

## 不同条件下乳清蛋白水解物乳化性的变化及机理分析

黄雯婷, 茅宇虹\*, 蔡珍珠, 陈 兰, 李仁宽, 叶秀云  
(福州大学生物科学与工程学院 福建省海洋酶工程重点实验室 福州 350108)

**摘要** 在 pH8.5、37℃、酶与底物质量比 0.5% 的条件下用胰蛋白酶水解乳清分离蛋白 (WPI) 5 h 制备水解物 (WPH)。通过控制环境条件,即添加不同盐 (NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>),改变离子强度 (0.1 mol/L 和 1 mol/L),pH 值 (3~7) 以及热处理来调控 O/W 界面处肽的组成。采用质谱法鉴定肽的组成,激光衍射法测量乳液的粒度分布及 STEP 技术测定乳液的稳定性,从而评估界面处肽的组成特性及相互作用对 WPH 乳化性的影响。结果表明,pH3 时,因离子强度增大而引起的电荷屏蔽作用导致 WPH 乳液发生显著聚集,而 pH7 时离子强度对 WPH 乳化性的影响不显著,热处理则显著降低了其乳化性。此外,在 WPH 等电点 (pH4) 时,热处理显著提高了 WPH 的乳化性,尤其是添加 CaCl<sub>2</sub> 的样品组。综合不同 pH 条件下析出肽的组成及乳化性分析,研究发现来自  $\beta$ -Lg 的肽段 f(41~60)、f(71~91)、f(78~101) 对 WPH 的乳化特性有重要贡献。

**关键词** 乳清蛋白水解物; 乳化性; 盐离子; pH 值; 热处理

**文章编号** 1009-7848(2023)03-0099-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.03.011

乳清分离蛋白 (Whey protein isolate, WPI) 含丰富的必需氨基酸且具有较好的乳化性,常被用作食品乳化剂<sup>[1-2]</sup>。它主要包含 50%~55% 的  $\beta$ -乳球蛋白 ( $\beta$ -Lactoglobulin,  $\beta$ -Lg) 与 20%~25% 的  $\alpha$ -乳白蛋白 ( $\alpha$ -Lactalbumin,  $\alpha$ -La)。因母乳中不含  $\beta$ -Lg, 故  $\beta$ -Lg 一直被认为是婴幼儿的主要过敏原之一。采用胰蛋白酶水解 WPI,尤其是对  $\beta$ -Lg 的降解,可降低其致敏性<sup>[3-4]</sup>。相应的乳清蛋白水解物 (Whey protein hydrolysate, WPH) 往往含有抗高血压、抗氧化、免疫调节等功效的生物活性肽<sup>[5-6]</sup>。然而,水解导致蛋白质分子量、电荷、疏水性改变,从而影响其功能特性,如乳化性<sup>[7-8]</sup>。许多研究指出,部分水解 WPI 可提高其乳化性<sup>[9-10]</sup>,过度水解则降低其乳化性<sup>[11-12]</sup>。这些研究将蛋白质水解物 (肽) 的乳化性直接与水解度或肽的分子量相关联,例如,分子量  $\geq 5$  ku 或 2 ku 的肽相较于小分子量肽往往被认为具备更好的乳化性。还有研究则指出相较于分子量分布,肽的两亲性是影响其乳化性的更重要因素<sup>[13]</sup>。由此可见,蛋白质水解物的乳化性不仅取决于分子量,还与其两亲性密切相关。

上述研究关注于蛋白质水解物的“静态”特

性,即分子量、两亲性等,忽视了不同肽在乳化过程中的“动态”问题。事实上,乳化体系(O/W)的形成是一个动态过程,主要包括 3 个阶段<sup>[14]</sup>:1) 水相中的乳化剂 (如蛋白质、肽等)通过对流或扩散到达 O/W 界面;2) 乳化剂分子在界面的吸附及其结构调整;3) 乳化剂分子在界面的重排及相互作用。最终,乳化剂分子通过降低 O/W 界面张力及阻止油滴小分子的聚合来稳定整个乳化体系。相比基于单个蛋白质的乳化体系,基于蛋白质水解物的体系要复杂得多。由于蛋白质水解物中肽的分子量及特性不同,这些肽往往具有不同的扩散特性及相互作用力。基于合理的推测,这些肽在乳化过程中存在竞争和/或协同作用。例如,由于小分子肽扩散系数大,相对更易到达 O/W 界面,从而占据有限的界面位置。若这些肽表面带电荷,则可能阻止其它带相同电荷的肽被吸附<sup>[15]</sup>。

本研究旨在探究 O/W 界面处肽的组成特性及相互作用对 WPH 乳化性的影响。首先采用胰蛋白酶制备具相同水解度的 WPH,通过液相色谱与质谱解析水解产物中肽的组成。在不对肽进行分离的前提下,通过改变环境因素 (如 pH、离子强度、热处理等)调控 WPH 中不同肽的聚集与相互作用,从而调控其在 O/W 界面处的吸附行为。结合 WPH 的乳化性分析,阐明其不同环境条件下乳化性变化的机理。

收稿日期: 2022-03-08

基金项目: 福建省自然科学基金青年科学基金项目(2020J05129)

第一作者: 黄雯婷,女,硕士生

通信作者: 茅宇虹 E-mail: yuhongmaowork@outlook.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

乳清分离蛋白粉 (Whey protein isolate, WPI), 总蛋白质含量 $\geq 98\%$ , 未变性乳清蛋白含量 91.87%, 其中 $\alpha$ -La 18.68%, $\beta$ -Lg B 32.07%, $\beta$ -Lg A 41.13%, 新西兰恒天然集团。牛胰腺胰蛋白酶 (I型, 比活 10 000 BAEE U/mg)、氯化钠等试剂, 美国 Sigma-Aldrich 公司。葵花籽油购于超市。

### 1.2 仪器与设备

自动滴定仪, 德国 TitroWiC; 台式离心机, 美国 Thermo Fisher Scientific; 有机元素分析仪 vario MAX cube, 德国 Elementar; Masterizer 2000 激光粒度分析仪、Zetasizer nano 电位分析仪, 英国 Malvern; LUMiFuge 稳定性分析仪, 德国 L. U. M; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 仪, 德国 Bruker; UltraTurrax T25 匀浆机, 德国 IKA-Werke; 高压均质机, 丹麦 APV。

### 1.3 试验方法

1.3.1 蛋白质含量的测定 基于杜马斯燃烧定氮法原理<sup>[16]</sup>, 采用有机元素分析仪 vario MAX cube 全自动定量分析样品中的总蛋白含量。

