

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241112005

引用格式: 李佳琪, 雷一铭, 毕晟贇, 等. 不同 pH 对马铃薯蛋白理化性质的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(5): 246–254.

LI JQ, LEI YM, BI SY, *et al.* Effects of different pH on the physicochemical properties of *Solanum tuberosum* L. protein [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(5): 246–254. (in Chinese with English abstract).

不同 pH 对马铃薯蛋白理化性质的影响

李佳琪, 雷一铭, 毕晟贇, 陈琼玲, 陈振家*

(山西农业大学食品科学与工程学院, 晋中 030801)

摘要: 目的 探究 pH 处理对马铃薯蛋白结构和功能特性的影响。**方法** 以马铃薯蛋白为研究对象, 通过荧光光谱、傅里叶变换红外光谱、粒径和电位、扫描电镜等方法分析 pH 对其物化性质、结构和构象的影响。

结果 不同 pH 处理后的蛋白质亚基组成、粒径分布、电位值等所得结果有显著差异。与 pH 7 相比, pH 10 条件下增强了马铃薯蛋白质的静电斥力, 蛋白溶解度和黏度显著提高, 分别为 89.2%、19625.0 mPa·s; 蛋白内源荧光光谱中 λ_{\max} 红移至 343 nm, 暴露了更多的疏水基团; 蛋白分子的粒径减小为 123.2 nm, Zeta 电位绝对值增大至 41.3 mV, 蛋白质分子形成分子内二硫键从而使得变性温度增加至 82.22 °C。而 pH 2 条件下, 蛋白在去折叠的同时发生聚集并形成可溶性聚集体, 但黏度下降为 1860.6 mPa·s, 蛋白荧光光谱中 λ_{\max} 蓝移至 341 nm, 粒径增加至 369.3 nm, Zeta 电位绝对值减小到 8.97 mV, 二硫键数量未有显著性改变, 这使得酸性条件下马铃薯蛋白的稳定性不足且有聚集趋势。**结论** 不同 pH 处理均会改善马铃薯蛋白的理化性质, 本研究以为马铃薯蛋白在食品加工中的应用提供科学指导。

关键词: 马铃薯蛋白; pH; 疏水性; 聚集; 亚基组成

Effects of different pH on the physicochemical properties of *Solanum tuberosum* L. protein

LI Jia-Qi, LEI Yi-Ming, BI Sheng-Yun, CHEN Qiong-Ling, CHEN Zhen-Jia*

(College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China)

ABSTRACT: Objective To elucidate the influence of pH treatment on the structural and functional properties of *Solanum tuberosum* L. protein. **Methods** *Solanum tuberosum* L. protein was selected as the research subject, and the effects of pH on its physical and chemical properties, structure, and conformation were analyzed by fluorescence spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, particle size and potential analysis, and scanning electron microscopy. **Results** Significant differences were observed in the protein subunit composition, particle size distribution, and potential values following treatments at different pH levels. Compared to pH 7, pH 10 enhanced the

收稿日期: 2024-11-12

基金项目: 山西省回国留学人员科研资助项目(2024-066); 山西省基础研究计划自然科学研究面上项目(20210302123399); 山西省后稷实验室自主立项课题项目(202304010930003-30)

第一作者: 李佳琪(2000—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为植物蛋白提取分离及修饰改性。E-mail: Lijiaqi1529132@163.com

*通信作者: 陈振家(1981—), 男, 副教授, 主要研究方向为植物蛋白提取分离及修饰改性、杂粮深加工与产品开发。E-mail: 13453216350@163.com

electrostatic repulsion of *Solanum tuberosum* L. proteins, significantly increasing protein solubility and viscosity to 89.2% and 19625.0 mPa · s, respectively. Additionally, λ_{\max} in the endogenous fluorescence spectra of the proteins shifted to 343 nm, exposing more hydrophobic groups. The particle size of protein molecules decreased to 123.2 nm, while the absolute value of the Zeta potential increased to 41.3 mV. Protein molecules formed intramolecular disulfide bonds, leading to an increase in the denaturation temperature to 82.22 °C. At pH 2, the protein aggregated and formed soluble aggregates while unfolding. However, viscosity decreased to 1860.6 mPa · s, λ_{\max} in the fluorescence spectrum shifted to 341 nm, particle size increased to 369.3 nm, the absolute value of the Zeta potential decreased to 8.97 mV, and the number of disulfide bonds did not change significantly. This resulted in insufficient stability of *Solanum tuberosum* L. protein under acidic conditions, with a tendency for aggregation. **Conclusion** Different pH treatments can enhance the physicochemical properties of *Solanum tuberosum* L. protein, and this study aims to offer scientific guidance for its application in food processing.

KEY WORDS: *Solanum tuberosum* L. protein; pH; hydrophobicity; aggregation; subunit composition

0 引言

马铃薯是全球第 4 大作物。根据国家统计局 2024 年提供的统计数据,我国的马铃薯年产量为 1909 万 t,主要用于制备新鲜和加工食品^[1]。长期以来,马铃薯的消费一直与人类的生活健康水平息息相关,因为马铃薯中含有丰富的碳水化合物、蛋白质、膳食纤维、维生素、矿物质和多酚^[2]。其中,淀粉含量约 9.0%~20.0%,蛋白质 1.5%~2.3%,脂肪 0.1%~1.1%,粗纤维 0.6%~0.8%。此外,马铃薯可以加工成面粉,通过蒸煮、干燥、研磨和筛分可以获得营养均衡的马铃薯粉^[3-4],以延长其应用和保质期。马铃薯浆渣中含有大约 2%~5%的固体,其中 35%是含氮物质,即蛋白质、肽和氨基酸^[5]。马铃薯蛋白作为马铃薯淀粉加工的副产物,若将其转化为高附加值的成分将产生重要的经济和环境影响。因此,马铃薯蛋白的回收利用具有重要的意义^[6-7]。

马铃薯蛋白作为人类消费的蛋白质来源引起了越来越多的关注。与来自其他蔬菜和谷物来源的其他蛋白质相比,马铃薯蛋白被认为是更高质量的,因为它们含有高比例的赖氨酸,具有平衡的氨基酸组成^[7-8],与全蛋的营养品质相当;还有显著的生物活性特性,包括抗氧化、抗炎和抗菌作用^[9]。马铃薯蛋白因其营养特性和可持续性潜力而作为潜在的替代蛋白质来源,在食品应用中具有很高的利用潜力。马铃薯可溶性蛋白质主要包括糖蛋白(43 kDa)、蛋白酶抑制剂(5~25 kDa)和其他(主要是高分子量)^[10-11]。通过酸碱处理、加热及超声波处理等物理化学方法可有效修饰蛋白质结构并增强其功能特性。其中 pH 变化处理是一种改变蛋白质功能特性的高效化学方法^[12]。蛋白质对 pH 的变化很敏感,因此蛋白质在极端 pH 下可以诱导其结构和功能特性的改变^[13]。当蛋白质暴露在远离蛋白质等电点的极端碱性或酸性 pH 条件下时,蛋白质之间的排斥力增加将导致蛋白质分子部分解折叠。这种展开和重折叠过程显著改变了蛋白质的结构和功能特性。例如,研究发现,

