

水剂法提取油茶籽油形成的乳化液中蛋白的分离及其结构表征

杨建远^{1,2}, 周凯¹, 杨义文¹, 杨云仙³, 张炳火¹, 查代明¹, 邓泽元²

(1. 九江学院 药学与生命科学学院, 江西 九江 332000; 2. 南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047; 3. 九江学院 旅游与地理学院, 江西 九江 332005)

摘要:水剂法提取油茶籽油时产生严重的乳化,是制约其应用的“瓶颈”。为明确其乳化液产生机制,对水剂法提取油茶籽油产生的乳化液中主要蛋白进行了分离与结构表征。结果表明:提取的粗蛋白在 pH 2.0、4.0、6.0、8.0 和 pH 10.0 条件下均表现优良的乳化特性;经初步纯化的蛋白组分(PEP)主要为 7 个分子质量为 10~35 kDa 的条带,其中 13 kDa 蛋白最多;PEP 中谷氨酸、精氨酸和天冬氨酸含量较高,分别为(40.36±0.14)%、(14.51±0.09)%、(7.74±0.03)%;二级结构中 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲含量分别为 25.71%、31.55%、19.07% 和 23.83%,其中 β -折叠含量最高;PEP 溶液具有较高的内源荧光强度和表面疏水性。推测 PEP 为水剂法提取油茶籽油过程中乳化液形成的重要因素之一。

关键词:水剂法;油茶籽油;乳化液;蛋白;结构特征

中图分类号:TS224.4;TS227 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2022)05-0054-06

Structural characteristics of proteins derived from the emulsion formed during aqueous extraction of oil – tea camellia seed oil

YANG Jianyuan^{1,2}, ZHOU Kai¹, YANG Yiwen¹, YANG Yunxian³,
ZHANG Binghuo¹, ZHA Daiming¹, DENG Zeyuan²

(1. College of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang 332000, Jiangxi, China;
2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University,
Nanchang 330047, China; 3. College of Tourism and Geography,
Jiujiang University, Jiujiang 332005, Jiangxi, China)

Abstract: It is unavoidable emulsification in the process of aqueous extraction of oil – tea camellia seed oil. To explore the generative mechanism of emulsion, the proteins in the oil – tea camellia seed oil emulsion were separated and its structural characteristics was investigated. The results showed that the crude proteins separated from the emulsion had excellent emulsifying properties at pH 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 and pH 10.0. The purified proteins(PEP) were seven major subunits/proteins with a molecular weight arranged from 10 kDa to 35 kDa, among them, the 13 kDa protein was the most. The PEP was rich in Glu, Arg and Asp, and their contents were (40.36±0.14)%, (14.51±0.09)% and (7.74±0.03)%, respectively. The contents of α -helix, β -folded, β -corner and random coil in PEP were 25.71%, 31.55%, 19.07% and 23.83%, respectively, among which the content of β -folded was the

收稿日期:2021-05-06;修回日期:2022-01-01

基金项目:国家自然科学基金地区项目(31560464);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ211809)

作者简介:杨建远(1979),男,副教授,博士,研究方向为食品生物技术与食品营养(E-mail)yjy731@sohu.com。

通信作者:邓泽元,教授,博士(E-mail)dengzy@ncu.edu.cn。

most. Moreover, the solution of PEP exhibited a high endogenous fluorescence intensity and surface hydrophobicity. It is hypothesized that the PEP is one of the important factors in the formation of emulsion during the extraction of oil – tea camellia seed oil by aqueous method.

Key words: aqueous extraction; oil – tea camellia seed oil; emulsion; protein; structural characteristics

水剂法是一种“安全、营养、经济”的提油方法,具有工艺简单、条件温和、营养伴随物基本得以保留及可有效利用饼粕等优点^[1]。然而,乳化问题是制约水剂法提取油茶籽油工业化应用的“瓶颈”^[2],并且水剂法提取油茶籽油时产生的乳化液难以在提油工艺中有效破乳^[3]。

