

DOI: 10.12161/j.issn.1005-6521.2024.10.013

pH 偏移处理对猪肝蛋白乳化特性的影响

刘昱颖^{1,2}, 彭松林^{1,2}, 尚永彪^{1,2*}

(1. 西南大学 食品科学学院, 重庆 400715; 2. 川渝共建特色食品重庆市重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 为探究猪肝蛋白(porcine liver protein, PLP)的 pH 偏移诱导重折叠改性方法与机制。猪肝蛋白溶液经 pH 偏移处理(pH3~11)后再将 pH 值调整到中性, 经过冻干处理后再测定改性猪肝蛋白的溶解度、乳化活性与稳定性、表面疏水性、乳液粒径与 Zeta 电位、活性巯基及内源荧光光谱、红外光谱。结果表明, 在 pH 酸性偏移条件下, PLP 的溶解度、乳化活性及乳化稳定性均有所下降, 乳液粒径增大、Zeta 电位绝对值下降, 而 pH 碱性偏移处理会使 PLP 的溶解度和乳化活性、乳化稳定性提高, 乳液粒径减小、Zeta 电位绝对值上升; 改性后 PLP 的荧光强度及活性巯基含量降低, 表明 pH 偏移处理对蛋白质三级结构产生显著影响, 而根据红外光谱结果显示, 其对蛋白质二级结构影响较小。因此, pH 碱性偏移处理可作为提高猪肝蛋白的乳化性、溶解性等功能特性的有效手段。

关键词: pH 偏移; 重折叠; 猪肝蛋白; 蛋白结构; 乳化特性

Effect of pH- Shifting Treatment on the Emulsification Characteristic of Porcine Liver Protein

LIU Yuying^{1,2}, PENG Songlin^{1,2}, SHANG Yongbiao^{1,2*}

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Chongqing Key Laboratory of Speciality Food Co-Built by Sichuan and Chongqing, Chongqing 400715, China)

Abstract: To explore the method and mechanism of pH-shifting-induced refolding modification of the porcine liver protein (PLP), and to lay the theoretical foundation for the high-value development and utilization of porcine liver. The solution of porcine liver protein was treated with pH-shifting (pH3-11) and then adjusted to neutral. After lyophilization, the solubility, emulsification activity, emulsion stability, surface hydrophobicity, emulsion size, Zeta potential, active sulfhydryl groups, endogenous fluorescence spectra, and infrared spectra of the modified porcine liver protein were measured. The results showed that the solubility, emulsification activity, and emulsion stability of PLP decreased after acidic pH-shifting treatment, the emulsion particle size increased and the absolute value of Zeta potential decreased, while the alkaline pH-shifting treatment increased the solubility and emulsification activity and emulsion stability of PLP, and the emulsion particle size decreased and the absolute value of Zeta potential increased. The fluorescence intensity and active sulfhydryl content of PLP decreased after modification, indicating that the pH-shifting treatment had a significant effect on the tertiary structure, while the infrared spectroscopy results showed that it had less effect on the secondary structure. The alkaline pH-shifting treatment can effectively improve the functional properties of porcine liver protein such as emulsification and solubility.

Key words: pH-shifting; refolding; porcine liver protein; protein structure; emulsification properties

引文格式:

刘昱颖, 彭松林, 尚永彪. pH 偏移处理对猪肝蛋白乳化特性的影响[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(10): 93-100.

LIU Yuying, PENG Songlin, SHANG Yongbiao. Effect of pH- Shifting Treatment on the Emulsification Characteristic of Porcine Liver Protein[J]. Food Research and Development, 2024, 45(10): 93-100.

猪肝是猪屠宰过程中重要的副产物之一, 资源十分丰富, 但少有精深加工产品的开发利用。猪肝的主

要营养成分是猪肝蛋白(porcine liver protein, PLP), 但猪肝蛋白原始状态的功能性质并不理想, 若能改善其

作者简介: 刘昱颖(1999—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 肉类科学。

*通信作者: 尚永彪(1964—), 男(汉), 教授, 博士, 研究方向: 食品蛋白质功能性质。

功能性质则可以促进猪肝资源的高值开发利用。

pH 偏移处理是一种化学改性手段,其过程涉及将蛋白质溶液的 pH 值从原始状态调至极端的酸性或碱性环境。在这种环境下,蛋白质会发生变性反应,其分子结构经历去折叠过程,导致原本隐藏的结构得以延伸展开,进而暴露出内部的巯基和疏水基团。当 pH 值再次调整回中性时,蛋白质结构发生重折叠^[1]。然而,经过 pH 偏移并恢复中性环境后,蛋白质的去折叠-重折叠过程并非完全可逆,其结构无法回到最初的未处理状态,而是停留在未变性与变性之间的临界状态,这种状态下的蛋白质,被称为“熔球态”,其对蛋白质的功能性质会产生一定程度的影响^[2-3]。