在弱酸性 pH 条件下,蛋白的变性和聚集速度很快,提高了表面疏水性,而碱性 pH 水平会导致这些聚集体中二硫键的形成增加^[14];极端酸性或碱性 pH 条件下的 pH 变化显著增强了蛋白的发泡性能。在其他研究中,发现 pH 变化已成功用于改善植物蛋白的凝胶和乳化特性^[15-17]。

马铃薯蛋白具有的功能和生物活性特性,能使其在各种食品和健康应用中发挥价值。通过超声处理^[9]、调整盐浓度、蛋白酶活性和蛋白质浓度等因素,可以增强马铃薯蛋白的功能特性,包括蛋白质溶解性、乳化活性、乳化稳定性和凝胶化能力^[14-15]。这些特性对于它们在食品加工中的应用至关重要,有助于改善食品的质地、稳定性和质量。马铃薯蛋白在食品应用中有许多方面,例如制作基于马铃薯蛋白的乳液、婴儿配方奶粉、面条^[4]、饮料和各种烘焙产品。此外,马铃薯蛋白还用于制备鱼粉、宠物食品和肉制品,具有丰富的应用潜力。目前人们对于优质蛋白质的需求不断增长,这推动了对替代和可持续蛋白质来源的探索,且关于 pH 对马铃薯蛋白质的影响的研究较少,特别是在改善马铃薯蛋白质的功能、结构、生物活性方面。因此,本研究使用碱提酸沉法从马铃薯中提取蛋白,采用荧光光谱、傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectrometer, FTIR)、粒径和电位、扫描电镜等手段研究 pH 对马铃薯蛋白的物化特性和稳定性的影响,为马铃薯的多功能应用开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

马铃薯,青薯 9 号,产自山西省。

低分子量蛋白标样(14.4~97.4 kDa)、 β -巯基乙醇、溴酚蓝、过硫酸铵(ammonium persulphate, AP)、四乙基乙二胺(N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, TEMED)(分析纯,北京索莱宝科技有限公司);三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris]、三羟甲基氨基

甲烷盐酸盐[tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride, Tris-HCl]、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、甘氨酸(分析纯,上海生物工程试剂有限公司);5,5-二硫代双[5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB](分析纯,上海阿拉丁生化科技有限公司);硫酸、盐酸(HCl)(分析纯,天津天力化学试剂有限公司);无水乙醇(分析纯,天津北辰方正有限公司);亚硫酸氢钠(NaHSO_3)、氢氧化钠(NaOH)、尿素、溴化钾、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

D2015W 电动搅拌器(上海思乐仪器有限公司); Nano ZS-90 型 Zeta 电位仪(英国 Malvern 公司); UV-6100 紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); DYY-7C 型电泳仪(北京六一生物科技公司); MCR-302 流变仪(奥地利 Anton Paar 公司); DSC3 差示扫描量热(differential scanning calorimetry, DSC)仪(瑞士 Mettler 公司); JSM-7500F 扫描电子显微镜(日本 Jeol 公司); RF-5301 荧光光谱仪[岛津国际贸易(上海)有限公司]。

1.3 试验方法

1.3.1 马铃薯蛋白的制备

参考 HU 等^[7]、LIU 等^[18]、FU 等^[19]的方法马铃薯清洗干净去皮切块,按薯与水的质量比(1:2)用组织捣碎机将其磨碎成浆,打浆过程中加入 1%的 NaHSO_3 防止被氧化,并用胶体磨处理 3 次,每次 1 min,后用 4 层纱布过滤,滤液静置后用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 8.5,常温下搅拌 2 h 后,3500 r/min 离心 15 min,上清液用 HCl 调节 pH 至 4.6,常温下沉淀 1 h,3500 r/min 离心 10 min,去除上清液。后用超纯水溶解沉淀,水洗至电导率小于 100,所得沉淀经真空冷冻干燥得到马铃薯蛋白。马铃薯蛋白在 pH 中性、碱性或者强酸性时溶解度较高,故选取 pH 为 2、7、10 开展后续实验,其中 pH 7 为未处理组。

1.3.2 马铃薯蛋白溶解度的测定

测定样品的溶解性。将样品配制成的溶液(1 mg/mL)用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 分别调节 pH 至 2、7、10,然后将样品以 10000 r/min 离心 10 min,获得澄清上清液。采用考马斯亮蓝法在 595 nm 下测得上清液中蛋白质浓度,每个样品平行测定 3 次,最终根据标准曲线计算出马铃薯蛋白的溶解度。

1.3.3 马铃薯蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的测定

配制 2%的蛋白溶液在室温下搅拌 2 h,分别调节 pH 至 2、7、10,10000 r/min 离心 10 min,将得到的上清、沉淀冷冻干燥后制备上样液。

浓缩胶:30%丙烯酰胺单体注射液、1 mol/L pH 6.8 Tris-HCl、10% SDS、10% AP、TEMED;分离胶:30%丙烯

酰胺单体注射液、1 mol/L pH 8.8 Tris-HCl、10% SDS、10% AP、TEMED。按浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),电泳过程中,保持浓缩胶电流 100 V,分离胶电流 150 V。电泳结束后,电泳胶片染色 50 min,染色结束后,用醋酸-乙醇溶液对胶片进行脱色,直至底色基本脱去后,扫描成像。

1.3.4 马铃薯蛋白黏度的测定

配制质量分数为 3%的蛋白溶液,分别调节 pH 至 2、7、10,3000 r/min 离心 10 min,用流变仪分别在 25 °C 下以 0.5%的固定应变在 0.10~100.00 rad/s 的范围内进行频率扫描,测定在不同剪切速率下的黏度值^[20]。

1.3.5 马铃薯蛋白内源性荧光光谱扫描

配制成 1 mg/mL 的蛋白溶液,室温下搅拌 2 h,分别调节 pH 至 2、7、10,后稀释至 0.3 mg/mL。利用荧光光谱仪进行荧光光谱扫描,激发波长为 290 nm,发射波长为 300~400 nm,激发和发射缝宽均为 2.5 nm,扫描速率 10 nm/min,以水作为空白。

