

不同酸浆添加量制备的豆腐凝胶特性比较

张志衡, 陈振家*, 李玉娥, 王晓闻, 张雪冰

(山西农业大学食品科学与工程学院, 山西晋中 030800)

摘要: 以同一品种的大豆为原料制取豆浆后, 添加不同比例酸浆(20%、23%、26%), 所得酸浆豆腐通过TPA质构、化学作用力、SDS-PAGE、微观结构、红外光谱等指标的测定, 分析酸浆添加量对酸浆豆腐凝胶特性的影响。研究表明: 随着酸浆添加量的增加, 豆腐的质构性增强, 在26%时豆腐的硬度达到最大值3.53 N, 豆腐含水量、保水性及得率均显著下降($p < 0.05$), 蛋白质含量从13.09%增加到15.28%; 二硫键和疏水相互作用是酸浆豆腐形成的主要作用力, 二者占比超过90%, 离子键和氢键的参与度相对较低。疏水作用是7S蛋白参与凝胶的主要作用力, 11S蛋白的部分A亚基通过离子键和氢键连接形成凝胶, 大分子蛋白聚集体, 11S蛋白的B亚基和A₃亚基主要通过二硫键参与凝胶的形成; 随着酸浆添加量的增加, 酸浆豆腐的凝胶网络结构逐渐变得粗糙, α 螺旋含量由16.00%减少到15.83%, 无规则卷曲由16.04%减少到15.80%, β 转角由34.12%减少到33.57%, β 折叠由33.84%增加到34.80%。综上可知, 酸浆添加量对豆腐的凝胶特性有显著影响。

关键词: 酸浆添加量; 豆腐; 凝胶特性

文章编号: 1673-9078(2022)04-161-170

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.4.0924

Comparison of Gel Properties of Tofu Prepared with Different Amounts of Physalis

ZHANG Zhiheng, CHEN Zhenjia*, LI Yu'e, WANG Xiaowen, ZHANG Xuebing

(College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030800, China)

Abstract: After preparing soybean milk from soybeans of the same variety, different proportions of physalis (20%, 23%, and 26%) were added. The influence of physalis addition on the gel characteristics of the resulting tofu was analyzed by determining the texture, chemical force, SDS-PAGE pattern, microstructure, infrared spectrum, and other metrics. The texture of tofu was enhanced with increasing amounts of added physalis; the hardness of tofu reached a maximum value of 3.53 N when 26% of physalis was added. Under these conditions, the water content, water retention, and yield of tofu decreased significantly ($p < 0.05$), whereas the protein content increased from 13.09% to 15.28%. Disulfide bonds and hydrophobic interactions were the main forces driving tofu formation containing physalis, accounting for more than 90% of the total forces, whereas the contribution of ionic bonds and hydrogen bonds was relatively low. Hydrophobicity in 7S proteins was the main force driving gel formation. Some A subunits of 11S proteins were connected by ionic bonds and hydrogen bonds to form the gel. In contrast, macromolecular protein aggregates as well as B and A₃ subunits of 11S proteins mainly participated in gel formation through disulfide bonds. As the amount of added physalis increased, the gel network structure of the resulting tofu gradually became rough, and the α helix content decreased from 16.00% to 15.83%. Random coils decreased from 16.04% to 15.80%, and β turns decreased from 34.12% to 33.57%, whereas β folds increased from 33.84% to 34.80%. In summary, the amount of added physalis significantly affects the gel properties of tofu.

