

## 알파 락트알부민의 열처리에 의한 겔화 특성

박인덕 · 홍윤호

전남대학교 식품영양학과

### Gelation Properties of $\alpha$ -Lactalbumin by Heat Treatment

In-Duck Park and Youn-Ho Hong

Department of Food and Nutrition, Chonnam National University

#### Abstract

In order to investigate gelation properties of  $\alpha$ -lactalbumin( $\alpha$ -La), gelling times and protein solubilities of  $\alpha$ -La gels prepared in 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) followed by heating at 90°C for 40 minutes under different  $\alpha$ -La concentration, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, N-ethylmaleimide(NEM), and dithiothreitol(DTT) concentration were measured. Gelling times decreased with increasing concentration of  $\alpha$ -La, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, and DTT, but increased with increasing concentration of NEM.  $\alpha$ -La solutions made from all treatments were gelled within 40 minutes with the exception of NEM at 20~50 mM. Solubilities decreased with increasing concentration of  $\alpha$ -La, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, and DTT, but the solubility of NEM-modified gels increased with increasing concentration of NEM. As the results, solubilities in standard buffer were 10.4~51.3%, 9.2~35.4%, 11.1~35.0%, 8.0~9.5%, and 96.8~56.2%, respectively. Solubilities in standard buffer containing 8 M urea and 0.5% SDS were higher than those in standard buffer, and were 41.8~81.3%, 41.9~64.1%, 43.5~69.8%, 29.6~38.5%, and 77.4~98.9%, respectively. Solubilities in the presence of DTT were almost close to 100% in all conditions. These results indicates that the gelation rate and solubility are influenced by many factors, i.e. protein concentration, kind and concentration of salts, concentration of thiol reagents. The solubility of gel decreased with increasing the gelation rate.

Key words:  $\alpha$ -La, gelation, heat treatment, NEM, DTT, solubility

## 서 론

우유의 유청단백질은 우수한 영양적 성분과 여러 기능적인 특성 즉, 분산력, 용해성, 점성, 겔형성, 유화성, 안정성 등으로 인해 식품산업에 많이 이용되고 있는데<sup>(1-3)</sup> 그 중 겔형성 능력은 특히 중요한 성질로 식품의 물성 및 조직감 등의 향상에 매우 중요한 영향을 주므로 많은 연구가 진행되고 있다<sup>(4-8)</sup>.

유청단백질의 겔형성 과정은 2단계로 이루어진다는 사실이 유력한 바, 우선 단백질의 변성이 일어나고 분자구조가 개열되며 그 다음으로 회합이 일어나 겔지지체(gel matrix)가 만들어지는 것으로 요약할 수 있다<sup>(9-12)</sup>. 겔형성 정도에는 pH, 염의 종류 및 농도, 유리 SH기의 농도, 단백질의 소수성, 열처리 조건과 시간 등 많은 요인들이 관여하고<sup>(13-15)</sup>, 겔의 성질은 각각의 주성분 단백질들 즉,  $\alpha$ -lactalbumin( $\alpha$ -La),  $\beta$ -lactoglobulin( $\beta$ -Lg), bovine serum albumin(BSA), immunoglobulin(IG), pro-

tease pepton(PP) 등의 물리, 화학적 성질에 많은 영향을 받는다고 알려져 있는데<sup>(16)</sup> 다양한 단백질 성분들 간에 이루어지는 상호반응이 매우 복잡적이기 때문에 유청단백질의 3차원 가교결합의 형성에 관한 메커니즘이 밝혀지지 못하고 있다<sup>(13)</sup>. 따라서 유청단백질의 주성분 단백질들을 선별적 시료로 하여 겔형성 과정과 이에 영향을 주는 인자들의 상호관계를 규명하는 것이 바람직하다.

Matsudomi 등<sup>(16)</sup>은 유청단백질 중  $\beta$ -Lg와 BSA를 선택하여 이들의 겔형성에 관하여 연구한 결과,  $\beta$ -Lg의 겔형성 과정에서 2가 양이온과 1가 양이온의 차이를 분광편광계로 측정 비교하였으나 겔의 형성과 물성학적 성질을 설명할 수 없었다고 하였다. IG는 가열시 일정한 겔을 형성하며<sup>(17)</sup>, PP는 유청단백질 분리물에 첨가시 겔형성에 아무 효과가 없는 것으로 나타났다<sup>(18)</sup>.