蛋白是一种双亲性大分子,易吸附于油水界面,通常具有一定的界面活性和胶体稳定性,被广泛用作乳化剂和稳定剂。研究表明,大多数油料种子蛋白具有乳化特性,如从大豆^[4]、葵花籽^[5]、油莎豆^[6]等提取的蛋白都具有较好的乳化活性。然而,蛋白乳化性的强弱很大程度上取决于其氨基酸组成、疏水性和二级结构等结构特性^[7]。豆类蛋白二级结构中 β -折叠含量高于谷类蛋白,而 α -螺旋含量低于谷类蛋白,豆类蛋白乳化性及乳化稳定性强于谷类蛋白^[8]。大豆-乳清混合蛋白(SPI-WPI)经超声处理可使其二级结构及构象发生一定的改变,导致其 α -螺旋含量降低, β -转角含量增加,分子结构更加舒展,疏水基团暴露,乳化活性提高^[9]。紫苏籽球蛋白、清蛋白和分离蛋白中氨基酸含量以谷氨酸最高,蛋白溶解性以球蛋白最好^[10]。因此,不同蛋白乳化能力的差异取决于蛋白自身结构^[11]。

蛋白、茶皂素和多糖等可能是水剂法提取油茶籽油过程中产生的乳化液中的主要乳化剂成分,其中蛋白含量占脱脂冻干乳化物的13.75%^[12]。从油茶籽饼粕中提取的蛋白具有较好的起泡性和乳化性,而且经不同的蛋白酶水解处理,其起泡性和乳化性可得以改善^[13]。本文对水剂法提取油茶籽油过程中形成的乳化液的主要蛋白组分进行分离纯化,探讨与乳化相关的结构特征,旨在阐明水剂法提取油茶籽油时乳化液形成机制及为其破乳提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

油茶籽,江西绿源油脂公司;DEAE-Sephrose Fast Flow柱,GE Healthcare Bioscience;考马斯亮蓝R250,上海化学试剂公司;SDS-PAGE试剂盒,碧云天生物公司;8-苯胺-1-萘磺酸钠(ANS),阿拉丁试剂公司。

F97Pro 荧光光度计,上海棱光公司;S-433d 氨基酸分析仪,Sykam 公司;Nicolet 5700 傅里叶变换-红外光谱仪,美国热电公司;K1100 全自动定氮仪,海能科技公司;Ultra Turrax T18 高速分散机,美国 IKA 公司;JMS-50 胶体磨,廊坊通用机械公司。

1.2 实验方法

1.2.1 乳化液中粗蛋白的提取^[14]

油茶籽经干燥、剥壳、粉碎及过筛处理,加4倍量的蒸馏水混匀,经胶体磨匀浆,静置待上层泡沫消失后,以4 200 r/min 离心 20 min,收集乳化液层。反复冻融离心去除乳化液中油脂,将残渣冻干,经乙醚浸泡后过滤脱脂2~3次,获得脱脂乳化物。

称取一定量的脱脂乳化物于锥形瓶中,按料液比1:20加入90%乙醇溶液,30℃水浴120 r/min下振荡30 min,以4 200 r/min 离心 20 min,取沉淀,提取2次。再以初始样品质量为基准,按料液比1:30加入pH 8.0的0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液,37℃摇床水浴60 min,离心,收集上清,沉淀重提1次,合并上清得蛋白粗提液。调pH至4.0,4℃冰箱静置2 h,离心收集沉淀,取少量蒸馏水洗涤2次,超纯水溶解,调pH至7.0,冻干,得粗蛋白。

1.2.2 粗蛋白乳化性的测定

1.2.2.1 乳液的制备^[14]

采用pH 7.0的0.02 mol/L磷酸盐缓冲液配制1%的粗蛋白溶液(含0.02%的叠氮钠)。分别取24 mL粗蛋白溶液,用0.5 mol/L HCl或NaOH调节pH分别至2.0、4.0、6.0、8.0、10.0和12.0,用高速分散机于14 000 r/min下慢慢加入一定质量的油茶籽油,使油茶籽油质量分数为20%,当油茶籽油完全被乳化后,以11 000 r/min的速度分散2 min,再经简单乳化装置(专利号:ZL201620355811.8)均质10次,得乳液。

1.2.2.2 乳液稳定性及微观结构的观察

分别取8.0 mL乳液分装于比色管中,静置观察10 d后,取少量分散乳液用相应pH的缓冲液稀释50倍,取50 μ L稀释乳液于凹槽载玻片上,盖上盖玻片,用荧光倒置显微镜观察微观结构,并拍照。

