

添加抗凝膠劑對蛋黃冷凍凝膠之影響

林禹承 5110

12/8/2021

大綱

- 一、 前言
- 二、 抗凝膠劑和冷凍對蛋黃流變性、熱力學及微結構之影響
- 三、 抗凝膠劑對蛋黃冷凍凝膠之影響
- 四、 冷凍和食品添加物對蛋黃流變性之影響
- 五、 結論

摘要

液體蛋黃因其保值期有限且對熱敏感，通常使用冷凍保存，但冷凍下蛋黃會產生不可逆的凝膠化現象，因此添加抗凝膠劑為一主要趨勢，本篇主要研究添加氯化鈉、蔗糖、水解蛋黃或酵素，是否能有效抑制凝膠。結果顯示相比 10% 的蔗糖及鹽，5% 水解蛋黃也能達到抗凝膠化的作用，但長期的保存下(冷凍 30 天)僅 10% 糖能維持液態，10% 的糖甚至在冷藏解凍 5 天後仍保持液態，顯示出其抗凝膠能力。急速冷凍對未添加之蛋黃雖有助益，但對添加後的組別並無影響，但在急速冷凍的情況下，添加 10% 鹽下會造成更嚴重的凝膠產生，可以推測鹽是透過降低共晶點，達到抗凝膠的能力。中性蛋白酶能夠與 2% 蔗糖及 2% 鹽產生相乘作用，因此未來工業上可以與商用方法並行，達到更好的抗凝膠作用。而本次實驗也發現蛋黃的變性溫度無法以流變儀方法取代式差熱掃描分析儀，添加鹽及糖會提升蛋白質穩定性，而添加水解蛋黃會降低其穩定性。

一、前言

由於豐富的營養成分及乳化功能，液體蛋黃是一種良好的食品(Anton, 2013)，但液態蛋黃的保質期有限，且蛋黃對熱處理非常敏感(Blume *et al.*, 2015)，因此通常使用冷凍保存，然而蛋黃在 -6°C 或更低的溫度下冷凍時，蛋黃會產生凝膠化現象，導致不可逆的流動性損失(Au *et al.*, 2015)。

食品工業通常會在冷凍前添加 10% 的鹽(Sodium chloride, NaCl)或蔗糖(Sucrose)以抑制凝膠化(Primacella *et al.*, 2018)，其他添加劑如葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖、山梨糖醇、丙二醇和木瓜蛋白酶也被發現是有效的凝膠抑制劑(Lopez *et al.*, 1954; Lopez *et al.*, 1955; Powrie *et al.*, 1963)，但由於成本過高因此不常使用。高糖分及鹽分的蛋黃在食品應用上有所限制，且近年來消費者對健康議題的重視，促使研究人員開始研究如何減少其用量與其凝膠化機制。日前的研究已證實添加酶解及蛋黃水解產物是防止冷凍過程中蛋黃凝膠化的有效方法(Primacella *et al.*, 2018)。

蛋黃冷凍引起的凝膠化機制目前還沒有定論，但在過去的研究一致認為，蛋白質在冷凍凝膠化中起著重要的作用，凝膠化冰晶形成導致蛋白質疏水端暴露並聚集形成的，而抑制凝膠的機制在蔗糖、NaCl 與水解蛋白三種主要的添加物上則各有不同。

二、抗凝膠劑和冷凍對蛋黃流變性、熱力學及微結構之影響

本實驗研究了鹽(Sodium chloride, NaCl)、蔗糖和水解蛋黃蛋白(Hydrolyzed egg yolk protein, HEY)對蛋黃流變性(Rheological properties)、熱力學(Thermal behavior)和微結構(microstructure)的影響，以了解它們的凝膠抑制機制。將鹽、蔗糖(5%、10%)及 HEY(3%、5%)分別與新鮮蛋黃混和後，於 -20°C 保存 1、10、20 及 30 天，分析前將樣品在 22°C 下解凍 4 小時，後續使用流變儀測量蛋黃黏彈性；示差掃描熱分析儀(Differential scanning calorimetry, DSC)測量蛋白質變性及自由水結晶溫度；共聚焦雷射掃描顯微鏡(Confocal laser scanning microscopy, CLSM)觀察蛋黃的微結構。

在蛋黃黏彈性部分，由測得之彈性模數(Elastic modulus, G')、損耗模數(Loss modulus, G'')及靜態屈服應力(Static yield stress)作出線性黏彈性區域(Linear viscoelastic region, LVR)。由 LVR 可觀察到新鮮蛋黃組別只有添加鹽的組別顯著高於其他組別，

較高濃度的鹽也導致更高的 G' (Fig. 1A)及屈服應力(Fig. 1B)；而在冷凍保存後的組別，除了控制組與 3%HEY 以外，其他組別的 G'' 仍大於 G' (Fig. 1C)，表示其具有類似液體的特性，而 10%蔗糖與 5%HEY 最不像固體。而 Fig.1B 和 D 顯示 LVR 中 G' 下降 10%所需的屈服應力，而鹽濃度與 G' 呈正相關；HEY 與蔗糖組與 G' 呈負相關。動態力學譜(Dynamic mechanical spectra)顯示出 G' 、 G'' 與震盪頻率的雙對數圖(Fig. 2)。新鮮蛋黃的 G'' 皆大於 G' 表示不存在凝膠狀的行為(Fig. 2AC)，但 10%鹽組別的 G' 與 G'' 在 198.69 rad/s 具有交叉，表示 10%的鹽改變了蛋黃的結構特徵(Fig. 2B)，而冷凍後頻率也有下降(Fig. 2F)；添加 HEY 組別未冷凍的 G' 和 G'' 雖有下降但不如添加鹽的組別，冷凍後 G' 和 G'' 非常接近並交岔於 6.28 和 628.32 rad/s(Fig. 2E)；添加 10%蔗糖組冷凍前後皆沒有產生顯著差異(Fig. 2CG)；隨著頻率增加 $\tan \delta$ 都下降(Fig. 2DH)。

長時間冷凍儲存後，蛋黃樣品的 G' 增加，對照具有最高值，其次是鹽漬、HEY 和加糖樣品 (Fig. 3A)。同樣， G'' 也隨著冷凍儲存時間的延長而增加。鹹蛋黃表現出最高的 G'' ，其次是對照、加糖和 HEY 樣品 (Fig. 3B)。相應地，蛋黃樣品的屈服應力隨著冷凍儲存時間的延長而增加。含 10% 糖的樣品表現出最低的屈服應力，其次是 5% HEY、10% 鹽和對照 (Fig. 3C)。所有樣品的 $\tan \delta$ 隨著冷凍儲存時間的增加而降低 (Fig. 3D)。只有 10% 的加糖蛋黃能夠保持 $\tan \delta > 1$ ，表明在整個 30 天的冷凍儲存過程中具有類似液體的行為。冷凍保存後也對樣品冷藏 4°C 保存 5 天後再次進行評估，發現冷凍保存 30 天並冷藏保存後，僅剩 10%糖還保持液體(Table 1)。

透過 DSC 測量蛋白質變性溫度(Fig. 4)，發現變性溫度添加鹽及糖的組別具有較高的變性溫度，而在保存後沒有組內沒有顯著差異；脂質結晶事件(10 到 -30°C)無法辨別 (Fig. 5)；自由水的結晶溫度無論新鮮還是冷凍儲存 30 天後，幾乎都在 -20°C 左右，僅有 10%鹽的組別產生劇烈的下降至 -40°C 以下(Fig. 5EF)；游離水含量可看到 HEY 與控制組較無差異，而糖與鹽都有顯著的下降，尤其 10%的鹽下降最多(Table 2)。

使用 CLSM 觀察顯微結構，顯示出鹽濃度上升可以觀察到更小的顆粒(Fig. 6)，表雖然示其分散程度高，這種情形在維持到冷凍 30 天後仍舊存在；而含有糖及 HEY 的組別，濃度上升不影響分散程度，且在冷凍後逐漸聚集，而 10%糖組在 30 天時已具有

較大的單元，而 5%HEY 組僅觀察到更緊密的單元；研究也做了冷凍 10 天後冷藏 5 天的組別，發現 10%鹽的大顆粒幾乎消失不見(Fig. 7)，而且糖和 HEY 組別中的團簇也似乎間格越來越遠。

總的來說，鹽、糖和 HEY 會顯著影響蛋黃的流變特性、熱力學和微觀結構，這些添加劑通過不同的機制抑制凝膠化。但即使在這些添加劑的存在下，長時間的冷凍儲存也會增加蛋黃發生凝膠化的趨勢。儘管如此，研究顯示，通過冷藏儲存微觀結構鬆弛，可能可以恢復蛋黃的流動性。

三、抗凝膠劑對蛋黃冷凍凝膠之影響

本研究旨在添加抗凝膠劑抑制冷凍蛋黃的凝膠化，探討對凍融蛋黃凝膠化行為作用，實驗將新鮮蛋黃添加 2%的鹽(Sodium chloride, SC)、2%蔗糖(Sucrose, S)以及 0.05%中性蛋白酶(Neutral Protease, NP)混和處理，分為蔗糖和鹽 (SSC)；中性蛋白酶 (NP)；中性蛋白酶 (SNP) 處理後加入蔗糖；中性蛋白酶 (SCNP) 處理後加入 NaCl；中性蛋白酶 (SSCNP) 處理後加入蔗糖和鹽，在 18°C 冷凍下儲存(7、15、30、45、60、75、90、120、150 和 180 天)後於室溫下解凍 4 小時分析，分析其硬度、流變性、粒徑分析及 DSC 分析。