1.3.2 WPH 的制备 取 5 g WPI 粉加入 95 mL 去离子水后于 4 °C 磁力搅拌过夜, 使其充分溶解 (约 15 h)。试验前将 WPI 溶液置室温后调节 pH 值至 4.6, 离心 (6 000 g, 10 min) 去除变性蛋白质<sup>[17]</sup>。用 0.45  $\mu$ m 的纤维素膜过滤上清液, 将其 pH 调至 8.5, 制备质量分数为 (5.0 $\pm$ 0.1)% 的 WPI 溶液, 置于 37 °C 水浴锅中预热, 备用。

pH-stat 水解法: 采用胰蛋白酶水解 WPI (pH 8.5, 37 °C), 酶添加量为 0.1% (E/S, m/m), 磁力搅拌转速为 150 r/min。采用自动滴定仪监测 WPH 水解过程中的 pH 值, 通过加入 0.5 mol/L NaOH 溶液使其 pH 值保持恒定。水解 5 h 后加入胰蛋白酶抑制剂终止反应。水解度 (Degree of hydrolysis, DH) 由公式 (1) 计算所得<sup>[18]</sup>:

$$DH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\% = \frac{V_b \times C_b}{\alpha \times M_p \times h'_{\text{tot}}} \quad (1)$$

式中,  $V_b$ ——所消耗的 NaOH 溶液体积 (mL);  $C_b$ ——NaOH 溶液的浓度 (0.5 mol/L),  $\alpha$ ——NH 的平均解离常数 (在 pH 8.5、37 °C 时该值为 0.926);  $M_p$ ——底物中蛋白质的质量 (g);  $h'_{\text{tot}}$ ——

1 g WPI 中肽键数的当量 (8.8 mmol/g)<sup>[19]</sup>。

### 1.3.3 WPH 组成分析

#### 1.3.3.1 残留蛋白质的定量分析 (HPLC 方法 1)

用去离子水将 WPH 稀释至蛋白质质量浓度 2 mg/mL, 调 pH 值至 4.6, 用 0.45  $\mu$ m 纤维素膜过滤。使用安捷伦 1100 系列 HPLC 系统、PLRP-S 300 Å-8  $\mu$ m Latek 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm) 测定样品中完整乳清蛋白含量 ( $\beta$ -Lg A、 $\beta$ -Lg B 和  $\alpha$ -La)。流动相中的溶剂 A 为含 0.1% (体积分数, 下同) 三氟乙酸 (TFA) 的去离子水, 溶剂 B 为含 0.0555% TFA 的 80% 乙腈, 洗脱梯度为溶剂 B 于 13 min 内从 43% 增至 55%, 上样量 20  $\mu$ L。整个分析在 40 °C 和 1 mL/min 流速下进行。检测波长 226 nm。以  $\alpha$ -La (91% 纯度)、 $\beta$ -Lg A (99% 纯度) 和  $\beta$ -Lg B (98% 纯度) 为标准品, 建立校准曲线, 进行定量分析。

1.3.3.2 肽的分离与鉴定 (HPLC 方法 2) 将样品稀释至蛋白质量浓度 4 mg/mL, 取 1 mL 与 150  $\mu$ L 80 mmol/L 二硫苏糖醇在 pH 8、37 °C 下孵育 45 min, 与 200  $\mu$ L 400 mmol/L 氯乙酰胺混合, 在黑暗中储存 30 min。在安捷伦 1100 系列 HPLC 系统上用 Kinetex XB-C18 100 Å 柱 (100 mm $\times$ 4.6 mm, 飞诺美, 美国) 分析样品。溶剂 A、B 与 1.3.3.1 节方法中所用溶剂相同, 洗脱梯度为溶剂 B 于 60 min 内从 1% 线性增至 45%, 上样量 60  $\mu$ L。整个分析在 60 °C、1.5 mL/min 流速下进行, 检测波长为 214 nm。前 45 min 洗脱的峰根据响应值斜率自动收集, 45 min 后的峰根据时间收集。收集的部分通过基质辅助激光解吸-电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 分析。

1.3.4 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 通过 MALDI-TOF-MS 鉴定样品中的肽组成。分别使用  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸和 2,5-二羟基苯乙酮两种基质。详细测定方法请参阅前期工作<sup>[20]</sup>。只有在所有重复样品中均检测到的肽才被确认存在。

1.3.5 Zeta 电位分析 将 WPI 和 WPH 分别稀释至蛋白质量浓度为 1 mg/mL, 采用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调节 pH 值。采用 Zetasizer nano 电位分析仪测定 pH 2~10 下 WPI 及 WPH 的平均表面电位值。

1.3.6 乳液的制备 采用 135 mL 蛋白质质量分数为 1.0% 的 WPI 或 WPH 和 15 mL 葵花籽油制备乳液。试验过程如图 1 所示。

1.3.7 乳液粒度的测定 利用 Mastersizer 2000 激光粒度分析仪测定乳液粒度及分布。测定参数: 湿法进样, 颗粒折射率 1.410, 吸收率 0.001; 分散剂为水, 折射率 1.330。每组乳化试验均设 3 次或以上重复试验。每份样品取 3 次样, 重复测定其粒度。对粒度大小分布相对集中的样品组采用  $d_{50}$  值进行比较分析, 而粒度大小分布较广的样品组, 以  $d_{90}$ 、 $d_{50}$ 、 $d_{10}$  值作箱图比较。因前期测试发现, SDS 对  $d_{50} \leq 1.5 \mu\text{m}$  的样品无显著性影响, 故只将  $d_{50} > 1.5 \mu\text{m}$  的样品与 0.5% SDS 溶液以 1:10 (V/V) 的比例混合, 搅拌 1 min 后再次测量粒度。SDS 添加前、后测得的  $d_{50}$  值的比值为聚集因子 ( $F$ )。

1.3.8 乳液稳定性的测定 通过 STEP 技术 (LUMiFuge) 测定乳析速率, 衡量乳液的稳定性。取 300  $\mu\text{L}$  样品于离心样品池中, 在 25  $^{\circ}\text{C}$ , 2 300 g 离心力条件下每隔 11 s 记录 1 次透光率, 共持续 46 min (模拟 1 个月存储过程)。光源波长为 870 nm, 透光率 15% 为临界值。采用设备自带的 SEPView 软件对数据进行分析, 计算乳析速率 ( $\mu\text{m/s}$ )。

#### 1.4 数据统计分析

未在上述方法中说明的试验均重复 3 次, 最终结果以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。用 Prism 软件进行显著性分析 ( $P < 0.05$ ), 用 Origin 2018 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 WPH 的组成分析

如图 2 所示 3 次平行水解试验结果, 胰蛋白酶水解 WPI 的水解度在起始阶段增长十分迅速, 100 min 后由于底物减少及胰蛋白酶的自降解, 水解度增长趋于平缓, 250 min 后最终水解度 ( $\text{DH}_{\text{max}}$ ) 分别为 7.64%、7.83%、8.08%。

分别取  $\text{DH}_{\text{max}}$  7.64% 与 8.08% 的样品进行 HPLC 分析, 测定残留蛋白质。如图 3b 所示, WPH 中几乎无残留蛋白质。据研究<sup>[20]</sup>报道, 天然  $\alpha$ -La 相对不易被胰蛋白酶水解, 而在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.5 时, 绝大多数的  $\alpha$ -La 被降解。采用 HPLC 方法 2 进一步分离水解物中的肽, 结果如图 3a 所示。两个样