1.3.6 马铃薯蛋白傅里叶红外光谱测定

按照样品粉末和干燥的溴化钾质量比 1:100 称取并研磨混匀,置于研钵中研磨均匀后压片^[21]。参数设定为:温度:25 °C,波长范围:4000~400 cm^{-1} ,扫描次数:64 次,扫描速率:4 cm^{-1} ,用 PeakFit4.12 软件对酰胺 I 带(1600~1700 cm^{-1})进行图谱分析,对样品的红外图谱进行基线校正,校正后进行二阶导数拟合,直至拟合残差最小分析,并计算样品各二级结构的百分含量。

1.3.7 马铃薯蛋白粒径及 Zeta 电位的测定

用水配制成 1 mg/mL 的蛋白溶液,调节 pH 至 2、7、10,然后将样品以 10000 r/min 离心 10 min,过 0.45 μm 滤膜。在样品池中加入 1 mL 试样,分散介质设定为水,分散剂折射率为 1.330,材料折射率为 1.450,25 °C 下平衡 120 s,采用 Nano ZS-90 型 Zeta 电位仪测定粒径分布和 Zeta 电势^[22]。

1.3.8 马铃薯蛋白总巯基的测定

使用 Ellman 试剂确定马铃薯蛋白的总巯基^[23]。定量马铃薯蛋白加入反应缓冲液:0.1 mol/L pH 8.0 磷酸钠缓冲液,含 1 mmol/L EDTA,8 mol/L 尿素,用于总巯基基团。将冷冻干燥后的马铃薯蛋白粉(pH 2、7、10)配制成 5 mg/mL 的溶液,室温下搅拌 2 h 后 10000 r/min 离心 10 min。取 5.5 mL 上清液加入 100 μL 的 Ellman 试剂(4 mg/mL DTNB 于缓冲液中),然后将该溶液在室温下避光放置 15 min,在 412 nm 下测量吸光度。将缓冲液用作试剂空白,根据标准曲线换算总巯基含量。

1.3.9 马铃薯蛋白差示扫描量热的测定

配制 2%的蛋白溶液在室温下搅拌 2 h,分别调节 pH 至 2、7、10 并冷冻干燥。用差示扫描量热仪进行 DSC 的测定^[24]。称取冷冻干燥后的样品约 3 mg 于标准铝锅中,在

反应室中加热, 温度为 30~120 °C, 升温速度为 10 °C/min, 氮气速度为 50 mL/min, 以空铝锅作为参比。

1.3.10 马铃薯蛋白扫描电子显微镜的测定

使用 JSM-7500F 扫描电子显微镜观察不同处理的马铃薯蛋白粉(pH 2、7、10)的形态特征。将每个样品轻轻地涂在固定到铜短柱的双面胶带上。在涂覆金箔后, 在 10 kV 加速电压下观察样品。样品置于载物台的双面胶带上, 洗耳球吹去多余粉末, 对样品进行喷金后通过扫描电子显微镜进行观察。

1.4 数据处理

每组实验重复 3 次, 实验结果用平均值±标准偏差表示, 利用 Origin 2021 软件作图, 通过 SPSS 26 软件对数据进行 Duncan 法分析, 显著水平为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 马铃薯蛋白的蛋白质溶解度及亚基分布

pH 被认为是维持蛋白质性质和净电荷分布的有效和重要因素之一。蛋白质通常在低酸性和高碱性 pH 区域具有最大溶解度, 这是由于它们的净电荷的相似性以及相似电荷之间的电排斥。因此, 在其等电点 pH (isoelectric point, pI) 下观察到最小蛋白质溶解度, 因为分子的静电排斥力以及水-蛋白质相互作用在该点最小化, 这导致形成蛋白质-蛋白质键和凝结核。然而, 使 pH 与 pI 值保持距离会增加净电荷, 从而增加排斥力, 从而改善溶解度^[25-26]。

由图 1A 可知, 溶解度结果显示为: pH 10>pH 2>pH 7, 分别为 89.2%、54.0%、40.5%。这可能是由于构象变化、蛋白质净电荷的变化导致的微小差异。离子间相互作用可以促进蛋白质和溶剂的相互作用, 疏水相互作用使蛋白质分子间相互分离, 两种作用力变化可影响蛋白质的溶解

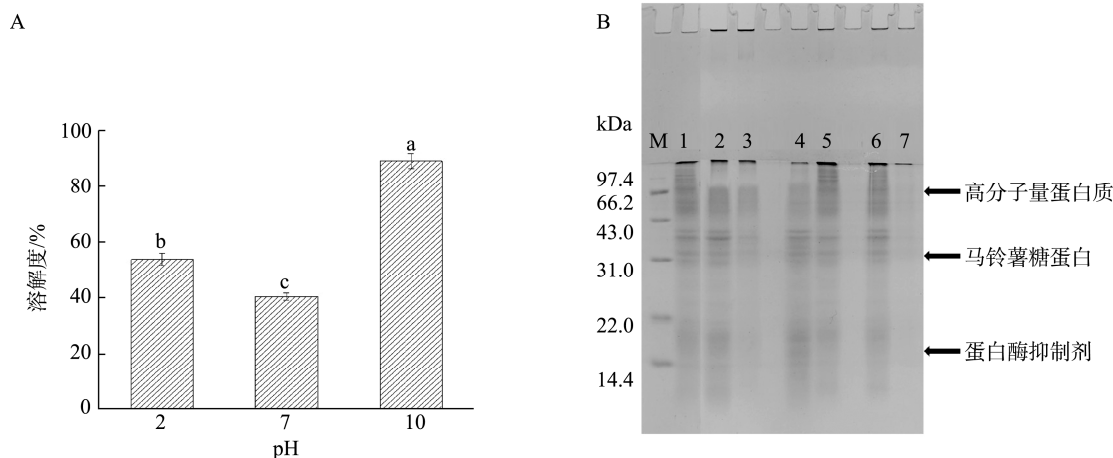
度。当蛋白质表面电荷减少, 分子间斥力减弱, 易发生碰撞、凝聚而产生沉淀, 导致溶解度降低, 反之溶解度提高。这是由于蛋白质是两性分子, 当其处于酸性介质时, 蛋白质分子大部分带正电荷, 分子之间互相排斥, 分子的分散性较好、溶解度较高, 但是随着 pH 的升高溶解度逐渐降低, 当达到等电点时蛋白质分子所带净电荷为零, 分子之间的排斥力消失, 溶解度降到最低值; 当蛋白质分子所处介质的大于蛋白质等电点, 蛋白质分子带负电荷, 溶解度又随着 pH 的升高而升高^[27]。

