含量。本实验中溶解度记为上清液蛋白含量与总蛋白含量的比值。

1.3.8 电位曲线

配制 1 mg/mL 的待测溶液，并将其 pH 值调节至 2.0，用 0.1 mol/L 盐酸溶液和 0.1 mol/L NaOH 溶液进行连续的电位滴定，pH 2.0~9.0，间隔 pH 值为 0.5。采用 Zeta 电位及纳米粒度分析仪重复 3 次测定蛋白溶液表面电位，由此得到待测样品随 pH 变化的电位曲线。

1.3.9 多肽粒度的分布及凝胶排阻色谱(SEC)[13]

将多肽溶于去离子水中(0.1%，*m/m*)，调节 pH 2.0 和 7.0，并使用 0.45 μm 的滤膜过滤以除去不溶物质。采用 Zeta 电位及纳米粒度分析仪测量溶液的粒度分布，由此得到多肽在 pH 2.0 和 7.0 下的粒度分布。

采用凝胶排阻色谱分析多肽的分子量分布。将多肽样品溶解于浓度为 5 mM 磷酸缓冲液(pH 7.0)中，稀释至 5 mg/mL，以 0.45 μm 的过滤器过滤后上样，上样量为 10 μL。采用 Waters 高效液相系统检测，它由 Waters 2487 高效液相泵和 1525 紫外检测器组成，TSKG42000swxl(7.8 mm×30 cm)作为分析柱；洗脱液为 50 mM 磷酸缓冲液(包含 50 mmol/L NaCl，pH 7.2)；洗脱流速为 0.8 mL/min，280 nm 波长下监测吸光值 $A_{280\,nm}$。标准蛋白为细胞色素 C(12.33 ku)、抑肽酶(6.51 ku)与杆菌肽素(1.42 ku)。

1.3.10 数据分析

用 Excel 软件对数据进行统计、分析，所有数据取三次重复的平均值；用 Origin 8.0 软件对数据进行图形处理。

2 结果与讨论

2.1 大豆蛋白纤维聚集和多肽的分离效果

2.1.1 总蛋白含量

经 SDS-PAGE 电泳鉴定，蛋白质在酸热处理 20 h 后，水解成小分子量的多肽分子(<10 ku)。鉴于此，研究初步尝试以 14 ku 透析袋透析掉多肽研究纤维聚集的理化性质，但结果发现，热处理蛋白经过 48 h 透析后，袋内蛋白质含量未见减少。由此推测，多肽分子在此酸性 pH 下也可能以分子量较大一些的无定形聚集体形式存在。由此，研究尝试采用 50 ku 和 100 ku 的超滤膜对大豆蛋白纤维聚集溶液进行分离，测定浓缩液和滤过液中的总蛋白质量变化，优化分离条件。由图 1 所示，当用 50 ku 超滤膜分离时，浓缩液和滤过液的总蛋白质量未见明显变化，计算所得蛋白纤维聚集转化率大大低于文献报道[13]。进而采用 100 ku 超滤膜进行分离，浓缩液总蛋白质量随着滤过液体积增加而减少，并在滤过液达到 100 mL 时，即在第二次超滤分离完成后，变化趋于平缓；滤过液总蛋白质量逐渐增加，计算所得纤维聚集转化率与文献报道一致（约 25%）。由此可知，50 ku 的超滤膜不能很好地分离得到纤维聚集和多肽，100 ku 超滤膜适合大豆蛋白纤维聚集体的大量分离。

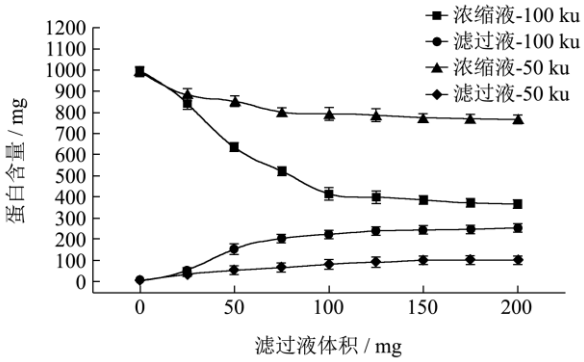


图 1 浓缩液和滤过液中的总蛋白质量(50 和 100 ku)