그러나  $\alpha$ -La의 겔형성에 관한 연구는 거의 이루어지고 있지 않는데, 열처리를 할 경우 열응고성이 좋지 않았고  $\beta$ -Lg와 반응하는 것으로 알려졌으며<sup>(19)</sup>, Lyster<sup>(20)</sup>는  $\alpha$ -La와  $\beta$ -Lg의 열변성에 있어서 반응속도론적인 연구를 수행한 결과,  $\alpha$ -La는 1차 반응식으로,  $\beta$ -Lg는 2차 반응식으로 나타낼 수 있다고 하였으나 겔형성 메커니즘에 관하여는 구체적으로 고찰하지 않았다. 또한 유청단백

Corresponding author: Youn-Ho Hong, Department of Food and Nutrition, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

질을 가열할 때  $\alpha$ -La의 구조변화를 알아보려고 이 단백질에 칼슘이 존재하는 경우와 존재하지 않는 경우로 나누어 Differential Scanning Calorimetry(DSC), 내부형 광계, 형광광도계 등을 사용하여 연구한 보고가 있다<sup>(21)</sup>. Eynard 등<sup>(22)</sup>은  $\alpha$ -La의 열처리시 수식과 표면 소수성의 변화를 형광분광법으로 측정하였는데 전체의 변성과정은 열에 노출되는 초기에 단백질 구조의 이완과 소수성 증가현상이 야기되었다고 보고하였으나 구체적으로 어떤 반응과 결합이 일어나는지에 대해서는 밝히지 못하였다.  $\alpha$ -La의 겔형성 과정에 관하여 보다 많은 연구가 체계적으로 이루어져 그 메카니즘을 이해하고, 이를 조절하며 응용하는 것이 절실하게 필요한 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는  $\alpha$ -La의 겔형성에 관여하는 인자들을 조절, 첨가하여 이들 인자들이  $\alpha$ -La의 겔형성 속도와 용해성에 미치는 정도를 측정함으로써  $\alpha$ -La의 겔형성 메카니즘을 규명하는 기초자료를 삼고자 하였다.

**재료 및 방법**

**재료 및 시약**

$\alpha$ -Lactalbumin, N-ethylmaleimide, dithiothreitol, Tris (hydroxymethyl)-aminomethane은 Sigma사(St. Louis, U.S.A)에서 구입하였고 기타 시약들은 분석용으로 시판되는 특급으로 사용하였다.

**$\alpha$ -La 겔의 제조**

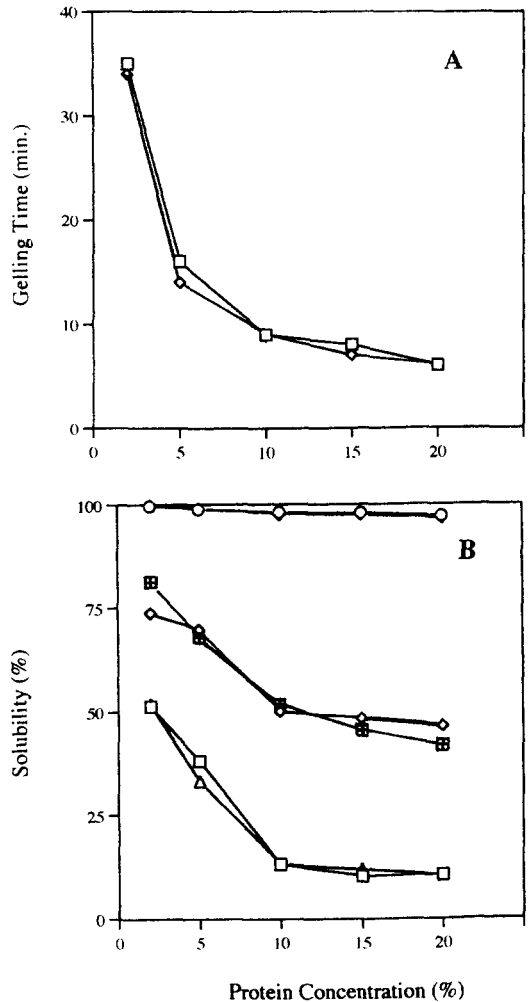
$\alpha$ -La의 농도는 20%(w/v)로 0.1 M Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0)을 이용해 제조하였는데 염이나 다른 첨가물을 함유하는 용액은 완충용액을 1:1로 희석해 원하는 최종농도가 되도록 하였고, 시료는 pH를 8.0으로 고정시켜 NaCl은 10~200 mM,  $CaCl_2$ 는 2~20 mM, NEM과 DTT는 0~50 mM를 각각 다른 농도로 첨가한 후 90°C에서 40분간 가열하여 겔을 제조하였다.

