

摘 要

蛋清具有高蛋白、零脂肪的优点，其中的蛋清蛋白氨基酸模式与人体相近，是重要的优质动物蛋白来源，由于储存运输困难，工业上多将其进行喷雾干燥制成蛋清粉（Egg white powder, EWP）。蛋清粉具有保质期长、运输成本低且易于与其他基料混合等优点，但喷雾干燥后会导致其复水性能下降，这限制了蛋清粉在食品工业中的广泛应用。本文以喷雾干燥蛋清粉（Spray-dried egg white powder, S-EWP）为主要研究对象，探究了喷雾干燥降低蛋清粉复水性的原因以及改善蛋清粉复水性能的方法，并将其应用于高蛋白发酵蛋清饮料中，主要研究内容和研究结果如下：

首先，探究了喷雾干燥对蛋清粉理化性质和复水性的影响，结果如下：S-EWP 平均粒径较小，表面疏水性较高，这可能是 S-EWP 的润湿性能降低、复水时间显著增加的原因。此外，喷雾干燥后蛋清粉颗粒呈现表面平滑的球状结构，不利于颗粒的润湿和分散。

其次，研究了酶热联合处理对蛋清粉复水性能的改善作用，主要研究了不同加热温度和中性蛋白酶的使用量对蛋清粉复水性的影响。结果表明，适当的加热处理可以通过增加 S-EWP 的粒径显著提高其 20 s 分散性（D20）和 60 s 分散性（D60）并减少复水时间，而酶水解则有利于释放具有较高电负性的多肽，从而增加复水溶液的稳定性。复水性最佳的蛋清粉制备条件为加热温度 75℃、酶使用量为 0.03%（活性单位数为 60 U/g）。在此条件下，S-EWP 的 D20、D60 和溶液稳定系数分别提高了 20.81%、61.61% 和 8.06%，复水时间减少了 61.49%。

然后，将复水性表现最佳的一组蛋清粉复水后应用于发酵蛋清饮料的生产。以未经改性的蛋清粉为对照组，探究蔗糖添加比例和乳酸菌接种量对蛋清饮料的影响。研究结果如下：经改性处理的蛋清粉复水后更有利于乳酸菌发酵的进行，这与改性蛋清粉中卵转铁蛋白的降解有关；乳酸菌发酵会通过降低蛋清饮料的 pH、中和蛋白质表面电荷以及增大蛋白聚集粒径使得体系稳定性降低。通过感官评定和快速气相电子鼻分析发现，适度发酵可改善蛋清风味，使蛋清饮料具备典型酸奶风味。感官评分最高的一组为蔗糖添加比例 6%，乳酸菌接种量 5×10^8 CFU/g。但所获得的饮料容易出现分层现象，需要进一步改善。

最后，探究了瓜尔胶和黄原胶两种多糖添加顺序和比例对发酵蛋清饮料体系的影响。通过对比发酵前和发酵后添加瓜尔胶和黄原胶，发现发酵后添加这两种多糖制备的蛋清饮料接受度更高。同一比例下，黄原胶对蛋清饮料的增稠效果及维持体系稳定性上都优于瓜尔胶。此外，由于瓜尔胶中豆腥味的存在，最后选择黄原胶为蛋清饮料体系稳定剂和增稠剂，最佳比例为 0.5%。

关键词：蛋清粉；酶热联合处理；复水性；乳酸菌发酵；发酵蛋清饮料

Abstract

Egg white is an important source of high-quality animal proteins with the advantages of high protein, zero fat and similar amino acid pattern to human body. Due to the difficulty of storage and transportation, egg white is generally spray-dried into egg white powder (EWP). EWP has the advantages of long shelf-life, low transportation cost and easy mixing with other base materials. However, spray drying will lead to the decline of the rehydration performance of EWP, which limits its wide application in the food industry. In this paper, spray-dried egg white powder (S-EWP) as the main research object, the cause of the decrease in rehydration properties of S-EWP and the corresponding solutions were explored, and the modified S-EWP was applied to fermented egg white beverage. The main research contents and results are as follows:

First of all, the effect of spray drying on the physicochemical properties and rehydration performance of EWP was explored. It was found that the average particle size/surface hydrophobicity of S-EWP was smaller/larger than that of the control group. This may be the potential reason for the decreasing dispersibility and increasing rehydration time of S-EWP. In addition, EWP presented a spherical structure with smooth surface after spray drying, which was not conducive to the wetting and dispersion of the particle.

Secondly, the effect of combined enzyme-heat treatment on the rehydration performance of S-EWP was studied, the effect of heating temperature and the ratio of neutral protease on the rehydration performance of EWP was studied. The results showed appropriate heating treatment could obviously improve D20 and D60 and reduce the rehydration time of S-EWP by increasing the particle size, whereas enzymatic hydrolysis was beneficial to the release of highly electronegative peptides, thus increasing the stability of S-EWP in water. The optimal conditions for preparing the S-EWP with high rehydration performance was obtained: the temperature was 75°C and the addition of enzyme was 0.03% (the enzyme activity was 60 U/g). In this condition, D20, D60 and coefficient of stability of S-EWP were increased by 20.81%, 61.61% and 8.06%, respectively. Besides, the rehydration time was reduced by 61.49%.

Then, the modified S-EWP with the best rehydration performance was rehydrated and applied to the production of fermented egg white beverage. With unmodified S-EWP as control group, the effects of the ratio of sucrose and inoculation amount of lactic acid bacteria on fermented egg white beverage were explored. It was found that the rehydration solution of modified S-EWP was more conducive to the fermentation of lactic acid bacteria, which was related to the degradation of ovotransferrin. The fermentation of lactic acid bacteria could reduce the

stability of the system by reducing the pH, surface charge and increasing the particle size of protein aggregation. Based on the results of sensory evaluation and rapid gas phase electronic nose analysis, it was found that moderate fermentation could improve the flavor of egg white beverage and make it have typical yogurt flavor. The highest sensory score was obtained with 6% of sucrose and 5×10^8 CFU/g of lactic acid bacteria inoculation. However, the fermented egg white beverage was prone to settle and needed to be further improved.

Finally, the effect of the adding sequence and ratio of guar gum (GG) and xanthan gum (XG) on the quality of fermented egg white beverage system was studied. By comparing the addition of GG and XG before and after fermentation, it was found that the acceptability of egg white beverage prepared by adding polysaccharides after fermentation was higher. At the same ratio, XG had stronger thickening and stabilizing effects than GG in egg white beverage. In addition, since the presence of beany smell in GG, 0.5% XG was selected as the stabilizer and thickener of fermented egg white beverage system.

Keywords: egg white powder, combined enzyme-heat treatment, rehydration performance, lactic acid fermentation, fermented egg white beverage

目 录

摘 要.....	I
Abstract	II
主要缩略词表.....	VIII
1 绪论.....	1
1.1 蛋清概述.....	1
1.1.1 蛋清蛋白	1
1.1.2 蛋清粉的加工及应用现状.....	1
1.2 复水性.....	2
1.2.1 复水性概述.....	2
1.2.2 复水性影响因素	3
1.3 复水性改善方法.....	3
1.3.1 物理法	3
1.3.2 化学法	5
1.3.3 生物酶法.....	5
1.3.4 联合处理法	5
1.3.5 蛋清粉复水性研究进展.....	6
1.4 发酵蛋清饮料概述.....	6
1.4.1 乳酸菌发酵概述	6
1.4.2 发酵蛋清饮料前景.....	7
1.5 背景与意义.....	8
1.6 技术路线.....	9
2 材料与方法.....	10
2.1 材料与设备	10
2.1.1 实验材料与试剂.....	10
2.1.2 主要仪器与设备	10
2.2 实验方法.....	10
2.2.1 样品制备	10
2.2.2 水解度（DH）测定	11
2.2.3 溶解度	12
2.2.4 20 s 分散性（D20）和 60 s 分散性（D60）	12
2.2.5 复水时间.....	12
2.2.6 溶液稳定系数（COS）	12

2.2.7 表面疏水性	13
2.2.8 粒径和 zeta 电位	13
2.2.9 总巯基含量测定	13
2.2.10 激光粒度	13
2.2.11 十二烷基硫酸-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析	13
2.2.12 傅里叶红外光谱分析 (FTIR)	13
2.2.13 差式扫描量热 (DSC) 分析	14
2.2.14 接触角分析	14
2.2.15 扫描电镜 (SEM) 分析	14
2.2.16 比表面积、孔体积和孔径分析	14
2.2.17 流变学分析	14
2.2.18 低场核磁共振分析	15
2.2.19 激光共聚焦 (CLSM) 分析	15
2.2.20 析水率分析	15
2.2.21 快速气相电子鼻分析	15
2.2.22 感官评定	15
2.3 统计学分析	16
3 结果与讨论	17
3.1 喷雾干燥对蛋清粉复水性能影响研究	17
3.1.1 喷雾干燥对蛋清粉溶解度影响	17
3.1.2 喷雾干燥对蛋清粉 20 s 分散性 (D20) 和 60 s 分散性 (D60) 影响	17
3.1.3 喷雾干燥对蛋清粉复水时间影响	17
3.1.4 喷雾干燥对蛋清粉复水溶液稳定系数 (COS) 影响	18
3.1.5 喷雾干燥对蛋清粉复水溶液粒径与电位影响	18
3.1.6 喷雾干燥对蛋清粉复水溶液表面疏水性 (H_0) 影响	19
3.1.7 喷雾干燥对蛋清粉二级结构影响	19
3.1.8 喷雾干燥对蛋清粉微观结构影响	20
3.1.9 相关性分析	21
3.1.10 小结	22
3.2 酶热联合处理对蛋清粉复水性能改善研究	22
3.2.1 水解度 (DH)	22
3.2.2 酶热联合处理对蛋清粉溶解度影响	23
3.2.3 酶热联合处理对蛋清粉 20 s 分散性 (D20) 和 60 s 分散性 (D60) 影响	23

3.2.4 酶热联合处理对蛋清粉复水时间影响	24
3.2.5 酶热联合处理对蛋清粉复水溶液稳定系数 (COS) 影响	25
3.2.6 SDS-PAGE 分析	25
3.2.7 酶热联合处理对蛋清粉复水溶液粒径和电位影响	26
3.2.8 酶热联合处理对蛋清粉复水溶液表面疏水性 (H_0) 影响	27
3.2.9 酶热联合处理对蛋清粉二级结构含量影响	28
3.2.10 酶热联合处理对蛋清粉接触角影响	29
3.2.11 酶热联合处理对蛋清粉热稳定性影响	29
3.2.12 酶热联合处理对蛋清粉微观结构影响	30
3.2.13 酶热联合处理对蛋清粉比表面积、孔体积和孔径影响	31
3.2.14 相关性分析	31
3.2.15 小结	32
3.3 发酵蛋清饮料制备条件研究	32
3.3.1 蔗糖添加比例和乳酸菌接种量对发酵蛋清饮料 pH 变化影响	33
3.3.2 蔗糖添加比例和乳酸菌接种量对发酵蛋清饮料表面疏水性影响	34
3.3.3 蔗糖添加比例和乳酸菌接种量对发酵蛋清饮料总巯基含量影响	34
3.3.4 蔗糖添加比例和乳酸菌接种量对发酵蛋清饮料粘度影响	35
3.3.5 蔗糖添加比例和乳酸菌接种量对发酵蛋清饮料粒径和电位影响	35
3.3.6 蔗糖添加比例和乳酸菌接种量对发酵蛋清饮料感官评定影响	36
3.3.7 风味物质分析	37
3.3.8 小结	40
3.4 多糖添加对发酵蛋清饮料体系影响研究	40
3.4.1 多糖添加对发酵蛋清饮料 pH 变化影响	40
3.4.2 多糖添加对发酵蛋清饮料流变学性能影响	41
3.4.3 多糖添加对发酵蛋清饮料粒径和电位影响	43
3.4.4 多糖添加对发酵蛋清饮料表面疏水性影响	45
3.4.5 多糖添加对发酵蛋清饮料水分分布影响	46
3.4.6 多糖添加对发酵蛋清饮料微观结构影响	49
3.4.7 多糖添加对发酵蛋清饮料析水率影响	50
3.4.8 多糖添加对发酵蛋清饮料二级结构影响	51
3.4.9 多糖添加对发酵蛋清饮料感官评定影响	53
3.4.10 小结	54
主要结论与展望	55
主要结论	55
展望	56

致 谢.....	57
参考文献.....	58
附录 1：作者在攻读硕士学位期间发表的论文.....	68
附录 2：附图.....	69

主要缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
EWP	Egg white powder	蛋清粉
S-EWP	Spray-dried egg white powder	喷雾干燥蛋清粉
F-EWP	Freeze-dried egg white powder	冷冻干燥蛋清粉
ANS	8-Anilino-1-naphthalenesulfonic Acid	8-苯胺-1-萘磺酸
FTIR	Fourier transform infrared spectrometry	傅里叶变换红外光谱
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoreses	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
LF-NMR	Low field-nuclear magnetic resonance	低场核磁共振
DSC	Differential scanning calorimetry	差示扫描量热法
SEM	Scanning electron microscope	扫描电子显微镜
LAB	Lactic acid bacteria	乳酸菌
GG	Guar gum	瓜尔胶
XG	Xanthan gum	黄原胶

