脱酚和碱处理对豌豆分离蛋白基本性质的影响

蒋 将[1]，朱 波[1]，刘元法[1,*]，熊幼翎[2]
(1.江南大学食品学院，江苏 无锡 214122；2.肯塔基大学动物与食品科学系，列克星顿 40546，美国)

摘 要：以脱脂豌豆粉为原料，采用甲醇和丙酮连续提取法进行脱酚处理后提取出豌豆分离蛋白，再对其进行碱处理，探讨豌豆分离蛋白基本性质(粒径、溶解度和乳化特性)的变化，并通过氨基酸组成和凝胶电泳初步分析蛋白质结构的变化。结果表明：豌豆中主要含有的酚酸是龙胆酸、水杨酸、香豆酸和阿魏酸；脱酚和碱处理的豌豆分离蛋白平均粒径减小，溶解度增加，形成的乳化液贮藏稳定性较好；脱酚处理不会破坏蛋白质的氨基酸组成，多酚提取物中的蛋白质含有较多含侧链氨基的精氨酸，以及含巯基的半胱氨酸，蛋白质的亚基发生了一定的变化。故豌豆分离蛋白经脱酚和碱处理后，功能性质均会得到显著的改善；且与脱酚处理相比，碱处理对豌豆分离蛋白的基本性质的改善更显著。

关键词：豌豆分离蛋白；脱酚处理；碱处理；功能性质

Functional Properties of Pea Protein Isolate Subjected to Phenol Removal and Alkali Treatment

JIANG Jiang[1]，ZHU Bo[1]，LIU Yuan-fa[1,*]，XIONG You-ling L.[2]
(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China；
2. Department of Animal and Food Sciences, University of Kentucky, Lexington 40546, USA)

Abstract：Pea protein isolate (PPI) was prepared from defatted pea flour by sequential treatment with methanol followed by acetone and then subjected to alkali treatment. The effects of phenol removal (with methanol/acetone extraction) and alkali treatment at pH 12 on the particle size, solubility and emulsifying properties of PPI were investigated. The amino acid profile and protein subunit changes were examined to elucidate the relationship between protein structure and functionality. Gentisic acid, hydroxybenzoic acid, coumaric acid and ferulic acid were identified using HPLC with phenolic compound standards. Decreased protein particle size and improved solubility and emulsifying properties were observed in PPI after both treatments. These processes also selectively removed some polypetides rich in arginine and cysteine. However, alkali treatment was more effective to improve protein functionality than phenol removal.

Key words：pea protein isolate；phenol removal；alkali treatment；functionality
中图分类号：TS229 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)23-0001-05
doi:10.7506/spkx1002-6630-201323001

豌豆是一种优良的营养性食品，有助于防止动脉硬化、肿瘤的作用。豌豆在我国已有两千多年的栽培历史，其利用价值主要是日常食用；对于豌豆的深加工，主要是生产淀粉的副产品——蛋白作为饲料低价卖出。豌豆中的蛋白含量在13.7%～30.7%之间，平均含量22.3%[1]。由于豌豆蛋白的功能性质相对较差，在食品中的应用仍然有限。国内外关于豌豆分离蛋白(PPI)的研究并不多，主要集中在对PPI制备及其基本性质的研究[2-4]，因此，有必要研究改性技术来改善其功能性，以期拓宽其应用范围。

酚类化合物广泛存在于植物中，植物多酚又名植物单宁，为植物体内的复杂酚类次生代谢物。具有清除机体内自由基、抗脂质氧化、延缓机体衰老、预防心血管疾病、防癌、抗辐射等生物活性功能[5-6]。另外酚类物质会使植物产品产生苦涩味、颜色加深，也可以与蛋白质等物质形成复合物，影响消化吸收，从而降低产品的营养价值[7]。Singleton等[8]报道了多种植物中的酚类物质具有毒性功能，可以对昆虫和病菌有一定的抵抗性。目前对植物中天然存在的酚类物质研究主要在提取方面。例如陈红惠等[9]探索了提取雪莲果叶中多酚类物质的最佳工艺条件。Xu等[10]研究了采取一些列的工序将油菜籽蛋白中的多酚化合物去除，以缓解黑色和不良风味的产生。

