

## 核桃蛋白的酶解工艺优化及产物特性研究

张娅妮, 阮晓惠, 陈浩, 张润光, 张有林

(陕西师范大学 食品工程与营养科学学院, 西安 710119)

**摘要:**将核桃饼脱脂、碱溶酸沉制备核桃蛋白,再利用碱性蛋白酶对核桃蛋白酶解,采用单因素实验研究底物质量分数、酶解 pH、酶用量、酶解温度、酶解时间对水解度的影响,在此基础上采用正交实验对酶解工艺条件进行优化,同时测定了酶解产物的溶解特性、乳化特性和起泡特性。结果表明:碱性蛋白酶酶解核桃蛋白最优酶解条件为底物质量分数 5.0%、酶解 pH 9.0、碱性蛋白酶(活性为 10 000 U/g)用量 4.0%、酶解温度 50℃、酶解时间 2 h;相较核桃蛋白,不同水解度的核桃蛋白酶解产物的表面疏水性下降,溶解特性、乳化特性和起泡特性提高。

**关键词:**核桃蛋白;碱性蛋白酶;酶解;功能特性

中图分类号:TS229;TS201.1

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2021)10-0018-06

### Optimization of enzymatic process and product properties of walnut protein

ZHANG Yani, RUAN Xiaohui, CHEN Hao, ZHANG Runguang, ZHANG Youlin

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

**Abstract:** Walnut protein was prepared from walnut cake by defatting and alkali solubilization and acid precipitation, then it was hydrolyzed by alkaline protease, and the effects of enzymolysis pH, mass fraction of substrate, enzyme dosage, enzymolysis temperature and enzymolysis time on the degree of hydrolysis were studied by single factor experiment, then the enzymatic hydrolysis process was optimized using orthogonal experiment. The solubility, emulsification and foaming properties of the enzymatic hydrolysis products were measured. The results showed that the optimal conditions for the enzymatic hydrolysis of walnut protein with alkaline protease were obtained as follows: mass fraction of substrate 5.0%, enzymolysis pH 9.0, amount of alkaline protease (activity 10 000 U/g) 4.0%, enzymolysis temperature 50℃ and enzymolysis time 2 h. Compared with walnut protein, the surface hydrophobicity of the enzymatic hydrolysis product with different degrees of hydrolysis decreased, and the solubility, emulsification and foaming properties increased.

**Key words:** walnut protein; alkaline protease; enzymatic hydrolysis; functional property

核桃(*Juglans regia* L.)为胡桃科、胡桃属多年生乔木<sup>[1]</sup>,其果实具有丰富的营养成分和经济价值,在我国种植广泛,深受大众喜爱<sup>[2]</sup>。核桃粕是核桃仁榨油后的剩余产物,富含大量的营养成分,但

目前主要用作肥料或动物饲料,利用价值低廉<sup>[3-4]</sup>。核桃粕中蛋白质含量高达 40%~50%,主要是水不溶性谷蛋白,溶解度较低,乳化特性和起泡特性不良。

酶是活细胞产生的具有高度催化活性和高度专一性的生物催化剂<sup>[5]</sup>。蛋白质酶解是指利用酶的内切或者外切作用对蛋白质进行部分降解和修饰,或通过增加分子间的交联形成特殊功能基团,得到小分子肽或氨基酸的过程<sup>[6]</sup>。酶解能改善蛋白质的功能,且不破坏蛋白质的营养,能使蛋白质具有新的加工特性<sup>[7]</sup>。蛋白质酶解产物应用广泛,既可以作为特定食品的配料,也可以作为肠道疾病病人饮食中的氮源,或者用于低过敏婴儿配方食品或运动

收稿日期:2020-12-11;修回日期:2021-06-23

基金项目:陕西省农业专项资金项目;陕西省科技攻关项目(2015NY007);西安市科技计划项目(NC1405(2))

作者简介:张娅妮(1996),女,硕士研究生,研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程(E-mail)1960935551@qq.com。

