

增强马氏珠母贝肌肉水溶性蛋白质热稳定胶体筛选研究

郑惠娜^{1,2,3}, 张凯^{1,2,3}, 周春霞^{1,2,3}, 曹文红^{1,2,3}, 高加龙^{1,2,3}, 郑周彬^{1,2,3},
魏薇^{1,2,3}, 秦小明^{1,2,3}, 章超桦^{1,2,3}

(1.广州海洋大学 食品科技学院,广东 湛江 524088;2.广东海洋大学 广东省水产品加工与安全重点实验室,广东 湛江 524088;3.广东海洋大学 国家贝类加工技术研发分中心(湛江),广东 湛江 524088)

摘要:以珍珠产业副产物马氏珠母贝肉为研究对象,在前期研究结果基础上,筛选有效提高马氏珠母贝肌肉水溶性蛋白(WSP)热稳定性亲水胶体,并分析不同热处理条件下最佳亲水胶体对马氏珠母贝肌肉水溶性蛋白(WSP和F-D WSP)热稳定性的影响,研究结果显示:同一热处理温度条件下,卡拉胶、果胶及瓜尔胶体对WSP的热稳定性的影响存在明显差异($P<0.05$)。在热处理温度范围内(60~100℃),卡拉胶对于稳定WSP的效果最好。卡拉胶对WSP和F-D WSP的热稳定性影响作用存在明显差异性($P<0.05$),在热处理温度范围内(60~100℃),随着热处理温度的不断提高,卡拉胶对WSP稳定性作用逐渐增强,而对F-D WSP的稳定性作用则呈先增强后减弱的趋势。

关键词:马氏珠母贝;水溶性蛋白;卡拉胶;热稳定性

中图分类号:TS 254.1 文章编号:1673-1689(2019)12-0085-06 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.12.012

Study on the Colloid Screening for Enhancing Thermal Stability of the Water Soluble Proteins Extracted from *Pinctada martensii* Muscle

ZHENG Huina^{1,2,3}, ZHANG Kai^{1,2,3}, ZHOU Chunxia^{1,2,3}, CAO Wenhong^{1,2,3}, GAO Jialong^{1,2,3},
ZHENG Zhoubin^{1,2,3}, WEI Wei^{1,2,3}, QIN Xiaoming^{1,2,3}, ZHANG Chaohua^{1,2,3}

(1.College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2.Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 3.National Research and Development Branch Center for Shellfish Processing (Zhanjiang), Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In this paper, the pearl industry by-product of *Pinctada martensii* was as the object of the study, based on the previous research results, the hydrophilic colloids, which was effectively enhancing the thermal stability of Water-Soluble Protein (WSP) of *Pinctada martensii* were screening. Meanwhile, the effect of the best hydrophilic colloid on *Pinctada martensii* muscle

收稿日期: 2017-01-12

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2016A030313810);广东省高等学校优秀青年教师培养计划项目(Yq2014005);国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-48-07B);广东省现代农业产业技术体系创新团队项目(2019KJ146);广东省应用型科技研发专项资金项目(2016B020235002)。

* 通信作者: 郑惠娜(1979—),女,博士,副教授,主要从事海洋生物资源高值化利用研究。Email: margaretpaper@126.com

引用本文: 郑惠娜,张凯,周春霞,等. 增强马氏珠母贝肌肉水溶性蛋白质热稳定胶体筛选研究[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(12):85-90.

water-soluble proteins (WSP and F-D WSP) under different heat-treatment conditions was studied. The results showed that the thermal stability of WSP was significantly affected by carrageenan, pectin and guar colloid under the same heat treatment temperatures ($P<0.05$). And in the range of heat treatment temperature ($60\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$), the effect of carrageenan was the best. Moreover, the effect of carrageenan on the thermal stability of WSP and F-D WSP was significantly different ($P<0.05$). In the range of $60\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, the effect of carrageenan on the stability of WSP was observed with the increasing of heat treatment temperature and the stability of F-D WSP was enhanced in the initial stage and then weakened at high temperature stage.