收稿日期：2013-08-30
基金项目：国家自然科学基金项目(30471225)；“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD28B04)
作者简介：蒋将(1982—)，女，讲师，博士，研究方向蛋白质结构与功能性质。E-mail：jiangjiang0909@gmail.com
*通信作者：刘元法(1974—)，男，教授，博士，研究方向为油脂与植物蛋白。E-mail：foodscilyf@163.com

国外学者对酚类物质与蛋白质间的相互作用以及抗氧化效果作了一定的研究。例如Ou等[11]研究了适宜浓度的阿魏酸促进大豆分离蛋白的成膜性，并且提高了用于新鲜猪肉保存的膜的抗氧化性。Jongberg等[12]研究了甲基邻苯二酚与肌原纤维蛋白(MPI)中硫醇作用，不会促使蛋白质二硫键的生成，且会抑制肉蛋白氧化。Tsai等[13]研究了5种酚酸与豌豆分离蛋白结合，并在不同加热条件下比较了抗氧化能力的增强效果，发现苯乙烯基甲酸类酚酸增强热稳定性比苯甲苯类酚酸要好。

但天然体系中酚类物质与蛋白质的结合且对功能性质的影响方面的研究还不多。本实验研究脱酚和碱处理对豌豆分离蛋白基本性质(平均粒径大小、溶解性、乳化性)的影响，并通过氨基酸组成和凝胶电泳初步分析蛋白质结构的变化，以期为继续研究酚类物质在蛋白体系中的抗氧化行为提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

豌豆 无锡雪浪农贸市场。

丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)、5,5二硫代二硝基苯甲酸盐(DTNB) 美国Sigma公司；甲醇、丙酮等化学试剂(化学纯) 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

79-1型磁力搅拌器 江苏国华仪器厂；Deltax型酸度计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司；UV-2800H型紫外-可见分光光度计 上海谱元仪器有限公司；Zetasizer Nano ZS纳米粒度分析仪 英国马尔文公司；高压均质机 ATS工业系统有限公司；650-60型荧光分光光度计 日本日立公司；电泳仪 美国Bio-Rad公司；高效液相色谱仪 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 豌豆的脱酚处理

根据Agboola等[14]的方法对脱脂豌豆粉进行脱酚处理，略作改进。称取一定量的脱脂豌豆粉，先采用70%甲醇(1:10，*m*/*V*)溶解，室温下搅拌40min，在10000×*g*冷冻离心20min，收集上清液M；再用70%丙酮(1:10，*m*/*V*)溶解沉淀，室温下搅拌20min后在10000×*g*冷冻离心20min，收集上清液A，并将沉淀抽滤除水后于20℃放置过夜，待提取蛋白。将收集到的M和A溶液在30℃条件下真空旋转蒸发，除去有机试剂，剩余的水溶液分别冻干，检测豌豆中的酚酸种类。

1.3.2 豌豆分离蛋白的提取

根据Ramirez-Suarez等[15]的方法提取豌豆分离蛋白。采用凯氏定氮法测定蛋白质含量[14]，提取未进行脱酚处理的豌豆，得到的天然豌豆分离蛋白(PPI)含量为93.4%；而提取进行脱酚处理后的豌豆，得到的脱酚豌豆分离蛋白(DPPI)含量为96.0%。

1.3.3 pH12偏移处理

参照蒋将[16]的方法。分别配制2g/100mL的蛋白溶液进行pH12偏移处理。将蛋白溶液调节pH12使蛋白结构部分展开，保持1h，随后将pH值调回中性，搅拌1h，使蛋白结构充分回复。

1.3.4 酚酸种类的测定

根据Michalska[17]的方法用HPLC检测豌豆中主要酚酸的种类。色谱条件：光电二极管阵列检测器，100RP-18柱(4mm×250mm，5μm)，流动相：水-乙腈-冰醋酸(88:10:2，*V*/*V*)，柱温：30℃，流速：1mL/min，时间：60min，进样量：5μL，检测波长：280nm。

1.3.5 溶解度的测定

采用双缩脲法测定蛋白质量浓度。先用标准的牛血清蛋白(BSA)作标准曲线。然后移取1mL蛋白液于1.5mL离心管中，12000r/min离心10min，吸取0.25mL上清液于试管中，加入0.75mL去离子水稀释，加入4mL双缩脲试剂，充分摇匀后，在室温下放置30min，于波长540nm处测定吸光度。吸取0.25mL不经离心的蛋白液，用同样的方法检测总的蛋白质量浓度。溶解度定义为上清液中蛋白质量浓度与总蛋白质量浓度的比值。