通信作者:张有林,教授,博士生导师(E-mail)youlinzh@snnu.edu.cn。

员饮料<sup>[8]</sup>。潘芬等<sup>[9]</sup>研究发现豌豆蛋白酶解物具有促进益生菌生长的作用;张怡等<sup>[10]</sup>指出哈蟆油蛋白酶解物可以治疗酒精性肝损伤;费焯等<sup>[11]</sup>报道苦荞清蛋白酶解物可以改善胰岛素抵抗。目前对多种食料蛋白酶解产物有比较广泛的研究,但对核桃蛋白酶解产物的研究较少。因此,本研究以核桃饼为原料提取核桃蛋白,用碱性蛋白酶酶解,并优化酶解工艺参数,通过测定不同水解度下酶解产物的表面疏水性、溶解度、乳化特性和起泡特性,评价核桃蛋白酶解产物的功能特性,旨在为拓宽核桃蛋白酶解产物在食品中的应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

核桃饼,陕西省香玲核桃仁冷榨制油后的副产物;市售鲁花5S压榨一级花生油;碱性蛋白酶(活性10 000 U/g),美国Sigma公司;考马斯亮蓝G250、牛血清白蛋白(BSA)、三羧甲基氨基甲烷(Tris)、8-苯胺-1-萘磺酸(ANS),均为分析纯,美国Sigma公司。其他试剂均为国产分析纯。

#### 1.1.2 仪器与设备

LGJ-18C冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂;HH-S数显恒温水浴锅,江苏省金坛市医疗仪器厂;KQ3200DE数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;SHZ-82恒温振荡器,金坛市富华仪器有限公司;PHS-3C精密pH计,上海精密科学仪器有限公司;UV-1100紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 脱脂核桃粕的制备

核桃饼→粉碎→过0.150 mm(100目)筛→50℃干燥24 h→按料液比1:5加入石油醚→振动脱脂4 h→过滤→弃掉滤液→重复脱脂2~3次→脱脂核桃粕→PE袋封装备用。

#### 1.2.2 核桃蛋白的制备

参考郭兴峰等<sup>[12]</sup>的方法,略作修改。

脱脂核桃粕→按照料液比1:15加入蒸馏水浸泡→调pH至9.0→60℃下磁力搅拌2 h→过滤并收集滤液→滤渣再次提取2 h→过滤并收集滤液→合并滤液→调pH至4.5(0.5 mol/L HCl)→4 000 r/min离心30 min→去除上清液→调pH至中性(2 mol/L NaOH溶液)→真空冷冻干燥→核桃蛋白→置于-20℃冰箱备用。

#### 1.2.3 主要成分测定

蛋白质含量测定采用GB 5009.5—2016凯氏定

氮法,蛋白质系数按5.30计算;粗脂肪含量测定采用GB 5009.6—2016索氏抽提法;水分含量测定采用GB 5009.3—2016直接干燥法;灰分含量测定采用GB 5009.4—2016。

#### 1.2.4 核桃蛋白的酶解

将核桃蛋白悬浮于去离子水中,加入一定量的碱性蛋白酶(用量以核桃蛋白质量计),在适宜温度和pH的条件下酶解一段时间,在100℃水浴中加热10 min灭酶,冷却至室温,离心并收集上清液,真空冷冻干燥,得核桃蛋白酶解产物。

#### 1.2.5 水解度(DH)的测定

采用甲醛滴定法<sup>[13]</sup>测定DH,略作修改。取5.0 mL核桃蛋白酶解液的上清液,加入25 mL蒸馏水并用0.05 mol/L NaOH标准溶液滴定至pH为8.2,加入10.0 mL pH 8.2甲醛溶液,准确记录将溶液体系滴定至pH 9.2时消耗0.05 mol/L NaOH标准溶液的体积。同时以30 mL水做空白实验,每次平行测定3次。水解度按式(1)计算。

$$D_H = [C \times (V - V_0) \times 0.014 / N] \times 100\% \quad (1)$$

式中: $D_H$ 为DH的值; $C$ 为NaOH标准溶液浓度, mol/L; $V$ 为酶解液消耗的NaOH标准溶液体积, mL; $V_0$ 为空白液消耗的NaOH标准溶液体积, mL;0.014为1 mL浓度为1.000 mol/L NaOH标准溶液相当于氮的质量(g); $N$ 为底物样品总氮含量,g。

