

超声波辅助低共熔溶剂提取对咖啡蛋白结构和功能特性的影响

苏 璋^{1,2}, 胡发广³, 于鑫欣^{2,4,5}, 李贵平³, 付兴飞³, 夏光华^{1*}, 董文江^{2,4,5*}

1. 海南大学食品科学与工程学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南万宁 571533; 3. 云南省农业科学院热带亚热带经济作物研究所, 云南保山 678025; 4. 海南省特色热带作物加工适宜性与品质控制重点实验室, 海南万宁 571533; 5. 国家重要热带作物工程技术研究中心, 海南海口 571101

摘 要: 为探索咖啡蛋白在食品加工中的应用, 以脱脂生咖啡粉为原料, 探究不同超声波功率 (0、200、400、600、800 W) 与低共熔溶剂法、碱法协同作用对咖啡蛋白组成成分 (聚丙烯酰胺凝胶电泳, SDS-PAGE)、结构特性 (粒径分布、傅里叶红外光谱、圆二色光谱、荧光光谱和扫描电镜) 和功能特性 (溶解度、吸水性、吸油性和乳化特性) 的影响。结果表明: 由低共熔溶剂提取的咖啡蛋白 (DES) 平均粒径 (12.30 μm) 显著小于由碱法提取的咖啡蛋白 (AEP) 平均粒径 (113.67 μm); DES 在酸性条件下溶解度更高, AEP 在碱性条件下溶解度更高; DES 比 AEP 有更好的吸水性和吸油性。经超声预处理后, 咖啡蛋白电泳图谱、傅里叶红外光谱、圆二色光谱和荧光光谱结果分析表明, 不同超声波功率预处理未引起蛋白质分子量分布的重大变化, 但是对蛋白质的二级结构和三级结构产生影响。表面微观结构表明, DES 表面结构较疏松多孔, AEP 表面紧密平坦, 超声预处理后 AEP 微观结构变得疏松多孔, 纹理变得分散, 并呈现出更多的不规则碎片; DES 表面发生略微变化, 在 400 W 和 600 W 处理 15 min 时表现出更多小颗粒多孔无序结构, 微观结构变化可影响蛋白质的化学和物理性质及其功能特性。在超声功率为 400 W 时, DES 粒径显著减小, 粒径参数 $D_{[3,2]}$ 和 $D_{[4,3]}$ 分别从 10.50、30.43 μm 减小到 7.89、11.27 μm ; 溶解度显著提高, 在酸性、碱性条件下溶解度分别由 47%、71% 上升到 75%、81%。此外, 超声预处理可提高咖啡蛋白的吸水性和乳化活性, 这些均为蛋白质在食品应用中的重要功能特性。研究表明采用超声波技术对咖啡蛋白进行改性有效果, 研究结果可为咖啡蛋白在食品加工中的应用提供理论依据。

关键词: 咖啡蛋白; 超声波功率; 低共熔溶剂; 结构特征; 功能特性

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

Effects of Ultrasonic-assisted Deep Eutectic Solvent Extraction on the Structure and Functional Properties of Coffee Protein

SU Zhang^{1,2}, HU Faguang³, YU Xinxin^{2,4,5}, LI Guiping³, FU Xingfei³, XIA Guanghua^{1*}, DONG Wenjiang^{2,4,5*}

1. School of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Spice and Beverage Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wanning, Hainan 571533, China; 3. Institute of Tropical and Subtropical Economic Crops, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Baoshan, Yunnan 678025, China; 4. Hainan Provincial Key Laboratory of Processing Suitability and Quality Control of Featured Tropical Crops, Wanning, Hainan 571533, China; 5. National Center of Important Tropical Crops Engineering and Technology Research, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: In order to explore the application of coffee protein in food processing, non-fat green coffee powder was used as the raw material. Different ultrasonic powers (0 W, 200 W, 400 W, 600 W and 800 W) effect of synergistic interaction

收稿日期 2023-10-17; 修回日期 2023-11-15

基金项目 云南省重大科技专项 (No. 202202AE090002); 中国热带农业科学院国家热带农业科学中心科技创新团队项目 (No. CATASCXTD202404); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630142022010)。

作者简介 苏 璋 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全。*通信作者 (Corresponding author): 夏光华 (XIA Guanghua), E-mail: xiaguanghua2011@126.com; 董文江 (DONG Wenjiang), E-mail: dongwenjiang.123@163.com。

with deep eutectic solvent method and alkali method on composition (SDS-PAGE), structural properties (particle size distribution, Fourier transform infrared spectroscopy, circular dichroism spectrum, fluorescence spectroscopy and scanning electron microscopy) and functional properties (solubility, water absorption, oil absorption and emulsification) of coffee protein were studied. The average particle size of coffee protein (DES) extracted by deep eutectic solvent (12.30 μm) was significantly smaller than that of coffee protein (AEP) extracted by alkali method (113.67 μm). The solubility of DES was higher under acidic conditions, and the solubility of AEP was higher under alkaline conditions. DES had better water and oil absorption than AEP. After ultrasonic pretreatment, the results of coffee protein electrophoresis, Fourier infrared spectrum, circular dichroism spectrum and fluorescence spectroscopy showed that different ultrasonic power pretreatment did not cause significant changes in protein molecular weight distribution, but it affected the secondary and tertiary structure of proteins. The surface microstructure of DES showed that the surface structure was loose and porous, and the surface of AEP was tight and flat. After ultrasonic pretreatment, the microstructure of AEP became loose and porous, the texture became dispersed, and more irregular fragments were presented. The surface of DES changed slightly, and showed more small-particle porous disordered structure when treated at 400 W and 600 W for 15 min. The microstructure changes could affect the chemical and physical properties and functional properties of proteins. When the ultrasonic power was 400 W, the particle size of DES decreased significantly, and the particle size parameters $D_{[3,2]}$ and $D_{[4,3]}$ decreased from 10.50 μm , 30.43 μm to 7.89 μm and 11.27 μm , respectively. The solubility increased significantly, and the solubility increased from 47% and 71% to 75% and 81% respectively under acidic and alkaline conditions. In addition, ultrasonic pretreatment could improve the water absorption and emulsification activity of coffee protein, which are important functional properties of proteins in food applications. The results show that the modification of coffee protein by ultrasonic technology is effective, and this study could provide a theoretical basis for the application of coffee protein in food processing.

Keywords: coffee protein; ultrasonic power; deep eutectic solvent; structural feature; functional characteristics

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.08.021

近年来,考虑到健康、低成本和可持续因素,人们对植物来源的可再生和可持续蛋白质资源越来越感兴趣^[1]。消费者对蛋白质的需求趋势也从单纯的动物蛋白向动植物蛋白合理营养结构型发展。植物性蛋白质来源被认为对于不断增长的全球人口更具可持续性,实现可持续发展需要减少对动物性蛋白质的依赖,在农业或食品行业寻找新的替代蛋白质来源^[2]。

咖啡作为世界上最受欢迎的饮料之一,也是生产和交易最多的商品之一^[3]。2022年我国咖啡种植面积为8.63万 hm^2 ,主要咖啡产区为云南省、海南省等地,其中云南省2022年咖啡种植面积为8.49万 hm^2 ,占全国咖啡面积的98.38%^[4]。近10a中国咖啡消费年增长率在15%左右,远高于全球市场2%的增长率^[5]。在咖啡加工过程中会产生大量副产物,如生咖啡豆、咖啡果壳、咖啡银皮和咖啡废渣等,其中生咖啡豆中的蛋白含量为12.1%~16.4%,可作为植物蛋白质的潜在来源,以创造友好的生态环境和更可持续的农业与工业,同时提高咖啡副产物的经济价值,并获得额外的经济效益^[6]。关于咖啡蛋白的提取普遍采用传统的碱溶酸沉方法,甄鹏晨等^[7]利用碱溶酸沉法提取蛋白质并测定了氨基酸的成分,结果表明咖啡豆蛋白

质中的氨基酸种类较为丰富。但目前关于咖啡蛋白的营养价值与功能特性的研究则较少。通过提取咖啡蛋白并对其结构特性和功能特性的研究,对提高咖啡资源的综合利用具有重要的意义。

目前关于蛋白质提取的方法很多,包括溶剂提取、碱提取、盐提取、酶提取等^[8]。但溶剂法、碱法和盐提法耗时且不环保,残留溶剂容易造成环境污染,过量使用碱溶液也会破坏蛋白质的功能特性,影响蛋白质的质量^[8]。而酶法提取速度慢和操作成本高,难以扩大提取规模。因此需要开发新的植物蛋白提取工艺和方法,实现绿色、环保和可持续发展理念。低共熔溶剂(DESs)作为一种新型绿色萃取溶剂,是一种共晶混合物,由氢键供体(HBD)和氢键受体(HBA)组成,具有提取效率高、毒性低、生物降解性好、制备容易、合成过程中无副产物等优点,被广泛应用于生物活性化合物的提取^[9]。