已有研究已经表明,pH 偏移处理能够有效改善大豆蛋白^[4]和豌豆蛋白^[5]等植物源蛋白质的功能特性,均显著提升了蛋白质的乳化特性。在动物源蛋白质改性方面,Kristinsson 等^[6]研究了 pH 偏移处理(pH11 和 pH2.5)对鳕鱼肌球蛋白和肌原纤维蛋白功能特性的影响,结果表明,无论是酸性还是碱性条件下的偏移处理,均能有效提高肌球蛋白和肌原纤维蛋白的乳化性能。此外,Li 等^[7]探究了 pH 偏移处理对白软水猪肉(pale soft exudative meat, PSE)肌原纤维蛋白凝胶与乳化特性的影响,发现碱性偏移诱导重折叠可以有效地促进其乳化特性。Chen 等^[8]、Yu 等^[9]分别探讨了 pH 偏移处理对乳清蛋白、蛋清蛋白的功能特性的影响与机理,均发现 pH 碱性偏移对乳化特性有显著的改善作用。在动物内脏的 pH 偏移处理蛋白改性研究领域,熊国远^[10]采取酸性(pH2.0~3.5)和碱性(pH10.5~12.0)偏移处理鸡肝蛋白时发现,碱性处理使鸡肝蛋白乳化特性得到了改善。李鑫^[11]分别以酸性(pH2.2~3.0)、碱性(pH11.0~12.0)偏移处理鹅肝蛋白,结果表明碱性偏移处理能提高鹅肝蛋白的乳化特性和凝胶特性,而酸性偏移处理的结果相反。前述研究表明,pH 碱性偏移处理能使各种动植物蛋白的乳化特性得以改善,但不同来源蛋白质的 pH 酸性偏移处理效果却有很大的差异。近年来,人们开始关注猪肝蛋白的改性技术研究,已有学者探究了热处理^[12]、超声波处理^[13]对猪肝蛋白乳化特性的影响。陆今明等^[14]深入探讨了 300 W 超声波辅助下,pH 值为 3.0 和 9.0 的偏移处理对猪肝蛋白乳化特性的影响,研究结果表明,超声波辅助 pH9.0 碱性偏移处理显著提升了猪肝蛋白的乳化特性。然而,经超声波辅助的 pH3.0 酸性偏移处理,猪肝蛋白的乳化特性却受到不利影响。唐永欣等^[15]对温和热辅助下的 pH 碱性偏移处理对猪肝蛋白的结构和功能特性进行了探究,发现在 50 °C 加热条件下辅助以 pH11 的偏移处理,效果最为显著。目前,有关猪肝蛋白 pH 偏移处理技术的研究还非常有限,尤其缺乏对广域范围内不同 pH 偏移处理间的效果差异研究。

本研究以猪肝蛋白为材料,考察 pH 酸碱双向偏移(pH3~11)处理对猪肝蛋白乳化特性的影响,旨在补充和完善猪肝蛋白 pH 偏移处理基础研究,同时为食品及化工等行业的特定功能蛋白材料开发提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

猪肝:市售;透析袋(8 000~14 000 Da):北京怡美妙科技有限公司;一级玉米油:山东三星玉米科技有限公司。

无水磷酸二氢钠、无水磷酸氢二钠:重庆跃翔化工有限公司;氢氧化钠:重庆市钛新化工有限公司;5,5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)[5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid),DTNB]、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA):重庆朝友生物科技有限公司;盐酸:宁波大川精细化工有限公司;8-苯胺基-1-萘磺酸铵(8-anilino naphthalene-1-sulfonic acid,ANS):上海笛柏生物科技有限公司;五水硫酸铜:重庆兴光化玻公司;甘氨酸(glycine, Gly)、三羟甲基氨基甲烷(tris hydroxymethyl aminomethane, Tris):重庆永捷实验仪器有限公司。所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

BSM220.4 电子天平:上海卓精电子科技有限公司;PHS-4C+酸度计:成都世纪方舟科技有限公司;TGL-16 高速冷冻离心机:四川蜀科仪器有限公司;LGJ-10 真空冷冻干燥机:北京松源华兴科技发展有限公司;Spectrum100 红外光谱仪:美国珀金埃尔默仪器有限公司;TU-195003040426 双光束紫外可见分光光度计:北京普析通用有限责任公司;ZEN3690 激光粒度分析仪:英国马尔文仪器公司;F-4700 荧光分光光度计:日本日立公司。

1.3 方法

1.3.1 猪肝蛋白提取

参照 Aroeira 等^[16]的方法并稍作修改。将猪肝绞碎呈泥状,与 3 倍体积的磷酸缓冲溶液(0.05 mol/L, pH7.4)混合均匀,10 000 r/min 均质 30 s,4 °C 冷冻离心 20 min(9 000 ×g),取上清液,重复上述步骤 2 次,透析 48 h 后冷冻干燥 60 h,得到猪肝蛋白,密封保存于 18 °C 冰箱,以供后续试验使用。

1.3.2 猪肝蛋白浓度测定

参考 Cui 等^[17]的方法,用双缩脲试剂对 PLP 溶液进行蛋白质浓度测定。

1.3.3 样品处理

配制 200 mL、10 mg/mL 猪肝蛋白溶液。将溶液 pH 值调至 3、4、5、6、8、9、10、11 后磁力搅拌 30 min,再将 pH 值调至中性搅拌 15 min,各处理样分别编号为 pH3-7、pH4-7、pH5-7、pH6-7、pH8-7、pH9-7、pH10-7、pH11-7,空白对照为未经 pH 偏移处理的蛋白溶液。

