

pH 值处理对热诱导马铃薯蛋白酶解物/果胶复合凝胶体系的形成影响

张婷婷^{1,2}, 刘维刚¹, 曾凡达^{1*}

(1. 中国科学院兰州化学物理研究所, 甘肃兰州 730000) (2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 马铃薯蛋白酶解物 (PPH) 因肽链断裂导致热诱导凝胶性能弱, 引入果胶 (PEC) 复配有望弥补这一不足。为探究 pH 值对 PPH-PEC 复合体系热诱导凝胶行为的影响, 本研究在不同 pH 值条件下制备 PPH-PEC 复合凝胶, 通过宏观观察、持水性 (WHC) 及溶解蛋白含量分析评估理化性质, 并借助激光共聚焦扫描显微镜 (CLSM) 及多种光谱技术 (FTIR、UV、荧光) 解析其微观结构形成规律。结果表明, 该体系仅在 pH 值 5、7、9 条件下形成完整凝胶, 其中 pH 值 7 时 WHC 最高 (87.62%), 显著高于 pH 值 5 (63.48%) 和 pH 值 9 (34.06%); 可溶性蛋白含量在 pH 值 9 时最高 (1.12 mg mL⁻¹), 参与网络构建的蛋白质最少。CLSM 显示, pH 值 7 时凝胶网络致密均匀, pH 值 5 时呈大孔不连续结构, pH 值 9 时肽链粗大聚集。FTIR 表明, pH 值 7 时 β -折叠和 α -螺旋含量最高, 氢键主导网络形成; pH 值 5 和 9 时无规卷曲含量较高, 疏水作用增强。紫外与荧光光谱证明, pH 值 7、9 条件下色氨酸残基发生轻微红移 (358 至 362 nm)。本研究为 PPH 凝胶食品开发及马铃薯蛋白高值化应用提供了理论依据。

关键词: 马铃薯蛋白酶解物; 果胶; pH 值调控; 复合凝胶; 热诱导凝胶

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.5.0358

Formation Mechanism of pH-Treated Heat-Induced Potato Protease Hydrolysate/Pectin Composite Gel System

ZHANG Tingting^{1,2}, LIU Weigang¹, ZENG Fankui^{1*}

(1. Research Center for Natural Medicine and Chemical Metrology, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China) (2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Potato protein hydrolysate (PPH) exhibits weak heat-induced gelation performance due to peptide chain cleavage, and the introduction of pectin (PEC) is expected to compensate for this deficiency. To investigate the effect of pH on the heat-induced gelation behavior of the PPH-PEC composite system, PPH-PEC composite gels were prepared under different pH conditions. The physicochemical properties were evaluated through macroscopic observation, water-holding capacity (WHC), and soluble protein content analysis, while the microstructure formation regularity was elucidated using confocal laser scanning microscopy (CLSM) and various spectroscopic techniques (FTIR, UV, fluorescence). The results showed that intact gels formed only at pH 5, 7, and 9. Among these, the WHC at pH 7 was the highest (87.62%), significantly higher than those at pH 5 (63.48%) and pH 9 (34.06%). The soluble protein content was highest at pH 9 (1.12 mg mL⁻¹), indicating the least amount of protein involved in network construction. CLSM revealed a dense and uniform gel network at pH 7, a large-pore discontinuous structure at pH 5, and coarse peptide aggregation at pH 9. FTIR analysis indicated that the contents of β -sheet and α -helix were the highest at pH 7, where hydrogen bonding dominated network formation, while random coil contents were higher at pH 5 and 9, where hydrophobic interactions were enhanced. UV and fluorescence spectroscopy confirmed that tryptophan residues underwent a moderate red shift (from 358 to 362 nm) at pH 7 and 9. This study provides a theoretical basis for the development of PPH gel-based foods and the high-value utilization of potato protein.

Key words: potato protease hydrolysate; pectin; pH control; composite gel; heat-induced gel

收稿日期: 2026-03-09; 修回日期: 2026-05-06; 接受日期: 2026-05-14

基金项目: 国家马铃薯产业技术体系 (CARS-09-P29); 甘肃省现代农业薯类产业技术体系 (GSARS-05)

作者简介: 张婷婷 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能复合材料, E-mail: zhangtingting@licp.cas.cn

通讯作者: 曾凡达 (1980-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品化学与加工技术, E-mail: zengfk@licp.cas.cn

随着全球健康意识的提高,食品消费正从单纯饱腹向天然、营养与功能性并重转变。在此背景下,开发基于天然植物蛋白的健康凝胶体系成为研究热点^[1]。植物蛋白凝胶不仅能为素食产品提供理想质构,还具备低胆固醇、低致敏性等优势,应用前景广阔^[2,3]。

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)作为全球重要的粮食作物,其淀粉加工副产物——马铃薯浓缩蛋白富含人体必需氨基酸,生物价高且营养均衡,是优质的植物蛋白资源^[4,5]。然而,天然马铃薯蛋白在提取过程中易发生不可逆变性,导致溶解性差、加工适应性低,严重制约了其高值化利用^[6-8]。虽然酶解技术制备的马铃薯蛋白酶解物(PPH)显著改善了溶解性和生物活性,但肽链断裂破坏了蛋白质形成连续网络的能力,导致其热诱导凝胶性能弱,难以单独应用。引入多糖进行复配改性成为解决这一难题的有效策略^[9]。果胶(PEC)作为一种天然的阴离子多糖,能通过静电相互作用和氢键与蛋白肽段结合,有望弥补 PPH 凝胶性的不足^[10-12]。