由于植物蛋白自身结构和加工工艺等因素的影响,其消化率较低,溶解性、起泡性、乳化性和胶凝性等功能特性较差,限制了其在食品中的应用^[10]。为了提高植物蛋白产业的竞争力,需要开发新的提取蛋白工艺及对蛋白适当的改性。蛋白质的功能可以通过各种化学和物理方法得到改

善, 超声作为一种新型、绿色、创新和可持续发展的技术, 受到广泛关注^[11]。超声波是频率大于 20 kHz 的声波, 具有波动与能量的双重属性, 能改变蛋白质分子结构, 破坏蛋白质分子内键, 对蛋白质溶解性有一定影响^[12]。大量研究表明, 超声波会影响植物蛋白的结构特性并改善植物蛋白的功能特性, WANG 等^[13]研究超声辅助酶法提取山核桃蛋白, 结果表明优化超声条件后 (400 W, 20 kHz, 5 s/3 s) 可有效改善山核桃蛋白的二级和三级结构, 同时提高蛋白质的溶解度和乳化活性。MALIK 等^[14]利用高强度超声辅助碱法从脱酚葵花籽粕中提取分离蛋白, 结果表明超声波可以改善蛋白质的溶解性、乳化性和发泡能力等功能特性。

目前较多关于超声波辅助提取大豆、花生、核桃蛋白质及对其功能特性的影响研究, 鲜有关于咖啡蛋白的研究, 而且更多地关注超声辅助碱法和酶法等研究, 而超声辅助低共熔溶剂提取对蛋白结构和功能特性的影响有待研究。本研究拟采用超声波辅助低共熔溶剂法和超声辅助碱法提取咖啡蛋白, 探究不同超声波功率对咖啡蛋白的组成成分、物理化学结构和功能特性的影响, 研究结果可为咖啡蛋白的潜在利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 供试材料生咖啡豆为中粒种咖啡, 采自海南白沙, 将红色成熟鲜果进行浮选后脱壳, 热风干燥 (40 °C 处理至水分含量约 10%) 后脱去银皮即得生咖啡豆。

1.1.2 试剂 氯化胆碱 ($C_5H_{14}ClNO$), 购自上海源叶生物科技有限公司; 石油醚 (沸程 60~90 °C)、乙二醇 ($C_2H_6O_2$)、无水乙醇、氢氧化钠、盐酸, 购自西陇科学股份有限公司。以上试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器与设备 VOSHIN-1500C 低温超声波萃取仪, 无锡沃信仪器制造有限公司; MASTERSIZER 3000 粒径分析仪, 英国 Malvern 公司; Nicolet 6700 傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Thermo Fisher 公司; Bio-Logic MOS-500 圆二色谱仪, 法国 Thermo Fisher 公司; F-4600 荧光光谱仪, 日本 Shimadzu Corporation 公司; Phenom Prox 台式显微能谱一体机, 荷兰 Phenom 公司。

1.2 方法

1.2.1 脱脂咖啡粉的制备 参照洪启迪等^[15]的方法对生咖啡粉脱脂。将生咖啡豆粉碎后过 40 目

筛, 称取 100.0 g 加入 300 mL 石油醚 (沸程 60~90 °C) 进行恒温振荡水浴 1 h。过滤除去石油醚, 重复 3 次后收集滤渣置于 40 °C 烘箱干燥, 即得脱脂生咖啡粉。

1.2.2 低共熔溶剂的制备 参考 RAJHA 等^[16]的方法制备低共熔溶剂 (DESs), 稍作修改, 将摩尔比为 1:3 的氯化胆碱和乙二醇加入具塞锥形瓶中, 放入 90 °C 水浴中磁力搅拌 1 h 直至溶液均匀透明, 待冷却后无结晶析出, 即溶剂制成。

1.2.3 超声波辅助低共熔溶剂提取咖啡蛋白 参考 CHEN 等^[17]的方法, 稍作修改。将脱脂咖啡粉和低共熔溶剂以料液比 1:5 (w/w) 混合, 放入超声波破碎室中进行超声预处理, 超声探头频率核磁为 20 kHz, 输出功率分别为 0、200、400、600、800 W, 设置超声时间为 15 min (运行 1 s, 间歇 3 s), 将温度控制在 4 °C 左右。将超声处理的混合液以 600 r/min 机械搅拌 120 min。搅拌结束后冷却至室温, 以 6000 r/min 低温离心 10 min, 取上清液加入冰乙醇, 置于 4 °C 冰箱放至蛋白质析出。在低温下 6000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀物; 用冰乙醇反复清洗沉淀物除去残留溶剂, 沉淀物冷冻干燥即为粗蛋白质, 低共熔溶剂提取的咖啡蛋白以 DES 表示。

1.2.4 超声波辅助碱提取咖啡蛋白 参考韩玮等^[18]的方法, 稍作修改。称取脱脂咖啡粉 5 g, 加入 100 mL 50% 乙醇, 常温下浸提 15 min, 离心后取沉淀重复 1 次, 去除上清液。料液比为 1:30 (w/V) 加入蒸馏水混合, 将混合液 pH 调至 10.0。将混合液放入超声波破碎室中进行超声处理, 超声探头频率为 20 kHz, 输出功率分别为 0、200、400、600、800 W, 设置超声时间为 15 min (运行 1 s, 间歇 3 s), 将温度控制在 4 °C 左右。将超声处理的混合液在 55 °C 恒温下以磁力搅拌 90 min, 提取结束后冷却至室温, 6000 r/min 低温离心 10 min。取上清液调节 pH 至 3.0, 并在 4 °C 下放置过夜以增强沉淀。取沉淀冻干获得粗蛋白, 碱法提取的咖啡蛋白以 AEP 表示。

1.2.5 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析 使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定咖啡蛋白的分子结构, 参考 MENG 等^[19]的方法, 稍作修改。预制 PAGE 凝胶为 5% 浓缩胶和 10% 分离胶。将 20 μ L 样品与 5 μ L 还原上样缓冲液 (4 $\times$) 混合, 95 °C 涡旋变性 5 min。将混合物冷却至室温后加

入胶孔, 利用 6.5~270 kDa 蛋白质标准溶液估计样品的分子量。浓缩胶时为恒压 80 V, 分离胶时为恒压 110 V。结束后用考马斯亮蓝染色, 脱色剂进行脱色。

1.2.6 粒径分布测定 使用粒径分析仪测定咖啡蛋白的粒度分布。参考 LV 等^[20]的方法, 稍作修改。将蛋白样品溶于纯水中, 稀释为蛋白溶液, 于室温下测定咖啡蛋白的粒度分布。测定结果用 D_{10} 、 D_{50} 、 D_{90} 、 $D_{[3,2]}$ 和 $D_{[4,3]}$ 表示, D_{10} 、 D_{50} 、 D_{90} 分别为样品中有 10%、50%、90% 的颗粒粒径小于该数值, $D_{[4,3]}$ 为体积平均粒径, $D_{[3,2]}$ 为表面积平均粒径。

1.2.7 傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 分析 使用傅里叶变换近红外光谱仪测定咖啡蛋白的光谱, 将蛋白样品 (5 mg) 与固体 KBr (500 mg) 放入玛瑙研钵中研磨混合, 使用压片机将其压成薄片。在 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 之间扫描 32 次。以 KBr 粉末介质作为空白, 分析咖啡蛋白的透过率光谱数据。

1.2.8 圆二色光谱分析 通过圆二光谱仪测定分析咖啡蛋白的二级结构组成和含量。参考 SUN 等^[21]的方法, 稍作修改。用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 将蛋白样品稀释至浓度为 1 mg/mL, 然后通过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 水系滤膜过滤。在远紫外线范围为 $190\sim 250\text{ nm}$ 中记录光谱。扫描速度、反应时间和带宽的值分别为 10 nm/min、0.50 s 和 2.0 nm。以相同的磷酸盐缓冲溶液作为空白。扫描 3 次取平均值。使用 Dichro Web 软件计算 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲的二级结构的比例。

1.2.9 荧光光谱分析 通过荧光光谱仪测定咖啡蛋白溶液 (1 mg/mL) 的荧光光谱。参考 ZHAO 等^[22]的方法, 稍作修改。测定超声辅助低共熔溶剂提取的蛋白质 (DES) 时狭缝宽度和激发波长分别设置为 5、350 nm, 扫描波长范围为 295~500 nm。测定超声辅助碱法提取的蛋白质 (AEP) 时狭缝宽度和激发波长分别设置为 10、350 nm, 扫描波长范围为 370~650 nm。

1.2.10 扫描电子显微镜 (SEM) 观察 通过 SEM 观察冻干咖啡蛋白样品的表面微观结构, 在 10 kV 加速电压和 3000 放大倍率下拍得 SEM 照片。观察前用导电胶将样品粘上, 使用离子溅射镀膜机对样品喷金溅射 120 s。