1 绪论

1.1 蛋清概述

1.1.1 蛋清蛋白

蛋清是鸡蛋的重要组成成分，占鸡蛋总重量的 45%-60%，主要由水分（85%-88%）、蛋白质（11%-13%）、碳水化合物（0.5%）和灰分（0.8%）等组成^[1]。蛋清蛋白主要由卵清蛋白（ovalbumin, 54%）、卵转铁蛋白（ovotransferrin, 12%）、卵类粘蛋白（ovomucoid, 11%）、溶菌酶（lysozyme, 3.5%）、卵粘蛋白（ovomucin, 1.5%-3.5%）和其他微量蛋白质组成。

表 1-1 蛋清蛋白中主要蛋白质及其理化性质^[2, 3]

Tab. 1-1 The major protein and the physicochemical properties of egg white

蛋白名称	含量 (%)	等电点 pI	相对分子质量 (kDa)	变性温度 (°C)
卵白蛋白	54.0	4.5-4.8	46.0	84.0
卵转铁蛋白	12.0-13.0	6.1-6.6	76.0-86.0	61.0
卵类粘蛋白	11.0	3.9-4.3	28.0	77.0
溶菌酶	3.5	10.7	14.3	75.0
卵粘蛋白	1.5-3.5	4.5-5.1	5500.0-8300.0	-

注：“-”表示未知。

1.1.2 蛋清粉的加工及应用现状

鸡蛋是人们日常生活中主要的蛋白质来源之一，其丰富的起泡性、凝胶性和乳化性被应用于工业生产的各个方面。由于储存和运输困难，工业上常将其进行喷雾干燥制成蛋粉^[4]。随着人们对蛋粉的需求量逐渐增加，高质量蛋粉的生产和加工已经成为禽蛋深加工的重要研究方向。

在食品工业中，蛋清粉包装成本更低、更易储存和运输。蛋清干燥制粉的主要方法有冷冻干燥法和喷雾干燥法。与冷冻干燥技术相比，喷雾干燥由于耗电少、干燥时间短在蛋粉加工中应用较多。喷雾干燥的机理是：通过将物料分散成细小的液滴和增加水的蒸发面积来加速干燥过程，最后物料被高温热风干燥成粉末^[5]。

喷雾干燥是最广泛使用的商业生产蛋清粉加工方法，具备热接触时间短、蒸发速度快、可以以相对较低的成本获得高品质蛋粉的优点。蛋清粉不仅保质期长，而且需要的运输成本和储存量相对较低，是蛋清液的重要替代品。目前，工业上对于蛋清粉的应用主要集中在以下方面：

1.1.2.1 肉制品及面制品

蛋清凝胶性代表蛋清蛋白分子变性聚集形成有序三维网络结构的能力，在肉制品、面制品中发挥着重要作用。其凝胶作用表现主要集中在两个方面：一是形成粘弹性凝胶，二是可以对食品进行增稠，提高产品的持水性和稳定性^[6]。蛋清的凝胶性主要受到热处理温度、pH 和离子强度的影响。

1.1.2.2 烘焙制品

蛋清蛋白由于其两亲性，可以有效地吸附在空气-水界面上，其分子柔性可以促进界面上的构象重排，且能够形成连续的粘弹性网络，因此蛋清蛋白具有良好的发泡性能^[7]。在蛋糕等烘焙产品、冰激凌等产品中蛋清的起泡性发挥重要作用。

1.1.2.3 乳化制品

蛋清蛋白的乳化性主要表现在作为表面活性剂来防止食品中的脂肪析出，从而延长食品货架期。目前蛋清粉优良乳化性能已经被广泛应用，如在香肠、蛋糕焙烤制品和色拉调味料等方面都有良好表现^[6]。

1.2 复水性

1.2.1 复水性概述

粉末复水性，也称为粉末再水化性，可分为四个主要步骤：润湿和膨胀（根据粉末成分的不同，可能同时发生）；沉降；分散（包括块体和凝聚体的破碎以及单个颗粒的破碎）；溶解^[8]。实际上，这几个步骤通常存在不同程度的时间重叠，难以单独分离研究。

粉末润湿性是指粉末表面的气相被水取代的现象。之前的研究表明，大颗粒或团聚的粉末更易润湿^[9, 10]。较大的颗粒尺寸具有较小的颗粒-溶剂接触角，从而有利于润湿^[11]。除了物理性质外，粉末成分也会影响粉末的润湿性。例如，脂肪含量较高的粉末表面疏水性更高，导致润湿性较差^[12, 13]。相反，碳水化合物或表面活性剂等粉末表面的亲水性成分能够提高粉末的润湿性^[11, 13, 14]。

沉降性为颗粒或颗粒凝聚体沉入水面以下的能力，主要取决于颗粒大小分布、孔隙度和密度^[15]。通常情况下，大颗粒或高密度颗粒更易于沉降。高孔隙率（低密度）的大颗粒比低孔隙率（高密度）的小颗粒沉降速率更高，这是由于水在大颗粒孔隙中的毛细管润湿效应有利于颗粒沉降的发生^[16]。

分散性为粉末在水中分散的能力。粉末分散同时伴随块状物/凝聚体破碎成单个颗粒和单个颗粒二次破碎的过程^[17, 18]。两者都会导致粉末尺寸减小和比表面积的增加，从而进一步促进固体基质与水的相互作用。当溶剂施加的解离力超过颗粒粘聚力时，就会发生分散^[19, 20]。

溶解通常被认为是粉末复水最后的步骤，是指粒子将表面物质释放到水中并不断侵蚀表面，直到表面崩塌和完全溶解^[21]。它导致可溶颗粒结构完全消失，并释放所有

可溶成分（如蛋白质、矿物质等）^[20, 22, 23]。完全的粉末溶解可以得到均匀的溶液。颗粒组成对粉末的溶解有着重要影响。例如，粉末的溶解通常会因为颗粒表面存在疏水分子而延迟^[24]。

1.2.2 复水性影响因素

1.2.2.1 颗粒组成及成分

研究发现，造成奶粉溶解度较低的原因主要是酪蛋白在粉末颗粒表面形成了胶束网络^{[25], [26]}。在复水过程中，奶粉颗粒的结构崩溃和碎裂受到粉末颗粒表面酪蛋白胶束的限制^[27]。粉末中的脂质成分对粉末润湿也有较大的影响，Gaiani 等人^[28]也报道了储藏过程中脂质从粉末内部迁移到表面会增加粉末的润湿时间。

1.2.2.2 颗粒大小

研究发现在一定范围内，颗粒越大，粉末分散性越理想^[29]。Galet 等人^[30]发现可以通过湿法造粒增加颗粒大小来提高可可粉的分散速度；Lee 等人^[31]使用新方法研究脱脂奶粉的润湿性和分散性，发现颗粒尺寸最小的奶粉分散时间最长，分散性表现最差。

1.2.2.3 pH

蛋白粉的复水性容易受溶液 pH 的影响，主要与蛋白分子之间静电相互作用有关。蛋清蛋白中，卵清蛋白所占比例最大，为构成蛋清蛋白的主要蛋白，其等电点为 pH4.5。当溶液 pH 处于蛋白质等电点时，蛋白分子的正负电荷相互抵消，静电斥力消失，蛋白分子迅速产生聚集沉降，使溶液稳定性急剧下降，复水性稳定性较差。Luo 等人^[32]发现冷冻干燥前将脱脂牛奶的 pH 从 6.7 降至 5.5，其溶解度从 77%降低至 32%，将 pH 恢复至 6.7 时，这一趋势发生了逆转。

1.2.2.4 温度

温度对粉末复水性同样具有较大影响，蛋白质受热会发生聚集，但不同蛋白质表现不同，适当升高温度会促进蛋白质与水分子间的相互作用，提高蛋白粉在水中的溶解速率。Zahra 等人^[33]研究发现喷雾干燥时增加进口温度可以降低粉末含水量，提高溶解度；Cao 等人^[34]研究西瓜籽蛋白粉也有同样的发现，即在一定范围内提高入口温度时，样品溶解度也随之增加；高晓莉等人^[35]将燕麦蛋白粉在不同温度下保持后测定其溶解度，发现随温度的升高，燕麦蛋白溶解度先增加后降低。

1.3 复水性改善方法

1.3.1 物理法

1.3.1.1 喷雾干燥前向浓缩物中添加气体

在喷雾干燥之前向乳制品浓缩物中添加气体已经成为一种改善粉末复水性能的方法。在超滤前和超滤过程中向脱脂牛奶中注入二氧化碳形成碳酸从而使 pH 降低，可改善粉末复水性^[36]；同样的，在喷雾干燥前向牛奶浓缩物中注入氮气，通过改变粒度分

布也可改善粉末复水性^[37]。然而，这些操作要考虑通过注入气体对粉末本身物理特性的影响。如在喷雾干燥之前直接注入氮气会降低颗粒堆积密度，并可能产生不易流动的粘性粉末，从而给粉末的工业生产带来挑战^[38]。

1.3.1.2 高压处理

之前有研究发现对液态牛奶浓缩蛋白在特定的温度范围内（10°C-60°C）施加一定范围的压力（100 MPa-400 MPa）后进行喷雾干燥，粉末溶解度可得到显著改善^[39]。另外也有研究表明在压力为 150 Mpa 时酪蛋白胶束发生解离，由此牛奶浓缩蛋白粉的复水性得到显著提升^[40]。

1.3.1.3 超声处理

超声处理在食品加工中通常有两种表现形式：低频（16 kHz-100 kHz）高场强（10 Wcm⁻²-1000 Wcm⁻²）以及高频（100 kHz-1 MHz）低场强（<1 Wcm⁻²）^[41]。Chandrapala 等人^[42]比较了高场强超声处理（20 kHz，31W，振幅为 50%）、高压均质（80 bar 或 200 bar）和高速剪切（17500 rpm）处理的喷雾干燥粉的复水性，发现三种预处理方法都能提高喷雾干燥粉末颗粒结构的崩解和组成成分释放速率，且短时高场强超声处理 5 min 就能取得理想的效果；McCarthy 等人^[43]研究了高场强超声处理（20 kHz，70.2W，振幅 100%）与顶部搅拌（450 rpm）对粉末复水性的影响，从粒径分布和溶解度的角度发现高场强超声处理比顶部搅拌处理对改善粉末复水性更有效。但超声处理系统的安装成本较高，难以纳入一个连续的工业过程，且随着时间推移，产品可能会腐蚀超声探头，造成产品污染。

1.3.1.4 膜过滤：微滤、超滤和纳滤

Gao 等人^[44]比较了纳滤或蒸发浓缩处理对粉末溶解度的影响，发现由于在蒸发过程中颗粒的热聚集显著，经纳滤处理的粉末溶解度显著高于后者；Crowley 等人^[45]研究了在 10°C 和 50°C 两种温度下进行膜过滤后生产的脱脂牛奶粉末的复水性，发现由于 10°C 处理后释放的酪蛋白胶束更多，粉末分散性较高。但过滤膜的维护可能需要较高的成本，因此在工业生产中应用受限。

1.3.1.5 流化床造粒

流化床造粒是将粘结剂作为溶液、悬浮剂或熔体喷洒到流化态粉末床上以获得颗粒的过程^[11]。在喷雾干燥接近尾声时，在流化床中进行团聚时，常用造粒这一术语来描述使用粘结剂将粉末颗粒连接在一起的过程。根据适用的粘合剂的类型，液桥可以通过冷却固化，也可以通过加热干燥形成固桥。Ji 等人^[11]在流化床系统中使用水或乳糖溶液作为粘合剂制备颗粒状牛奶分离蛋白粉末，发现用乳糖团聚的牛奶分离蛋白粉末润湿性明显提高，但未改善分散性和溶解性；吴绍松等人^[13]在流化床造粒时将表面活性剂（Tween 80 和卵磷脂）喷洒到牛奶分离蛋白粉末上，降低了溶液的表面张力，明显降低了润湿时间，但也未显著改善分散性和溶解性。

1.3.1.6 热处理

热处理会诱导蛋白质分子结构的展开, 促进蛋白质分子的聚集的发生^[46]。热变性的蛋清蛋白在不同的静电斥力和吸引力(包括疏水相互作用和二硫键)平衡下会形成各种聚集体^[47]。蛋白质分子聚集状态的变化会改变其复水特性。在大多数情况下, 蛋白质热变性会因为不溶聚集体的增加导致溶解度下降^[48], 但其粉末分散性会被明显提高^[22, 31]。Davenel 等人^[49]研究发现, 提高温度可以改善牛奶浓缩蛋白的溶解度, 从而增加向粉末颗粒内部转移的水。Janet 等人^[50]通过研究发现温度升高 4°C 对粉末复水的影响与搅拌速度从 400 rpm 增加至 800 rpm 相同; Richard 等人^[29]也发现温度变化对粉末复水过程有显著影响。

1.3.2 化学法

1.3.2.1 调节 pH

刘达松等人^[51]在膜过滤之前对溶液进行酸化(调整 pH 为 6.7, 6.0, 5.7 和 5.4), 然后在喷雾干燥之前直接恢复 pH 值, 发现脱脂牛奶的溶解度随酸化 pH 的降低而增加, 且可以减少储存引起的溶解度损失; Panthi 等人^[52]在冷冻干燥前提高了溶液 pH(将 pH 从 6.9 调节至 7.3 和 7.6), 发现随 pH 的增加粉末润湿性较低, 但分散性有所提高。