Fig.1 Total protein content of concentrate and filtrate

2.1.2 硫黄素 T(Th T)和刚果红(CR)分析

硫黄素 T(Th T)荧光和刚果红(CR)分析是常用的定性检测蛋白纤维结构的方法。Th T 染料在与纤维中的 β-sheet 结构结合后，会使荧光强度增加，而经 CR 染色的纤维聚集则会呈现绿色双折射现象，在 520~540 nm 范围内会有吸收峰，借此可用于检测纤维结构的含量。

将 100 ku 超滤膜分离得到的浓缩液和滤过液分别通过 Th T 荧光和 CR 分析检测其中所含有的蛋白纤维聚集体，从而判断纤维聚集与多肽的分离效果，如图 2。由图 2a 的 Th T 荧光分析可知，在总蛋白含量相同的情况下，天然 SPI 荧光强度较低，酸性 pH 下的热处理后，荧光强度明显增强，说明 SPI 经酸热处理后自组装形成了具有 cross β-sheet 的纤维结构。将热处理蛋白经 100 ku 的超滤膜分离后，浓缩液荧光强度较热处理蛋白进一步提高，而滤过液荧光强度较低，说明热处理蛋白溶液中的多肽能有效滤出。图 2b 的 CR

分析可得到相同结论。由此，Th T 和 CR 分析进一步证明 100 ku 超滤膜能有效分离出多肽。

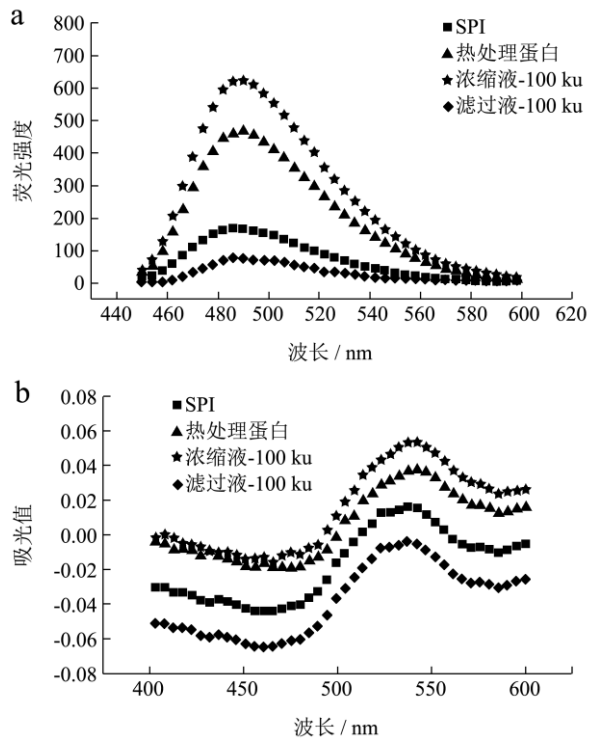


图 2 浓缩液和滤过液的 Th T 和 CR 分析

Fig.2 Th H and CR analysis of concentrate and filtrate

2.1.3 原子力显微镜(AFM)观察

本文对热诱导 SPI 和 100 ku 超滤膜分离得到的浓缩液和滤过液进行 AFM 直观观察。由图 3 可知，热处理蛋白中可以看到“蠕虫状”纤维聚集体和颗粒状聚集体的共存，纤维聚集长约 200~700 nm、高约 8 nm，颗粒聚集则长约 80 nm、高约 3 nm。浓缩液中基本上是纤维聚集，并且部分纤维聚集在一起形成一长约 1.6 μm、高约 15 nm 的团聚物，颗粒聚集则较少。滤过液中除了分布有高 5 nm 左右的颗粒聚集外，未发现有纤维聚集存在。由此可知，超滤分离方法与超速离心等其它方法相比，能够有效地大量制备纤维聚集体和多肽，有利于对其理化性质和应用进行研究。

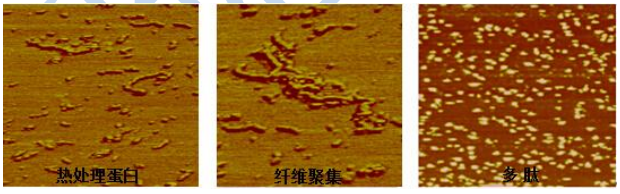


图 3 pH2.0 条件下热处理蛋白、纤维聚集和多肽的 AFM 图

Fig.3 Atomic force microscopy images of heated SPI, fibrils, and peptides at pH 2.0