首先分析物理層面：硬度方面發現只有控制組與 SSC 組有顯著的上升(Fig. 8)，其餘有加入 NP 組別都表現出抑制蛋黃凝膠的能力。流變性上可發現處理過的蛋黃 G'和 G''都有降低(Fig. 9AB)，在 $\tan \delta$ 上控制組與 SSC 組皆大於 1(Fig. 9C)，表示呈現半固體的狀態，而其他四個有 NP 處理的組別皆高於 1，表示其呈現流體的狀態。接著在粒徑分布上，處理組大多落在粒徑較小區域(Fig. 10)，冰晶的形成會促進蛋白質聚集為大分子造成凝膠，因此較小的粒徑可以阻止蛋白質聚集，而中性蛋白酶可將大分子蛋白質分解為小分子減少粒徑(Primacella *et al.*, 2018)，鹽可降低離子間的吸引力(Fang *et al.*, 2021)，而蔗糖可以覆蓋蛋白質並捕獲在冷凍過程中失去的水分子，阻止結構展開並降低蛋白質溶解度，因此蛋白質結構保持穩定，聚集顆粒的形成受到抑制。

熱力學部分：通過 DSC 對樣品進行熱力學分析，通過-20 到 20°C 掃描可計算出融化溫度(melting temperature, T_m)及融化焓(Melting enthalpy, ΔH_1)，反映出可凍結水的

含量；通過-20 到 120°C 掃描可測得變性溫度(Denaturation temperature, T_p)及變性焓值(Denaturation enthalpy, ΔH_2)，用來對照蛋黃的熱穩定性。結果顯示處理組的 T_m 低於新鮮蛋黃但高於對照組(Table 3)，而 ΔH_1 均高於對照組，表示處理後樣品中冷凍水損失減少。而五個樣品的 ΔH_2 高於對照組，且 SNP、SCNP 及 SSCNP 組的 ΔH_2 都高於 NP 組，可能是因為鹽和蔗糖的加入，提高了蛋黃的耐熱溫度。

本次實驗用鹽、蔗糖與 NP 預處理，對冷凍蛋黃長期的變化進行分析，結果顯示在冷凍前加入 2% 的蔗糖和鹽，在一定程度上抑制了凝膠化，但能力不如其他加了 NP 的方法有效，未來在工業上可以結合 NP 的處理，得到更有效的抗凝膠能力。

四、 冷凍和食品添加物對蛋黃流變性之影響

本研究在添加 NaCl、蔗糖及 HEY 三種情況下，對蛋黃冷凍凝膠化的影響，NaCl 與蔗糖的濃度為 10%，HEY 添加量為 5%，冷凍方式分為兩種，一種為傳統的低速冷凍，直接放於-20°C 保存 72 小時；另一種為先以-80°C 急速冷凍 3 小時後，再以-20°C 保存 72 小時，分析前置於室溫解凍 4 小時，解凍後進行全質構分析(Texture profile analysis, TPA)、流變性、及 DSC/流變儀分析其蛋白質穩定性。

在 TPA 分析上，觀察到添加 10% 蔗糖組別硬度最低(Fig. 11)，而添加 HEY 組別則與勻速冷凍的 NaCl 組相似，急速冷凍會使控制組的硬度降低大約 25%，而在 HEY 與蔗糖添加組別上，則沒有看到一樣的趨勢。比較特殊的是添加 10% NaCl，在-80°C 急速冷凍下硬度顯著高於-20°C 冷凍，表示添加 NaCl 的組別在低於共晶點的溫度下，對冷凍誘導的凝膠化沒有抑制作用。

流變學特性分析之中，彈性模數 (G') 和損耗模數 (G'') 分別代表類固體和類液體，在所有蛋黃處理過的樣品中， G'' 值高於 G' 值意味著樣品沒有凝膠。分析凍融過程中各組別的流程特性(Table 4)，未添加組別(FY)在冷凍與解凍時會發生凝膠化，且無法被機器所測量，以 G' 來看添加 10% 糖組(SG)最不像固體，而凍融後所有組別皆有升高，但添加處理的組別仍沒有產生凝膠化作用；凝膠化的發生也可以通過 $\tan \delta$ 來衡量，定義為 G''/G' 的比率， $\tan \delta > 1$ 表明樣品沒有凝膠，除了急速冷凍的 NaCl 組以外，所有樣品均顯示高於 1；屈服應力(Yield stress)定義為在結構化流體中開始流動所

需的最小應力，且與固體特性成正相關，而數據顯示 SG 的數據最低。

G' 與振盪頻率的對數圖可求得斜率(n)，而所有組別都呈現出 $n > 1$ (Fig. 12)，表示蛋黃系統中主要為物理凝膠；在新鮮樣品中所有組別 G'均低於 G''(Fig. 12A)，表示不存在凝膠化，除了加入 NaCl 的組別會在 100 rad/s 左右發生交叉，表示添加 10% NaCl 大幅度的改變其流變性，而 HEY 及 SG 組別的 G'和 G''雖有上升，但與 FY 組相比則無太大差異；在後續冷凍後也發現 NaCl 組交叉點有繼續向較低頻率移動(Fig. 12B)，HEY 組也在冷凍後發生交叉，頻率與 NaCl 組相似，而 SG 組雖稍微有上升，但趨勢沒有明顯變化；在 $\tan \delta$ 中，新鮮的所有組別的 $\tan \delta$ 都高於 1(Fig. 12C)，但新鮮和凍融的 NaCl 組的 $\tan \delta$ 值在較高頻率下均低於 1(Fig. 12D)，而凍融後可發現除了 NaCl 組外，HEY 組在低頻率呈現出大於 1，而高頻率小於 1 的狀況。

蛋白質穩定性通常使用 DSC 分析其固-液相轉變溫度，也就是變性溫度，流變儀最近也被證實可以從黏彈性變化了解其相轉變溫度，結果發現由流變儀的結果差異不顯著(Table 5)，但透過 DSC 測量則有顯著差異，可能因為其較低的加熱速率與其更精準的零件。在 DSC 數據中發現，凍融樣品與新鮮樣品沒有顯著差異，而 SG 和 NaCl 組別增加了對溫度的抵抗力，HEY 則在凍融後變性溫度下降，可能是因為添加 HEY 後的疏水性基團濃度上升，導致生態與蛋黃本身蛋白有更多交聯的可能性，從而導致穩定性下降

本次研究發現添加 5%HEY 的蛋黃，其特性與 10%NaCl 和蔗糖相比，都落在可接受範圍內，顯示其具有成為新型抗凝膠劑的潛力，能夠替代目前的方案，生產新穎的冷凍蛋黃產品。

五、 結論

蔗糖、鹽(NaCl)及胜肽皆具有抗凝膠化的功能，胜肽可以由外部添加，也可以使用蛋白酶處理水解蛋黃的蛋白質。急速冷凍對未添加之蛋黃雖有助益，但對添加後的組別並無影響，且在添加 10%NaCl 下會造成更嚴重的凝膠產生。本次研究發現冷凍後冷藏保存，仍會對蛋黃流變性造成影響，因此未來在研究冷凍凝膠時，也要考慮解凍後冷藏保存造成的影響。

六、 參考文獻

1. Anton, M. (2013). Egg yolk: structures, functionalities and processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12), 2871-2880.
2. Au, C., Acevedo, N. C., Horner, H. T., & Wang, T. (2015). Determination of the gelation mechanism of freeze–thawed hen egg yolk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(46), 10170-10180.
3. Blume, K., Dietrich, K., Lilienthal, S., Ternes, W., & Drotleff, A. (2015). Exploring the relationship between protein secondary structures, temperature-dependent viscosities, and technological treatments in egg yolk and LDL by FTIR and rheology. *Food Chemistry*, 173, 584-593.
4. Fang, B., & Nakagawa, K. (2021). Effect of pH, ionic strength, and freezing treatment on a colloidal suspension of egg white aggregates. *Food Structure*, 27, 100181.
5. Fei, T., Leyva-Gutierrez, F. M. A., Wan, Z., & Wang, T. (2021). Gelation inhibiting additives and freezing impact rheological, thermal, and microstructural properties of yolk. *LWT*, 144, 111160.
6. Lopez, A., Fellers, C. R., & Powie, W. D. (1954). Some factors affecting gelation of frozen egg yolk. *Journal of Milk and Food Technology*, 17(11), 334-339.
7. Lopez, A., Fellers, C. R., & Powrie, W. D. (1955). Enzymic inhibition of gelation in frozen egg yolk. *Journal of Milk and Food Technology*, 18(3), 77-80.
8. Ma, Z., Ma, Y., Wang, R., & Chi, Y. (2021). Influence of antigelation agents on frozen egg yolk gelation. *Journal of Food Engineering*, 302, 110585.
9. Powrie, W., Little, H., & Lopez, A. (1963). Gelation of egg yolk. *Journal of Food Science*, 28(1), 38-46.
10. Primacella, M., Acevedo, N. C., & Wang, T. (2020). Effect of freezing and food additives on the rheological properties of egg yolk. *Food Hydrocolloids*, 98, 105241.
11. Primacella, M., Fei, T., Acevedo, N., & Wang, T. (2018). Effect of food additives on egg yolk gelation induced by freezing. *Food Chemistry*, 263, 142-150.