1.3.2.2 盐离子的使用

研究表明在浓缩乳制品中加入盐离子, 也可以通过降低溶液中钙含量改善粉末溶解度。孙彦君等人^[53]在膜过滤之前向脱脂牛奶中加入柠檬酸三钠和焦磷酸钠, 显著降低溶液钙含量的同时提高了溶解性; McCarthy 等人^[54]将六偏磷酸钠和柠檬酸钠加入复水后的脱脂牛奶溶液中, 发现可以显著改善粉体的分散性。Vink 等人^[55]发现随着在溶液中添加 NaCl 浓度的增加, 蛋白表面暴露的疏水区显著增加, 二硫键显著减少, 粉末溶解度显著增加。但使用离子交换剂和钙结合剂可能会改变粉末的营养特性并引入其他物质, 因此可能会影响消费者的接受程度。

1.3.3 生物酶法

生物酶法可以通过对蛋白进行水解, 增加其水结合位点, 从而改善高蛋白粉末颗粒的复水性能^[56, 57]。限制性酶处理已被广泛用于蛋白质功能性质的改善, 如可通过碱性蛋白酶对蛋黄蛋白改性增加其分散稳定性^[58], 用风味蛋白酶和中性蛋白酶提高牛奶分离蛋白的复水性^[59]。Banach 等人^[60]用三种消化酶(糜蛋白酶, 胰蛋白酶和木瓜蛋白酶)和一种半胱氨酸蛋白酶对牛奶浓缩蛋白进行酶解处理, 显著提高了粉末的溶解度; Ryan 等人^[61]研究了风味蛋白酶、中性蛋白酶和复合蛋白酶对牛乳分离蛋白的影响, 发现 pH 在 4.0-7.0 时, 水解产物的溶解度显著提高, 但热稳定性降低。

1.3.4 联合处理法

Schafer 等人^[62]使用膜过滤和 pH 调节来生产低钙浓缩牛奶蛋粉末, 具体操作为通

过膜过滤将脱脂奶的 pH 值调节至 6.2，然后将截留物 pH 酸化到 5.6，显著提高了粉末溶解度；Power 等人^[63]通过谷氨酰胺酶和六偏磷酸钠对浓缩牛奶进行联合处理，显著改善了粉末复水性能。

1.3.5 蛋清粉复水性研究进展

当前粉末复水性的改良多集中在乳粉以及植物蛋白粉中，对于蛋清粉复水性的研究相对较少。近年来，随着人们消费观念以及对健康饮食的看重，蛋清粉作为一种高蛋白、低热量的原料逐渐受到消费者的青睐。例如，张婷等人^[64]研究了蛋清粉与不同浓度的大豆卵磷脂进行湿混或干混之后蛋清粉的复水性表现，发现湿混合后蛋清粉复水溶液具有较高的净负电荷和较小的粒径，能够更快实现粉末复水，但混合工序是在喷雾干燥之后，需要投入额外的加工设备，生产成本较高；李培山等人^[65]研究了微波结合磷酸化修饰对蛋清粉复水性的影响，发现经处理后蛋清粉在碱性条件下的表面疏水性降低，电负性增加，润湿性、分散性和溶解性都有所提高，但微波设备投资大，且磷酸化修饰会引入化学基团，引发食品安全问题，因此应用性受限；刘亚平等人^[21]使用超声辅助脱酰胺的方式处理蛋清液，发现脱酰胺后粉末复水性显著增加，但超声处理需要考虑超声设备的安全性和维护成本问题。

1.4 发酵蛋清饮料概述

1.4.1 乳酸菌发酵概述

乳酸菌是一种对宿主具有潜在益生作用的细菌，可利用可溶性碳水化合物产生大量乳酸，并通过降解蛋白质和脂类产生多种必需氨基酸和维生素。在发酵过程中，乳酸菌还可通过利用发酵液中的营养物质产生典型风味。不同菌种生长代谢方式不同，生成的风味成分和含量也不同。之前的研究发现，嗜热链球菌的发酵时间越长，生成的 2, 3-丁二酮含量越高，发酵液的“奶油香气”越浓厚；当向含有戊糖乳杆菌的发酵液中添加木糖时，可以显著提高酸奶中的 2, 3-丁二酮和乙酸含量^[66]。

研究发现，乳酸菌发酵产生风味的途径有三种：（1）乳酸发酵、代谢及柠檬酸代谢：乳酸发酵分为同型乳酸发酵和异型乳酸发酵两种。同型乳酸发酵只有乳酸一种产物，异型乳酸发酵还产生乙醇或乙酸，乳酸也可进一步代谢形成乙醛、乙酸和乙醇等物质；柠檬酸代谢主要产生酸奶的特征风味物质 2, 3-丁二酮。（2）蛋白质水解和氨基酸代谢：部分乳酸菌可将水解发酵体系中原有的氨基酸或水解蛋白质产生的游离氨基酸通过转氨作用生成 α -酮酸，进一步形成醛类和酯类等。（3）脂质分解：饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸经氧化降解可产生酯类、酸类和醇类等^[66]。由于乳酸菌发酵会产生令人愉悦的感官风味，因此乳酸菌发酵作为一种常用的改善风味的手段，在许多饮料生产方面应用广泛：有研究表明将豆乳用干酪乳杆菌和瑞士乳杆菌发酵，会使挥发性风味化合物数量增加^[67]，显著降低豆腥味；Cases 等人^[68]将嗜酸乳杆菌应用于发酵饮料的

生产，在改善风味的同时提高了消费者的接受度；绪亚鑫等人^[69]用乳酸乳球菌、嗜热链球菌和梅利斯丛梗孢酵母对全蛋液发酵生产蛋挞，发现经发酵蛋液制备的蛋挞呈现独特的芳香风味。

保加利亚乳杆菌（*Lactobacillus bulgaricus*）和嗜热链球菌（*Streptococcus thermophilus*）是乳酸菌发酵中常用的两种菌，在发酵过程中，两种乳酸菌存在协同作用^[70]，长期以来被用于生产酸奶等产品。研究表明，保加利亚乳杆菌在生长时可通过胞外蛋白酶降解蛋白质生成肽段和氨基酸为嗜热链球菌提供能量，而嗜热链球菌则通过代谢产生甲酸盐和二氧化碳供保加利亚乳杆菌生长^[71]。两种乳酸菌共同使用时，产酸量明显高于使用单一菌种进行发酵。

1.4.2 发酵蛋清饮料前景

乳酸菌发酵饮料作为一种备受消费市场欢迎的饮料，主要有以下优势：乳酸菌发酵饮料中蛋白质含量丰富，可经乳酸作用被分解成多肽类等易被消化酶作用和被机体吸收的物质；通过将牛奶中的乳糖发酵成乳酸，可防止乳糖不耐症人群发生腹泻现象；另外，乳酸可抑制有害微生物的繁殖，促进胃肠蠕动，还可赋予产品特殊风味，增加产品口感^[72]。

近年来，国内外对于鸡蛋发酵产品的研究和应用十分重视，根据其生产技术、原料以及产品品质，发酵产品的性质和功能都不相同。过去对乳酸菌发酵蛋品的研制主要集中在以蛋液和牛乳的混合物为原料接种乳酸菌发酵制成鸡蛋酸奶。国外在七八十年代已经开展了关于蛋品发酵饮料的研究，例如 Cunningham 等人^[73]将全蛋液或蛋清液与低脂牛奶混合后进行发酵，得到鸡蛋酸酪乳。Lilian 等人^[74]将蛋清加入到全脂牛奶中，改善了酸奶的化学和感官特性。在国内，研究者们多使用牛乳与蛋清的混合液作为发酵原料进行蛋酸奶的生产。如魏元等人^[72]以蛋清为主要原料，加入酸牛奶和糖类发酵，确定了最佳发酵条件：乳酸菌接种量 3%、发酵温度 42℃、时间 24 h；王薇等人^[75]向蛋清中加入牛乳和糖类，进行乳酸发酵，确定了混合菌的配比、接种量、牛乳添加量等。最近，关于乳酸菌发酵在蛋清功能和性质方面的应用提升逐渐成为研究热点：陈杰等人^[76]用植物乳杆菌对脱溶菌酶蛋清进行适当发酵，制备了一款具有乳酸菌发酵风味的蛋白干产品；郑洁霞^[77]将蛋清进行 80℃ 处理 15 min 后，用多种乳酸菌发酵蛋清来验证其对蛋清抗氧化能力的提升，发现植物乳杆菌和副干酪乳杆菌对蛋清抗氧化能力提升效果最显著。

蛋清作为一种高蛋白食品原料，具备营养价值和性价比高的优点。但是蛋品发酵饮料生产和消费量不及牛乳饮料，主要原因有以下几点：一、高蛋白含量下蛋清蛋白受热易凝固，无法进行有效巴氏杀菌；二、蛋清中缺乏微生物生长所需的速效碳源或氮源^[59]。三、蛋清中溶菌酶和卵转铁蛋白等抗菌蛋白的存在，抑制了乳酸菌等益生菌的发酵^[77]。这些缺点给蛋清饮料生产带来很大挑战。作为食品发酵行业的重要微生物，乳酸菌可通过自身复杂的代谢系统赋予食品更丰富的功能。目前，乳酸菌已经被用于

发酵生产酸奶、香肠和大豆等^[77]，但乳酸菌在蛋清发酵方面研究相对较少，还存在很大发展空间。

1.5 背景与意义

鸡蛋营养丰富，价格低廉，氨基酸模式与人体相近，是人类最好的营养来源之一。鸡蛋蛋清是一种以水为分散介质、以蛋白质为分散相的胶体物质。蛋清中蛋白质含量约为 11%-13%，主要成分包括卵清蛋白、卵转铁蛋白、溶菌酶、卵粘蛋白、卵球蛋白等。目前，液态蛋清多存在储存时间短、易受微生物污染、深加工不足等缺点，为方便存储，工业上多通过喷雾干燥将其制成蛋清粉。蛋清粉不仅保留了蛋清的全部营养，而且还能明显减少蛋清液在运输过程中的重量，解决蛋清液易变质的弊端，利于储藏和运输。但蛋清蛋白粉由于其蛋白含量高、颗粒细小、表明粗糙度不足等因素，在溶解过程中易结块，不利于其复水分散。因此，蛋清粉应用于蛋白饮品受到极大的限制。

有效复水是发挥蛋清粉的潜在功能的先决条件。由于喷雾干燥后蛋清粉颗粒过小而抑制了水分向粉末颗粒的迁移，得到的蛋清粉复水时间较长，且复水溶液稳定性较差。目前，有关蛋清粉性质的研究主要集中在凝胶性、发泡性和乳化性改善方面，针对其复水性研究相对较少，因此改善蛋清粉复水性对于丰富蛋清粉原料品种、扩大其应用范围具有十分重要的意义。

本课题探究了喷雾干燥后蛋清粉复水性下降的原因，通过酶热联合处理技术对蛋清蛋白进行改性，将蛋清蛋白先进行热聚集，然后使用少量中性蛋白酶对蛋清蛋白聚集体进行水解，对其理化性质和复水性进行评价，得到一种高复水性蛋清粉；在此基础上，将所得的高复水性蛋清粉应用于发酵蛋清饮料的生产，通过研究蔗糖添加比例和乳酸菌接种量确定了发酵蛋清饮料的制备条件；然后通过对比发酵前后不同比例的瓜尔胶和黄原胶的添加对蛋清饮料体系的影响，制备出一款蛋白含量高且富含酸奶风味的蛋清饮料，符合当代消费的健康理念。

1.6 技术路线

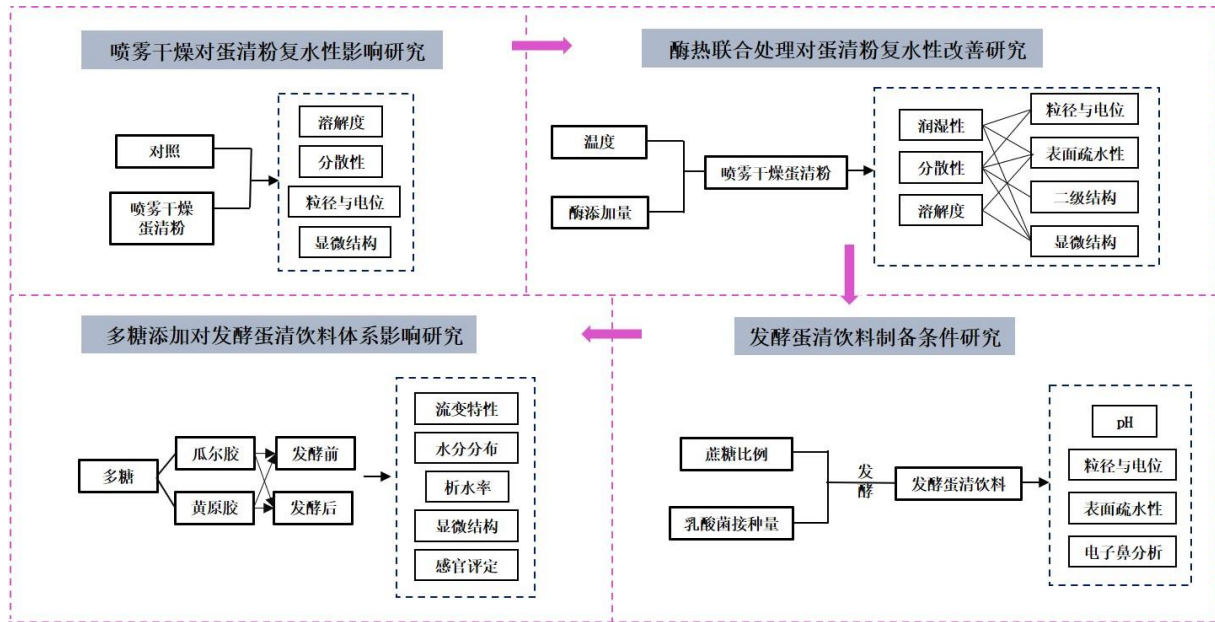


图 1-1 技术路线图

Fig. 1-1 Technical route

2 材料与方法

2.1 材料与设备

2.1.1 实验材料与试剂

新鲜鸡蛋，购自江苏无锡天惠超市；电泳蛋白 Marker (PR1950)，4×蛋白上样缓冲液（还原性），购自北京索莱宝科技有限公司；保加利亚乳杆菌 LB42 (5×10^{10} CFU/g)、嗜热链球菌 ST81 (1×10^{11} CFU/g)，购自苏州微康益生菌股份有限公司；枯草芽孢杆菌中性蛋白酶 (2×10^6 U/g)，购自南宁庞博生物工程有限公司；邻苯二甲醛 (OPA)、二硫代苏糖醇 (DTT)、1-萘磺酸-8-苯胺基 (ANS)、L-丝氨酸和 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 购自 Sigma-Aldrich 公司；其他分析纯化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