**겔형성 시간의 측정**

10%  $\alpha$ -La 용액 1ml를 직경 1cm 시험관에 넣고 수조 (90°C)에서 40분간 가열하면서 15초 간격으로 용액의 겔형성 유무를 관찰하였는데 겔형성 시간은 시험관을 거꾸로 뒤집어서 내용물의 손실이 없을 때로 하였다<sup>(23)</sup>.

**단백질 용해성의 측정**

단백질의 용해성 측정은 Shimada와 Cheftel의 방법<sup>(24)</sup>에 따라 실시하였는데 0.1% 겔을 표준완충용액(0.086 M Tris-0.09 M glycine-4 mM  $Na_2EDTA$ , pH 8.0), 8 M urea, 0.5% SDS를 함유하는 표준완충용액, 그리고 8 M urea, 0.5% SDS, 10 mM DTT를 함유하는 표준완충용액을 각각 첨가해 3분간 균질화시켜 용액을 만들어 이 액을 20,000×g에서 15분간 원심분리한 후 얻어진 상층액을 Lowry 방법<sup>(25)</sup>으로 측정, 계산하였다.



**Fig. 1. Gelling time and solubility of  $\alpha$ -lactalbumin gels as a function of protein concentration during heating at 90°C for 40 min. (pH 8.0)**

A: (□-□) added NaCl 80 mM, (◇-◇) added  $CaCl_2$  10 mM, B: (□-□) added NaCl 80 mM, standard buffer, (◇-◇) added NaCl 80 mM, std. buffer containing 8 M urea and 0.5% SDS, (○-○) added NaCl 80 mM, std. buffer containing 10 mM DTT, (△-△) added  $CaCl_2$  10 mM, standard buffer, (□-□) added  $CaCl_2$  10 mM, std. buffer containing 8 M urea and 0.5% SDS, (◇-◇) added  $CaCl_2$  10 mM, std. buffer containing 10 mM DTT

**결과 및 고찰**

**$\alpha$ -La 겔형성에 대한 단백질농도의 효과**

Shimada와 Cheftel<sup>(24)</sup>은  $\beta$ -Lg와 BSA가 10% 농도에서 70°C 이상, 15분 가열시 겔을 형성한다고 보고하였는데 본 실험에 사용된  $\alpha$ -La는 90°C에서 2시간 가열해도 약간의 점도증가는 나타났으나 겔은 형성되지 않았다. 이

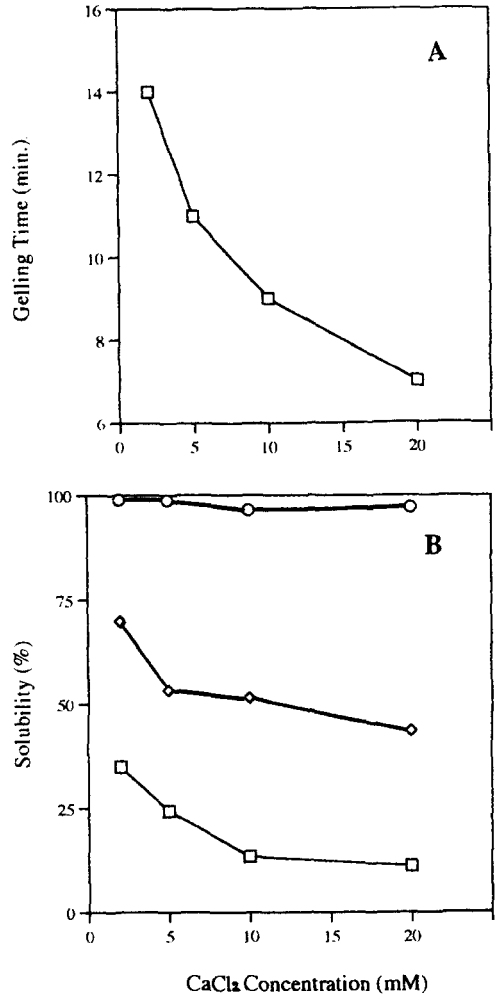
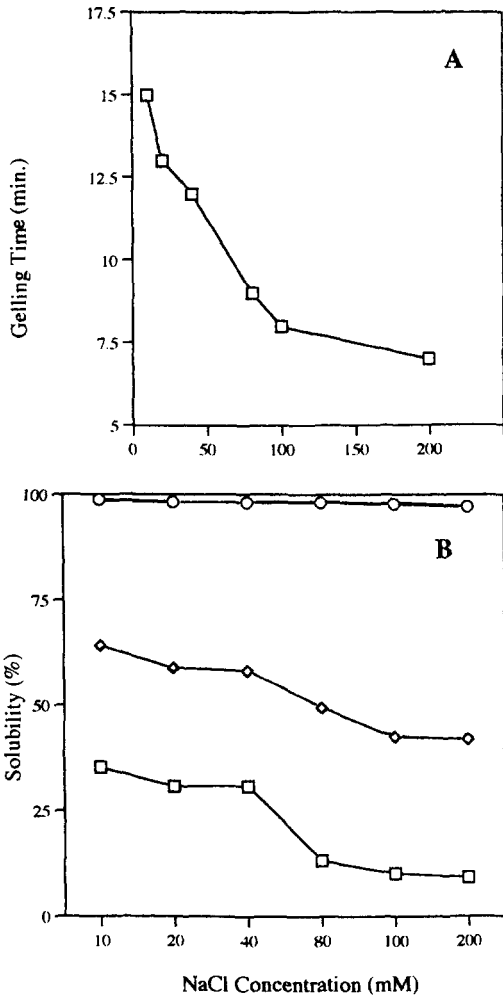