1.3.6 动态光散射分析

将蛋白液用0.1mol/L磷酸盐缓冲溶液(pH7.0)稀释到1mg/mL。采用纳米粒度分析仪测定豌豆分离蛋白的平均粒径大小，测定温度为25℃。

1.3.7 蛋白乳化液贮藏过程中稳定性及黏度的测定

根据朱波[18]的方法制备4种蛋白乳化液并置于37℃烘箱中贮藏，在第1、3、5、7天分别测定乳化液的水层高度；并用药勺挖取上层乳化层，采用NDJ-1旋转式黏度计测定乳化液的表观黏度。

1.3.8 氨基酸组成分析

称取一定量的蛋白于水解管中，加入6mol/L的HCl 8mL，充氮封口后于烘箱中水解24h，取出冷却转移至25mL容量瓶定容，过滤，离心，采用氨基酸分析仪测定氨基酸含量。

1.3.9 蛋白凝胶电泳分析

参照Liu等[19]的还原和非还原方法，稍加改动，12%分离胶，5%浓缩胶，电泳采用1mm凝胶板，电泳样品用上样缓冲液配制成蛋白质量浓度为2mg/mL，沸水加热3min，考马斯亮蓝染色，上样量10μL，开始电泳时电流为20mA，待样品进入分离胶后改为40mA。还原电泳加入*β*-巯基乙醇(*β*-ME)，而非还原电泳不加。

2 结果与分析

2.1 豌豆中酚酸种类的测定

采用反相HPLC法对豌豆中的酚酸进行检测，通过对比多种酚酸标品(槲皮素、阿魏酸、香豆酸、儿茶素、芦丁、龙胆酸、水杨酸、咖啡酸、丁香酸、绿原酸等)的出峰保留时间，确定主要含有的酚酸种类，再通过质谱联用鉴定[20]。HPLC检测图谱见图1。

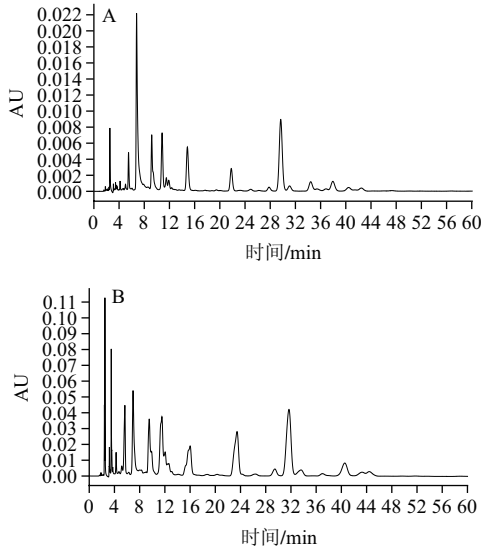


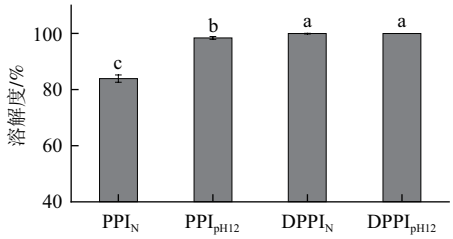
图 1 采用反相HPLC检测70%甲醇提取物(A)和70%丙酮提取物(B)中酚酸的种类

Fig.1 Reverse-phase HPLC profiles of 70% methanol extract (A) and 70% acetone extract (B)

由图1可知，甲醇和丙酮提取物中酚酸物质基本在30min内被洗脱出来，这也说明了豌豆中酚酸主要是亲水性物质，在采用极性洗脱剂时较早被洗脱出来。根据酚酸标品保留时间，并通过质谱联用鉴定，基本可以确定提取物中主要含有龙胆酸(6.9min，$[M-H]^-$153.1)、水杨酸(15.3min，$[M-H]^-$137.1)、香豆酸(23min，$[M-H]^-$163.1)、阿魏酸(31.5min，$[M-H]^-$193.1)。检测结果与Mendez等[21]报道结果相似。各个品种的豌豆中均含有阿魏酸；香豆酸、水杨酸、香草酸仅存在于某些品种中[22]。

