

蛋白质谷氨酰胺酶和复配蛋白酶对豌豆蛋白酶解的改性及其功能特性优化

喻晨¹, 詹飞¹, 苏爱华², 崔春^{2*}
(1. 安琪酶制剂(宜昌)有限公司, 湖北宜昌 443000) (2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510460)

摘要:以溶解度和脱酰胺度为评价指标, 优化了蛋白质谷氨酰胺酶 (Prokey® G-01, 简称 Prokey 酶) 和复配酶制剂蛋白酶 (Flavkey® T-02, 简称 Flavkey 酶) 对豌豆蛋白酶解改性效果的影响, 并对最改性豌豆蛋白酶解产物的功能特性进行了分析。研究发现, 豌豆蛋白的最佳酶解工艺条件为: pH 值 7.0 (Prokey 酶) /pH 值 10.0 (Flavkey 酶), 酶添加量 0.6% (m/m), 酶解温度 55 ℃, 酶解时间 8 h。在此条件下, 两种酶酶解得到的豌豆蛋白的溶解度从 6.00% 提高到 40.00% 以上, 悬浮稳定性从 58.90% 升高至 90.00% 以上, 起泡性和乳化性分别提高了 122.58% 和 46.11%。Prokey 酶改性豌豆蛋白的脱酰胺度和乳化性较 Flavkey 酶改性样品分别高 2.39 倍和 1.09 倍, 但起泡性、悬浮稳定性较 Flavkey 酶改性样品显著性降低 ($P<0.05$)。改性后的豌豆蛋白溶液口感细腻顺滑、香气突出、豆腥味减弱。结果表明, 两种酶均能显著改善豌豆蛋白溶液的口感、悬浮稳定性、起泡性和乳化性, 拓宽了豌豆蛋白在食品领域的应用范围。

关键词: 豌豆蛋白; 酶法; 脱酰胺改性; 功能特性

文章编号: 1673-9078(2025)04-46-53 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.4.1197

Enzymatic Modification of Pea Proteins by Protein Glutaminase Combined with Protease and Optimization of Their Functional Properties

YU Chen¹, ZHAN Fei¹, SU Aihua², CUI Chun^{2*}
(1. Angel Enzyme Preparation (Yichang) Co. Ltd., Yichang 443000, China)
(2. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510460, China)

Abstract: The effects of optimized the hydrolysis modification of protein glutaminase (Prokey® G-01, hereinafter referred to as Prokey enzyme) combined with enzyme preparation protease (Flavkey® T-02, hereinafter referred to as Flavkey enzyme) on pea proteins were investigated, with solubility and deamidation degree as evaluation indicators. The functional properties of the most modified pea protein hydrolysate products were also analyzed. The results indicated the optimal enzymatic hydrolysis conditions for pea protein are pH 7.0 (Prokey enzyme)/pH 10.0 (Flavkey enzyme), enzyme addition amount of 0.6%, hydrolysis temperature of 55 ℃, and hydrolysis time of 8 h. Under these conditions, the solubility of pea protein hydrolyzed by the two enzymes increased from 6.00% to more than 40.00%. The suspension stability increased

引文格式:
喻晨,詹飞,苏爱华,等.蛋白质谷氨酰胺酶和复配蛋白酶对豌豆蛋白酶解的改性及其功能特性优化[J].现代食品科技,2025,41(4):46-53.

YU Chen, ZHAN Fei, SU Aihua, et al. Enzymatic modification of pea proteins by protein glutaminase combined with protease and optimization of their functional properties [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(4): 46-53.

收稿日期: 2024-08-15
基金项目: 广东省普通高校特色创新类项目 (2021KTSCX003); 山东省科技型中小企业创新能力提升工程项目 (2022TSGC2558)
作者简介: 喻晨 (1985-), 男, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: yuchen@angelyeast.com
通讯作者: 崔春 (1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: cuichun@scut.edu.cn

from 58.90% to over 90.00%, and the foaming property and emulsibility improved by 122.58% and 46.11%, respectively. The deamidation degree and emulsibility of the Prokey enzyme-modified pea protein were 2.39 and 1.09 times higher than that of the Flavkey enzyme-modified sample. However, the foaming property and suspension stability of the Prokey enzyme-modified pea protein were significantly reduced compared to the Flavkey enzyme-modified sample ($P<0.05$). The modified pea protein solution was delicate and smooth, with a prominent aroma and reduced bean odor. These results showed that both enzymes significantly improved the texture, suspension stability, foaming, and emulsibility of pea protein solutions, which broadened the application of pea protein in the food field.

Key words: pea protein; enzymatic method; deamidation; functional characteristics

豌豆 (*Pisum sativum*) 是一种豆科植物, 是世界上最古老的食用蔬菜之一, 其产量在豆类农作物中排名第四^[1,2]。它富含蛋白质、碳水化合物和膳食纤维, 同时含有丰富的矿物质元素和维生素^[3,4]。豌豆蛋白 (Pea Protein Isolation, PPI) 是提取豌豆淀粉后产生的副产物, 蛋白质含量高达 70% 以上。豌豆蛋白的氨基酸组成也接近 FAO/WHO 推荐的标准要求, 具有低致敏性、低毒性、蛋白生物价高等特点, 是目前食品行业的研究热点^[5,6]。但豌豆蛋白水溶性、起泡性和乳化性等功能特性较差, 在食品中应用受到很大限制, 因此, 对豌豆蛋白进行改性拓展其应用范围尤为重要^[2]。