注：图片尺寸：2×2 μm。

2.2 大豆蛋白纤维聚集和多肽的性质研究

2.2.1 氨基酸分析

对天热 SPI、热处理蛋白、纤维聚集和多肽进行氨基酸组成成分分析。由表 1 可知，天然 SPI、热处理蛋白和纤维聚集的氨基酸组成相近。突出的是，多肽与纤维聚集相比，疏水性氨基酸和不带电氨基酸分别少 3.71 和 1.54%，带电氨基酸则较多，其中天门冬氨酸(Asp)的含量明显增加。这主要是因为在酸热条件下，Asp 会发生 β-羟基的质子化，导致多肽链的有限水解[6]，进而部分形成纤维聚集。氨基酸分析结果与 Linden 等[14]的发现相一致，其发现形成 β-乳球蛋白纤维聚集的多肽链中疏水氨基酸较多，而未能形成纤维聚集体的多肽中则含有较多的带正电氨基酸，疏水氨基酸较少。

表 1 天然 SPI、热处理蛋白、纤维聚集和多肽的氨基酸组成（g/100g 氨基酸）

Table 1 Amino acid compositions of SPI, heated SPI, fibrils, and peptides (g/100 g amino acid)

氨基酸	SPI/%	热处理蛋白/%	纤维聚集/%	多肽/%
天冬氨酸 Asp	10.27	10.10	10.55	16.35
谷氨酸 Glu	23.35	23.73	23.79	24.73
丝氨酸 Ser	5.86	5.55	5.59	4.98
甘氨酸 Gly	4.24	4.06	4.06	3.65
组氨酸 His	2.78	1.91	2.40	2.30
精氨酸 Arg	7.02	7.02	7.60	7.31
苏氨酸 Thr	3.8	3.72	3.63	3.53
丙氨酸 Ala	4.07	3.80	3.83	3.17
脯氨酸 Pro	5.5	5.54	5.51	5.38
酪氨酸 Tyr	3.57	3.89	3.60	3.23
缬氨酸 Val	4.58	4.28	4.17	3.75
蛋氨酸 Met	1.49	1.14	1.12	1.00
半胱氨酸 Cys	0.28	0.24	0.26	0.20
异亮氨酸 Ile	3.61	4.63	4.55	3.32
亮氨酸 Leu	8.22	8.22	8.01	6.19
苯丙氨酸 Phe	5.85	6.09	5.64	4.38
赖氨酸 Lys	5.72	6.10	5.68	6.53
Hydrophobic	19.6	19.94	19.32	15.61
Uncharged polar	17.75	17.46	17.14	15.60
Positive charged polar	15.52	15.02	15.68	16.14
Negative charged polar	33.62	33.82	34.34	41.08

注：*Hydrophobic: Alanine, isoleucine, methionine, phenylalanine, valine; *Uncharged polar: Glycine, serine, threonine, tyrosine, cysteine; *Positive charged polar: Lysine, arginine, histidine; *Negative charged polar: Aspartic acid, glutamic acid。

2.2.2 溶解度

天然 SPI、热处理蛋白、纤维聚集和多肽在 pH 2.0~9.0 下的溶解度曲线，如图 4。由图可知，天然 SPI 呈现典型的 U 字型溶解度曲线，在等电点附近(pH 4.0~6.0)溶解度较低。经热处理后，蛋白在等电点溶解度提高，但中性条件下溶解度变低。纤维聚集的溶解度曲线与热处理蛋白相近，但等电点和中性下的溶解度进一步变低，这是因为热处理蛋白中含有未分离的多肽，多肽使热处理蛋白的溶解度高于纤维聚集。多肽的溶解度在 pH 2.0~9.0 都较高，pH 稳定性较高。这与 β-乳球蛋白酸热处理得到的多肽的溶解性有着明显差别，Ardy[11]等从热处理 β-乳球蛋白中分离得到的多肽在 pH 5.0 浊度增大，溶解度很低，以上不同可能是动物蛋白和植物蛋白纤维聚集进程及结构不同导致的。

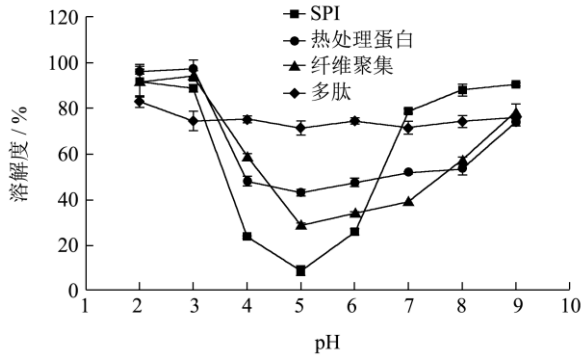


图 4 天然 SPI、热处理蛋白、纤维聚集和多肽的溶解度-pH 曲线

Fig.4 Analysis of the solubility profiles of SPI, heated SPI, fibrils and peptides