Keywords: *Pinctada martensii*, water soluble protein, carrageenan, thermal stability

食品加工过程中,热处理是引起食品成分发生变性,导致食品物理化学特性发生改变的重要原因。动物肌肉加工过程中,蛋白质是最易受热而发生变性的成分,并且相比于植物蛋白和陆地动物蛋白,水产肌肉蛋白更为不稳定,更易受热而发生变性,大量研究显示,肌肉蛋白经过热处理后其分子结构、物理化学特性等均会在加热和受热过程中发生明显的变化^[1-6]。因此,在食品加工过程中,为了防止蛋白质因各种加工因素的影响,常常添加一些亲水性胶体,这些胶体能与食品中的蛋白质相互作用,从而稳定蛋白质分子结构,质地和物理化学性质^[7-11]。我国水产加工技术相对落后,特别是基础研究起步较晚,水产资源及其副产品的加工利用率一直处于较低水平,导致长期以来我国水产加工产品单一,高值化加工产品较少。因此,加强基础性研究,提升水产高值化加工技术水平,对于充分开发和利用我国丰富的水产及副产品资源十分必要。作者以珍珠产业副产物马氏珠母贝肉为研究对象,在前期研究结果基础上^[12],筛选出有效提高马氏珠母贝肌肉水溶性蛋白热稳定性亲水胶体,并分析不同热处理条件下最佳亲水胶体分子对马氏珠母贝肌肉水溶性蛋白质热稳定性的影响,研究结果为进一步开发利用马氏珠母贝肉以及改善水产肌肉蛋白热稳定性,提高水产资源及副产品加工利用率、充分开发利用我国水产资源提供理论基础依据。

1 材料与方法

1.1 材料

马氏珠母贝:购于湛江雷州市珍珠养殖场。

1.2 试剂与仪器

考马斯亮蓝试剂盒:购于南京建成生物工程研

究所;福林酚试剂盒,十二烷基苯磺酸钠(SDS),三羟甲基氨基甲烷(Tris),溴酚蓝,R-250 考马斯亮蓝:购于北京鼎国生物技术有限公司;丙烯酰胺(Acr-Bis),过硫酸铵,四甲基乙二胺(TEMED),电泳上层胶缓冲液,电泳下层胶缓冲液:购于碧云天生物技术有限公司;卡拉胶,果胶,瓜尔胶:购于美国 Sigma 公司,其余试剂均为分析纯。

JA2003 电子天平:上海舜宇恒平科学仪器有限公司产品;JYL-F20 绞肉机:九阳股份有限公司产品;T-18 高速匀浆机:德国 IKA 公司产品;J-26S XP 高速台式冷冻离心机:美国贝克曼库尔特公司产品;DYY-6C 电泳仪:北京六一仪器厂制造;DYCZ-24DN 双垂直电泳槽:北京六一仪器厂制造;PHS-3C 数显 pH 酸度计:上海仪电科学仪器股份有限公司产品;UV-2550 紫外可见分光光度计:日本岛津公司产品;DK-8D 三孔三温水浴锅:常州诺基仪器有限公司产品;Bio-Rad ChemiDoc MP 凝胶成像系统:美国 Bio-Rad 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 原料预处理 马氏珠母贝肉去壳,去内脏取闭壳肌,清洗沥干,每袋 500 g 分装,置于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏备用。

1.3.2 水溶性蛋白质的提取 水溶性蛋白质提取参考文献^[12]略加修订,取冻藏马氏珠母贝肌肉于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下解冻 16 h,称取一定量贝肉绞肉机绞碎后,按照 1 g:4 mL 比例加入超纯水($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷),高速分散机匀浆 3 min(冰浴条件下),然后 10 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,取上清液为粗提马氏珠母贝肌肉水溶性蛋白质。进一步按照 50 g/dL 比例加入硫酸铵,并于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置过夜后 10 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,取沉淀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下透析脱盐直至采用 BaCl_2 检测无沉淀,

既得马氏珠母贝肌肉水溶性蛋白质(WSP),进一步冷冻干燥后获得粉末状水溶性蛋白质(F-D WSP)。

1.3.3 蛋白质浓度测定 样品蛋白质浓度采用福林酚试剂盒进行测定。以牛血清白蛋白(BSA)为标准品绘制标准曲线,得到标准曲线为: $y=0.001\ 3x+0.001\ 3$, $R^2=0.998$, y 为吸光值, x 则为样品浓度。