Key words: physalis addition; tofu; gel property

引文格式:

张志衡,陈振家,李玉娥,等.不同酸浆添加量制备的豆腐凝胶特性比较[J].现代食品科技,2022,38(4):161-170

ZHANG Zhiheng, CHEN Zhenjia, LI Yu'e, et al. Comparison of properties of tofu prepared with different amounts of physalis [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(4): 161-170

收稿日期: 2021-08-20

基金项目: 山西省重点研发计划项目(201903D221035); 山西农业大学博士科研启动(2016ZZ06)

作者简介: 张志衡(1997-), 男, 硕士, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 18335462754@163.com

通讯作者: 陈振家(1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 植物蛋白提取分离及修饰改性, E-mail: 13453216350@163.com

豆腐是世界上最受欢迎的大豆产品之一。其通过大豆浸泡、研磨、过滤、加热、凝固和成型等工艺制成,在整个过程中,大豆蛋白发生变性、解离和聚集等行为,形成具有三维网络结构的凝胶体系^[1]。凝固剂是豆腐凝胶形成的关键,据文献记载^[2],当蛋白浓度高于 8%时,通过一定的热处理即可形成凝胶,但当蛋白浓度低于 8%时,仅通过加热无法形成凝胶,需借助凝固剂的促凝作用才能形成,豆浆中的蛋白浓度低于 8%,因此在豆腐的制备过程中必须添加凝固剂。根据凝固机理,豆腐凝固剂大致可分为三类,即盐类凝固剂、酸类凝固剂和酶类凝固剂。盐类凝固剂制备所得豆腐表面光滑、产率高,具有浓浓的豆香味,但保质期短且持水性较差;酶类凝固剂制备所得豆腐弹性好、口感细腻、无异味,但其硬度偏软,且成本高;酸类凝固剂制备所得豆腐质地细滑、保水性强和弹性好等优点,但豆腐会带有酸味^[3-5]。研究发现^[6],黄浆水经自然发酵后得到的发酵液(即酸浆)可以作为凝固剂点制豆腐,即为酸浆豆腐,酸浆豆腐保水性好、质地细腻,具有很高的营养价值,且制作过程未引入钙、镁等金属离子,产生的黄浆水经过自然发酵作为凝固剂再次利用,避免了对环境造成危害,因此酸浆豆腐是一种绿色健康无污染的豆制品。关于酸浆凝固机理的报道不多,有研究发现^[7],酸浆中乳酸含量越高,制备的酸浆豆腐乳香味越浓,宋莲军等^[8]在研究有机酸对豆腐品质的影响时发现,用乳酸点制的豆腐品质优于其他单一有机酸,将单一有机酸复配为混合凝固剂时,最优配比也是以乳酸为主,宋俊梅等^[9]对酸浆成分研究后发现,在排除了蛋白质、灰分等影响外,确定了酸浆豆腐的凝固机理为酸凝,但是由于没有研究灰分的成分,没有考虑到灰分中可能存在的金属离子(Ca^{2+} 、 Mg^{2+})在蛋白凝胶形成中的贡献,Qiao 等^[10]发现自然发酵酸浆中的有机酸多为 L-乳酸,证明了乳酸菌是酸浆中的主要微生物。综上所述,我们可以推测酸浆豆腐凝固机理主要是酸浆中乳酸菌和有机酸凝固作用,还可能涉及到盐类凝固机理,因此对酸浆豆腐的凝固机理还需要做进一步的研究。

在酸浆豆腐加工中,影响豆腐凝胶特性的因素很多,包括豆水比、煮浆方式、点浆温度、酸浆品质及用量等,其中,酸浆是影响豆腐品质的关键因素^[11]。目前对酸浆的研究主要集中在酸浆中微生物的分离与鉴定方面^[12],而对酸浆豆腐凝胶特性的研究很少,本试验旨在通过不同添加量的酸浆来控制豆腐的凝固过程,探究不同凝固剂添加量下酸浆豆腐凝胶特性的变化。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

大豆,市售;酸浆,大同广灵神泉豆制品有限公司[pH 3.9,酸度=4.14(以乳酸计)];考马斯亮蓝 G-250、牛血清蛋白、无水乙醇、 β -ME、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、溴酚蓝、过硫酸铵、低分子量蛋白标样、四甲基乙二胺、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、氯化钠、尿素,分析纯。