#### 1.2.6 表面疏水性的测定

参考Wang等<sup>[14]</sup>的ANS荧光探针法。激发波长为390 nm,发射波长为470 nm,间隙5 nm。利用蛋白质浓度和荧光强度作响应曲线,曲线斜率为待测样品的表面疏水性指数。

#### 1.2.7 溶解性的测定

参照Lawal等<sup>[15]</sup>的方法,略作修改。将125 mg样品分散在25 mL去离子水中,调节pH至2.5~9.5,离心30 min,收集上清液。测定上清液和样品的蛋白质含量,每个样品平行测定3次,取平均值。按式(2)计算溶解性( $X$ )。

$$X = C_1 / C_2 \times 100\% \quad (2)$$

式中: $C_1$ 为上清液中的蛋白质含量; $C_2$ 为样品中的蛋白质含量。

#### 1.2.8 乳化性与乳化稳定性的测定

不同pH下核桃蛋白酶解产物的乳化性和乳化稳定性测定参考Pearce<sup>[16]</sup>、Henrique<sup>[17]</sup>等的方法,略作修改。调节样品溶液pH至2.0~10.0,将3 mL不同pH样品溶液分别与1 mL大豆油混合,在XHF-D型高速分散器中分散90 s。迅速从试管底部吸取0.1 mL乳浊液,加入4.9 mL 0.1% SDS溶

液中,以 0.1% SDS 溶液为空白对照,摇匀后迅速在 500 nm 处测得吸光值( $A_0$ ),放置 10 min 后测得吸光值( $A_t$ )。按式(3)、式(4)分别计算乳化性(EAI)和乳化稳定性(ESI)。

$$I_{EA} = 2TA_0 \times n / (C \times \Phi \times 10\ 000) \quad (3)$$

$$I_{ES} = A_t / A_0 \times 100\% \quad (4)$$

式中: $I_{EA}$ 为 EAI 的值; $I_{ES}$ 为 ESI 的值; $T$ 取 2.303; $C$ 为核桃蛋白酶解产物溶液质量浓度,取 0.001 g/mL; $\Phi$ 为油相体积分数,取 0.25; $n$ 为稀释倍数,取 50。

### 1.2.9 起泡性与泡沫稳定性的测定

核桃蛋白酶解产物的起泡性和泡沫稳定性的测定参照 Pires 等<sup>[18]</sup>的方法。取 30 mL 0.5 mg/mL 核桃蛋白酶解产物溶液,调节 pH 至 2.0 ~ 10.0,使用 XHF-D 型高速分散器分散 120 s,立即转移到玻璃量筒中记录泡沫体积( $V_0$ ),室温环境下放置 30 min 后记录泡沫体积( $V_t$ )。分别按式(5)、式(6)计算起泡性( $F_0$ )和泡沫稳定性( $F_1$ )。

$$F_0 = V_0 / 30 \times 100\% \quad (5)$$

$$F_1 = V_t / V_0 \times 100\% \quad (6)$$

### 1.2.10 数据处理

用 Excel 2010 软件分析,计算平均值并作图,结果表示为“ $\bar{X} \pm S$ ”,采用 SPSS 19 Duncan's 多重比较,显著水平取  $p < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 核桃饼、脱脂核桃粕和核桃蛋白中的主要成分

