

超微粉碎-微粒化组合技术对乳清蛋白结构和加工特性的影响

孙婵婵, 张民, 田朝杰, 史春悦

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 研究了超微粉碎-微粒化组合技术对乳清蛋白结构和加工特性的影响, 以期为其在乳清蛋白的深加工中的应用提供理论基础。采用傅立叶红外光谱研究了乳清蛋白的二级结构, 发现超微粉碎、微粒化及其组合技术均能不同程度的改变乳清蛋白各二级结构元件的含量。荧光光谱扫描结果显示乳清蛋白的最大荧光吸收波长分别由 333 nm 红移至 334 nm、356 nm 和 358 nm, 说明了处理后的蛋白表面疏水性不同程度的增加。同时处理后的乳清蛋白的游离巯基含量 24.11 $\mu\text{mol/g}$ 显著性减少至 8.41 $\mu\text{mol/g}$, 说明了乳清蛋白三级结构发生改变。组合技术处理后, 乳清蛋白的焓值由 133.10 J/g 下降到 54.63 J/g, 说明了聚集程度显著性下降。二级和三级结构的改变直接导致了热稳定性的增强、乳化性和乳化稳定性、起泡性和泡沫稳定性、持水能力和吸油性的增强。这些加工特性的增强说明超微粉碎-微粒化组合技术适宜在乳清蛋白基质脂肪模拟物中推广应用。

关键词: 超微粉碎; 微粒化; 乳清蛋白; 结构; 加工特性

文章编号: 1673-9078(2015)12-263-268

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.039

Effect of Combination of Superfine Grinding and Microparticulation on the Structure and Processing Properties of Whey Protein

SUN Chan-chan, ZHANG Min, TIAN Zhao-jie, SHI Chun-yue

(College of Food Science and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In order to evaluate the application of combination of superfine grinding technology and microparticulation in whey protein (WP) further processing, the effects on structures, processing properties and their relationship were investigated. The fitting results of FT-IR spectrum shows that the contents of secondary structure elements significantly changed. Fluorescence emission spectrums show that the maximum wavelength of whey protein red shifted from 333 nm to 334 nm, 356 nm and 358 nm, respectively. That means the improvement of surface hydrophobicity. The reduction of free sulfhydryl content (from 24.11 $\mu\text{mol/g}$ to 8.41 $\mu\text{mol/g}$) means the change of tertiary structure. The decrease of enthalpy values (from 133.10 J/g to 54.63 J/g) indicates the lesser aggregation. The enhancement of thermostability, emulsifying properties, foaming characteristics, water holding capacity and oil binding capacity on different levels was due to the change of conformation. The improvement of processing properties means the applicable of combination of superfine grinding technology and microparticulation in whey protein-based fat mimetic.

Key words: Superfine grinding; microparticulation; whey protein; structure; processing properties

近年来, 我国干酪需求增大, 而发展干酪产业将产生大量乳清, 目前我国尚缺乏乳清蛋白综合利用相关技术。因此, 迫切需要开发乳清蛋白综合利用技术, 以实现干酪产业的可持续发展^[1]。乳清蛋白属于全价蛋白, 即含有组成蛋白质的全部 20 种氨基酸, 且乳糖、

收稿日期: 2015-03-23

基金项目: 国家高新技术研究发展计划 (863 计划) (2013AA102204)

作者简介: 孙婵婵 (1988-), 女, 博士, 主要研究方向食品添加剂及功能配料

通讯作者: 张民 (1972-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事食品化学与食品营养方面的研究工作

脂肪、胆固醇含量低, 易于消化吸收, 因此在食用蛋白质中具有较高的生物利用价值。

1990 年, Singer.N 等人提出了微粒化蛋白的概念^[2]。微粒化蛋白是通过在一定浓度的蛋白湿热处理的同时或之后施加一定的高剪切力, 使得蛋白形成 0.1~10 μm 的小颗粒。由于这些颗粒小于人体口腔粘膜对其感知程度的阈值^[3], 因此微粒化蛋白便具有了类似奶油的滑腻口感。微粒化蛋白通常作为脂肪模拟物, 部分甚至全部取代高脂食品 (如冰淇淋等) 中的脂肪。