1.2.3 粗蛋白的初步纯化

用pH 8.0的0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液配制20 mg/mL的粗蛋白溶液,并上样吸附于DEAE-Sephrose Fast Flow柱,分别用含0.0、0.2、0.4、0.6、0.8 mol/L NaCl的pH 8.0的0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液分步洗脱,以每管8 mL自动收集洗脱液,采用Bradford法测定洗脱液中蛋白峰,收集合并蛋白峰,并用10 kDa超滤膜浓缩,冻干,获得初步纯化的蛋白组分(PEP),采用凯氏定氮法测定PEP中蛋白质含量。

1.2.4 SDS - PAGE 分析

参照文献[15]和 SDS - PAGE 试剂盒进行 SDS - PAGE 分析。

1.2.5 氨基酸含量分析

参考 Yin 等^[16]的方法略作修改。称取 20 ~ 30 mg PEP 样品于安瓿管,加 10 mL 6 mol/L HCl 溶液、1.0 g 苯酚,通氮气,110 °C 水解 24 h,冷却定容,取适量水解样品水浴挥干,用 1.0 mL 0.1 mol/L HCl (pH 2.2)溶解,过 0.22 μm 滤膜,待氨基酸分析仪分析。

1.2.6 内源荧光强度(FI)的测定^[17]

称取 PEP 样品溶于 pH 7.0 的 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液中,使 PEP 质量浓度为 100 μg/mL,采用荧光光度计测定其 FI。测定条件:狭缝宽度 10 nm,激发波长 280 nm,发射波长 295 ~ 400 nm。

1.2.7 表面疏水性(S_0)的测定^[18]

用 pH 7.0 的 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液配制 PEP 质量浓度分别为 0.50、0.25、0.13、0.03 mg/mL 的样品溶液,分别取 3 mL 样品溶液,各加入 20 μL 8.0 mmol/L ANS 溶液,搅匀,暗处静置 15 min 后,室温下采用荧光光度计测定其荧光强度。测定条件:激发波长和发射波长分别为 390、470 nm,狭缝宽度 10 nm。样品质量浓度与荧光强度直线方程的斜率即为 S_0 。

1.2.8 二级结构分析

采用傅里叶变换 - 红外光谱 (FTIR) 预测蛋白二级结构,PEP 样品处理参照 Kang 等^[19]的方法。样

品蛋白冻干粉用 KBr 粉高压制样,扫描范围 4 000 ~ 400 cm^{-1} 。酰胺 I 带光谱(1 600 ~ 1 700 cm^{-1})段内蛋白利用 Omnic 和 PeakFit 软件分析二级结构。

1.2.9 数据分析

利用 Origin 8.0 软件作图,数据以“平均值 ± 标准偏差”表示。

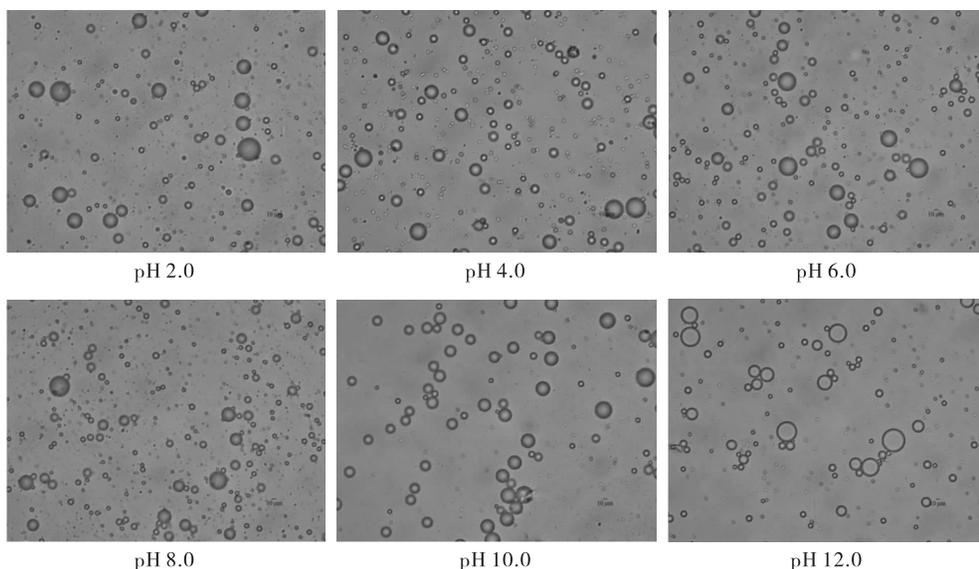
2 结果与分析

2.1 粗蛋白乳化性的初步观察

按 1.2.2.1 方法制备乳液,发现不同 pH 条件均能形成包油量为 20% 的乳液且不同 pH 条件下的乳液随着观察时间的延长,均出现向上漂浮的现象,这可能是乳化包油量较大均质不充分所致。静置 10 d 后,pH 12.0 的乳液出现部分乳粒破乳现象,其乳液上层可见少量油析出。

