

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.10.043

CaCl₂对纤维核诱导乳清浓缩蛋白聚合能力的影响

徐红华 谢明明 丁瑞 马金玉 高子雯 关琛

(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 研究了 CaCl₂ 对两种核诱导乳清浓缩蛋白(WPC)在聚合方面的影响。通过向 WPC 自发、均相核诱导 WPC、二次核诱导 WPC 形成纤维过程中添加 CaCl₂, 可提高纤维体系的硬度、黏度以及聚合率, 并且对核诱导形成的纤维聚合物影响较大。添加 CaCl₂ 后, 核诱导的硬度增加量是 WPC 自发硬度增加量的 1.661 倍(均相核诱导)和 1.821 倍(二次核诱导), 黏度增加量的对应值为 2.261 倍(均相核诱导)与 2.479 倍(二次核诱导)。添加 CaCl₂ 使纤维的形态发生变化, 成弯曲聚集体。对于纤维形成的两种路径自发与核诱导, CaCl₂ 的影响程度不同, 与乳清浓缩蛋白自发纤维聚合能力相比, CaCl₂ 对核诱导乳清浓缩蛋白聚合能力的提升幅度更大。

关键词: 乳清浓缩蛋白; 纤维; CaCl₂; 均相核; 二次核; 聚合

中图分类号: TS201.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2018)10-0375-06

Effect of CaCl₂ on Aggregates of Whey Protein Concentrate with Adding Fibril Nuclei

XU Honghua XIE Mingming DING Rui MA Jinyu GAO Ziwen GUAN Chen

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Whey protein concentrate (WPC) fibril was made at pH value of 2.0 and 90°C. The investigation focused on the impact of adding CaCl₂ on the aggregation of WPC spontaneous, homogeneous nuclei induced WPC and secondary nuclei induced WPC. As adding CaCl₂, the properties of the hardness, viscosity and amount of WPC fibril aggregates with formation spontaneous or induced homogeneous/secondary nuclei were all increased, especially for two nuclei induced whey concentrate proteins. Adding CaCl₂, the hardness was increased by 1.661 (homogeneous nuclei induced WPC) and 1.821 (secondary nuclei induced WPC) times than that of whey protein concentrate spontaneous, and the viscosity was increased by 2.261 (homogeneous nuclei induced WPC) and 2.479 (secondary nuclei induced WPC) times. The micro morphology using TEM of WPC aggregates was changed from long and semi-flexible fibrils into curly and cluster polymers when mixed CaCl₂. And the fluorescence intensity was all decreased by adding CaCl₂. It was speculated that because the Th T dye was unable to fully bind with the assembled fibrils. For the two ways of forming fibrils: spontaneous or nuclei induced WPC, there were different results that the aggregation ability of nuclei-induced WPC was even greater than that of spontaneous WPC fibril formation as adding CaCl₂.

Key words: whey protein concentrate; fibrils; CaCl₂; homogeneous nuclei; secondary nuclei; aggregation

0 引言

乳清浓缩蛋白(WPC)在特殊条件下可以自组装形成纤维状聚合物^[1-3]。由于乳蛋白纳米纤维具有特殊的功能性质(如凝胶性^[4]、增稠特性^[5]、稳定

的乳化性^[6-7]与泡沫稳定性^[8]),近年来在食品行业中应用广泛。这种纤维状聚合物的形成过程可分为滞后期、生长期和稳定期^[9]。纤维形成机理主要为二次成核理论,即初级成核与二次成核。初级成核是在滞后期蛋白质单体发生聚合形成稳定的均相

收稿日期: 2018-07-05 修回日期: 2018-08-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471682)