目前最具有代表性的产品是 Nutra-Sweet 公司生

产的 Simplese, 采用鸡蛋蛋白和乳清蛋白、植物胶、卵磷脂、蔗糖、酸和水等原料经微粒化等一系列过程而制成的, 其粒径约为 3 μm 。国内江南大学的李玉美^[4]和天津科技大学的丁杰^[5]相继对乳清蛋白制备微粒化蛋白的工艺进行研究, 不同 pH 下, 湿热处理后的乳清蛋白凝胶需要微粒化处理 15 min 才能达到所需粒径(<10 μm)。本实验室采用超微粉碎-微粒化组合技术, 只需要 10000 r/min 微粒化处理 5 min 即可达到所需粒径(<10 μm), 并且得到的微粒化蛋白具有颗粒小、能耗低和稳定性好的特点。

超微粉碎一般是指将 3 mm 以上的物料颗粒粉碎至 10~25 μm 的过程。当物料被加工到 10 μm 以下, 微粉就具有巨大的比表面、空隙率和表面能, 且超微粉碎技术的粉碎过程对原料中原有的营养成分影响较小、制备出的粉体均匀性好。颗粒微细程度不同对某些天然生物资源的食用特性、功能特性和理化性能产生多方面的影响^[6]。

本文通过研究该组合技术对乳清蛋白结构和加工特性的影响, 并探讨乳清蛋白结构与加工特性之间的内在关系, 以期为其在乳清蛋白的深加工中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 原料

本实验采用的原料为蛋白含量 80% 的乳清浓缩蛋白 (Whey Protein Concentrate, WPC), 新西兰恒天然公司生产。超微粉碎乳清蛋白 (sWPC) 由河北秦皇岛市太极环纳米制品有限公司采用球磨机代加工而成。其中, sWPC-2h 为超微粉碎处理 2 h 的乳清蛋白样品, sWPC-6h 为超微粉碎处理 6 h 的乳清蛋白样品。

1.2 主要仪器设备

傅立叶变换红外光谱仪, Vector 22, 德国布鲁克光谱仪公司; 荧光分光光度计, FL-2500, 日本日立公司; 差示扫描量热仪, DSC-60A, 日本岛津公司; 高速乳化剪切机, Ultra-Turrax T25, 德国 IKA 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 微粒化处理

根据前期实验优化结果, 微粒化处理工艺如下: 0.12 g/mL 蛋白分散液 85 $^{\circ}\text{C}$ 湿热处理 35 min 后, 采用高速乳化剪切机 10000 r/min 处理 5 min。

文中, MWP 代表以乳清蛋白为原料制备得到的

微粒化蛋白, sMWP-2h 代表以超微粉碎 2 h 的乳清蛋白 (sWPC-2h) 为原料制备得到的微粒化蛋白, sMWP-6h 代表以超微粉碎 6 h 的乳清蛋白 (sWPC-6h) 为原料制备得到的微粒化蛋白。

1.3.2 二级结构的测定

采用傅立叶变换红外光谱仪对乳清蛋白和微粒化蛋白进行红外检测, 分别称取各蛋白样品 1.5 mg, 溴化钾 150 mg, 充分研磨压片后, 采用红外光谱仪进行全波段扫描, 参数如下: 扫描范围: 4000-500 cm^{-1} , 分辨率: 4 cm^{-1} , 扫描次数: 16 次。采用软件 OMNIC 进行红外光谱 1700~1600 cm^{-1} 范围进行拟合, 计算各二级结构元件的含量^[7]。

1.3.3 游离巯基的测定

参照 Beveridge 等人^[8] 的 Ellman 试剂分析方法。

1.3.4 内源性荧光光谱扫描

参考 Gu Chun-Feng 等人的方法^[9], 有少许改动。采用 5 mM 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 配制不同样品待测液 (蛋白浓度 0.05 mg/mL)。设定激发波长为 295 nm, 进行发射波长扫描, 扫描范围为 300-400 nm。

1.3.5 热学性质分析

称取蛋白样品 5 mg 左右放入铝盒中, 将样品和铝盒对应编号。把铝盒密封压制, 以空铝盒为空白对照, 进行 DSC 扫描, 求出 DSC 曲线, 读取各样品的变性温度和变性焓值。扫描起始温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 升温至 150 $^{\circ}\text{C}$, 升温速率为 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