1.2 试验仪器

自分离磨浆机,无锡市太湖城电气有限公司;单盘电子加热器、成型机,天思食品机械有限公司;TMS-Pro 型质构仪,美国 Food Technology Corporation;DYY-7C 型电泳仪,北京市六一仪器厂;可见分光光度计,上海菁华科技有限仪器公司;HH 系列数显恒温水浴锅、磁力加热搅拌器,金坛市科析仪器有限公司;HC-2064 高速离心机、大容量低速离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;电动玻璃均质机,宁波新芝生物科技股份有限公司;CM-5 型色差仪,日本柯尼卡美能达;Tensor 27 型傅里叶变换红外光谱仪,德国 Bruker;JSM-7500F 冷场发射扫描电子显微镜,日本电子株式会社;SCIENTZ-18N 型冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 酸浆豆腐的制备

根据 Kamizake^[13]、Khoder 等^[14]的方法并加以改进来制备酸浆豆腐。具体步骤为:大豆清洗 3 次,室温下浸泡 12 h,沥干水分后,将大豆与水按 1:5 (m/V)磨浆,粗浆 200 目过筛去除豆渣后,加热煮沸 5 min,冷却至 85 °C 后加入酸浆凝固,酸浆添加量分别为:20%、23%、26% (V/V),85 °C 水浴保温 10 min (蹲脑),所得豆花转移至模具中,压制成型(60 MPa, 30 min),将压制好的豆腐切割成适宜大小,于 4 °C 下保存备用。

1.3.2 酸浆豆腐质构性的测定

将制备好的豆腐切成 4 cm×4 cm×1 cm 的立方体,采用质地多面剖析法(TPA)测定豆腐质构特性^[15]。测试参数如下:测试速度:60 mm/s,测试后速度:200 mm/s,探头回升高度:15 mm,挤压距离:5 mm,测试间隔:3 s,起始力:0.4 N;每个样品重复测定 10 次。

1.3.3 酸浆豆腐得率、含水量及保水性的测定

按照 Kang 等^[16]的方法测定豆腐得率,将制作好的豆腐于室温下静置 5 min 后称重,计算 100 g 干大

豆所得豆腐的质量即为豆腐得率。

$$\text{豆腐得率} / (\text{g} / 100\text{g}) = \frac{W_1}{W_2} \times 100\%$$

式中:

W_1 ——豆腐质量;

W_2 ——干大豆质量。

参照 GB 5009.3-2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》中的直接干燥法^[17]测定豆腐的含水量(MC)。

根据王睿黎等^[18]的方法来测定豆腐的保水性。使用一种特殊的带有内管的 50 mL 离心管,内管底部成网状,在内管中放入一张滤纸片,称取滤纸片和内管的质量 m_1 ,称取约 1 g 豆腐放在滤纸上,然后称此时内管的质量 m_2 ,3500×g 离心 10 min 后,称内管的质量 m_3 ,豆腐的保水性按照如下公式测得:

$$\text{豆腐保水性} / \% = \frac{m_2 - m_3}{(m_2 - m_1) \times \text{MC}} \times 100\%$$

1.3.4 酸浆豆腐中蛋白质含量的测定

蛋白质含量的测定参考 GB 5009.5-2016^[19]。

1.3.5 酸浆豆腐凝胶作用力的测定

参考 Gómez-Guillén 等^[20]的方法。用小刀切取 3 g 豆腐凝胶放入研磨器内分别与 20 mL 的 0.05 mol/L NaCl (SA)、0.6 mol/L NaCl (SB)、0.6 mol/L NaCl+1.5 mol/L 尿素 (SC)、0.6 mol/L NaCl+8 mol/L 尿素 (SD) 和 0.6 mol/L NaCl+8 mol/L 尿素+0.2 mol/L β -ME (SE) 破碎均质,定容后 10000×g 离心 10 min。利用考马斯亮蓝法测定上清液中蛋白质的含量。离子键的贡献以溶解于 SB 溶液与 SA 溶液中蛋白质含量之差来表示,氢键的贡献以溶解于 SC 溶液与 SB 溶液中蛋白质含量之差来表示,疏水性相互作用的贡献以溶解于 SD 溶液与 SC 溶液中蛋白质含量之差来表示,二硫键的贡献以溶解于 SE 溶液与 SD 溶液中蛋白质含量之差来表示。