七、圖表

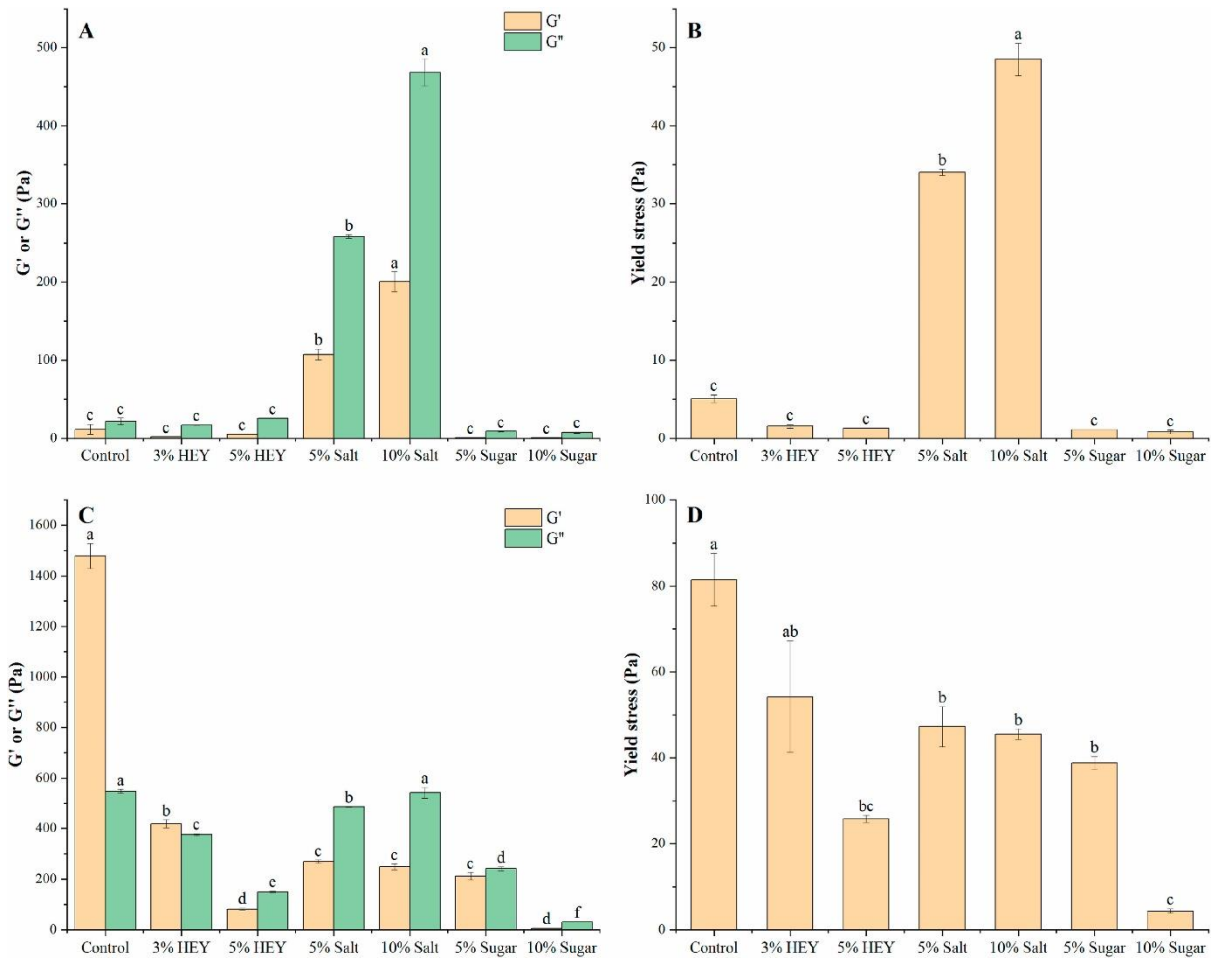


Fig. 1 Viscoelasticity of frozen-thawed egg yolk samples. A: average elastic modulus (G') and loss modulus (G'') of fresh yolk samples; B: static yield stress of fresh yolk samples; C: G' and G'' of yolk samples after 24 h frozen; D: static yield stress of samples after 24 h frozen storage. Values with different letters within the same measurements are significantly different ($p < 0.05$)

(Fei *et al.*, 2021)

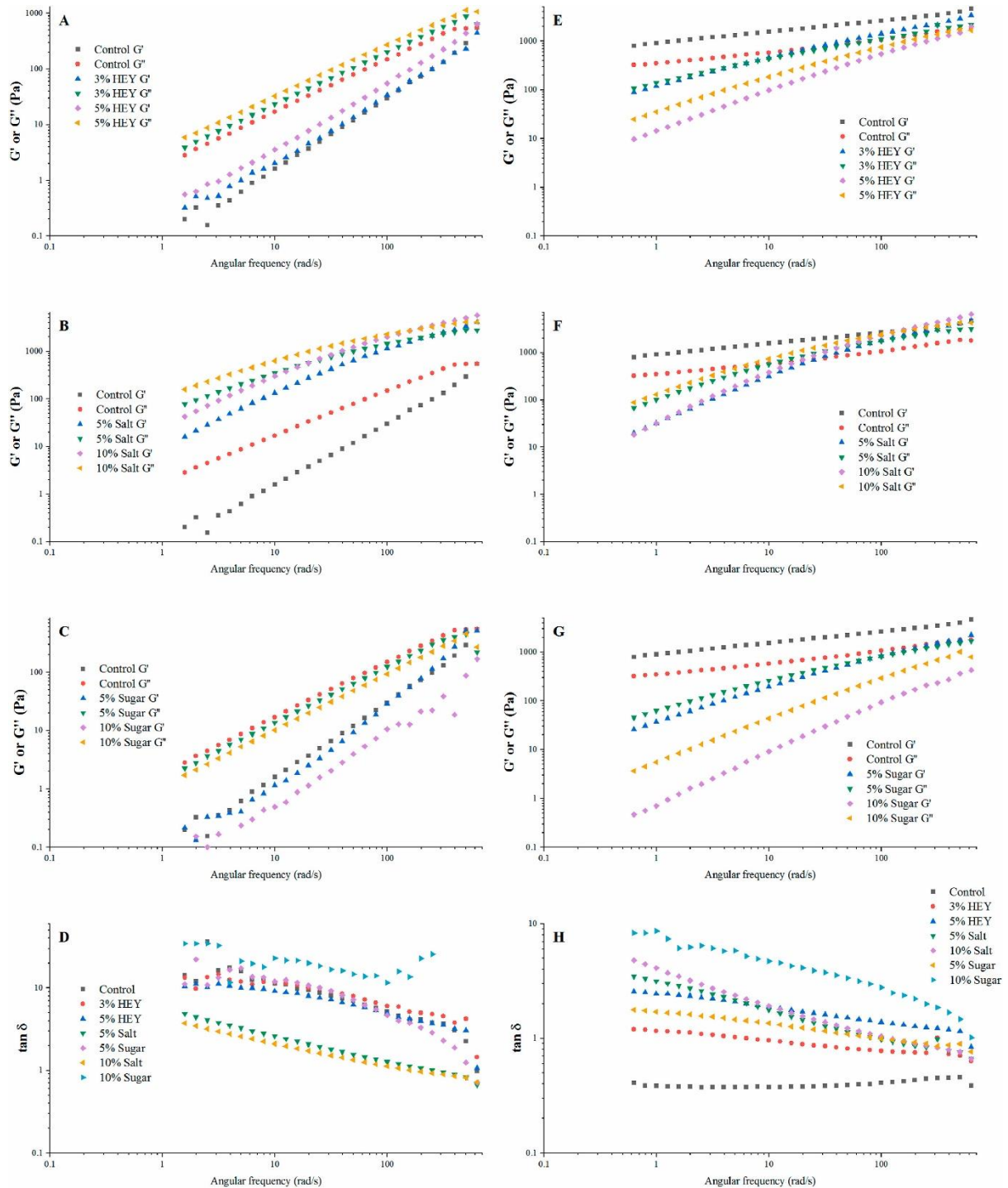


Fig. 2 Dynamic mechanical spectra of fresh egg yolk samples of A: HEY G' and G'' ; B: Salt G' and G'' ; C: Sugar G' and G'' ; D: $\tan \delta$ vs. frequency, and egg yolk samples after 24 h frozen storage of E: HEY G' and G'' ; F: Salt G' and G'' ; G: Sugar G' and G'' ; H: $\tan \delta$ vs. frequency.