2.2 脱酚处理对碱处理PPI溶解性的影响

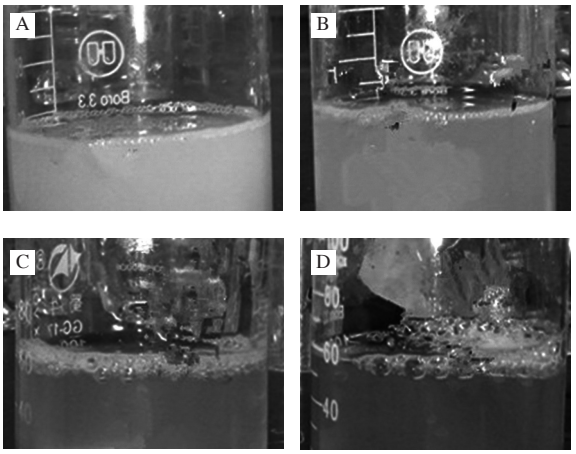
溶解性是食物蛋白质的一个非常重要的物理性质，因为它限制着其他功能特性的发挥。食物体系中，酚类化合物可以游离存在，也可以与蛋白质等物质结合为可溶性复合物存在。因此脱酚处理对于蛋白质的溶解性会产生一定的影响。已有研究表明pH12偏移处理可以明显提高蛋白质溶解度[16]。由图2可知，脱酚处理后的豌豆分离蛋白具有非常好的溶解性，溶解度几乎达到100%，较天然豌豆分离蛋白溶解度增加了18%，与pH12偏移处理后的蛋白溶解度相当。另外，观察这4种处理的蛋白溶解后的溶液现象(图3)，未经过脱酚处理的PPI溶液非常浑浊，经过pH12偏移处理后略为透明；而脱酚处理后的PPI溶液在pH12偏移处理前后均澄清。



PPI_N.未脱酚处理的天然豌豆分离蛋白；PPI_{pH12}.未脱酚处理的pH12改性豌豆分离蛋白；$DPPI_N$.仅经过脱酚处理的豌豆分离蛋白；$DPPI_{pH12}$.经过脱酚处理且pH12改性的豌豆分离蛋白；图3、4同。图中字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

图 2 脱酚处理对碱处理PPI溶解性的影响

Fig.2 Effects of phenol removal and alkali treatment on the solubility of PPI



A.PPI_N；B.PPI_{pH12}；C.$DPPI_N$；D.$DPPI_{pH12}$。

图 3 脱酚和碱处理前后PPI溶液现象

Fig.3 Appearance of PPI subjected to phenol removal and alkali treatment

Siebert等[23]报道了蛋白质与酚类化合物结合会形成可溶性的复合物，进而形成较大的胶粒，即“Haze”现象；不过并不是所有蛋白质都涉及到与酚类物质结合使溶液变浑浊，主要是醇溶蛋白和富含脯氨酸的蛋白质。因此脱酚处理使得蛋白质溶解度大大提高的原因可能有三点：其一，脱酚处理破坏了酚类物质与蛋白质的非共价结合(如氢键、疏水相互作用)，即“Haze”现象得到了抑制破坏，从而蛋白溶液变得澄清；其二，脱酚处理去除了部分蛋白质与酚类物质共价结合的复合物，大颗粒物质减少；其三，脱酚处理过程中有机试剂将一些不溶性蛋白去除。

2.3 脱酚和碱处理对PPI粒径分布的影响

蛋白质的粒径大小对其功能性质有一定的影响，例如乳化性。而酚类物质与蛋白质结合会使得颗粒变大，

溶液变浑浊[23]。而pH12偏移处理会使得蛋白质亚基解离，粒径变小[16]。脱酚处理及碱处理前后PPI粒径分布具体结果见表1。

表1 脱酚和碱处理前后PPI粒径分布具体结果

Table 1 Particle size distribution of PPI modified byphenol removal and alkali treatment

样品	峰数	峰值/nm	峰宽/nm	强度/%	平均粒径/nm	分散指数(PDI)
PPI_N	峰1	1452	466.6	82.4	625.5	0.708
	峰2	129.9	25.96	17.6		
PPI_{pH12}	峰1	185.5	120.1	80.1	93.39	0.495
	峰2	24.02	7.74	15.9		
	峰3	4804	724.7	3.9		
$DPPI_N$	峰1	107.3	19.01	63.6	260.0	0.386
	峰2	17.00	4.483	36.4		
$DPPI_{pH12}$	峰1	24.45	10.95	60.5	98.98	0.972
	峰2	153.2	38.68	36.9		
	峰3	4029	608.2	2.6		