2.1.2 主要仪器与设备

AB204-N 分析天平，瑞士梅特勒-托利多公司；C-MAG MS7 磁力搅拌器，德国 IKA 公司；AH-2010 均质机，加拿大 ATS 工程公司；Centrifuge 5430R 冷冻离心机，德国 Eppendorf 公司；冷冻干燥机，美国 Labconco 公司；pH 计，瑞士梅特勒-托利多公司；Zetasizer nano ZS 纳米粒度及电位仪，英国马尔文公司；F-7000 荧光光谱仪，日本日立公司；S3500 激光粒度分析仪，美国 Microtrac 公司；DHR-3 流变仪，美国沃特世公司；UH-5300 紫外分光光度计，日本日立公司；FTIR IS10 型傅里叶红外光谱仪，美国 Nicolet 公司；MOBILE MINOR 喷雾干燥机，基伊埃工程技术有限公司；MessoMR23-060V-I 低场核磁共振成像分析仪，北京纽曼公司；SU8100 冷场发射扫描电子显微镜，日本株式会社日立高新技术公司；LSM 710 激光共聚焦显微镜，德国蔡司有限公司；视频光学接触角测量仪，德国德菲仪器股份有限公司；DSC3 差式扫描量热仪，瑞士梅特勒-托利多公司；快速气相色谱电子鼻，法国 Alpha MOS S.A 公司。

2.2 实验方法

2.2.1 样品制备

将从超市选购的新鲜鸡蛋破壳，分离蛋清与蛋黄，蛋清留下备用。使用 T25D S25 高速剪切机将蛋清液剪切均匀，速度 5000 r/min，处理时间为 5 min。随后用 100 目筛网过滤蛋清液，除去其中的杂质与泡沫，用 5% (w/v) 无水柠檬酸调节 pH 至 7.0^[78]。

2.2.1.1 蛋清粉 (EWP) 制备

将 2.2.1 中制备所得蛋清用喷雾干燥机进行干燥，分别设置入口和出口温度为

180°C 和 80°C，蠕动泵流速 15 rpm，干燥后收集备用。

对照组蛋清粉制备：将上述处理过的蛋清倒入玻璃平皿，-40°C 预冻过夜后，放入冷冻干燥机中进行冻干处理。

2.2.1.2 酶热联合处理蛋清粉制备

将 2.2.1 中制备所得蛋清液分为 A 组和 B 组，A 组蛋清液先在不同温度（65°C、70°C、75°C）下加热 5 min，然后将中性蛋白酶以 0.03%（w/v）的比例加入到蛋清液中，在 50°C 的酶反应器中反应 4 h。B 组蛋清液先在 75°C 下加热 5 min，然后加入一定量的中性蛋白酶（0.01%、0.03%、0.05%，w/v），在 50°C 的酶反应器中反应 4 h。同时，以普通蛋清液作为对照。不同温度（65°C、70°C、75°C）处理的样品分别命名为 65+0.03、70+0.03、75+0.03。添加不同酶的样品分别命名为 75+0.01、75+0.03 和 75+0.05。最后，通过喷雾干燥得到蛋清粉，参数设置同 2.2.1.1。

2.2.1.3 发酵蛋清饮料的制备

将 2.2.1.2 中制备所得蛋清粉用去离子水溶解制成蛋清粉复水溶液（蛋白浓度 10%，w/v），置于超净台紫外杀菌 5 h 后分别加入 2%、4% 和 6% 的蔗糖，并分别接种 8×10^7 CFU/g、 2.5×10^8 CFU/g、 5×10^8 CFU/g 的乳酸菌（保加利亚乳杆菌 LB42：嗜热链球菌 ST81=1:1），放入 42°C 培养箱培养，发酵体积为 30 mL。将蔗糖比例为 2%、乳酸菌接种量为 8×10^7 CFU/g 的组别命名为 LF-287，其他组按照蔗糖和乳酸菌接种量的不同分别命名为 LF-228、LF-258、LF-487、LF-428、LF-458、LF-687、LF-628 和 LF-658，将 75+0.03 组蛋清粉复水溶液（未加蔗糖、乳酸菌接种量为 5×10^8 CFU/g）命名为 LF-75。以普通蛋清粉复水溶液（未加蔗糖、乳酸菌接种量为 5×10^8 CFU/g）为对照组。

2.2.1.4 发酵蛋清饮料（加多糖）的制备

在蔗糖比例为 6%、乳酸菌接种量为 5×10^8 CFU/g 的情况下，以 75+0.03 组蛋清粉复水溶液（蛋白浓度 10%，w/v）为对照组，通过发酵前和发酵后分别加 0.1%、0.3% 和 0.5% 的瓜尔胶和黄原胶的方式制备发酵蛋清饮料。将发酵前加 0.1%、0.3%、0.5% 瓜尔胶（GG）和黄原胶（XG）的组别分别命名为 0.1GG+LF、0.3GG+LF、0.5GG+LF、0.1XG+LF、0.3XG+LF 和 0.5XG+LF；发酵后添加 0.1%、0.3%、0.5% 瓜尔胶（GG）和黄原胶（XG）的组别分别命名为 LF+0.1GG、LF+0.3GG、LF+0.5GG、LF+0.1XG、LF+0.3XG 和 LF+0.5XG。

2.2.2 水解度（DH）测定

参照 Tang 等人^[79]的方法对蛋清蛋白水解度进行测定。将 0.5 g 蛋清粉溶于 10 mL 去离子水中，置于磁力搅拌器上搅拌至完全溶解。将样品稀释后取 300 μ L 与 3 mL 邻苯二甲醛（OPA）试剂混合，黑暗中反应 2 min 后，于 340 nm 下测量吸光度，根据公式（1）得到蛋清蛋白水解度。

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100 = \frac{w_{\text{NH}_2} - \beta}{\alpha h_{\text{tot}}} \quad (1)$$

其中, h 是指单位重量的蛋白质中断裂的肽键的量 (mmol/g); h_{tot} 是指单位重量的蛋白质中肽键的总量 (8 mmol/g); w_{NH_2} 是指单位重量的蛋白质(mmol/g)中 NH_2 的量; $\alpha = 1.0$, $\beta = 0.4^{[80]}$ 。

2.2.3 溶解度

参照 Gu 等人^[58]的方法对蛋清粉的溶解度进行测定。将 0.5 g 蛋清粉溶于 10 mL 去离子水中, 置于磁力搅拌器上搅拌至完全溶解后, 5000 g/min 离心 15 min, 稀释后与双缩脲试剂混合, 静置 30 min, 于 540 nm 下测定上清液和蛋清粉溶液的吸光值^[81]。以牛白蛋白为标准蛋白制作标准曲线, 通过标准曲线方程计算得到样品蛋白浓度。

标准曲线: $y = 0.0505x + 0.006$ ($R^2 = 0.9994$)

$$\text{溶解度 (\%)} = \frac{C_1}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

其中, C_1 和 C_0 分别代表上清液和蛋清粉溶液的蛋白浓度。

2.2.4 20 s 分散性 (D20) 和 60 s 分散性 (D60)

根据 Wang 等人^[82]的方法进行测定。将 0.5 g 蛋清粉分别放入盛有 10 mL 去离子水的烧杯中, 在 700 r/min 下分别搅拌 20 s 和 60 s 后, 立即用 200 目筛过滤溶液。将滤液和溶液进行适当稀释后, 取 1 mL 样品与 4 mL 双缩脲试剂反应 30 min 后, 于 540 nm 下测定吸光值, 对应标准曲线计算出对应的蛋白浓度。D20 和 D60 通过下式表示:

$$\text{D20 (\%)} = \frac{A_1}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{D60 (\%)} = \frac{A_2}{A_0} \times 100 \quad (4)$$

其中, A_1/A_2 分别代表搅拌 20 s/60 s 后样品滤液中的蛋白浓度, A_0 是未过滤蛋清粉复水溶液中的蛋白浓度。

2.2.5 复水时间

蛋清粉的复水时间根据 Zhao 等人^[83]的方法进行测定, 并稍加修改。将 0.5 g 蛋清粉放入盛有 10 mL 去离子水的 25 mL 烧杯中, 设置磁力搅拌器的转速为 700 r/min, 用计时器记录蛋清粉从最初接触空气-水界面开始到完全浸入水中润湿的时间即为复水时间。

2.2.6 溶液稳定系数 (COS)

COS 根据 Gu 等人^[58]的方法进行测定。1 g 蛋清粉分散于 20 mL 去离子水中, 经搅拌 20 min 后以 5000 g/min 离心 15 min 后取上清液稀释, 使用紫外光谱仪在 280 nm 处测定样品的吸光度, 通过下列公式计算蛋清粉复水溶液的 COS 值:

$$\text{COS (\%)} = \frac{W_1}{W_0} \times 100 \quad (5)$$

其中, W_1 和 W_0 分别代表上清液和蛋清粉溶液的吸光度。

2.2.7 表面疏水性

蛋白质的表面疏水性采用 1-萘磺酸-8-苯胺基 (ANS) 荧光探针法进行测定^[78]。将 20 μ L ANS 水溶液 (8 mmol/L) 与 4 mL 样品 (蛋白浓度为 0.5 mg/mL) 混合, 并将混合物在黑暗中静置 15 min。使用 F-7000 荧光光谱仪测量荧光强度, 扫描波长设置为 400-600 nm, 激发波长为 390 nm。外源荧光光谱的峰值荧光强度作为样品的表面疏水性数值。

2.2.8 粒径和 zeta 电位

根据 Chen 等人^[84]的方法测定样品的粒径与 zeta 电位值, 并稍作修改。使用去离子水将蛋清粉复水溶液浓度稀释至 0.5 mg/mL, 在 25°C 下平衡 60 s 后, 使用纳米粒度及 ZETA 电位分析仪测定样品粒径和电位, 将三次测量后的数据平均值作为样品的平均粒径和电位值。

2.2.9 总巯基含量测定

参考 Hunt 等人^[85]的方法, 做了一些修改。将样品浓度稀释到 2 mg/mL, 取 0.5 mL 稀释液与 2 mL PBS (pH7.0, 0.5% SDS, 8 mol/L 尿素) 和 50 μ L Ellman 试剂 (pH7.4, 10 mmol/L DTNB 溶解到 PBS 缓冲液中) 混合, 在 40°C 静置 15 min, 于 412 nm 处测量样品的吸光值。总巯基含量的计算如下:

$$SH (\mu \text{ mol/g}) = \frac{73.53 \times A_{412} \times D}{C} \quad (6)$$

其中, A_{412} 表示样品在 412 nm 下的吸光值, D 表示稀释倍数 (5.1), C 为样品中蛋白浓度。

2.2.10 激光粒度

使用 S3500 激光粒度分析仪测量发酵蛋清饮料的粒度分布。

2.2.11 十二烷基硫酸-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析

蛋清粉中蛋白组成变化采用 SDS-PAGE 进行分析^[86]。将样品蛋白浓度稀释至 2 mg/mL, 取 30 μ L 样品与 10 μ L 的 4 $\times$ 上样缓冲液混合, 在 100°C 加热 5 min 后取 10 μ L 加入加样孔。使用 5% 的浓缩胶和 12% 的分离胶进行电泳。将浓缩胶电压设置为 80 V, 分离胶电压设置为 120 V。电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 对电泳胶染色 20 min, 再使用脱色液洗脱至条带清晰。

2.2.12 傅里叶红外光谱分析 (FTIR)

将蛋清粉与干燥的溴化钾粉末以 1:100 (w/v) 的比例混匀后, 研磨后使用压片机

将其碾压成透明薄片^[87]。将样品薄片放置在傅里叶红外光谱仪中进行扫描测试，设置扫描波段 4000-400 cm^{-1} ，扫描次数 32 次，分辨率 4 cm^{-1} 。使用 OMNIC V8.0 软件处理扫描图谱，选取 1700-1600 cm^{-1} 波段用 PeakFit v4 软件进行计算，得到各样品二级结构占比。

2.2.13 差式扫描量热（DSC）分析

将蛋清粉与去离子水以 1:3 (w/v) 的比例混合后，称取约 5 mg 样品放入铝制坩埚中，以空坩埚为对照，使用 DSC3 差示扫描量热仪进行蛋清蛋白的热变性分析^[83]。设置加热温度为 30-100°C，升温速度为 5°C/min。通过分析热变性曲线得到热变性峰值温度 (T_d) 以及对应的焓变值 (ΔH)。