(Fei *et al.*, 2021)

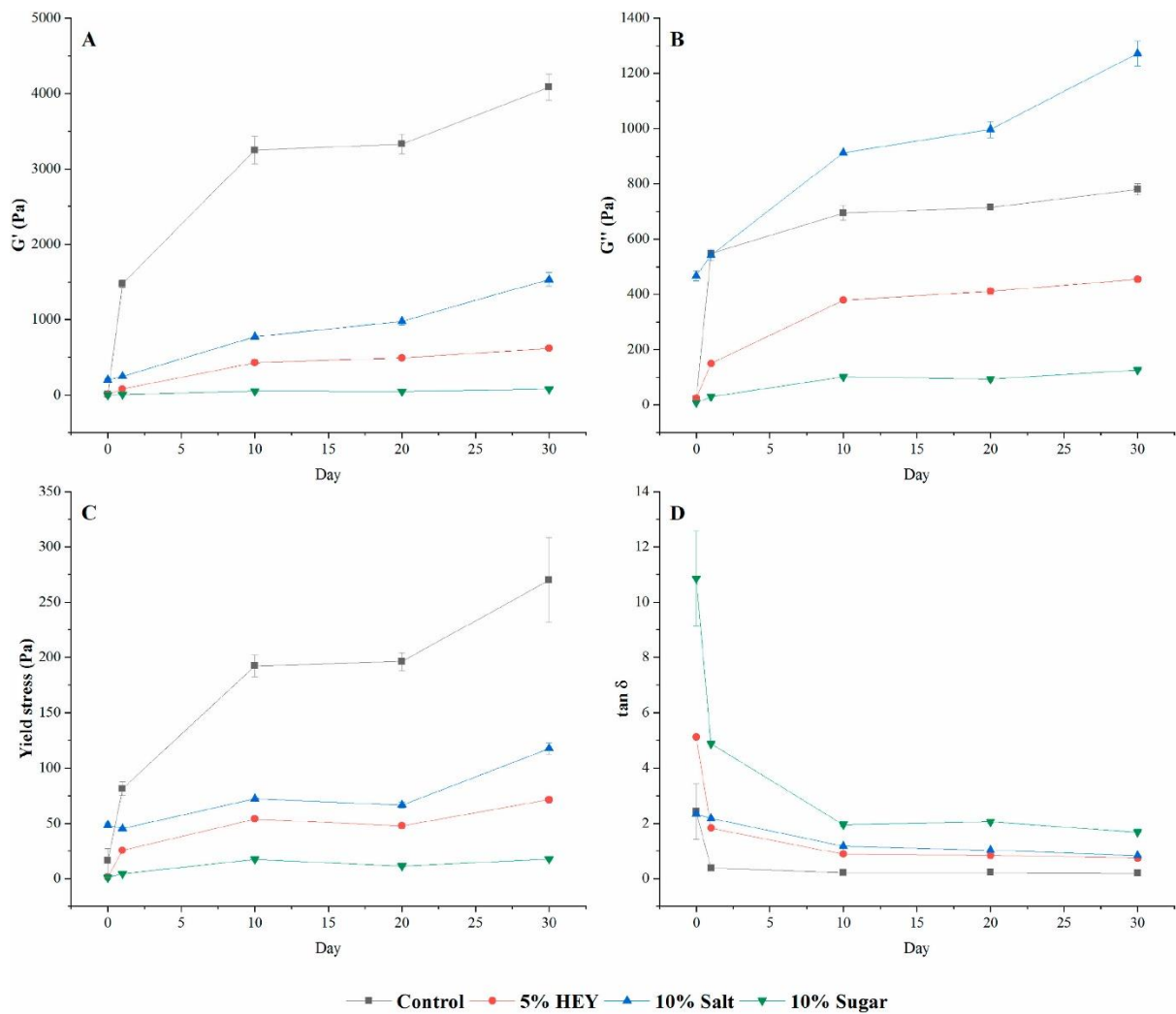


Fig. 3 Viscoelasticity of frozen-thawed egg yolk upon frozen storage. A: average storage modulus (G'); B: average loss modulus (G'') within the linear viscoelastic region (LVR); C: static yield stress; D: $\tan \delta$.

(Fei *et al.*, 2021)

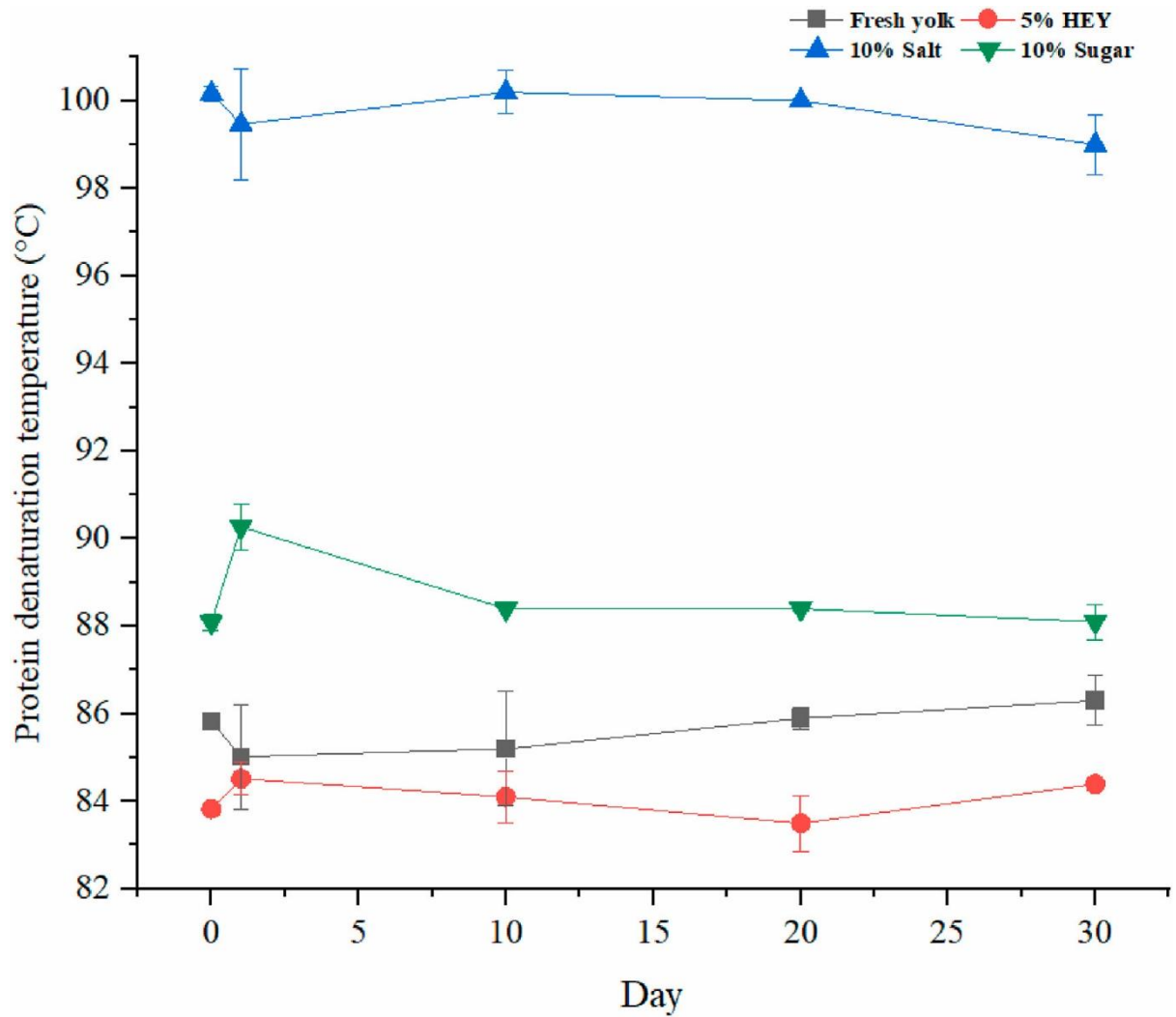


Fig. 4 Changes in the protein denaturation peak temperature (°C) for egg yolk in the presence of salt, sugar and HEY throughout 30 d storage time.

(Fei *et al.*, 2021)