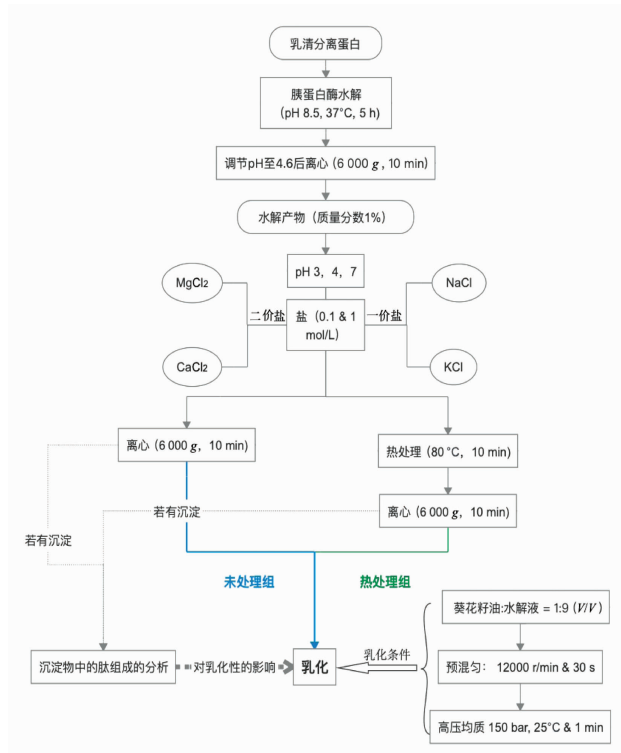


图 1 乳化试验设计思路图解

Fig.1 Experimental diagram of emulsification

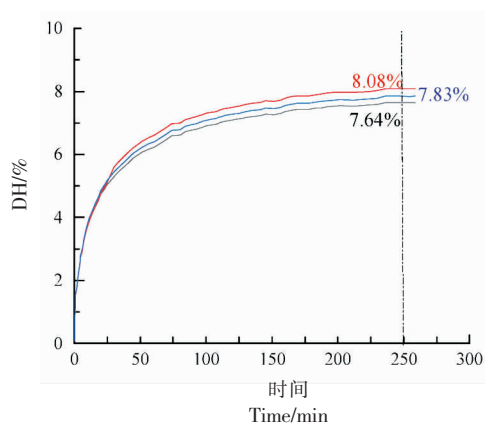


图 2 胰蛋白酶水解 WPI 的水解度随水解时间的变化

Fig.2 The changes of hydrolytic degree during the tryptic hydrolysis of WPI

品的水解度虽略有差异, 但色谱图几乎完全一致。这说明水解度的波动主要是由于 pH-stat 方法自身的误差, 并未导致 WPH 中肽组成的明显变化。WPH 经 HPLC 分离以及 MALDI-TOF-MS 分析后, 各色谱峰所对应的肽如表 1 所示。在所标注的 31 个色谱峰中, 有 5 个峰对应的质荷比没有成功匹配到具体的肽。其中, 大部分肽的分子质量均小

于 3 ku,且较多小于 2 ku,而 Pend 包含一些未被完全水解且分子质量大于 3 ku 的多肽,例如来源于  $\alpha$ -La 的 f(14~58)、f(63~113)。

根据胰蛋白酶的酶切位点特异性 (Lys/K & Arg/R)<sup>[22]</sup>, $\beta$ -Lg 与  $\alpha$ -La 中的潜在酶切位点分别为 18 个与 13 个。本研究中,除酶切位点 Lys47,其余  $\beta$ -Lg 酶切位点被水解而产生的肽在 WPH 中均被检测到。这是由于 Lys47 后为 Pro48,它的存在阻止胰蛋白酶水解该肽键。此外,Tyr20 并非理论酶

切位点,有报道指出胰蛋白酶可有效水解  $\beta$ -Lg 中该位点后的肽键<sup>[23]</sup>。本研究中,由该位点水解产生的肽也被检测到,如 f(21~40)。相较于  $\beta$ -Lg,来源于  $\alpha$ -La 的肽较少,实际中被水解的酶切位点主要位于该蛋白质一级结构的两端,例如 Lys5、Lys13、Lys98、Lys108 与 Lys114。这可能是由于该蛋白质其它酶切位点位于蛋白质空间结构中的内部,空间位阻使胰蛋白酶无法有效接触这些酶切位点。

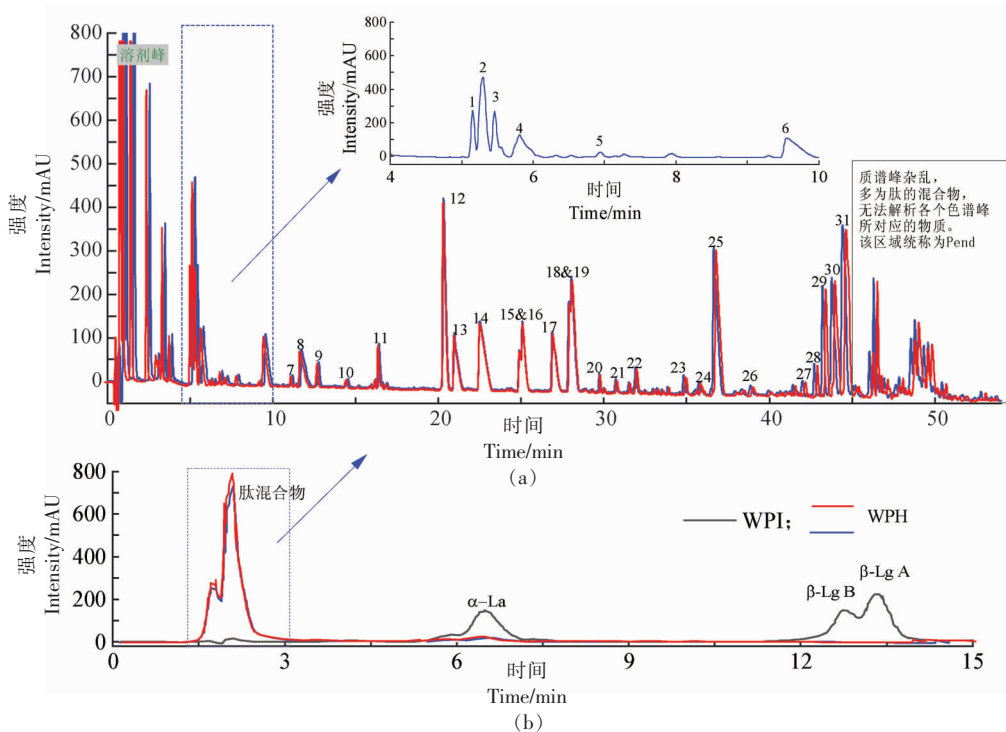


图 3 HPLC 分析:(a)WPH 中肽组成的 HPLC 分析;(b) WPI 与 WPH 中残留蛋白质 HPLC 分析  
Fig.3 HPLC profiles:(a) HPLC analysis of peptide composition in WPH;(b) HPLC profiles of WPI and residual proteins in WPH