1.2.11 溶解度测定 参考 ALMEIDA 等^[23]的方法, 稍作修改。将咖啡蛋白 (1 mg/mL, 10 mL)

溶液置于烧杯中, 并通过添加 HCl (1 mol/L) 或 NaOH (1 mol/L) 溶液将蛋白质溶液的 pH 调节至 4.0 和 9.0。将蛋白质溶液在室温下持续搅拌 1 h 使其溶解, 然后在 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 6000 r/min 离心 10 min。取上清液, 采用 BCA 试剂盒测定蛋白质含量。溶解度 (%) 的计算公式:

$$\text{溶解度} = \frac{\text{上清液蛋白质含量 (mg/mL)}}{\text{总蛋白含量 (mg/mL)}} \times 100\%$$

1.2.12 吸水性和吸油性测定 参考 LIU 等^[24]的方法, 稍作修改。将冻干咖啡蛋白 (10 mg) 加入超纯水或植物油 (10 mL) 中振荡混匀, 室温下静置 30 min, 在转速为 5000 r/min 离心 20 min, 弃上清液。咖啡蛋白的吸水性和吸油性计算公式:

$$\text{吸水性/吸油性 (g/g)} = \frac{W_2 - W_1}{W}$$

式中, W_2 为吸水/油后管及咖啡蛋白的重量 (g), W_1 为未吸水/油咖啡蛋白及管的重量 (g), W 为冻干沉淀物重量 (g)。

1.2.13 乳化性能 参考李普等^[25]的方法, 稍作修改。取 6 mL 质量浓度为 2 mg/mL (溶于 0.01 mol/L pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲溶液) 的咖啡蛋白溶液和 2 mL 大豆油放入离心管中, 12 000 r/min 高速匀化 2 min。在分别放置 0 min 和 30 min 时, 从匀浆液底部吸取 50 μL , 加至 5 mL 质量分数为 0.1% 的十二烷基硫酸钠溶液中, 混匀后在 500 nm 波长处分别测定放置 0 min 的吸光度 (A_0) 和放置 30 min 的吸光度 (A_{30})。代入公式计算乳化活性 (EAI) 和乳液稳定性 (ESI), 以质量分数为 0.1% 的 SDS 作空白对照, 咖啡蛋白的乳化活性和乳液稳定性计算公式:

$$\text{乳化活性 (m}^2/\text{g)} = \frac{4.606 \times A_0 \times 100}{\rho \times \varphi \times \theta \times 10\,000}$$

$$\text{乳液稳定性 (min)} = \frac{A_0}{A_0 - A_{30}} \times (t_{30} - t_0)$$

式中, ρ 为蛋白质量浓度 (g/mL); φ 为光径 (1 cm); θ 为大豆油质量分数 (25%); 100 为稀释倍数; A_0 和 A_{30} 分别为放置 0 min 和 30 min 时的吸光度; $t_{30}-t_0$ 为 2 次测定的时间差。

1.3 数据处理

所有试验均重复 3 次, 数值以平均值 $\pm$ 标准偏差表示, 并进行显著性分析, $P < 0.05$ 为方差显著。使用 SPSS 26.0、Origin 2021 等软件进行数据分析和绘图。

2 结果与分析

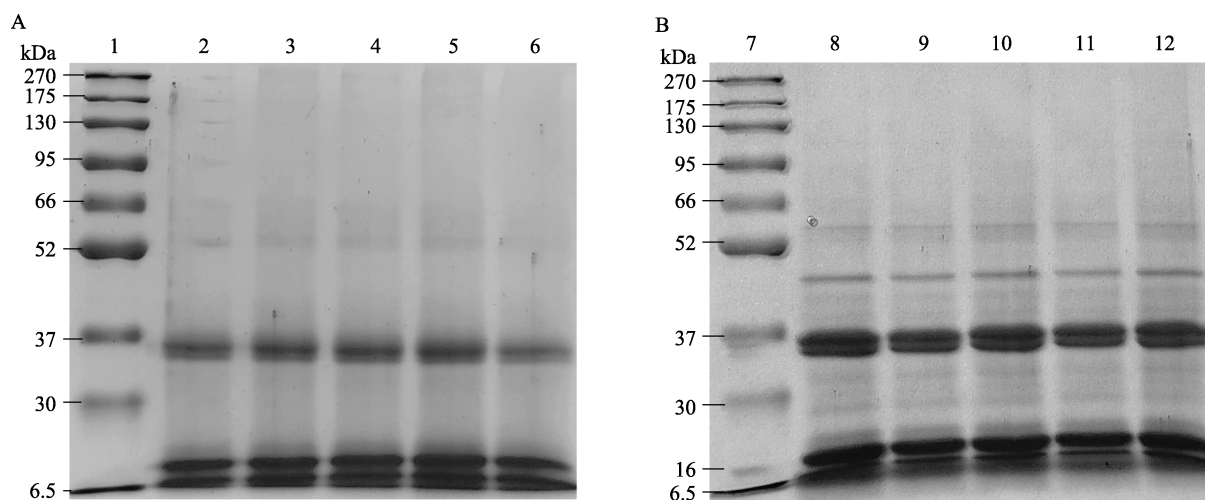
2.1 超声波处理对咖啡蛋白组成成分的影响

通过 SDS-PAGE 探究咖啡蛋白中亚基的变化 (图 1)。由 SDS-PAGE 显示, 咖啡蛋白的分子量分布范围为 6.5~37 kDa; 碱法提取的咖啡蛋白 (AEP) 在 37~52 kDa 附近比 DES 少 1 条带, 可能是碱法处理水解了 37~52 kDa 的蛋白条带。与未经超声处理的蛋白相比, 所有经超声处理的蛋白质样品的电泳图谱均无显著差异。表明超声处理不会改变咖啡蛋白的分子量^[19]。这与 HU 等^[26]研究超声波处理对大豆分离蛋白功能和结构特性的影响结果一致, 表明试验中的超声处理条件不

会改变蛋白质的 SDS-PAGE 图谱。

2.2 超声波处理对咖啡蛋白理化结构特性的影响

2.2.1 咖啡蛋白粒径分布 蛋白质的粒径大小与蛋白质的功能属性密切相关^[27]。蛋白质的粒径分布和聚集情况可通过测定的粒径各种参数表示, 其中 $D_{[4,3]}$ 能够监测聚集体的变化, $D_{[3,2]}$ 代表大多数颗粒的大小^[20]。咖啡蛋白的粒径见图 2 和表 1。结果表明, 碱法提取的咖啡蛋白粒径 (图 2A) 显著大于低共熔溶剂提取的蛋白 (图 2B)。经过不同功率的超声预处理后, 咖啡蛋白粒径均有所减小。低共熔溶剂提取的咖啡蛋白在 400 W ($D_{[4,3]}$

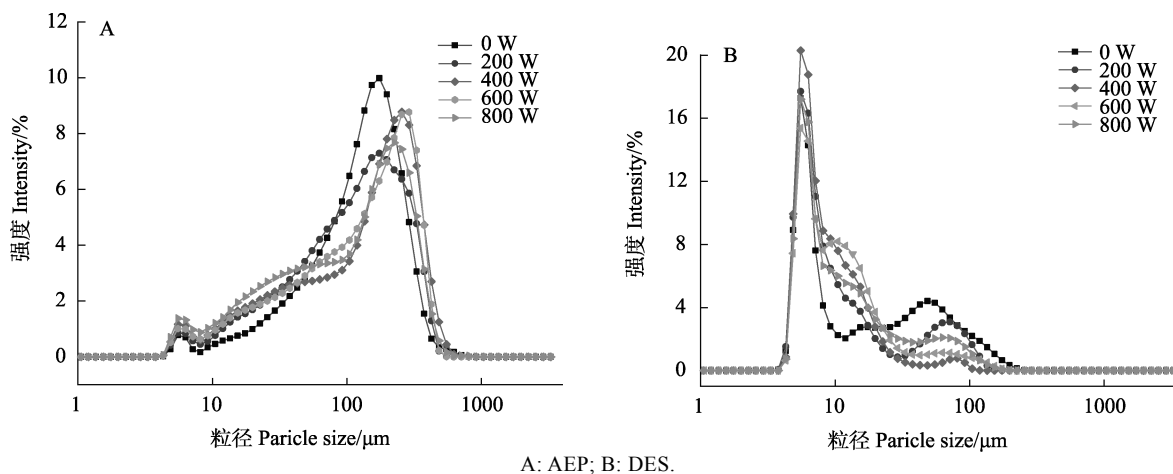


A: 碱法提取的咖啡蛋白 (AEP); B: 低共熔溶剂提取的咖啡蛋白 (DES)。1、7: 标准品 (6.5~270 kDa marker); 2~6: 0、200、400、600、800 W 的 AEP; 8~12: 0、200、400、600、800 W 的 DES。

A: Coffee protein extracted by alkaline method (AEP); B: Coffee protein extracted by co melting solvent (DES). 1, 7: Standard products (6.5~270 kDa marker); 2~6: AEP of 0 W, 200 W, 400 W, 600 W, 800 W; 8~12: DES of 0 W, 200 W, 400 W, 600 W, 800 W.