作者简介: 徐红华(1969—),女,教授,博士生导师,主要从事食品科学研究, E-mail: xhh3161@126.com

核结构,均相核具有在纤维形成过程中最高的自由能;二次成核是指单体在均相核的表面有序排列,从而形成成熟纤维的过程^[10-14]。研究发现在乳清分离蛋白形成纤维过程中加入二次核(成熟纤维),滞后后期时间缩短,加速纤维的形成^[15],均相核诱导蛋白形成纤维的研究报道较少。 Ca^{2+} 会影响蛋白质纤维自发形成的聚合结构,LOVEDAY等^[16-17]研究发现 β -乳球蛋白在形成纤维过程中添加一定的 CaCl_2 ,会促进纤维的形成,缩短滞后时间,但纤维的形态发生了变化,由长、细、半柔性变为短小、弯曲。但是,目前的研究主要集中在 CaCl_2 对WPC自发形成纤维的影响方面,鲜有核诱导方面的报道。本文通过比较添加 CaCl_2 与未添加 CaCl_2 对WPC自发形成的纤维以及均相核/二次核诱导WPC在聚合过程中硬度、黏度以及聚合率的差异,探讨 CaCl_2 对核诱导WPC聚合能力的影响,以期改善乳清浓缩蛋白的应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要材料

乳清浓缩蛋白WPC-80,美国HILMAR公司; CaCl_2 ,纯度99.99%,阿拉丁公司;硫黄素T, Sigma公司;其他化学试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器

CP153型电子精密天平,奥豪斯仪器有限公司;DELTA320型pH计,梅特勒-托利多仪器有限公司;3-18K型离心机, Sigma公司;KDN-102C型半自动定氮仪,上海纤检仪器有限公司;HHW型数显恒温水浴锅,常州丹瑞实验仪器有限公司;旋转流变仪,英国马尔文公司;TA-XT2 PLUS型物性测定仪,英国STABLE MICRO SYSTEM公司;JEM-1200EX型透射电子显微镜,日本日立公司;F-4500型荧光分光光度计,日本日立公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的制备

乳清浓缩蛋白自发形成纤维加钙(WPC自发+钙):参照LOVEDAY等^[18]的方法略有改动,将5.00 g WPC溶于去离子水中,用6 mol/L HCl调pH值为2.0,定容至100 mL。19 000 g、4℃下离心20 min,取中层清液,利用凯氏定氮法测定蛋白质含量,用pH值2.0的去离子水(6 mol/L HCl调去离子水至pH值2.0)稀释至3.0%。添加0.75 mol/L的 CaCl_2 溶液,蛋白质量分数为2.8%, CaCl_2 终浓度为50 mmol/L。90℃水浴加热,并于4℃冰箱保存。

乳清浓缩蛋白自发形成纤维(WPC自发):上述

3.0%蛋白溶液,添加与 CaCl_2 相同体积的pH值2.0去离子水,蛋白质量分数为2.8%。90℃水浴加热,并于4℃冰箱保存。

均相核诱导乳清浓缩蛋白形成纤维加钙(均相核诱导WPC+钙):3.0%的WPC,90℃下加热2 h形成均相核^[19-20]。均相核与3.0% WPC溶液以质量比1:3混匀,蛋白质量分数为3.0%(pH值2.0)。添加0.75 mol/L的 CaCl_2 溶液,蛋白质量分数为2.8%, CaCl_2 终浓度为50 mmol/L。90℃水浴加热,并于4℃冰箱保存。

均相核诱导乳清浓缩蛋白形成纤维(均相核诱导WPC):3.0%的均相核WPC混合液,添加与 CaCl_2 相同体积的pH值2.0去离子水,蛋白质量分数为2.8%。90℃水浴加热,并于4℃冰箱保存。

二次核诱导乳清浓缩蛋白形成纤维加钙(二次核诱导WPC+钙):3.0%的WPC,90℃下加热10 h形成成熟纤维即二次核。二次核与3.0% WPC溶液以质量比1:3混匀,蛋白质量分数为3.0%(pH值2.0)。添加0.75 mol/L的 CaCl_2 溶液,蛋白质量分数为2.8%, CaCl_2 终浓度为50 mmol/L。90℃水浴加热,并于4℃冰箱保存。