通过 SDS-PAGE 评估的马铃薯蛋白质的组成在图 1B 可见。从图中可以明显看出, 10~48 kDa 的蛋白质条带占优势, 表明马铃薯蛋白质中的主要部分由分子量(molecular weight, MW)为 39~45 kDa 的马铃薯糖蛋白、分子量为 5~25 kDa 的蛋白酶抑制剂和其他蛋白质(除马铃薯糖蛋白和蛋白酶抑制剂之外所有鉴定的马铃薯蛋白质), 其中马铃薯糖蛋白含量较多^[28-29]。这些条带还表明, 在马铃薯蛋白中存在一些具有不同 kDa 的其他小组分。

图 1B 中, pH 2、7、10 的蛋白上清溶液中均有马铃薯糖蛋白亚基和蛋白酶抑制剂, 而 pH 2 和 pH 10 中高分子量蛋白质条带颜色显著高于 pH 7, 这表明高分子量蛋白质的溶解度是造成不同 pH 条件下马铃薯蛋白溶解度的差异。而在 pH 2、7、10 的沉淀中, pH 10 的条带颜色明显比 pH 2 和 pH 7 的条带浅, 同时也印证了高分子量蛋白质在 pH 10 的条件下溶解度更高。

2.2 马铃薯蛋白黏度分析

溶液黏度通过蛋白质分子之间的吸引力和排斥力而增加。因此, 蛋白质结构对溶液黏度起着重要作用。通过频率扫描分析了样品的动态流变特性(图 2)。黏度随着剪切速率的增加而降低是典型的假塑性或剪切稀化流体的特征^[30]。



注: A 中不同字母表示显著差异($P<0.05$), 图 5、7、8 同; B 中 M 为低分子量蛋白质 Marker; 泳道 1~7 分别为马铃薯蛋白粉、pH 2 上清、pH 2 沉淀、pH 7 上清、pH 7 沉淀、pH 10 上清、pH 10 沉淀。

图 1 不同 pH 的马铃薯蛋白溶解度(a)及亚基(b)分布图

Fig.1 Distribution of *Solanum tuberosum* L. protein solubility (a) and subunits (b) at different pH

如图 2 所示,当频率从 0.10 增加到 100.00 rad/s 时,所有试样的表观黏度均降低,表明剪切稀化行为,具有非牛顿特性黏度的趋势。这可能是由于围绕颗粒的网络的破坏或分子之间的弱连接,或在施加的剪切速率下可溶性复合物结构的重排。低频率条件下,蛋白溶液的黏度表现为: $\text{pH } 10 > \text{pH } 7 > \text{pH } 2$, 为 19625.0、10070.0、1860.6 $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 。pH 10 条件下马铃薯蛋白溶解度最高且更多的高分子量蛋白质保持可溶,这是其黏度较大的原因。pH 2 条件下,虽然蛋白质溶解度较高,但酸性条件下,蛋白质会通过自折叠发生聚集形成可溶性聚集体,从而降低溶液黏度^[31-32]。

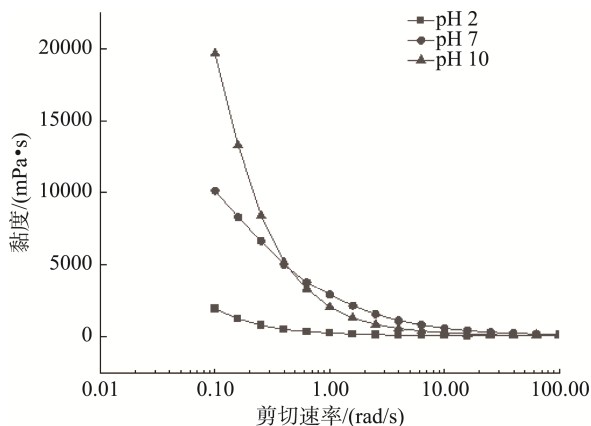


图 2 不同 pH 的马铃薯蛋白黏度图

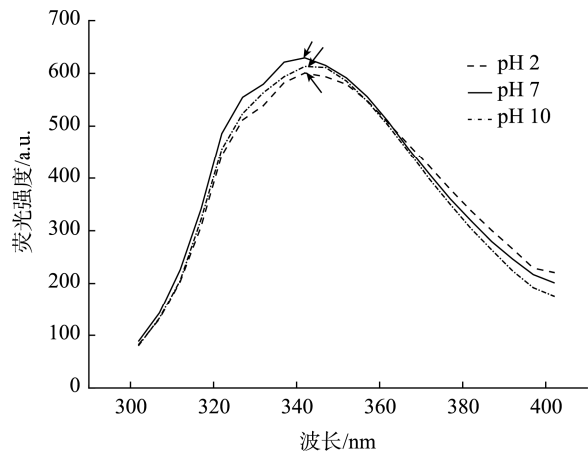
Fig.2 Viscosity of *Solanum tuberosum* L. proteins at different pH

2.3 马铃薯蛋白荧光光谱分析

蛋白的荧光光谱分析通常用于研究其结构、构象和相互作用等方面。蛋白质在紫外-可见光范围内的荧光主要来源于芳香族氨基酸(如色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸)的激发发射。通常会观察到部分峰和波谷,这些可以反映出蛋白质的结构和构象信息。例如,色氨酸通常在约 350 nm 处有峰值,而苯丙氨酸和酪氨酸通常在约 330 nm 处有峰值。根据荧光光谱的特征峰和波形,推断马铃薯蛋白的结构和构象信息^[33]。

为观察不同 pH 对荧光强度的影响,固定激发波长为 290 nm,得到马铃薯蛋白在不同 pH 下的发射波长如图 3 所示,可见在实验设置的 3 种 pH 下,最大吸收波长(λ_{max})从大到小依次为 pH 10、7、2,分别为 343、342、341 nm。荧光发射光谱能够灵敏反映蛋白质的构象和微环境的极性是否发生改变。内源荧光光谱中 λ_{max} 红移代表蛋白质中氨基酸残基微环境极性增强。碱处理会蛋白质空间结构的剧烈变化,肽链逐渐伸展,已暴露的疏水基团重新展开,氨基酸残基逐渐暴露在分子外部的极性环境中,蛋白质的内源荧光强度逐渐降低,产生荧光猝灭现象, λ_{max} 红移,这可能是 pH 10 λ_{max} 较大的原因。蛋白的 λ_{max} 经酸处理而出现蓝移的原因是疏水相互作用使已暴露的疏水基团重新聚集,