Fig. 2. Gelling time and solubility of 10%  $\alpha$ -lactalbumin gels as a function of NaCl concentration during heating at 90°C for 40 min. (pH 8.0)

A: (□—□) added NaCl 80 mM, B: (□—□) standard buffer, (◇—◇) std. buffer containing 8 M urea and 0.5% SDS, (○—○) std. buffer containing 10 mM DTT

Fig. 3. Gelling time and solubility of 10%  $\alpha$ -lactalbumin gels as a function of CaCl<sub>2</sub> concentration during heating at 90°C for 40 min (pH 8.0)

A: (□—□) added CaCl<sub>2</sub> 10 mM, B: (□—□) standard buffer, (◇—◇) std. buffer containing 8 M urea and 0.5% SDS, (○—○) std. buffer containing 10 mM DTT

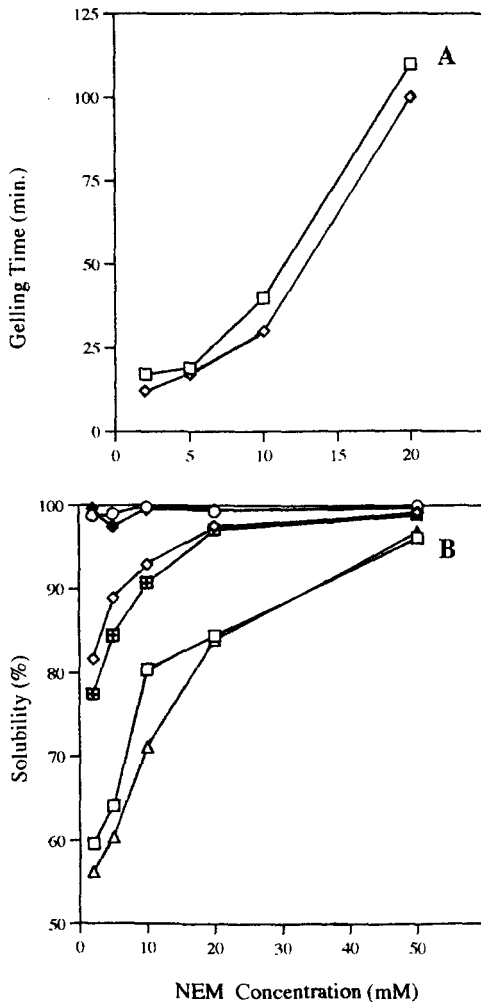
것은  $\alpha$ -La이 Ca<sup>2+</sup>을 함유하여 holo- $\alpha$ -La으로써 구조를 안정화시키기 때문인 것으로 사료된다<sup>(26)</sup>. 따라서 본 실험에서는 단백질농도 효과(Fig. 1)와 NEM, DTT 첨가에 의한 효과(Fig. 4, 5)를 관찰하기 위하여 염을 첨가해 겔을 제조하였는데 겔형성 시간이 비슷한 NaCl 80 mM(Fig. 2)과 CaCl<sub>2</sub> 10 mM(Fig. 3)을 처리조건이 다른  $\alpha$ -La 용액에 각각 첨가해 겔을 제조하여 첨가물의 종류와 농도에 따른 겔특성을 조사하였다.

Fig. 1에서  $\alpha$ -La의 농도변화에 따른 겔형성 시간은 농도가 증가될수록 감소하였는데 모든 조건에서 40분 이내에 겔이 형성되었다.

형성된 겔의 혼탁도를 눈으로 관찰한 결과  $\alpha$ -La 2%를

제외하고는 전부 불투명하였다. Matsudomi 등<sup>(16)</sup>은  $\beta$ -Lg에 40 mM 이상의 NaCl을 첨가했을 때 불투명하고 스폰지와 유사한 겔이 형성되었다고 보고하였는데 본 실험의 결과  $\alpha$ -La도 이와 유사성을 나타내었다.