显微镜下观察静置 10 d 的乳液微观结构,发现 pH 2.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0 的乳液均为较稳定的大小不均一的乳液粒子,仅有 pH 12.0 的乳液出现油粒(见图 1)。

因此,从乳化液中提取的粗蛋白在 pH 2.0 ~ 10.0 范围条件下均具有较强的乳化活性和乳化稳定性。pH 的变化可能改变了溶液中蛋白质的构象,导致其亲水性基团(水结合位点)的暴露或包埋,从而改变其亲水亲脂平衡^[20]。当 pH 增加至 12.0 时,很可能由于蛋白质氨基酸基团的离子化,其亲水性增加,从而亲水亲脂平衡被改变,蛋白在油水界面的亲油能力减弱,导致乳粒的包油稳定能力下降。因此,pH 12.0 条件下的乳液长时间储存后出现了油析现象。



注:目镜 10 倍,物镜 40 倍,标尺 10 μm。

图 1 不同 pH 条件下的乳液室温储存 10 d 的微观结构

2.2 粗蛋白的初步纯化

将 1.2.1 提取的粗蛋白按 1.2.3 方法采用

pH 8.0 的 0.02 mol/L Tris - HCl 缓冲液溶解,上 DEAE - Sepharose Fast Flow 柱吸附,经不同 NaCl 含

量的 Tris - HCl 缓冲液洗脱,发现在含 0.6 mol/L NaCl 的 pH 8.0 的 0.02 mol/L Tris - HCl 缓冲液洗脱时获得 PEP 洗脱峰,测得其蛋白质含量为 $(84.78 \pm 5.57)\%$ 。

2.3 SDS - PAGE 分析

PEP 的 SDS - PAGE 分析结果见图 2。由图 2 可知,PEP 中的蛋白质分子质量集中于 10 ~ 35 kDa 之间,主要为 13、15、16、17、21、25 kDa 和 35 kDa 7 个蛋白条带,其中分子质量 13 kDa 蛋白的含量最高。

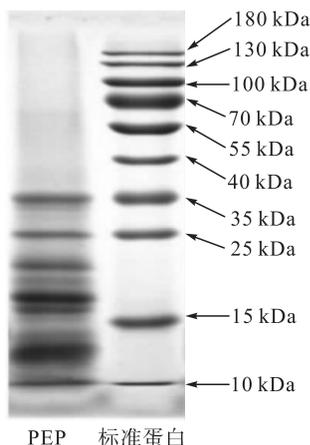


图 2 PEP 的 SDS - PAGE 图谱

2.4 氨基酸组成

PEP 的氨基酸组成及含量测定结果见表 1。

表 1 PEP 的氨基酸组成及含量

氨基酸	含量/%
Asp [△]	7.74 ± 0.03
Thr [#]	0.61 ± 0.02
Ser [#]	2.82 ± 0.02
Glu [△]	40.36 ± 0.14
Gly [#]	2.49 ± 0.02
Ala [*]	3.70 ± 0.05
Cys [#]	4.06 ± 0.16
Val [*]	1.01 ± 0.03
Met [*]	3.19 ± 0.06
Ile [*]	1.80 ± 0.03
Leu [*]	6.01 ± 0.04
Tyr [#]	1.65 ± 0.07
Phe [*]	2.39 ± 0.04
His [▲]	2.85 ± 0.08
Lys [▲]	3.91 ± 0.00
Arg [▲]	14.51 ± 0.09
Pro [*]	0.90 ± 0.07
酸性氨基酸	48.10 ± 0.11
碱性氨基酸	21.27 ± 0.04
不带电荷的极性氨基酸	11.62 ± 0.05
非极性氨基酸	19.00 ± 0.05