目前, 蛋白质改性主要有三种方法: 物理改性 (热处理和超声处理^[7])、化学改性 (糖基化^[8]、磷酸化^[7]和原纤维化^[9]) 和生物改性 (酶水解和交联^[10])。与物理改性和化学改性相比, 蛋白质酶法改性具有反应条件温和、无有毒有害副产物、酶解产物功能特性高等特点, 广泛应用于植物蛋白改性上^[2]。Yi^[11]通过绿原酸催化漆酶交联对豌豆蛋白进行改性, 发现豌豆蛋白的乳化活性、乳化能力、凝胶强度和持水能力在漆酶催化下与绿原酸交联后可显著增强, 这表明豌豆蛋白在漆酶与绿原酸修饰后具有极佳的功能性。Tahir 等^[12]采用物理、化学和酶法改性结合的方法对豌豆进行改性, 将 PPI 溶液 pH 值调至 10.0, 进行超声波处理、风味蛋白酶水解, 三种方法协同作用, 更有效地改变蛋白质结构, 显著提高溶解度、乳化性、起泡性和凝胶强度。

酶法脱酰胺改性是蛋白质酶法改性的一种, 是利用蛋白质谷氨酰胺酶、谷氨酰胺酶或蛋白酶对蛋白质侧链基团上的谷氨酰胺或天冬酰胺残基进行脱酰胺反应, 具有较高的专一性, 能够避免对蛋白质的过度水解。蛋白质谷氨酰胺酶是 2000 年日本学者 Yamaguchi 等^[13]从解脲金黄杆菌 (*Chryseobacterium proteolyticum*) 9670T 中首次发现, 2020 年被允许

其作为食品工业用酶制剂使用。酶法脱酰胺能够显著改善蛋白质的溶解度、乳化性、起泡性等功能特性。有鉴于此, 本文比较了蛋白质谷氨酰胺酶和复配酶制剂蛋白酶对豌豆蛋白脱酰胺改性工艺, 并在最佳工艺条件下评价了两种酶制剂对豌豆蛋白功能特性的影响, 为豌豆蛋白的开发应用提供理论指导和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

豌豆蛋白 (蛋白含量 72.62%), 罗盖特 (中国) 营养食品有限公司; 蛋白质谷氨酰胺酶 (200 U/g) Prokey® G-01、复配酶制剂蛋白酶 (100 U/g) Flavkey® T-02, 安琪酶制剂 (宜昌) 有限公司; A045-4 型 BCA 蛋白定量测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 大豆油 (食品级), 市购; 其他试剂 (均为分析纯), 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

PHS-3E 型 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; ZWYR-2102C 型智能恒温空气摇床, 上海智诚分析仪器制造有限公司; SuPerMax-3100 型多功能酶标仪, 上海闪谱生物科技有限公司; SCIENTZ-18N 型冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; HYP-308 型消化炉、KDN-103F 型凯氏定氮仪, 上海纤检仪器有限公司; GL-21M 型高速冷冻离心机, 长沙湘智离心机仪器有限公司; FJ200-SH 型高速分散均质机, 广州市芊荃化玻仪器有限公司; GI54DP 立式自动压力蒸汽灭菌锅, 致微仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 豌豆蛋白酶解工艺

配制 5% (m/V) 的豌豆蛋白溶液, 调节 pH 值,

加入豌豆蛋白质量 0.6% (m/m) 的酶制剂, 置于 55 °C 空气摇床酶解 4 h, 沸水浴灭酶 10 min, 冷却至室温后再调节酶解液 pH 值为 7.0, 得到豌豆蛋白酶解液。

1.3.2 pH值对豌豆蛋白酶解的影响

配制 5% (m/V) 的豌豆蛋白溶液, 调节 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 加入豌豆蛋白质量 0.6% (m/m) 的酶制剂, 置于 55 °C 的空气摇床酶解 4 h, 沸水灭酶 10 min, pH 值调回 7.0 后得到豌豆蛋白酶解液, 测定不同 pH 值对豌豆蛋白溶解度和脱酰胺度的影响。

1.3.3 酶添加量对豌豆蛋白酶解的影响

配制 5% (m/V) 的豌豆蛋白溶液, 调节 pH 值为 7.0 (Prokey 酶) /10.0 (Flavkey 酶), 加入豌豆蛋白质量 0.3%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5% (m/m) 的酶制剂, 置于 55 °C 的空气摇床酶解 4 h, 沸水灭酶 10 min, pH 值调回 7.0 后得到豌豆蛋白酶解液, 测定不同酶添加量对豌豆蛋白溶解度和脱酰胺度的影响。

1.3.4 酶解时间对豌豆蛋白酶解的影响

配制 5% (m/V) 的豌豆蛋白溶液, 调节 pH 值为 7.0 (Prokey 酶) /10.0 (Flavkey 酶), 加入豌豆蛋白质量 0.6% (m/m) 的酶制剂, 置于 55 °C 的空气摇床酶解 0、4、8、12、16、20、24 h, 沸水灭酶 10 min, pH 值调回 7.0 后得到豌豆蛋白酶解液, 测定不同酶解时间对豌豆蛋白溶解度和脱酰胺度的影响。

1.3.5 酶解温度对豌豆蛋白酶解的影响

配制 5% (m/V) 的豌豆蛋白溶液, 调节 pH 值为 7.0 (Prokey 酶) /10.0 (Flavkey 酶), 加入豌豆蛋白质量 0.6% (m/m) 的酶制剂, 置于 45、50、55、60、65 °C 的空气摇床酶解 4 h/8 h, 沸水灭酶 10 min, pH 值调回 7.0 后得到豌豆蛋白酶解液, 测定不同酶解温度对豌豆蛋白溶解度和脱酰胺度的影响。