将上述处理好的样品冷冻干燥后保存待测。

1.3.4 溶解度测定

参考 Agyare 等^[18]的方法,并稍作修改。将处理后的蛋白质样品配制成 2.5 mg/mL 的蛋白溶液,在 4 °C 下以 5 500 r/min 的速度冷冻离心 15 min,取上清液,利用双缩脲法测定其中的蛋白浓度,并据此计算出蛋白的溶解度。蛋白溶解度($X, \%$)的计算公式如下。

$$X = \frac{C_1}{C_0} \times 100$$

式中: C_1 为离心后上清液蛋白质浓度,mg/mL; C_0 为离心前溶液中蛋白质浓度,mg/mL。

1.3.5 乳化活性测定

参考 Agyare 等^[18]和 Pearce 等^[19]的方法,稍作修改。首先将样品配制成 2.5 mg/mL 的蛋白溶液,然后取 2.0 mL 大豆油加入 6.0 mL 蛋白溶液中,搅拌均匀,并在 10 000 r/min 的转速下匀浆 30 s。取 50 μ L 的乳化液,并加入 0.1% 十二烷基硫酸钠溶液 5 mL。测定样品在 500 nm 下的吸光值,记为 A_0 。PLP 乳化活性(emulsifying activity, EAI)的计算公式如下。

$$Y = \frac{2 \times 2.303}{\rho \times (1 - \varphi) \times 10\,000} \times A_0 \times 101$$

式中: Y 为乳化活性, m^2/g ; φ 为油相体积分数,油的体积/乳化体系的体积; ρ 为蛋白质浓度,g/mL; A_0 为乳化液 500 nm 处的吸光值;101 为稀释倍数。

1.3.6 乳液稳定性测定

参考 Lu 等^[20]的方法并稍作修改,以放置 30 min 后乳液的浊度值表示乳液稳定性。将新鲜乳液倒入 10 mL 试管中,静置 30 min,在 500 nm 波长处测定吸光值记录为乳液的浊度值(A_{500}),将装有新鲜乳液的试管封口置于 4 °C 贮藏 7 d,拍摄其外观状态,记录 7 d 后的液面分层情况。

1.3.7 粒径分布及 Zeta 电位测定

参考吴佳^[21]的方法,稍作修改。将样品配制成 1 mg/mL 的蛋白溶液,用粒度分析仪进行测定,记录样品的粒径分布和 Zeta 电位。

1.3.8 表面疏水性测定

参考 Benjakul 等^[22]的方法,进行适当修改。采用 8-苯氨-1-萘磺酸(ANS)荧光探针法来测定 PLP 的表面疏水性。将样品配制成浓度为 0.25 mg/mL 的蛋白溶液,取 20 μ L 的 8 mmol/L ANS 溶液加入 4.0 mL 的样品溶液中,并在避光条件下充分振荡均匀,持续 15 min,以确保 ANS 与蛋白质充分结合。使用荧光分光光度计对样品的荧光强度进行测定。测定条件为激发波长 390 nm,发射波长范围为 400~600 nm,激发和发射狭缝宽度为 5 nm,电压为 400 mV。

1.3.9 活性巯基测定

参考 Cui 等^[23]与 Nie 等^[24]的方法,进行适当修改。

用缓冲液(4 mmol/L EDTA、0.086 mol/L Tris、0.09 mol/L Gly, pH8)对样品进行稀释,配制为 1 mg/mL 的蛋白溶液。取 0.03 mL 的 4 mg/mL DTNB 缓冲液加入 3 mL 的蛋白溶液中振荡混匀,30 °C 的条件下进行避光水浴 30 min。在 412 nm 处测定其吸光值,并根据公式计算活性巯基的含量($M, \mu\text{mol/g}$),计算公式如下。

$$M = \frac{73.53 \times A_{412} \times D}{C}$$

式中: A_{412} 为蛋白溶液在 412 nm 处的吸光值; D 为稀释因子; C 为蛋白质浓度,mg/mL;73.53 由 $10^6/1.36 \times 10^4$ 计算, 1.36×10^4 为摩尔吸收率。

1.3.10 内源荧光光谱测定

参考 Nie 等^[24]的方法,进行适当修改。将样品配制成 0.25 mg/mL 的蛋白溶液。用荧光分光光度计测定其内源荧光光谱。仪器参数设置:激发波长为 290 nm,发射光谱范围为 300~460 nm,激发和发射狭缝宽度均为 5 nm,电压为 700 mV,扫描速度为 300 nm/min。

1.3.11 傅里叶红外光谱测定

参考 Hou 等^[25]的方法并有所修改,取冻干样品 2 mg,用 15 mg 干燥 KBr 研磨压片后上机测试。扫描范围为 4 000~600 cm^{-1} ,分辨率为 4 cm^{-1} ,进行 32 次扫描。对酰胺 I 带(1 700~1 600 cm^{-1})的谱图信号进行高斯方程拟合,并通过傅里叶去卷积法确定各峰的吸收位置及面积,以便定量估计蛋白质的二级结构,使用每个峰的积分面积计算二级结构,包括 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角以及无规卷曲。

1.4 数据处理

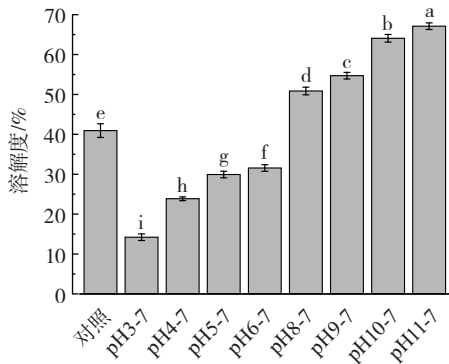
每组试验重复 3 次,并取 3 个平行样,试验结果用平均值 \pm 标准差表示。通过 Excel 2019 软件进行数据处理,Origin 2022 软件用于试验绘图,SPSS Statistics 17.0 用于 Duncan 显著性分析, $P < 0.05$ 表明结果有显著差异。