2.2.14 接触角分析

参照 Li 等人^[65]的方法计算样品的接触角。将预先用压片机压好的厚度约 2 mm 的蛋清粉薄片放置在测试平台上。将 OCA15EC 自动注射器控制系统的水滴体积设置为 2 μL ，并记录 0 s、1 s、5 s、10 s、30 s、60 s、90 s 和 120 s 时的接触角数值。每个样本至少重复 5 次。

2.2.15 扫描电镜（SEM）分析

参照 Bao 等人^[88]的研究方法，将样品粉末洒在样品台上，在样品表面引导气流将粉末铺平，喷金后在 3 kV 下观察蛋清粉的表面和微观结构^[88]。

2.2.16 比表面积、孔体积和孔径分析

将蛋清粉样品在 150°C 下脱气 8 h，用 Micromeritics ASAP 2460 BET 系统测定氮气的吸附-脱附等温线和比表面积。采用 Brunauer-Emmett-Teller (BET) 模型计算样品的比表面积、孔体积和孔径。

2.2.17 流变学分析

参照 Sun 等人^[4]的方法并进行适当修改，使用 DHR-3 流变仪测定发酵蛋清饮料的流变学行为。

2.2.17.1 表观粘度测定

使用直径 40 mm 的铝板，设置平板与底面间隙为 1.0 mm。在剪切速率为 0.01-100 s^{-1} 的范围内进行测定。

2.2.17.2 频率扫描

首先进行应变扫描实验，在线性粘弹范围内选择 0.1% 的应变在 0.1-10 Hz 的频率范围进行频率扫描测试。

2.2.18 低场核磁共振分析

基于 Sun 等人^[89]的测量方法并稍加修改。准确量取 1.5 mL 样品于 2 mL 离心管中，将其放入核磁共振仪中，选择直径为 25 mm 的玻璃管。弛豫时间（ T_2 ）和面积分数（ P_2 ）使用 CPMG 序列进行确定。设置测定参数：回声时间（TE）0.5 ms，等待时间（TW）2500 ms，扫描重复次数（NS）为 4，前置放大倍数（PRG）为 1，回波次数（NECH）为 5000。

2.2.19 激光共聚焦（CLSM）分析

取 100 μ L 样品，加入 10 μ L 0.1%（w/v）的尼罗蓝溶液在黑暗中染色 30 min。取 5 μ L 染色后的样品于显微镜载玻片上进行观察并保存图像，放大倍数为 40 倍。

2.2.20 析水率分析

用析水率来表征发酵蛋清饮料的稳定性。准确称取 10 g 样品于 15 mL 离心管中，5000 g/min 离心 15 min，弃去上清液，分别称取离心前后样品质量。所有实验重复三次，根据以下公式计算析水率。

$$\text{析水率 (\%)} = \frac{M_0 - M_1}{M_0} \times 100 \quad (7)$$

其中， M_1 表示离心后沉淀物质量， M_0 表示离心前样品总质量。

2.2.21 快速气相电子鼻分析

将待测蛋清粉样品溶解后，取 5 mL 样液装入顶空进样瓶中，参照陈杰等人^[76]的方法使用快速气相色谱电子鼻进行测定。参数设置：进样量 2000 μ L，顶空萃取温度 60°C，柱温 50°C，数据采集时间 177 s。

2.2.22 感官评定

根据预期目标，对发酵蛋清饮料的口感、组织状态、色泽、风味进行了打分，感官总分根据各项评定分数的总和得到。根据之前的方法^[90]，具体参照以下评定标准：

表 2-1 发酵蛋清饮料感官评分标准

Tab. 2-1 The sensory scoring standard of fermented egg white beverage

	评分标准	分值
口感	甜度适中，细腻顺滑	20-30
	酸甜不佳，口感粗糙	10-19
	过酸或过甜，难以忍受	0-9
组织状态	流动性好，少量或无蛋清析出	25-30
	有蛋清析出，表面柔滑	15-25
	有大量蛋清析出	0-14
色泽	乳白色且颜色均匀	10-15
	微泛黄，颜色较均匀	5-9
	颜色不均匀且差距大	0-4
风味	有发酵酸奶风味，无异味	15-25
	有发酵酸奶风味，略有蛋腥味	10-14
	有严重蛋腥味或其他不良风味	0-9

2.3 统计学分析

本研究中除特殊注明外，其余每次试验均重复三次，应用 SPSS 软件（美国纽约 IBM 公司）进行显著性差异分析和相关性分析。

3 结果与讨论

3.1 喷雾干燥对蛋清粉复水性能影响研究

3.1.1 喷雾干燥对蛋清粉溶解度影响

粉末溶解度是评价粉末复水性能的重要指标之一。以冷冻干燥蛋清粉（F-EWP）为对照，图 3-1 展示了喷雾干燥蛋清粉（S-EWP）的溶解性。如图所示，对照组的溶解度为 97.76%，S-EWP 的溶解度为 99.79%，二者无显著性差异（ $p>0.05$ ），说明喷雾干燥对蛋清蛋白的溶解度影响较小。

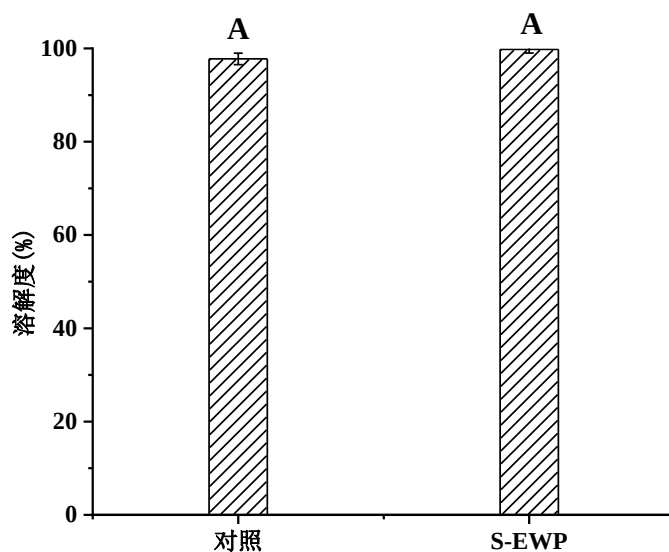


图 3-1 蛋清粉的溶解度

Fig. 3-1 The solubility of EWP

3.1.2 喷雾干燥对蛋清粉 20 s 分散性（D20）和 60 s 分散性（D60）影响

分散性是评价粉末复水性能的另一重要指标。如图 3-2A 所示，对照组的 D20 和 D60 分别为 57.26% 和 58.65%，而 S-EWP 的 D20 和 D60 较低，分别为 25.62% 和 26.86%。这表明喷雾干燥会使蛋清粉的分散性下降。这可能是因为喷雾干燥方式改变了蛋清粉的结构，不易进行吸水润湿，需要更长的时间在水中分散开。

3.1.3 喷雾干燥对蛋清粉复水时间影响

如图 3-2B 所示，对照组的复水时间为 267 s，而 S-EWP 的复水时间为 322 s，这表明 S-EWP 具有更差的复水表现。这可能与 S-EWP 颗粒粒度更小，更易因吸水结块而延长复水过程有关。另外，这可能与 S-EWP 颗粒状态有关。一般而言颗粒呈球状，表面平滑，凹凸褶皱较少，不利于与水分接触。Richard 等人^[29]研究发现，颗粒状粉末比非

颗粒状粉末需要更长的复水时间，这可能与喷雾干燥后蛋清粉复水时间延长有关。

3.1.4 喷雾干燥对蛋清粉复水溶液稳定系数（COS）影响

COS 常用来表征分散颗粒在溶液中的抗团聚和抗沉淀性。如图 3-2B 所示，对照组的 COS 为 92.05%，S-EWP 复水溶液的 COS 显著降低（88.20%）。这可能是因为 S-EWP 溶液中存在更多的絮状不溶物，从而在溶液中更易发生沉淀，使 COS 降低。另外研究表明，COS 与绝对电势有关^[91]。一般而言，溶液的绝对电势越高，其 COS 越高，溶液稳定性越好，分散体越不易发生聚集和沉降，溶液越不容易发生分层。S-EWP 复水溶液 COS 下降，这可能与溶液绝对电势降低，溶液中蛋清蛋白粒子间的静电斥力减弱有关。

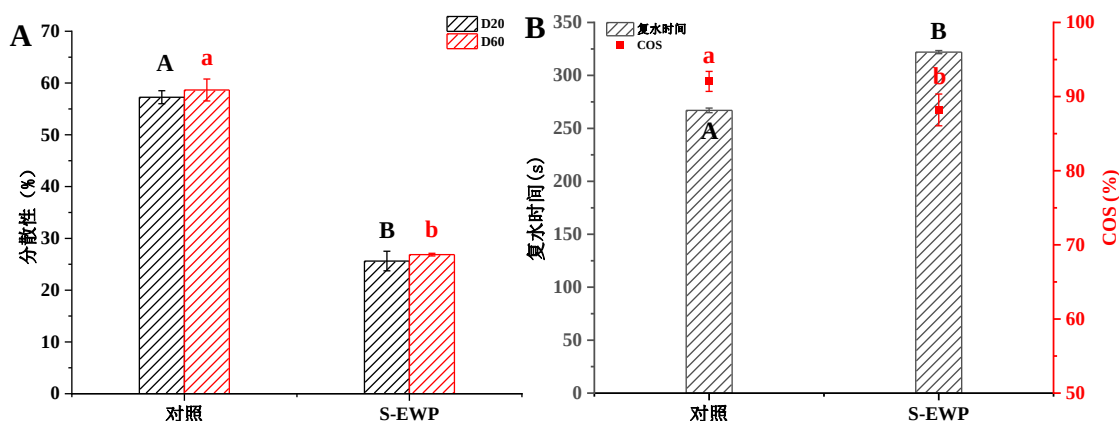


图 3-2 蛋清粉的 20 s 分散性和 60 s 分散性 (A)、复水时间和 COS (B)

Fig.3-2 D20 and D60 (A)/COS and rehydration time (B) of EWP

3.1.5 喷雾干燥对蛋清粉复水溶液粒径与电位影响

在诸多物理特性中，粉末粒度大小是影响其复水性的最主要因素之一，因此研究颗粒的粒度大小和分布（Particle size distribution, PSD）对于粉末的润湿性和分散性来说显得尤为重要^[92]。如图 3-3A 所示，S-EWP 的平均粒径为 145.6 nm，显著低于对照组（186.93 nm）。从粒度分布来看，蛋清粉溶液的粒径呈双峰分布，其中 S-EWP 的粒度分布较对照组整体偏左，因此其平均粒径较小。之前的研究表明，粉末粒径与其复水性紧密相关，在一定范围内，粉末粒度越大，复水性越好^[8]。本研究中 S-EWP 的复水性变差，这与之前的研究结果一致^[93]。zeta 电位表示带电粒子之间的排斥程度，与胶体粒子的悬浮稳定性密切相关。如图 3-3B 所示，蛋清粉复水后其溶液电位值呈负值，可能是由于溶液的 pH 值（pH=7.0）高于蛋清蛋白的主要成分（卵清蛋白，pI=4.5）的等电点，之前研究表明蛋清蛋白在 pH 值高于等电点的溶液中带负电^[94]。S-EWP 复水溶液的 zeta 电位值显著降低，颗粒间的静电斥力变弱，不利于溶液的稳定性，这也验证了 3.1.4 中的猜想。

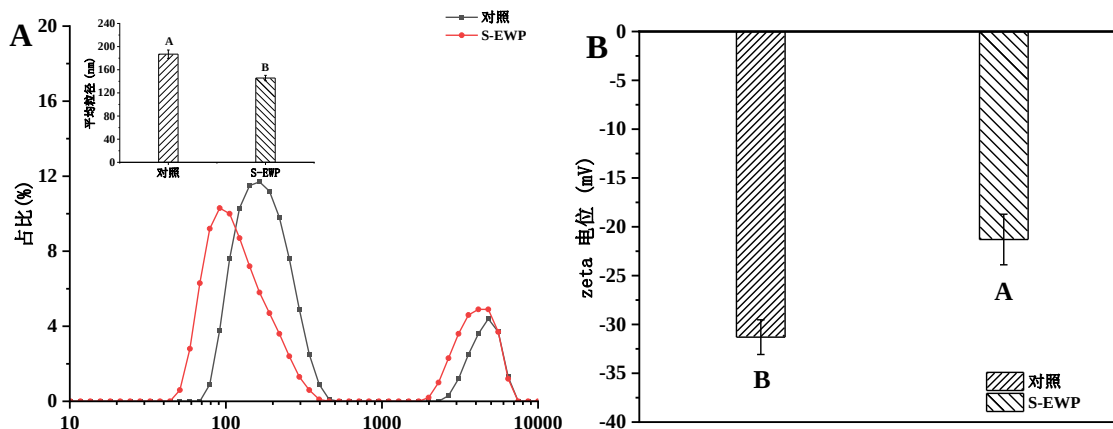


图 3-3 蛋清粉的粒度分布和平均粒径大小 (A) / zeta 电位值 (B)