1.3.6 SDS-PAGE 电泳

样品制备:准确称取 5 mg 豆腐加入样品处理液(0.4% SDS、0.2 mol/L Tris-HCl, pH 6.8、2% 溴酚蓝、尿素)中,加蒸馏水补充至总体积 1 mL,震荡混匀后冷藏备用;液体样品的添加量根据其蛋白浓度确定,使最终溶液中的蛋白浓度调整至 1 mg/mL;

SDS-PAGE 电泳采用 Backman 等^[21]的方法,制得的分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%,上样量 6 μ L,恒压电泳,电流为 40 mA,浓缩胶电压为 100 V,分离胶电压为 150 V。电泳完毕,固定 2 h,染色 3 h,脱色 2 h,结束后拍照成像,并分析图谱。

1.3.7 扫描电子显微镜分析

根据 Guo 等^[22]的方法制备样品。将制备好的豆腐切成 2 mm×2 mm×1 mm 的形状,用 2.5%的戊二醛溶液 4 °C 下固定 14 h,用磷酸盐缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 7.2)洗三次,每次 20 min,然后依次用 30%、50%、70%、80%、90%、100%的乙醇溶液脱水,然后在液氮中冷冻,并进行真空冷冻干燥。将干燥的样品粘在样品台上,在样品表面喷金,扫描电子显微镜(10 kV)下观察样品微观结构。

1.3.8 傅里叶变换红外光谱分析

参照 Shin 等^[23]的方法来测定样品的二级结构。将生豆浆、熟豆浆及豆腐冷冻干燥成粉。称取冻干样品 10 mg,加入 1 g KBr,在研钵中研磨均匀,使用压片机将混合物压成透明片状(压力:10 MPa,时间:1 min),准备完成后进行测定。波长范围设定为 4000~400 cm^{-1} ,分辨率为 4 cm^{-1} ,扫描次数:24 次;利用 Peakfit 软件对图谱进行基线校正、去卷积和高斯拟合处理,根据峰与二级结构的对应关系,利用各子峰面积计算二级结构的相对含量。

1.3.9 数据分析

利用 Origin 8.0 和 Excel 软件统计分析数据并作图,用 SPSS 软件分析不同处理间的差异性,显著水平为 $p < 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 酸浆添加量对豆腐质构性的影响

表 1 酸浆添加量对豆腐质构性的影响

Table 1 Effect of physalis addition on texture of tofu

酸浆 添加量/%	测量参数			
	硬度/N	内聚性	弹性/mm	咀嚼性/mJ
20	1.24±0.08 ^c	0.4±0.03 ^a	2.54±0.30 ^a	1.27±0.23 ^c
23	1.89±0.15 ^b	0.38±0.02 ^a	2.68±0.25 ^a	1.99±0.41 ^b
26	3.53±0.15 ^c	0.4±0.05 ^a	2.83±0.42 ^a	3.63±0.53 ^a

注:同一列字母不同表示组间差异显著($p < 0.05$)。

质地特性是评价酸浆豆腐品质的重要方法之一,质构仪可以模仿口腔咀嚼,客观反映豆腐的质构特性,对豆腐质构分析中常采用的是二次压缩实验,即将样品压缩至一定距离后,返回至不与样品接触的位置,重复第一次下压过程,获得应力随时间的变化曲线,即 TPA 曲线^[12],选择硬度、弹性、内聚性和咀嚼性四个参数,凝胶硬度反应凝胶网络结构对机械力的感应,可以用来表征凝胶结构抵抗外力压缩的能力,它反映了蛋白分子间相互作用的强弱和成键数目的多少;凝胶弹性是去除外力后样品恢复至原始状态的能力,反映了凝胶抗形变能力的强弱;内聚性定义为产品抵抗