1.3.4 有效亲水胶体的筛选 选取卡拉胶、果胶、瓜尔胶3种亲水胶体,采用0.05 mol/L pH 7.0 Tris-HCl缓冲液将水溶性蛋白质WSP配成1 mg/mL的蛋白质溶液。同时,将3种亲水胶体配成1 mg/mL的胶体溶液,然后将蛋白质溶液与胶体溶液以体积比10:1的比例混合均匀,将10 mL混合液及蛋白溶液分装于玻璃试管中,在60、70、80、90、100℃温度条件下分别水浴热处理30 min,无添加胶体的蛋白质溶液也在同样热处理条件进行处理,样品经过热处理后迅速冷却至室温,并于600 nm波长下测定热处理后蛋白质溶液及蛋白质胶体混合溶液吸光值 A 及 A' ,样品的浊度以透光率 T 和 T' 表示。通过比较在同一热处理温度和加热时间条件下,蛋白质溶液浊度与蛋白质胶体混合溶液浊度差异(透光率差值 ΔT),筛选出有效提高马氏珠母贝肌肉水溶性蛋白热稳定性亲水胶体。根据下式计算 $\Delta T\%$:

$$T(\%)=10^{-A}\times 100\ (1); \quad T'(\%)=10^{-A'}\times 100\ (2);$$

$$\Delta T(\%)=(T'-T)\times 100\ (3)$$

其中: A 为热处理后水溶性蛋白质溶液吸光值; A' 为热处理后水溶性蛋白质胶体混合溶液吸光值; T 为热处理后水溶性蛋白质溶液透光率; T' 为热处理后水溶性蛋白质胶体混合溶液透光率。

1.3.5 有效亲水胶体-蛋白质混合体系热处理 根据1.3.4筛选出最佳提高水溶性蛋白质热稳定性亲水胶体,采用0.05 mol/L pH 7.0 Tris-HCl缓冲液将WSP配成1 mg/mL(福林酚法定量)的蛋白质溶液,D-F WSP溶解后先4 000 r/min离心5 min取上清液,福林酚法定量配成1 mg/mL蛋白质溶液。根据1.3.4程序进行热处理,同时比较同样热处理条件下最佳亲水胶体对WSP和D-F WSP蛋白质溶液热稳定性的影响差异。

1.3.6 SDS-PAGE分析 将水溶性蛋白质(WSP和F-D WSP)配成质量浓度为2 mg/mL的蛋白质溶液,按照样品溶液:加样缓冲液体积比例5:1混合均匀后,水浴煮沸5 min。采用浓缩胶5 g/dL,分离胶12 g/dL进行SDS-PAGE电泳分离,先恒压80 V分离30min

后改为恒压160 V分离直至条带前沿电泳至接近分离胶底部处,关闭电源,小心取下凝胶,切除浓缩胶部分,采用考马斯亮蓝染色均匀后,脱色液脱色直至凝胶底色透明,出现清晰条带,于Bio-Rad凝胶成像系统中成像分析。

1.3.7 数据分析与处理 实验数据采用GraphPad Prism5.0(GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA USA)和SPSS 22.0(IBM Inc., NY, USA)进行作图分析,数据表示为平均值 $\pm$ SD($n=3$),多组数据之间采用单因素ANOVA进行显著性差异($P<0.05$)分析,两组数据之间采用独立样本T检验进行显著性差异($P<0.05$)分析。

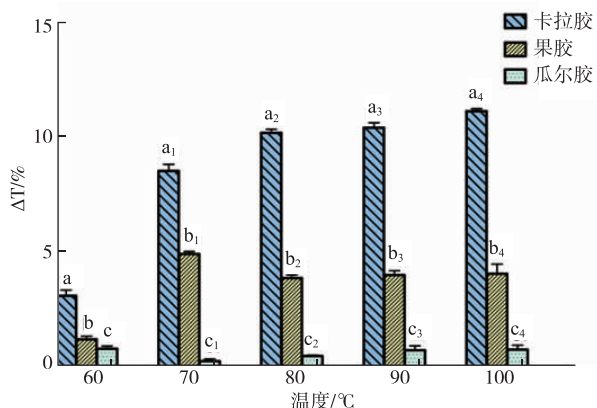
2 结果与讨论

2.1 有效亲水胶体的筛选

肌肉蛋白可以根据溶解度的差异分为水溶性蛋白(又称肌浆蛋白)、盐溶性蛋白(又称肌原纤维蛋白,主要是肌球蛋白、肌动蛋白和肌动球蛋白)和不溶性蛋白(又称肌质蛋白)^[13]。前期研究结果显示相对于盐溶性蛋白,马氏珠母贝肌肉水溶性蛋白的热稳定性较差^[12]。