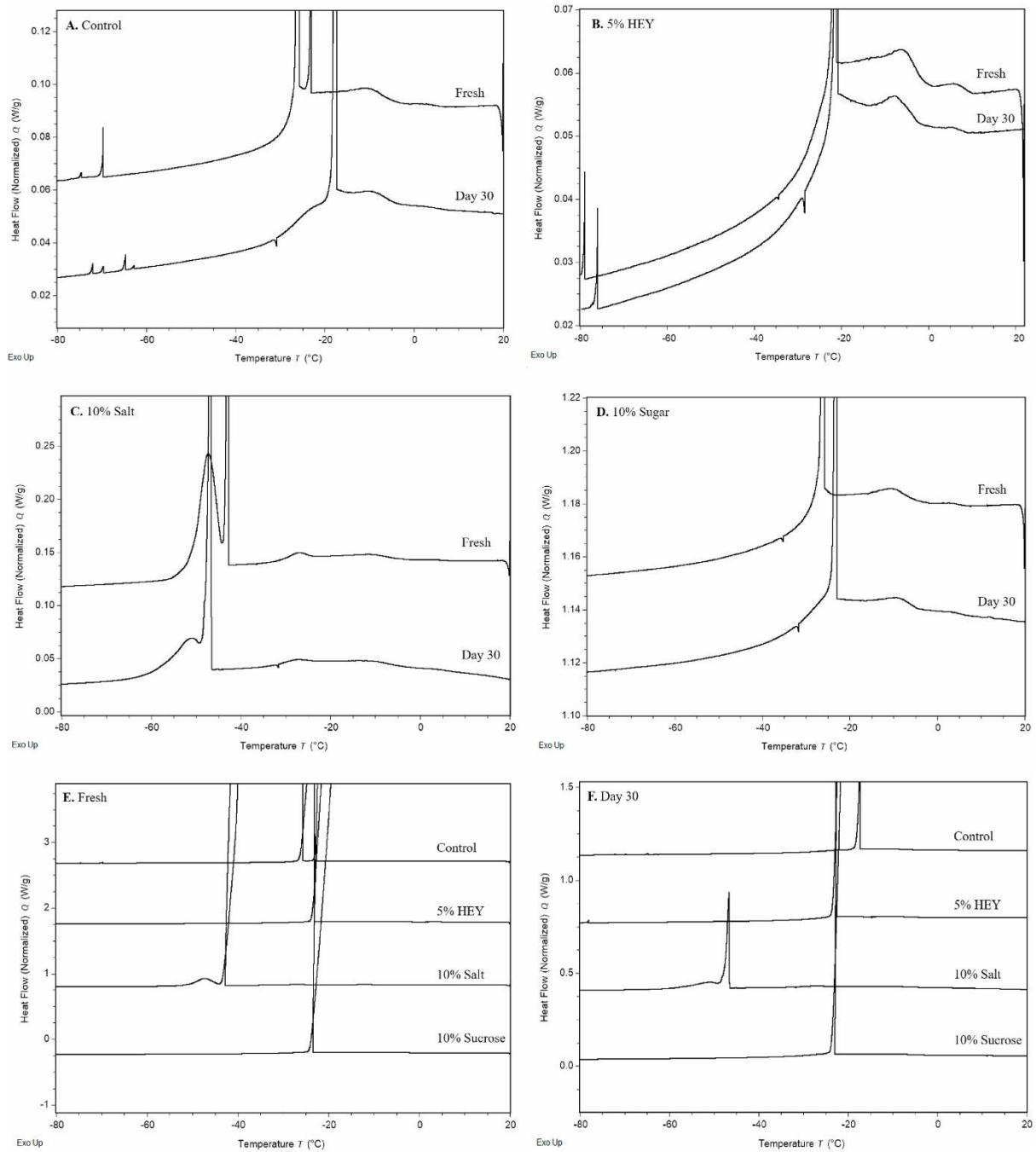


Fig. 5 Differential scanning calorimetry thermograms of freshly-made and 30 d storage frozen-thawed yolk in the presence of different additives (A–D). Comparison of water crystallization events for all treatments after being freshly made (E) and 30 d storage frozen-thawed (F).

(Fei *et al.*, 2021)

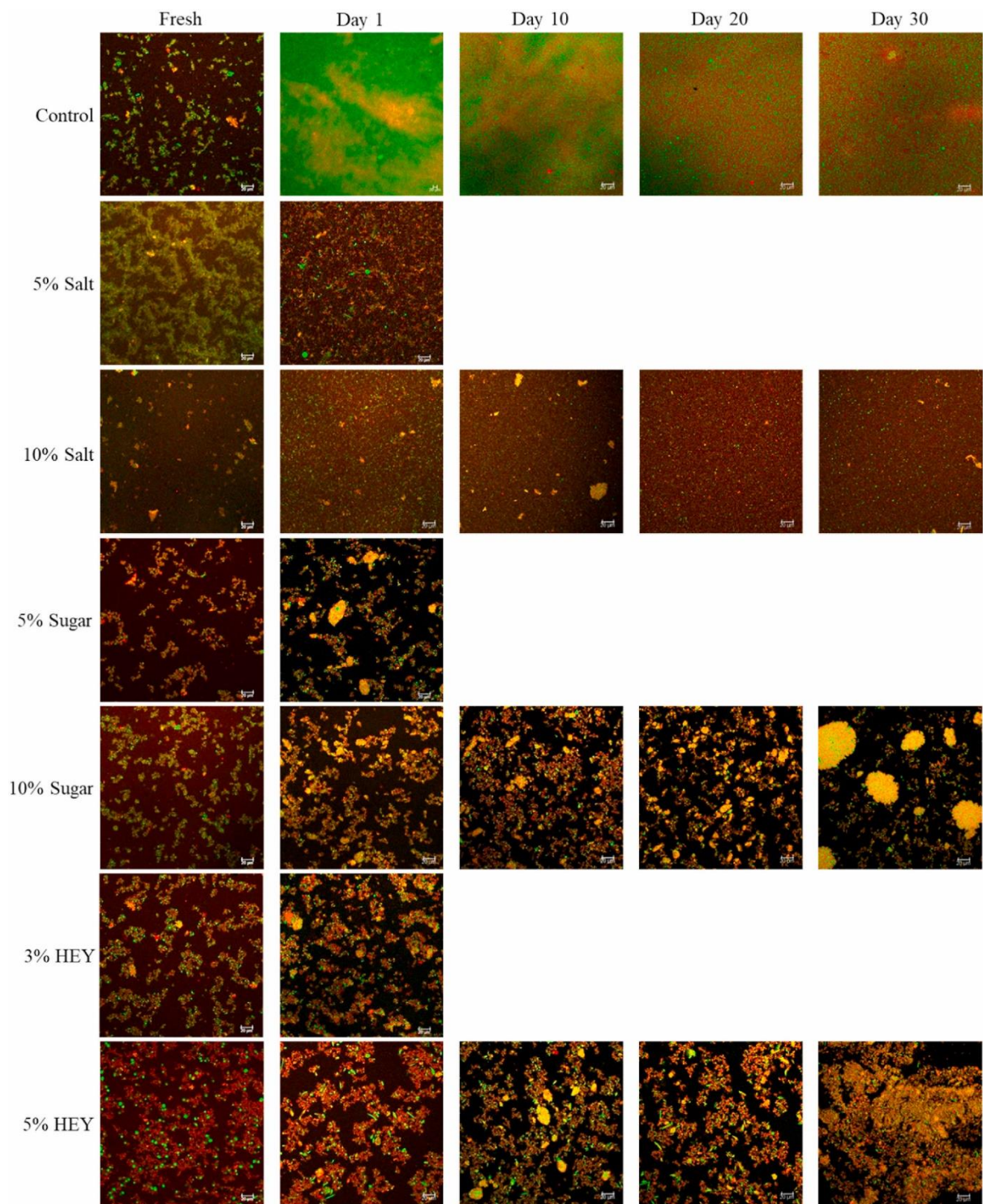


Fig. 6 Confocal microscopy images of yolk microstructure with and without additives stained with Nile Red (lipid) and Fast Green FCF (proteins) after freezing at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ throughout 30 d storage. Scale bar represents $20\text{ }\mu\text{m}$.

(Fei *et al.*, 2021)

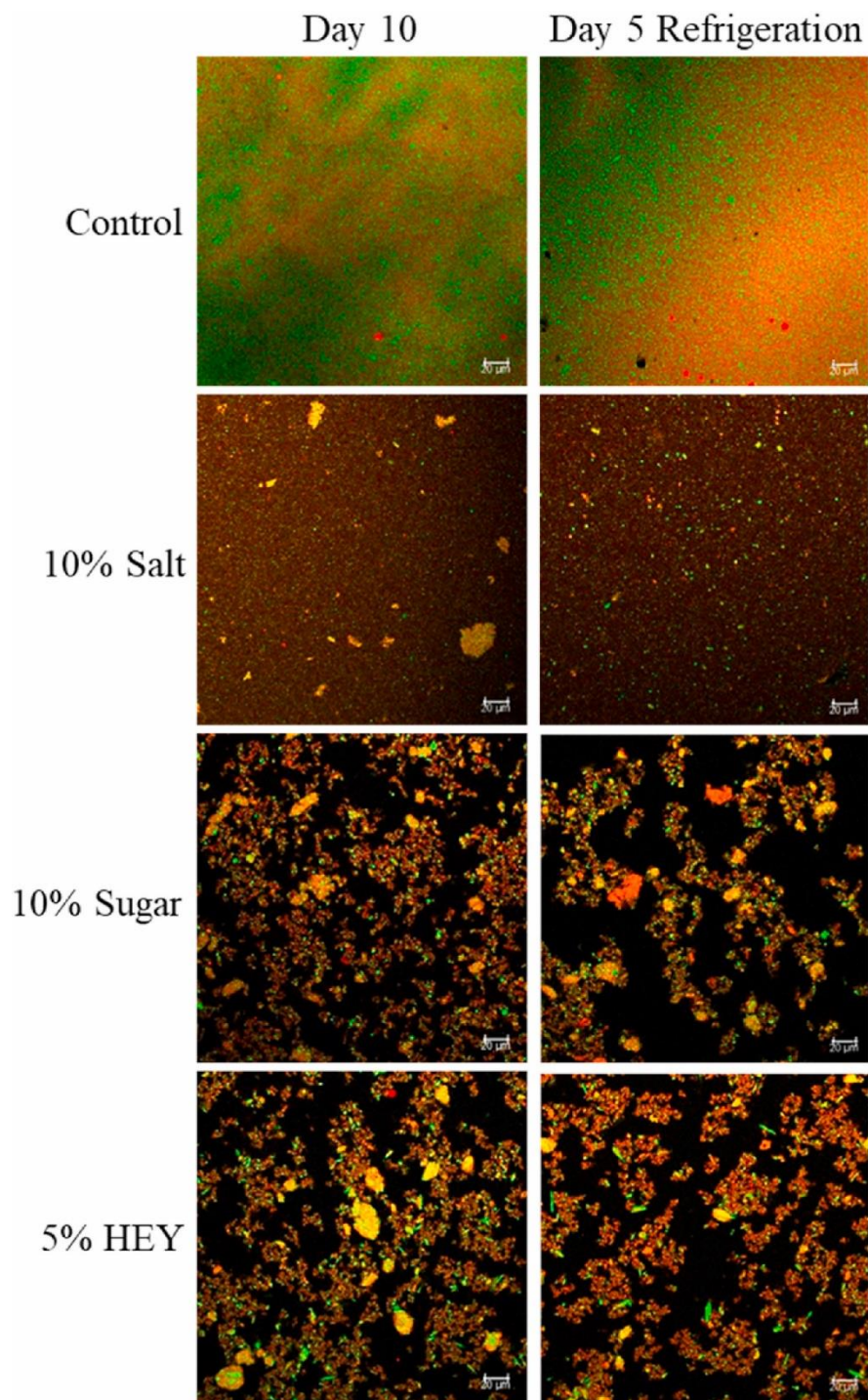


Fig. 7 Confocal microscopy images of yolk microstructure with and without additives stained with Nile Red (lipid) and Fast Green FCF (proteins) after 10 d freezing followed by 5 d refrigeration. Scale bar represents 20 μm .