图 1 超声波处理对咖啡蛋白 SDS-PAGE 图谱的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic treatment on SDS-PAGE profile of coffee protein



A: AEP; B: DES.

图 2 超声波处理对咖啡蛋白粒径分布的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic treatment on particle size distribution of coffee protein

表 1 超声波处理对咖啡蛋白粒径的影响
Tab. 1 Effect of ultrasonic treatment on particle size of coffee protein μm

蛋白样品 Protein sample	D_{10}	D_{50}	D_{90}	$D_{[3,2]}$	$D_{[4,3]}$
AEP-0 W	33.07±0.55 ^a	133.67±1.53 ^b	266.00±2.64 ^d	65.10±0.90 ^a	144.33±1.53 ^c
AEP-200 W	22.20±1.56 ^b	117.67±0.58 ^c	292.00±7.81 ^c	51.60±1.83 ^b	138.33±2.31 ^c
AEP-400 W	18.50±0.72 ^c	152.00±5.57 ^a	333.00±6.56 ^a	48.80±1.71 ^c	163.67±4.51 ^a
AEP-600 W	19.40±0.79 ^c	139.67±8.50 ^b	320.33±9.01 ^b	49.96±1.85 ^{bc}	156.33±6.51 ^b
AEP-800 W	15.83±0.81 ^d	118.67±7.02 ^c	300.00±9.54 ^c	41.47±1.76 ^d	140.33±5.51 ^c
DES-0 W	5.30±0.01 ^e	12.30±0.56 ^d	79.67±3.85 ^e	10.50±0.10 ^e	30.43±1.30 ^d
DES-200 W	5.26±0.01 ^e	8.07±0.16 ^d	64.50±3.33 ^f	8.84±0.03 ^{ef}	20.40±0.66 ^e
DES-400 W	5.27±0.01 ^e	7.49±0.12 ^d	18.10±0.72 ⁱ	7.89±0.11 ^f	11.27±0.68 ^f
DES-600 W	5.40±0.01 ^e	9.35±0.04 ^d	31.30±4.06 ^h	9.08±0.05 ^{ef}	16.33±0.80 ^{ef}
DES-800 W	5.34±0.01 ^e	8.98±0.10 ^d	51.40±5.01 ^g	9.18±0.08 ^{ef}	19.00±0.61 ^e

注：同列不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

为 11.27 μm, $D_{[3,2]}$ 为 7.89 μm) 时粒径最小, 粒径的减小是由于超声处理产生的空化效应和高剪切力将一些较大的不溶性蛋白质聚集体破坏^[28]。在更强的超声强度处理 (600、800 W) 时形成更大的聚集体, 因为较高功率产生更小的颗粒和更多的游离巯基基团, 这些基团可以与自身反应或被氧化成更大的聚集体^[29]。而碱法提取的咖啡蛋白在 800 W 超声预处理时 D_{10} 和 $D_{[3,2]}$ 最小, 分别从 0 W 的 33.07、65.10 μm 减小到 15.83、41.47 μm。综上, 超声预处理对低共熔溶剂法和碱法提取的咖啡蛋白产生不同影响, 可能是由于 2 种溶剂的黏度不同引起的, 空化是超声波辅助提取和改性植物蛋白的主要原因, 通常密度较低的溶剂出现更多的空化作用^[30]。

2.2.2 咖啡蛋白傅里叶红外光谱 FTIR 是一种用于监测蛋白质官能团构象变化和结构性质的可

靠技术。经过不同功率的超声预处理后咖啡蛋白的 FTIR 光谱如图 3 所示, 其中 1660~1656 cm^{-1} 对应酰胺 I 的振动, 1542~1534 cm^{-1} 对应酰胺 II 的振动, 1242~1239 cm^{-1} 对应酰胺 III 的振动^[30]。经超声处理后, 咖啡蛋白对应酰胺 I 和酰胺 II 处的吸收峰均有不同程度的减弱。由低共熔溶剂提取的咖啡蛋白 (图 3A) 在酰胺 I 和酰胺 II 处的吸收峰发生偏移, 酰胺 I 中的特征峰主要由 C=O 和 N-H 伸缩振动引起, 而酰胺 II 可以表明分子间或分子内氢键被破坏^[31]。在 3292 cm^{-1} 附近的吸收峰对应羟基 (-OH) 吸收峰, 代表样品中分子间氢键的强度, 经超声处理后碱法提取的蛋白 (图 3B) 的 -OH 吸收峰均移至短波红外区域, 表明超声削弱了蛋白质中的分子间氢键强度^[32]。结果表明超声预处理在不同程度上改变了咖啡蛋白质的分子结构。

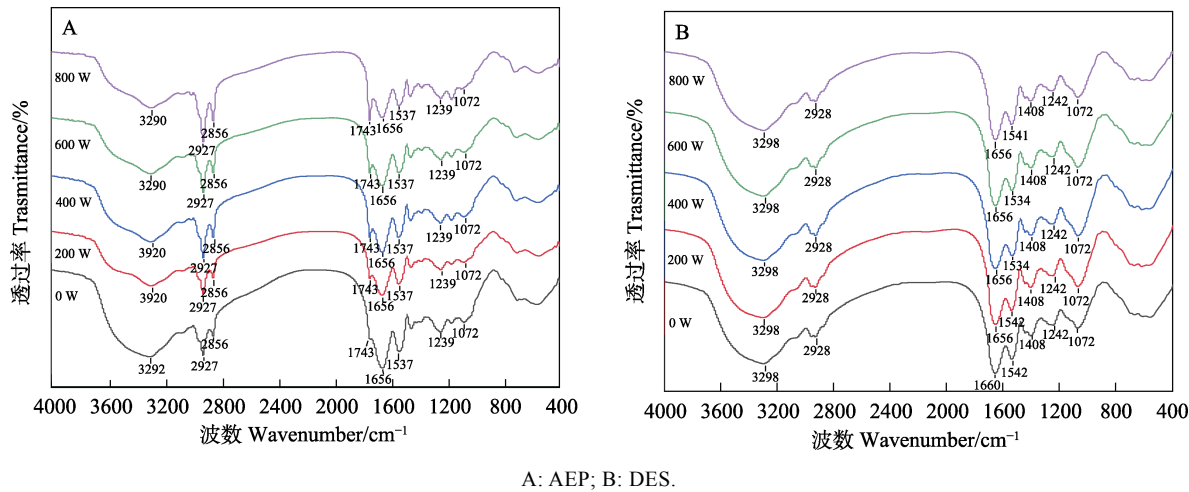


图 3 超声波处理对咖啡蛋白 FTIR 的影响
Fig. 3 Effect of ultrasonic treatment on FTIR of coffee protein

2.2.3 咖啡蛋白的二级结构组成和含量 蛋白质的二级结构是局部折叠结构，通常取决于氨基酸序列和主链原子之间的相互作用^[21]；蛋白质的二级结构通过 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲的比例来确定。通过圆二光谱仪测定分析咖啡蛋白的二级结构组成和含量，咖啡蛋白的 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲含量如图 4 和表 2 所示，经超声预处理辅助提取后， α -螺旋含量有所降低，特别是在超声 400 W（DES 为 66.67%、AEP 为 8.81%）时显著低于未超声预处理（DES 为 69.17%、AEP 为 9.11%）的蛋白，而 β -折叠含量有所增加，这可能是由于 R 基团在超声过程中聚合引起的，蛋白质聚集体的生成也将

导致 α -螺旋含量降低以及 β -折叠含量增加^[21]。 α -螺旋含量降低意味着蛋白质分子的伸展， β -折叠一般埋藏在肽链内部， α -螺旋与 β -折叠含量的改变说明蛋白质空间构象发生改变^[33]。结果表明，经过超声预处理后蛋白质分子展开， α -螺旋破坏、 β -折叠形成，咖啡蛋白的二级结构发生变化。

2.2.4 咖啡蛋白的三级结构构象 蛋白质的内源荧光光谱主要表征荧光氨基酸残基的相互作用，如色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸等氨基酸残基的相互作用，可用于测定蛋白质三级结构构象的变化^[34]。超声辅助碱法提取的咖啡蛋白（图 5A），在 200、400、600 W 时增强了荧光强度，最大发射荧光强度波长从 444 nm 分别移动到 414、419、418 nm。