第一次变形相对于其抵抗第二次变形的程度,咀嚼性定义为将固体食物咀嚼到可吞咽的状态所需要的能量,凝胶的质构特性直接影响到食品品质。

由表1可知,随着酸浆添加量的增加,豆腐的硬度和咀嚼性显著增大($p < 0.05$),豆腐的质地由松软变得坚硬。有研究指出^[24],豆腐的质构特性是大豆蛋白质三维网络结构特性的外在表现,三维网络结构构建的强弱取决于参与蛋白数量和凝胶形成方式。不同酸浆添加量会影响等量豆浆中释放 H^+ 的多少,这直接会导致形成豆腐的质构特性差异。酸浆添加量越大,参与凝胶形成的大豆蛋白越多,其硬度和咀嚼性也会逐渐增大。弹性和咀嚼性也呈现出和硬度相同的变化趋势,说明随着酸浆添加量的增加,酸浆豆腐的抗变形能力随之增强,形状恢复能力提高;作为凝胶内部结合强度的指标,内聚性可用来模拟豆腐凝胶的强弱^[25],酸浆豆腐的内聚性整体偏小且随酸浆添加量的增加无显著性变化($p > 0.05$),表明酸浆豆腐凝胶通常较弱且一定范围内的酸浆添加量对其几乎无影响,这与Cao等^[26]的研究结果一致。整体来看,酸浆添加量对于豆腐的硬度、弹性和咀嚼性均有显著影响,而对豆腐的内聚性影响不大。

2.2 不同酸浆添加量对豆腐含水量与保水性的影响

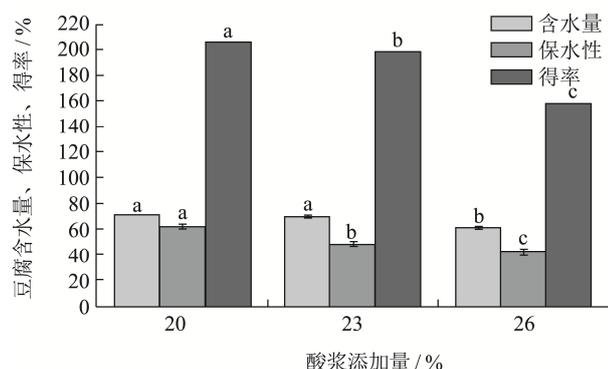


图1 不同酸浆添加量制备的豆腐得率、含水量及保水性

Fig.1 Yield, water content and water retention of tofu prepared with different levels of physalis addition

图1为酸浆添加量分别为20%、23%、26%制作的豆腐含水量、得率和保水性的测定结果。豆腐含水量定义为压制成型的鲜豆腐中水分所占比例;豆腐得率定义为一定质量的干大豆制得的豆腐的质量,它主要反映了豆浆中的蛋白向豆腐凝胶转化过程中转化率的高低;对于凝胶体系而言,凝胶保水性是指蛋白质凝胶保留水分的能力,它不仅决定凝胶网络结构的细腻程度,还关系到相关食品品质^[27]。由图1可知,随

着酸浆添加量的增加,豆腐的含水量、保水性和得率都呈逐渐降低趋势,酸浆添加量从20%提高至23%时,含水量几乎不变($p > 0.05$),但当添加量达到26%时有明显的降低($p < 0.05$);豆腐得率与其含水量变化一致,均显著降低($p < 0.05$)。酸浆中含多种有机酸,其中乳酸和醋酸含量较多,相比盐类凝固剂和无机酸,酸浆释放 H^+ 的速率较慢,而 H^+ 的缓释在一定程度上有利于豆腐凝胶结构形成的有序性,因此相比卤水豆腐,酸浆豆腐具有较高的含水量和得率。另外,20%酸浆添加量在豆腐制作过程中具有缓慢酸化作用,而随着酸浆添加量增加,由于大豆蛋白的加速聚集,可能会形成粗糙的凝胶网络结构,对水分的截留能力降低,因此酸浆添加量对豆腐含水量和得率有较大影响^[25]。也有研究证实,豆腐得率与其含水量呈正相关^[28]。