(Fei *et al.*, 2021)

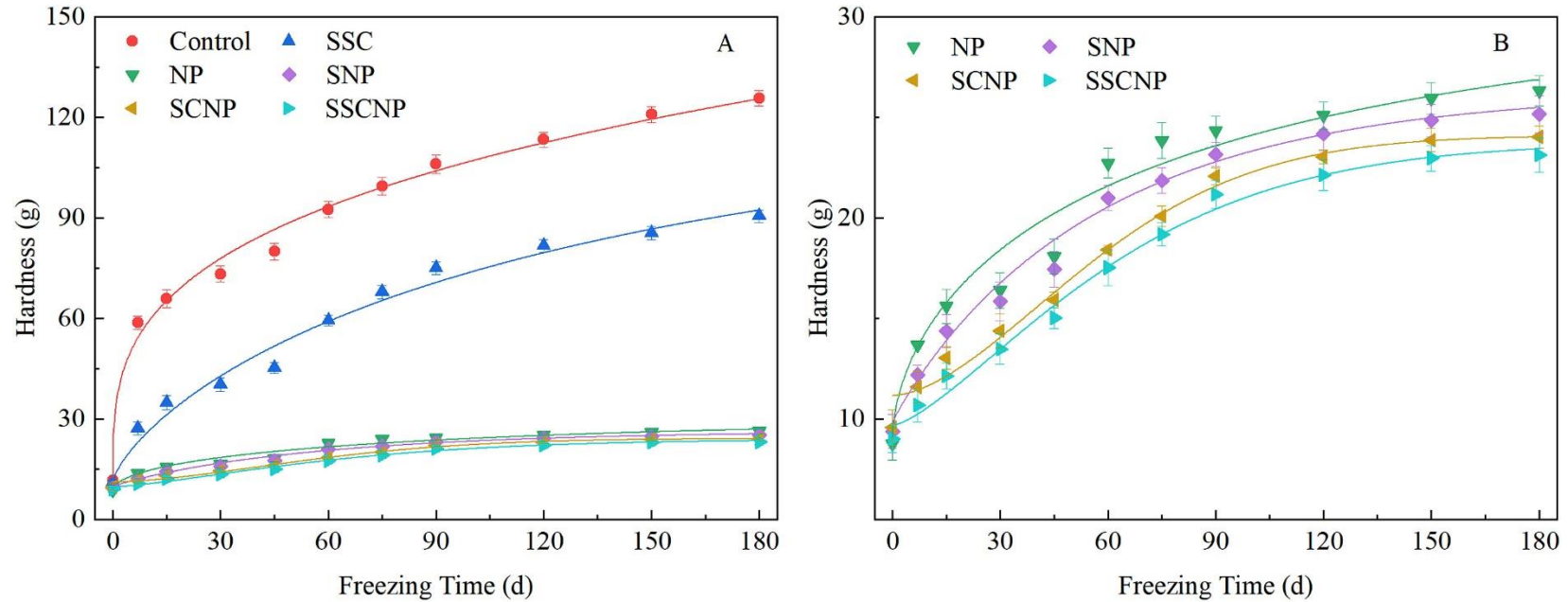


Fig. 8 (A): Dynamic hardness changes of the control, SSC, NP, SNP, SCNP and SSCNP samples; (B): Magnified version of dynamic hardness changes of the NP, SNP, SCNP and SSCNP samples. Solid line shows Weibull model. Note: adding sucrose and NaCl (SSC); adding neutral protease (NP); adding sucrose after treatment with neutral protease (SNP); adding NaCl after treatment with neutral protease (SCNP); and adding sucrose and NaCl after treatment with neutral protease (SSCNP).

(Ma *et al.*, 2021)

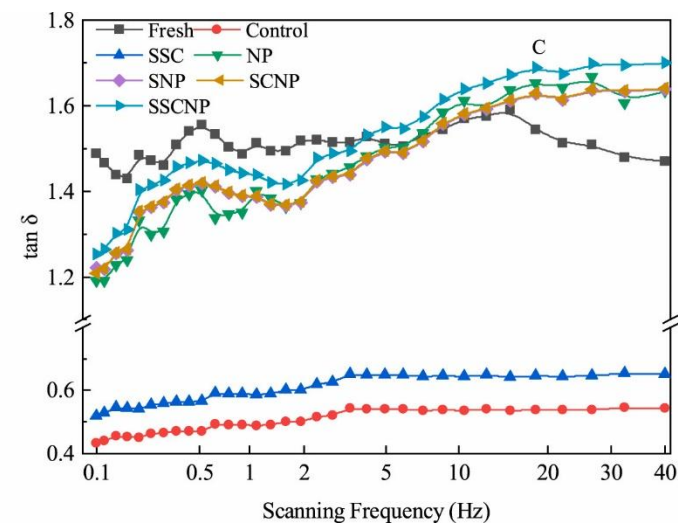
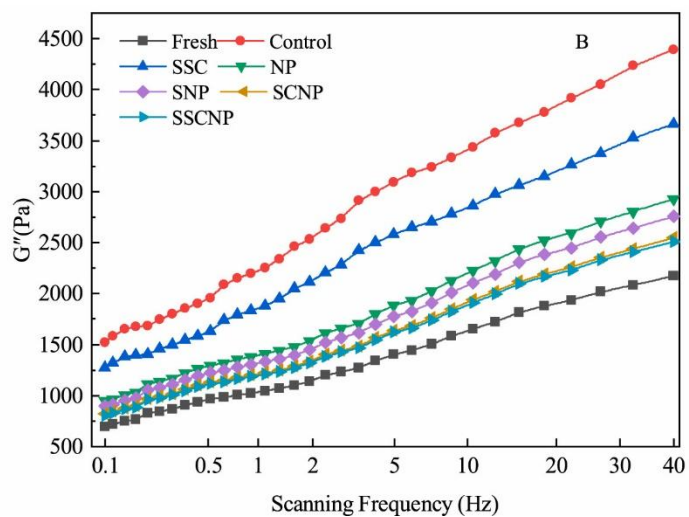
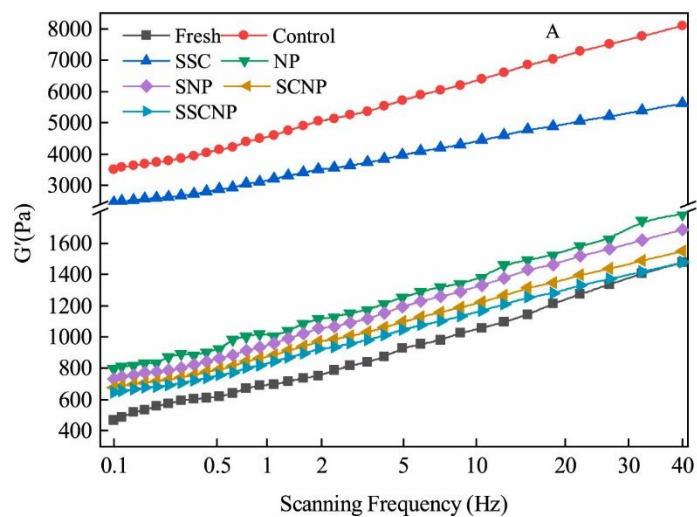


Fig. 9 (A)The elastic modulus (G'); (B)viscous modulus (G'') and (C) $\tan \delta$ values of the fresh yolk (Image 7), control, SSC, NP, SNP, SCNP and SSCNP samples. Refer to Fig. 1 footnote for treatment abbreviations.