겔의 용해성은 표준완충용액에 용해된 겔의 경우 단백질 농도가 증가할 수록 NaCl과 CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 것 모두 감소하였는데 NaCl을 첨가한 것은 10.5~51.3%, CaCl<sub>2</sub>의 경우는 10.4~51.9%를 각각 나타내었다. 이것은 용해성이 염의 종류에 따라 큰 차이는 보이지 않으나 단백질의 농도가 증가됨에 따라 분자간 소수성 상호반응이 증가되기 때문으로 추정할 수가 있다<sup>(24)</sup>. 8 M urea와 0.5% SDS를 함유한 표준완충용액에 용해된 겔 역시



**Fig. 4. Gelling time and solubility of 10%  $\alpha$ -lactalbumin gels as a function of N-ethylmaleimide(NEM) concentration during heating at 90°C for 40 min. (pH 8.0)**

A: (□-□) added NaCl 80 mM, (◇-◇) added CaCl<sub>2</sub> 10 mM, B: (□-□) added NaCl 80 mM, standard buffer, (◇-◇) added NaCl 80 mM, std. buffer containing 8 M urea and 0.5% SDS, (○-○) added NaCl 80 mM, std. buffer containing 10 mM DTT, (△-△) added CaCl<sub>2</sub> 10 mM, standard buffer, (□-□) added CaCl<sub>2</sub> 10 mM, std. buffer containing 8 M urea and 0.5% SDS, (◇-◇) added CaCl<sub>2</sub> 10 mM, std. buffer containing 10 mM DTT

농도증가에 따라 용해성이 감소하였는데 표준완충용액만 처리한 겔의 용해성 보다는 더 높은 값인 46.5~73.8%, 41.8~81.3%를 각각 나타내었고, 특히 DTT를 함유한 표준완충용액에서는 고농도의  $\alpha$ -La에서도 거의 100%에 가까운 용해성을 나타낸 것으로 미루어 고농도 단백질 겔의 용해성 감소는 분자간 이황화결합에 의한 것으로 추정된다<sup>(27)</sup>.

**$\alpha$ -La 겔형성에 대한 염의 효과**

Na과 다른 염들은 전하중성화를 유도해 안정한 겔 망상구조를 형성하는데, 보고<sup>(28-29)</sup>에 의하면 유청단백질 및  $\beta$ -Lg의 겔강도에 미치는 효과가 NaCl 보다는 CaCl<sub>2</sub>에 의한 영향이 더 크다고 하였다. 이것은 Ca 이온이 개열된 단백질 분자들의 음전하그룹 간에 Ca 가교를 형성하여 겔 지지체를 증가시키기 때문인데, 본 연구에서는 10%  $\alpha$ -La에 NaCl과 CaCl<sub>2</sub> 농도를 각각 10~200 mM, 2~20 mM로 달리하여 겔형성 시간과 용해성의 변화양상을 관찰하였다(Fig. 2, 3).

그 결과 NaCl과 CaCl<sub>2</sub> 농도가 증가될수록 겔형성 속도는 증가하였는데 NaCl 보다는 CaCl<sub>2</sub>가 소량으로도 겔형성에 미치는 효과가 더 컸고 겔형성은 모두 15분 이내로 비교적 빠르게 이루어졌다.

겔의 용해성은 표준완충용액에서는 NaCl를 첨가한 경우 9.2~35.4%, CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 경우는 11.1~35.0%였고, 8 M urea와 0.5% SDS를 함유한 표준완충용액에서는 41.9~64.1%, 43.5~69.8%를 각각 나타내었다.

Etsushiro<sup>(11)</sup>에 의하면 5% ovalbumin을 80°C에서 1시간 가열시 NaCl 첨가량이 증가할수록 겔의 혼탁도가 증가한다고 하였는데, 본 실험에서는  $\alpha$ -La에 NaCl 10 mM과 CaCl<sub>2</sub> 2 mM을 첨가해 제조한 겔들만 투명하였고 그 이상의 농도에서는 불투명하였다.  $\beta$ -Lg 겔은 40 mM 이상의 NaCl이나 5 mM 이상의 CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 경우에 불투명하였다고 보고하였는데<sup>(16)</sup>, 겔의 투명도는 단백질의 종류에 따라 첨가된 염의 농도에 의한 차이가 있음을 시사하는 것으로 보인다.