2.2.3 电位曲线

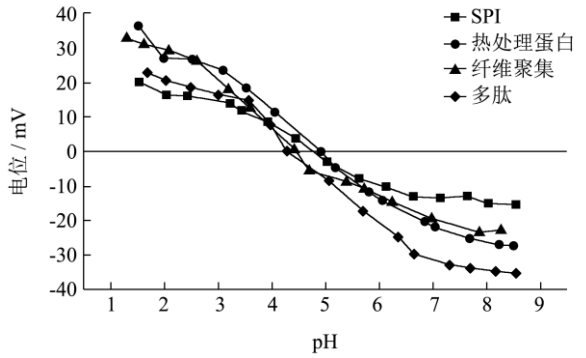


图 5 天然 SPI、热处理蛋白、纤维聚集和多肽的电位曲线

Fig.5 Zeta potential profiles of SPI, heated SPI, fibrils and peptides

蛋白质的 Zeta 电位可以反映蛋白表面的荷电情况。天然 SPI、热处理蛋白、纤维聚集和多肽在 pH 2.0~9.0 下的电位曲线，如图 5。由图可知，未经加热处理的蛋白等电点在 pH 4.8，热处理蛋白的等电点稍向高 pH 值偏移，等电点为 4.9。天然 SPI 电位绝对值在偏离等电点位置小于热处理蛋白，这主要是因为酸热条件下，蛋白质结构的展开和氨基酸水解使更多的带电氨基酸暴露出来，导致蛋白表面所带电荷增大。与热处理蛋白相比，纤维聚集和多肽的等电点则向低 pH 值偏移。纤维聚集与热处理蛋白电位曲线趋势一致。值得注意的是，多肽在低于等电点 pH 条件下，其电位绝对值明显低于纤维聚集，但在中性 pH 的电位绝对值大于 30 mV。这与氨基酸分析中，多肽含有较多的 Asp 等带负电的氨基酸是相符合的。

2.2.4 pH 稳定性分析

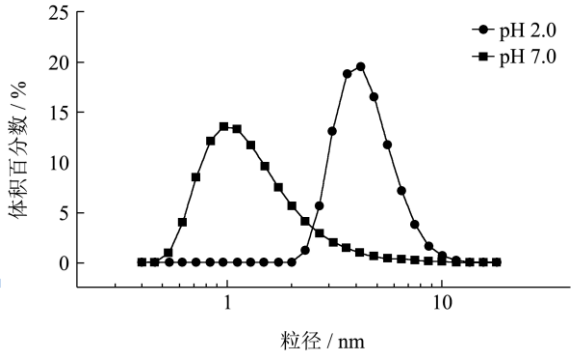


图 6 多肽在 pH 2.0、7.0 下的粒度分布图

Fig.6 Particle size distribution (pH 2.0 and 7.0) of peptides

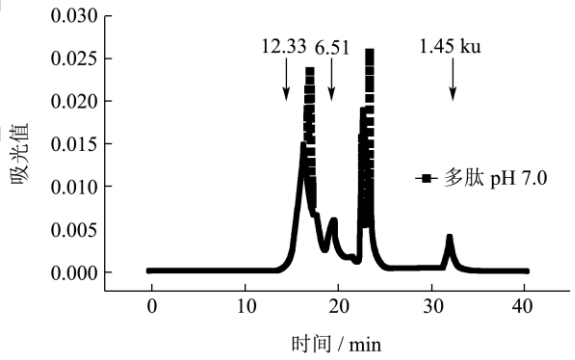


图 7 多肽在 pH7.0 下的分子量分布图

Fig.7 Molecular weight distribution (pH 7.0) of peptides

蛋白质的纤维化是在 pH 2.0 条件下热诱导形成的，考虑到大多数食品的 pH 处于中性或弱酸性的事实，这一极端酸性的 pH 限制了纤维聚集在食品工业中的应用。由此，研究不同 pH 条件下蛋白纤维聚集体和多肽的性质很有必要。溶解度结果显示，超滤分离所得蛋白纤维聚集体在中性条件下主要以沉淀的形式存在，电镜观察发现纤维聚集体团聚在一起（结果未列出），如何更好的在中性条件下应用纤维聚集体于食品体系中需要进一步研究。对于分离所得多肽而言，SDS-PAGE 电泳鉴定其分子量大都小于<10 ku，却不能被透析袋和 50 ku 超滤膜有效分离。这一矛盾现象可能与多肽的存在形式有关。多肽在酸性(pH<4.0)