(Ma *et al.*, 2021)

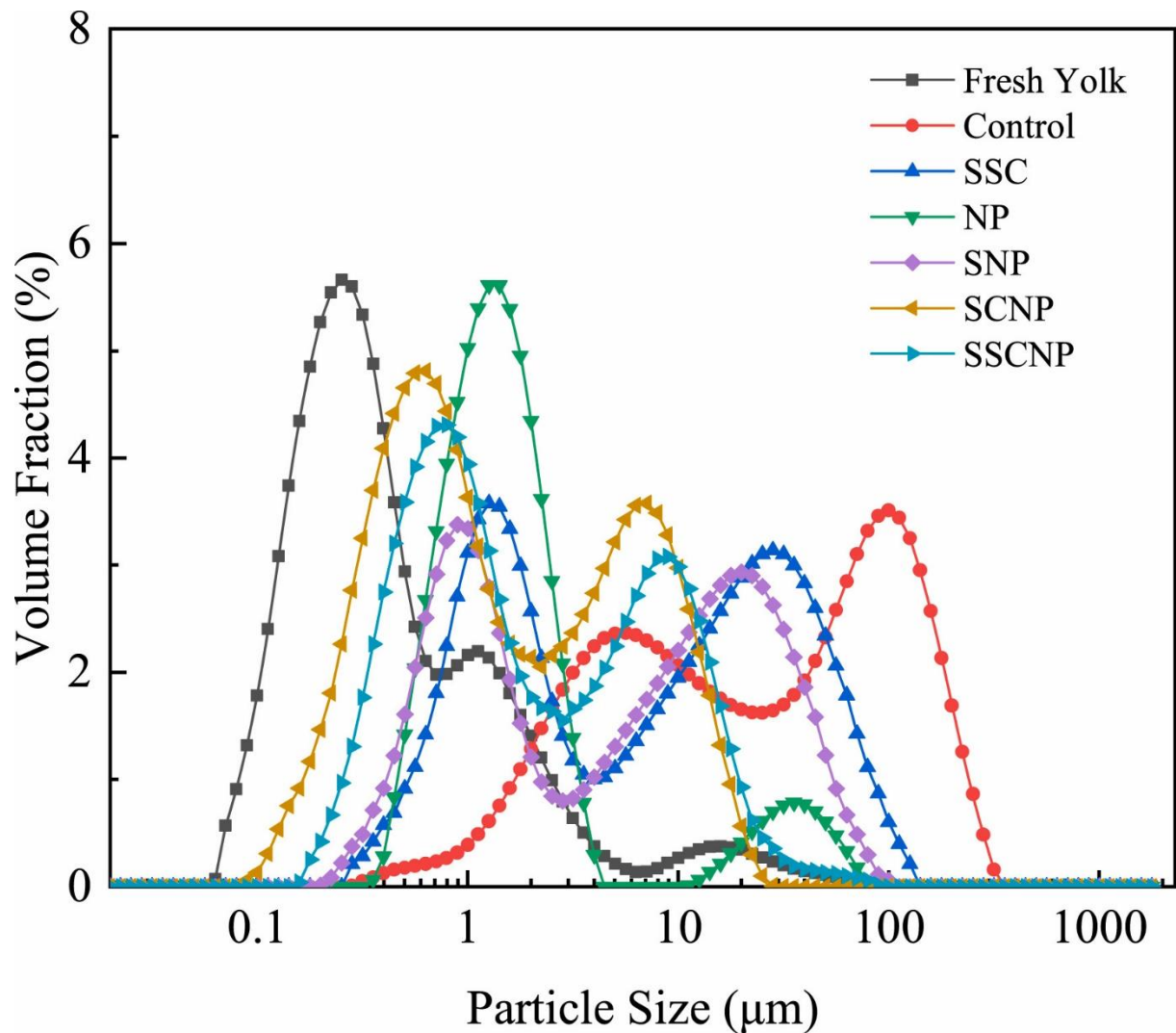


Fig. 10 Particle size distribution of the fresh yolk, control, SSC, NP, SNP , SCNP and SSCNP samples. Refer to Fig. 1 footnote for treatment abbreviations.

(Ma *et al.*, 2021)

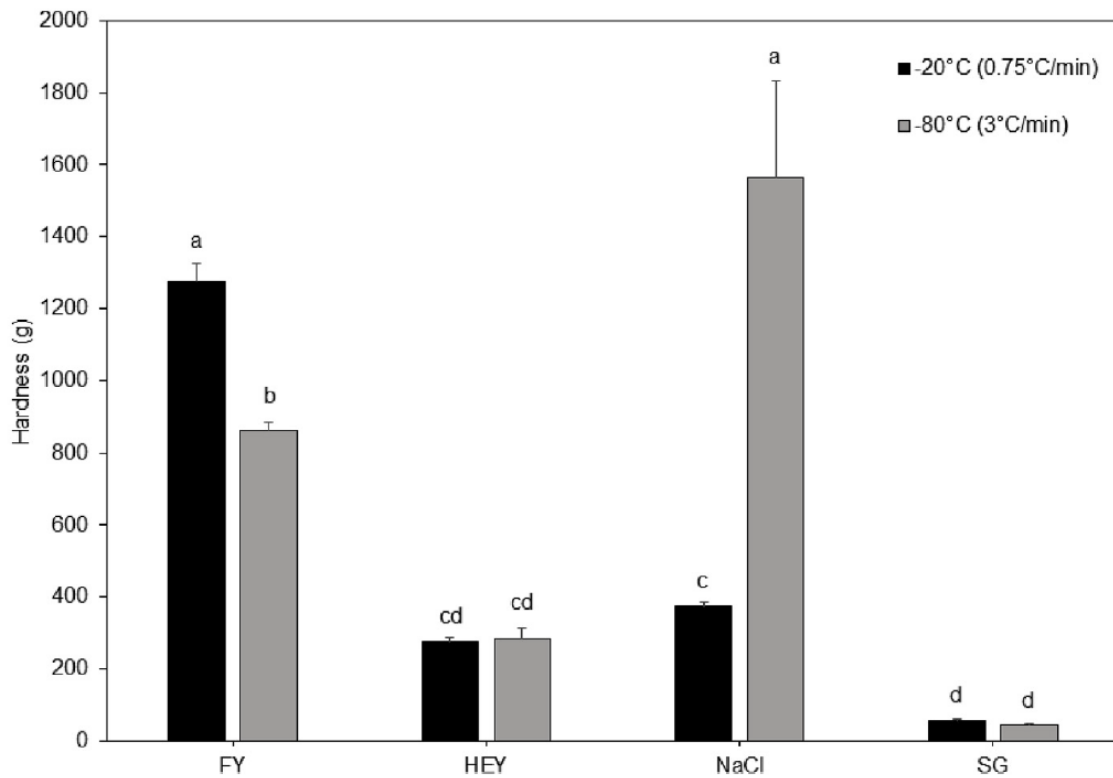


Fig. 11 Effect of freezing temperature (cooling rate) on the hardness of frozen-thawed yolk products after 72 h of freezing. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

(Primacella *et al.*, 2020)

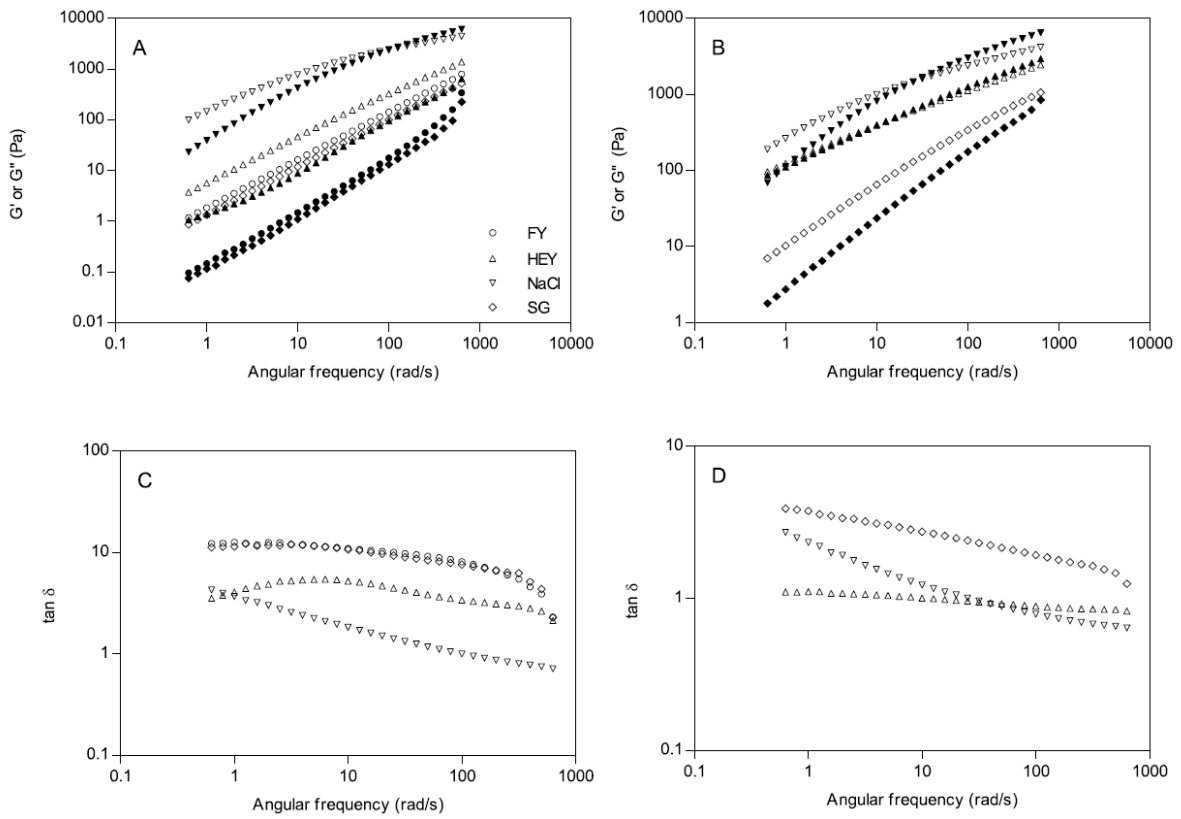


Fig. 12 Frequency dependence of fresh (A and C) and frozen-thawed (B and D) yolk products frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 72 h. G' (closed symbols) and G'' (open symbols). Refer to Table 1 footnote for treatment abbreviations.