二次核诱导乳清浓缩蛋白形成纤维(二次核诱导WPC):3.0%的二次核WPC混合液,添加与 CaCl_2 相同体积的pH值2.0去离子水,蛋白质量分数为2.8%。90℃水浴加热,并于4℃冰箱保存。

1.2.2 质构特性

将pH值2.0的3.0% WPC、均相核、二次核与11.0% pH值2.0的WPC溶液以体积比1:1混匀,使其蛋白质量分数为7.0%。混合溶液加入0.75 mol/L CaCl_2 ,蛋白质量分数为6.53%, CaCl_2 终浓度为50 mmol/L,于烧杯中90℃水浴加热5 h。对照样为蛋白质量分数7.0%的混合液,加入与 CaCl_2 相同体积的pH值2.0去离子水,蛋白质量分数为6.53%。放置4℃冰箱12 h,次日取出恢复至室温(20℃)。采用质构剖面分析方法(Texture profile analyse, TPA)测定样品的硬度、胶粘性指数、弹性指数以及咀嚼性指数,参数设定为:测试前速度1 mm/s,测试速度1.7 mm/s,测试后速度2 mm/s,下压距离10 mm,引发力5 N,探头型号A-BE-D35^[21]。

加钙样品较对照样硬度增加量为

$$N = N_{\text{Ca}} - N_0 \quad (1)$$

式中 N ——硬度增加量,g

N_{Ca} ——加钙样品硬度,g

N_0 ——对照样硬度,g

加钙样品较对照样胶粘性指数增加量为

$$A = A_{\text{Ca}} - A_0 \quad (2)$$

式中 A ——胶粘性指数增加量

A_{Ca} ——加钙样品胶粘性指数

A_0 ——对照样胶粘性指数

1.2.3 表观黏度

1.2.1 节中的样品于 90℃ 水浴加热 0、1、2、3、4、5、7、10 h, 使用旋转流变仪测定样品的黏度。选择直径 60 mm 的平行板, 板间距 150 nm, 剪切速率变化范围为 0.01 ~ 100 s⁻¹, 用一次性胶头滴管吸取 2 mL 溶液, 使样品均匀分布于底部平板上^[22], 在剪切速率为 10 s⁻¹ 时取值。

加钙样品较对照样黏度的增加量为

$$B = B_{Ca} - B_0 \quad (3)$$

式中 B ——加热 10 h 的黏度增加量, Pa·s

B_{Ca} ——加钙样品在加热 10 h 的黏度, Pa·s

B_0 ——对照样在加热 10 h 的黏度, Pa·s

1.2.4 蛋白聚合率

1.2.1 节中的样品于 90℃ 水浴加热 0、2、5 h, 取 20 mL 样液于 50 mL 离心管中, 15 000 g、4℃ 离心 30 min, 取上层清液, 利用凯氏定氮法测定蛋白含量, 计算公式为

$$C = 1 - C_t / C_{WPC0h} \quad (4)$$

式中 C ——蛋白聚合率

C_{WPC0h} ——WPC 自发加热 0 h 的蛋白质量浓度, mg/mL

C_t ——样品加热 t 时的蛋白质量浓度, mg/mL

1.2.5 Th T 荧光分析

1.2.1 节中的样品于 90℃ 水浴加热, 每隔 1 h 取样 (0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 h)。用含有 0.2 mol/L 的 NaCl、0.01 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 值 7.0) 配制 800 mg/L 的甲硫磺素 T (Th T) 的溶液。用水系 0.22 μm 滤膜过滤, 滤液即为 Th T 储备液。放置于棕色瓶中并于 4℃ 冰箱避光保存。测定时将