核桃饼、脱脂核桃粕和核桃蛋白中的主要成分见表 1。

表 1 核桃饼、脱脂核桃粕和核桃蛋白的主要成分 %

主要成分	核桃饼	脱脂核桃粕	核桃蛋白
蛋白质	47.26 ± 0.23 <sup>c</sup>	63.98 ± 0.52 <sup>b</sup>	88.91 ± 0.44 <sup>a</sup>
粗脂肪	12.89 ± 0.65 <sup>a</sup>	2.34 ± 0.15 <sup>b</sup>	1.15 ± 0.09 <sup>c</sup>
水分	16.09 ± 0.84 <sup>a</sup>	8.64 ± 0.25 <sup>b</sup>	3.72 ± 0.05 <sup>c</sup>
灰分	4.57 ± 0.12 <sup>a</sup>	3.90 ± 0.18 <sup>a</sup>	3.45 ± 0.08 <sup>a</sup>

注:同行不同小写字母表示差异显著( $p < 0.05$ )。

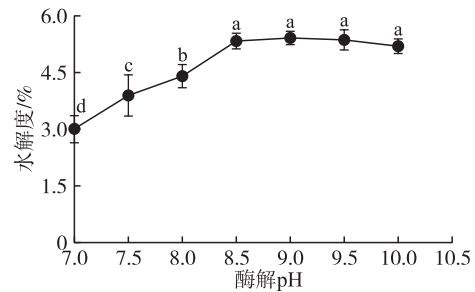
由表 1 看出,核桃饼经脱脂和碱溶酸沉,蛋白质含量显著提高( $p < 0.05$ ),粗脂肪和水分含量显著减少( $p < 0.05$ ),但灰分含量变化不显著( $p > 0.05$ )。

### 2.2 碱性蛋白酶酶解核桃蛋白的单因素实验

#### 2.2.1 酶解 pH 对核桃蛋白水解度的影响(见图 1)

由图 1 看出,在酶解 pH 为 7.0 ~ 9.0 的范围内,随着酶解 pH 的升高,核桃蛋白的水解度逐渐增大,当酶解 pH 为 9.0 时,水解度达到 5.42%,随后随着酶解 pH 升高,核桃蛋白的水解度略有下降,这

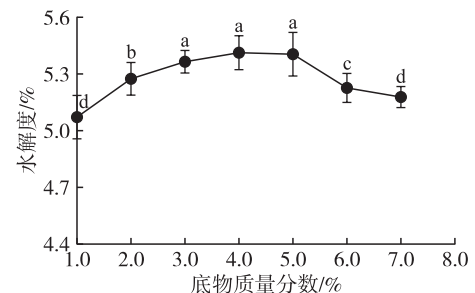
可能是因为 pH 过高造成酶的活性降低。因此,核桃蛋白酶解最佳 pH 为 9.0。



注:底物质量分数 4.0%、酶用量 5.0%、酶解温度 50℃、酶解时间 2 h。

图 1 酶解 pH 对核桃蛋白水解度的影响

#### 2.2.2 底物质量分数对核桃蛋白水解度的影响(见图 2)

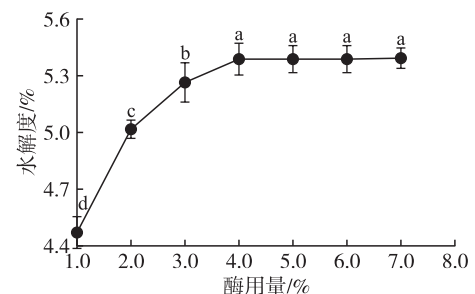


注:酶解 pH 9.0、酶用量 5.0%、酶解温度 50℃、酶解时间 2 h。

图 2 底物质量分数对核桃蛋白水解度的影响

由图 2 看出,底物质量分数在 1.0% ~ 4.0% 的范围内,随着底物质量分数的增加核桃蛋白的水解度增加。当底物质量分数达到 4.0% 时,核桃蛋白的水解度达 5.34%,随后随着底物质量分数的继续增大,核桃蛋白水解度出现降低的趋势,这可能是因为随着底物质量分数的增大溶液的黏度增加,从而降低了酶分子与底物的相互作用。因此,核桃蛋白酶解最佳底物质量分数为 4.0%。