热诱导凝胶化通过加热促使蛋白质变性展开,暴露疏水基团及活性位点,进而聚集形成三维网络结构^[13]。该过程高度依赖环境因素,其中 pH 值是调控关键。pH 值决定蛋白质和多糖分子的净电荷、构象状态及分子间静电作用力的性质(吸引或排斥)^[14,15]。Jiang 等^[16]证明,pH 值变化可诱导亚基解离和结构解折叠,从而增强大豆分离蛋白的功能特性。具体而言,酸性条件下蛋白质带正电,促进与带负电多糖的静电吸引;碱性环境则改变电荷状态,重塑相互作用^[17]。

鉴于此,本研究旨在系统阐明 pH 值对 PPH-PEC 复合凝胶体系性能的调控机制。研究将聚焦于环境 pH 值如何通过改变体系内分子间的静电相互作用、氢键及疏水作用力,进而调控凝胶网络的微观结构与宏观理化性质。尽管蛋白-多糖体系的 pH 值效应已有报道,但针对高水解度 PPH 与 PEC 复配体系在宽 pH 值范围内的热诱导凝胶行为规律及深层机理尚不明确。

本研究将系统考察不同 pH 值处理对 PPH-PEC 复合体系的影响。首先,通过宏观成胶状态、持水性(WHC)及溶解蛋白含量分析,评估凝胶的基础形成能力与网络稳定性;其次,利用激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)直观表征微观相分离行为与网络形貌;最后,结合傅里叶变换红外光谱(FTIR)、紫外光谱(UV)及内源荧光光谱技术,深入解析不同 pH 值条件下 PPH 肽段的二级结构变化、微环境极性迁移及分子间作用力的动态平衡。通过上述多维度关联分析,本研究拟揭示 pH 值调控 PPH-PEC 复合凝胶形成的分子机理,以期为该复合体系的定向设计及马铃薯蛋白的高值化应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料

马铃薯浓缩蛋白,宁夏富农薯业有限公司(采用热絮凝法提取);BCA 试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;Alcalase 2.4L FG 碱性蛋白酶(Denmark, PLQ00004),诺维信生物技术有限公司;果胶(PEC:纯度 65%,来源于苹果),上海源叶生物有限公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

Eppendorf Centrifuge 5810R 高速冷冻离心机,德国艾本德股份公司;ME204 分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;C-MAG HS 7 磁力搅拌器,德国 IKA 公司;HH-501 恒温水浴锅,金坛区白塔新宝仪器厂;SY-6000 喷雾干燥机,上海世远生物设备工程有限公司;UV-765 紫外可见分光光度计,中国上海仪电科学仪器股份有限公司;Fluoro 全功能稳态瞬态荧光光谱仪,北京格致同德科技有限公司;TENSOR 27 傅里叶红外光谱仪,布鲁克(北京)科技有限公司;FV1200 激光扫描共聚焦显微镜,日本奥林巴斯公司。

1.3 试验方法

1.3.1 PPH 的制备

马铃薯蛋白(PP)通过碱提酸沉法制备^[18]。具体步骤如下:取 100 g 浓缩蛋白分散于 0.04% (m/V) NaOH 溶液中,在 60 °C 下持续搅拌加热 30 min。离心 3 500 r·min⁻¹ 20 min 后收集上清液。通过逐步加入 0.1 mol L⁻¹ 盐酸调节至等电点,诱导蛋白完全沉淀。按相同条件离心后收集沉淀物并进行喷雾干燥,得到 PP。

马铃薯蛋白酶解物(PPH)经酶水解制备^[19]:取适量 PP (4%, m/V)溶于超纯水,加入 9% (V/V) Alcalase 2.4L,

于 pH 值 9、55 °C 条件下水解 4 h。酶水解后经加热失活终止反应。将水解液以 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 去除未完全水解的蛋白质残留物。将上清液 pH 值调节至 3~5, 随后进行喷雾干燥获得 PPH。

1.3.2 PPH-PEC 的制备

首先, 配制质量体积比为 10% (m/V) 的 PPH 水溶液。将溶液置于磁力搅拌器上连续搅拌 2 h, 随后置于 4 °C 冰箱中静置过夜, 以确保充分水化。次日, 分别使用 1 mol L⁻¹ 的 HCl 溶液与 1 mol L⁻¹ 的 NaOH 溶液将 PPH 溶液的 pH 值分别调节至 1、3、5、7、9、11 和 13。接着, 向不同 pH 值的溶液中加入 0.75% (m/V) 的 PEC, 混合均匀。混合液经功率为 100 W 超声处理 30 min 后, 置于 95 °C 条件下加热反应 1 h。反应结束后, 立即将样品移入 4 °C 冰箱中冷却固化, 即得 PPH-PEC 复合水凝胶。所有成品凝胶均保存于 4 °C 环境中备用^[13]。

1.3.3 PPH-PEC 凝胶的持水性

凝胶样品的持水能力 (WHC) 根据先前的方法测定^[20]。在 4 °C 下储存 12 h 后, 使用高速冷冻离心机将凝胶以 4 000 r·min⁻¹ 和 25 °C 离心 20 min。通过倒置离心管用滤纸除去分离的水。使用下式测定 PPH-PEC 凝胶的 WHC:

$$W = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100 \quad (1)$$

式中:

W——凝胶的持水能力, %;

W₁——离心前离心管加样品的重量, g;

W₂——离心后离心管加样品的重量, g;