Th T 储备液用含有 0.2 mol/L 的 NaCl、0.01 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 值 7.0) 稀释 50 倍, 得到 Th T 工作液; 取 800 μL 样品加入 10 mL 的 Th T 工作液中, 旋涡震荡 1 min 后, 于荧光分光光度计下比色。设定参数为: 激发波长 460 nm, 发射波长 490 nm, 狭缝宽度 5 nm 和 10 nm, 测定不同加热时间下样品的荧光强度^[23]。

1.2.6 透射电镜

1.2.1 节中的样品于 90℃ 下加热 5 h, 在 4℃ 冰箱中保存 12 h, 取出后放至室温。用超纯水将样品稀释至 1 mg/mL, 取稀释液滴于透射电镜专用铜网上吸附 20 min, 用滤纸吸除多余液体, 在室温下干燥 10 min, 在 80 kV 电压下观察样品的微观结构^[24]。

1.2.7 数据处理分析

试验数据采用 SigmaPlot 10 进行制图和 IBM SPSS Statistics v 20.0 软件对试验数据进行 ANOVA 方差分析, 检验差异显著性 ($P < 0.05$)。数据均以平均值 ± 标准差表示 ($n = 3$)。

2 结果与讨论

2.1 凝胶质构特性

结果如表 1 所示, 未加钙样品其硬度与胶粘性均为核诱导 WPC 高于其自发聚合, 并且二次核诱导略高于均相核诱导。CaCl₂ 的加入可以明显改善 WPC 样品的凝胶质构, 但核诱导的提高幅度更大, 从 CaCl₂ 添加前后 WPC 凝胶硬度的提升差值可以看出 (图 1), 核诱导 WPC 分别是其自发聚合的 1.661 倍 (均相核诱导) 和 1.821 倍 (二次核诱导); 胶粘性提升量分别是其自发聚合的 2.544 倍 (均相核诱导) 和 2.129 倍 (二次核诱导)。上述结果可以发现, 相对 WPC 自发聚合, CaCl₂ 的加入对核诱导 WPC 聚合的影响更大。

表 1 凝胶质构特性

Tab. 1 Textural properties of different samples

参数	WPC 自发	WPC 自发 + 钙	均相核诱导 WPC	均相核诱导 WPC + 钙	二次核诱导 WPC	二次核诱导 WPC + 钙
硬度/g	(63.537 ± 4.604) ^a	(136.341 ± 4.117) ^c	(81.867 ± 3.175) ^b	(202.824 ± 5.662) ^d	(130.468 ± 6.427) ^c	(263.048 ± 3.606) ^e
胶粘性指数	(23.763 ± 2.448) ^a	(37.303 ± 3.050) ^c	(29.997 ± 1.504) ^b	(64.443 ± 4.181) ^d	(38.164 ± 4.181) ^c	(66.999 ± 3.760) ^d
弹性指数	(0.751 ± 0.017) ^b	(0.712 ± 0.060) ^{ab}	(0.821 ± 0.084) ^{bc}	(0.937 ± 0.048) ^c	(0.741 ± 0.093) ^b	(0.596 ± 0.093) ^a
咀嚼性指数	(17.846 ± 1.961) ^a	(26.469 ± 1.250) ^b	(25.666 ± 4.381) ^b	(61.313 ± 3.882) ^d	(26.541 ± 1.471) ^b	(34.751 ± 4.276) ^c

注: 同行不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

2.2 表观黏度

纤维形成过程中 Ca²⁺ 的影响也存在很大差异, Ca²⁺ 在自发与核诱导 2 种不同形成方式中的作用也有很大不同。在形成过程中, 黏度均呈上升趋势。核诱导 WPC 形成的纤维聚合物其黏度高于 WPC 自发聚合, 同时, 添加 CaCl₂ 的样品其黏度较对应的未添加