1.3.6 加工特性的测定

乳化性及乳化稳定性的测定参考 Pearce 和 Kinslla 采用浊度法^[10]。

持水性和吸油性的测定参照周俊等人^[11]的实验方法进行。

起泡性和泡沫稳定性的测定参照 Wu Haiwen 等人^[12]的实验方法进行。

1.3.7 数据分析和统计分析

采用软件的方差分析 (One-way ANOVA) 作总体差异显著性检验, 组间比较采用 Tukey 法。显著性水平 (P) 设定为 0.05。

2 结果与讨论

2.1 二级结构测定结果

采用软件绘制红外光谱如图 1 所示, 由图可以看出 1500~1750 cm^{-1} 处峰值发生了显著性改变。说明在超微粉碎和微粒化处理过程中, 样品的二级结构均发生了改变。

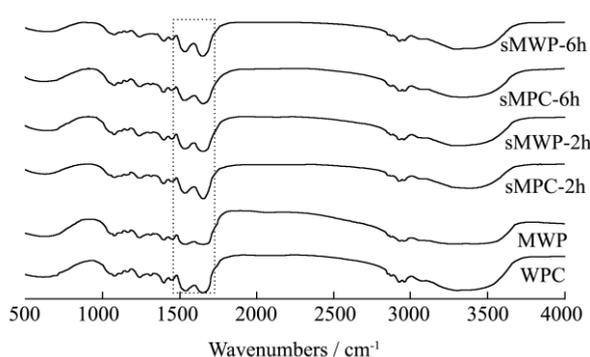


图1 WPC、sWPC-2h、sWPC-6h、MWP、sMWP-2h和sMWP-6h的红外光谱图

Fig.1 FT-IR spectrogram of WPC, sWPC-2h, sWPC-6h, MWP, sMWP-2h and sMWP-6h

采用软件计算二级结构元件含量，计算结果如表1所示。由表1可以看出，超微粉碎处理后，乳清蛋白的β-折叠和β-转角含量分别由25.01%和21.15%显著性(P<0.05)减少至22.77%和12.80%，而无规卷

表1 WPC、sWPC-2h、sWPC-6h、MWP、sMWP-2h和sMWP-6h的二级结构元件含量计算结果(%)

样品	WPC	MWP	sWPC-2h	sMWP-2h	sWPC-6h	sMWP-6h
α-螺旋	44.42 ^c	48.21 ^a	44.36 ^{cd}	43.77 ^c	45.98 ^b	41.02 ^f
β-折叠	25.01 ^{cd}	26.59 ^c	20.97 ^f	33.44 ^a	22.77 ^e	33.04 ^{ab}
无规卷曲	9.43 ^e	6.18 ^f	20.08 ^a	11.47 ^d	18.45 ^b	13.05 ^e
β-转角	21.15 ^a	19.02 ^b	14.60 ^c	11.32 ^f	12.80 ^{de}	12.90 ^d

注：每行中标有相同字母的数值表示不存在显著性差异，即P>0.05。

2.2 游离巯基含量测定结果

采用软件分析各样品游离巯基含量的数值间的显著性差异，结果如表2所示。由表可以看出超微粉碎处理和微粒化处理均能显著性降低蛋白样品的游离巯基含量，但是组合技术进一步将游离巯基含量由24.11 μmol/g减少至8.41 μmol/g。这是因为超微粉碎处理破坏大的蛋白颗粒的同时，使得埋藏在内部的游离巯基暴露被氧化形成二硫键，这与Isao Hayakawa

表2 WPC、sWPC-2h、sWPC-6h、MWP、sMWP-2h和sMWP-6h的二硫键测定结果

样品	WPC	MWP	sWPC-2h	sMWP-2h	sWPC-6h	sMWP-6h
SH _P (μmol/g)	24.11±0.58 ^a	13.22±0.43 ^d	19.78±0.50 ^b	12.74±0.91 ^{de}	16.39±0.87 ^c	8.41±0.76 ^f

注：数值以平均值±标准偏差表示(n=3)。每行中标有相同字母的数值表示不存在显著性差异，即P>0.05。

2.3 内源性荧光测定结果

采用软件绘制各样品的内源性荧光光谱如图2所示。蛋白质中的芳香族氨基酸残基的侧链基团具有吸收紫外区域的入射光从而发射荧光的特性。因此可以根据这种特性来研究蛋白质在变性或复性过程中整体