Fig. 3-3 PSD and average particle size (A)/zeta potential (B) of EWP

3.1.6 喷雾干燥对蛋清粉复水溶液表面疏水性 (H_0) 影响

使用 ANS 探针法测定了溶液在 400-600 nm 的荧光发射光谱, 以荧光强度峰值作为蛋清蛋白的表面疏水性数值 H_0 。数值越大, 样品的表面疏水性越强。如图 3-4 所示, 对照组蛋清蛋白的 H_0 较低, 喷雾干燥后, 蛋清粉的 H_0 增大, 表明蛋清蛋白在喷雾干燥后暴露了更多疏水基团, 这可能与喷雾干燥的高温环境有关。在高温环境下蛋清蛋白部分展开暴露了内部的疏水基团, 从而增加了表面疏水性, 这与孙乐常等人^[93]的研究结果一致。另外, 表面疏水性对颗粒的复水性也有明显影响: 具有较高疏水性的颗粒不容易润湿, 含有大量这种颗粒的粉末表现出团聚的倾向, 延长了复水时间^[92], 这可能是造成 S-EWP 的复水时间更长的主要因素之一。

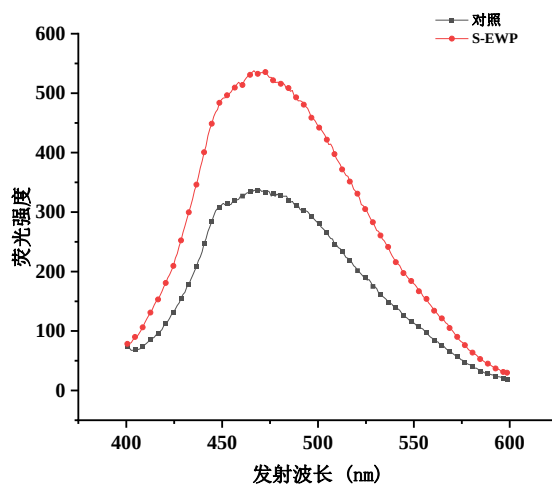


图 3-4 蛋清粉的表面疏水性

Fig. 3-4 Surface hydrophobicity of EWP

3.1.7 喷雾干燥对蛋清粉二级结构影响

蛋白质结构特性影响其功能特性, 通过 FTIR 光谱可以推测其内部结构的变化, 而对功能特性的变化做出一定解释。根据以往的研究, $3750-3000\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰强度表示蛋白分子氢键强度, 由 O-H、N-H 键的伸缩振动引起。S-EWP 的氢键吸收峰强度

高于对照组，表明蛋白质分子中 N-H、O-H 伸缩振动形成了更强的缔合体^[95]。S-EWP 在 3750-3000 cm^{-1} 处的吸收峰强度更大，说明喷雾干燥能使 N-H 与 O-H 形成的氢键总量增加^[96]。

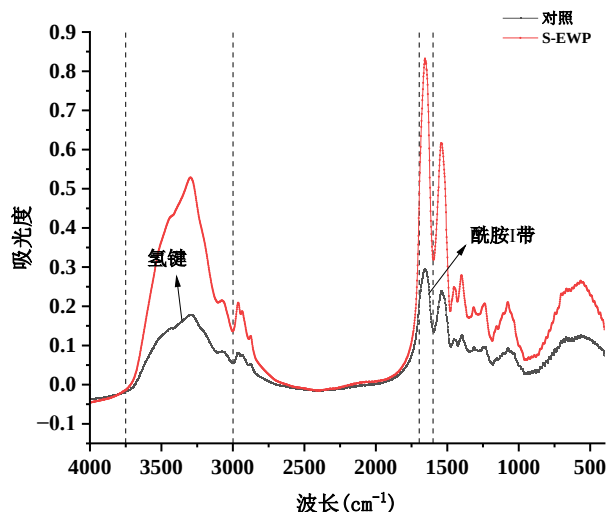


图 3-5 蛋清粉的红外吸收光谱

Fig. 3-5 FTIR spectra of EWP

蛋清蛋白的红外光谱如图 3-5 所示。其中二级结构主要与 1600-1700 cm^{-1} 的信号有关，该峰段主要由 C=O 键伸缩振动引起，对研究蛋白质的二级结构最具有参考性。对该段进行拟合分析，根据峰面积计算二级结构的相对含量，1600-1640 cm^{-1} 、1640-1650 cm^{-1} 、1650-1660 cm^{-1} 、1660-1700 cm^{-1} 分别对应 β -折叠、无规则卷曲、 α -螺旋以及 β -转角^[97]，结果如表 3-1 所示。之前有研究表明^[21]，较多的 β -折叠结构和较少的 α -螺旋结构会使分子结构更加灵活，提高蛋白质分子的柔韧性和延展性，从而利于在水中的润湿和分散。对照组中含量最多的是无规则卷曲，其次是 α -螺旋。经喷雾干燥处理后，蛋清粉 α -螺旋和无规则卷曲含量增加， β -折叠和 β -转角含量降低，可能是在喷雾干燥过程中高温使维持 β -折叠的分子内氢键断裂，蛋白质分子空间构象发生了改变^[95]，蛋白分子柔韧性和延展性降低，蛋清粉的复水性能下降。

表 3-1 蛋清粉的二级结构含量

Tab. 3-1 Secondary structure content of EWP

样品名	β -折叠 (%)	无规则卷曲 (%)	α -螺旋 (%)	β -转角 (%)
对照	23.20±0.01 ^a	28.27±0.03 ^b	26.37±0.02 ^b	22.27±0.05 ^a
S-EWP	16.44±0.67 ^b	31.34±1.26 ^a	31.82±0.49 ^a	20.91±0.73 ^b

注：不同小写字母代表有显著差异 ($p < 0.05$)。

3.1.8 喷雾干燥对蛋清粉微观结构影响

微观结构图可以更直观的表现出两种蛋清粉在表面结构方面的差异。如图 3-6 所示，对照组蛋白颗粒呈块状或片状，截面不规则；而 S-EWP 蛋白颗粒呈球状，表面平滑，

两端有较大凹陷。蛋清粉颗粒存在大小不均匀的情况，这与图 3-3A 中粒径分布有大小两个峰的现象一致。在同样放大倍数下，对照组蛋清粉颗粒更大，这可能是其平均粒径大于 S-EWP 的原因。且对照组由于是松散的片状结构，其表面会更易与水分子接触和结合，也更有利于水分在其内部流动，所以更易被润湿和分散。另外，在一定范围内，颗粒较大可能更利于在复水初期的润湿和沉降。之前有研究表明，颗粒较大或发生一定程度的团聚会更有利于发生润湿和溶解^[9, 15, 98]。喷雾干燥后蛋清粉颗粒减小，因此复水时间增长。

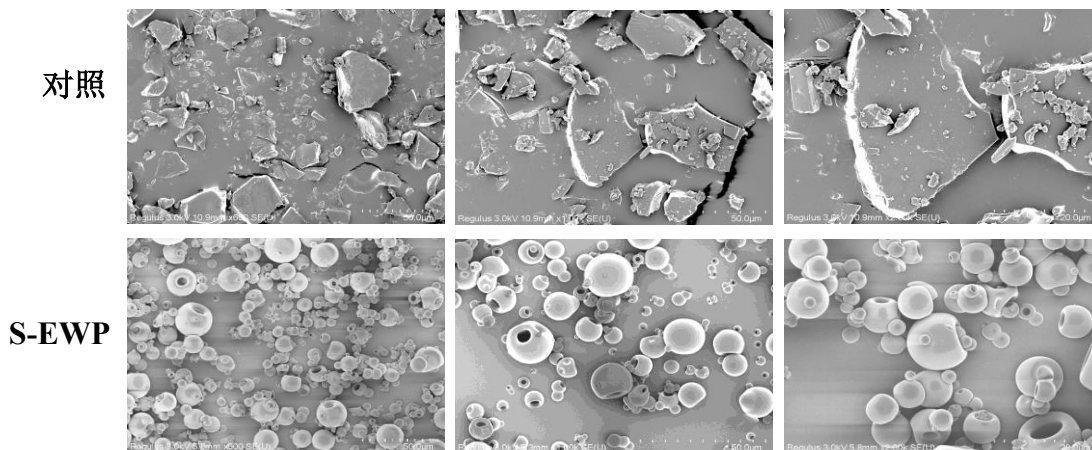


图 3-6 蛋清粉在 600 倍、1000 倍、2000 倍下的微观结构图

Fig. 3-6 Microstructure of EWP at 600 ×,
1000 × and 2000 ×

3.1.9 相关性分析

对蛋清粉的复水性和其他理化性质进行了相关性分析，结果如下：粒径与溶解度呈负相关，与 D20 和 D60 呈显著正相关 ($p < 0.05$)，表明较大的颗粒有利于在水中的快速分散，但不利于后续的溶解过程。分散时间与粒径呈显著负相关，这进一步表明颗粒大小对于复水性的影响：较大颗粒可以通过接触水分快速实现润湿和沉降，但在水中其结构的后续崩塌和溶解可能需要更多的时间，这可能也与粉末表面粗糙程度和组分有关^[21]。COS 与表面电势呈现显著正相关 ($p < 0.05$)，说明表面电荷的增大有利于维持复水溶液稳定性。表面疏水性与复水时间呈现显著的正相关，表明疏水性颗粒不容易润湿，较难在水中分散，这与 Felix 等人^[92]的研究结果一致。

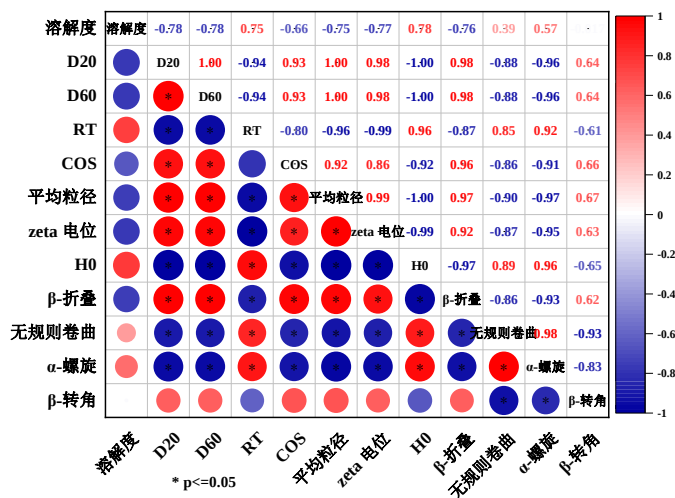


表 3-7 不同理化性质间的相关性研究结果，RT：复水时间；H0：表面疏水性；zeta：zeta 电位绝对值
注： $p \leq 0.05$ 代表了各参数之间的显著相关

Fig. 3-7 Results of correlation analysis among different physicochemical properties. RT: rehydration time; H0: surface hydrophobicity; zeta: absolute value of zeta potential. $p \leq 0.05$ represents the significant correlation among parameters

3.1.10 小结

本节研究了喷雾干燥对于蛋清粉复水性能的影响，发现喷雾干燥后蛋清蛋白颗粒粒径减小，表面疏水性增大，粒径较小使颗粒润湿难度增加，易发生结块；表面疏水性增大不利于在水中的分散和维持复水溶液稳定性。因此，通过增加蛋清粉颗粒尺寸和亲水性可能是有效提高喷雾干燥蛋清复水性的重要手段。

3.2 酶热联合处理对蛋清粉复水性能改善研究

前面提到喷雾干燥后的蛋清粉复水性下降的主要原因是高温下蛋清蛋白发生变性，蛋白颗粒粒径减小，不利于与水的接触，且极易发生结块，而增大粒径可以改善蛋清粉的复水性。为此，本节采用了热处理和酶水解结合的方式处理蛋清蛋白。热处理的方式使蛋清蛋白发生聚集而粒度增大，酶水解可以通过减少颗粒团聚对蛋白热聚集体进行粒度修饰的同时增加颗粒亲水性，减缓蛋清蛋白因过度聚集而导致的不利影响。

3.2.1 水解度 (DH)

如图 3-8 所示，当酶添加量为 0.03% 时，DH 随加热温度的升高先增大后减小，在 70°C 时 DH 达到最高值 (6.07%)。这可能是由于随着温度的升高，蛋白质分子展开，出现更多的酶结合部位。在 75°C 时 DH 降低 (4.52%) 可能是由于形成了不利于蛋白酶切割的大聚集体^[47]。正如之前所预期的那样，增加酶使用量可以获得更高的 DH 值 (图 3-8B)，这可能是由于反应体系中更多的蛋白酶分子有更多的机会接触和作用于蛋清蛋白分子^[58]。

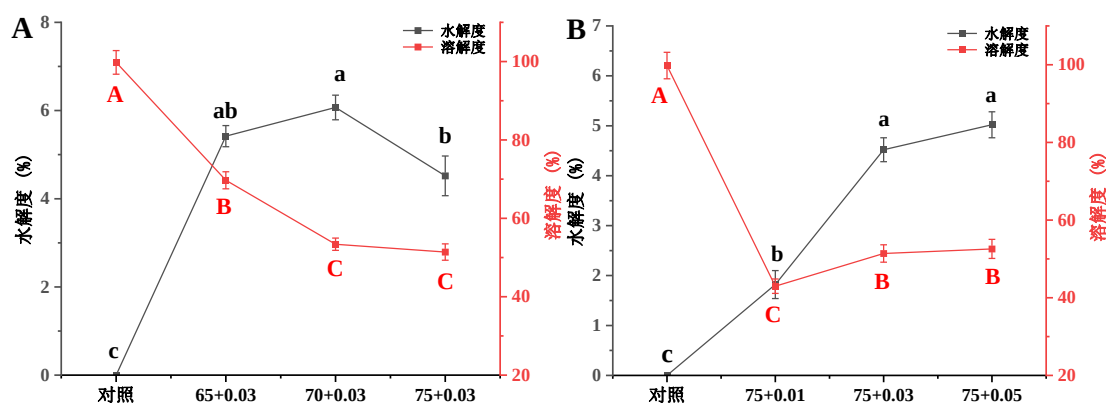


图 3-8 不同加热温度 (A) 和酶添加量 (B) 制备的蛋清粉的水解度和溶解度

Fig. 3-8 The degree of hydrolysis and the solubility of the EWP prepared with different heating temperatures (A) and enzyme ratios (B)