表 1 各色谱峰所对应的肽

Table 1 Peptides corresponding to each chromatographic peak

色谱峰	保留时间/min	实测质核比(m/z)	理论质核比(m/z)	肽	氨基酸序列
1	5.16	1 122.80	1 122.47	[61~70]B	WENGECAQKK
2	5.30	1 249.14	1 249.50	[61~69]B	WENGECAQK
3	5.56	1 179.02	1 178.32	[61~69]A	WEGGECAQK
		1 285.10	1 284.51	[61~70]A	WEGGECAQKK
4	5.81	573.33	573.36	[71~75]	IIAEK
5	6.92	1 040.40	1 040.20	[6~13]*	CEVFRELK
6	9.56	938.43	939.00	[84~91]	IDALNENK
7	11.19	1 066.49	未知	/	/

(续表 1)

色谱峰	保留时间/min	实测质核比( <i>m/z</i> )	理论质核比( <i>m/z</i> )	肽	氨基酸序列
8	11.73	673.35	672.78	[9~14]	GLDIQK
9	12.77	825.15	825.00	[71~77]	IIAEKTK
10	14.18	1 146.35	1 146.57	[115~123]*	LDQWLCEKL
11	16.42	1 245.57	1 245.31	[125~135]	TPEVDDEALEK
12	20.97	933.59	933.17	[1~8]	LIVTQTMK
13	22.50	837.56	837.05	[142~148]	ALPMHIR
14	24.89	1 193.71	1 193.41	[92~101]	VLVLDTDYKK
15	25.11	1 065.63	1 065.23	[92~100]	VLVLDTDYK
16	26.88	903.66	903.57	[76~83]	TKIPAVFK
17	27.89	1 635.52	1 635.75	[125~138]	TPEVDDEALEKFDK
18	28.72	1 200.10	1 199.60	[99~108]*	VGINYWLAHK
19	29.01	1 668.26	1 668.90	[95~108]*	ILDKVGINYWLAHK
20	30.72	1 777.82	1 777.87	[109~123]*	ALCSEKLDQWLCEKL
21	31.51	2 309.74	未知	/	/
22	31.91	1 621.31	1 621.81	[1~13]*	EQLTKCEVFRELK
		1 978.51	1 978.08	[1~16]*	EQLTKCEVFRELKDLK
23	34.81	1 250.57	未知	/	/
24	35.72	1 803.23	1 802.83	[76~91]	TKIPAVFKIDALNENK
25	36.64	1 715.84	1 715.40	[149~162]	LSFNPTQLEEQCHI
26	38.64	1 602.57	未知	/	/
27	41.42	1 843.83	未知	/	/
28	42.01	2 418.87	2 419.04	[59~79]*	IWCKDDQNPSSNICNISC DK
29	42.71	2 030.07	2 030.18	[21~40]	SLAMAASDISLLDAQSAPLR
30	43.63	2 774.33	2 774.29	[101~124]B	KYLLFCMENSAEPEQSLGCQCLVR
31	44.43	2 646.85	2 646.25	[102~124]A	YLLFCMENSAEPEQSLACQCLVR
		2 313.29	2 313.67	[41~60]	VYVEELKPTPEGDLEILLQK

注:\*来源于 $\alpha$ -La 蛋白,其余则来源于 $\beta$ -Lg 蛋白。A 与 B 分别指 $\beta$ -Lg A 与 $\beta$ -Lg B。

## 2.2 不同 pH 条件下 WPI 与 WPH 的 Zeta 电位

一般情况下,Zeta 电位绝对值越高,代表粒子之间的静电作用越强,有利于防止液滴聚集<sup>[24]</sup>。如图 4 所示,随 pH 值的升高,Zeta 电位呈下降趋势。Zeta 电位值为 0 时的 pH 即溶液中蛋白质/肽的表观等电点 (pI),表示粒子表面净电荷为 0。由此可见,WPI 的 pI 在 pH5 左右 (图 4),与 $\beta$ -Lg (pI=5.1)及 $\alpha$ -La (pI=4.2)的理论等电点相近<sup>[25]</sup>。WPH 的 pI 在 4 左右,是因为水解导致可电离的基团增加。根据 WPH 与 WPI 的 pI 值,后续考察了 pH3,4,5,6,7 对其乳化性的影响。

## 2.3 不同 pH 值对 WPI 与 WPH 乳化性的影响

乳液粒度直观反映乳液分散、聚集情况。一般来说,乳液粒度越小,乳液分散性越佳,往往也更稳定,常作为评价乳化性的指标。蛋白质分数为 1% 的 WPI 与 WPH 所形成的乳液粒度随 pH 变化

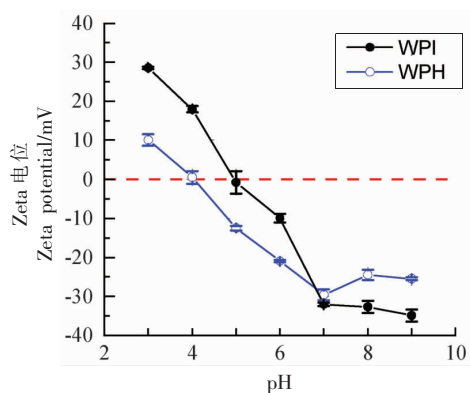


图 4 WPI 与 WPH 的 Zeta 电位随 pH 的变化

Fig.4 Zeta potential profiles changes of WPI and WPH with pH values

情况如图 5 所示。WPI 在其 pI 条件下所形成的乳液  $d_{50}$  值为  $9.1 \mu\text{m}$ ,而在其它 pH 条件下,该值均为  $1 \mu\text{m}$  左右。WPH 亦在其 pI 值 (pH=4) 处达最

大  $d_{50}$  值 ( $4.8 \mu\text{m}$ ), 且在 pH 5 时  $d_{50}$  值为  $3.0 \mu\text{m}$ , 约为其它 pH 条件下的 3 倍。在接近 pI 时, 蛋白质/肽几乎不带电, 彼此间静电斥力不足, 使乳液聚集<sup>[26]</sup>。用 SDS 分散法测定上述 3 组样品, WPI 在 pH 5 时形成的乳液, 其  $d_{50}$  值降至  $1.2 \mu\text{m}$  ( $F=7.6$ ), 而 WPH 在 pH 4 与 pH 5 的乳液的  $d_{50}$  值分别降至  $1.7 \mu\text{m}$  ( $F=2.8$ ) 与  $2.5 \mu\text{m}$  ( $F=1.2$ ), 与其较高的乳析速率相对应(表 2), 说明在 pI 附近, 聚集是上述乳液不稳定的主要原因。