1.3.6 最佳酶解工艺验证

配置 5% (m/V) 的豌豆蛋白溶液, 调节 pH 值为 7.0 (Prokey 酶) /10.0 (Flavkey 酶), 加入豌豆蛋白质量 0.6% (m/m) 的酶制剂, 置于 55 °C 的空气摇床酶解 4 h/8 h, 沸水灭酶 10 min, pH 值调回 7.0 后依次得到豌豆蛋白酶解液 Prokey-4h、Prokey-8h、Flavkey-4h 和 Flavkey-8h, 空白组为 PPI。

1.3.7 溶解度的测定

取 5 g 豌豆蛋白酶解液, 离心 (15 000 r/min, 10 min, 25 °C), 得到上清液的蛋白含量用 BCA 试

剂盒比色法进行测定。样品中的总氮含量采用凯氏定氮法测得。

$$NSI = \frac{P_1}{P_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

NSI——酶解液溶解度, %;

P_1 ——上清液的蛋白含量, g;

P_2 ——样品中的总氮含量, g。

1.3.8 脱酰胺度的测定

采用 Kato 等^[14]和 Liao 等^[15]使用的微量弥散皿法测定豌豆蛋白样品的脱酰胺度并稍作修改。具体操作方法如下:

原料完全脱酰胺产生的氨的测定: 取 0.5 g 豌豆蛋白置于 10 mL 的密封玻璃管中, 加入 5 mL 2 mol/L 的盐酸溶液, 充分搅拌均匀后, 置于蒸汽灭菌锅中, 121 °C 下反应 3 h 以完全脱酰胺。反应结束后取出, 待样品冷却后打开玻璃管, 用 40 g/L 硼酸吸收氨并测定总氮含量。

脱酰胺过程中样品释放产生的氨的测定: 在微量弥散皿的中央腔室中加入 3 mL 40 g/L 的硼酸溶液和 3 滴溴甲酚绿-甲基红混合指示剂, 外腔室中加入 1 mL 蛋白酶解液和 3 mL 饱和硼酸钾溶液, 立即盖上涂抹了适量凡士林的弥散皿皿盖。随后轻轻摇匀混合, 平放桌面静置 12 h 后用 0.01 mol/L 的标准盐酸溶液滴定脱酰胺样品释放的氨气。

$$B = \frac{N_1}{N_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

B ——酶解液脱酰胺度 (DD), %;

N_1 ——酶解液释放的氨量, g;

N_2 ——原料完全脱酰胺产生的氨量, g。

1.3.9 悬浮稳定性的测定

参考陈天祥等^[16]的方法测定豌豆蛋白溶液的悬浮稳定性并稍作修改。取 20 g 质量分数 5% 的豌豆蛋白溶液, 搅拌均匀置于 25 mL 玻璃试管中, 于 4 °C 下静置 24 h, 用标尺记录豌豆蛋白溶液的初始高度 H , 静置 24 h 后, 记录玻璃试管中沉淀部分的高度 H_{24} 。

$$D = \left(1 - \frac{H_{24}}{H}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

D ——悬浮稳定性 (SS), %;

H ——样品溶液的初始高度, mm;

H_{24} ——样品溶液静置 30 min 后沉淀高度, mm。

表 1 感官评定标准

Table 1 Sensory evaluation criteria

项目	评价标准
豆腥味	豆腥味较弱或无豆腥味（7~9 分）；豆腥味中等（4~6 分）；豆腥味明显（0~3 分）
苦味	苦味较弱或无苦味（7~9 分）；苦味中等（4~6 分）；苦味明显（0~3 分）
鲜味	鲜味明显（7~9 分）；鲜味中等（4~6 分）；鲜味较弱或无鲜味（0~3 分）
香气	具有豌豆特有的豆香味，无不良气味。（7~9 分）；豌豆香味较淡，无异味。（4~6 分）；基本无豆香味，且夹杂豆腥味。（0~3 分）
顺滑感	口感细腻顺滑，无卡喉感（7~9 分）；口感较为细腻顺滑，无卡喉感（4~6 分）；口感粗糙且卡喉（0~3 分）

1.3.10 乳化性和乳化稳定性的测定

参考 Chavan 等^[7]的方法测定豌豆蛋白样品的乳化性和乳化稳定性。取 50 g 豌豆蛋白酶解液，离心（15 000 r/min，10 min，25 ℃）得到上清液，并用 BCA 试剂盒测定其蛋白浓度（g/mL）。准确量取 25 mL 上清液于 50 mL 锥形瓶中，加入 8 mL 食品级大豆油，然后用高速分散均质机以 12 000 r/min 的速度均质 1 min 得到乳浊液，立即从底部取 50 μL 乳浊液，用 0.1% SDS 稀释至 5 mL，于 500 nm 处测吸光值 A_0 ；静置 30 min 后再从底部取 50 μL 乳浊液，用 0.1% SDS 稀释至 5 mL，于 500 nm 处测吸光值 A_{30} 。

$$E_1=\frac{2\times2.303\times A_0\times N}{0.25\times c\times 10\,000}$$

(4)