由表1可知，脱酚处理前后的PPI粒径大小差异很大，其原因与溶解性差异原因一样，脱酚处理过程破坏了蛋白间的疏水相互作用，大颗粒不可溶的聚集减少。而这两种蛋白在pH12偏移处理后，均可发生部分亚基解离，使得两种蛋白质粒径减小，且大小基本一样。

2.4 脱酚和碱处理对PPI乳化液贮藏稳定性及黏度的影响

脱酚处理会改变蛋白质间的相互作用和成分，从而影响到其乳化特性；而pH偏移处理会进一步改变蛋白质的三级结构，比较这两种处理对PPI乳化液稳定性的影响对研究蛋白质乳化性具有一定的意义。蛋白质乳化液的稳定性可以通过乳化液在贮藏过程中分层情况以及黏度的变化来反映，结果见图4。

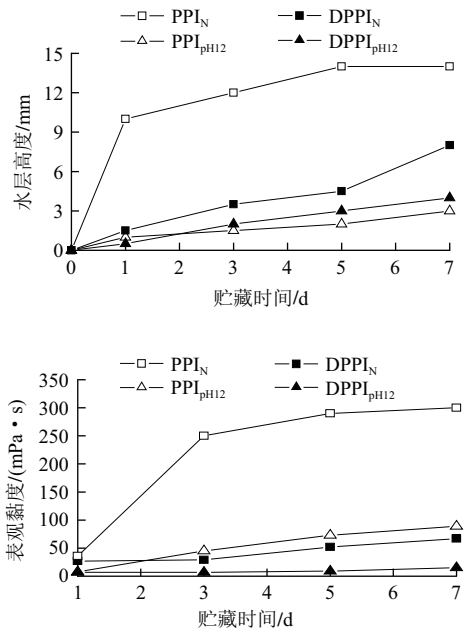


图4 脱酚和碱处理对PPI乳化液贮藏稳定性及黏度的影响

Fig.4 Effects of phenol removal and alkali treatment on the storage stability and viscosity of PPI emulsion

由图4可知，乳化液在贮藏实验中出现分层现象，总体表现为PPI_N的稳定性最差，其次为$DPPI_N$、$DPPI_{pH12}$、PPI_{pH12}；$DPPI_{pH12}$和PPI_{pH12}的差异不大。另外，在贮藏实验中可以发现PPI_{pH12}和$DPPI_{pH12}$的分层差异虽不大，但是PPI_{pH12}乳化液的黏度较高，流动性不好；而在$DPPI_{pH12}$乳化液经过7d贮藏后流动性依旧很好。也表明了pH12偏移处理对蛋白乳化性质的改善比脱酚处理要显著。

2.5 脱酚处理对PPI氨基酸组成的影响

表2 脱酚处理对PPI氨基酸组成的影响

Table 2 Effect of phenol removal on the amino acid composition of PPI

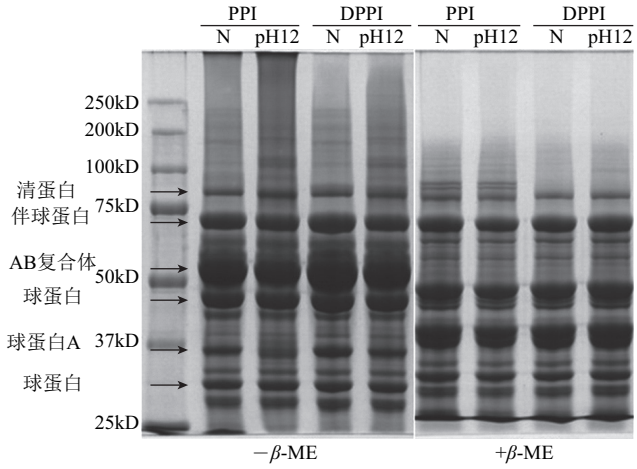
氨基酸	含量/(g/16g N)		
	PPI	DPPI	AE
天冬氨酸(Asp)	11.039	11.183	26.331
谷氨酸(Glu)	20.950	21.923	19.640
丝氨酸(Ser)	4.953	4.781	2.560
组氨酸(His)	2.668	2.744	0.964
甘氨酸(Gly)	3.951	3.791	13.609
苏氨酸(Thr)	3.117	2.926	1.478
精氨酸(Arg)	10.110	10.575	15.831
丙氨酸(Ala)	3.984	3.645	2.221
酪氨酸(Tyr)	3.259	3.319	1.166
半胱氨酸(Cys-s)	0.301	0.240	0.980
缬氨酸(Val)	5.047	4.816	6.722
甲硫氨酸(Met)	0.706	0.489	0.095
苯丙氨酸(Phe)	5.277	5.165	2.903
异亮氨酸(Ile)	4.605	4.494	1.243
亮氨酸(Leu)	8.406	8.253	1.060
赖氨酸(Lys)	7.390	7.291	1.034
脯氨酸(Pro)	4.240	4.365	2.164