2 结果与分析

2.1 pH 偏移处理对 PLP 溶解度的影响

pH 偏移处理对 PLP 溶解度的影响如图 1 所示。

蛋白质溶解度的大小与蛋白质功能特性的好坏密切相关,良好的溶解性往往是蛋白质表现出较强功能性质的基础^[26]。由图 1 可知,相较于对照组,当 pH 酸性偏移处理时,PLP 的溶解度显著下降($P < 0.05$)。随着酸性偏移程度的不断加剧,其溶解度呈现持续降低的趋势($P < 0.05$);pH 碱性偏移处理能显著提高 PLP 的溶解度($P < 0.05$),且溶解度随着 pH 碱性偏移程度的增大而不断提高($P < 0.05$)。试验结果表明,pH 酸性偏移处理会影响 PLP 的水合性质,使溶解度降低,其原因可能是在诱导重折叠过程中暴露的疏水基团



不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

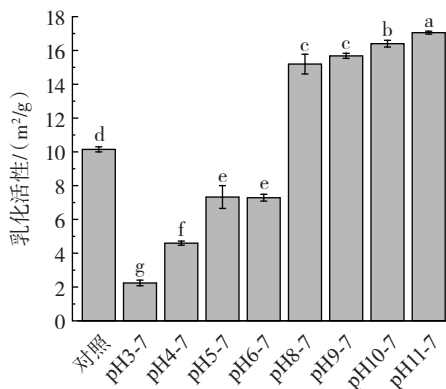
图1 pH偏移处理对PLP溶解度的影响

Fig.1 Effect of pH-shifting treatment on solubility of PLP

增多,且当pH酸性偏移接近等电点处时,疏水基团形成聚集,使溶解度进一步降低;pH碱性偏移处理的效果相反,可能是因为蛋白质的三级结构展开,导致疏水基团暴露,同时亲水基团数量也相应增加,蛋白质与水分子的结合程度随之增加,水合作用也增强,进而改善了其溶解度,此外,PLP蛋白粒径减小可能导致蛋白质比表面积相应增加,从而增强了水合作用,这也导致了其溶解性增强。Yongsawatdigul等^[27]在研究pH偏移处理对金线鱼肌浆蛋白的影响时,也发现pH酸性偏移降低了肌浆蛋白的溶解度,与本试验研究结果相一致。

2.2 pH偏移处理对PLP乳化活性的影响

pH偏移对PLP乳化活性的影响如图2所示。



不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

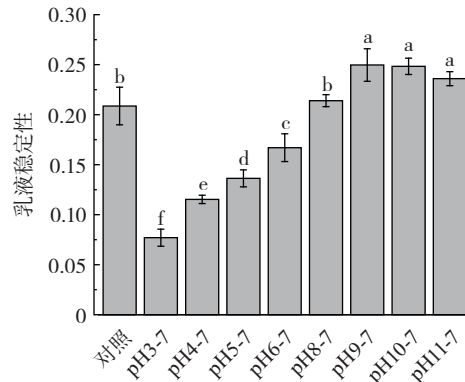
图2 pH偏移处理对PLP乳化活性的影响

Fig.2 Effect of pH-shifting treatment on emulsifying activity of PLP

乳化能力通常使用乳化活性来评估。由图2可知,与对照组相比(10.14 m²/g),pH酸性偏移处理显著降低了PLP的乳化活性($P < 0.05$),pH碱性偏移处理后,PLP的乳化活性得到了明显改善($P < 0.05$)。Vareltzis等^[28]在研究蓝色贻贝蛋白的功能性质时,也发现碱性偏移处理的蛋白具有更好的乳化性能,本试验与其研究结果相一致。

2.3 pH偏移处理对PLP乳液稳定性的影响

pH偏移处理对PLP乳液稳定性的影响如图3所示,pH偏移处理的PLP乳液贮藏7d后的外观见图4。



不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

图3 pH偏移处理对PLP乳液稳定性的影响

Fig.3 Effect of pH-shifting treatment on the emulsion stability of PLP

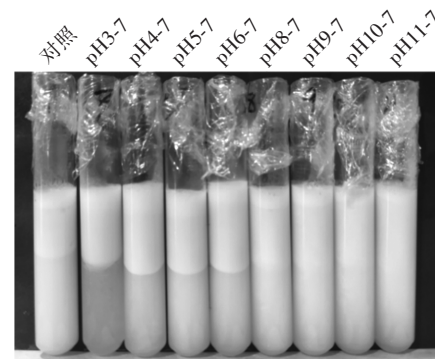


图4 pH偏移处理对PLP乳液分层现象的影响

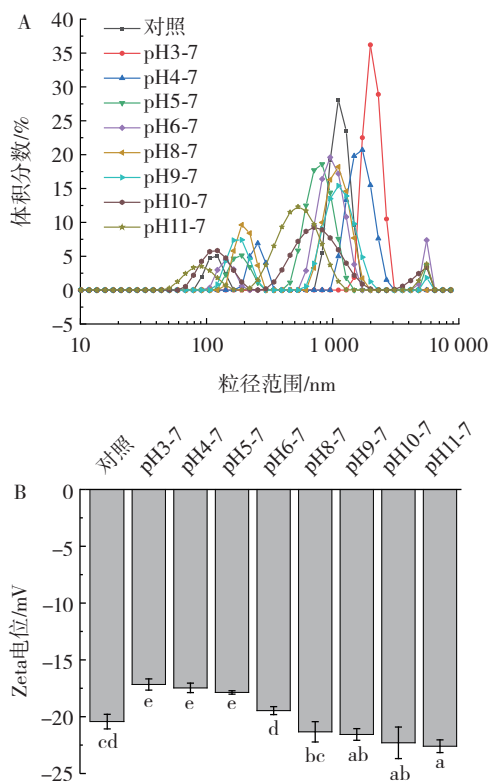
Fig.4 Effect of pH-shifting treatment on the layering of PLP emulsion