式中：

- E_1 ——乳化性（EAI），m²/g；
- A_0 ——样品在 500 nm 处的吸光值；
- N ——稀释倍数，100；
- 0.25——体系中油相所占体积分数；
- c ——蛋白质的质量浓度，g/mL。

$$E_2=\frac{A_0\times30}{A_0-A_{30}}$$

(5)

式中：

- E_2 ——乳化稳定性（ESI），min；
- A_0 ——样品在 0 min 处的吸光值；
- A_{30} ——样品在 30 min 后的吸光值。

1.3.11 起泡性和泡沫稳定性的测定

参考 Howell 等^[18]的方法测定豌豆蛋白酶解液的起泡性和起泡稳定性。取 25 g 豌豆蛋白酶解液于 50 mL 离心管中，用直尺测量溶液高度为 H ，然后用高速分散均质机以 12 000 r/min 的速度均质 1 min 后用直尺测量泡沫高度为 H_0 ，静置 30 min 后用直尺测量泡沫高度为 H_{30} 。

$$G_1=\frac{H_0}{H}\times100\%$$

(6)

$$G_2=\frac{H_{30}}{H_0}\times100\%$$

(7)

式中：

- G_1 ——起泡性（OR），%；
- G_2 ——泡沫稳定性（FS），%；
- H ——样品溶液高度，mm；
- H_0 ——样品溶液 0 min 起泡高度，mm；
- H_{30} ——样品溶液 30 min 起泡高度，mm。

1.3.12 感官评定

将酶法改性豌豆蛋白溶液灭酶，冷冻干燥，得到冻干豌豆蛋白粉。将冻干豌豆蛋白粉溶解于饮用水中，使其蛋白质浓度达到 2% 后，参考 GB/T 30885-2014《植物蛋白饮料 豆奶和豆奶饮料》的要求和侯文娟等^[19]的感官评定方法，主要对豌豆蛋白溶液的豆腥味、鲜味、苦味、香气以及顺滑感进行感官评定，评定标准如表 1。选取 10 位（5 男 5 女）与食品相关专业且具有感官评定经验的感官评价人员进行感官评定，以 PPI 的感官评价标准为参照。

1.4 数据处理

采用 Excel、SPSS 27 和 Origin 2018 进行数据的整理、分析和作图，数据组间比较采用单因素方差分析，平行重复三次， $P<0.05$ 表示有数据间具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同pH值对豌豆蛋白酶解的影响

由图 1a 可知，采用 Prokey 酶对豌豆蛋白脱酰胺改性时，溶解度随着 pH 值的升高呈现先上升后平缓的趋势；脱酰胺度随着 pH 值的升高呈现先上升后下降的趋势。虽然 pH 值 6.0 时脱酰胺度达到最高，

为23.22%，但其溶解度低，只达到14.34%；而pH值7.0(35.76%)的溶解度比pH值6.0的高出2倍多，且两者的脱酰胺度无显著性差异($P>0.05$)。综合考虑，选取pH值7.0为Prokey酶的最适pH值。

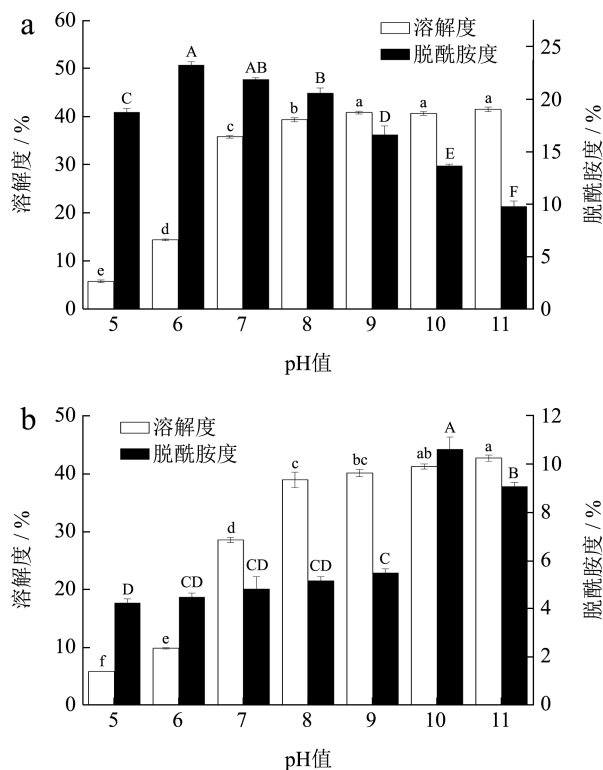


图1 不同pH值对豌豆蛋白溶解度和脱酰胺度的影响

Fig.1 Effect of different pH on solubility and deamidation of pea protein

注：a为Prokey酶，b为Flavkey酶，图2~4同。图中大写字母表示不同pH值脱酰胺度的显著性差异，小写字母表示不同pH值溶解度的显著性差异。

由图1b可知，采用Flavkey酶对豌豆蛋白脱酰胺改性时，随着pH值的升高，豌豆蛋白酶解液的溶解度和脱酰胺度逐渐上升。在pH值为10.0时，溶解度和脱酰胺度分别达到最大值41.24%和10.64%，方璐怡^[20]在研究酶法改性豌豆蛋白时，也发现谷氨酰胺酶在碱性条件下能很好改善豌豆蛋白的溶解性。因此，选取pH值10.0为Flavkey酶的最适pH值。