目前,亲水胶体广泛用于各种食品的加工过程中,其能够通过增强食品组分凝胶特性、粘稠性、持水性等提高食品的加工特性。卡拉胶、果胶及瓜尔胶是食品工业中常用的胶体种类,并且研究显示这3种胶体对蛋白稳定性起到一定作用^[14-15]。作者通过测定不同温度条件下3种胶体对马氏珠母贝肌肉水溶性蛋白质WSP的热稳定性的差异,筛选出最佳稳定WSP的胶体种类,研究结果(见图1)显示:同一热处理温度条件下,3种胶体对WSP的热稳定性的影响存在明显差异($P<0.05$),并且在热处理温度范围内(60~100℃),卡拉胶对于稳定WSP的效果最好,添加卡拉胶能够显著降低WSP溶液在热处理条件下的浊度值,提高WSP溶液的透光率。而效果相对较差的是果胶,瓜尔胶的稳定效果最差。并且从图中结果可以看出,随着热处理温度的提高, ΔT 逐渐增大,而这种趋势在果胶及瓜尔胶数据结果中不明显。蛋白质的热变性反应十分复杂,随着热处理的条件及温度不同会发生许多结构变化,特别是各种热处理条件对蛋白质变性过程肽链的展开及蛋白质凝聚反应的强度不同,当蛋白质在水溶液中发生热变性时候,首先肽链展开后相互凝聚,蛋白质

溶液浊度提高,透光率减少,当变性到一定程度时候,凝聚蛋白质完全变性并在重力作用下发生沉淀,从而使溶解度下降^[16-17]。研究结果显示,在热处理条件下,卡拉胶作为稳定马氏珠母贝肌肉水溶性蛋白 WSP 的效果最好。



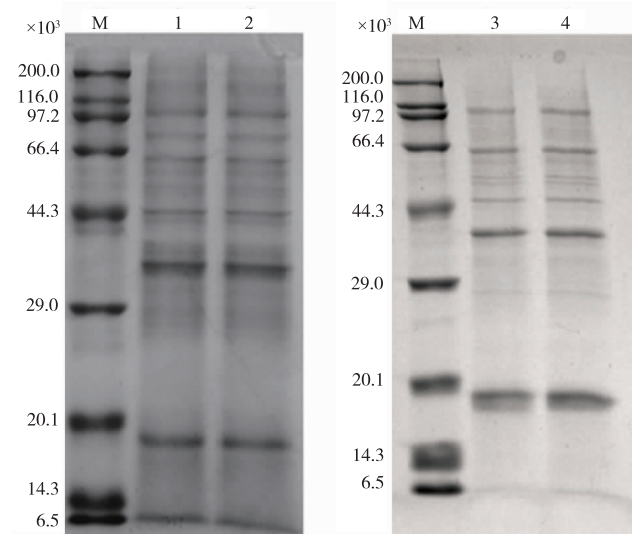
同一温度不同字母表示具有显著性差异 ($P < 0.05$)

图 1 不同温度条件下 3 种亲水胶体对水溶性蛋白 WSP 热稳定性的影响

Fig. 1 Effect of three colloids on thermal stability of WSP at different

2.2 卡拉胶对水溶性蛋白热稳定性的影响

2.2.1 WSP 与 F-D WSP 蛋白质溶液组成差异比较
贝肌肉水溶性蛋白质主要含有肌浆蛋白、球蛋白和肌白蛋白,大多数的水溶性蛋白质相对分子质量在 1~10 万范围内,分子形状近似球形^[18-19]。研究过程中发现冷冻干燥后的水溶性蛋白质 F-D WSP 的溶解



M: 蛋白标准品,泳道 1,2 为 WSP,泳道 3,4 为 F-D WSP

图 2 WSP 与 F-D WSP 蛋白溶液组成差异比较

Fig. 2 Comparison of the protein compositions between WSP and F-D WSP solution

性较差,难以完全溶解,因此,WSP 与 F-D WSP 可溶蛋白质溶液组成是否有所不同需要进行分析。图 2 比较了 WSP 和 F-D WSP 蛋白质溶液的蛋白组成差异,从图中结果分析:未经过冷冻干燥的水溶性蛋白质 WSP 条带数较冷冻干燥的水溶性蛋白质 F-D WSP 多,经过冷冻干燥,能够溶解于缓冲溶液中的 F-D WSP 蛋白质条带主要分布在 9.9×10^4 、 6.5×10^4 、 4.2×10^4 、 3.6×10^4 以及 1.8×10^4 附近。而未经过冷冻干燥的 WSP 水溶液蛋白条带较多,并且与 F-D WSP 相比较,主要体现在 1.5×10^5 及 8.0×10^4 附近的相对分子质量较大蛋白质,这可能是由于冷冻干燥过程中相对分子质量较大蛋白更容易发生冷冻变性从而溶解性大大降低,以至于冷冻干燥后在缓冲溶液中无法溶解。