W₀——离心管的重量, g。

1.3.4 PPH-PEC 凝胶的蛋白可溶含量

凝胶样品的蛋白可溶含量参考前人方法测定^[20]。将凝胶恢复至室温后, 将 0.6 g 凝胶加入到 10 mL 蒸馏水中, 并均质 5 min, 然后置于烧杯中磁力搅拌 1 h, 接着使用高速冷冻离心机将凝胶以 4 000 r·min⁻¹ 和 25 °C 离心 10 min, 收集上清液, 并通过紫外可见分光光度计在 562 nm 处使用 BCA 法进行定量。

1.3.5 PPH-PEC 凝胶的微观结构

采用激光扫描共聚焦显微镜 (CLSM) 观察新鲜 PPH-PEC 复合凝胶的微观结构^[21,22]。凝胶样品先切片再染色, 使用去离子水配置染色剂, 分别为 0.1% (m/V) 荧光增白剂 (CFW) 和质量浓度为 50 μg·mL⁻¹ 的罗丹明 B 染色, 其中 CFW 用于染色 PEC, 罗丹明 B 用于染色 PPH。样品用溶液染色 1 h, 随后用蒸馏水清洗以去除多余染料。CFW 的激发和发射波长分别在 405 nm 和 430~470 nm, 罗丹明 B 的激发和发射波长分别在 559 nm 和 570~620 nm, 物镜放大倍率为 20 倍。

1.3.6 紫外光谱

采用紫外可见分光光度计测定 PPH-PEC 复合凝胶体系的紫外光谱。样品参考 Agyare 等^[23]描述的方法制备。取适量样品溶液 (0.2%, m/V) 在各个 pH 值条件下的缓冲液中制备, 将样品在 4 000 r·min⁻¹ 下离心 15 min, 然后使用 1 cm 路径长度的比色皿收集 200 和 400 nm 之间的 UV 光谱。

1.3.7 内源荧光光谱

PPH-PEC 复合凝胶体系的内源荧光光谱是使用荧光分光光度计在 25 °C 下使用 1 cm 路径长度的比色皿获得的。样品溶液 (0.2%, m/V) 在各个 pH 值下的缓冲液中, 在 280 nm 处激发, 狭缝 3 nm, 并记录从 300 至 450 nm 的发射光谱^[24]。

1.3.8 FTIR

将每个样品分别与 KBr 按 1:100 混合并研磨, 使用 FTIR 光谱仪在 4 000 至 400 cm⁻¹ 的波数范围内, 分辨率为 4 cm⁻¹ 进行分析; 使用 PeakFit 4.12 软件进行基于酰胺 I 条带 (1 700~1 600 cm⁻¹) 的二级结构分析^[25]。

1.4 数据分析

每次测量独立重复三次, 数据以平均值±标准差表示。使用 Origin 2024 软件绘图, 采用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行单因素方差分析 (ANOVA), 并使用 Tukey 检验进行事后多重比较, 显著性水平设为 P<0.05。

2 结果与讨论

2.1 PPH-PEC 凝胶的凝胶特性

2.1.1 凝胶外观

PPH-PEC 复合凝胶体系的形成情况如图 1 所示。在 pH 值 1、3 条件下，明显观察到两者没有形成凝胶，为液体状态，甚至可以观察到沉淀；pH 值 5、7、9 条件下形成凝胶，并且颜色随着 pH 值增加逐渐加深；pH 值 11、13 条件下，凝胶无法成型。通过比较凝胶体系的形成情况来看，pH 值处理会对 PPH-PEC 复合凝胶体系产生影响。