曲和α-螺旋含量相应由9.43%和44.42%显著性(P<0.05)增加到18.45%和45.98%。微粒化处理后，乳清蛋白β-折叠和α-螺旋含量分别显著性(P<0.05)增加到26.59%和48.21%，而无规卷曲和β-转角含量相应显著性(P<0.05)减少至6.18%和19.02%。组合技术处理后，β-折叠和无规卷曲含量进一步显著性(P<0.05)增加到33.04%和13.05%，β-转角和α-螺旋含量相应显著性(P<0.05)减少至12.90%和41.02%。而这种二级结构的改变可能是因为超微粉碎和微粒化处理过程中，蛋白分子间的氢键作用逐渐减小，分子间的相互作用逐渐减弱，其疏水结合及离子结合可能因体积的缩小被切断，导致蛋白质分子展开，非极性基团暴露出来，从而改变了二级结构^[13]。山东农业大学的司慧等人^[6]研究发现超微粉碎能够显著改变大豆蛋白的二级结构，从而提高了大豆蛋白的疏水性。该结论可通过游离巯基含量的测量结果及内源性荧光的测定结果加以证实。

等人^[14]的研究结果一致。而微粒化处理过程中的湿热处理能先让蛋白解聚，蛋白分子充分展开，大量的内埋的游离巯基暴露。这些暴露的游离巯基，在高温下易被氧化形成分子间/分子内二硫键，蛋白分子重新聚合形成新的聚集。高速剪切处理，将大颗粒聚集破坏，形成新的小颗粒的过程中也有部分游离巯基暴露氧化成二硫键。这些新的二硫键的形成造成蛋白三级结构的改变，进而引起二级结构元件含量发生相应改变。

空间构象的变化。由图2可以看出，超微粉碎处理后蛋白的最大吸收波长由333 nm红移至334 nm。这是由于在天然的蛋白质中，可产生荧光的芳香族氨基酸分子多处于蛋白质的内部，被多种非极性氨基酸残基包围，因此其所处的局部小环境的极性弱于蛋白质分子外部水溶液的极性。超微粉碎处理后，芳香族氨基

酸分子的侧链基团逐渐暴露于水溶液中,因此蛋白质荧光发射峰的 λ_{max} 逐渐增大^[16]。微粒化处理后继续红移至356 nm和358 nm,说明了微粒化处理和组合技术处理能够更大程度的改变蛋白的构象。乳清蛋白结构的显著性改变,也会引起其热学性质和加工特性的相应改变。

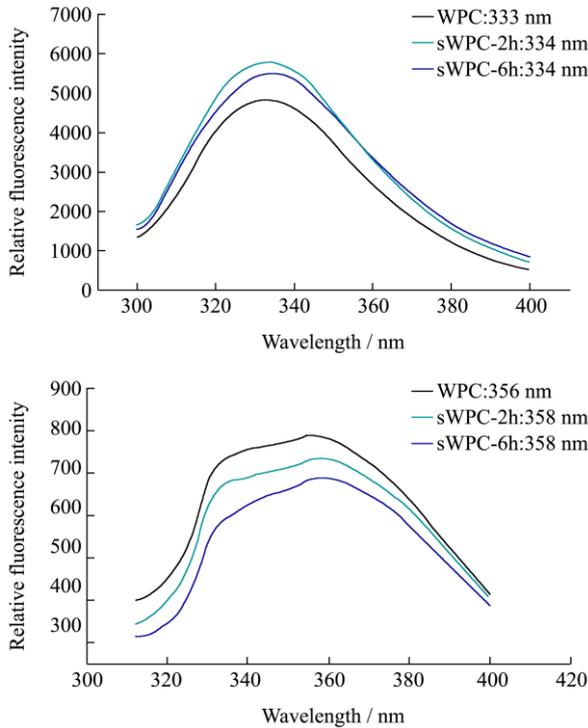


图2 WPC、sWPC-2h、sWPC-6h、MWP、sMWP-2h和sMWP-6h的荧光光谱及最大吸收波长(λ_{max})

Fig.2 Fluorescence emission spectrum and maximum wavelength of WPC, sWPC-2h, sWPC-6h, MWP, sMWP-2h and sMWP-6h

2.4 热学性质的测定结果

差示扫描量热法(DSC)是在维持样品与对照物的温度相同的控制程序下,测量输送给被测物质和参比物质的能量差值与温度之间关系的一种热分析技术方法。各样品的吸热图谱如图3所示,从图中可以看出,各样品的吸收峰均呈现单一的窄峰,说明样品均具有很高的协同性。