条件下由于电荷量低（图 5）、静电排斥力不足，从而发生无定形聚集，导致多肽分子无法透过 50 ku 超滤膜，AFM 图片证实了这一推测（图 3）。纳米粒度分布（图 6）结果显示，在 pH 2.0 下，多肽分子主要分布于 4~6 nm，当 pH 调节到 7.0 时，多肽分子粒径分布明显变小（<2 nm）。为了进一步验证多肽分子的 pH 稳定性，本文采用凝胶排阻色谱分析多肽的分子量分布情况，见图 7。多肽的分子量较小，分布都小于 12.33 ku，此结果与 SDS-PAGE 电泳的结果相同。结合电位结果分析（图 5），可能的原因是，多肽在中性 pH 其电荷量较高导致多肽分子间相互作用减弱，聚集体解离。

3 结论

本文以超滤手段对热诱导大豆蛋白纤维聚集体和多肽进行大量分离，确定分离方法并研究两者的理化性质。结果表明，100 ku 超滤膜反复分离两次即能获得较好的分离效果。SPI 经热处理后，其等电点的溶解度提高，但中性 pH 条件下溶解度变小，且蛋白水解致使其表面电位绝对值明显提高，即所带电荷量增大；分离所得纤维聚集体的氨基酸组成和表面电位与热处理蛋白相似，但等电点和中性 pH 溶解度更低；多肽则含有较少疏水氨基酸和较多负电氨基酸，在 pH 2.0~9.0 溶解度较好，多肽在酸性 pH 下电荷量和静电排斥力较低，导致其以无定形聚集体的形式存在，而中性 pH 其电荷量较高导致多肽分子间相互作用减弱，聚集体解离。

参考文献

[1] 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

[2] Humblet-Hua N P, Sagis L M C, Scheltens G, et al. Encapsulation systems based on proteins, polysaccharides, and protein-polysaccharide complexes [J]. Zurich, Switzerland, 2009

[3] van Dijke K C, Schroën K C, Boom R M. Microchannel emulsification: from computational fluid dynamics to predictive analytical model [J]. Langmuir, 2008, 24(18): 10107-10115

[4] Jung J M, Gunes D Z, Mezzenga R. Interfacial activity and interfacial shear rheology of native β-lactoglobulin monomers and their heat-induced fibers [J]. Langmuir, 2010, 26(19): 15366-15375

[5] Kroes-Nijboer A, Venema P, Bouman J, et al. The critical aggregation concentration of β-lactoglobulin-based fibril formation [J]. Food Biophysics, 2009, 4(2): 59-63

[6] Arnaudov L N, de Vries R. Strong impact of ionic strength on the kinetics of fibrilar aggregation of bovine β-lactoglobulin [J]. Biomacromolecules, 2006, 7(12): 3490-3498

[7] Akkermans C, van der Goot A J, Venema P, et al. Formation of fibrillar whey protein aggregates: Influence of heat and shear treatment, and resulting rheology [J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(7): 1315-1325

[8] Kroes-Nijboer A, Venema P, Bouman J, et al. Influence of protein hydrolysis on the growth kinetics of β-lg fibrils [J]. Langmuir, 2011, 27(10): 5753-5761

[9] Tang C H, Wang C S. Formation and characterization of amyloid-like fibrils from soy β-conglycinin and glycinin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(20): 11058-11066

[10] Tang C H, Wang S 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

[11] Kroes-Nijboer A, Sawalha H, Venema P, et al. Stability of aqueous food grade fibrillar systems against pH change [J]. Faraday Discussions, 2012, 158(1): 125-138

[12] Nilsson M R. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro [J]. Methods, 2004, 34(1): 151-160

[13] 王金梅.大豆蛋白热聚集行为及界面 乳化性质研究[D].广州:华南理工大学,2012
WANG Jing-mei. Thermally aggregation behaviors, interfacial and emulsifying properties of soy protein [D]. Guang Zhou: South China University of Technology, 2012

[14] Akkermans C, Venema P, van der Goot A J, et al. Peptides are building blocks of heat-induced fibrillar protein aggregates of β-lactoglobulin formed at pH 2 [J]. Biomacromolecules, 2008, 9(5): 1474-1479