由图3和图4可知,与对照组相比,pH酸性偏移处理后,PLP乳液的乳化稳定性显著降低($P < 0.05$),乳化液存放7d后分层现象更加明显,且pH酸性偏移幅度越大乳液的稳定性越差;pH碱性偏移处理则相反,除pH8-7处理组外,pH碱性偏移处理后的PLP乳化稳定性显著提高($P < 0.05$),样品存放7d后除pH8-7处理样略显分层外,其它处理样均保持了良好的乳化状态。

2.4 pH偏移处理对PLP粒径分布和Zeta电位的影响

不同pH偏移处理下PLP粒径分布和Zeta电位如图5所示。

如图5A所示,相较于对照组,pH酸性偏移处理会增大PLP的粒径,pH酸性偏移幅度越大PLP的粒径越大;pH碱性偏移会减小PLP的粒径,且pH碱性偏移幅度越大PLP的粒径越小。如图5B所示,当进



不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。A. 粒径; B. Zeta 电位。

图5 pH 偏移处理对 PLP 粒径分布和 Zeta 电位的影响

Fig.5 Effect of pH-shifting treatment on particle size distribution and Zeta potential of PLP

行 pH3-7、pH4-7、pH5-7 偏移处理时, Zeta 电位绝对值相较于对照组均显著下降 ($P < 0.05$), 在 pH6-7 偏移处理时, Zeta 电位绝对值与对照组相并无显著性差异 ($P > 0.05$), 而除了 pH8-7 处理组外, 碱性偏移处理均导致了 Zeta 电位绝对值的显著增加 ($P < 0.05$)。

蛋白质粒径的大小和界面电位绝对值的高低与蛋白质的乳化特性有着极大的关系, 粒径细小有利于蛋白质在油脂表面的附着, 界面电位绝对值高则能增加脂肪球之间的排斥力, 因此粒径小、Zeta 电位绝对值大则蛋白质的乳化特性更好。本试验结果中 Zeta 电位绝对值的变化与粒径的变化趋势相一致, 同时二者的变化也跟蛋白质的溶解性、乳化性和乳化稳定性等特性变化一致, 说明 pH 偏移处理导致的 Zeta 电位绝对值的变化与粒径的变化可能是蛋白质功能特性变化的原因之一。

2.5 pH 偏移处理对 PLP 表面疏水性的影响

pH 偏移处理对 PLP 表面疏水性的影响如图 6 所示。

表面疏水性反映了蛋白质展开程度以及疏水基团在其表面的暴露程度。这种性质会影响蛋白质之间的疏水相互作用, 同时与蛋白质的乳化特性密切相关, 对蛋白质和油脂的吸附作用也会产生影响。如图 6 所

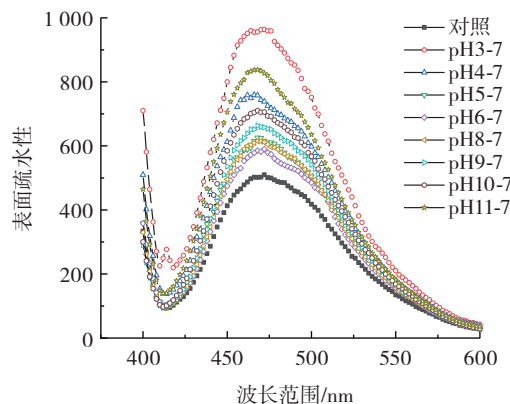


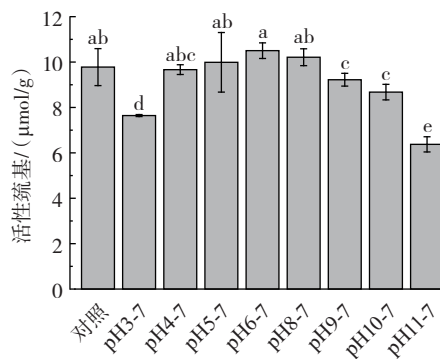
图6 pH 偏移处理对 PLP 表面疏水性的影响

Fig.6 Effect of pH-shifting treatment on surface hydrophobicity of PLP

示, 随着酸碱偏移程度的逐渐增强, PLP 的表面疏水性也逐渐升高, 且均高于对照组。其中酸性偏移所引起的表面疏水性增加更为显著, 这表明在酸性环境下, PLP 的变性程度更为剧烈。其原因可能是 pH 值调回中性过程中的重折叠现象, 蛋白质未能完全恢复到其原始状态, 而是以一种“熔球态”的形式存在, 疏水基团暴露得更多, 进而增强了表面疏水性。此外, pH 酸性偏移处理使得更多的疏水基团在等电点处相互聚集, 形成了体积更大的疏水基团^[11], 所以 pH 酸性偏移处理使猪肝蛋白表面疏水性的增加程度更为剧烈。