在DSC谱图中,变性转变的温度(T_d)及变性焓(ΔH)通过最大峰对应的温度和峰面积确定,汇总各样品的DSC扫描结果如表3所示。从表3可以看出,超微粉碎处理后,蛋白的峰值温度由101.82℃逐渐显著性增大至104.24℃,同时吸热峰变窄,这说明了蛋白热稳定性和协同性的增强。微粒化处理后,蛋白质的峰值温度没有显著性改变,但是吸热峰变窄,说明蛋白的热稳定性没有显著性改变,但是协同性增强。

微粒化处理后各样品的热焓值显著性降低,说明蛋白聚集程度的下降。组合技术处理后,蛋白样品的焓值由133.10 J/g显著性下降到54.63 J/g,说明了聚集程度显著性下降,这与本实验室前期测定的蛋白颗粒显著性减小的测定结果一致。

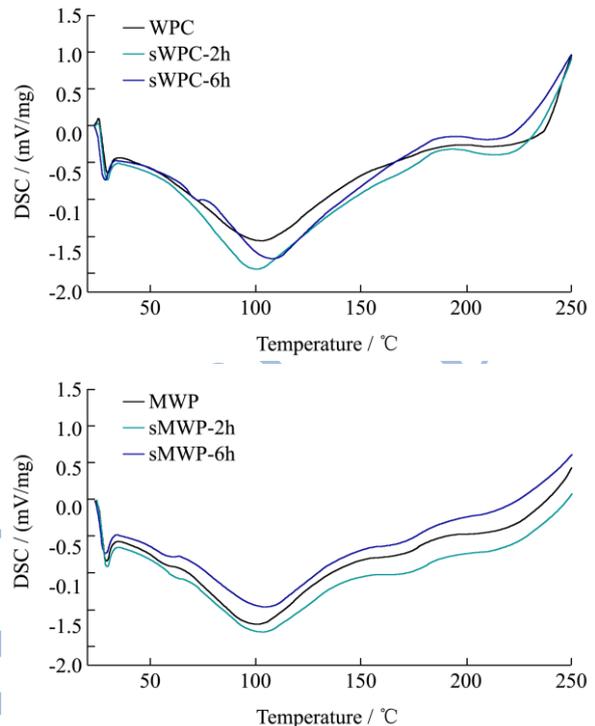


图3 WPC、sWPC-2h、sWPC-6h、MWP、sMWP-2h和sMWP-6h的吸热图谱

Fig.3 The DSC spectrograms of WPC, sWPC-2h, sWPC-6h, MWP, sMWP-2h and sMWP-6h

表3 WPC、sWPC-2h、sWPC-6h、MWP、sMWP-2h和sMWP-6h的DSC测定结果

Table 3 Results of DSC

Samples	Onset/°C	Peak/°C	Endset/°C	Heat enthalpy/(J/g)
WPC	51.18 ^f	101.82 ^e	144.09 ^a	133.10 ^a
MWP	68.47 ^{bc}	100.53 ^f	127.60 ^{ef}	58.76 ^d
sWPC-2h	67.39 ^d	102.62 ^c	130.31 ^d	102.76 ^c
sMWP-2h	70.91 ^a	102.44 ^{cd}	127.67 ^e	49.63 ^f
sWPC-6h	64.27 ^e	104.24 ^{ab}	143.14 ^{ab}	121.27 ^b
sMWP-6h	68.87 ^b	104.68 ^a	131.73 ^c	54.63 ^e

注:每列中标有相同字母的数值表示不存在显著性差异,即 $P > 0.05$ 。

2.4 加工特性的测定结果

根据参考文献的实验方法,测定蛋白样品的几种加工特性,并采用软件进行显著性分析,结果如表4所示。由表4可以看出,微粒化处理后,乳清蛋白的乳化力由126.81 m²/g显著性增大到135.44 m²/g,乳化

稳定性由 18.68 显著性增加到 22.26, 这说明微粒化处理能够显著性提高乳清蛋白的乳化力和乳化稳定性。这可能是由于乳清蛋白是水溶性蛋白, 表面疏水性较低, 微粒化处理增大了其表面疏水性, 使得蛋白质维持水油界面的能力增强。经组合技术处理后, 蛋白的乳化力显著性增加到 $162.76 \text{ m}^2/\text{g}$, 乳化稳定性增加到 26.07, 这说明组合技术能够更好的提高样品的乳化性和乳化稳定性, 这是由于蛋白构象的相应改变引起的。