**$\alpha$ -La 겔형성에 대한 N-ethylmaleimide의 효과**

본 실험에서는 Matsudomi 등<sup>(16)</sup>이 BSA와  $\beta$ -Lg의 겔 강도 실험에 사용한 NEM 2~50 mM을 첨가해 겔 특성을 조사하였다(Fig. 4).

NEM은 단백질 분자에 존재하는 유리 티올(thiol)그룹을 차단함으로써 단백질 분자간에 티올-이황화물 상호교환반응을 방해하여 결국 단백질의 불용화를 억제하는 물질로 작용하는데<sup>(27)</sup>, 본 실험 결과 Fig. 4에 나타난 것처럼 NEM 2~10 mM 첨가시는 40분 이내에 모두 겔이 형성되었는데, 20 mM의 NEM 첨가시는 거의 2시간 정도를 가열해야 겔이 형성되었고, 50 mM 첨가시는 3시간 가열에도 겔이 형성되지 않았다. Matsudomi 등<sup>(16)</sup>은 BSA는 2 mM 이상의 NEM 첨가시,  $\beta$ -Lg는 20 mM 이상 첨가시 겔의 강도가 급격히 감소하였다고 보고하였는데, 본 실험에서는 NEM을 10 mM 이상 첨가했을 때 겔형성 속도가 급격히 감소함을 나타내었다. 형성된 겔들은 2 mM NEM을 첨가한 것을 제외하고는 모두 투명하였다.

표준완충용액에 용해된 겔의 용해성은 NEM의 농도 증가에 따라 NaCl에서는 59.6~96.1%, CaCl<sub>2</sub>의 경우는 56.2~96.8%로 증가되었고 변성제(8 M urea, 0.5% SDS)를 첨가한 것 역시 표준완충용액에 용해된 것보다 더

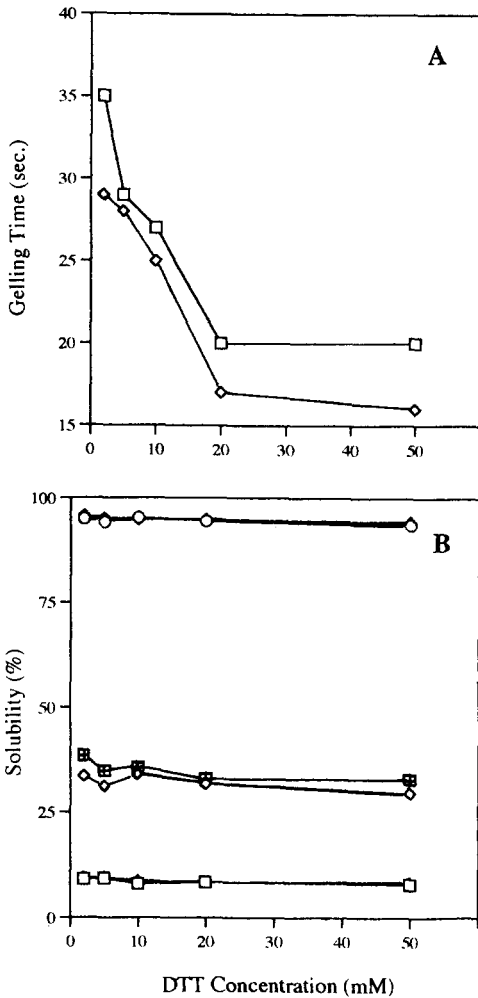


Fig. 5. Gelling time and solubility of 10%  $\alpha$ -lactalbumin gels as a function of dithiothreitol concentration during heating at 90°C for 40 min (pH 8.0)

A: (□-□) added NaCl 80 mM, (◇-◇) added CaCl<sub>2</sub> 10 mM, B: (□-□) added NaCl 80 mM, standard buffer, (◇-◇) added NaCl 80 mM, std. buffer containing 8 M urea and 0.5% SDS, (○-○) added NaCl 80 mM, std. buffer containing 10 mM DTT, (△-△) added CaCl<sub>2</sub> 10 mM, standard buffer, (□-□) added CaCl<sub>2</sub> 10 mM, std. buffer containing 8 M urea and 0.5% SDS, (◇-◇) added CaCl<sub>2</sub> 10 mM, std. buffer containing 10 mM DTT

높은 값인 81.6~98.2%, 77.4~98.9%였는데, 이것은 다른 첨가물에 의해 제조한 겔 보다도 더 높은 값이었다. 환원형 glutathione을  $\alpha$ -La과  $\beta$ -Lg의 혼합물에 첨가한 경우  $\alpha$ -La의 겔형성 능력이  $\beta$ -Lg 보다 더 크게 나타났으므로 위와 같은 혼합단백질에서  $\alpha$ -La의 농도 증가가 보다 단단한 겔형성에 기여할 것이라고 보고되었다<sup>(30)</sup>. 이는 티올-이황화물결합 상호교환이 겔형성과 겔의 용해성에

중요함을 의미한다<sup>(27,31)</sup>.