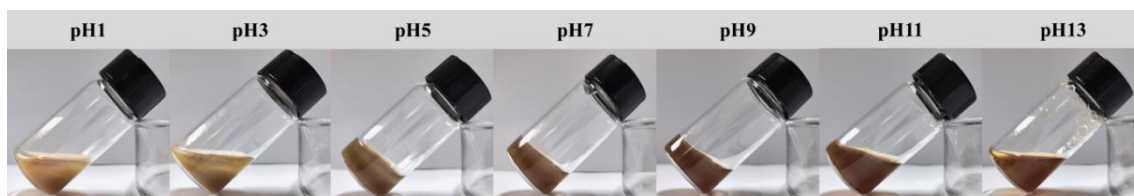


图 1 不同 pH 值下的 PPH-PEC 复合凝胶状态

Fig.1 Gel State of Potato Protease Hydrolysate at Different pH Levels

2.1.2 持水性

凝胶的持水能力反映了其将水保持在凝胶网络中的能力，持水性越好意味着凝胶网络更加稳定^[26,27]。图 2 所示，PPH-PEC 复合凝胶体系的持水能力 pH 值 7 > pH 值 5 > pH 值 9，其中 pH 值 7 到 pH 值 9 变化最为显著，从 87.62% 降到 34.06%。具体而言，在 pH 值 7 条件下，PPH-PEC 复合凝胶表现出最优的持水性能（87.62%）。Jiang 等^[17]认为适度的 pH 偏移处理可促进蛋白质分子去折叠，暴露更多活性基团，从而增强与多糖的相互作用；但极端 pH 条件则会破坏分子间氢键和静电平衡，导致凝胶网络松散。PPH 等电点（pI）约 pH 值 4.5~5.0，其在等电点处会完全丧失电荷，果胶在水溶液中整体带负电^[28]。肽的全局电荷（正负）由环境的 pH 值决定，在 pH 值 7 条件下，尽管 PPH 与果胶均带负电存在静电排斥，但这种适度的排斥力虽然延缓了分子的无序聚集，却使得分子链有足够时间在热诱导下通过氢键和疏水作用进行有序重排，从而形成均匀、连续且稳定的凝胶网络。在 pH 值 9 条件下，静电排斥作用增强，与在中性条件下相比，凝胶网络变得更为松散且不稳定。在 pH 值 5 条件下，接近 PPH 的等电点，其几乎不带电，静电作用较弱，主要靠疏水作用、氢键等相互作用力聚集，形成网络结构。而在 pH 值 1、3 及 pH 值 11、13 条件下，过低的 pH 值使果胶链过度质子化、聚集形成沉淀，无法形成凝胶；过高的 pH 值，静电排斥过强，难以形成凝胶网络，这与宏观观察到的相分离和网络解体现象一致，证实了极端 pH 值破坏了维持水分的关键网络结构。此外，Urbonaitė 等^[29]发现，WHC 值的增加与较小颗粒引起的凝胶网络粗糙度密切相关。

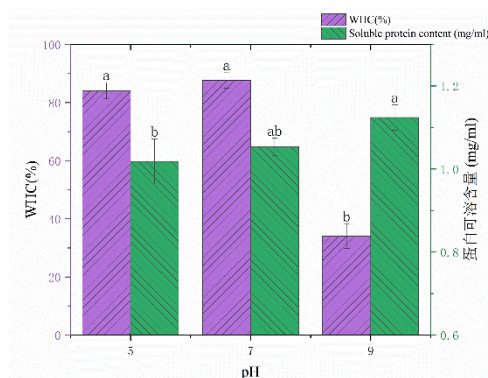


图 2 PPH-PEC 复合凝胶体系的持水性与蛋白可溶含量

Fig.2 Water Holding Capacity and Protein Soluble Content of PPH-PEC Composite Gel System

注：图中不同小写字母表示组间差异显著（ $P < 0.05$ ）。

2.1.3 可溶性蛋白含量

蛋白质凝胶可溶性蛋白质表示对凝胶形成没有贡献的蛋白质。可溶性蛋白质的数量越多表明蛋白质参与凝胶网络结构的程度越低，而数量越少表示参与程度越高^[20]。如图 2 所示，pH 值 9 凝胶的可溶性蛋白质含量高于 pH 值 7 与 pH 值 5，为 $1.12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，而在 pH 值 7 与 pH 值 5 条件下的可溶性蛋白含量无显著差异。Chen 等^[20]报道，马铃薯蛋白凝胶在 pH 值 2 时可溶性蛋白含量最高，表明极端 pH 条件下大量蛋白质未参与网络构建；而在 pH 值

7 和 pH 值 10 条件下可溶性蛋白含量显著降低,与本研究 pH 值 7 和 pH 值 5 条件下的结果(均低于 $1.12\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 趋势吻合。该研究认为,可溶性蛋白含量的降低反映了更多蛋白质通过氢键和疏水相互作用参与了凝胶网络的形成。本研究中 pH 值 7 条件下可溶性蛋白含量最低,进一步证实了该条件下 PPH 肽段与果胶之间的交联最为充分,形成了最为稳定的凝胶网络。相比之下, pH 值 9 条件下可溶性蛋白含量最高 ($1.12\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),表明碱性环境中增强的静电斥力阻碍了 PPH 与 PEC 的有效交联,导致大量可溶性蛋白未被网络捕获,这与该条件下 WHC 显著下降 (34.06%) 的结果相互印证。

2.2 PPH-PEC 凝胶的微观结构

使用激光共聚焦扫描显微镜 (CLSM) 观察不同 pH 值下形成的 PPH-PEC 复合凝胶体系的微观网络结构,图像如图 3 所示。红色区域和蓝色区域分别代表 PPH 和 PEC,因为色彩叠加,双染凝胶背景呈现紫色^[22]。所有凝胶均表现出异质性微观结构,特点是 PPH 在基于果胶的网络结构中随机分散^[30],并在凝胶网络内均形成多肽链聚集体,这与 Gentile^[9]提出的复合凝胶结构一致。Gentile 指出复合凝胶是由果胶形成致密的连续网络骨架,PPH 肽链以细小颗粒形式均匀分散于果胶骨架中,而非形成连续的蛋白相,并且 pH 值是通过调控蛋白与多糖的静电作用来影响两者的相分离行为。本研究中, pH 值 7 条件下,网络结构呈现致密状态,依旧可观察到多肽分子颗粒,说明 pH 值 7 时适度的静电斥力恰好维持了 PPH 与果胶的相分离与交联的平衡,形成了致密的网络复合结构。相比之下, pH 值 5 时凝胶网络呈现较大的孔隙结构且表现出明显的不连续性,可清晰观察到多肽分子颗粒嵌合于其中,此条件下当环境 pH 值接近马铃薯蛋白的等电点时,蛋白质分子表面净电荷降至最低,静电排斥力减弱,疏水相互作用主导了分子的快速无序聚集,而蛋白相过度聚集破坏了网络连续性。在 pH 值 9 条件下,多肽颗粒尺寸明显增大,但其在凝胶网络中的分布密度较 pH 值 7 条件下有所降低,这一现象表明, pH 值 9 时静电斥力增强导致更明显的相分离,降低了其在果胶基质中的均匀分散程度。