2.3 酸浆豆腐蛋白组成的测定

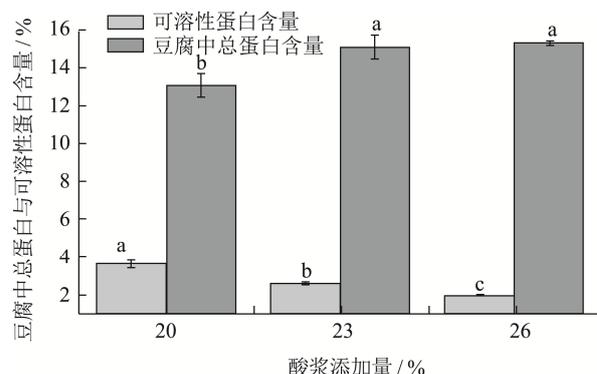


图2 不同酸浆添加量制备的豆腐中总蛋白含量与可溶性蛋白含量

Fig.2 Total protein content and soluble protein content in tofu prepared with different levels of physalis addition

酸浆豆腐形成过程中,通过 H^+ 诱导热变性大豆蛋白构建三维网络结构,形成蛋白质凝胶。豆腐内部物理空间中所截留液体中仍存在部分可溶蛋白。因此,评价豆腐凝胶形成过程中参与蛋白质的多少就有两方面考量。一是未被凝胶网络截留流失到黄浆水中的蛋白,二是被截留但保持可溶状态的蛋白。

如图2所示为酸浆豆腐中蛋白含量与可溶性蛋白含量随酸浆添加量的变化趋势,酸浆豆腐中的蛋白质含量约占豆腐总量的13%~16%,其余主要成分为水分和油脂,随着酸浆添加量的增加,酸化速率加快,过快的凝胶形成速度导致了蛋白质的快速聚集和大聚集体的形成,因而使得豆腐凝胶中的蛋白质含量不断提高,同时,由于蛋白含量的提高,蛋白凝胶中的蛋白质分子相互作用增加,分子间作用力增强,导致豆腐的硬度和咀嚼性提升。在豆腐凝胶网络结构中还存在尚未参与凝胶结构形成的蛋白,即可溶性蛋白,可溶性

蛋白在酸浆豆腐中的含量很少, 约占总蛋白的 2%~4%, 说明豆腐中大多数蛋白都参与了豆腐凝胶的形成, 随着酸浆添加量的增加, 可溶性蛋白含量逐渐降低; 酸浆豆腐中总蛋白含量的提高和可溶性蛋白含量的降低表明酸化速率的提高有助于促进大豆蛋白强凝胶网络的形成。