$\alpha$ -La 겔형성에 대한 dithiothreitol의 효과

DTT도 NEM과 같은 농도 범위로 첨가했는데, Fig. 5에 의하면 DTT 농도에 관계없이 모든 조건에서 90°C로 가열하자마자 1분 이내에 겔들이 형성되었고 형성된 겔은 모두 불투명하고 단단하였다.

DTT 첨가로 인한 용해성 변화는 농도에 따라 큰 차이는 없었지만 DTT 첨가량이 많아질수록 약간 더 낮은 용해성을 보였는데 그 값은 각각 8.0~9.5%(표준완충용액), 29.6~38.5%(8 M urea와 0.5% SDS를 함유한 표준완충용액)였고, DTT를 함유한 완충용액에서도 다른 처리조건 보다는 약간 더 낮았으나 거의 100%에 가까운 용해성을 나타내었다.

DTT는 단백질 분자의 이황화물결합의 환원작용을 야기해 새로 형성된 티올그룹과 티올-이황화물 상호교환반응을 유발하여 겔강도를 증가시키는 역할을 하는 물질로 알려졌는 바<sup>(32)</sup>, 본 실험 결과로 보아  $\alpha$ -La에 있어서는 2 mM 정도의 소량의 DTT 첨가시에도  $\alpha$ -La의 겔 형성에 긍정적으로 영향을 주는 것으로 나타났다.

$\beta$ -Lg의 경우 첨가된 DTT의 농도가 2.0 mM일 때 형성된 겔강도는 가장 높았고, DTT의 첨가량을 5.0~50.0 mM으로 증가하였을 때 겔강도는 DTT의 량에 반비례하여 급격히 낮아졌는데 이는 이황화물결합이 적기 때문으로 유추하였다<sup>(16)</sup>.  $\alpha$ -La에는 이황화결합이 4개 존재하므로 겔형성 거동에 다소의 차이가 있는 것으로 사료되나, 이에 관한 보다 구체적인 연구가 기대된다.

요 약

알파-라트알부민( $\alpha$ -La)의 열처리에 의한 겔 특성을 조사하기 위하여  $\alpha$ -La 농도, 염의 종류와 농도, 티올시약(NEM, DTT)의 농도를 달리해 90°C에서 40분간 가열하여 만든  $\alpha$ -La의 겔형성 시간과 용해성을 측정하였다. 겔형성 시간은  $\alpha$ -La, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, DTT의 농도가 증가할수록 감소하였으나 NEM의 경우는 그와 반대로 나타났다. 용해성은  $\alpha$ -La, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, DTT의 농도가 증가함에 따라 감소하였으나 NEM의 경우는 NEM의 농도증가에 따라 용해성은 증가하는 양상을 나타내었다. 표준완충용액에 용해된 겔의 용해성은 각각 10.4~51.3%, 9.2~35.4%, 11.1~35.0%, 8.0~9.5%, 그리고 96.8~56.2%였고, 8 M urea와 0.5% SDS를 함유한 표준완충용액에서는 더 높은 값인 41.8~81.3%, 41.9~64.1%, 43.5~69.8%, 29.6~38.5%, 그리고 77.4~98.9%로 각각 나타났다. DTT를 함유한 것은 모든 조건에서 거의 100%에 달하는 용해성을 나타내었다. 이상으로  $\alpha$ -La의 겔형성 속도와 용해성은 여러인자 즉, 단백질 농도, 염의 종류와 농도, 티올시약의 농도 등에

의해 영향을 받고, 겔형성 속도가 증가될수록 겔의 용해성은 감소함을 알수 있었다.

### 감사의 글

본 논문은 한국과학재단 '94 핵심전문연구 지원과제 (941-0600-034-1) 연구비에 의하여 수행된 연구결과의 일부로서, 이에 깊은 감사를 드립니다.