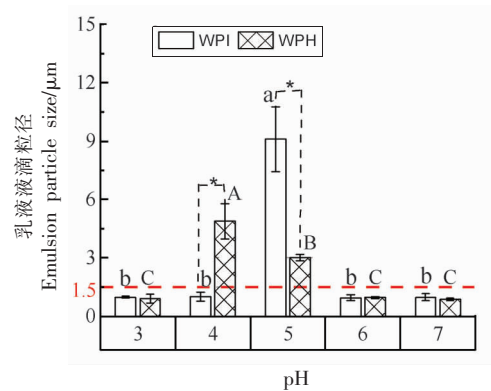
## 2.4 不同环境因素对 WPH 乳化性的影响

### 2.4.1 热处理

热处理往往导致蛋白质/肽结构的改变<sup>[27]</sup>, 从而影响其在 O/W 界面处的吸附行为。根据前文研究结果, 分别选取 pH 3, 4, 7 (WPH 中的肽分别携带正、中、负静电荷) 并与热处理结合, 探究其对 WPH 乳化性的影响。在 pH3 与 pH7 时, 热处理对乳液的  $d_{50}$  值均无显著性影响, 且均小于  $1.5 \mu\text{m}$  (图 6)。通过 STEP 技术进一步分析 WPH 乳液稳定性, 结果发现 pH 3 时乳液乳析速率均在  $4.9 \mu\text{m/s}$  左右(表 2), 而 pH 7 时对 WPH 进行热处理降低了乳液乳析速率(未处理组  $6.8 \mu\text{m/s}$ , 热处理组  $4.3 \mu\text{m/s}$ )。这一现象在 pH 4 时更为显著, 热处理显著降低了乳液  $d_{50}$  值与乳析速率(未处理  $407.5 \mu\text{m/s}$ ; 热处理  $47.6 \mu\text{m/s}$ )。WPH 乳化性的提高可能是由于热处理导致部分肽(主要是表面静电荷为 0 的多肽)发生聚集, 在后续乳化过程中这些肽很少甚至未吸附在 O/W 界面, 而其余携带电荷的肽更多地分布在界面处, 乳化性得到提升。这说明环境因素可显著调控肽在 O/W 界面处的吸附行为。为进一步验证该假设, 后续试验分别在 pH3, 4, 7 下添加不同浓度的盐离子并结合热处理对 WPH 的乳化性进行分析。

### 2.4.2 盐溶液及热处理对 WPH 乳化性的影响及其与肽组成相关性分析

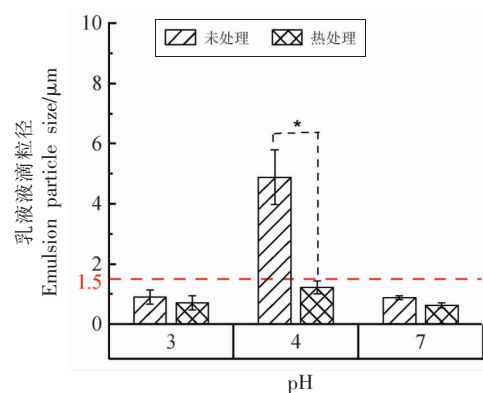
在  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  盐浓度范围, 绝大多数样品的  $d_{50}$  值随 SDS 的增加而增大, 可肉眼观察到絮凝现象。这可能是由于高浓度  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  离子与 SDS 的共同作用导致乳液液滴的聚集。因此, 对这些样品不采取 SDS 分散法进行聚集效应分析(表 2)。此外, 由 2.4.1 节结果可知, 乳液粒度分布与乳析速率呈正相关, 即粒度越大乳析速率越快, 乳液越不稳定, 说明粒度分布对乳化性具有良好的表征效果。本节主要采用粒度分



注: 不同小写字母表示 WPI 样品组存在显著性差异; 不同大写字母表示 WPH 样品组存在显著性差异; \* 表示相同 pH 下 WPI 与 WPH 样品组间存在显著性差异, 无标注则为无显著性差异 ( $P<0.5$ )。

图 5 不同 pH 值对乳液粒度的影响

Fig.5 Effects of pH values on the particle size of emulsions



注: \* 表示相同 pH 下不同处理样品组存在显著性差异, 无标注则为无显著性差异 ( $P<0.5$ )。

图 6 不同 pH 值下热处理对乳液粒度的影响

Fig.6 Effects of heat treatment on the particle size of emulsions at varied pH values

布来表征不同环境下 WPH 乳化性的变化, 并辅以乳析速率进行验证。由于多数情况下所形成的乳液稳定性差, 乳析速率测量误差大(部分样品乳析速率过大, 在取样过程中已观察到乳析现象), 因此该值仅供作参考, 不作显著性分析。

图 6a~6c 分别为 pH 3, 4, 7 条件下, 两种浓度 (0.1, 1 mol/L) 的一价盐 ( $\text{NaCl}$ 、 $\text{KCl}$ ) 和二价盐 ( $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ ) 以及乳化前 WPH 热处理对其乳液粒度的影响, 结果表明 WPH 的乳化性与溶液中的 pH、盐离子种类和浓度显著相关。此外, 这些因素导致乳化性变化的机理可能主要有两种: 1) O/W

界面的肽组成不变,而肽之间的相互作用改变;2)改变了界面的肽的组成。本试验采用 MALDI-TOF-MS 分析各样品离心后得到的沉淀的肽,结果见表 3。

当大多数肽表面带正电荷 (pH3,图 6a)时,随盐浓度的增加,Cl<sup>-</sup>的电荷屏蔽作用愈加显著,乳液粒度显著增大。添加 1mol/L NaCl、KCl 的乳液 *F* 值分别为 3.8,3.3(表 2),表明聚集效应是其乳化性降低的主要原因,导致聚集的主要是 Cl<sup>-</sup>的电荷屏蔽作用。盐浓度 (离子强度)显著影响 WPH 乳化性,而不同盐种类对其的影响无显著性差异,这与表 2 中测得的乳析速率相符。此外,无论是否热处理,一价盐均导致相同的疏水性肽 (分子质量 < 2 ku) 析出,而二价盐主要导致热处理组析出分子质量 > 2 ku 的肽(表 3)。分子质量较大的多肽往往具有一定的空间结构,热处理导致其结构变化,而二价阳离子可能通过与肽形成盐桥促使其聚集甚至析出。这些肽的析出导致粒度及乳析速率进一步增大。其中,加入 1 mol/L MgCl<sub>2</sub> 的热处理组的乳液粒度最大,这可能是肽 f(41~60)析出所致,该肽已被证明具有很好的乳化性能<sup>[13]</sup>。

如图 6c 所示,pH 7 时添加一价盐导致乳液粒度及乳析速率略微增大;添加二价盐,该趋势更加明显。在 pH7 时,WPH 中的肽大多带负电荷,可与不同盐的阳离子相互结合,二价盐较一价盐更易

促进液滴间形成离子键,导致乳液粒度增大。与 pH 3 不同,pH 7 时离子强度对 WPH 乳化性的影响并不显著。此外,添加 0.1 mol/L NaCl、KCl 的 WPH 在热处理前、后所形成的乳液的聚集因子分别为 1.5 和 4.7 与 1.5 和 5.6(表 2),这说明聚集效应是造成热处理后 WPH 乳化稳定性差的主要因素。相比之下,热处理对存在二价盐的 WPH 的乳化性影响较小。pH 7 时肽的静电排斥作用使得在所有样品中均未检测到析出的肽,无法将其乳化性的变化与特定的肽进行关联。