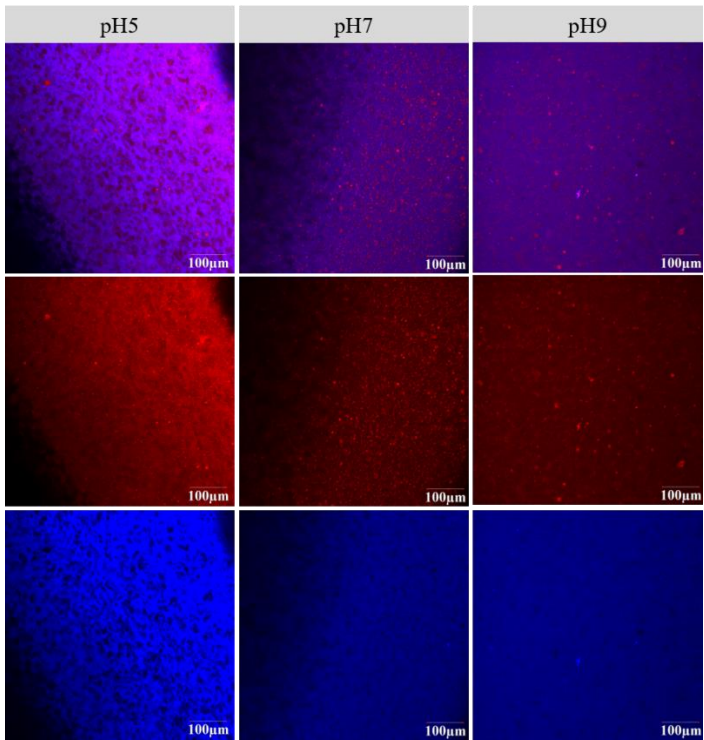


图 3 PPH-PEC 复合凝胶体系的 CLSM 图像

Fig.3 CLSM image of the PPH-PEC composite gel system

2.3 PPH-PEC 凝胶的紫外光谱分析

紫外光谱用于检测发色团 (芳香族氨基酸侧链) 的变化,从而揭示了蛋白质构象^[31]。当组成发色团的蛋白质经受不同的微环境时,蛋白质的紫外吸收发生变化。图 4 显示了经不同 pH 值条件下的 PPH-PEC 复合凝胶体系的紫外光谱。紫外光谱在 225 和 270 nm 附近显示出特征吸收峰,分别对应于肽键和芳香族氨基酸残基 (苯丙氨酸、

酪氨酸和色氨酸)^[24]。

如图4所示,随着pH值从1至13,PPH-PEC复合凝胶体系在225 nm处的肽键吸收峰强度呈现显著波动,且在270 nm附近芳香族氨基酸特征峰的波长位置发生系统性偏移,反映出不同pH值环境下蛋白质构象及微环境极性的剧烈重构。值得注意的是,在能够成功形成热诱导凝胶的pH值5、7和9条件下,225 nm处吸光度均维持在较高水平($A_{225}>1.25$),表明在此区间内热处理有效促进了PPH分子的去折叠,使原本包埋于内部的肽键大量暴露,二级结构由有序向无规卷曲转变,为网络交联提供了充足的反应位点;相比之下,在非凝胶区(如pH值1、3、11、13),该峰强度明显下降或峰形畸变,尤其在pH值11时出现异常低谷,可能源于强碱性条件导致的部分肽键水解或过度电离引起的聚集沉淀,从而削弱了凝胶形成的结构基础。

更关键的是,270 nm附近芳香族残基吸收峰的最大波长($\lambda_{\max}$)呈现出红移趋势:在pH值5时 $\lambda_{\max}$ 约为268 nm,而在pH值9时移至约272 nm,至pH值13则进一步红移至290 nm以上。这一现象表明,随着体系pH值升高,芳香族氨基酸的疏水侧链所处微环境的极性逐渐增强——即从相对疏水的聚集态转向亲水的溶剂暴露态。在pH值5(接近PPH等电点)时观察到的轻微蓝移,印证了此时静电排斥最小,变性后暴露的疏水基团倾向于通过疏水缔合形成非极性核心,有利于构建凝胶网络;而pH值7和9条件下的渐进式红移,则揭示出由于PPH与PEC均带负电荷,静电斥力阻碍了疏水簇的紧密堆积,迫使芳香族残基更多地暴露于水相中,其凝胶化机制更多依赖于氢键而非疏水主导。此外,pH值13虽显示最强红移,但因吸光度骤降且无凝胶形成,说明极端碱性不仅破坏结构稳定性,还可能引发不可逆降解,导致无法形成连续网络。