2.2 不同酶添加量对豌豆蛋白酶解的影响

由图2a可知，采用Prokey酶对豌豆蛋白脱酰胺改性时，随着酶添加量的增加，豌豆蛋白溶解度和脱酰胺度逐渐升高。当酶添加量大于0.9%后溶解度和脱酰胺度变化缓慢，这主要是由于作用底物有限，当酶添加量达到饱和时，过量的酶不能继续发生反应。由于0.6%组的溶解度与0.9%组的无显

著性差异($P>0.05$)，同时考虑成本问题，因此选择0.6%作为Prokey酶的最适酶添加量。

由图2b可知，采用Flavkey酶对豌豆蛋白脱酰胺改性时，随着酶添加量的增加，豌豆蛋白溶解度和脱酰胺度逐渐升高。当酶添加量大于0.6%后溶解度和脱酰胺度变化缓慢，所以选择0.6%为Flavkey酶的最适酶添加量。

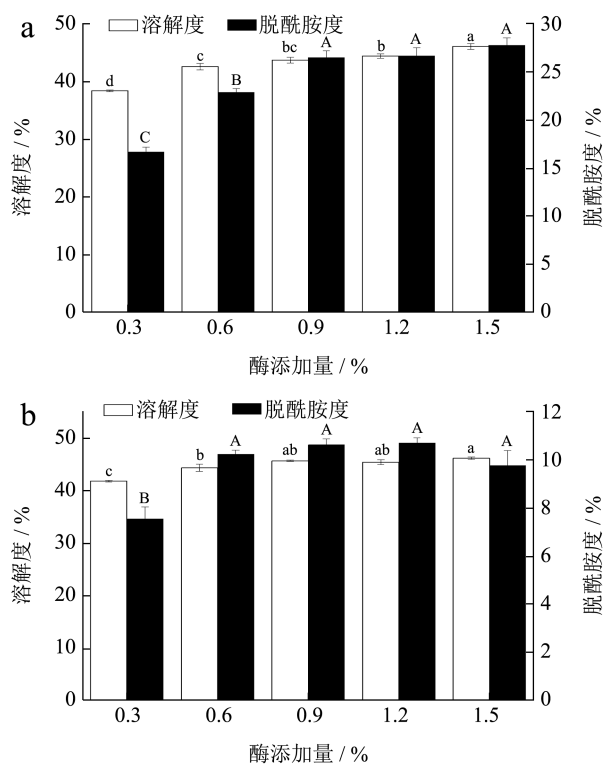


图2 不同酶添加量对豌豆蛋白溶解度和脱酰胺度的影响

Fig.2 Effect of different enzyme additions on solubility and deamidation of pea protein

注：图中大写字母表示不同酶添加量脱酰胺度的显著性差异，小写字母表示不同酶添加量溶解度的显著性差异。

2.3 不同酶解时间对豌豆蛋白酶解的影响

由图3a可知，采用Prokey酶对豌豆蛋白脱酰胺改性时，在酶解4和8h后两者的溶解度相同且最高，为39.89%，脱酰胺度分别为22.78%、28.18%，继续增加酶解时间至24h时，溶解度显著降低($P<0.05$)，因此选择4和8h进行下一步试验。

由图3b可知，采用Flavkey酶对豌豆蛋白脱酰胺改性时，随着酶解时间的延长，溶解度和脱酰胺度逐渐升高。在酶解4、8h时溶解度达到最高，与空白组相比，具有显著性差异($P<0.05$)，因此选择选择4和8h进行下一步试验。此外，0h组中脱酰胺度达6.37%，说明在酶催化脱酰胺的过程中，非酶脱酰胺也有发挥的作用。

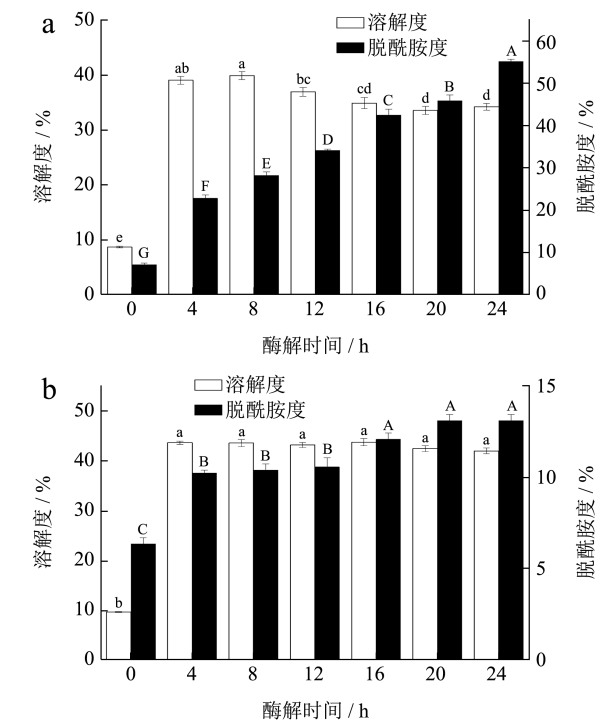


图3 不同酶解时间对豌豆蛋白溶解度和脱酰胺度的影响
Fig.3 Effect of different enzyme digestion time on solubility and deamidation of pea protein