从而使色氨酸残基体系的非极性增强,这可能也是 pH 2 λ_{max} 较小的原因,也与其黏度变化一致^[34]。



注: 箭头表示所在峰的位置。

图 3 不同 pH 的马铃薯蛋白内源性荧光光谱图

Fig.3 Endogenous fluorescence spectra of *Solanum tuberosum* L. proteins at different pH

2.4 马铃薯蛋白傅里叶变换红外光谱分析

FTIR 是一种适用于确定蛋白质的二级结构和官能团范围的快速且非破坏性的方法,并且它给出了与蛋白质中化学键的振动状态相关的信息^[35-36]。FTIR 在 110 cm^{-1} 和 1700 cm^{-1} 之间的光谱部分具有关于多肽蛋白质构象的有价值的信息,其中最重要的是酰胺 I(光谱在 1600 cm^{-1} 和 1700 cm^{-1} 之间)。图 4 显示了马铃薯蛋白的 FTIR 光谱,马铃薯蛋白的红外光谱在 1654 cm^{-1} 处的特征峰,代表水分子和无定形分子中 O-H 的弯曲振动,在不同的 pH 下,没有显著差异。

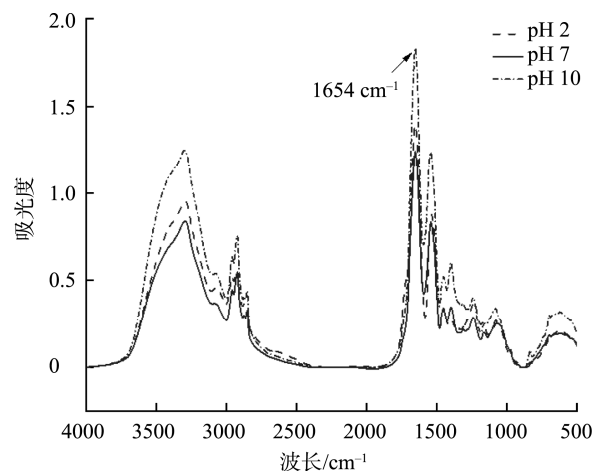


图 4 不同 pH 的马铃薯蛋白 FTIR 图

Fig.4 FTIR of *Solanum tuberosum* L. proteins at different pH

蛋白质的二级结构包括分子间 β -折叠($1610 \sim 1625 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1685 \sim 1695 \text{ cm}^{-1}$)、分子内 β -折叠($1630 \sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1670 \sim 1684 \text{ cm}^{-1}$)、无规则卷曲($1640 \sim 1648 \text{ cm}^{-1}$)、 α -螺旋

(1648~1659 cm^{-1})及 β -转角(1660~1668 cm^{-1})^[37]。图 5 显示了 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲的 FTIR 峰拟合后的二级结构比例图。由图可知, pH 2、7、10 的二级结构的相对含量均存在显著性差异($P<0.05$), 呈现不同的变化^[38]。与 pH 7 相比, pH 10 条件下马铃薯蛋白其波数在 1610~1625 cm^{-1} 分子间 β -折叠以及在 1630~1640 cm^{-1} 的分子内 β -折叠的含量均有显著差异($P<0.05$), 分别从 9.4%减少至 8.1%, 23.1%减少为 22.6%。碱性条件下马铃薯蛋白的构象会发生改变, β -折叠含量的升高(42.8%升为 43.1%)使蛋白质更为有序且具有更高的聚集倾向, 表明碱处理会使蛋白质分子二级结构发生改变, 从而变得稳定; 且 SDS-PAGE 中结果表明高分子量蛋白亚基敏感度较高, 可能是此亚基会使疏水暴露, 发生折叠或者去折叠过程, 形成更为有序的二级结构单元, 而酸处理却恰恰相反。

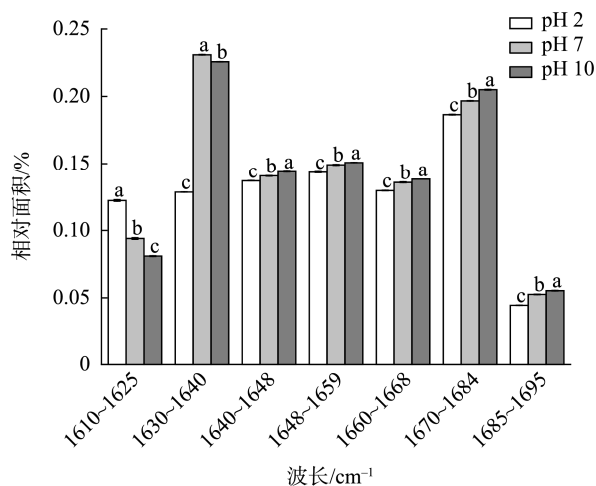


图 5 不同 pH 的马铃薯蛋白二级结构各含量的比例图
Fig.5 Proportion of each content of *Solanum tuberosum* L. protein secondary structure at different pH

2.5 马铃薯蛋白粒径及 Zeta 电位分析

蛋白质颗粒的大小在其功能特性中起着重要作用, 如蛋白质分散体的总大小会显著影响蛋白质的乳化和起泡能力^[35,39]。由图 6 和表 1 可知, 与未处理组相比, 酸处理可以使蛋白的粒径分布范围变窄和峰值变大, 并显著增大马铃薯蛋白的体积平均粒径($P<0.05$)。pH 从 7 调节至 10 导致粒度从 138.4 nm 降低至 123.2 nm, 可能是因为碱性条件诱导蛋白质之间更强的静电排斥。而 pH 从 7 降至 2 时, pH 超过 pI, 导致蛋白质沉淀, 从而粒度增大至 369.3 nm^[40]。

ζ 电位主要用于评价颗粒间的静电相互作用, 预测分散体系的稳定性。在一定条件下, ζ 势的绝对值越高, 表明粒子间的排斥力越大, 体系越稳定^[41]。由图 7 可知, Zeta 电位绝对值表现为 pH 10>pH 7>pH 2, 分别为 41.3、37.46、8.97 mV, 这些蛋白质在 pH 10 时相对稳定, 蛋白质表面电荷增加, 它们之间的强静电排斥, 不易发生碰撞, 故相对