#### 2.2.3 酶用量对核桃蛋白水解度的影响(见图 3)



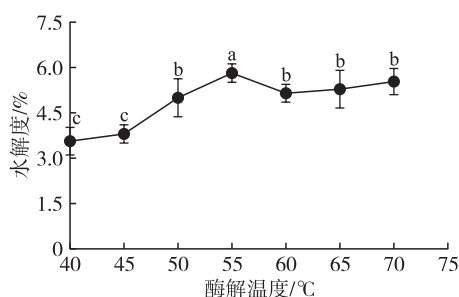
注:酶解 pH 9.0、底物质量分数 4.0%、酶解温度 50℃、酶解时间 2 h。

图 3 酶用量对核桃蛋白水解度的影响

由图 3 看出,碱性蛋白酶用量在 1.0% ~ 4.0%

的范围内,随着酶用量的增加,核桃蛋白的水解度迅速增加。当酶用量为4.0%时,核桃蛋白的水解度达到5.32%,随后酶用量再增加,核桃蛋白水解度趋于平稳,这可能是因为底物已经全部参与反应,核桃蛋白水解度达到了饱和。因此,核桃蛋白酶解最佳酶用量为4.0%。

#### 2.2.4 酶解温度对核桃蛋白水解度的影响(见图4)



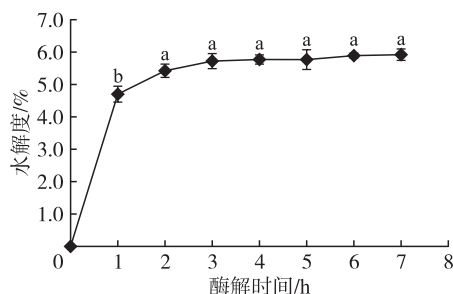
注:酶解 pH 9.0、底物质量分数 4.0%、酶用量 4.0%、酶解时间 2 h。

图4 酶解温度对核桃蛋白水解度的影响

由图4看出,酶解温度在40~55℃的范围内,随着酶解温度的继续升高,核桃蛋白的水解度逐渐升高,当酶解温度为55℃时,核桃蛋白水解度达到5.80%,之后随着酶解温度的继续升高,核桃蛋白的水解度均较55℃时的低,这可能是因为酶解温度升高,导致酶的活性受到一定的影响,从而使得核桃蛋白的水解度降低。因此,核桃蛋白用碱性蛋白酶酶

解最佳酶解温度为55℃。

#### 2.2.5 酶解时间对核桃蛋白水解度的影响(见图5)



注:酶解 pH 9.0、底物质量分数 4.0%、酶用量 4.0%、酶解温度 50℃。

图5 酶解时间对核桃蛋白水解度的影响

由图5看出,酶解时间在1h以内,随着酶解时间的延长,核桃蛋白的水解度迅速增加,而酶解2h以后,核桃蛋白的水解度趋于平缓。这可能是因为随着酶解反应的进行,需要酶解的蛋白质不断减少,同时酶的活性和浓度逐渐降低,导致核桃蛋白的水解度变化不大。因此,核桃蛋白酶解最佳酶解时间为2h。

#### 2.3 碱性蛋白酶酶解核桃蛋白的正交实验

在单因素实验的基础上,固定酶解时间2h,以酶解 pH、酶用量、底物质量分数、酶解温度为因素,核桃蛋白水解度(DH)为指标,进行四因素三水平正交实验,正交实验设计及结果见表2。