CaCl₂ 样品均有升高, 在前 2 h 的滞后期差异不大, 随着热聚合的持续, Ca²⁺ 的影响程度增大 (图 2a); 在形成方式中, Ca²⁺ 在自发与核诱导中的作用有很大不同, 添加 CaCl₂ 后对核诱导聚合的改善幅度更大, 均相核诱导 WPC 与二次核诱导 WPC 其黏度增加量分别是 WPC 自发黏度增加量的 2.261 与 2.479 倍 (图 2b)。

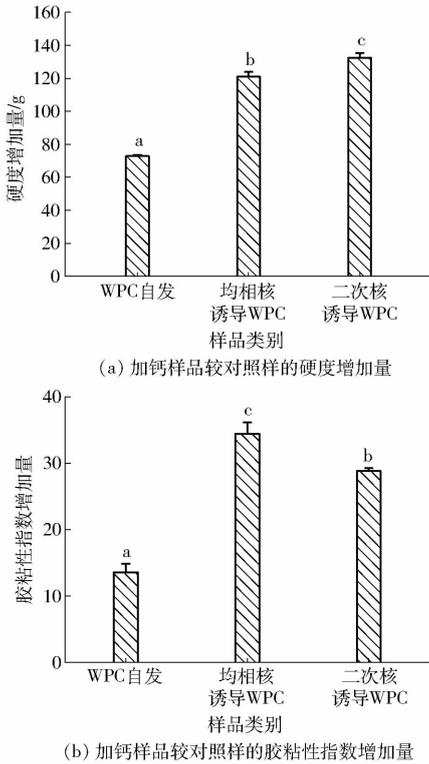


图1 WPC自发、均相核诱导WPC、二次核诱导WPC添加CaCl₂后纤维凝胶硬度与胶粘性变化

Fig.1 Changes of hardness and gumminess by adding CaCl₂ to WPC spontaneous, homogeneous nucleation induced WPC and secondary nucleation induced WPC

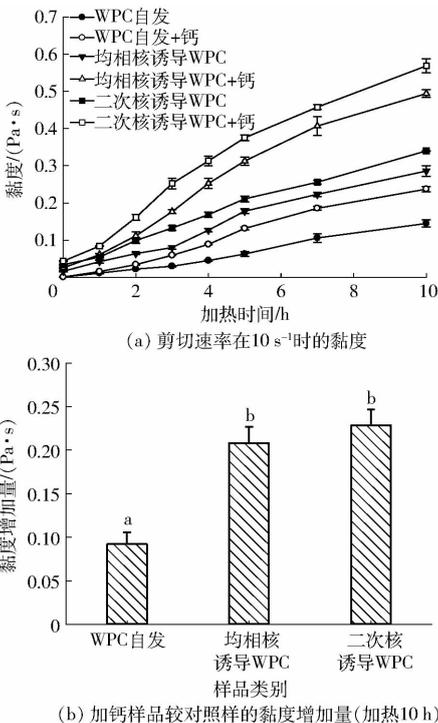


图2 WPC自发、均相核诱导WPC、二次核诱导WPC添加CaCl₂后形成纤维的黏度变化

Fig.2 Changes of viscosity by adding CaCl₂ to WPC spontaneous, homogeneous nucleation induced WPC and secondary nucleation induced WPC

表明CaCl₂的加入对核诱导WPC热聚合的提高幅度更大。

2.3 蛋白聚合率

通过聚合率可从侧面研究蛋白质的聚合能力。由图3可知,随着加热时间延长,不同样品的聚合率均有上升,这表明延长热处理时间会促进蛋白质之间聚合成大分子聚合物。且核诱导WPC形成的蛋白聚合率高于WPC自发聚合。样品添加CaCl₂后其聚合率明显提高,但是,在纤维形成的不同时期Ca²⁺的影响程度不同,未经过热处理(0 h)Ca²⁺的混入就可以提高聚合程度;随着热处理的进行,在纤维形成滞后期(2 h)Ca²⁺的混入可以较大幅度提高其聚合程度;生长期(5 h)Ca²⁺的影响程度降低,聚合率差值减小。