2.6 pH 偏移处理对 PLP 活性巯基的影响

pH 偏移处理对 PLP 活性巯基的影响如图 7 所示。



不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

图7 pH 偏移处理对 PLP 活性巯基的影响

Fig.7 Effect of pH-shifting treatment on active sulfhydryl group of PLP

暴露于蛋白质表面的巯基称为活性巯基, 它是蛋白质中重要的功能基团之一, 活性巯基含量的变化可以对蛋白质的空间构象产生影响, 并间接地反映出蛋白质三级结构的变化。如图 7 所示, 经过 pH 酸碱偏移处理后, 与对照组相比, PLP 的活性巯基含量有不同程度的变化, pH 酸性偏移处理组中除 pH3-7 组活性巯基含量显著性降低外, 其他处理组均无显著性差异;

而 pH 碱性偏移处理组中除 pH8-7 组外,其他处理组活性巯基含量显著减少($P<0.05$)。pH 酸碱偏移幅度越大,活性巯基含量的减少程度更为显著。王瑛^[29]发现 pH 酸碱偏移处理会导致罗非鱼肌球蛋白活性巯基含量明显下降,并认为巯基含量明显降低,可能是在去折叠、重折叠过程肌球蛋白发生了不同程度的变性,重折叠后不能完全恢复原本的结构,使巯基更易氧化成二硫键,因此,活性巯基含量随之减少。

2.7 内源荧光光谱变化分析

pH 偏移处理对 PLP 内源荧光光谱的影响如图 8、表 1 所示。

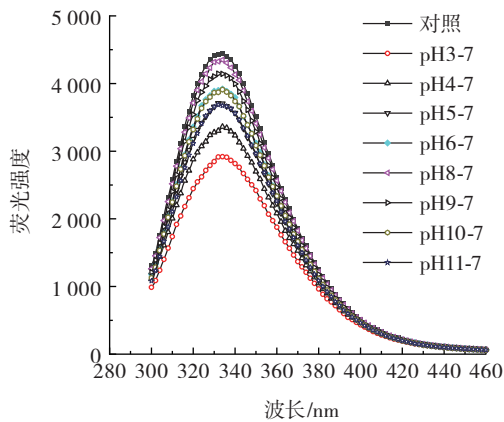


图 8 pH 偏移处理对 PLP 荧光光谱的影响

Fig.8 Effect of pH-shifting treatment on fluorescence spectrum of PLP

表 1 pH 偏移处理对 PLP 荧光强度的影响

Table 1 Effect of pH-shifting treatment on fluorescence intensity of PLP

处理组	λ_{\max}/nm	荧光强度
对照	332.83±0.29	4 419.67±29.26 ^a
pH3-7	337.00±0.50	2 916.33±28.10 ^e
pH4-7	334.50±0.50	3 332.67±33.98 ^f
pH5-7	334.25±0.35	3 712.00±14.14 ^c
pH6-7	333.17±0.58	3 999.33±38.81 ^c
pH8-7	333.75±0.35	4 373.00±32.53 ^a
pH9-7	334.00±0.71	4 189.00±48.08 ^b
pH10-7	334.83±0.29	3 924.00±39.89 ^d
pH11-7	334.83±0.29	3 730.00±34.39 ^c

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

内源荧光光谱分析是探究蛋白质构象的有效方法,它能够借助对光谱变化的分析来推断出蛋白结构中侧链的变化,从而间接反映蛋白三级结构的改变^[30]。如图 8 和表 1 所示,经过 pH 偏移处理后的猪肝蛋白,其最大发射波长(λ_{\max})相较于对照组均发生了明显的红移现象。在除 pH8-7 处理组外的其他处理组中,荧光强度均显著下降($P<0.05$)。随着 pH 酸碱偏移程度

的增加,荧光强度的下降程度也随之增加。相较于 pH 碱性偏移处理,pH 酸性偏移处理引起的荧光强度下降更为显著。蛋白质的内源荧光主要来自于色氨酸(Trp), λ_{\max} 发生了轻微的红移,表明蛋白构象被破坏,更多的色氨酸从蛋白质分子内部非极性环境中逐渐暴露出来。而荧光强度的下降可能是因为蛋白质发生了折叠,部分生色基团被破坏或者掩埋^[31]。

2.8 傅里叶红外光谱变化分析

pH 偏移处理对 PLP 红外光谱的影响见图 9。

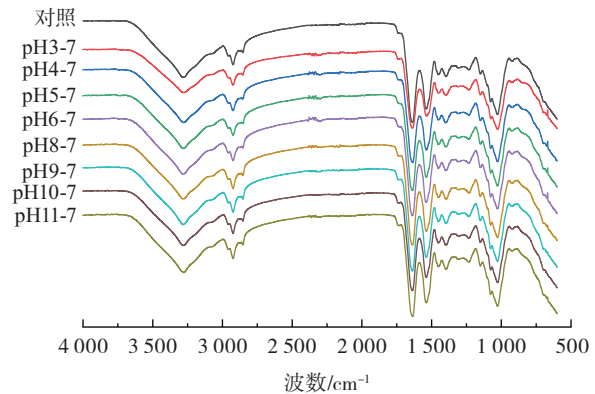


图 9 pH 偏移处理对 PLP 红外光谱的影响

Fig.9 Effect of pH-shifting treatment on Fourier transform infrared spectra (FTIR) of PLP