### 문헌

- Hong, Y.H.: Nutritional properties and utilization of bovine whey. *Korean J. Nutr. Society*, **16**, 137 (1983)
- Morr, C.V.: Fractionation and modification of whey protein in U.S. *IDF Bulletin*, **212**, 145 (1987)
- De Wit, J.N.: The use of whey protein products. In *Developments in dairy chemistry-4*, Fox, P.F.(Ed.), Elsevier Applied Sci., London & New York, p.323 (1989)
- De Wit, J.N.: Functional properties of whey proteins in food systems. *Neth. Milk Dairy J.*, **38**, 71 (1984)
- Katsuta, K., Rector, D. and Kinsella, J.E.: Viscoelastic properties of whey protein gels. *J. Food Sci.*, **55**, 512 (1990)
- Morr, C.V. and Foegeding, E.A.: Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: A status report. *Food Technol.*, **44**, 100 (1990)
- Brandenberg, A.H., Morr, C.V. and Weller, C.L.: Gelation of commercial whey protein concentrates : Effect of removal of low molecular weight components. *J. Food Sci.*, **57**, 427 (1992)
- Beuschel, B.C., Culbertson, J.D., Patridge, J.A. and Smith, D.M.: Gelation and emulsification properties of partially insolubilized whey protein concentrates. *J. Food Sci.*, **57**, 605 (1992)
- Mangino, M.E.: Gelation of whey protein concentrates. *Food Technol.*, **46**, 114 (1992)
- Schmidt, R.H. and Illingworth, B.L.: Gelation properties of whey protein and blended protein system. *Food Product Develop.*, **12**, 60 (1978)
- Etsushiro Doi : Gels and gelling of globular proteins. *Trends Food Sci. Technol. J.*, **4**, 10 (1993)
- 勝田繁子: ホエイタンパク質のゲル化. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **37**, 73 (1990)
- Mulvihill, D.M. and Kinsella, J.E.: Gelation characteristics of whey proteins and  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Technol.*, **41**, 102 (1987)
- Xiong, Y.L.: Influence of pH and ionic environment on thermal aggregation of whey proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 380 (1992)
- Gupta, V.K. and Reuter, H.: Protein solubility and gelation behavior of whey protein concentrates prepared by ultrafiltration of sweet cheese whey. *Neth. Milk Dairy J.*, **46**, 89 (1992)
- Matsudomi, N., Rector, D. and Kinsella, J.E.: Gelation of bovine serum albumin and  $\beta$ -lactoglobulin; Effects of pH, salts, and thiol reagents. *Food Chem.*, **40**, 55 (1991)
- De Wit, J.M., Klarenbeek, G. and Adams, M.: Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. *Neth. Milk Dairy J.*, **40**, 41 (1986)
- Hillier, R.M. and Cheeseman, G.C.: Effect of proteose pepton on the heat gelation of whey protein isolates. *J. Dairy Res.*, **46**, 113 (1979)
- Mulvihill, D.M. and Donovan, M.: Whey proteins and their thermal denaturation. *Irish J. Food Sci. & Technol.*, **11**, 111 (1987)
- Lyster, R. : The denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in heated milk. *J. Dairy Res.*, **37**, 233 (1970)
- Owusu, R.K.: Thermodynamic analysis of the effect of Ca on bovine  $\alpha$ -lactalbumin conformational stability. *Food Chem.*, **44**, 189 (1992)
- Eynard, L., Iametti, S., Relkin, P. and Bonomi, F.: Surface hydrophobicity changes and heat-induced modification of  $\alpha$ -lactalbumin. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1731 (1992)
- Hillier, R.M., Lyster, R.L.J. and Cheeseman, G.C.: Gelation of reconstituted whey powders by heat. *J. Sci. Food Agric.*, **31**, 1152 (1980)
- Shimada, K. and Cheftel, J.C.: Texture characteristics, protein solubility, and sulfhydryl group/disulfide bond contents of heat-induced gels of whey protein. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 1018 (1988)
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.T.: Protein measurement with the polyphenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- Apenten, R.K.O.: A three-state heat-denaturation of bovine  $\alpha$ -lactalbumin. *Food Chem.*, **52**, 131 (1995)
- Shimada, K. and Cheftel, J.C.: Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 161 (1989)
- Kuhn, P.R. and Foegeding, E.A.: Mineral salt effects on whey protein gelation. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1013 (1991)
- Foegeding, E.A., Kuhn, P.R. and Hardin, D.D.: Specific divalent cation-induced changes during gelation of  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 2092 (1992)
- Legowo, A.M., Imada, T. and Hayakawa, S.: Heat-induced gelation of the mixtures of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in the presence of glutathione. *Food Research International*, **26**, 103 (1993)
- Xiong, Y.L., Dawson, K.A. and Wan, L.: Thermal aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin: Effect of pH, ionic environment, and thiol reagent. *J. Dairy Sci.*, **76**, 70 (1993)
- Li-chan, E. and Nakai, S.: Raman spectroscopic study of thermally and/or dithiothreitol induced gelation of lysozyme. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1238 (1991)