注：图中大写字母表示不同酶解时间脱酰胺度的显著性差异，小写字母表示不同酶解时间溶解度的显著性差异。

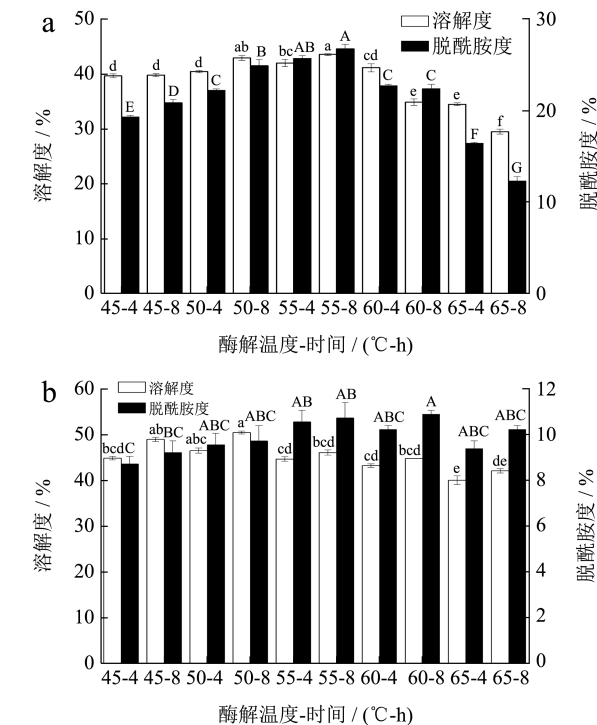


图4 不同酶解温度对豌豆蛋白溶解度和脱酰胺度的影响
Fig.4 Effect of different enzyme digestion temperatures on solubility and deamidation of pea protein

注：图中大写字母表示不同酶解温度-时间脱酰胺度的显著性差异，小写字母表示不同酶解温度-时间溶解度的显著性差异。

2.4 不同酶解温度对豌豆蛋白酶解的影响

由图4a可知，采用Prokey酶对豌豆蛋白脱酰胺改性时，溶解度和脱酰胺度都随着酶解温度的升高呈现先上升后下降的趋势。在55℃时溶解度和脱酰胺度达到最高，且55-8组的溶解度显著高于55-4组，故Prokey酶的最适酶解温度为55℃，最适酶解时间为8h。

由图4b可知，采用Flavkey酶对豌豆蛋白脱酰胺改性时，溶解度和脱酰胺度都随着酶解温度的升高呈现先上升后下降的趋势，由于酶解温度在55℃时溶解度和脱酰胺度最高，55-8组溶解度高于55-4组，故Flavkey酶的最适酶解温度为55℃，最适酶解时间为8h。

2.5 溶解度和脱酰胺度分析

由图5可知，Prokey和Flavkey样品的溶解度和脱酰胺度明显高于未处理PPI样品，Prokey样品的脱酰胺效果显著高于Flavkey样品，而溶解度前者比后者低，这可能是由于Flavkey酶的反应条件是pH值10.0，豌豆蛋白在碱性条件下更易溶出。

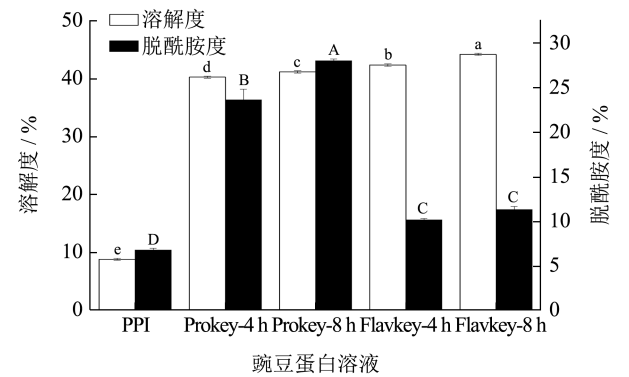


图5 两种不同酶处理对豌豆蛋白溶解度和脱酰胺度的影响
Fig.5 Effect of two different enzyme treatments on solubility and deamidation of pea protein

注：图中大写字母表示不同处理样品脱酰胺度的显著性差异，小写字母表示不同处理样品溶解度的显著性差异。

2.6 悬浮稳定性分析

由图6可知，静置24h后，与未处理PPI样品相比，Prokey和Flavkey酶解处理后悬浮液的稳定性明显有所提高 ($P<0.05$)，由58.90%升高至90.00%以上。其中Prokey酶解悬浮液的稳定性较Flavkey有所降低，Prokey-4h的悬浮稳定性不如Prokey-8h，Flavkey-4h与Flavkey-8h之间的悬浮稳定性变化不大，说明酶解时间对Prokey酶酶解豌

豆蛋白溶液的悬浮稳定性有所影响,而对 Flavkey 酶影响不大。方璐怡^[20]使用谷氨酰胺酶对豌豆蛋白改性时也发现,静置时间越长,PPI 悬浮液的相分离现象越严重,而改性样品整体较为均匀,相分离不明显。