傅里叶红外光谱通常用于研究蛋白质二级结构构象的变化。如图 9 所示,处理组的光谱与对照组极为相似,这表明 PLP 的二级结构可能未发生明显变化。经过软件拟合、计算处理后得到表 2,其显示了对照组与处理组的二级结构相对含量。

表 2 pH 偏移处理对 PLP 二级结构相对含量的影响

Table 2 Effect of pH-shifting treatment on relative content of PLP secondary structure

处理组	β -折叠/%	无规卷曲/%	α -螺旋/%	β -转角/%
对照	41.94±0.03 ^c	14.41±0.02 ^a	25.85±0.03 ^a	17.80±0.03 ^b
pH3-7	40.70±0.02 ^e	13.81±0.03 ^b	25.34±0.04 ^e	20.15±0.03 ^a
pH4-7	41.57±0.04 ^f	14.05±0.02 ^c	25.82±0.01 ^b	18.56±0.04 ^c
pH5-7	41.94±0.03 ^c	13.96±0.01 ^f	25.69±0.01 ^c	18.40±0.02 ^d
pH6-7	41.88±0.04 ^d	13.87±0.03 ^e	25.66±0.02 ^d	18.59±0.03 ^b
pH8-7	41.60±0.05 ^e	14.27±0.02 ^d	25.86±0.02 ^a	18.27±0.02 ^e
pH9-7	41.94±0.02 ^c	14.37±0.03 ^b	25.63±0.03 ^c	18.06±0.02 ^e
pH10-7	42.38±0.03 ^a	14.03±0.02 ^c	25.46±0.01 ^f	18.14±0.01 ^f
pH11-7	42.05±0.05 ^b	14.31±0.02 ^c	25.47±0.02 ^f	18.17±0.02 ^f

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

由表 2 可知,与对照组相比,各处理组中的 4 种二级结构的相对含量变化较小。其中无规卷曲和 α -螺旋的含量有所下降,而 β -转角的含量则呈现上升趋势, β -折叠的含量则表现出一种无序的变化趋势。这些现象表明,在处理过程中,4 种二级结构之间可能发

生了不同类型的转换。Kristinsson 等^[32]研究 pH 酸碱偏移处理鳕鱼肌球蛋白时发现, 尽管 pH2.5 偏移处理组的蛋白质 α -螺旋结构有 10% 的损失, 但并未观察到二级结构的明显变化, 本试验结果与该研究一致。

3 结论

本试验针对 pH 酸碱偏移处理对蛋白质性质会产生不同影响的复杂情况, 探究宽域范围内(pH3~11)pH 酸碱偏移处理对 PLP 乳化特性的影响, 并从蛋白质颗粒分布、电化学及活性基团与分子结构变化的角度探讨 PLP 改性的机理。研究表明, pH 酸性偏移与 pH 碱性偏移对 PLP 的影响截然不同。pH 酸性偏移处理会导致 PLP 的溶解度、乳化活性以及乳化稳定性显著降低; 与 pH 酸性偏移处理不同, pH 碱性偏移处理显著提高了 PLP 的溶解度、乳化活性及乳化稳定性。其原因是 pH 酸性偏移使得乳液粒径增大、电位绝对值降低, 而 pH 碱性偏移导致乳液粒径减小、电位绝对值上升; 此外, pH 偏移还显著提高了 PLP 的表面疏水性, 降低了活性巯基含量, 荧光强度也有不同水平的降低, 这些变化均表明 pH 偏移对 PLP 的三级结构有显著影响。然而, 红外光谱分析显示, pH 偏移对 PLP 二级结构的影响较小。

综上所述, pH 偏移处理能够改变猪肝蛋白的水合特性和界面特性, 其原因是经过 pH 偏移处理后, 蛋白质的分子结构、颗粒直径以及电荷载荷发生了改变。pH 酸性偏移处理使猪肝蛋白的功能特性变差, pH 碱性偏移处理能显著改善猪肝蛋白的特性, pH 碱性偏移处理改性技术在功能性猪肝蛋白质的开发领域极具应用前景。

参考文献:

- 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.
- GOTO Y, TAKAHASHI N, FINK A L. Mechanism of acid-induced folding of proteins[J]. *Biochemistry*, 1990, 29(14): 3480-3488.
- JIANG J, XIONG Y L, CHEN J. Role of β -conglycinin and glycinin subunits in the pH-shifting-induced structural and physicochemical changes of soy protein isolate[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(2): C293-C302.
- JIANG J, CHEN J, XIONG Y L. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(16): 7576-7583.
- JIANG J, ZHU B, LIU Y F, et al. Interfacial structural role of pH-shifting processed pea protein in the oxidative stability of oil/water emulsions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(7): 1683-1691.
- KRISTINSSON H G, HULTIN H O. Effect of low and high pH treatment on the functional properties of cod muscle proteins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(17): 5103-5110.
- LI L Y, ZHAO X, XU X L. Trace the difference driven by unfolding-refolding pathway of myofibrillar protein: Emphasizing the changes on structural and emulsion properties[J]. *Food Chemistry*, 2022, 367: 130688.
- CHEN W J, WANG W J, MA X B, et al. Effect of pH-shifting treatment on structural and functional properties of whey protein isolate and its interaction with (-)-epigallocatechin-3-gallate[J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 234-241.
- YU Y L, GUAN Y, LIU J B, et al. Molecular structural modification of egg white protein by pH-shifting for improving emulsifying capacity and stability[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 121: 107071.
- 熊国远. ISP 鸡肝蛋白的乳化特性形成机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- XIONG Guoyuan. Formation mechanism of emulsifying properties of chicken liver protein extracted by ISP (Isoelectric solubilization/precipitation)[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016.
- 李鑫. 鹅肝蛋白的提取及其加工特性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- LI Xin. Study on extraction and processing properties of goose liver proteins[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018.
- 潘成磊, 丁景, 董唯, 等. 热处理温度对猪肝水溶性蛋白乳化性质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(16): 82-89.
- PAN Chenglei, DING Jing, DONG Wei, et al. Effects of heat treatment temperature on emulsifying properties of water-soluble proteins in pig liver[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(16): 82-89.
- 康梦瑶, 丁景, 鲁小川, 等. 超声波处理对水溶性猪肝蛋白乳化特性的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(3): 144-151.
- KANG Mengyao, DING Jing, LU Xiaochuan, et al. Effect of ultrasonic treatment on emulsification characteristics of water-soluble pig liver protein[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(3): 144-151.
- 陆今明, 彭松林, 杨凯麟, 等. 超声波辅助 pH 偏移处理对猪肝蛋白结构及乳化特性的影响[J]. *食品研究与开发*, 2023, 44(5): 89-96.
- LU Jinming, PENG Songlin, YANG Kailin, et al. Effect of ultrasound-assisted pH-shifting treatment on the structure and emulsification characteristics of porcine liver protein[J]. *Food Research and Development*, 2023, 44(5): 89-96.
- 唐永欣, 彭松林, 郭晨晨, 等. 温和热辅助 pH 值碱性偏移处理对猪肝蛋白结构和功能特性的影响[J]. *食品科学*, 2023, 44(24): 88-96.
- TANG Yongxin, PENG Songlin, GUO Chenchen, et al. Effect of mild heating assisted alkaline pH shift treatment on the structural and functional properties of porcine liver protein[J]. *Food Science*, 2023, 44(24): 88-96.
- AROEIRA C N, TORRES FILHO R A, FONTES P R, et al. Comparison of different methods for determining the extent of myofibrillar fragmentation of chilled and frozen/thawed beef across postmortem aging periods[J]. *Meat Science*, 2020, 160: 107955.
- CUI L Q, BANDILLO N, WANG Y C, et al. Functionality and structure of yellow pea protein isolate as affected by cultivars and extraction pH[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 108: 106008.
- AGYARE K K, ADDO K, XIONG Y L. Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt[J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(1): 72-81.
- PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique[J]. *Journal of Agricultural*

- and Food Chemistry, 1978, 26(3): 716-723.
- [20] LU Y Y, PAN D D, XIA Q, et al. Impact of pH-dependent succinylation on the structural features and emulsifying properties of chicken liver protein[J]. Food Chemistry, 2021, 358: 129868.
- [21] 吴佳. DHPM 处理和 Salecan 添加量对低盐条件下肌原纤维蛋白理化特性和结构的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2021.
- WU Jia. Effects of DHPM treatment and Salecan addition on the physical and chemical properties and structure of myofibrils protein under low-salt condition[D]. Chongqing: Southwest University, 2021.
- [22] BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, ISHIZAKI S, et al. Differences in gelation characteristics of natural actomyosin from two species of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(9): 1311-1318.
- [23] CUI C, ZHOU X S, ZHAO M M, et al. Effect of thermal treatment on the enzymatic hydrolysis of chicken proteins[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2009, 10(1): 37-41.
- [24] NIE X H, LIU H Z, YU N X, et al. Effect of high pressure homogenization on aggregation, conformation, and interfacial properties of bighead carp myofibrillar protein[J]. Journal of Food Science, 2021, 86(12): 5318-5328.
- [25] HOU H J, CHANG K C. Structural characteristics of purified beta-conglycinin from soybeans stored under four conditions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(26): 7931-7937.
- [26] 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.
- WANG Lin, ZHOU Guowei, YU Zhichao, et al. Effect of pH-shifting treatment on the structure and emulsifying properties of *Cyperus esculentus* L. protein[J]. Food Science, 2020, 41(22): 34-41.
- [27] YONGSAWATDIGUL J, HEMUNG B O. Structural changes and functional properties of threadfin bream sarcoplasmic proteins subjected to pH-shifting treatments and lyophilization[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(3): C251-C257.
- [28] VARELTZIS P K, UNDELAND I. Protein isolation from blue mussels (*Mytilus edulis*) using an acid and alkaline solubilisation technique—Process characteristics and functionality of the isolates[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(15): 3055-3064.
- [29] 王瑛. pH 值调节诱导罗非鱼肌球蛋白结构和性质的变化[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2013.
- WANG Ying. PH-shifting induced changes in the structure and properties of myosin from tilapia[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2013.
- [30] YU M, ZENG M M, QIN F, et al. Physicochemical and functional properties of protein extracts from *Torreya grandis* seeds[J]. Food Chemistry, 2017, 227: 453-460.
- [31] 王晨, 马艳秋, 张梓湘, 等. 不同处理方法对蛋清蛋白免疫原性及结构的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(15): 93-100.
- WANG Chen, MA Yanqiu, ZHANG Zixiang, et al. Effects of different processing methods on the immunogenicity and structure of egg white protein[J]. Food Science, 2022, 43(15): 93-100.
- [32] KRISTINSSON H G, HULTIN H O. Changes in conformation and subunit assembly of cod myosin at low and high pH and after subsequent refolding[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(24): 7187-7196.

责任编辑:冯娜
收稿日期:2023-07-13