表2 正交实验设计及结果

实验号	A pH	B 酶用量	C 底物质量分数	D 酶解温度	DH/%
1	1(8.5)	1(3.0%)	1(3.0%)	1(50℃)	5.36 ± 0.51
2	1	2(4.0%)	2(4.0%)	2(55℃)	5.94 ± 0.53
3	1	3(5.0%)	3(5.0%)	3(60℃)	4.85 ± 0.44
4	2(9.0)	1	2	3	6.02 ± 0.58
5	2	2	3	1	6.48 ± 0.62
6	2	3	1	2	6.19 ± 0.54
7	3(9.5)	1	3	2	5.75 ± 0.52
8	3	2	1	3	5.29 ± 0.47
9	3	3	2	1	5.08 ± 0.46
$K_1$	16.15	17.13	16.84	16.92	
$K_2$	18.69	17.71	17.04	17.88	
$K_3$	16.12	16.12	17.08	16.16	
R	2.57	1.59	0.24	1.72	

由表2看出,最优因素水平组合为 $A_2B_2C_3D_2$ ,在该组合条件下进行核桃蛋白的酶解,测得水解度为6.52%,与正交实验处理5( $A_2B_2C_3D_1$ )的水解度(6.48%)差异不显著( $p > 0.05$ ),综合考虑,确定碱性蛋白酶酶解核桃蛋白的最优工艺组合为

$A_2B_2C_3D_1$ ,即酶解 pH 9.0,酶用量 4.0%,底物质量分数 5.0%,酶解温度 50℃。

#### 2.4 核桃蛋白酶解产物的特性

考虑酶解时间对产物的特性存在一定的影响,本文对在最优的酶解条件(酶解 pH 9.0、酶用量

4.0%、底物质量分数 5.0%、酶解 50℃) 下分别酶解 0.5、1、2 h 的核桃蛋白酶解产物(对应水解度分别为 2.20%、4.97% 和 6.63%) 的特性进行研究。

#### 2.4.1 表面疏水性(见图 6)

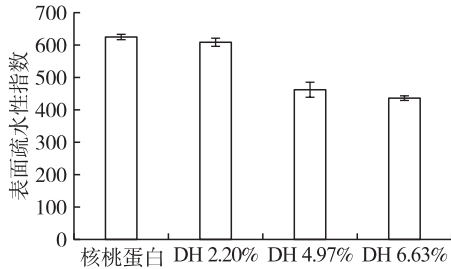


图 6 核桃蛋白酶解产物的表面疏水性

由图 6 看出,核桃蛋白的表面疏水性指数为 625,高于燕麦分离蛋白<sup>[19]</sup>和小麦谷蛋白<sup>[20]</sup>。用碱性蛋白酶酶解,随着酶解时间的延长,核桃蛋白酶解产物的水解度增加,表面疏水性指数呈下降趋势,这可能是因为酶解减少了核桃蛋白分子表面疏水基团的含量,使得表面疏水性指数降低。

#### 2.4.2 溶解性(见图 7)

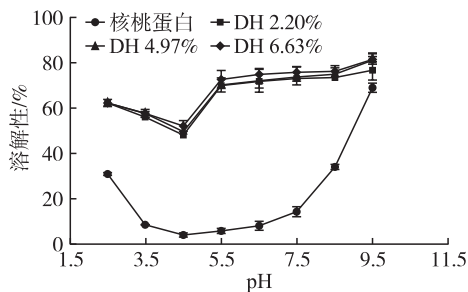


图 7 核桃蛋白酶解产物的溶解性

由图 7 看出,pH 为 4.5 时核桃蛋白及其酶解产物的溶解性最差,核桃蛋白溶解性只有 3.87%,这是由于 pH 4.5 是核桃蛋白的等电点所致。当 pH 不断升高时,核桃蛋白及其酶解产物的溶解性逐渐升高,当 pH 为 9.5 时,核桃蛋白溶解性达到 68.9%。pH 9.5 时,水解度分别为 2.20%、4.97% 和 6.63% 3 种酶解产物的溶解性分别为 76.34%、81.09% 和 81.56%,这可能是因为 pH 影响蛋白质的疏水性、极性和可离子化基团的数量<sup>[21-24]</sup>,导致产物溶解性提高。