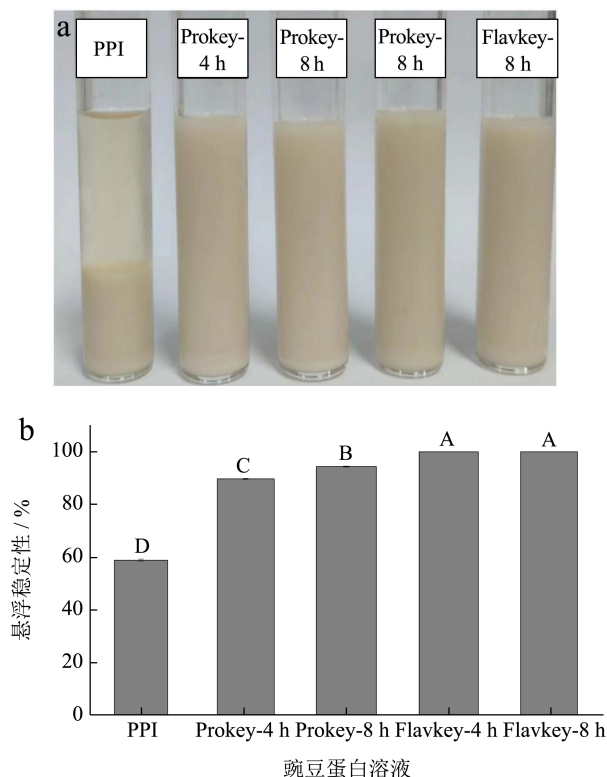


图 6 两种不同酶处理对豌豆蛋白悬浮稳定性的影响

Fig.6 Effect of two different enzyme treatments on the suspension stability of pea protein

注:图中大写字母表示不同处理样品悬浮稳定性的显著性差异。

2.7 乳化性能和起泡性分析

由图 7a 可知,与 PPI 相比,Prokey-4 h 样品的乳化性的变化不大,乳化稳定性有所降低,Prokey-8 h、Flavkey-4 h 和 Flavkey-8 h 样品的乳化能力有显著性提高 ($P < 0.05$),而乳化稳定性变化不大。同时 Flavkey 样品的乳化能力较 Prokey-8 h 样品有所降低,但乳化稳定性变化不大。这一结果与 Wang 等^[21]和张金凤等^[22]的研究结果略有不同,这一略微差异可能是由蛋白种类、来源以及脱酰胺酶来源、作用条件等不同引起的。

由图 7b 可知,Prokey-4 h、Prokey-8 h、Flavkey-4 h 和 Flavkey-8 h 样品的起泡性分别为 53.54%、60.40%、65.02% 和 69.19%,Prokey 和 Flavkey 样品的起泡能力远高于 PPI 样品,且 Flavkey 样品比

Prokey 样品的起泡性显著性提高 ($P < 0.05$)。蛋白质的起泡性受蛋白质的溶解度影响。一般来说,溶解度较高,起泡能力就较强。蛋白质溶解度高,在空气和水界面扩散和吸附能力更强,界面张力降低,更易于泡沫的形成^[23]。Prokey 和 Flavkey 样品的起泡稳定性不如 PPI 样品,而 Prokey 和 Flavkey 样品两者间的泡沫稳定性差距很小。这可能是由于高溶解度,降低了蛋白质表面活性剂分子间的凝聚力,从而导致泡沫膨胀消失^[24]。

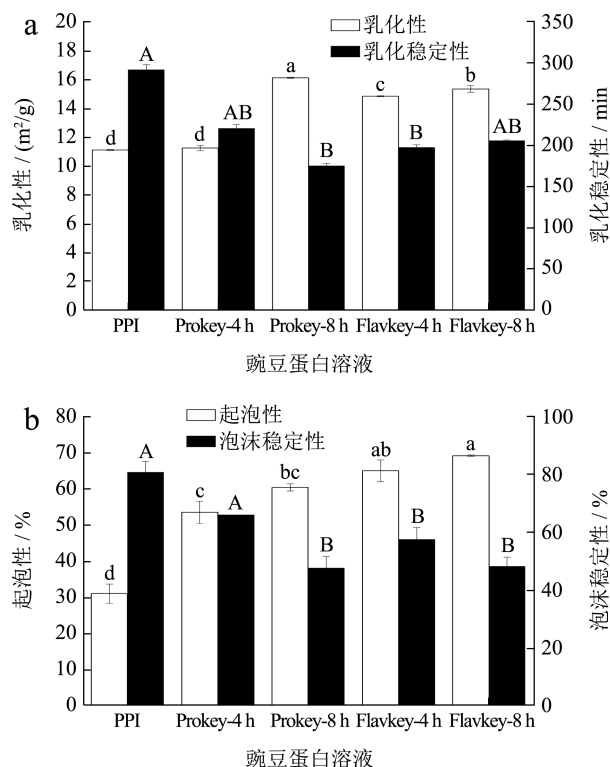


图 7 两种不同酶处理对豌豆蛋白乳化性能和起泡性的影响

Fig.7 Effect of two different enzyme treatments on the emulsification properties and foaming of pea protein

注:图中大写字母表示不同处理样品乳化稳定性/泡沫稳定性的显著性差异,小写字母表示不同处理样品乳化性/起泡性的显著性差异。

2.8 感官评定结果

由图 8 可知,经过酶法脱酰胺后,与未处理 PPI 样品相比,Prokey 和 Flavkey 样品溶液的豆腥味有所减弱、香气突出、顺滑感增强,苦味、鲜味变化不大。Flavkey 样品的豆腥味比 Prokey 样品弱,但顺滑感前者较后者差。方璐怡^[20]发现通过谷氨酰胺酶处理 PPI 可以明显改善豌豆蛋白的均一性、分散性和悬浮性,以及降低豆味、苦味、砂砾感和团块感,从而提高了消费者对 PPI 的接受度。