对脱酚前后的蛋白质以及丙酮提取物中的少部分蛋白质进行氨基酸组成分析。由表2可知，豌豆分离蛋白的氨基酸组成中，谷氨酸、天冬氨酸、精氨酸、亮氨酸、赖氨酸含量较高，含硫氨基酸蛋氨酸和半胱氨酸含量最少。相似的研究Siebert等[23]也有报道，儿茶酚和多肽的混合液中发现，谷氨酸、精氨酸容易与酚结合形成沉淀。与未脱酚处理的豌豆分离蛋白相比较，脱酚处理后的豌豆分离蛋白氨基酸组成比例并没有发生明显变化，这说明脱酚处理不会破坏PPI氨基酸组成。这与Sripad等[24]报道的一致。而从丙酮提取物中的少量蛋白质的氨基酸组成可以看出，所提取出来的蛋白质含有较多含侧链氨基的精氨酸，以及含巯基的半胱氨酸。

2.6 脱酚和碱处理PPI的SDS-PAGE分析

采用SDS-PAGE分析了脱酚处理及pH12偏移处理前后的PPI结构变化[25]，包括二硫键生成所产生的聚集和各亚基的解离、丢失等。电泳样品分两批：加β-ME(+β-ME)和不加β-ME(−β-ME)的。具体结果见图5。当脱酚处理前的PPI_N中不含β-ME时，经过pH12改性处理后，可以观察到浓缩胶顶部有聚集物，比较+β-ME、−β-ME结果可知，这些大分子聚集体是由于豌豆球蛋白的二硫键共价

聚集产生的[16]。当样品中加入β-ME时，浓缩胶顶部的大分子聚集物完全解离成11S的A和B亚基。脱酚处理后的豌豆分离蛋白$DPPI_N$在pH12改性前后，浓缩胶顶部基本不含大分子聚集体。这说明了脱酚过程，去除了蛋白质中的一些大分子聚合物。



N．为未经处理的自然组。

图5 脱酚和碱处理PPI的非还原(−β)和还原(+β)电泳图

Fig.5 SDS-PAGE analysis of PPI modified by phenol removal and alkali treatment

在还原型(+β)电泳图中，可以发现PPI在90kD处有两条明显的条带，而DPPI样品未显示。这是PPI中大分子蛋白聚合物在β-ME作用下，亚基解离造成的；脱酚处理后的DPPI的氨基酸成分中，含有巯基的半胱氨酸含量减少。这也可能是pH12偏移处理对DPPI性质影响较小的原因之一。

3 结 论

本实验研究了脱酚处理对豌豆分离蛋白基本功能性质的影响。与碱处理[16]对照，碱处理对蛋白乳化性质的提高可以和脱粉处理相媲美。通过HPLC内标法，检测出豌豆中主要含有的酚酸是龙胆酸、水杨酸、香豆酸和阿魏酸。研究表明豌豆分离蛋白经碱处理以后，功能性质会得到显著的改善。仅脱酚处理后的豌豆分离蛋白平均粒径减小，溶解度增加，形成的乳化液贮藏稳定性较好，适合较长时间贮藏。这可能是在植物种子体系中，酚类物质与蛋白质结合形成大颗粒的复合物，改变蛋白质间的疏水相互作用等作用。同时发现脱酚前后豌豆分离蛋白在经过碱处理后，性质基本一致。间接说明了与脱酚处理相比，碱处理对豌豆分离蛋白的基本性质的改善较显著。

通过氨基酸组成和凝胶电泳分析，脱酚处理不会破坏蛋白质的氨基酸组成，多酚提取物中的蛋白质含有较多含侧链氨基的精氨酸，以及含巯基的半胱氨酸。蛋白质的亚基发生了一定的变化，这也是碱处理对DPPI性质影响较小的原因之一。该研究确定了脱酚和碱处理对豌豆分离蛋白基本功能性质改善，为继续研究酚类物质在蛋白体系中的抗氧化行为提供一定的理论基础。

参考文献：

[1] TÖMÖSKÖZI S, LÁSZTITY R, HARASZI R, et al. Isolation and study of the functional properties of pea proteins[J]. Die Nahrung, 2001, 45(5): 399-401.