稳定且导致溶解度升高。而在 pH 2 时, 蛋白质分子大部分带正电荷, 蛋白质的高净电荷增加了它们之间的静电排斥, 但疏水基团的暴露, 同时也促进了它们的聚集, 形成了可溶性聚集体, 使粒径增大^[20], 这也是 pH 2 条件下溶解度较高的原因。可能是由于蛋白质溶液 pH 的变化导致氨基酸的质子化或去质子化, 这反过来又改变了蛋白质分子的净表面电荷。普遍接受的是, 表面电荷在蛋白质分子稳定空气/水界面方面起着重要作用^[42]。

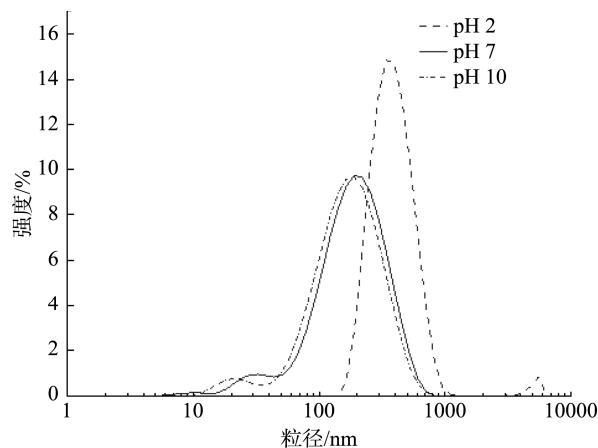


图 6 不同 pH 的马铃薯蛋白粒径分布图
Fig.6 Distribution of *Solanum tuberosum* L. protein particle size at different pH

表 1 不同 pH 的马铃薯蛋白平均粒径
Table 1 Average size of *Solanum tuberosum* L. protein at different pH

pH	平均粒径/nm
2	369.3±12.42 ^a
7	138.4±2.99 ^b
10	123.2±1.71 ^c

注: 表中不同小写字母代表显著差异($P<0.05$)

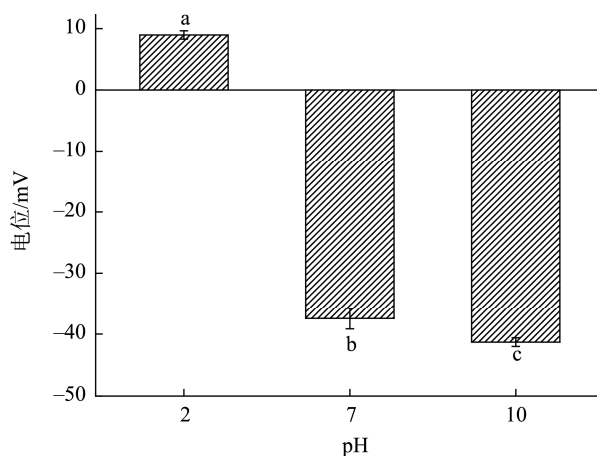


图 7 不同 pH 的马铃薯蛋白 Zeta 电位图
Fig.7 Zeta potential of *Solanum tuberosum* L. proteins at different pH

2.6 马铃薯蛋白总巯基分析

蛋白总巯基通常指的是蛋白质中所有巯基的总量,包括表面巯基和分子内包裹的巯基。巯基是一种含有硫的官能团,通常表示为-SH。在蛋白质中,巯基可以形成二硫键,这是蛋白质折叠和稳定化的重要结构特征之一。

如图 8 所示, pH 7 时马铃薯蛋白的总巯基含量为 33.65 $\mu\text{mol/g}$ 。pH 2 的总巯基含量最高,为 34.24 $\mu\text{mol/g}$, pH 10 的总巯基含量为 26.89 $\mu\text{mol/g}$ 。由图 8 可知,碱性条件使总巯基的含量下降,这可能是碱处理使蛋白质结构展开,由于蛋白在折叠的过程中发生了变性,使内部巯基暴露出来并形成分子内二硫键。在酸性条件下,蛋白质发生了聚集,蛋白质分子间静电排斥减弱,有利于分子的去折叠程度降低,巯基位点被包埋,没有新的二硫键形成^[43-44]。

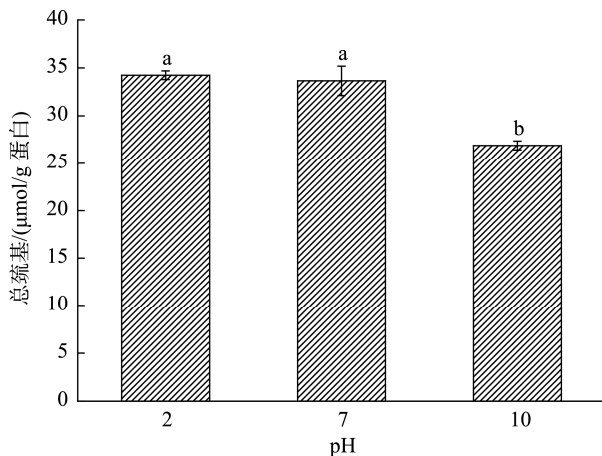


图 8 不同 pH 的马铃薯蛋白总巯基含量图

Fig.8 Plot of total sulfhydryl content of *Solanum tuberosum* L. proteins at different pH

2.7 马铃薯蛋白差示扫描量热分析

DSC 可以反映蛋白质结构稳定性,在蛋白质热变性的研究中应用广泛。蛋白质在吸热过程中,分子间作用力被破坏,蛋白质变性,当达到变性温度时,就会出现对应吸收峰,因此 DSC 峰值温度的变化可以反映蛋白质结构的变化,峰值温度越高,则蛋白质的热稳定性越强^[45]。

如图 9 所示,3 种蛋白的 DSC 曲线均显示了 1 个主要的吸热峰,表明在 30~120 $^{\circ}\text{C}$ 发生了蛋白质变性。pH 2、7 和 10 的主要放热峰分别集中在 72.93、72.12 和 82.22 $^{\circ}\text{C}$ 。结果表明, pH 10 条件下马铃薯蛋白比 pH 2 和 pH 7 的变性温度高,与其在此条件下二硫键的含量较高有关^[36]。

2.8 马铃薯蛋白颗粒形貌分析

扫描电镜是一种通过聚焦电子束扫描样品表面而成像的技术,可用来观察蛋白质的形状、大小和分布等微观结构^[24,46]。图 10a、b、c 分别为在 2000 倍下 pH 2、7 和 10 的扫描电子显微镜图。可以观察到 pH 7 的样品较聚集,