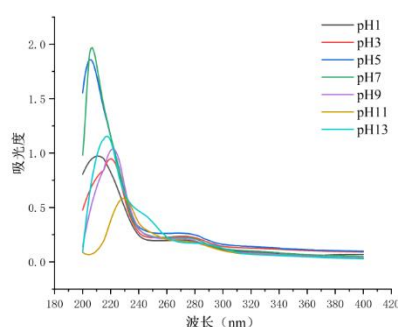


图4 PPH-PEC复合凝胶体系的紫外光谱

Fig.4 Ultraviolet Spectrum of the PPH-PEC Composite Gel System

2.4 PPH-PEC凝胶的内源荧光光谱分析

内源荧光光谱可揭示不同pH值预处理对PPH-PEC复合体系微环境极性 & 分子构象的调控机制^[32]。为了进一步证实PPH-PEC在凝胶过程中的构象变化,在280 nm的激发波长下获得了内源荧光光谱。蓝移指示疏水基团包埋于非极性内部,红移则意味着肽链展开、疏水基团暴露于极性溶剂中^[33]。当发色团如酪氨酸和色氨酸残基处于高亲水性环境中时,则发生红移。所有样品的发射峰均位于300~400 nm区间,主要源于马铃薯蛋白酶解物中色氨酸(Trp)残基的荧光贡献,其最大发射波长($\lambda_{\max}$)的位置直接反映色氨酸所处微环境的极性^[34]。如图5所示,未成凝胶组(pH值1、3、11、13)荧光强度显著较低且谱形宽化,表明极端pH值导致蛋白过度变性或无序聚集,破坏了荧光发色团的有序微环境;相比之下,成凝胶组(pH值5、7、9)展现出显著增强的荧光强度。对比这三个独立成胶体系发现,pH值5处理组的 $\lambda_{\max}$ 位于约358 nm处,而pH值7与pH值9处理组的 $\lambda_{\max}$ 分别红移至约360 nm和362 nm。这种组间差异表明,相较于近等电点条件(pH值5),在pH值7和pH值9条件下,PPH肽链呈现出更为舒展的构象,使得更多原本包埋的色氨酸残基暴露于极性水环境中。然而,鉴于红移幅度有限(<5 nm)且三组均能形成稳定凝胶,说明这种构象变化并非剧烈的疏水内核暴露,而是适度的链段伸展。这一微观状态更有利于暴露极性基团以形成氢键网络,并促进PPH伸展链段与果胶长链之间的空间缠结及多糖介导的交联,从而在静电排斥存在的条件下(pH值7、9)依然构建出稳固的三维凝胶网络。荧光光谱结果与UV光谱分析一致。

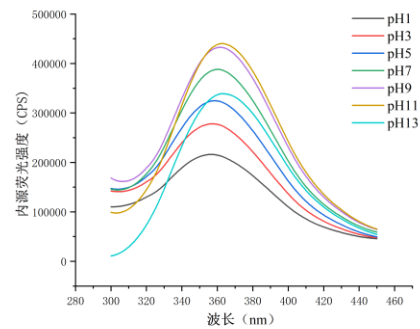


图 5 PPH-PEC 复合凝胶体系的内源荧光光谱

Fig.5 Intrinsic Fluorescent Spectra of the PPH-PEC Composite Gel System

2.5 PPH-PEC 凝胶的二级结构

利用 FTIR 分析了 pH 值对 PPH-PEC 复合凝胶形成的影响。酰胺 I 带内 ($1\,600\sim1\,700\text{ cm}^{-1}$), 蛋白质二级结构表现出特征性的构象: β -折叠 ($1\,605\sim1\,640\text{ cm}^{-1}$), 无规卷曲 ($1\,641\sim1\,650\text{ cm}^{-1}$), α -螺旋 ($1\,651\sim1\,660\text{ cm}^{-1}$), 以及 β -转角 ($1\,661\sim1\,700\text{ cm}^{-1}$)^[35]。表 1 所示, 在 pH 值 7 条件下, 凝胶体系存在静电斥力, 仍然呈现出最高的 α -螺旋 (29.79%) 与 β -折叠含量 (57.12%) 且无规卷曲完全消失, 成功形成稳定凝胶。相比于其他条件下, 增加的 α -螺旋含量与减少的静电排斥和增强的氢键相关, 而 β -折叠的形成与疏水相互作用有关^[36]。并且, 热诱导提供的能量足以克服分子间的静电斥力^[37], 而中性环境最大限度地减少了离子化基团对氢键形成的干扰, 促使变性后的 PPH 分子链通过强氢键作用高度有序地重排为 β -折叠片层, 构建了致密且均匀的刚性骨架; 同时, 适度的静电斥力延缓了聚集速率, 避免了无序沉淀的发生, 有利于形成连续网络。相比之下, 在 pH 值 5 和 9 的成胶区域, 体系处于弱酸或弱碱环境, PPH 与 PEC 之间存在一定的静电吸引 (pH 值 5) 或静电斥力 (pH 值 9), 配合较高的无规卷曲 (28.71% , 35.27%) 和 β -折叠含量 (20.10% , 39.20%), 暴露出更多疏水基团, 通过疏水相互作用辅助交联, 形成了“刚柔并济”的网络结构^[36]。而在未能成胶的极端 pH 值条件 (pH 值 1、3、11、13) 下, 过强的静电斥力 (pH 值 1、11、13) 阻碍了分子链的有效靠近与有序堆积, 导致虽有部分 β -折叠形成 (如 pH 值 1、11) 却无法构建连续网络, 或发生非特异性的大规模聚集沉淀^[38]; pH 值 3 时虽接近 pI, 但酸性环境可能抑制了关键氢键的形成或导致聚集动力学过快, 致使二级结构分布杂乱, 无法形成稳定的凝胶骨架。