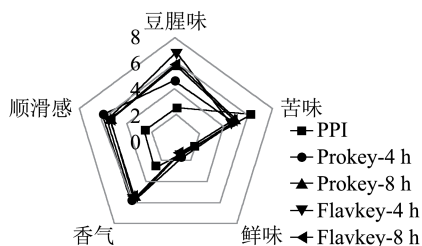


图8 豌豆蛋白溶液感官评定雷达图

Fig.8 Radar chart for sensory evaluation of pea protein solution

3 结论

通过单因素试验,以溶解度和脱酰胺度为评价指标,确定豌豆蛋白的最佳酶法改性工艺条件为:pH值7.0(Prokey酶)/pH值10.0(Flavkey酶),酶添加量0.6%(m/m),酶解温度55℃,酶解时间8h。在此条件下,Prokey-4h、Prokey-8h、Flavkey-4h和Flavkey-8h样品的溶解度分别达到40.27%、41.17%、42.36%和44.20%,脱酰胺度分别为23.65%、28.01%、10.23%和11.41%,两种酶改性豌豆蛋白的悬浮稳定性、起泡性和乳化性明显提高,其中Prokey酶改性豌豆蛋白的脱酰胺度和乳化性较Flavkey酶改性样品分别高2.39倍和1.09倍,但悬浮稳定性和起泡性较Flavkey酶改性样品分别降低了10.41%和18.58%。改性后的豌豆蛋白溶液细腻顺滑、香气突出、豆腥味减弱。本研究可为豌豆蛋白在植物蛋白饮料中应用提供理论和方法指导。

参考文献

- [1] 顾竟,宗绪晓.豌豆资源遗传多样性及核心种质研究进展[J].植物遗传资源学报,2009,10(2):334-337.
- [2] 马宁,魏姜勉.豌豆蛋白的改性及其开发利用研究进展[J].中国市场,2015,32:231-233.
- [3] 徐忠,王友健,陈晓明,等.响应面试验优化超声辅助酶解豌豆蛋白工艺研究[J].粮食与油脂,2021,34(10):121-125.
- [4] 周航,巩瀚钰,薛雯雯,等.超声处理对豌豆蛋白起泡性的影响[J].粮食与食品工业,2023,30(6):34-39.
- [5] 郭兴凤,莫重文.豌豆蛋白粉的制取研究[J].郑州粮食学院学报,1995,3:013.
- [6] JIANG R S, XIAO Z G, HUO J J, et al. Effects of rice bran content on plant-based simulated meat: From the aspects of apparent properties and structural characteristics [J]. Food Chemistry, 2022, 380: 131842.
- [7] NASRABADI M N, DOOST A S, MEZZENGA R. Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 118: 106789.
- [8] ZHA F, GAO K, RAO J, et al. Maillard-driven chemistry to tune the functionality of pea protein: Structure characterization, site-specificity, and aromatic profile [J].

Trends in Food Science and Technology, 2021, 114: 658-671.

- [9] YI J, HE Q, PENG G, et al. Improved water solubility, chemical stability, antioxidant and anticancer activity of resveratrol via nanoencapsulation with pea protein nanofibrils [J]. Food Chemistry, 2022, 377: 131942.
- [10] GLUSAC J, DAVIDESKO-VARDI I, ISASCHAR-OVDAT S, et al. Tyrosinase-crosslinked pea protein emulsions: Impact of zein incorporation [J]. Food Research International, 2019, 116: 370-378.
- [11] YI J, CHEN X, WEN Z, et al. Improving the functionality of pea protein with laccase-catalyzed crosslinking mediated by chlorogenic acid [J]. Food Chemistry, 2024, 433: 137344.
- [12] TAHIR, ASSAM BIN, BO JIANG, et al. Improving functional merit of commercially available pea protein isolate by employing a combination of physical, chemical, and enzymatic modification [J]. Food Bioscience, 2024, 59: 104161.
- [13] YAMAGUCHI S, YOKOE M. A novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. Nov., a newly isolated bacterium from soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3337-3343.
- [14] KATO A, TANAKA A, MATSUDOMI N, et al. Deamidation of food proteins by protease in alkaline pH [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987, 35(2): 224-227.
- [15] LIAO L, ZHAO M, REN J, et al. Effect of acetic acid deamidation-induced modification on functional and nutritional properties and conformation of wheat gluten [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(3): 409-417.
- [16] 陈天祥,于秋生,於慧利,等.一种高悬浮稳定性、低苦味大米蛋白的生产方法:中国,202211525169.X[P].2023-03-03.
- [17] CHAVAN U D, MCKENZIE D B, Shahidi F. Functional properties of protein isolates from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) [J]. Food Chemistry, 2001, 74(2): 177-187.
- [18] HOWELL N K, TAYLOR C. Effect of ascorbic acid on the foaming and gelling of globular proteins [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2010, 30(3): 321-334.
- [19] 侯文娟,秦洋,张丹,等.豌豆蛋白发酵乳的工艺优化及产品特性研究[J].食品工业科技,2024,45(2):175-182.
- [20] 方璐怡.豌豆分离蛋白酶法改性及其应用研究[Z].广州:华南理工大学,2022.
- [21] WANG M, HETTIARACHCHY N S, Qi M, et al. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(2): 411-416.
- [22] 张金凤,韩燕红,王宇慧,等.pH值对清水河春箭筈豌豆分离蛋白功能特性的影响[J].草学,2023,6:29-34.
- [23] 代娅,李华,刘鑫慧,等.酶解联合美拉德反应处理对面筋蛋白特性的影响[J].河南工业大学学报(自然科学版), 2024,45(2):49-57.
- [24] GARG D, CHAKRABORTY S, GOKHALE J S, et al. Optimizing the extraction of protein from Prosopis cineraria seeds using response surface methodology and characterization of seed protein concentrate [J]. LWT, 2020, 117: 108630.