2.2.2 卡拉胶对 WSP 及 F-D WSP 热稳定性的影响

为进一步研究卡拉胶对马氏珠母贝肌肉水溶性蛋白的影响作用,作者同时比较了卡拉胶对未经过冷冻干燥的水溶性蛋白质 WSP 及冷冻干燥后的水溶性蛋白 F-D WSP 热稳定性影响作用的差异性,研究结果见图 3-图 7,从图 3 及图 4 结果分析,在 60 °C 和 70 °C 热处理条件下及热处理时间范围内 (5~30 min) 卡拉胶对 F-D WSP 和 WSP 的热稳定性作用存在明显差异,在同一处理时间条件下,卡拉胶对 F-D WSP 的稳定作用明显优于对 WSP 的稳定作用,这可能是冷冻干燥后,水溶性蛋白质本身已经发生了一定的变性,亲水性较差,溶解于水溶液中再经过热处理更容易发生凝聚,从而更不稳定,这使得卡拉胶的稳定作用尤为明显,未经过冷冻干燥处理的 WSP 蛋白质在 60 °C 及 70 °C 条件下相对稳定

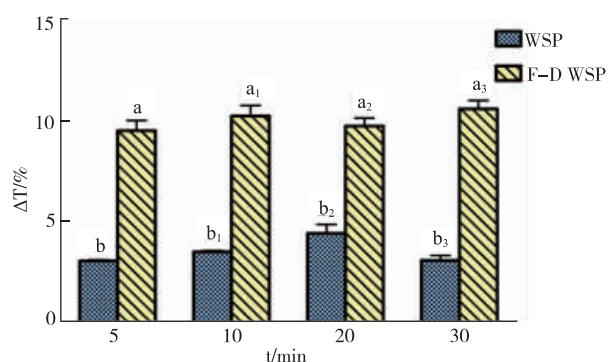


图 3 60 °C 热处理条件下卡拉胶对 WSP 及 F-D WSP 热稳定性影响

Fig. 3 Effect of Carrageenan on thermal stability of WSP and F-D WSP under 60 °C

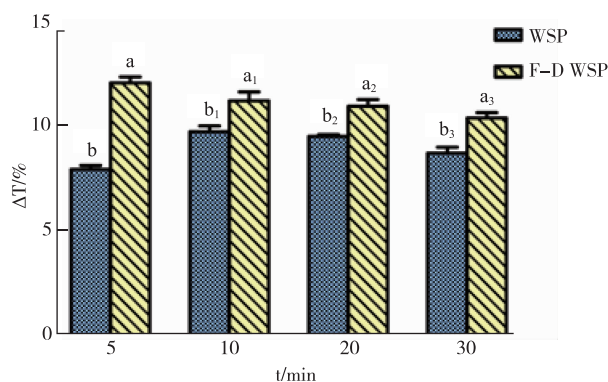


图 4 70 °C 热处理条件下卡拉胶对 WSP 及 F-D WSP 热稳定性影响

Fig. 4 Effect of Carrageenan on thermal stability of WSP and F-D WSP under 70 °C

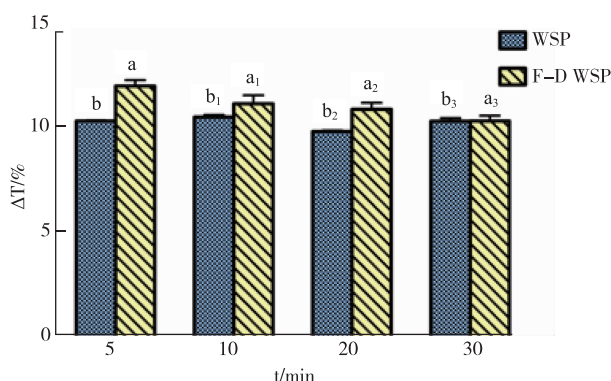


图 5 80 °C 热处理条件下卡拉胶对 WSP 及 F-D WSP 热稳定性影响

Fig. 5 Effect of Carrageenan on thermal stability of WSP and F-D WSP under 80 °C

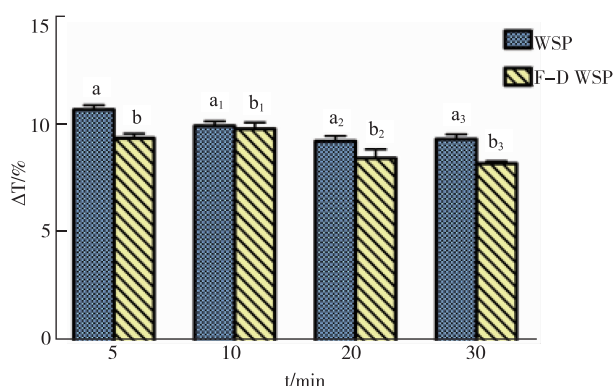


图 6 90 °C 热处理条件下卡拉胶对 WSP 及 F-D WSP 热稳定性影响