[2] 郭兴凤, 莫重文. 豌豆蛋白粉的制取研究[J]. 郑州粮油学院学报, 1995, 16(3): 70-73.

[3] 李宝艳, 万端极. 超滤膜法制备豌豆蛋白的工艺[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(10): 75-77.

[4] CSERHALMI Z, CZUKOR B, GAJZÁGÓ S I. Emulsifying properties, surface hydrophobicity and thermal denaturation of pea protein fractions[J]. Acta Alimentaria, 1998, 27(4): 357-363.

[5] 郭新竹, 宁正祥. 天然酚类化合物及其保健作用[J]. 食品工业, 2002, 23(3): 28-29.

[6] 赵扬帆, 郑宝东. 植物多酚类物质及其功能学研究进展[J]. 福建轻纺, 2006(11): 107-110.

[7] HOROWITZ R M, BRUNO G. Taste and structure in phenolic glycosides[J]. J Agric Food Chem, 1969, 17(4): 696-700.

[8] SINGLETON V L, KRATZER F H. Toxicity and related physiological activity of phenolic substances of plant origin[J]. J Agric Food Chem, 1969, 17(3): 497-512.

[9] 陈红惠, 吕静, 彭郦, 等. 雪莲果叶中多酚的提取工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 88-91.

[10] XU L, DIOSADY L L. Removal of phenolic compounds in the production of high-quality canola protein isolates[J]. Food Research International, 2002, 35(1): 23-30.

[11] OU S Y, WANG Y, TANG S Z, et al. Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate[J]. Journal of Food Engineering, 2005, 70(2): 205-210.

[12] JONGBERG S, LUND M N, WATERHOUS A L, et al. 4-Methylcatechol inhibits protein oxidation in meat but not disulfide formation[J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(8): 10329-10335.

[13] TSAI P J, SHE C H. Significance of phenol-protein interactions in modifying the antioxidant capacity of peas[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(22): 8491-8494.

[14] AGBOOLA S O, MOFOLASAYO O A, WATTS B M, et al. Functional properties of yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed flours and the vitro bioactive properties of their polyphenols[J]. Food Research International, 2010, 43(2): 582-588.

[15] RAMIREZ-SUAREZ J C, XIONG Y L. Effect of transglutaminase-induced cross-linking on gelation of myofibrillar/soy protein mixtures[J]. Meat Science, 2003, 65(2): 899-907.

[16] 蒋将. pH偏移处理诱导熔球态大豆蛋白的结构变化及功能性质的改善[D]. 无锡: 江南大学, 2011: 43-54.

[17] MICHALSKA A. Antioxidant contents and antioxidative properties of traditional rye breads[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(3): 734-740.

[18] 朱波. 三种不同脂肪酸组成的油脂乳化液的理化性质研究[J]. 食品工业科技, 2013, 14(1): 103-107.

[19] LIU G, XIONG Y L. Electrophoretic pattern, thermal denaturation, and *in vitro* digestibility of oxidized myosin[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(3): 624-630.

[20] BRAVO L, GOYA L, LECUMBERRI E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages[J]. Food Research International, 2007, 40(3): 393-405.

[21] MENDEZ J, LOJO M I. Phenolic and indole constituents of edible peas[J]. J Food Sci, 1971, 36(6): 871-872.

[22] SOSULSKI F W, DABROWSKI K J. Composition of free and hydrolyzable phenolic acids in the flours and hulls of ten legume species[J]. J Agric Food Chem, 1984, 32(1): 131-133.

[23] SIEBERT K J, TROUKHANOVA N V, LYNN P Y. Nature of polyphenol-protein interactions[J]. J Agric Food Chem, 1996, 44(1): 80-85.

[24] SRIPAD G, RAO M S N. Effect of methods to remove polyphenols from sunflower meal on the physicochemical properties of the proteins[J]. J Agric Food Chem, 1987, 35(6): 962-967.

[25] BARAC M, CABRILO S, PESIC M, et al. Profile and functional properties of seed proteins from six pea (*Pisum sativum*) genotypes[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(12): 4973-4990.