注:△为酸性氨基酸,▲为碱性氨基酸,#为不带电荷的极性氨基酸,*为非极性氨基酸。

由表 1 可知:PEP 中酸性、碱性、不带电荷的极性氨基酸和非极性氨基酸含量分别为 $(48.10 \pm 0.11)\%$ 、 $(21.27 \pm 0.04)\%$ 、 $(11.62 \pm 0.05)\%$ 和 $(19.00 \pm 0.05)\%$ 。其中,谷氨酸含量高达 $(40.36 \pm 0.14)\%$,精氨酸含量和天冬氨酸含量分别为 $(14.51 \pm 0.09)\%$ 和 $(7.74 \pm 0.03)\%$ 。

2.5 内源荧光强度和表面疏水性

蛋白溶液的内源荧光强弱能体现蛋白分子表面疏水基团的信息,通常用于蛋白构象特征的表达^[21]。PEP 内源荧光强度分析结果如图 3 所示。由图 3 可知,PEP 的最大荧光强度 (F_{\max}) 为 674.1,高于菜籽蛋白中乳化性白蛋白、球蛋白和分离蛋白在 pH 4.0 ~ 9.0 间的 F_{\max} 值(7.9 ~ 62.1)^[22]。这是由于 PEP 表面的疏水基团易于引起蛋白之间更好的交互作用,能更容易在油水界面上形成分子排布的保护性层^[23]。

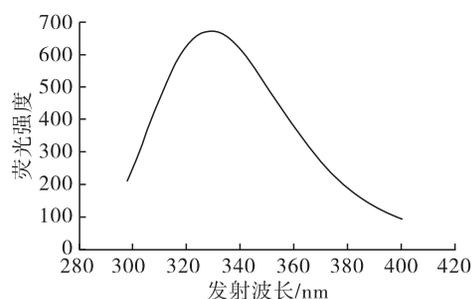


图 3 PEP 内源荧光强度 (FI) 光谱图

S_0 体现蛋白分散吸附于油水界面能力^[24]。经测定,PEP 的 S_0 值为 $2\ 243.70 \pm 169.28$ ($R^2 = 0.982$),稍高于木通子中的白蛋白与谷蛋白^[25]。可见,PEP 较高的表面疏水性有利于蛋白的乳化活性和乳化稳定性。

2.6 二级结构的预测

PEP 的傅里叶变换 - 红外光谱图如图 4 所示。

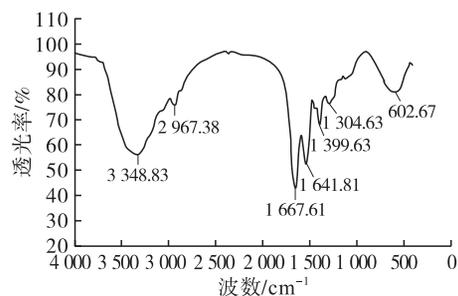


图 4 PEP 的傅里叶变换 - 红外光谱图

由图 4 可知,2 967 cm^{-1} 处为不对称 -CH₃ 拉伸振动,酰胺区特征振动光谱 1 304 cm^{-1} 处为 N-H 和 C-N 弯曲,1 641 cm^{-1} 处为 C-N 伸缩弯曲,1 667 cm^{-1} 处为 C=O 伸缩,3 348 cm^{-1} 处为 N-H

伸缩。1 600~1 700 cm^{-1} 各区域谱带振动频率对应其二级结构^[26]。酰胺 I 带 1 610~1 640 cm^{-1} 、1 640~1 650 cm^{-1} 、1 650~1 658 cm^{-1} 和 1 660~1 700 cm^{-1} 红外光谱区段分别对应蛋白分子结构的 β -折叠、无规卷曲、 α -螺旋和 β -转角^[27]。经分析,PEP 中 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲含量分别为 25.71%、31.55%、19.07%和 23.83%,其中 β -折叠含量最高。

3 讨论

3.1 乳化液中蛋白的乳化性

从水剂法提取油茶籽油过程中形成的乳化液中分离得到的粗蛋白乳化活性很强,仅以高速分散机简单均质便可在 pH 2.0~12.0 条件下形成包油量达 20% 的水包油型乳液,室温下储存 10 d 仅见 pH 12.0 条件下形成的乳液出现油析现象,这可能是蛋白在强碱性条件下乳化能力减弱,形成的乳粒表面蛋白保护层难以长时间维持高达 20% 的包油量所致。