在肽的等电点附近 (pH4),静电斥力不足导致乳液产生明显的聚集效应 (图 5)。添加盐并未加剧这一影响,反而在添加 1 mol/L 二价盐的情况下显著提高了其乳化性 (图 6b)。与 pH 3、pH 7 时截然不同,在 pH 4 时,热处理显著降低了乳液粒度及乳析速率 (除 1 mol/L MgCl<sub>2</sub> 存在时)。这可能是因为此时大多肽的静电荷为 0,不同阳离子和/或 Cl<sup>-</sup>与肽在热处理后的相互作用补偿了缺失的静电作用,因此仅在添加 1mol/L CaCl<sub>2</sub> 且热处理后的 WPH 中检测到沉淀的肽,而该组样品的乳化性优于 pH 4 时其它条件下的样品。说明这些肽的析出可能促进了 WPH 的乳化性。综合不同 pH 条件下析出肽的组成以及相应的乳化性分析,来自于  $\beta$ -Lg 的 f(41~60),f(71~91),f(78~101) 对 WPH 的乳化性具有重要贡献。

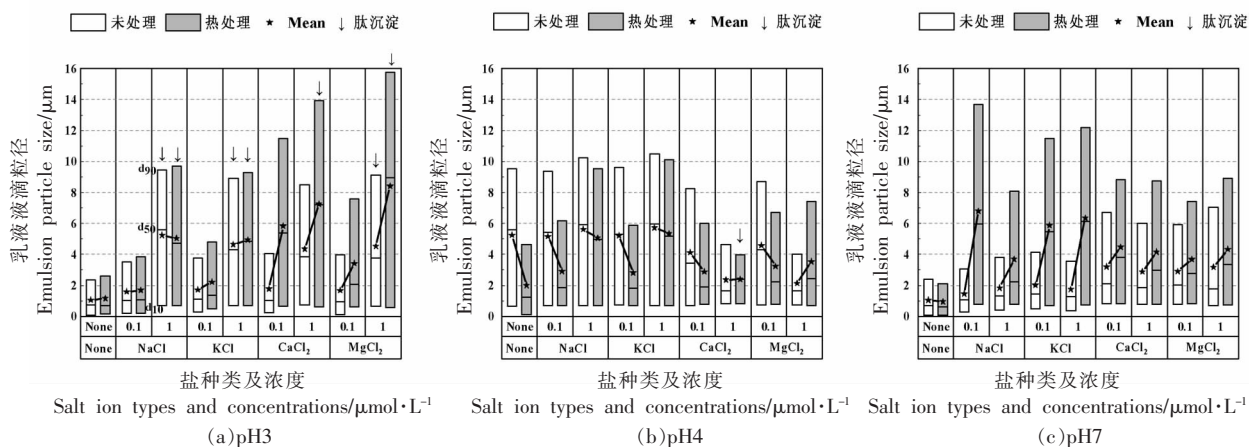


图 7 不同 pH 条件下盐种类和浓度对乳液粒度的影响

Fig.7 Effects of salt ion types and concentrations on the size distributions of emulsion particle at varied pH values

表2 不同环境条件下WPI与WPH乳液的相关特性

Table 2 Characteristics of emulsions formed by WPI and WPH with different milieu conditions

样品	pH 值	盐	是否热处理	$d_{50}$	SDS- $d_{50}^*$	聚集因子	乳析速率/ $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	
WPI	3	/	否	$0.99 \pm 0.05$	/	/	$3.8 \pm 0.2$	
	4	/	否	$1.0 \pm 0.23$	/	/	$4.1 \pm 0.1$	
	5	/	否	$9.11 \pm 1.66$	$1.2 \pm 0.06$	7.6	$293.0 \pm 45.6$	
	6	/	否	$0.95 \pm 0.15$	/	/	$4.0 \pm 0.1$	
	7	/	否	$0.99 \pm 0.18$	/	/	$3.9 \pm 0.1$	
WPH	3	/	否	$0.91 \pm 0.23$	/	/	$4.9 \pm 0.2$	
			是	$0.71 \pm 0.23$	/	/	$4.8 \pm 0.1$	
	0.1 mol/L NaCl	否	$1.03 \pm 0.18$	/	/	$14.3 \pm 1.4$		
		是	$1.06 \pm 0.21$	/	/	$15.0 \pm 1.3$		
	1 mol/L NaCl	否	$5.57 \pm 1.25$	$1.47 \pm 0.04$	3.8	$580.5 \pm 67.8$		
		是	$4.74 \pm 0.28$	$1.6 \pm 0.23$	3.0	$592.5 \pm 123.4$		
	0.1 mol/L KCl	否	$1.11 \pm 0.21$	/	/	$6.1 \pm 2.3$		
		是	$1.36 \pm 0.25$	/	/	$7.8 \pm 0.4$		
	1 mol/L KCl	否	$4.29 \pm 1.5$	$1.3 \pm 0.29$	3.3	$389.3 \pm 32.4$		
		是	$4.87 \pm 0.33$	$1.4 \pm 0.09$	3.5	$527.6 \pm 34.78$		
	0.1 mol/L $\text{CaCl}_2$	否	$1.03 \pm 0.26$	/	/	$50.7 \pm 12.3$		
		是	$5.38 \pm 0.3$	/	/	$517.9 \pm 89.2$		
	1 mol/L $\text{CaCl}_2$	否	$3.85 \pm 0.6$	/	/	$334.1 \pm 65.4$		
		是	$7.21 \pm 0.4$	/	/	$528.4 \pm 96.3$		
	0.1 mol/L $\text{MgCl}_2$	否	$0.96 \pm 0.31$	/	/	$13.9 \pm 3.2$		
		是	$2.08 \pm 0.36$	/	/	$30.8 \pm 1.2$		
	1 mol/L $\text{MgCl}_2$	否	$3.77 \pm 0.24$	/	/	$189.5 \pm 12.4$		
		是	$8.95 \pm 2.08$	/	/	$543.8 \pm 101.2$		
	WPH	4	/	否	$4.88 \pm 0.91$	$1.74 \pm 0.08$	2.8	$407.5 \pm 36.7$
				是	$1.22 \pm 0.21$	/	/	$47.6 \pm 8.3$
0.1 mol/L NaCl		否	$5.41 \pm 0.91$	$2.13 \pm 0.46$	2.6	$423.2 \pm 43.4$		
		是	$1.85 \pm 0.21$	$1.78 \pm 0.24$	1.1	$95.2 \pm 23.3$		
1 mol/L NaCl		否	$5.93 \pm 1$	$2.15 \pm 0.17$	2.8	$416.8 \pm 68.3$		
		是	$4.99 \pm 1.33$	$2.63 \pm 0.32$	1.9	$426.8 \pm 48.2$		
0.1 mol/L KCl		否	$5.3 \pm 0.38$	$2.35 \pm 0.55$	2.3	$315.5 \pm 65.3$		
		是	$1.82 \pm 0.2$	$1.92 \pm 0.29$	1.0	$103.7 \pm 34.1$		
1 mol/L KCl		否	$5.98 \pm 1.2$	$2.54 \pm 0.07$	2.4	$517.7 \pm 23.2$		
		是	$5.19 \pm 0.27$	$2.11 \pm 0.06$	2.5	$368.37 \pm 54.2$		
0.1 mol/L $\text{CaCl}_2$		否	$3.45 \pm 0.46$	/	/	$231.6 \pm 9.2$		
		是	$1.88 \pm 0.24$	/	/	$142.4 \pm 23.6$		
1 mol/L $\text{CaCl}_2$		否	$1.65 \pm 0.17$	/	/	$66.1 \pm 31.2$		
		是	$2.39 \pm 0.32$	/	/	$60.6 \pm 12.3$		
0.1 mol/L $\text{MgCl}_2$		否	$4.3 \pm 0.55$	/	/	$336.2 \pm 43.6$		
		是	$2.22 \pm 0.29$	/	/	$178.4 \pm 21.4$		
1 mol/L $\text{MgCl}_2$		否	$1.65 \pm 0.07$	/	/	$65.9 \pm 9.8$		
		是	$2.45 \pm 0.06$	/	/	$168.7 \pm 23.1$		
5		/	否	$3.01 \pm 0.18$	$2.5 \pm 0.36$	1.2	$86.6 \pm 8.2$	
6		/	否	$0.96 \pm 0.06$	/	/	$5.8 \pm 0.2$	
7	/	否	$0.88 \pm 0.06$	/	/	$6.8 \pm 0.2$		