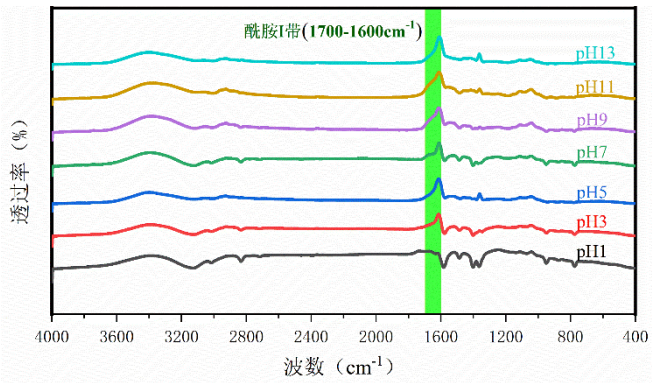


图 6 PPH-PEC 复合凝胶体系的 FTIR 光谱

Fig.6 FTIR Spectrum of the PPH-PEC Composite Gel System

表 1 pH 值对 PPH-PEC 复合凝胶体系二级结构的影响

Table 1 Effect of pH on the Secondary Structure of the PPH-PEC Composite Gel System

pH 值	β -折叠/%	无规卷曲/%	α -螺旋/%	β -转角/%
	$1\,605\sim1\,640\text{ cm}^{-1}$	$1\,641\sim1\,650\text{ cm}^{-1}$	$1\,651\sim1\,660\text{ cm}^{-1}$	$1\,661\sim1\,700\text{ cm}^{-1}$
1	42.72	21.33	-	35.94

现代食品科技		Modern Food Science and Technology		2027, Vol.43, No.5
3	26.68	30.04	23.15	20.14
5	20.10	28.71	25.88	25.31
7	57.12	-	29.79	13.10
9	39.20	35.27	17.86	7.67
11	43.86	41.40	14.71	-
13	22.37	30.28	25.11	22.24

3 结论

本研究系统阐明了 pH 值对马铃薯蛋白酶解物 (PPH) 与果胶 (PEC) 复合体系热诱导凝胶行为的调控机制。研究表明, 该体系的凝胶化具有显著的 pH 值依赖性, 仅在 pH 值 5、7 和 9 的特定范围内能形成结构完整且持水性良好的凝胶, 而在强酸 (pH 值 1、3) 或强碱 (pH 值 11、13) 环境下则因分子过度聚集沉淀或静电斥力过强而无法成胶。不同 pH 值条件下凝胶形成的主导机制存在差异: 在 pH 值 7 条件下, 凝胶性能最优, 持水性最高, 为 87.62%。此时体系主要依赖热驱动下的氢键作用, PPH 分子链高度有序重排形成高含量的 β -折叠结构, 构建了致密均匀的刚性骨架, 适度的静电斥力延缓了聚集速率, 避免了无序沉淀, 形成了稳定的三维网络。在 pH 值 5 (近等电点) 条件下, 静电排斥最小, 疏水相互作用主导了分子的快速聚集。虽然形成了凝胶, 但 CLSM 显示微观结构呈现较大孔隙和不连续性, 网络较为粗糙, 持水性略低于 pH 值 7 条件。在 pH 值 9 条件下, 静电斥力增强, 导致多肽链构象舒展, 持水性显著下降至 34.06%, 内源荧光光谱显示色氨酸残基最大发射波长从 pH 值 5 时的 358 nm 红移至 362 nm, 表明色氨酸残基暴露增加。凝胶网络呈现“颗粒稀疏化”与“果胶基质致密化”并存的特征, 更多依赖于氢键及多糖介导的交联维持稳定, 此时可溶性蛋白含量最高 (1.12 mg/mL), 表明参与网络构建的蛋白质最少。

综上所述, 适宜的 pH 值环境能够有效平衡静电相互作用与氢键和疏水作用, 诱导 PPH 形成适度有序的二级结构, 从而驱动稳定复合凝胶的形成。本研究证实了非等电点条件下通过氢键主导构建高持水性凝胶的可行性, 为马铃薯蛋白酶解物在植物基凝胶食品中的定向应用提供了重要的理论依据。

参考文献

- [1] 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.
- [2] HAVEMEIER S, ERICKSON J, SLAVIN J. Dietary guidance for pulses: the challenge and opportunity to be part of both the vegetable and protein food groups [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2017, 1392(1): 58-66.
- [3] 曾凡逵, 刘刚. 中国马铃薯主粮化面临的问题及解决方法 (英文) [J]. 现代食品科技, 2017, 33(9): 293-298+90.
- [4] ZHENG W, ZHAO M, ZHOU F. Improving the functionality and bioactivity of potato protein via PEG-sugar deep eutectic solvent extraction: Hydrogen bond regulation and mechanistic insights [J]. Food Hydrocolloids, 2026, 170: 111767.
- [5] XU J, LI Y, KAUER L, et al. Functional Food Based on Potato [J]. Foods, 2023, 12(11): 2145.
- [6] BHUTTO R A, BHUTTO N UL AIN H, KHANAL S, et al. Potato protein as an emerging high-quality: Source, extraction, purification, properties (functional, nutritional, physicochemical, and processing), applications, and challenges using potato protein [J]. Food Hydrocolloids, 2024, 157: 110415.
- [7] HU X, JIANG H, LIU Z, et al. The Global Potato-Processing Industry: A Review of Production, Products, Quality and Sustainability [J]. Foods, 2025, 14(10): 1758.
- [8] HU X Y, LV H Z, REN C T, et al. A Comparative Review of the Potato Industries in China and India [J]. Potato Research, 2025, 68(4): 3901-3924.
- [9] GENTILE L. Protein-polysaccharide interactions and aggregates in food formulations [J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2020, 48: 18-27.
- [10] WANG Y R, YANG Q, LI-SHA Y J, et al. Structural, gelation properties and microstructure of rice glutelin/sugar beet pectin composite gels: Effects of ionic strengths [J]. Food Chemistry, 2021, 346: 128956.
- [11] LU X, CHEN J, GUO Z, et al. Using polysaccharides for the enhancement of functionality of foods: A review [J]. Trends in Food Science