#### 2.4.3 乳化特性(见图 8、图 9)

由图 8、图 9 看出,水解度为 2.20%、4.97% 和 6.63% 3 种酶解产物的乳化性和乳化稳定性都高于核桃蛋白,这可能是因为酶解降低了核桃蛋白的表面疏水基团含量和表面疏水性指数,酶解产物的亲水基团、疏水基团以及相关电荷促进了 O/W 乳液的形成。

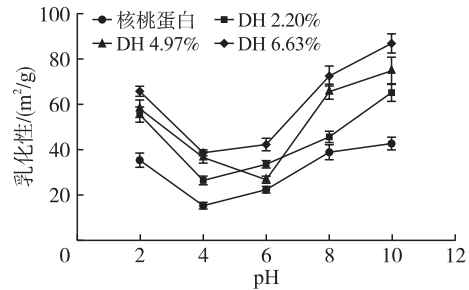


图 8 核桃蛋白酶解产物的乳化性

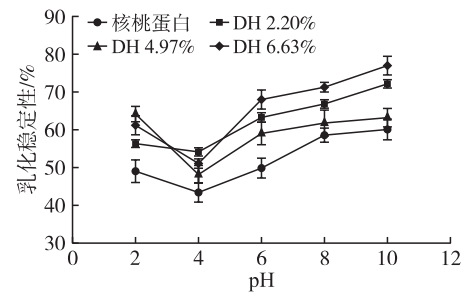


图 9 核桃蛋白酶解产物的乳化稳定性

#### 2.4.4 起泡特性(见图 10、图 11)

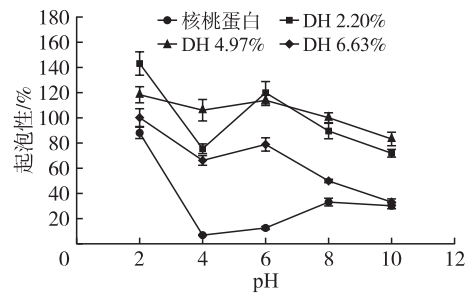


图 10 核桃蛋白酶解产物的起泡性

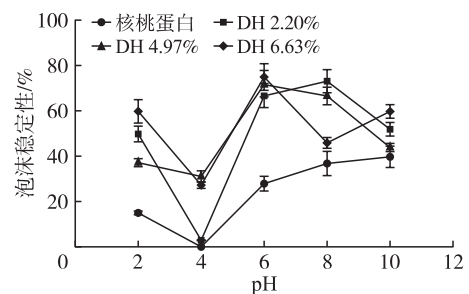


图 11 核桃蛋白酶解产物的泡沫稳定性

由图 10、图 11 看出,水解度为 2.20%、4.97% 和 6.63% 3 种酶解产物的起泡性和泡沫稳定性均高于核桃蛋白,这可能是因为酶解使得蛋白质表面净电荷数目增加,有利于多肽链的交联,从而使酶解产物表现出较高的起泡性和泡沫稳定性。核桃蛋白酶解产物起泡性在 pH 为 2 时最好,泡沫稳定性在 pH 为 6~8 时较好。

### 3 结论

香玲核桃仁冷榨制油后的核桃饼经脱脂、碱溶酸沉得到核桃蛋白,采用碱性蛋白酶酶解核桃蛋白,以水解度为指标采用单因素实验和正交实验对酶解

工艺条件进行优化,并研究了核桃蛋白酶解产物的表面疏水性、乳化特性、起泡特性和溶解特性。结果表明,碱性蛋白酶解核桃蛋白的最佳工艺条件为:底物质量分数5.0%,酶解pH9.0,碱性蛋白酶(活性10 000 U/g)用量4.0%,酶解温度50℃,酶解时间2 h。与核桃蛋白相比,核桃蛋白酶解产物的表面疏水性指数降低,溶解特性、乳化特性和起泡特性提高。