3.2 乳化液中蛋白的结构特性

3.2.1 乳化液中蛋白的组成

粗蛋白经 DEAE-Sephrose Fast Flow 柱初步纯化时,含 0.6 mol/L NaCl 的 pH 8.0 的 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液洗脱时获得唯一主要蛋白洗脱峰,PEP 为完整的纯化乳化蛋白组分,SDS-PAGE 分析表明,PEP 主要为含有 7 个分子质量的蛋白条带的混合蛋白,分子质量范围为 10~35 kDa。油体蛋白具有双亲性分子结构,在油水两相存在的混合物中容易发生乳化,是广泛存在于植物种子中的一种天然乳化性蛋白^[28]。多数含油种子中乳化性油体蛋白多为分子质量较小的亚型,如:大豆有 1 种 16 kDa,3 种 18 kDa,3 种 24 kDa 的油体蛋白亚型^[29];花生有 14、16、18 kDa 3 种油体蛋白亚型^[30];油茶籽有 5 种油体蛋白亚型,包括 3 种高分子(H)亚型(Ole I、Ole IV 和 Ole V),2 种低分子(L)亚型(Ole II 和 Ole III)^[31]。PEP 中的几个分子质量相近的蛋白条带是否为油茶籽中主要乳化性的油体蛋白相关亚型值得进一步鉴定。

3.2.2 乳化性蛋白的结构特征

PEP 中二级结构含量高低顺序为 β -折叠、 α -螺旋、无规卷曲和 β -转角。蛋白二级结构与表面疏水性具有相关性,Chen 等^[27]报道大豆蛋白表面疏水性与 α -螺旋含量呈负相关,与 β -折叠和无规卷曲呈正相关。PEP 中 β -折叠含量达 31.55%,谷氨酸、精氨酸和天冬氨酸含量高,其溶液最大荧光强

度为 674.1, S_0 值高达 $2\ 243.70 \pm 169.28$ 。可见,PEP 中二级结构、氨基酸组成等有利于蛋白表面疏水性及其乳化特性。

4 结论

水剂法提取油茶籽油形成的乳化液中乳化性粗蛋白组分经高速分散与均质,在不同 pH 条件下均能形成包油量达 20% 的乳液。经初步纯化后得到的蛋白组分 PEP 包括 7 个主要蛋白条带的混合蛋白,分子质量范围为 10~35 kDa,其中分子质量 13 kDa 蛋白的含量最高。PEP 具有较多的有利于乳化的结构特征,如:蛋白二级结构中 β -折叠、无规卷曲含量相对较高,氨基酸组成中谷氨酸、精氨酸和天冬氨酸含量高,同时,蛋白溶液具有较高的内源荧光强度和表面疏水性结构特征。推测蛋白组分 PEP 为水剂法提取油茶籽油过程中乳化液形成的重要因素之一。

参考文献:

- [1] TABTBAEI S, DIOSADY L L. Aqueous and enzymatic extraction processes for the production of food-grade proteins and industrial oil from dehulled yellow mustard flour[J]. *Food Res Int*, 2013, 52(2): 547-556.
- [2] 李依娜,钟海雁. 油茶籽油的水代法提取工艺研究及品质分析[J]. *食品与机械*, 2010, 26(2): 139-142.
- [3] YUSOFF M M, GORDON M H, NIRANJAN K. Aqueous enzyme assisted oil extraction from oilseeds and emulsion de-emulsifying methods: a review[J]. *Trends Food Sci Technol*, 2015, 41(1): 60-82.
- [4] WANG C, WANG X, LIU C Y, et al. Application of LF-NMR to the characterization of camellia oil-loaded pickering emulsion fabricated by soy protein isolate [J/OL]. *Food Hydrocolloid*, 2021, 112:106329[2021-05-06]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106329>.
- [5] 杨希,武爱群. 葵花籽蛋白水解物对水包油型乳状液物理和氧化稳定性的影响[J]. *中国油脂*, 2021, 46(1): 57-60.
- [6] 王琳,周国卫,于志超,等. pH 值偏移处理对油莎豆蛋白结构及乳化性质的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(22): 34-41.
- [7] SHARIF H R, WILLIAMS P A, SHARIF M K, et al. Current progress in the utilization of native and modified legume proteins as emulsifiers and encapsulants: a review [J]. *Food Hydrocolloid*, 2018, 76: 2-16.
- [8] CARBONARO M, MASELLI P, NUCARA A. Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study[J]. *Amino Acids*, 2012, 43(2): 911-921.