表 4 WPC、sWPC-2h、sWPC-6h、MWP、sMWP-2h 和 sMWP-6h 的加工特性的测定结果

样品	WPC	MWP	sWPC-2h	sMWP-2h	sWPC-6h	sMWP-6h
乳化力/(m^2/g)	126.81 ± 1.71^c	135.44 ± 2.62^b	115.46 ± 4.15^f	125.49 ± 6.34^{cd}	123.44 ± 0.84^{de}	162.76 ± 2.49^a
乳化稳定性	18.68 ± 0.08^d	22.26 ± 0.54^{bc}	17.80 ± 0.07^{de}	22.85 ± 1.57^b	17.32 ± 0.06^{def}	26.07 ± 0.12^a
起泡性/%	26.67 ± 2.31^f	29.33 ± 1.15^e	34.00 ± 2.00^{cd}	39.33 ± 3.06^{ab}	36.00 ± 4.00^{bc}	41.33 ± 1.15^a
泡沫稳定性/%	69.84 ± 2.75^{bcd}	65.56 ± 5.09^{de}	70.40 ± 7.16^{abc}	63.18 ± 5.59^{ef}	74.26 ± 3.94^a	72.22 ± 4.81^{ab}
持水能力/(g/g)	2.48 ± 0.28^f	7.59 ± 1.09^{ab}	3.47 ± 0.29^{de}	7.05 ± 0.21^{abc}	3.82 ± 0.73^d	7.85 ± 0.56^a
吸油性/(g/g)	2.39 ± 0.02^{cdef}	5.72 ± 0.08^{ab}	2.58 ± 0.30^{cde}	3.88 ± 0.60^c	3.65 ± 0.61^{cd}	6.75 ± 0.98^a

注: 数值以平均值 \pm 标准偏差表示 ($n=3$)。每行中标有相同字母的数值表示不存在显著性差异, 即 $P>0.05$ 。

由表 4 可以看出, 微粒化处理后乳清蛋白的起泡性由 26.67% 显著性提高到 29.33%, 而经由组合技术处理后, 继续提高到 41.33%。食品的泡沫一般是指气泡在连续的液相或者含可溶性表面活性剂的半固相中形成的分散体系。许多加工食品是泡沫类型的产品。例如冰激凌、搅打奶油、面包、蛋糕等。这些产品独特的口感和质构源自于其中分散的微细气泡。因此良好的起泡性和泡沫稳定性, 能够提高乳清蛋白在这类食品中应用的宽度和深度。另外, 数据显示超微粉碎处理和微粒化处理后对蛋白的泡沫稳定性并没有显著性影响。说明超微粉碎-微粒化组合技术生产的微粒化蛋白适宜作为脂肪模拟物应用在如冰淇淋、搅打奶油和蛋糕等高脂食品中。

蛋白质的持水能力表示蛋白质的水化能力, 即蛋白质分子通过直接吸附及松散结合而在其分子周围形成水化层的能力。一般认为, 持水性能是蛋白质溶胀、黏度增加、形成凝胶等一系列物理化学反应的综合效应。由表 4 可以看出, 微粒化处理后, 乳清蛋白的持水能力由 2.48 g/g 显著性提高到 7.59 g/g 。这可能是因为超微粉碎和微粒化过程中, 表面疏水基团的增加导致部分亲水基团内埋, 因此能够将大量水分子稳定的包裹在这部分亲水基团间的空隙中。经超微粉碎-微粒化组合技术处理后, 持水能力并没有呈现进一步的显著增强 (7.85 g/g)。这可能是因为乳清蛋白已经达到持水能力的极大值。持水能力的显著性增强, 能显著性提高乳清蛋白在高脂食品中的应用率。

蛋白质的吸油性是指蛋白质在一定条件下承受

食品的乳化稳定性严重影响食品的感官性状和货架期。乳清蛋白作为脂肪模拟物应用在高脂食品中, 较弱的乳化性能会造成食品的析油和沉淀, 进而影响其应用。超微粉碎处理和微粒化处理, 使得乳清蛋白乳化性能显著性提高, 因此可以增大对油脂的取代率, 而不影响食品的感官和稳定性。说明超微粉碎-微粒化组合技术适宜在乳清蛋白基质脂肪模拟物中推广应用。