#### 参考文献:

- [1] 郝荣庭,张毅萍. 中国果树志·核桃卷[M]. 北京:中国林业出版社,1996:12-58.
- [2] 王小纪,张有林,杨红军,等. 陕西引种早实核桃的生物学性状与营养成分[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版),2013,41(3):93-97.
- [3] 贾立君,马汇泉. 核桃油综合保质技术研究[J]. 现代化农业,2013(1):40-41.
- [4] 郝剑,张卫民,杨红军,等. 核桃粕制备微胶囊速溶核桃粉的工艺研究[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版),2014,42(5):103-108.
- [5] 卜友泉. 酶和核酶的词源学研究及现实意义[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2020,36(4):475-480.
- [6] SAVAGE G P. Chemical composition of walnuts (*Juglans regia* L.) grown in New Zealand[J]. Plant Foods Human Nutr, 2001,56(1):75-82.
- [7] 毛晓英. 核桃蛋白质的结构表征及其制品的改性研究[D]. 江苏 无锡:江南大学,2012.
- [8] 刘志同,裴静,石冬冬. 酶改性技术在大豆分离蛋白生产中的应用[J]. 粮油食品科技,2003,11(3):11-12.
- [9] 潘芬,杨敏,刘梦阳,等. 豌豆蛋白酶解产物促进益生菌生长活性研究[J]. 中国食品学报,2019,19(2):27-36.
- [10] 张怡,郑冉,于奇,等. 哈蟆油蛋白酶解物对乙醇诱导的L-02细胞损伤的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2021(15):43-50.
- [11] 费焯,王雍,龚仕英,等. 苦荞清蛋白酶解物对高糖诱导的HepG2细胞胰岛素抵抗的保护作用[J]. 食品科学,2021,42(1):222-227.
- [12] 郭兴峰,陈计峦,林燕,等. 热榨和冷榨核桃饼粕中蛋白质提取及其性质研究[J]. 农业工程学报,2012,28(18):287-292.
- [13] 周慧江,朱振宝,易建华. 核桃蛋白水解物水解度测定方法比较[J]. 粮食与油脂,2012,25(2):28-30.
- [14] WANG Y, WANG R, CHANG Y, et al. Preparation and thermo-reversible gelling properties of protein isolate from defatted Antarctic krill (*Euphausia superba*) byproducts[J]. Food Chem,2015,188:170-176.
- [15] LAWAL O S, ADEBOWALE K O. The acylated protein derivatives of *Canavalia ensiformis* (jack bean): a study of functional characteristics [J]. LWT - Food Sci Technol, 2006,39(8):918-929.
- [16] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique [J]. J Agric Food Chem,1978,26(3):716-723.
- [17] HENRIQUE S D B L, ALBUQUERQUE M P, ASSMANN F, et al. Physicochemical properties of three food proteins treated with transglutaminase [J]. Ciência Rural,2004,34(4):1219-1223.
- [18] PIRES C, TEIXEIRA B, CARDOSO C, et al. Cape hake protein hydrolysates prepared from alkaline solubilised proteins pre-treated with citric acid and calcium ions: functional properties and ACE inhibitory activity [J]. Process Biochem,2015,50(6):1006-1015.
- [19] MOHAMED A, BIRESAW G, XU J, et al. Oats protein isolate: thermal, rheological, surface and functional properties [J]. Food Res Int,2009,42(1):107-114.
- [20] WANG J, ZHAO M, YANG X, et al. Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration [J]. J Cereal Sci,2006,44(1):93-100.
- [21] YIN S W, TANG C H, CAO J S, et al. Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate [J]. Food Chem,2008,106(3):1004-1013.
- [22] KONG X, ZHOU H, QIAN H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates [J]. Food Chem,2007,102(3):759-763.
- [23] BUCKO S, KATONA J, POPOVIC L, et al. Influence of enzymatic hydrolysis on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate [J]. Food Hydrocolloid, 2016, 60:271-278.
- [24] HMIDET N, BALTI R, NASRI R, et al. Improvement of functional properties and antioxidant activities of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins hydrolyzed by *Bacillus mojavensis* A21 proteases [J]. Food Res Int,2011,44(9):2703-2711.