呈球状、碎片状、等不规则形状,表面光滑或凹凸不平。而 pH 2 和 pH 10 的蛋白颗粒较分散,呈现颗粒状。可能是由于在溶解过程 pH 10 条件下的部分蛋白质去折叠,会形成较为分散的颗粒状,而 pH 2 条件下部分球状蛋白质被解离后又重新聚集。

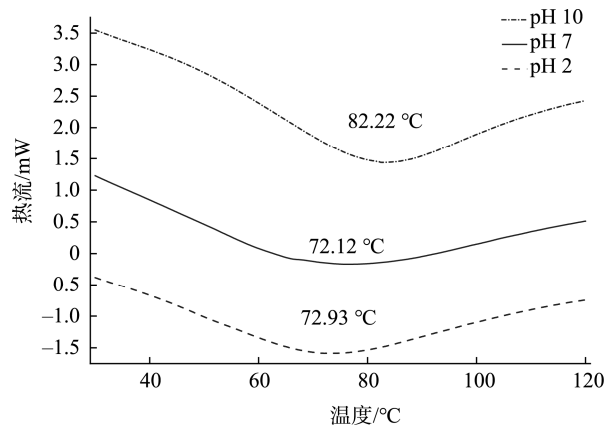
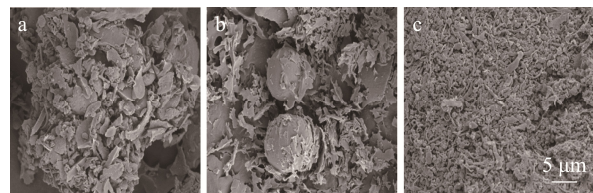


图 9 不同 pH 的马铃薯蛋白 DSC 图

Fig.9 DSC plots of *Solanum tuberosum* L. proteins at different pH



注: a. pH 2; b. pH 7; c. pH 10。

图 10 不同 pH 的马铃薯蛋白扫描电镜图

Fig.10 Scanning electron micrographs of *Solanum tuberosum* L. proteins at different pH

3 结 论

通过对不同 pH 的马铃薯蛋白理化性质的研究发现:相比 pH 7 的中性条件,碱性环境增强了马铃薯蛋白质的静电斥力,更多的高分子量蛋白亚基呈可溶状态,蛋白质肽链展开,暴露了更多的疏水基团,同时也暴露了一些巯基位点并形成了分子内的二硫键,增加了蛋白质的变性温度。但由于蛋白分子链展开的同时也增加了亲水基团的数量以及强静电排斥的存在,蛋白的结构更为有序且溶液体系趋于稳定。酸性环境也在一定程度上增强了蛋白质之间的静电斥力,促使部分高分子量蛋白亚基呈可溶状态,但蛋白质肽链展开的过程中,同时发生了蛋白聚集形成可溶性聚集体,二硫键数量未有显著性改变,这使得酸性条件下马铃薯蛋白的稳定性不足且有聚集趋势。由此可见, pH 可以显著改变马铃薯蛋白的理化特性,为马铃薯蛋白在食品加工中的应用提供理论参考科学指导。

参考文献

- [1] LIU X, MA Q, CHENG D, *et al.* Preparation and characterization of type 3 resistant starch by ultrasound-assisted autoclave gelatinization and its effect on steamed bread quality [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2023, 92: 106248.
- [2] KOCH M, NAUMANN M, PAWELZIK E, *et al.* The importance of nutrient management for potato production part I: Plant nutrition and yield [J]. *Potato Research*, 2020, 63(1): 97–119.
- [3] GONG S, LI W, YU Y, *et al.* Dynamic changes of proton populations in potato flours during fermentation and their relationship with digestibility and functional properties [J]. *Food Chemistry*, 2020, 313: 126161.
- [4] PU H, WEI J, WANG L, *et al.* Effects of potato/wheat flours ratio on mixing properties of dough and quality of noodles [J]. *Journal of Cereal Science*, 2017, 76: 236–242.
- [5] CHENG L, ZHANG X, HONG Y, *et al.* Characterisation of physicochemical and functional properties of soluble dietary fibre from potato pulp obtained by enzyme-assisted extraction [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 101: 1004–1011.
- [6] BEALS KA. Potatoes, nutrition and health [J]. *American Journal of Potato Research*, 2019, 96(2): 102–10.
- [7] HU C, HE Y, ZHANG W, *et al.* Potato proteins for technical applications: Nutrition, isolation, modification and functional properties-A review [J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2024, 91: 103533.
- [8] KÄRENLAMP I SO, WHITE PJ. Chapter 5-potato proteins, lipids, and minerals. *Advances in potato chemistry and technology* [M]. Second Edition. San Diego: Academic Press, 2009.
- [9] HUSSAIN M, QAYUM A, XIUXIU Z, *et al.* Potato protein: An emerging source of high quality and allergy free protein, and its possible future based products [J]. *Food Research International*, 2021, 148: 110583.
- [10] ALTING AC, POUVREAU L, GIUSEPPIN MLF, *et al.* 12-Potato proteins. *Handbook of food proteins* [M]. Cambridge: Woodhead Publishing, 2011.
- [11] WAGLAY A, KARBOUNE S. Chapter 4-potato proteins: Functional food ingredients. *Advances in potato chemistry and technology* [M]. Second Ed. San Diego: Academic Press, 2016.
- [12] WANG Y, WANG S, LI R, *et al.* Effects of combined treatment with ultrasound and pH shifting on foaming properties of chickpea protein isolate [J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 124: 107351.
- [13] WANG Y, YANG F, WU M, *et al.* Synergistic effect of pH shifting and mild heating in improving heat induced gel properties of peanut protein isolate [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 131: 109812.
- [14] ANDLINGER D J, RÖSCHEISEN P, HENGST C, *et al.* Influence of pH, temperature and protease inhibitors on kinetics and mechanism of thermally induced aggregation of potato proteins [J]. *Foods*, 2021, 10(4): 796.
- [15] SCHMIDT JM, DAMGAARD H, GREVE-POULSEN M, *et al.* Gel properties of potato protein and the isolated fractions of patatins and protease inhibitors-Impact of drying method, protein concentration, pH and ionic strength [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 96: 246–258.
- [16] GAO D, HELIKH A, DUAN Z, *et al.* Thermal, structural, and emulsifying properties of pumpkin seed protein isolate subjected to pH-shifting treatment [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2023, 17(3): 2301–2312.
- [17] PÉREZ-GÁLVEZ R, MALDONADO-VALDERRAMA J, JONES NC, *et al.* Influence of the enzymatic treatment and pH on the interfacial and emulsifying properties of sunflower and olive protein hydrolysates [J]. *Food Hydrocolloids*, 2024, 154: 110135.
- [18] LIU Z, WU Z, LI R, *et al.* Two-stage foam separation technology for recovering potato protein from potato processing wastewater using the column with the spiral internal component [J]. *Journal of Food Engineering*, 2013, 114(2): 192–198.
- [19] FU Y, LIU WN, SOLADOYE OP. Towards potato protein utilisation: Insights into separation, functionality and bioactivity of patatin [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2020, 55(6): 2314–2322.
- [20] TAN Y, WANNASIN D, MCCLEMENTS DJ. Utilization of potato protein fractions to form oil-in-water nanoemulsions: Impact of pH, salt, and heat on their stability [J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 137: 108356.
- [21] 罗明昌, 吴乐萍, 王一竹, 等. 蒸煮条件下马铃薯淀粉与大豆肽的相互作用及其产物结构特性的探究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(5): 1391–1398.
- [22] LUO MC, WU LP, WANG YZ, *et al.* Investigation of the interaction between potato starch and soybean peptide under cooking conditions and the structural properties of their products [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(5): 1391–1398.
- [23] SHEN L, TANG CH. Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate [J]. *Food Research International*, 2012, 48(1): 108–118.
- [24] SHEN X, FANG T, GAO F, *et al.* Effects of ultrasound treatment on physicochemical and emulsifying properties of whey proteins pre- and post-thermal aggregation [J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 63: 668–676.
- [25] HOU X, LI X, LI J, *et al.* Changes in the structural and physicochemical characteristics of sonicated potato flour [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2023, 99: 106573.
- [26] CHEN G, WANG S, FENG B, *et al.* Interaction between soybean protein and tea polyphenols under high pressure [J]. *Food Chemistry*, 2019, 277: 632–638.
- [27] YOUSEFI N, ABBASI S. Food proteins: Solubility & thermal stability improvement techniques [J]. *Food Chemistry Advances*, 2022, 1: 100090.
- [28] 孙莹, 周斌, 王龙, 等. 马铃薯蛋白组成、性质及其改性应用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(9): 36–44.
- [29] SUN Y, ZHOU B, WANG L, *et al.* Progress in the study of potato protein composition, properties and its modification applications [J]. *Food Industry Science and Technology*, 2024, 45(9): 36–44.
- [30] DU Y, CHEN F, ZHANG Y, *et al.* Potato protein isolate-based biopolymers [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2015, 132(44): 42723.
- [31] WAGLAY A, ACHOURI A, KARBOUNE S, *et al.* Pilot plant extraction of potato proteins and their structural and functional properties [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2019, 113: 108275.
- [32] CAO B, FANG L, LIU C, *et al.* Effects of high hydrostatic pressure on the functional and rheological properties of the protein fraction extracted from