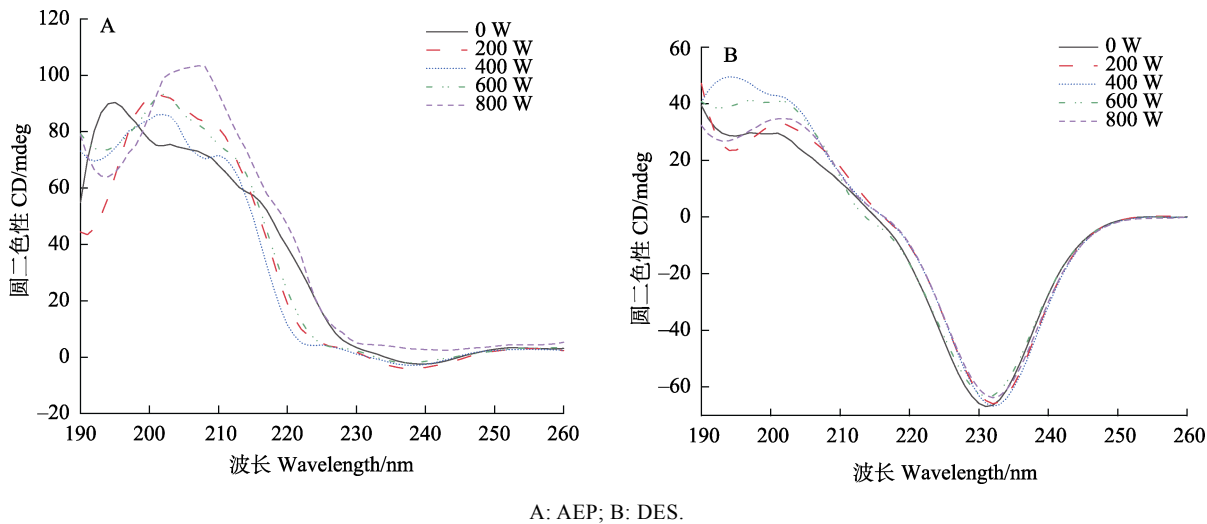


图 4 超声波处理对咖啡蛋白圆二色性的影响
Fig. 4 Effect of ultrasonic treatment on circular dichroism of coffee protein

表 2 超声波处理对咖啡蛋白二级结构含量的影响
Tab. 2 Effect of ultrasonic treatment on content of secondary structure of coffee protein

蛋白样品 Protein sample	含量 Content/%			
	α -螺旋 α -helix	β -折叠 β -sheet	β -转角 β -turn	无规则卷曲 Random coil
AEP-0 W	9.11±0.04 ^a	46.24±0.05 ^b	10.72±0.03 ^b	33.94±0.30 ^a
AEP-200 W	9.03±0.19 ^a	46.31±0.08 ^b	10.76±0.13 ^{ab}	33.90±0.04 ^{ab}
AEP-400 W	8.81±0.11 ^b	46.46±0.05 ^a	10.91±0.07 ^a	33.81±0.07 ^b
AEP-600 W	9.00±0.06 ^{ab}	46.28±0.04 ^b	10.77±0.02 ^{ab}	33.93±0.09 ^a
AEP-800 W	9.10±0.02 ^a	46.19±0.08 ^b	10.75±0.08 ^b	33.96±0.04 ^a
DES-0 W	69.17±0.90 ^a	7.44±0.56 ^b	10.85±0.19 ^c	12.54±0.29 ^b
DES-200 W	67.25±0.53 ^{bc}	8.29±0.22 ^a	11.34±0.15 ^{ab}	13.12±0.20 ^a
DES-400 W	66.67±0.10 ^d	8.54±0.06 ^a	11.51±0.01 ^a	13.27±0.06 ^a
DES-600 W	67.33±0.22 ^{bc}	8.40±0.25 ^a	11.42±0.15 ^a	12.84±0.31 ^{ab}
DES-800 W	68.11±0.80 ^{ab}	7.96±0.32 ^{ab}	11.10±0.20 ^{bc}	12.83±0.28 ^{ab}

注：同列不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

这些变化是由于超声处理使咖啡蛋白分子结构展开,破坏了蛋白质的疏水相互作用,暴露了分子链外的疏水基团或区域,导致荧光强度增强和荧光光谱蓝移^[28]。在更高的超声功率 800 W 时降低了荧光强度,最大发射荧光强度的波长从 444 nm 移动到 463 nm。可能是随着超声功率进一步增加,蛋白质亚基通过暴露的疏水相互作用(和氢键)重组并形成,表现出紧凑的四级结构并形成大的聚集体,导致荧光强度降低^[27]。

然而,经过超声处理后,低共熔溶剂法提取的咖啡蛋白(图 5B)降低了荧光强度,最大发射

荧光强度的波长从 360 nm 移动到 363 nm。荧光强度的降低反映了色氨酸和酪氨酸之间能量转移效率的不同^[35]。DES 最大荧光发射的红移是由于超声波的空化效应使蛋白质的构象发生变化,导致更多的发色团暴露于溶剂中^[36]。此外,氧化色氨酸残基的存在也可能降低荧光强度^[22]。SUN 等^[37]在研究超声辅助提取花生分离蛋白中同样表明超声辅助提取降低了荧光强度,并使蛋白质的最大发射荧光强度的波长从 323.07 nm 移动到 327.07 nm。荧光光谱的蓝移、红移和荧光强度的变化表明了超声波处理可以改变蛋白质的三级构象。

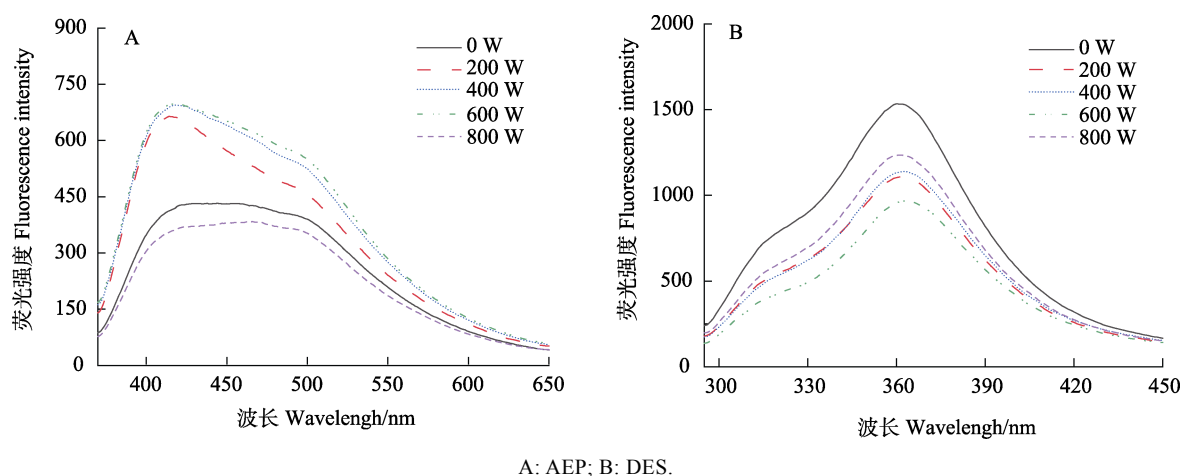


图 5 超声波处理对咖啡蛋白内源荧光的影响

Fig. 5 Effect of ultrasonic treatment on endogenous fluorescence of coffee protein

2.2.5 咖啡蛋白表面微观结构 为了解不同提取方法协同超声处理对咖啡蛋白的影响,通过扫描电子显微镜(SME)观察冻干咖啡蛋白的微观结构。结果如图 6 所示,碱法和低共熔溶剂法提取咖啡蛋白的表面微观结构存在明显差异。由碱法提取的蛋白(AEP)表面紧密平坦,而低共熔溶剂法提取的咖啡蛋白(DES)表面结构较疏松多孔。经过不同程度超声预处理后 AEP 的微观结构变得疏松多孔,纹理变得分散,并呈现出更多不规则碎片;而 DES 表面发生略微变化,在 400 W 和 600 W 处理 15 min 时表现出更多的小颗粒多孔无序结构。MENG 等^[19]通过研究超声处理对乳清分离蛋白构象和功能特性的影响表明,超声处理后,大片被破碎成更小的不规则碎片。蛋白质微观结构的变化与超声处理有关,微观结构影响蛋白质化学和物理性质以及功能特性。超声协同作用导致蛋白质结构疏松,体积密度变小,有助于提高蛋白质的溶解度^[13]。这些发现与图 7 中的蛋白质溶解度一致。