- & Technology, 2019, 86: 311-327.
- [12] WARNAKULASURIYA S N, NICKERSON M T. Review on plant protein-polysaccharide complex coacervation, and the functionality and applicability of formed complexes [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(15): 5559-5571.
- [13] ZHOU H, HU X, XIANG X, et al. Modification of textural attributes of potato protein gels using salts, polysaccharides, and transglutaminase: Development of plant-based foods [J]. Food Hydrocolloids, 2023, 144: 108909.
- [14] LI X, FANG Y, AL-ASSAF S, et al. Complexation of bovine serum albumin and sugar beet pectin: Stabilising oil-in-water emulsions [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2012, 388(1): 103-111.
- [15] NIKBAKHT NASRABADI M, SEDAGHAT DOOST A, MEZZENGA R. Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 118: 106789.
- [16] JIANG J, XIONG Y L. Extreme pH treatments enhance the structure-reinforcement role of soy protein isolate and its emulsions in pork myofibrillar protein gels in the presence of microbial transglutaminase [J]. Meat Science, 2013, 93(3): 469-476.
- [17] JIANG L, REN Y, SHEN M, et al. Effect of acid/alkali shifting on function, gelation properties, and microstructure of *Mesona chinensis* polysaccharide-whey protein isolate gels [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 117: 106699.
- [18] 张亚军,王玉杰,张龙,等.马铃薯蛋白高效提取分离技术优化[J].青海农林科技, 2021,2:1-5,8.
- [19] YU M, LIN S, GE R, et al. Buckwheat self-assembling peptide-based hydrogel: Preparation, characteristics and forming mechanism [J]. Food Hydrocolloids, 2022, 125: 107378.
- [20] CHEN Z, LI J, MU X, et al. Effect of freezing on the properties of potato protein gels at different pH [J]. LWT, 2025, 233: 118506.
- [21] LIU H, LIANG Y, CHEN Z, et al. Effect of curdlan on the aggregation behavior of gluten protein in frozen cooked noodles during cooking [J]. Journal of Cereal Science, 2022, 103: 103395.
- [22] TENG W, YANG Z, WANG N, et al. Modulating the textural and structural characteristics of curdlan-potato protein gel with different concentrations [J]. Food Hydrocolloids, 2024, 149: 109638.
- [23] AGYARE K K, XIONG Y L, ADDO K. Influence of salt and pH on the solubility and structural characteristics of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate [J]. Food Chemistry, 2008, 107(3): 1131-1137.
- [24] WANG K Q, LUO S Z, ZHONG X Y, et al. Changes in chemical interactions and protein conformation during heat-induced wheat gluten gel formation [J]. Food Chemistry, 2017, 214: 393-399.
- [25] LI P, SUN Z, MA M, et al. Effect of microwave-assisted phosphorylation modification on the structural and foaming properties of egg white powder [J]. LWT, 2018, 97: 151-156.
- [26] JIANG X, CHEN Q, XIAO N, et al. Changes in Gel Structure and Chemical Interactions of Hypophthalmichthys molitrix Surimi Gels: Effect of Setting Process and Different Starch Addition [J]. Foods, 2022, 11(1): 9.
- [27] CAO L, LU W, GE J, et al. Modulation of oligoguluronate on the microstructure and properties of Ca-dependent soy protein gels [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 250: 116920.
- [28] YAO S, UDENIGWE C C. Peptidomics of potato protein hydrolysates: implications of post-translational modifications in food peptide structure and behaviour [J]. Royal Society Open Science, 2018, 5(7): 172425.
- [29] URBONAITE V, VAN DER KAAIJ S, DE JONGH H H J, et al. Relation between gel stiffness and water holding for coarse and fine-stranded protein gels [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 56: 334-343.
- [30] MIN C, YANG Q, PU H, et al. Textural characterization of calcium salts-induced mung bean starch-flaxseed protein composite gels as dysphagia food [J]. Food Research International, 2023, 164: 112355.
- [31] ROSENHECK K, DOTY P. The far ultraviolet absorption spectra of polypeptide and protein solutions and their dependence on conformation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1961, 47(11): 1775-1785.
- [32] SHENG L, SU P, HAN K, et al. Synthesis and structural characterization of lysozyme-pullulan conjugates obtained by the Maillard reaction [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 71: 1-7.
- [33] LI R, XIONG Y L. Disulfide cleavage to improve interfacial behavior and emulsification properties of oat protein [J]. Food Chemistry, 2023, 404: 134511.
- [34] VISEU M I, CARVALHO T I, COSTA S M B. Conformational Transitions in β -Lactoglobulin Induced by Cationic Amphiphiles: Equilibrium Studies [J]. Biophysical Journal, 2004, 86(4): 2392-2402.

-
- [35] BARTH A. Infrared spectroscopy of proteins [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2007, 1767(9): 1073-1101.
- [36] SHENG L, LIU Q, DONG W, et al. Effect of high intensity ultrasound assisted glycosylation on the gel properties of ovalbumin: Texture, rheology, water state and microstructure [J]. Food Chemistry, 2022, 372: 131215.
- [37] SHENG L, TANG G, WANG Q, et al. Molecular characteristics and foaming properties of ovalbumin-pullulan conjugates through the Maillard reaction [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105384.
- [38] JIANG Q, CHEN N, GAO P, et al. Influence of L-arginine addition on the gel properties of reduced-salt white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) surimi gel treated with microbial transglutaminase [J]. LWT, 2023, 173: 114310.