(续表 2)

样品	pH 值	盐	是否热处理	$d_{50}$	SDS- $d_{50}^*$	聚集因子	乳析速率/ $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
			是	$0.63 \pm 0.08$			$4.3 \pm 0.2$
		0.1 mol/L NaCl	否	$1.05 \pm 0.06$	/	/	$7.1 \pm 0.2$
			是	$5.96 \pm 1.47$	$1.28 \pm 0.05$	4.7	$350.3 \pm 12.4$
		1 mol/L NaCl	否	$1.33 \pm 0.69$	/	/	$22.1 \pm 3.5$
			是	$2.21 \pm 0.16$	$1.13 \pm 0.08$	2.0	$170.2 \pm 21.3$
		0.1 mol/L KCl	否	$1.44 \pm 0.96$	/	/	$116.6 \pm 28.2$
			是	$5.46 \pm 0.21$	$0.98 \pm 0.07$	5.6	$315.7 \pm 54.2$
		1 mol/L KCl	否	$1.29 \pm 2.21$	/	/	$59.8 \pm 12.3$
			是	$6.14 \pm 0.44$	$0.92 \pm 0.10$	6.7	$341.3 \pm 23.1$
		0.1 mol/L $\text{CaCl}_2$	否	$2.11 \pm 0.13$	/	/	$24.2 \pm 2.5$
			是	$3.79 \pm 0.26$			$170.3 \pm 9.4$
		1 mol/L $\text{CaCl}_2$	否	$1.85 \pm 0.28$	/	/	$24.6 \pm 8.7$
			是	$2.98 \pm 0.23$			$271.9 \pm 53.2$
		0.1 mol/L $\text{MgCl}_2$	否	$2.01 \pm 0.05$	/	/	$87.8 \pm 12.2$
			是	$2.78 \pm 0.53$			$268.8 \pm 23.4$
		1 mol/L $\text{MgCl}_2$	否	$1.77 \pm 0.14$	/	/	$45.5 \pm 3.2$
			是	$3.34 \pm 0.21$			$273.1 \pm 43.2$

注:\* 只将  $d_{50} > 1.5 \mu\text{m}$  的样品与 0.5% 的 SDS 溶液混合后再测量; 添加  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$  的样品加入 SDS 后有显著的絮凝现象而无法测量 SDS- $d_{50}$ 。

表 3 沉淀肽的相关性质及分析

Table 3 The analysis of precipitated peptides

蛋白质来源	肽				pH 值	盐 (1 mol/L)	处理过程	
	序列	分子质量/ku	理论等电点	平均亲水性				
$\beta$ -Lg	f (78~83)	0.7	10.1	-0.6	3	NaCl	组 1&2	
	f (76~83)	0.9	10.6	-0.1			组 1&2	
	f (61~69)	1.1	4.3	-0.1			组 1&2	
	f (61~101)	4.7	8.7	0.4		$\text{CaCl}_2$	组 2	
	f (71~91)	2.4	9.7	0.3			组 2	
	f (78~101)	2.6	7.0	0.2			组 2	
	f (84~124)	4.7	4.2	0.1			组 2	
	f (78~83)	0.7	10.1	-0.6		$\text{MgCl}_2$	组 1&2	
	f (41~60)	2.3	4.0	0.3			组 1&2	
	f (61~101)	4.7	8.7	0.4			组 2	
		f (78~101)	2.6	7.0		0.2		组 2
		f (139~148)	1.2	11.5		-0.2		组 2
	$\alpha$ -La	f (109~123)	1.8	4.4		0.2	4	KCl
f (115~123)		1.1	4.1	-0.1	组 1&2			
f (6~13)		0.7	6.4	0.6	组 1&2			
$\beta$ -Lg	f (61~100/101)	4.7	6.6/8.7	0.3/0.4	4	$\text{CaCl}_2$	组 2	
	f (92~124)	3.7	4.3	-0.1			组 2	
	f (101~148)	5.2	4.7	0.3			组 2	
	f (136~148)	1.5	10.6	0.1			组 2	
	f (139~148)	1.2	11.5	-0.2			组 2	
$\alpha$ -La	f (115~123)	1.1	4.1	-0.1		组 2		

注: 组 1、组 2 分别表示未热处理与热处理。只有在所有重复样品中均检测到的肽才会被确认存在。相关性质由 <https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/> 计算而得, 其中平均亲水性是基于“霍普-伍兹分析”计算而得, 大于 0 时亲水, 小于 0 时疏水, 其绝对值越大表示相应的亲水/疏水性越强。

### 3 结论

利用胰蛋白酶充分水解 WPI 得到 WPH。通过在不同 pH 条件下改变离子种类、离子强度以及对 WPH 进行热处理等手段,研究环境变化和热处理对 WPH 乳化性的影响。结果表明在 WPH 的 pI 附近 (pH4),热处理或热处理与添加盐类(例如  $\text{CaCl}_2$ ) 相结合有助于提高其乳化性。不同环境因素或热处理导致不同的肽析出,间接验证了通过改变环境因素可调控吸附到 O/W 界面的肽组成及其相互作用的假设,而部分肽,例如来自于  $\beta$ -Lg 的 f(41~60)、f(71~91)、f(78~101) 对 WPH 的乳化性具有重要贡献。基于本研究结论,后续拟添加组分相对复杂的乳盐(富含钙、磷,可作为天然钙质增补剂)并结合不同的热处理条件,期望显著改变 WPH 的乳化特性,使其更具实用价值。