3.2.2 酶热联合处理对蛋清粉溶解度影响

图 3-8 显示了不同蛋清粉样品的溶解度。对照组溶解度为 99.79%。在图 3-8A 中，蛋清粉复水溶液的溶解度随着加热温度升高而降低。这个结果可能是因为在高温下大量的蛋清蛋白聚集体增加，颗粒平均粒度增加，在与水接触时不易被溶解^[99]。另外，随着预热处理温度的升高，不溶性蛋白含量可能会增多^[100]，溶液浊度可能增大。之前有人报道过浑浊是由不溶性蛋白的存在引起的，浑浊程度的增加表明蛋白质聚集的形成^[101]。Fyfe 等人^[102] 曾报道，表面疏水性的增加可导致高蛋白粉体溶解度的降低。表面暴露的疏水基团参与广泛的分子间相互作用，可能导致较低的溶解度。蛋白质疏水作用增强引起蛋白质发生聚集，最终导致溶解度的下降^[103]。图 3-8B 显示 S-EWP 的溶解度随着酶添加量的增加而逐渐改善 (42.97%、51.40%、52.58%)。这可能是由于水解样品的分子量减少和亲水肽的存在^[104]，使蛋清粉的溶解度得到显著改善。

3.2.3 酶热联合处理对蛋清粉 20 s 分散性 (D20) 和 60 s 分散性 (D60) 影响

在图 3-9 中，对照组的 D20 和 D60 相对较低，分别为 25.62% 和 26.86%，而 65+0.03 组的 D20 最高，为 61.73%，说明 65°C 处理的蛋清粉瞬时分散性最好。D20 随着温度的升高而降低 (61.73%、50.09%、46.43%)，这意味着大的蛋白质聚集体倾向于发生沉降。图 3-9B 显示，随着酶添加量的增加，蛋清粉的 D20 和 D60 显著增加 ($p < 0.05$)。这可能是由于随着水解度的增加，蛋清蛋白聚集性降低。另外，Gu 等人^[58]发现酶解后蛋白质聚集体的亲水性增加可能有利于蛋清粉在水中的分散。

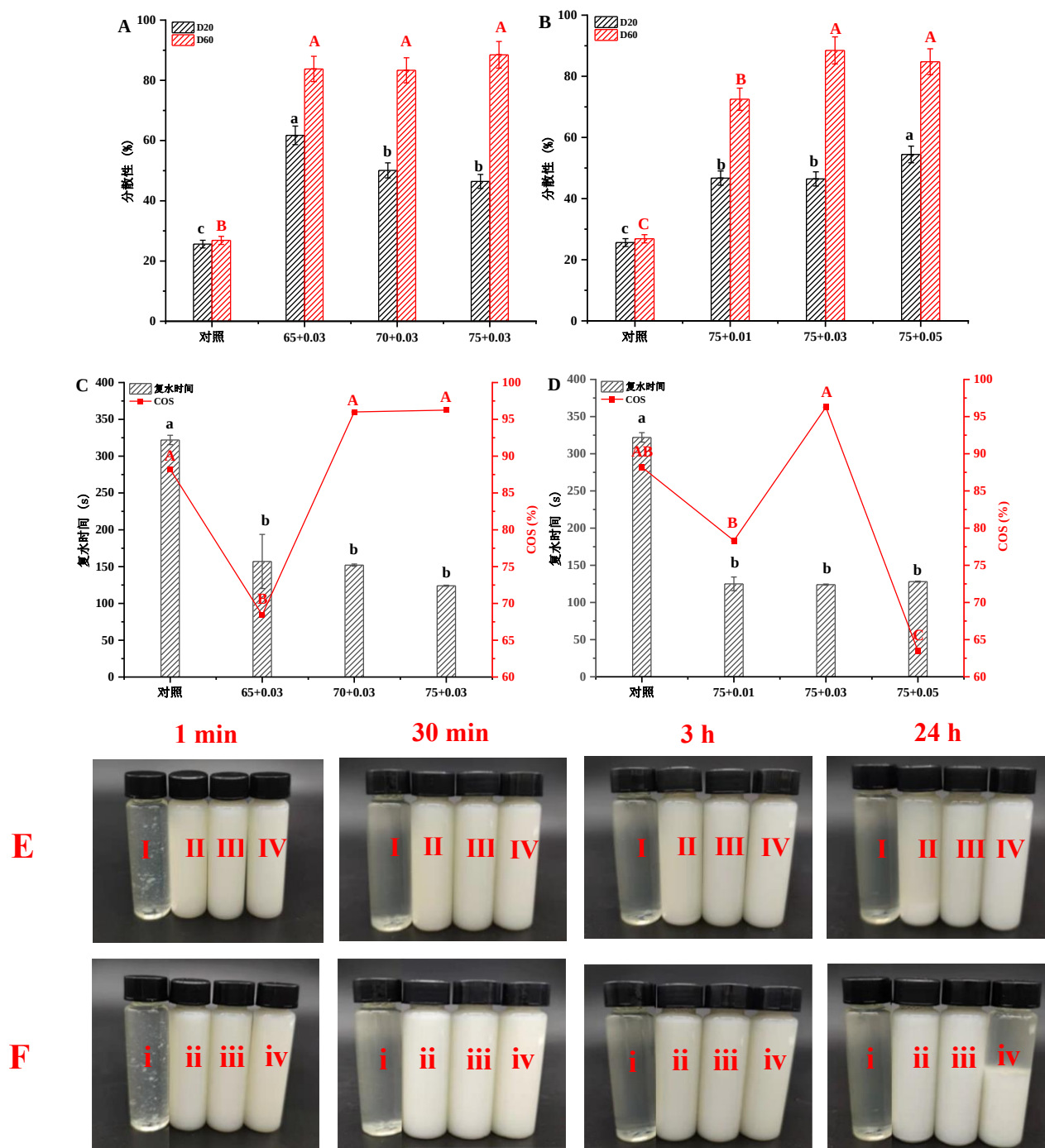


图 3-9 不同加热温度 and 不同酶添加量处理的蛋清粉的 20 s 分散性、60 s 分散性、复水时间、稳定系数 (COS) 和不同放置时间的宏观图, I, II, III, IV 分别代表对照, 65+0.03, 70+0.03, 75+0.03; i, ii, iii, iv 分别代表对照, 75+0.01, 75+0.03, 75+0.05

Fig. 3-9 D20, D60, rehydration time, COS and aqueous dispersions at different storage times of EWP. I, II, III and IV represent control, 65+0.03, 70+0.03 and 75+0.03, respectively. i, ii, iii, and iv represent control, 75+0.01, 75+0.03, 75+0.05, respectively

3.2.4 酶热联合处理对蛋清粉复水时间影响

复水时间是衡量粉末复水性的重要指标。如图 3-9C 所示, 对照组的复水时间最长, 为 322 s。提高热处理温度有利于减少蛋清粉的复水时间 (157 s、152 s、124 s)。同样,

增加酶的加入量可以显著缩短复水时间，但它们之间没有显著差异（图 3-9D）。这一结果可能与不同酶添加量情况下蛋白质条带的变化不大有关（图 3-10B）。

3.2.5 酶热联合处理对蛋清粉复水溶液稳定系数（COS）影响

为了测试蛋清粉复水溶液的稳定性，测定了其在水中的 COS。如图 3-9C 和 D 所示，对照组的 COS 为 88.20%，65+0.03 组别的 COS 最低，为 68.44%。这表明，在 65°C 处理的蛋清粉复水溶液稳定性较差，这可能是因为 65+0.03 组别的蛋清粉平均粒径最大（图 3-11A）。随着加热温度的升高（70-75°C），COS 急剧上升，可能是由于蛋清粉颗粒平均粒度的减小和溶液表面电荷的增加^[105]。Stefanovic 等人^[106]研究发现，强烈的颗粒间静电斥力通常伴随着溶液负电荷的增加，从而有利于抑制蛋白质颗粒的团聚和沉淀。当加热温度设置为 75°C 时，蛋清粉复水溶液的 COS 先上升后下降（图 3-9D）。当加酶量为 0.05% 时，COS 最低（63.47%），这可能是由于形成了更大的聚集体^[91]。从图 3-9E 和 F 可以看出，除 70+0.03 组（图 3-9E III）和 75+0.03 组（图 3-9F iii）外，其余蛋清粉复水溶液在静置 24 h 后都出现了明显的分层沉淀现象，这可能是由于颗粒拥有较小粒径和较高电位值时，其聚集和沉降趋势较小^[105]。

3.2.6 SDS-PAGE 分析

为了探究加热和酶处理对蛋清粉组成的影响，对不同组的蛋清粉复水溶液进行了 SDS-PAGE 分析。在图 3-10 中，加热和酶解联合处理后，75 kDa（泳道 2、3、4）附近的蛋白条带消失。根据先前的研究，75 kDa 附近的条带为卵转铁蛋白（变性温度：61°C）^[107]。上述结果可归因于卵转铁蛋白在热处理过程中发生变性，并被蛋白酶水解。如图 3-10A 所示，位于 45 kDa 附近的卵清蛋白下方出现了一条新的条带，表明卵清蛋白被部分水解，这可能与蛋清蛋白的水解度增加有关（图 3-8A）。如图 3-10B 所示，随着加酶量的增加，卵清蛋白下方的条带颜色变深，说明卵清蛋白发生水解的程度逐渐增大。

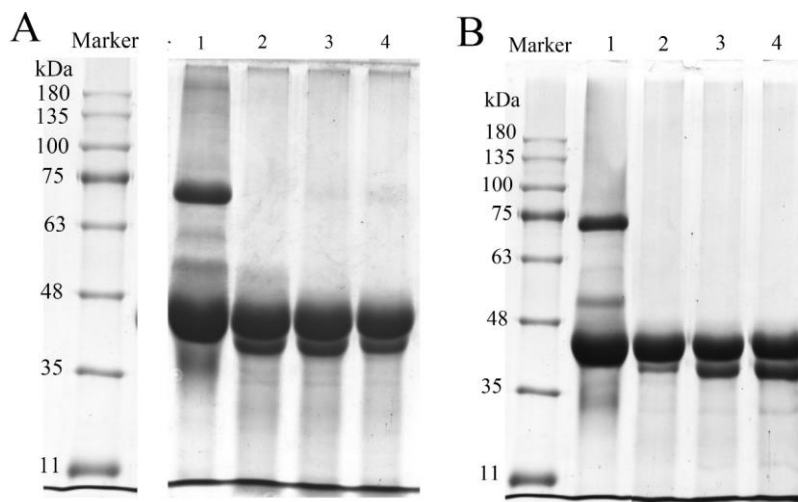


图 3-10 SDS-PAGE 图，(A) 不同加热温度下制备的蛋清粉，泳道 1、2、3 和 4 分别代表对照、65+0.03、70+0.03 和 75+0.03；(B) 不同酶添加量下制备的蛋清粉，泳道 1、2、3 和 4 分别代表对照、75+0.01、75+0.03 和 75+0.05

Fig. 3-10 (A) SDS-PAGE of the EWP prepared with different heating temperatures. Lane 1, 2, 3 and 4 represent control, 65+0.03, 70+0.03 and 75+0.03 respectively. (B) SDS-PAGE of EWP prepared with various enzyme ratios. Lane 1, 2, 3 and 4 represent control, 75+0.01, 75+0.03 and 75+0.05 respectively

3.2.7 酶热联合处理对蛋清粉复水溶液粒径和电位影响

蛋清粉复水溶液的粒径分布 (PSD) 和平均粒径如图 3-11A 和 B 所示。对照样本具有较宽的 PSD 和双峰分布，在 100 nm 附近有较大的峰值，在 1000-10000 nm 之间有较小的峰值。对照组平均粒径为 145.6 nm。样品 65+0.03 的主峰在 1000-10000 nm 之间，小峰在 100-1000 nm 之间，平均粒径显著增大 (919.8 nm) ($p<0.05$)，这可能与变性蛋白的聚集和 DH 不足有关。图 3-11B 显示，随着酶添加量的增加，三组蛋清粉的 PSD 从大到小转移，尽管 75+0.03 和 75+0.05 组的平均粒径没有显著差异。这可能是因为计算的平均粒径包括大颗粒和小颗粒。75+0.03 为双峰体系，主峰峰值大于 75+0.05，但其 DH 值较低，导致部分小团聚体在此种条件下未完全水解。因此，样品 75+0.03 最终的平均粒径与样品 75+0.05 基本相同。

zeta 电位值是衡量带电粒子之间排斥力的一个评估标度，它与胶体分散稳定性密切相关。当电位值太低，不能在颗粒之间提供足够的排斥力时，胶体颗粒很容易发生凝聚^[105]。图 3-11C 显示，随着加热温度的升高，蛋清粉复水溶液的负电荷显著增加 ($p<0.05$)。这可能是热处理温度升高会促使蛋白结构展开，有利于蛋白酶作用释放电负性多肽链^[108]。然而，样品 65+0.03 的电位值 (-20.47 mV) 略低于对照样品 (-21.3 mV)。值得注意的是，在图 3-11D 中，蛋清粉复水溶液的净电荷随着酶含量的增加而先增加后减少。这可能是因为随着 DH 的增加，带有高负电荷的小分子多肽首先被释放，然后低电势的亲水性多肽被随机释放。此外，之前的研究表明，负电荷的增加可能会