2.4 酸浆豆腐凝胶作用力的测定

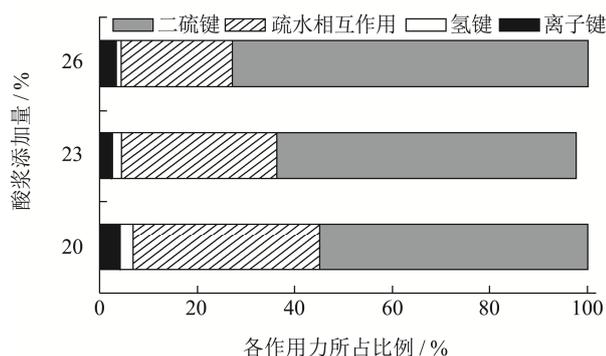


图3 不同酸浆添加量制备的豆腐中分子间作用力的组成

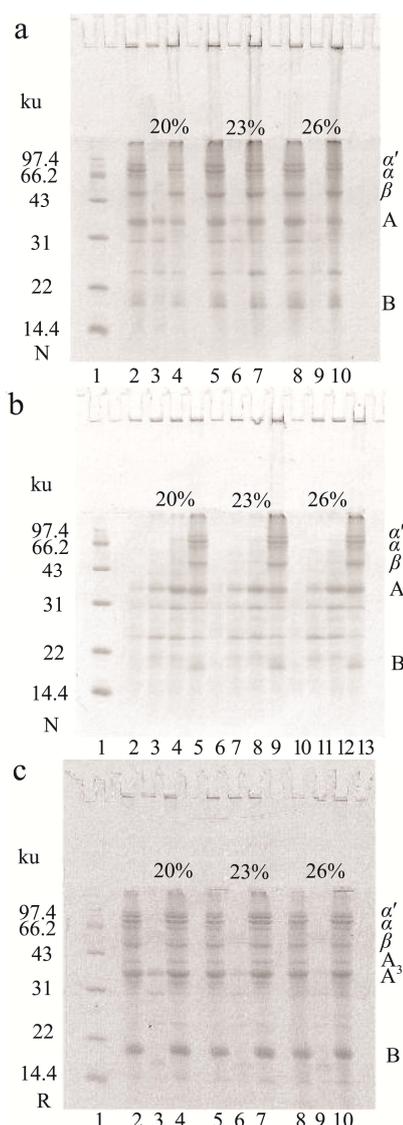
Fig.3 Composition of intermolecular forces in tofu prepared with different levels of physalis addition

在形成酸浆豆腐凝胶的过程中, 蛋白质的构象发生了变化, 在这一过程中可能伴随分子间作用力的变化, 从而形成不同的三维网络结构, 即有序聚集。酸浆豆腐中维持蛋白结构的作用力主要包括疏水作用、氢键、二硫键和离子键, 在这些作用力的综合影响下, 凝胶达到平衡状态^[29]; 使用不同酸浆添加量制备的豆腐, 可能涉及到不同的化学作用力, 且不同作用力对豆腐凝胶的贡献也有所不同, 因此, 量化这些分子间作用力的贡献有助于我们从分子角度解释酸度对于酸浆豆腐某些凝胶特性的影响。各作用力在酸浆豆腐中的贡献如图3所示, 二硫键和疏水作用是维持蛋白结构的主要作用力, 而氢键和离子键只参与少部分蛋白凝胶的形成, 这与 Zheng 等^[30]的研究结果相同。随着酸浆添加量的增加, 二硫键含量逐渐增加, Yang 等^[31]研究表明, 低静电作用可能会促进二硫键的形成, 随着 H⁺的增加, 豆浆 pH 逐渐接近蛋白质的等电点, 导致蛋白质分子间的静电力降低, 蛋白质内部的巯基暴露出来, 释放出的巯基氧化成二硫键; 疏水作用随酸浆添加量的增加呈下降趋势, 说明在较低的酸度(20%酸浆添加量)下, 由于酸化速度较慢, 促进了蛋白质之间的疏水相互作用, 这与 Cao 等^[26]的研究结果相符。离子键和氢键也参与了豆腐凝胶的形成, 金杨等^[32]的研究表明, 随着点脑温度的升高, 凝胶体系的离子键和氢键含量大幅下降, 蛋白质分子链展开, 内部疏水基团暴露, 这是 85 °C 下制备的豆腐中氢键和离子键贡

献较低的主要原因, 此外, 酸化也可能干扰了离子键和氢键的形成; 值得一提的是, 虽然酸浆豆腐中氢键和离子键含量很低, 但它们仍然是蛋白质凝胶形成的必要作用力^[30]。