2.3 超声波处理对咖啡蛋白功能特性的影响

2.3.1 咖啡蛋白溶解度 溶解度是蛋白质变性聚集的重要指标,蛋白质的功能特性及其在食品工业中应用很大程度上受到其溶解度的影响^[28]。经过不同功率超声预处理提取的咖啡蛋白在 pH 为 4.0 (蛋白质的等电点附近)和 pH 为 9.0 时测得的溶解度如图 7 所示。所有咖啡蛋白在碱性(pH 9.0)条件下溶解较好,碱法提取的咖啡蛋白(图 7A)溶解度最高,而低共熔溶剂提取的咖啡蛋白(图 7B)溶解度在酸性条件下溶解度更高(pH 4.0)。经不同超声处理后,DES 的溶解度随着超声功率的升高先增加后下降,在 400 W 时溶解度最高,pH 为 4.0 和 9.0 时分别为 75%和 81%(图 7B),适当的超声功率可使蛋白质分子部分展开,增加蛋白质和水分子之间的相互作用。此外,超声波处理可以减小蛋白质的粒径,也可将原本不易溶解的蛋白质转化为更易溶解形式,从而增加蛋白质的溶解度^[26, 38]。当超声强度增加时,咖啡蛋白分子膨胀,暴露疏水基团及埋藏分子内巯基

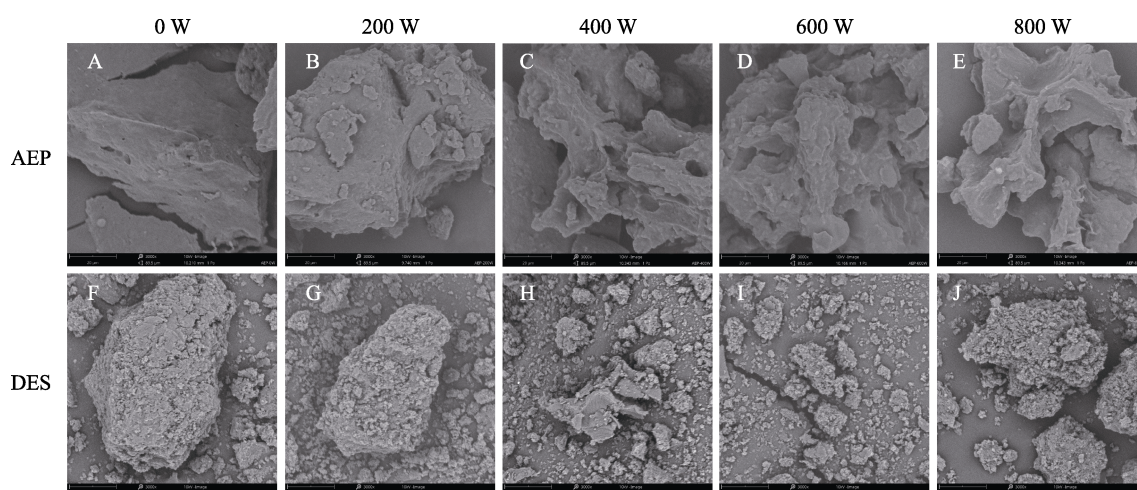
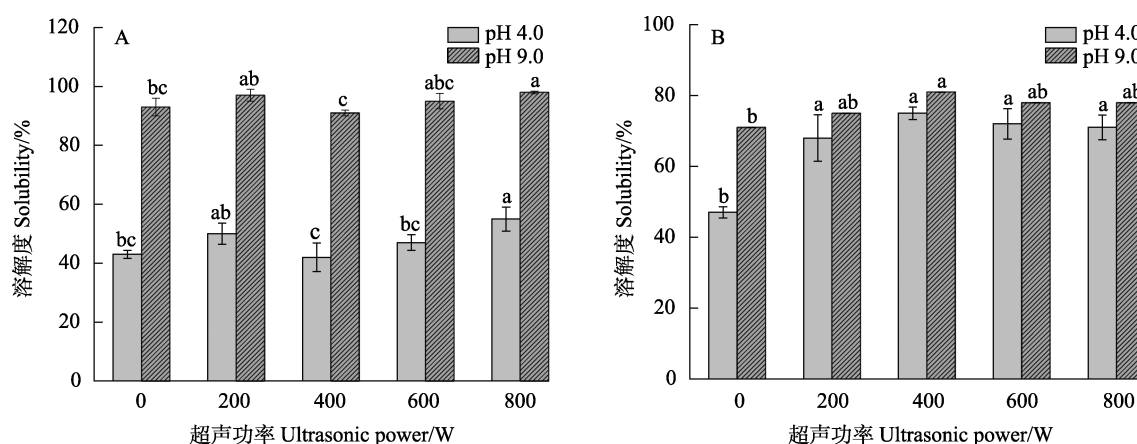


图 6 超声波处理后咖啡蛋白的表面微观结构 (3000×)

Fig. 6 Surface microstructure of coffee protein after ultrasonic treatment (3000×)

不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

A: AEP; B: DES.

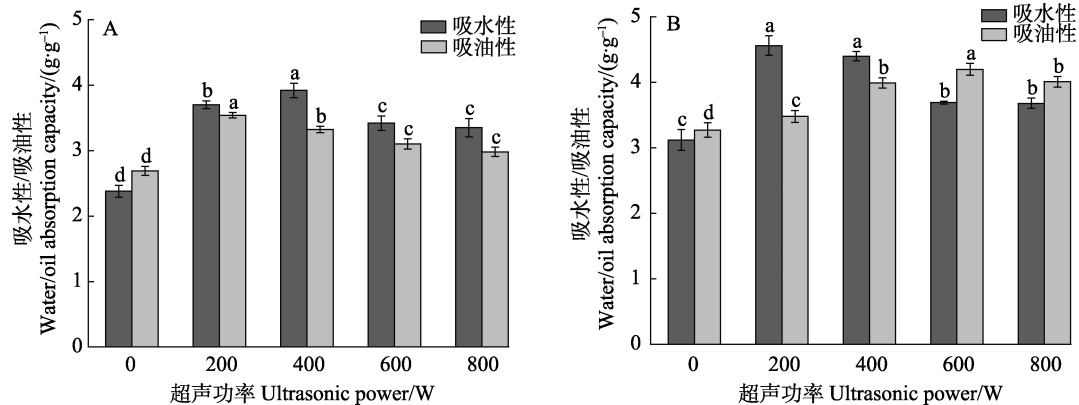
图 7 超声波处理对咖啡蛋白溶解度的影响

Fig. 7 Effect of ultrasonic treatment on solubility of coffee protein

基团；蛋白质分子通过非共价相互作用重新形成大分子聚集体，从而导致溶解度降低^[39]。然而，AEP 的溶解度在超声功率为 800 W 时最大，pH 为 4.0 和 9.0 时分别为 55% 和 98%，400 W 时溶解度最小，分别为 42% 和 91%（图 7A）。在相同超声功率处理时，AEP 的溶解度呈现与 DES 不同的变化规律，可能是由于 2 种溶剂黏度不同，经不同超声处理后使蛋白质粒径不同，导致相同超声处理后其溶解度存在差异^[40]。结果表明超声辅助提取可以减小蛋白质的粒径，促进蛋白质和水的相互作用，从而提高蛋白质的溶解度。

2.3.2 咖啡蛋白吸水性 (WAC) 和吸油性 (OAC)
蛋白质的吸水能力在提高各种食品的增稠性、多汁性和黏度等方面起着重要作用；吸油能力是另一个重要的功能特性，有助于在汤、人造肉和其

他烘焙产品中保持风味^[29]。不同方法及不同超声功率辅助提取对咖啡蛋白吸水性和吸油性的影响如图 8 所示。在未经超声处理时，碱法提取的咖啡蛋白质的吸水性 (2.38 g/g) 和吸油性 (2.69 g/g) 较差（图 8A），低共熔溶剂提取的蛋白质的吸水性 (3.12 g/g) 和吸油性 (3.27 g/g) 均有所改善（图 8B）。随着超声功率的增加，咖啡蛋白的吸水性呈先上升后下降趋势。DES 和 AEP 的吸水性分别在 200 W (4.56 g/g) 和 400 W (3.92 g/g) 时最高。因为在适当超声处理过程中蛋白质解离和部分溶解促进了与水分子的相互作用，从而改善蛋白质的水合作用。但是在强空化作用下，液体超声分解会导致空化气泡的产生和破裂。气泡破裂会在超声波探头中心附近形成温度和压力极高的热点，会破坏亲水和疏水基团^[41]。



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).
A: AEP; B: DES.