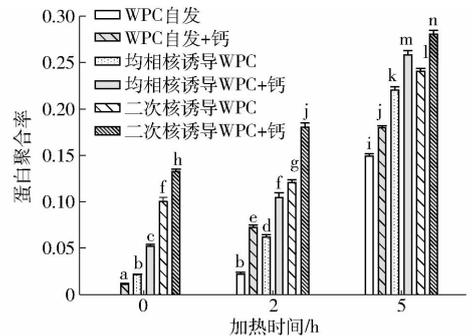


图3 WPC自发、均相核诱导WPC、二次核诱导WPC添加CaCl₂后形成的纤维在热处理过程中聚合率的变化

Fig.3 Changes of polymerization by adding CaCl₂ to WPC spontaneous, homogeneous nucleation induced WPC and secondary nucleation induced WPC

2.4 透射电镜

通过透射电镜观察添加CaCl₂对纤维微观形态的影响。CaCl₂的加入明显改变纤维的形态,由细长半柔性的纤维(图4a、4b、4c)变为短小弯曲团簇聚集状(图4d、4e、4f),表明添加50 mmol/L CaCl₂对WPC的聚合有促进作用。核诱导形成的纤维数量较WPC自发形成的纤维多。对于自发与核诱导两种纤维形成方式,加钙WPC自发是独立的纤维团簇聚集而核诱导则是纤维团簇聚集之间相连, CaCl₂对核诱导形成的纤维聚合影响更大。

2.5 Th T 荧光分析

Th T是一种荧光染料,可以与纤维的β-折叠结合,间接反映纤维的产量^[8]。均相核与二次核诱导WPC形成的纤维其荧光强度较WPC自发聚合高(图5),表明核诱导较WPC自发形成纤维数量多。混入Ca²⁺后在纤维形成的不同时期存在不同程度的影响。在滞后期(0~2 h)添加CaCl₂的

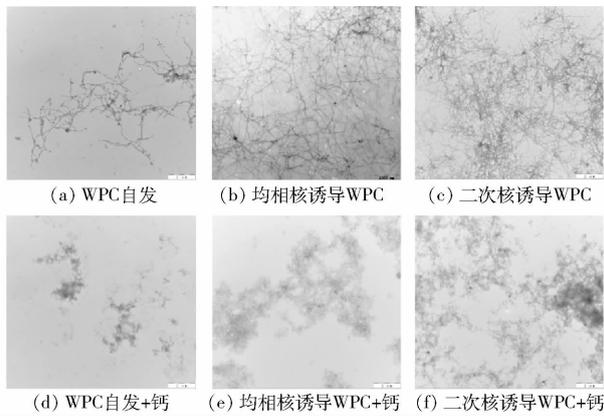


图 4 WPC 自发、均相核、二次核诱导 WPC 添加 CaCl_2 后加热 5 h 形成的纤维透射电镜图

Fig. 4 Transmission electron micrographs of different samples heated for 5 h at 90°C and pH value of 2.0

WPC 自发与均相核诱导较对照样荧光强度高,表明 CaCl_2 在其滞后期促进纤维的形成,但在生长期与稳定期荧光强度较对照样低。二次核诱导 WPC 在加热 0 ~ 1 h, 添加 CaCl_2 的样品与对照样其荧光强度相近,从 2 h 开始,添加 CaCl_2 的二次核诱导 WPC 其荧光强度较对照样低。由此可推测, CaCl_2 并没有影响纤维核结构的形成,但会促进随后的聚合。纤维聚合在一起, Th T 无法充分地 与聚合纤维结合^[25], 从而影响了荧光强度的结果。