热加工后保持油脂的能力, 是蛋白质的功能特性之一。由表 4 可以看出, 微粒化处理后乳清蛋白的吸油性由 2.39 g/g 显著性提高到 5.72 g/g , 经组合技术处理后, 有所增加 (6.75 g/g), 但是增加不显著。这可能是因为微粒化过程中乳清蛋白的表面疏水基团显著性增加, 使得蛋白与油结合力增强, 而组合技术的处理并没有能进一步显著性增加表面疏水基团。乳清蛋白常常作为脂肪模拟物用在肉馅、香肠、焙烤食品等产品中, 乳清蛋白良好的吸油性和持水能力对改善食品的口感, 包括硬度、黏度等物性指标有重要意义, 有利于完善组织化产品的感官品质和功能品质。

以上研究结果与 Isao Hayakawa 等人^[14]及 Moakes RJA^[15]的研究结果一致, 说明超微粉碎处理和微粒化处理使蛋白颗粒减小和形状发生改变, 这在一定程度上提高了蛋白的加工特性, 从而提高了蛋白在食品工业中的应用价值。

3 结论

超微粉碎-微粒化组合技术处理后乳清蛋白的 β -折叠和无规卷曲含量增加, 相应地 β -转角和 α -螺旋含量减少。同时组合技术的处理显著性降低了乳清蛋白游离巯基的含量, 增大了乳清蛋白的表面疏水性, 吸热焓值的减小。都说明超微粉碎、微粒化及其组合技术均能在破坏乳清蛋白的本来大颗粒聚集的基础上形成新的小颗粒聚集。这一系列构象的改变, 直接造成热稳定性、乳化性、起泡性、泡沫稳定性、持水能力和吸油性均不同程度的增强。这也说明了超微粉碎-

微粒化组合技术适宜在乳清蛋白基质脂肪模拟物中推广应用。

参考文献

- [1] Tunick M H. Whey protein production and utilization: a brief history [J]. *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*, 2008: 1-13
- [2] Singer N S, Dunn J M. Protein microparticulation: the principle and the process [J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 1990, 9(4): 388-397.
- [3] Lucca P A, Tepper B J. Fat replacers and the functionality of fat in foods [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1994, 5(1): 12-19
- [4] 李玉美.以乳清蛋白为基质的脂肪替代品的研究[D].江南大学,2006
LI Yu-mei. The research on the whey protein-based fat replacer [D]. *Jiangnan University*, 2006
- [5] 丁杰.改性乳清蛋白制备脂肪替代品的研究[D].天津科技大学,2011
DING Jie. Preparation of fat replacers through modifying whey protein [D]. *Tianjin University of Science & Technology*, 2011
- [6] 司玉慧.超微粉碎对大豆分离蛋白功能作用的影响[D].山东农业大学,2012
SI Yu-hui. Effect of ultrafine comminution on function of soybean protein isolate [D]. *Shandong University of Agriculture*, 2012
- [7] Haris P I. Probing protein-protein interaction in biomembranes using Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2013, 1828(10): 2265-2271
- [8] 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
- [9] Gu C F, Lan X F, Yu Y S, et al. Fluorescence spectrum of milk solution [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2012, 41(1): 107-111
- [10] Wang X B, Zhang Y H, Jiang L Z. Improvement of emulsifying properties of soybean protein isolate through glycosylation modification [J]. *Advanced Materials Research*, 2013, 781: 1495-1499
- [11] 周俊,潘丽军,韩智宏.高纯菜籽蛋白的制备及其相关性质研究[J].食品工业科技,2012,33(5):189-193
ZHOU Jun, PAN Li-jun, HAN Zhi-hong. Study on preparation of high-purity rapeseed protein and its properties [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(5): 189-193
- [12] Wu H W, Wang Q, Ma T Z, et al. Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein [J]. *Food Research International*, 2009, 42 (3): 343-348
- [13] Rahmeh R, Damian M, Cottet M, et al. Structural insights into biased G protein-coupled receptor signaling revealed by fluorescence spectroscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(17): 6733-6738
- [14] Chan F T S, Schierle G S K, Kumita J R, et al. Protein amyloids develop an intrinsic fluorescence signature during aggregation [J]. *Analyst*, 2013, 138(7): 2156-2162
- [15] Hayakawa I, Yamada Y, Fujio Y. Microparticulation by jet mill grinding of protein powders and effects on hydrophobicity [J]. *Journal of Food Science*, 1993, 58(5): 1026-1029
- [16] Moakes R J A, Sullo A, Norton I T. Preparation and characterisation of whey protein fluid gels: The effects of shear and thermal history [J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 45: 227-235