### 参 考 文 献

- [1] ZHANG X, ZHANG S, XIE F, et al. Soy/whey protein isolates: interfacial properties and effects on the stability of oil-in-water emulsions[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(1): 262-271.
- [2] LAM R S H, NICKERSON M T. The effect of pH and temperature pre-treatments on the physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate[J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2015, 60(1): 427-434.
- [3] YU X X, LIU C, LU M H, et al. Impact of enzymatic hydrolysis followed by transglutaminase-induced cross-linking on decreasing antigenicity and reserving partial interfacial properties of whey protein isolate[J]. *Food & Function*, 2019, 10(3): 1653-1660.
- [4] 于鑫欣, 刘畅, 赵昀晗, 等. 蛋白质打开方式对乳清蛋白酶法交联及抗原性的影响[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(9): 53-58.  
YU X X, LIU C, ZHAO Y H, et al. Effects of protein opening mode on enzymatic cross-linking and antigenicity of whey protein [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(9): 53-58.
- [5] MARTIN-DEL-CAMPO S T, MARTINEZ-BASILIO P C, SEPULVEDA-ALVAREZ J C, et al. Production of antioxidant and ACEI peptides from cheese whey discarded from Mexican white cheese production[J]. *Antioxidants* 2019, 8(6): 158.
- [6] ZHAO C H, ASHAOLU T J. Bioactivity and safety of whey peptides[J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2020, 134: 109935-109940.
- [7] DRAPALA K P, AUTY M A E, MULVIHILL D M, et al. Improving thermal stability of hydrolysed whey protein-based infant formula emulsions by protein-carbohydrate conjugation [J]. *Food Research International*, 2016, 88(Pt A): 42-51.
- [8] GARCIA-MORENO P J, GUADIX A, GUADIX E M, et al. Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with fish protein hydrolysates[J]. *Food Chemistry*, 2016, 203: 124-135.
- [9] SINGH A M, DALGLEISH D G. The emulsifying properties of hydrolyzates of whey proteins[J]. *Journal of Dairy Science*, 1998, 81(4): 918-924.
- [10] BANACH J C, LIN Z, LAMSAL B P. Enzymatic modification of milk protein concentrate and characterization of resulting functional properties[J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2013, 54(2): 397-403.
- [11] RYAN G, O'REGAN J, FITZGERALD R J. Emulsification properties of bovine milk protein isolate and associated enzymatic hydrolysates[J]. *International Dairy Journal*, 2020, 110: 104811-104819.
- [12] LIM A S L, FENELON M A, MCCARTHY N A. Physicochemical properties and issues associated with trypsin hydrolyses of bovine casein-dominant protein ingredients[J]. *International Dairy Journal*, 2019, 97: 111-119.
- [13] RAHALI V, CHOBERT J M, HAERTLE T, et al. Emulsification of chemical and enzymatic hydrolysates of beta-lactoglobulin: characterization of the peptides adsorbed at the interface[J]. *Nahrung-Food*, 2000, 44(2): 89-95.
- [14] GARCIA-MORENO P J, GREGERSEN S, NEDAMANI E R, et al. Identification of emulsifier potato peptides by bioinformatics: application to omega-3 delivery emulsions and release from potato industry side streams[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 690.
- [15] ALUKO R E, MCINTOSH T, REANEY M. Comparative study of the emulsifying and foaming properties of defatted coriander (*Coriandrum sativum*)

- seed flour and protein concentrate[J]. *Food Research International*, 2001, 34(8): 733–738.
- [16] BUCKEE G K. Determination of total nitrogen in barley, malt and beer by Kjeldahl procedures and the Dumas combustion method—collaborative trial[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 1994, 100(2): 57–64.
- [17] DANNENBERG F, KESSLER H G. Reaction kinetics of the denaturation of whey Proteins in milk[J]. *Journal of Food Science*, 1988, 53(1): 258–263.
- [18] MAT D J L, CATTENOZ T, SOUCHON I, et al. Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: *In vitro* gastric digestions in static and dynamic pH conditions[J]. *Food Chemistry*, 2018, 239: 268–275.
- [19] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(5): 642–646.
- [20] MAO Y, CERNIGOJ U, ZALOKAR V, et al. Production of beta-Lactoglobulin hydrolysates by monolith based immobilized trypsin reactors[J]. *Electrophoresis*, 2017, 38(22/23): 2947–2956.
- [21] MAO Y H, KULOZIK U. Selective hydrolysis of whey proteins using a flow-through monolithic reactor with large pore size and immobilised trypsin[J]. *International Dairy Journal*, 2018, 85: 96–104.
- [22] DENG Y, GRUPPEN H, WIERENGA P A. Comparison of protein hydrolysis catalyzed by bovine, porcine, and human trypsins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(16): 4219–4232.
- [23] MAO Y H, KRISCHKE M, HENGST C, et al. Influence of salts on hydrolysis of beta-lactoglobulin by free and immobilised trypsin[J]. *International Dairy Journal*, 2019, 93: 106–115.
- [24] GRISHAM D R, NANDA V. Zeta potential prediction from protein structure in general aqueous electrolyte solutions[J]. *Langmuir*, 2020, 36(46): 13799–13803.
- [25] FARRELL H M, JIMENEZ-FLORES R, BLECK G T, et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision[J]. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87(6): 1641–1674.
- [26] DAI L, HINRICHS J, WEISS J. Ionic strength and pH stability of oil-in-water emulsions prepared with acid-hydrolyzed insoluble proteins from *Chlorella protothecoides*[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(11): 4237–4244.
- [27] 陈笛, 王存芳. 乳清蛋白及与其它乳成分的热聚合作用机制研究进展[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(3): 298–306.
- CHEN D, WANG C F. Research progress on mechanisms of thermal polymerization of whey protein and other milk ingredients[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(3): 298–306.

## The Changes and Mechanism of the Emulsifying Properties of Whey Protein Hydrolysates at Various Conditions

Huang Wenting, Mao Yuhong\*, Cai Zhenling, Chen Lan, Li Renkuan, Ye Xiuyun  
(College of Biological Sciences and Technology, Fuzhou University,  
Fujian Key Laboratory of Marine Enzyme Engineering, Fuzhou 350108)

**Abstract** Firstly, whey protein isolate (WPI) was hydrolyzed by trypsin at constant conditions (i.e., pH 8.5, 37 °C, enzyme/substrate ratio: 0.5%, 5 h) to prepare whey protein hydrolysates (WPH). Secondly, this study evaluated the influence of milieu conditions on emulsifying properties of WPH. Namely, pH values (3–7) and ionic strength (0.1 mol/L and 1 mol/L) by means of the addition with different salts (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>) were combined with heat treatment of WPH prior emulsification. For emulsion characterization, particle size distributions were measured by laser diffraction, emulsion stability was evaluated by STEP technique, and mass spectrometry was used to identify individual precipitated peptides due to heat treatment or the changes of milieu conditions. It was found that the charge-shielding effect caused by the increase in ionic strength at pH3 led to significant emulsion flocculation, while the effect of ionic

strength on the emulsification characteristics of WPH at pH7 was insignificant. In addition, at the isoelectric point of WPH (pH4), heat treatment significantly improved the emulsification characteristics of WPH, especially for the sample group with the addition of CaCl<sub>2</sub>. Combining the composition of the precipitated peptides at different environmental conditions and the corresponding emulsification characteristics, f(41-60), f(71-91), and f(78-101) released from  $\beta$ -Lg are believed to make an important contribution to the emulsification characteristics of WPH.

**Keywords** whey protein hydrolysate; emulsifying properties; salt ions; pH values; heat treatment