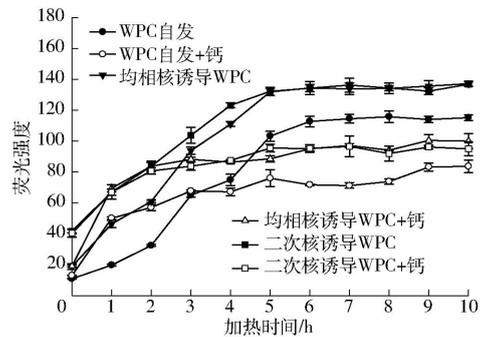


图 5 WPC 自发、均相核诱导 WPC、二次核诱导 WPC 添加 CaCl_2 后热处理过程中 Th T 荧光强度的变化

Fig. 5 Changes of Th T fluorescence intensity by adding CaCl_2 to WPC spontaneous, homogeneous nucleation induced WPC and secondary nucleation induced WPC

3 结论

- (1) CaCl_2 会提高纤维体系的黏度、硬度与聚合率, 并且 CaCl_2 对核诱导形成的纤维影响更大。
- (2) CaCl_2 的加入对纤维的形态有影响, 使纤维由细长直链变为弯曲聚集的状态, 促进纤维之间的聚合, 并且对核诱导的纤维影响更大。
- (3) 在加热初期, 添加 CaCl_2 对 WPC 自发与均相核诱导 WPC 形成纤维有促进作用。在加热后期, 加钙样品的荧光强度较未加钙样品低。

参 考 文 献

- 1 DURAND D, GIMEL J C, NICOLAI T. Aggregation, gelation and phase separation of heat denatured globular proteins [J]. *Physica a Statistical Mechanics & Its Applications*, 2002, 304(1):253 - 265.
- 2 GAO Y Z, XU H H, JU T T, et al. The effect of limited proteolysis by different proteases on the formation of whey protein fibrils [J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(12):7383 - 7392.
- 3 LOVEDAY S M, ANEMA S G, SINGH H. β -lactoglobulin nanofibrils: the long and the short of it [J]. *International Dairy Journal*, 2016, 67:35 - 45.
- 4 KHARLAMOVA A, NICOLAI T, CHASSENIEUX C. Calcium-induced gelation of whey protein aggregates: kinetics, structure and rheological properties [J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 79:145 - 157.
- 5 SUTARIYA S G, HUPPERTZ T, PATEL H A. Influence of milk pre-heating conditions on casein-whey protein interactions and skim milk concentrate viscosity [J]. *International Dairy Journal*, 2017, 69:19 - 22.
- 6 GUZEY D, MCCLEMENTS D J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry [J]. *Advances in Colloid & Interface Science*, 2006, 128 - 130:227 - 248.
- 7 MANTOVANI R A, FURTADO G D F, NETTO F M, et al. Assessing the potential of whey protein fibril as emulsifier [J]. *Journal of Food Engineering*, 2018, 223:99 - 108.
- 8 OBOROCEANU D, WANG L, MAGNER E, et al. Fibrillization of whey proteins improves foaming capacity and foam stability at low protein concentrations [J]. *Journal of Food Engineering*, 2014, 121(1):102 - 111.
- 9 THOMAS C T M, TUOMAS P J K. Kinetic theory of protein filament growth: self-consistent methods and perturbative techniques [J]. *International Journal of Modern Physics B*, 2015, 29(2): 1530002.
- 10 FERRONE F A, HOFRICHTER J, EATON W A. Kinetics of sickle hemoglobin polymerization II. A double nucleation mechanism [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1985, 183(4):611 - 631.
- 11 DOUGLAS A S. Protein aggregation [M]. New York: Nova Science Publishers, 2011:112 - 114.
- 12 HARPER J D, JR P T L. Models of amyloid seeding in alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1997, 66:385 - 407.
- 13 AROSIO P, KNOWLES T P, LINSE S. On the lag phase in amyloid fibril formation [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*,