- [9] 王喜波,王琳,周国卫,等. 超声时间对大豆-乳清混合蛋白结构及乳化性质的影响[J]. 农业机械学报,2020,51(8):358-363.
- [10] 刘宁,赵佳,武选民,等. 紫苏籽中不同蛋白组分的功能性质研究[J]. 中国油脂,2019,44(6):45-49.
- [11] O'SULLIVAN J, MURRAY B, FLYNN C, et al. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins[J]. Food Hydrocolloid, 2016, 53: 141-154.
- [12] YANG J Y, LI J, WANG M, et al. A novel aqueous extraction for camellia oil by emulsified oil: a frozen/thawed method[J/OL]. Eur J Lipid Sci Technol, 2019, 121(4):1800431 [2021-05-06]. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800431>.
- [13] LI X, DENG J L, SHEN S, et al. Antioxidant activities and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from defatted *Camellia oleifera* seed cake[J]. J Food Sci Technol, 2015, 52(9): 5681-5690.
- [14] 杨建远. 水法提取茶油过程中天然组分乳化机制及破乳提油技术的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- [15] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [16] YIN S W, HUANG K L, TANG C H, et al. Surface charge and conformational properties of phaseolin, the major globulin in red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L): effect of pH [J]. Int J Food Sci Technol, 2011, 46(8): 1628-1635.
- [17] AGBOOLA S O, ALUKO R E. Isolation and structural properties of the major protein fraction in Australian wattle seed (*Acacia victoriae* Bentham)[J]. Food Chem, 2009, 115(4): 1187-1193.
- [18] KARNIK D, JUNG J, HAWKING S, et al. Sugar beet pectin fractionated using isopropanol differs in galacturonic acid, protein, ferulic acid and surface hydrophobicity [J]. Food Hydrocolloid, 2016, 60: 179-185.
- [19] KANG D C, ZOU Y H, CHENG Y P, et al. Effects of power ultrasound on oxidation and structure of beef proteins during curing processing [J]. Ultrason Sonochem, 2016, 33: 47-53.
- [20] BENELHADJ S, GHARSALLAOUI A, DEGRAEVE P, et al. Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* protein isolate [J]. Food Chem, 2016,194:1056-1063.
- [21] AROGUNDADE L A, MU T H, AKINHANMI T F. Structural, physicochemical and interfacial stabilisation properties of ultrafiltered African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) protein isolate compared with those of isoelectric protein isolate[J]. LWT - Food Sci Technol, 2016, 69: 400-408.
- [22] TAN S H, MAILER R J, BLANCHARD C L, et al. Emulsifying properties of proteins extracted from Australian canola meal[J]. LWT - Food Sci Technol, 2014, 57(1): 376-382.
- [23] WASSWA J, TANG J, GU X H. Functional properties of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), Nile perch (*Lates niloticus*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin hydrolysates [J]. Int J Food Prop, 2008, 11(2): 339-350.
- [24] CHANDRAPALA J, ZISU B, PALMER M, et al. Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate[J]. Ultrason Sonochem, 2011, 18(5): 951-957.
- [25] DU Y, JIANG Y, ZHU X, et al. Physicochemical and functional properties of the protein isolate and major fractions prepared from *Akebia trifoliata* var. *australis* seed [J]. Food Chem, 2012, 133(3): 923-929.
- [26] KONG J L, YU S N. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures[J]. Acta Bioch Bioph Sin, 2007, 39(8): 549-559.
- [27] CHEN W, JIANG L, WEI D, et al. Effect of secondary structure determined by FTIR spectra on surface hydrophobicity of soybean protein isolate[J]. Sci Technol Food Ind, 2011, 15(1): 4819-4827.
- [28] DELEU M, VACA M G, FABRE J F, et al. Interfacial properties of oleosins and phospholipids from rapeseed for the stability of oil bodies in aqueous medium[J]. Colloid Surf B, 2010, 80(2): 125-132.
- [29] CAO Y, ZHAO L, YING Y, et al. The characterization of soybean oil body integral oleosin isoforms and the effects of alkaline pH on them[J]. Food Chem, 2015, 177: 288-294.
- [30] CABANOS C, KATAYAMA H, TANAKA A, et al. Expression and purification of peanut oleosins in insect cells[J]. Protein J, 2011, 30(7): 457-463.
- [31] 仇健. 油茶种子油体蛋白基因的分离克隆及其原核表达[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2006.