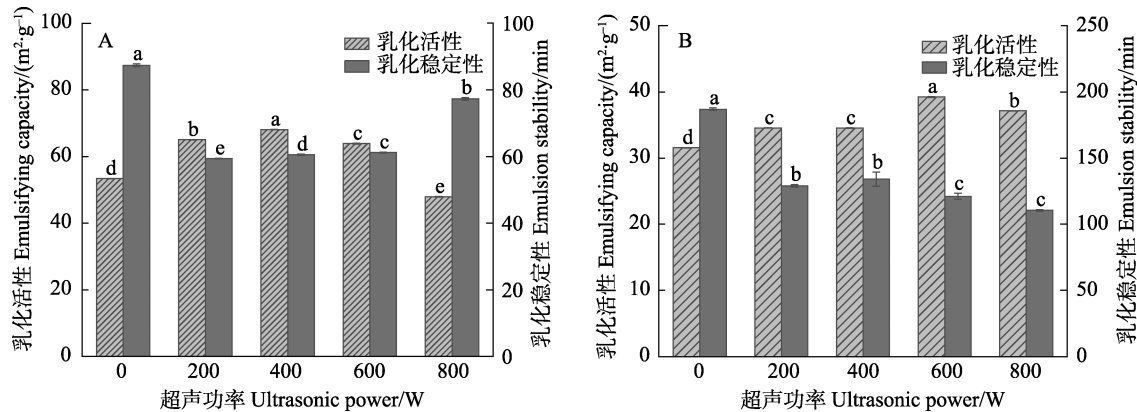
图 8 超声波处理对咖啡蛋白吸水性和吸油性的影响

Fig. 8 Effect of ultrasonic treatment on water and oil absorption of coffee protein

随着超声功率的增加，咖啡蛋白的吸油性同样呈先上升后下降的趋势。这可能是由于蛋白质的原始构象发生了变化，产生了更大的比表面积，并暴露了分子中的非极性基团或疏水表面，从而增强了吸油性^[42]。此外， α -螺旋含量的减少可能导致蛋白质分子伸展，这有助于在水油界面更好地吸收^[43]。随着超声功率的增加，咖啡蛋白吸油性逐渐下降，可能是由于超声功率增强后蛋白质变性和聚集所致^[44]。通过研究表明，超声波可以通过物理、化学和机械效应提高咖啡蛋白的吸水性和吸油性，但是高强度的超声会对吸水性和吸油性产生负面影响。

2.3.3 咖啡乳化性能 乳化特性是蛋白质的重要功能特性之一，蛋白质的乳化性可通过乳化活性和乳化稳定性进行评估，活性指数表示蛋白质形

成乳液的能力，而稳定性指数则表示蛋白质在一段时间内形成稳定乳液的能力^[43]。不同超声功率辅助碱法（AEP）和低共熔溶剂（DES）提取对咖啡蛋白乳化活性和乳化稳定性的影响分别如图 9A 和图 9B 所示。未经超声处理时，AEP 的乳化活性和乳化稳定性分别为 53.39 m²/g 和 87.39 m²/g，DES 的乳化活性和乳化稳定性分别为 31.57 m²/g 和 186.91 m²/g，表明低共熔溶剂的提取有利于溶液的稳定性，但不利于溶液乳化活性。当超声功率从 0 W 增加到 800 W 时。DES 的活性指数是先上升后下降，在 600 W（39.22 m²/g）时增加到最大值；而稳定性指数则随着超声强度的增强而逐渐降低。AEP 的活性指数在 400 W 时增加到最大值（68.10 m²/g）后下降；同样稳定性指数随着超声强度的增强而逐渐降低。可能是由于超声波的



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).
A: AEP; B: DES.

图 9 超声波处理对咖啡蛋白乳化性能的影响

Fig. 9 Effect of ultrasonic treatment on emulsifying property of coffee protein

空化效应导致部分蛋白质尺寸减小和疏水基团暴露^[43]。因此,更多蛋白质分子可以吸附在油水界面上,增加乳化作用。然而随着超声功率的进一步增加,产生的超声能量太强可能导致蛋白质变性形成聚集体,降低油水界面处的蛋白质浓度,从而导致乳化作用降低^[44]。经过超声处理后蛋白质乳液的稳定性降低,可能因为不溶性蛋白聚集体不利于维持油水界面的稳定^[20]。结果表明,超声处理可以提高咖啡蛋白的乳化性能,但是不利于咖啡蛋白的乳液稳定性。

3 讨论

通过研究不同超声波功率与低共熔溶剂法、碱法协同作用对咖啡蛋白结构和功能特性的影响,结果表明,由低共熔溶剂提取的咖啡蛋白(DES)粒径小于碱法提取的咖啡蛋白(AEP),在酸性条件下DES的溶解度(47%)高于AEP(43%);DES的吸水性和吸油性均高于AEP。SDS-PAGE、FTIR、圆二色光谱和荧光光谱结果表明,经超声波处理后,未引起蛋白质分子量分布的重大变化,但是对蛋白质的二级结构和三级结构产生不同程度的影响,包括咖啡蛋白的 α -螺旋破坏、 β -折叠形成,荧光光谱的蓝移、红移,以及改变了荧光强度。DES在超声功率为400 W时,具有更小的粒径和更高的溶解度,粒径参数 $D_{[3,2]}$ 和 $D_{[4,3]}$ 分别从10.50、30.43 μm 减小到7.89、11.27 μm ;酸、碱性条件下的溶解度分别由47%、71%增加到75%、81%。此外,超声预处理可改善咖啡蛋白的吸水性、吸油性和乳化活性。HU等^[26]研究了超声波处理对大豆分离蛋白功能和结构特性的影响,结果表明超声处理条件不会改变蛋白质的SDS-PAGE图谱,而超声处理提高了蛋白质的溶解度。SUN等^[37]研究表明,超声处理能减小花生分离蛋白的粒径,可有效提高花生分离蛋白的乳化性能。WANG等^[13]研究表明,在超声功率为400 W时可有效改善山核桃蛋白的二级和三级结构,同时提高蛋白质的溶解度和乳化活性。这些研究均表明,超声处理具有改善咖啡蛋白功能特性的潜力,从而提高其作为功能成分在食品工业中的利用率。但是超声波对咖啡蛋白结构的影响机理以及对更多蛋白功能性质的影响有待进一步研究,以期提供更多关于咖啡蛋白开发利用的理论知识,将有利于实现咖啡蛋白的加工与应用。

参考文献

- [1] WEN C, ZHANG J, YAO H, ZHOU J, DUAN H Q, ZHANG H H, MA H L. Advances in renewable plant-derived protein source: the structure, physicochemical properties affected by ultrasonication[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2019, 53: 83-98.
- [2] KUMAR M, TOMAR M, PUNIA S, DHAKANE-LAD J, DHUMAL S, CHANGAN S, SENAPATHY M, BERWAL M K, SAMPATHRAJAN V, SAYED A A. Plant-based proteins and their multifaceted industrial applications[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 154: 112620.
- [3] BARRETO PEIXOTO J A, SILVA J F, OLIVEIRA M B P, ALVES R C. Sustainability issues along the coffee chain: from the field to the cup[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2023, 22(1): 287-332.
- [4] 黄家雄, 吕玉兰, 李维锐, 夏兵, 项希希, 周雪芳, 罗心平. 中国咖啡产业发展报告(2022)[J]. *热带农业科技*, 2023, 46(4): 1-5.
HUANG J X, LYU Y L, LI W R, XIA B, XIANG X X, ZHOU X F, LUO X P. Report on china coffee industry in 2022[J]. *Tropical Agricultural Science & Technology*, 2023, 46(4): 1-5. (in Chinese)
- [5] 赵茜, 苗玥, 季圣阳, 闫林, 李也, 张芳, 龚加顺, 陆柏益. 咖啡豆品质评价体系构建及国产咖啡豆品质评价[J]. *食品科学*, 2024, 45(3): 193-202.
ZHAO Q, MIAO Y, JI S Y, YAN L, LI Y, ZHANG F, GONG J S, LU B Y. Quality evaluation of coffee beans and screening of characteristic indexes[J]. *Food Science*, 2024, 45(3): 193-202. (in Chinese)
- [6] WEN L, ÁLVAREZ C, ZHANG Z, POOJARY M M, LUND M N, SUN D, TIWARI B K. Optimisation and characterisation of protein extraction from coffee silverskin assisted by ultrasound or microwave techniques[J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2021, 11: 1575-1585.
- [7] 甄鹏晨, 高育哲. 咖啡豆蛋白质的提取工艺条件优化及其成分研究[J]. *现代食品*, 2018(10): 172-176.
ZHEN P C, GAO Y Z. Coffee bean protein extraction conditions and constituents optimization[J]. *Process Technology*, 2018(10): 172-176. (in Chinese)
- [8] WEN C, LIU G Y, REN J Y, DENG Q C, XU X, ZHANG J X. Current progress in the extraction, functional properties, interaction with polyphenols, and application of legume protein[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(4): 992-1002.
- [9] ZHAO R T, PEI D, YU P L, WEI J T, WANG N L, DI D L, LIU Y W. Aqueous two-phase systems based on deep eutectic solvents and their application in green separation processes[J]. *Journal of Separation Science*, 2020, 43(1): 348-