加强蛋白质颗粒之间的静电斥力，并通过阻止颗粒聚集改善其在水中的分散^[78, 79]。

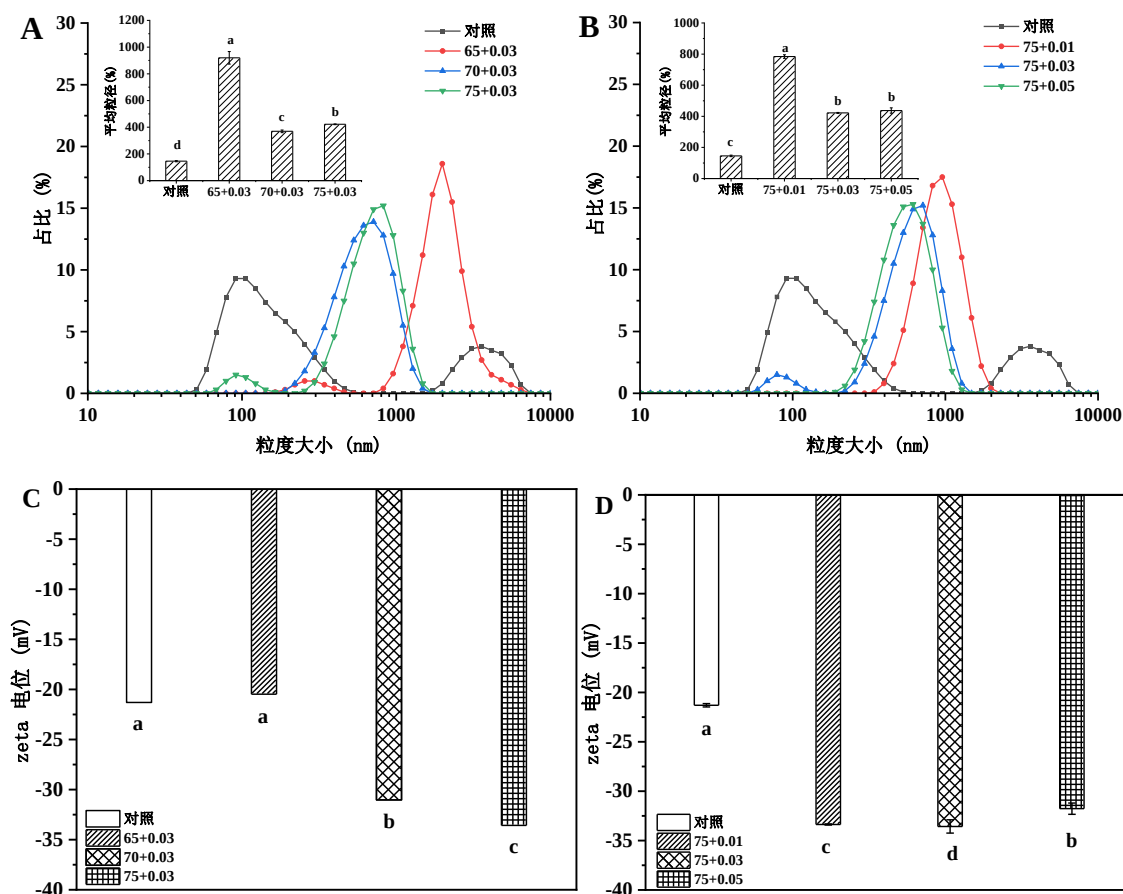


图 3-11 不同加热温度和不同酶添加量处理的蛋清粉复水溶液的粒径分布、平均粒径和 zeta 电位

Fig. 3-11 PSD, average particle size and zeta potential of the EWP solutions treated with different heating temperatures and enzyme ratios

3.2.8 酶热联合处理对蛋清粉复水溶液表面疏水性 (H_0) 影响

蛋白质的 H_0 是与水环境接触的蛋白质表面疏水基团变化的指示器^[109]。图 3-12A 显示，与对照组相比，加热可以显著提高 H_0 ，这可能有助于分子内部更多的疏水基团转化到蛋白质表面。在图 3-12A 中，蛋清蛋白的 H_0 先增加 (70+0.03) 然后下降 (75+0.03)，这与水解度的变化一致 (图 3-8A)。Fu 等人^[110]发现，适当的蛋白酶水解有利于蛋清蛋白分子的疏水位点的出现，从而增加 H_0 。75+0.03 组的 H_0 降低可能是因为 75 °C 时蛋清蛋白的聚集尺寸增加 (图 3-11A)，导致疏水基团重新隐藏在蛋白质中^[99]。如图 3-12B 所示，蛋清蛋白的 H_0 随着酶添加量的增加而下降，这可能是因为随着水解度的增加，亲水性多肽逐渐释放，导致 H_0 降低^[111]。

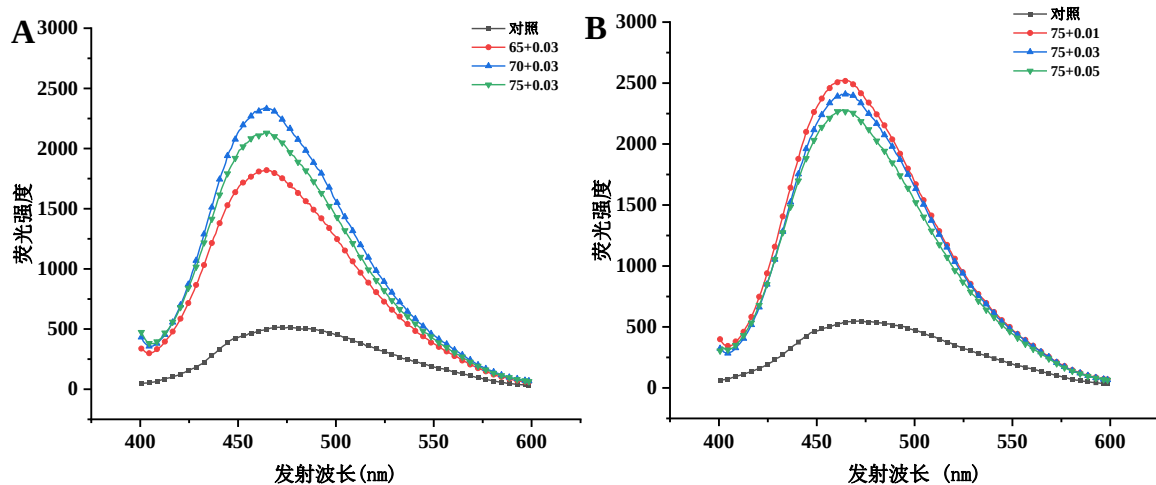


图 3-12 不同加热温度 (A) 和不同酶添加量 (B) 处理的蛋清粉复水溶液的荧光发射光谱图

Fig. 3-12 Fluorescence emission spectra of the EWP prepared with different heating temperatures (A) and enzyme ratios (B)

3.2.9 酶热联合处理对蛋清粉二级结构含量影响

通过去卷积获得酰胺 I 区的二级结构信息, 并测量了 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲的占比。如图 3-13A 所示, 随着温度的升高, α -螺旋在蛋清蛋白中的比例显著降低, 而 β -折叠的比例显著增加, 表明加热促进了 α -螺旋向 β -折叠的转变。先前的一项研究表明, β -折叠含量的增加与蛋白质的热聚集有关^[112], 且 β -折叠是稳定变性蛋白质中聚集体的重要结构。这一现象与 Mine 等人^[113]观察到的蛋清蛋白热变性过程中 β -折叠比例的显著增加以及 α -螺旋含量的下降是一致的。如图 3-13B 所示, 随着加酶量的增加, 蛋清蛋白的二级结构没有发生明显的变化, 说明轻微的水解不会改变蛋清蛋白的二级结构占比, 加热温度对二级结构含量的影响效果更显著。

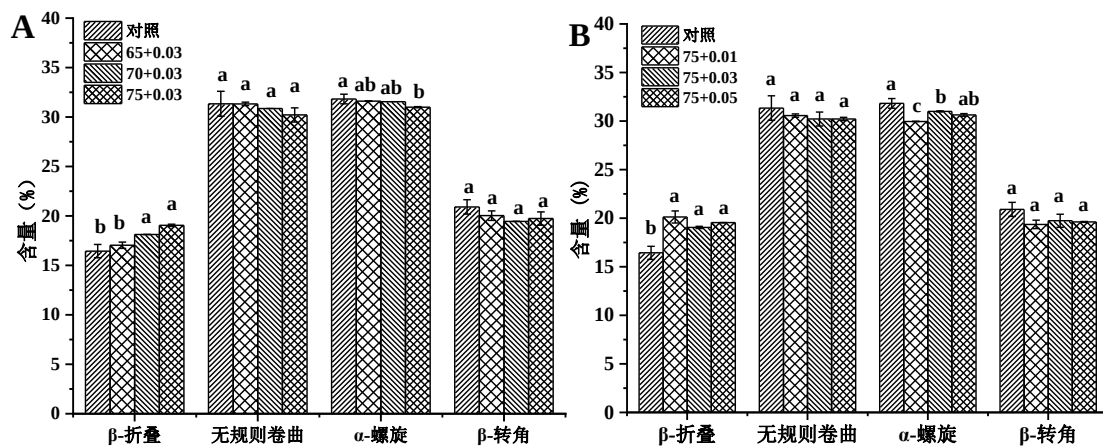


图 3-13 不同加热温度 (A) 和不同酶添加量 (B) 制备的蛋清粉的二级结构含量

Fig. 3-13 Secondary structure content of the EWP prepared with different heating temperatures (A) and enzyme ratios (B)

3.2.10 酶热联合处理对蛋清粉接触角影响

润湿是粉末复水的初始阶段，指的是粉末浸入水面以下所需的时间，且通常是高蛋白粉末复水过程中的限速步骤^[8]。接触角（ θ 值）是在食品、土壤、植物、纳米和制药等不同学科领域中常用的润湿行为指数。然而之前的研究表明^[114]，粉末的非均匀表面形貌和化学异质性可能导致测量的 θ 值高于实际，因此，考虑 θ 值随时间的变化更具参考价值。

如图 3-14 所示，对照组在 0 s 时的 θ 值为 87.8° ，非常接近之前研究的非润湿材料的数值（ $\theta \geq 90^\circ$ ）^[8]。在润湿期间（10 s），对照组蛋白颗粒并没有在很大程度上吸收水滴，至 120 s 时水滴才有明显吸收。对照样品的平均粒径较小（146 nm），这可能是造成这一结果的原因。当颗粒与水接触时，在水和粉末之间形成的一层薄膜可以防止水渗透到颗粒基质中^[65]。由于小颗粒在吸水后发生凝聚，其润湿性较低^[115]。此外，对照组蛋清粉具有较大的比表面积（表 3-2），容易吸收更多水分至饱和状态，导致已溶解的粉末和未吸水的粉末之间发生结块。而 75+0.03 组在 0 s 时 θ 值为 57.15° ，10 s 时水滴已经明显被吸收，120 s 时 θ 值已小于 50° ，说明经加热和酶解处理后，蛋清粉颗粒的润湿性已得到很大改善。

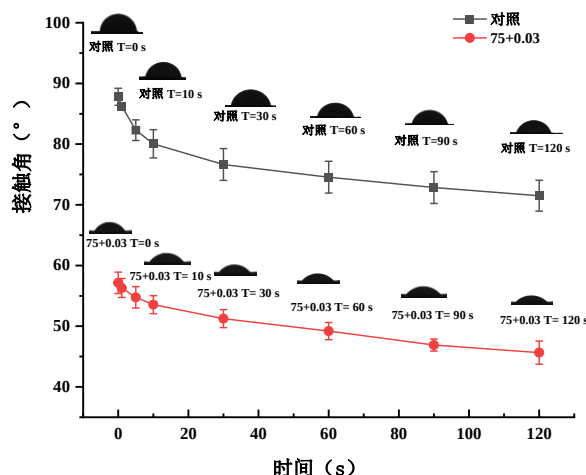


图 3-14 对照组和 75+0.03 组的动态接触角数值

Fig. 3-14 Dynamic contact angle data of the control group and 75+0.03 group

3.2.11 酶热联合处理对蛋清粉热稳定性影响

差示扫描量热法可以表征蛋白质的结构和构象变化。此外，还可以从热谱图中确定变性温度（变性曲线的峰值）和 ΔH （变性热）。变性温度表示蛋白质的热稳定性，而 ΔH 表示疏水/亲水相互作用和蛋白质致密性^[116]。

为了研究酶热联合处理对蛋清蛋白耐热性的影响，选择对照组和 75+0.03 组进行 DSC 实验。如图 3-15 所示，对照组有两个吸热峰（ 67.78°C 和 82.92°C ），对应的 ΔH 分别为 0.36 J/g 和 1.66 J/g ，其中第一个变性峰是卵转铁蛋白^[117]。第二个是天然卵清蛋白和稳定卵清蛋白中间体（S-卵清蛋白，天然卵清蛋白转化为稳定卵清蛋白的中间体）

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/816220114032010054>