- 2015, 17(12):7606 – 7618.
- 14 KUMAR E K, HAQUE N, PRABHU N P. Kinetics of protein fibril formation: methods and mechanisms [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 100:3 – 10.
- 15 LOVEDAY S M, SU J, RAO M A, et al. Whey protein nanofibrils: the environment-morphology-functionality relationship in lyophilization, rehydration, and seeding [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2012, 60(20):5229 – 5236.
- 16 LOVEDAY S M, CREAMER L K, SINGH H, et al. Tuning the properties of β -lactoglobulin nanofibrils with pH, NaCl and CaCl₂ [J]. *International Dairy Journal*, 2010, 20(9):571 – 579.
- 17 LOVEDAY S M, SU J, RAO M A, et al. Effect of calcium on the morphology and functionality of whey protein nanofibrils [J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(10):3780 – 3788.
- 18 LOVEDAY S M, WANG X L, RAO M A, et al. β -lactoglobulin nanofibrils: effect of temperature on fibril formation kinetics, fibril morphology and the rheological properties of fibril dispersions [J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 27(1):242 – 249.
- 19 BOLDER S G, HENDRICKX H, SAGIS L M. Fibril assembly in whey protein mixtures [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(12):4229 – 4234.
- 20 OBOROCEANU D. Characterization of β -lactoglobulin fibrillar assemblies using atomic force microscopy, polyacrylamide gel electrophoresis, and in situ fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(6):3667 – 3673.
- 21 SANLI 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.
- 22 XIN G, LYDIAJ C, STEPHENR E. Influence of sugars on the characteristics of glucono- δ -lactone-induced soy protein isolate gels [J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(2):314 – 326.
- 23 AKKERMANS C, VENEMA P, AJ V D G, et al. Peptides are building blocks of heat-induced fibrillar protein aggregates of beta-lactoglobulin formed at pH 2 [J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9(5):1474 – 1479.
- 24 KREBS M R, DEVLIN G L, DONALD A M. Amyloid fibril-like structure underlies the aggregate structure across the pH range for beta-lactoglobulin [J]. *Biophysical Journal*, 2009, 96(12):5013 – 5019.
- 25 NILSSON M R. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro [J]. *Methods*, 2004, 34(1):151 – 160.
-

(上接第 374 页)

- 16 BROCKS L, KLONT R E, BUIST W, et al. The effects of selection of pigs on growth rate vs. leanness on histochemical characteristics of different muscles [J]. *Journal of Animal Science*, 2000, 78(5):1247.
- 17 HAMILTON D N, MILLER K D, ELLIS M, et al. Relationships between longissimus glycolytic potential and swine growth performance, carcass traits, and pork quality [J]. *Journal of Animal Science*, 2003, 81(9):2206.
- 18 LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C (T))} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402 – 408.
- 19 MONIN G, SELLIER P. Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post-mortem period: the case of the Hampshire breed [J]. *Meat Science*, 1985, 13(1):49 – 63.
- 20 王兵. 力竭运动对大鼠心肌 AMPK 活性的影响 [J]. *西安工业大学学报*, 2013, 33(1):68 – 71.
WANG Bing. Effect of exhausted exercise on AMPK expression in rat's myocardium [J]. *Journal of Xi'an Technological University*, 2013, 33(1):68 – 71. (in Chinese)
- 21 李爽, 李燕舞, 王蕾, 等. 长期运动训练对机体血清中 AMPK 水平的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(24):4698 – 4700.
LI Shuang, LI Yanwu, WANG Lei, et al. The effects of long-term exercise training on the AMPK level in the serum [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 12(24):4698 – 4700. (in Chinese)
- 22 CORTON J M, GILLESPIE J G, HARDIE D G. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response [J]. *Current Biology*, 1994, 4(4):315 – 324.
- 23 MIHAYLOVA M M, SHAW R J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism [J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(9):1016 – 1023.
- 24 GUO Q H. Control of postmortem energy metabolism [D]. West Lafayette: Purdue University, 2006.