(Primacella *et al.*, 2020)

Table 1 Average elastic modulus (G') and loss modulus (G'') within the linear viscoelastic region (LVR), static yield stress and $\tan \delta$ of yolk samples with 10 d or 30 d freezing storage at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ followed by 5 d refrigeration storage at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

	Day-F	G'	G''	Yield stress	$\tan \delta$	G'	G''	Yield stress	$\tan \delta$
Samples after 10 d frozen storage at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$					Samples after 30 d frozen storage at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$				
Control	0	3250.12	694.63	192.25	0.21	4083.36	780.07	270.02	0.19
	5	3164.75	700.93	185.88	0.22	3276.09	701.78	191.84	0.21
5% HEY	0	428.11 ^a	378.74 ^a	54.06 ^a	0.88 ^b	616.73 ^a	456.00 ^a	71.57 ^a	0.74 ^b
	5	341.89 ^b	346.36 ^b	45.93 ^b	1.01 ^a	424.49 ^b	378.39 ^b	52.90 ^b	0.89 ^a
10% Salt	0	770.53	912.61	72.32	1.18	1532.50	1272.03	117.71	0.83 ^b
	5	767.47	940.19	72.17	1.23	1312.20	1197.75	104.93	0.91 ^a
10% Sugar	0	52.09 ^a	101.86 ^a	17.28 ^a	1.96 ^b	74.95 ^a	126.34 ^a	17.56 ^a	1.69 ^b
	5	23.54 ^b	61.76 ^b	10.07 ^b	2.63 ^a	29.53 ^b	71.54 ^b	10.58 ^b	2.44 ^a

*Within the same sample and same frozen storage duration, values with different letters are significantly different with and without 5 d refrigeration storage ($p < 0.05$). Day-F: d of refrigeration storage.

(Fei *et al.*, 2021)

Table 2 Changes in amount of free water (% relative to total water) in egg yolk with the presence of anti-gelation additives.

Entry	Control	3% HEY	5% HEY	5% Salt	10% Salt	5% Sugar	10% Sugar
Fresh	70.3 ^a	64.9	62.4	45.8	29.5	61.1 ^a	52.6
Frozen-thawed 24 h	67.1 ^a	65.1	60.3	42.4	27.2	54.2	42.8
Frozen-thawed 10 d	55.7	n.d.	57.0	n.d.	29.4	n.d.	55.4
Frozen-thawed 15 d ^a	61.5	n.d.	50.8 ^a	n.d.	30.8	n.d.	54.0
Frozen-thawed 20 d	63.7	n.d.	57.2	n.d.	31.3	n.d.	53.0
Frozen-thawed 30 d	65.3	n.d.	59.6	n.d.	18.4 ^a	n.d.	48.9

Values with different letters within the same measurements are significantly different ($p < 0.05$).

n.d.: not determined.

^a Sample consists of freeze-thawed treatment at 10 d followed by 5 d of refrigeration at 2 °C.

(Fei *et al.*, 2021)

Table 3 Thermodynamic analysis of the fresh yolk, control, SSC, NP, SNP, SCNP and SSCNP samples.

Group	$T_m/^\circ\text{C}$	$\Delta H_1/(\text{J/g})$	$T_p/^\circ\text{C}$	$\Delta H_2/(\text{J/g})$
Fresh Yolk	-1.81 ± 0.11^a	0.957 ± 0.08^a	70.14 ± 0.69^d	2.89 ± 0.16^a
Control	-4.26 ± 0.26^d	0.401 ± 0.03^b	73.98 ± 0.78^{bc}	1.75 ± 0.11^e
SSC	-4.01 ± 0.09^d	0.457 ± 0.08^b	73.27 ± 0.43^c	1.89 ± 0.06^{de}
NP	-3.66 ± 0.11^c	0.554 ± 0.13^b	72.56 ± 0.63^{bc}	2.02 ± 0.09^{cd}
SNP	-3.03 ± 0.17^b	0.581 ± 0.17^b	72.64 ± 0.56^{bc}	2.32 ± 0.18^b
SCNP	-3.57 ± 0.24^c	0.623 ± 0.24^b	71.85 ± 0.94^b	2.16 ± 0.15^{bc}
SSCNP	-3.49 ± 0.15^c	0.609 ± 0.18^b	72.03 ± 0.86^{bc}	2.07 ± 0.14^{cd}

Note: T_m initial melting temperature; ΔH_1 melting enthalpy; T_p peak denaturation temperature; ΔH_2 denaturation enthalpy value. There was significant difference in lowercase letters in the same column (Mean \pm SD, $P < 0.05$). Refer to [Fig. 1](#) footnote for treatment abbreviations.

(Ma *et al.*, 2021)

Table 4 Rheological properties of fresh and frozen-thawed yolk products.

	G' (Pa)		
	Fresh	Frozen at -20°C	Frozen at -80°C
FY	$0.80^{\text{B}} \pm 0.37$	N/A	N/A
HEY	$3.52^{\text{Ba}} \pm 0.13$	$321.85^{\text{ABa}} \pm 89.44$	$124.07^{\text{Bab}} \pm 32.29$
NaCl	$289.12^{\text{Ab}} \pm 94.95$	$465.06^{\text{Ab}} \pm 84.03$	$2750.74^{\text{Aa}} \pm 386.60$
SG	$0.69^{\text{Bb}} \pm 0.15$	$3.49^{\text{Ba}} \pm 0.37$	$1.03^{\text{Bb}} \pm 0.25$
G'' (Pa)			
FY	$10.43^{\text{B}} \pm 0.30$	N/A	N/A
HEY	$28.64^{\text{Bc}} \pm 0.73$	$325.55^{\text{Ba}} \pm 27.07$	$184.79^{\text{Bb}} \pm 28.92$
NaCl	$588.31^{\text{Aa}} \pm 153.05$	$731.92^{\text{Aa}} \pm 3.19$	$1073.30^{\text{Aa}} \pm 204.67$
SG	$8.11^{\text{Bb}} \pm 0.01$	$20.59^{\text{Ca}} \pm 2.46$	$11.43^{\text{Bb}} \pm 2.34$
tan δ			
FY	$14.57^{\text{A}} \pm 6.41$	N/A	N/A
HEY	$8.17^{\text{Aa}} \pm 0.52$	$1.07^{\text{Bb}} \pm 0.21$	$1.51^{\text{Bb}} \pm 0.16$
NaCl	$2.06^{\text{Aa}} \pm 0.15$	$1.60^{\text{Ba}} \pm 0.28$	$0.39^{\text{Bb}} \pm 0.02$
SG	$12.03^{\text{Aa}} \pm 2.49$	$5.90^{\text{Ab}} \pm 0.08$	$11.17^{\text{Aab}} \pm 0.46$
Yield Stress (Pa)			
FY	$0.50^{\text{B}} \pm 0.14$	N/A	N/A
HEY	$3.41^{\text{Bb}} \pm 0.74$	$38.36^{\text{Ba}} \pm 2.57$	$22.82^{\text{Bab}} \pm 10.39$
NaCl	$50.26^{\text{Ab}} \pm 13.54$	$54.42^{\text{Ab}} \pm 3.81$	$175.03^{\text{Aa}} \pm 26.40$
SG	$0.45^{\text{Bb}} \pm 0.07$	$2.95^{\text{Ca}} \pm 0.28$	$1.29^{\text{Bb}} \pm 0.25$

^{A-C} Within the same columns, values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

^{a-b} Within same rows, values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

FY: fresh yolk only; HEY: yolk +5% HEY; NaCl: yolk +10% salt; SG: yolk +10% sucrose Mean value \pm average difference from the mean ($n = 2$).

(Primacella *et al.*, 2020)

Table 5 Heat denaturation temperature of fresh and frozen yolk products measured using rheometer and DSC.

	Rheometer		DSC	
	Fresh	Frozen	Fresh	Frozen
FY	65.2 ± 1.0	NA	76.8 ^{bc} ± 0.1	76.9 ^c ± 0.1
HEY	64.9 ± 0.8	62.3 ± 0.8	72.8 ^c ± 0.3	70.5 ^d ± 0.7
NaCl	69.7 ± 0.5	69.4 ± 5.1	91.5 ^a ± 0.2	90.9 ^a ± 0.2
SG	61.8 ± 0.9	68.7 ± 1.2	77.9 ^b ± 1.4	79.4 ^b ± 0.8

Within the same columns, values with different letters are significantly different ($P < 0.05$). Mean value ± average difference from the mean ($n = 2$). Refer to [Table 1](#) footnote for treatment abbreviations.

(Primacella *et al.*, 2020)