- 359.
- [10] SIM S Y J, SRV A, CHIANG J H, HENRY C J. Plant proteins for future foods: a roadmap[J]. *Foods*, 2021, 10(8): 1967.
- [11] DAY L, CAKEBREAD J A, LOVEDAY S M. Food proteins from animals and plants: differences in the nutritional and functional properties[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 119: 428-442.
- [12] 穆利霞, 廖森泰, 詹宝瑟, 邹宇晓, 刘军. 超声处理对碱法制备蚕蛹蛋白条件的优化[J]. *热带作物学报*, 2014, 35(5): 1005-1011.
- MU L X, LIAO S T, ZHAN B S, ZOU Y X, LIU J. Optimization of ultrasonic treatment on preparation of silkworm pupa protein by alkaline extraction[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2014, 35(5): 1005-1011. (in Chinese)
- [13] WANG Q, WANG Y, HUANG M G, HAYAT K, KURTZN C, WU X, AHMAD M, ZHENG F P. Ultrasound-assisted alkaline proteinase extraction enhances the yield of pecan protein and modifies its functional properties[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021, 80: 105789.
- [14] MALIK M A, SHARMA H K, SAINI C S. High intensity ultrasound treatment of protein isolate extracted from dephenolized sunflower meal: effect on physicochemical and functional properties[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017, 39: 511-519.
- [15] 洪启迪, 董文江, 梅丽宝, 龙宇宙, 胡荣锁, 初众, 王海茹. 基于热诱导的绿咖啡油氧化过程解析及活性成分变化规律研究[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(11): 3327-3338.
- HONG Q D, DONG W J, MEI L B, LONG Y Z, HU R S, CHU Z, WANG H R. Exploration of the accelerated oxidation process and change rule of bioactive components from green coffee oil based on thermal induction[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42(11): 3327-3338. (in Chinese)
- [16] RAJHA H N, MHANNA T, EI KANTAR S, EL KHOURY A, LOUKA N, MAROUN R G. Innovative process of polyphenol recovery from pomegranate peels by combining green deep eutectic solvents and a new infrared technology[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2019, 111: 138-146.
- [17] CHEN Q, CHAIHU L X, YAO X P, CAO X W, BI W T, LIN J, CHEN D D Y. Molecular property-tailored soy protein extraction process using a deep eutectic solvent[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2021, 9(30): 10083-10092.
- [18] 韩玮, 杨芙莲, 董文宾, 冯丽琴. 夏秋茶中茶蛋白的提取工艺研究[J]. *食品科技*, 2017, 42(2): 226-231.
- HAN W, YANG F L, DONG W B, FENG L Q. Extraction technology of tea protein in tea[J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(2): 226-231. (in Chinese)
- [19] MENG Y, LIANG Z, ZHANG C, HAO S Q, HAN H Y, DU P, LI A L, SHAO H, LI C, LIU L B. Ultrasonic modification of whey protein isolate: implications for the structural and functional properties[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 152: 112272.
- [20] LV S Y, TAHA A, HU H, LU Q, PAN A Y. Effects of ultrasonic-assisted extraction on the physicochemical properties of different walnut proteins[J]. *Molecules*, 2019, 24(23): 4260.
- [21] SUN X Y, ZHANG W, ZHANG L F, TIAN S J, CHEN F S. Effect of ultrasound-assisted extraction on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(3): 1150-1160.
- [22] ZHAO Q L, XIE T T, HONG X, ZHOU Y L, FAN L P, LIU Y F, LI J W. Modification of functional properties of perilla protein isolate by high-intensity ultrasonic treatment and the stability of o/w emulsion[J]. *Food Chemistry*, 2022, 368: 130848.
- [23] ALMEIDA F S, DIAS F F G, SATO A C K, DE MOURA J M L N. From solvent extraction to the concurrent extraction of lipids and proteins from green coffee: an eco-friendly approach to improve process feasibility[J]. *Food and Bioprocesses Processing*, 2021, 129: 144-156.
- [24] LIU Y, MA X Y, LIU L N, XIE Y P, KE Y J, CAI Z J, WU G J. Ultrasonic-assisted extraction and functional properties of wampee seed protein[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 39: 324-331.
- [25] 李普, 刘贵梅, 卢永翎, 郑铁松, 吕丽爽. 小麦醇溶蛋白糖基化改性过程中有害产物形成的影响因素分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(15): 10-16.
- LI P, LIU G M, LU Y X, ZHENG T S, LYU L S. Analysis of factors influencing on the formation of harmful products during glycosylation of wheat gliadin[J]. *Food Science*, 2018, 39(15): 10-16. (in Chinese)
- [26] HU H, WU J H, LI-CHAN E C, ZHU L, ZHANG F, XU X Y, FAN G, WANG L F, HUANG X J, PAN S Y. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 30(2): 647-655.
- [27] LIANG Q F, REN X F, QU W J, ZHANG X, CHENG Y, MA H L. The impact of ultrasound duration on the structure of β -lactoglobulin[J]. *Journal of Food Engineering*, 2021, 292: 110365.
- [28] ZHAO L, CHENG X Y, SONG X Y, OUYANG D Y, WANG J, WU Q Y, JIA J Q. Ultrasonic assisted extraction

- of mulberry leaf protein: kinetic model, structural and functional properties, *in vitro* digestion[J]. *Process Biochemistry*, 2023, 128: 12-21.
- [29] RAHMAN M M, LAMSAL B P. Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: impact on physicochemical, functional, and nutritional properties[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(2): 1457-1480.
- [30] DING Y, MA H, WANG K, AZAM S, WANG Y, ZHOU J, QU W. Ultrasound frequency effect on soybean protein: acoustic field simulation, extraction rate and structure[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 145: 111320.
- [31] NAIK M, NATARAJAN V C, MODUPALLI N, THANGARAJ S, RAWSON A. Pulsed ultrasound assisted extraction of protein from defatted Bitter melon seeds (*Momordica charantia* L.) meal: kinetics and quality measurements[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 155: 112997.
- [32] ZHANG J, LUO D L, XIANG J L, XU W, XU B C, LI P Y, HUANG J H. Structural variations of wheat proteins under ultrasound treatment[J]. *Journal of Cereal Science*, 2021, 99: 103219.
- [33] 殷春燕, 咎立峰, 邢浩春, 张献忠, 李丹, 李静, 连启蒙. 超声辅助提取对蛋白质的功能性质和结构影响的研究进展[J]. *食品科技*, 2022, 47(1): 246-253.
- YIN C Y, ZAN L F, XING H C, ZHANG X Z, LI D, LI J, LIAN Q M. Recent advances on the effect of ultrasound-assisted extraction on the structure and functional properties of protein[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(1): 246-253. (in Chinese)
- [34] LI A, GUO Z H, WANG Z R, YANG Q Q, WEN L Y, XIANG X W, KAN J Q. Effect of multiple-frequency ultrasound-assisted transglutaminase dual modification on the structural, functional characteristics and application of Qingke protein[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2023, 94: 106317.
- [35] ZHANG F X, YUE Q, LI X, KONG B H, SUN F D, CAO C N, ZHANG H W, LIU Q. Mechanisms underlying the effects of ultrasound-assisted alkaline extraction on the structural properties and *in vitro* digestibility of *Tenebrio molitor* larvae protein[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2023, 94: 106335.
- [36] HUANG L R, DING X N, DAI C H, MA H L. Changes in the structure and dissociation of soybean protein isolate induced by ultrasound-assisted acid pretreatment[J]. *Food Chemistry*, 2017, 232: 727-732.
- [37] SUN X Y, ZHANG W, ZHANG L F, TIAN S J, CHEN F S. Molecular and emulsifying properties of arachin and conarachin of peanut protein isolate from ultrasound-assisted extraction[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 132: 109790.
- [38] TANG C H, WANG X Y, YANG X Q, LI L. Formation of soluble aggregates from insoluble commercial soy protein isolate by means of ultrasonic treatment and their gelling properties[J]. *Journal of Food Engineering*, 2009, 92(4): 432-437.
- [39] JIANG L, WANG J, LI Y, WANG Z J, LIANG J, WANG R, CHEN Y, MA W J, QI B K, ZHANG M. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates[J]. *Food Research International*, 2014, 62: 595-601.
- [40] CHEN W, MA H, WANG Y. Recent advances in modified food proteins by high intensity ultrasound for enhancing functionality: potential mechanisms, combination with other methods, equipment innovations and future directions[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2022, 85: 105993.
- [41] CUI Q, WANG X, WANG G R, LI R, WANG X D, CHEN S, LIU J N, JIANG L Z. Effects of ultrasonic treatment on the gel properties of microbial transglutaminase crosslinked soy, whey and soy-whey proteins[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2019, 28: 1455-1464.
- [42] WANG F, ZHANG Y Z, XU L, MA H L. An efficient ultrasound-assisted extraction method of pea protein and its effect on protein functional properties and biological activities[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 127: 109348.
- [43] LI W Y, YANG H R, COLDEA T E, ZHAO H F. Modification of structural and functional characteristics of brewer's spent grain protein by ultrasound assisted extraction[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 139: 110582.
- [44] DONG Z Y, LI M Y, TIAN G, ZHANG T H, REN H, QUEK S Y. Effects of ultrasonic pretreatment on the structure and functionality of chicken bone protein prepared by enzymatic method[J]. *Food Chemistry*, 2019, 299: 125103.