- pine nuts [J]. *Food Science and Technology International*, 2017, 24(1): 53–66.
- [31] HONG T, IWASHITA K, SHIRAKI K. Viscosity control of protein solution by small solutes-A Review [J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2018, 19(8): 746–758.
- [32] LAN Y, CHEN B, RAO J. Pea protein isolate-high methoxyl pectin soluble complexes for improving pea protein functionality: Effect of pH, biopolymer ratio and concentrations [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 80: 245–253.
- [33] ZHANG Y, CHEN L, LV Y, *et al.* Inhibition of interaction between epigallocatechin-3-gallate and myofibrillar protein by cyclodextrin derivatives improves gel quality under oxidative stress [J]. *Food Research International*, 2018, 108: 8–17.
- [34] 吴晓娟, 王晓婵, 张佳妮. pH 值碱性偏移结合热处理对米糠蛋白结构和功能性质的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(4): 23–30.
- WU XJ, WANG XC, ZHANG JN. Effects of pH alkaline shift combined with heat treatment on the structural and functional properties of rice bran protein [J]. *Food Science*, 2021, 42(4): 23–30.
- [35] HUSSAIN M, QAYUM A, ZHANG X, *et al.* Improvement in bioactive, functional, structural and digestibility of potato protein and its fraction patatin via ultra-sonication [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 148: 111747.
- [36] ZHANG DQ, MU TH, SUN HN, *et al.* Comparative study of potato protein concentrates extracted using ammonium sulfate and isoelectric precipitation [J]. *International Journal of Food Properties*, 2017, 20(9): 2113–2127.
- [37] ZHANG Y, ZHANG X, ZHANG Z, *et al.* Effect of high hydrostatic pressure treatment on the structure and physicochemical properties of millet gliadin [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 154: 112755.
- [38] ZHU Y, YUAN YH, MEI LP, *et al.* Comparison of structural and physicochemical properties of potato protein and potato flour modified with tyrosinase [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2022, 21(5): 1513–1524.
- [39] 刘鑫硕. 超声处理马铃薯蛋白和蛋清蛋白混合凝胶性质研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- LIU XS. Study on the properties of mixed gels of potato protein and egg white protein by ultrasonic treatment [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
- [40] CHOI Y, LEE J, JO YJ, *et al.* High internal phase emulsions stabilized by physically modified mung bean protein isolates under different pHs [J]. *Food Hydrocolloids*, 2024, 155: 110200.
- [41] HAN W, SHI W, GONG D, *et al.* Improvement of solubility, emulsification property and stability of potato protein by pH-shifting combined with microwave treatment and interaction with pectin [J]. *Food Bioscience*, 2023, 56: 103301.
- [42] DACHMANN E, NOBIS V, KULOZIK U, *et al.* Surface and foaming properties of potato proteins: Impact of protein concentration, pH value and ionic strength [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 107: 105981.
- [43] DU X, ZHAO M, PAN N, *et al.* Tracking aggregation behaviour and gel properties induced by structural alterations in myofibrillar protein in mirror carp (*Cyprinus carpio*) under the synergistic effects of pH and heating [J]. *Food Chemistry*, 2021, 362: 130222.
- [44] CHEN L, ZHANG SB. Structural and functional properties of self-assembled peanut protein nanoparticles prepared by ultrasonic treatment: Effects of ultrasound intensity and protein concentration [J]. *Food Chemistry*, 2023, 413: 135626.
- [45] GUO Q, MU TH. Emulsifying properties of sweet potato protein: Effect of protein concentration and oil volume fraction [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(1): 98–106.
- [46] AHSAN M, ALI TM, HASNAIN A. Use of oxidized potato starch as simultaneous fat and casein replacer in analogue mozzarella cheese-I: Impact on rheological properties of cheese [J]. *Food Hydrocolloids*, 2024, 146: 109192.

(责任编辑: 安香玉 于梦娇)