Fig. 6 Effect of Carrageenan on thermal stability of WSP and F-D WSP under 90 °C

性较好。图 5 结果显示了 80 °C 条件下, 卡拉胶对 WSP 的稳定作用开始增强, 而对 F-D WSP 的稳定作用有所减弱, 并且随着热处理温度的提高, 卡拉胶对 WSP 的稳定作用开始优于对 F-D WSP 的稳定作用。这可能是由于在较高温条件下, 经过冷冻干燥处理的 F-D WSP 易于发生进一步变性凝聚, 此时卡拉胶的稳定作用已经不能较为有效抑制 F-D WSP 热变性进程。卡拉胶是一类多糖类物质, 各种类型的卡拉胶结构中均含有大量的羟基。Fuente 等研究显示在卡拉胶存在条件下, 质量分数 2% 的乳清蛋白溶液在 pH7.0 溶液中进行热处理, 乳清蛋白不会失去其天然结构, 但是会引起加热过程中所形成的可溶性聚集体相对分子质量降低^[20]。Kelly 等研究也显示, 卡拉胶的存在不影响在 75 °C 时加热的乳清蛋白的聚集, 然而, 在较高温度下, 卡拉胶的存在对乳清分离蛋白的聚集产生较大影响^[21]。蛋白质种类及存在的状态不同, 卡拉胶与其相互作用的机制也不同, 整体分析, 随着热处理温度的不断提高, 卡拉胶对未经过冷冻干燥处理的 WSP 稳定性作用逐渐增强, 而对经过冷冻干燥处理的 F-D WSP 的稳定性作用则呈先增强后减弱的趋势。

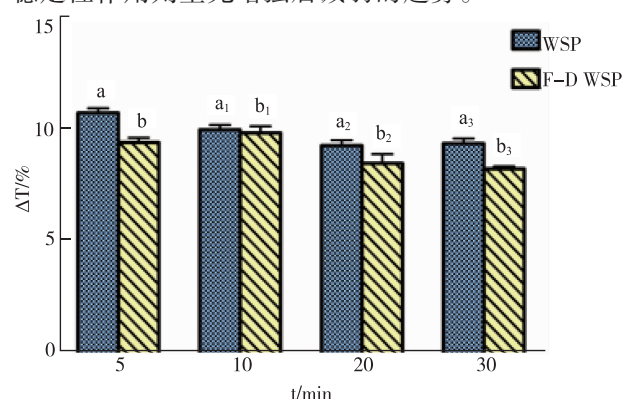


图 7 100 °C 热处理条件下卡拉胶对 WSP 及 F-D WSP 热稳定性影响

Fig. 7 Effect of Carrageenan on thermal stability of WSP and F-D WSP under 100 °C

3 结 语

亲水胶体卡拉胶、果胶及瓜尔胶对提高马氏珠母贝肌肉水溶性蛋白热稳定性具有一定的作用, 其中卡拉胶的稳定性作用效果最佳。经过冷冻干燥后的水溶性蛋白溶液的蛋白组成与未经过冷冻干燥的水溶性蛋白溶液蛋白组成存在一定差异, 同时卡拉胶对其稳定性作用也存在差异, 在热处理条件

下,随着热处理温度的不断提高,卡拉胶对未经过冷冻干燥处理的 WSP 稳定性作用逐渐增强,而对经

过冷冻干燥处理的 F-D WSP 的稳定性作用则呈先增强后减弱的趋势。

参考文献:

- [1] KIM D A, CORMEC M, NARSIMHAN G. Effect of thermal treatment on interfacial properties of β -lactoglobulin[J]. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2005, 285: 100-109.
- [2] MILITELLO V, CASARINO C, EMANUELE, et al. Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by FTIR spectroscopy and light scattering[J]. **Biophysical Chemistry**, 2004, 107: 175-187.
- [3] UYERSKY V N, FINK A L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded [J]. **Biochim Biophys Acta**. 2004, 1698: 131 - 153.
- [4] ZHANG J, LIU X Y. Effect of protein - protein interactions on protein aggregation kinetics [J]. **Journal of Chemical Physics**, 2003, 119: 10972-10976.
- [5] FEDURKINA N V, BELOUSOVA L V, MITSKEVITCH LG, et al. Change in kinetic regime of protein aggregation with temperature increase. Thermal aggregation of rabbit muscle creatine kinase[J]. **Biochemistry**, 2006; 71: 325 - 331.
- [6] HUA Yufei, CUI Steve W. Gel Rigidity and the phase behavior of soy protein-hydrocolloid mixtures [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2004, 23(2): 21-26
- [7] DOUBLIER J L, GARNIER C, RENARD D, et al. Protein polysaccharide interactions [J]. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, 2000, 5: 202-214.
- [8] MAROZIENE A, DEE KRUIF C G. Interaction of pectin and casein micelles[J]. **Food Hydrocolloids**, 2000, 14: 391-394.
- [9] HEMAR Y, HALL, C E, MUNRO P A, et al. Small and large deformation rheology and microstructure of κ -carrageenan gels containing commercial milk products[J]. **International Dairy Journal**, 2002, 12: 371-381.
- [10] HEMAR Y, TAMEHANA M, MUNRO P. A., et al. Viscosity, microstructure and phase behavior of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum [J]. **Food Hydrocolloids**, 2001, 15: 565-574.
- [11] DICKINSON E, EUSTON S R. Stability of food emulsions containing both proteins and polysaccharides [J]. **Food Polymers, Gels and Colloids**, 1991: 132-146.
- [12] ZHENG H N, ZHANG C H, QIN X M, et al. Kinetics of heat denaturation of proteins extracted from *Pinctada martensii* [J]. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering**, 2013, 29(5): 237-242.
- [13] BIRKELAN S., BJERKENG, B. Extractabilities of astaxanthin and protein from muscle tissue of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by brine concentration and pH [J]. **Food Chemistry**, 2004, 85: 559-568.
- [14] FELIX N A, MICHAEL, Nickerson T. Effect of pH, biopolymer mixing ratio and salts on the formation and stability of electrostatic complexes formed within mixtures of lentil protein isolate and anionic polysaccharides (κ -carrageenan and gellan gum) [J]. **International Journal of Food Science and Technology**, 2014, 49, 65-71.
- [15] TIPPETTS M, MARTINI S. Influence of ι -Carrageenan, pectin, and gelatin on the Physicochemical properties and stability of milk protein-stabilized emulsions[J]. **Journal of Food Science**, 2012, 77: 253-258.
- [16] LAW A J R, LEAVER J. Effect protein concentration on rates of thermal denaturation of whey protein in milk [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1997, 45(11): 4255-426.
- [17] DICKOW J A, KAUFMANN N, WIKING L, et al. M. Protein denaturation and functional properties of Lenient Steam Injection heat treated whey protein concentrate[J]. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2012, 13: 178-183.
- [18] 须山三千三, 鸿巢章二编. 水产食品学[M]. 日本: 恒生社厚生阁, 1987.
- [19] ZHENG H N, ZHANG C H, QING X M, et al. Study on the protein fractions extracted from the muscle tissue of *Pinctada martensii* and their hydrolysis by pancreatin [J]. **International Journal of Food Science and Technology**, 2012, 47(10): 2228-2234.
- [20] FUENTE D L, HEMAR M A, Y, SINGH, et al. Influence of κ -carrageenan on the aggregation behaviour of proteins in heated whey protein isolate solutions[J]. **Food Chemistry**, 2004, 86: 1-9.
- [21] KELLY L, MILENA C. Whey protein aggregate formation during heating in the presence of κ -carrageenan[J]. **Food Chemistry**, 2009, 115: 1479-1485.