由上述作用力的分析可以推测酸浆豆腐的形成过程大致分为两步, 第一步, 大豆蛋白在加热条件下变性, 维持蛋白构象的作用力(离子键、氢键、二硫键等)发生断裂, 内部疏水基团和巯基暴露, 由于此时豆浆 pH 高于大豆蛋白的等电点, 蛋白分子表面带有较多的负电荷, 因此分子间产生较强的静电斥力, 蛋白质分子难以聚集; 第二步, 随着酸浆的加入, H⁺迅速扩散, 蛋白质表面的负电荷被中和, 分子间的静电斥力减弱, 大量巯基氧化形成二硫键, 而蛋白质分子依靠疏水作用、二硫键等分子间作用力相互结合达到平衡, 最终构成凝胶网络结构。

2.5 SDS-PAGE



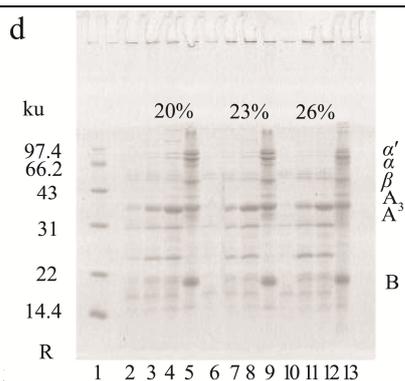


图4 不同作用力下酸浆豆腐蛋白亚基组成

Fig.4 Subunit composition of physalis tofu protein under different forces

注: a 图为酸浆豆腐、豆腐可溶性和不溶性蛋白的非还原电泳图谱(泳道1为低分子量蛋白质 Marker、泳道2~4分别为20%酸浆豆腐、豆腐中可溶性和不溶性蛋白的亚基组成,泳道5~7、8~10为相应的23%、26%酸浆豆腐各蛋白的亚基组成); b 图为酸浆豆腐在SA、SB、SC、SD溶液中可溶性蛋白亚基组成的非还原电泳图谱(泳道1为低分子量蛋白质 Marker、泳道2~5为20%酸浆豆腐在四种溶液中的可溶性蛋白亚基组成,泳道6~9、10~13分别为23%、26%酸浆豆腐在四种溶液中的可溶性蛋白亚基组成); c、d为a、b两图对应的还原电泳图谱。

对比图4a、4c中的3、6、9泳道可知,酸浆豆腐中可溶性蛋白的亚基条带较少,主要由11S的A亚基和一条30ku亚基组成,并且随酸浆添加量的增加条带逐渐变浅,对比2、5、8泳道和4、7、10泳道可知,豆腐中亚基条带与豆腐中不溶性蛋白的亚基条带相近,随着酸浆添加量的增加条带均逐渐加深,结合图2中豆腐蛋白含量的测定结果可得到以下结论:在酸浆豆腐凝胶形成过程中,少量A亚基被包裹在凝胶内部,未参与蛋白凝胶的形成;豆腐蛋白凝胶主要由11S的A、B亚基和7S的 α 、 α' 、 β 亚基组成;酸浆添加量的增加促进了豆腐中可溶性蛋白向凝胶网络的转化,且改变了蛋白的亚基组成;由图4b可知,酸浆豆腐在SA、SB、SC、SD中的蛋白亚基条带(B、A、 β 、 α 、 α')逐渐加深,说明在凝胶形成过程中有离子键、氢键和疏水作用的参与,在SA、SB、SC三种溶液中条带很少且主要由11S蛋白亚基组成,而在SD溶液中亚基条带大量增加且以7S蛋白亚基为主,结合图3酸浆豆腐凝胶作用力分析结果可知,疏水作用是酸浆豆腐中7S蛋白参与凝胶的主要作用力,而离子键和氢键在豆腐形成过程中贡献值相对较低且主要是由11S蛋白的A亚基参与;对比4a、4c两图发现,加入巯基乙醇后,B亚基条带颜色加深和A₃亚基条带的出现,可以得出豆腐凝胶形成过程中,B亚基和A₃亚基主要是通过二硫键参与,大于100ku的聚集体由多种

蛋白亚基组成,加入巯基乙醇后逐渐消失,说明这些聚集体之间也是通过二硫键连接。随着酸浆添加量的增加,豆腐中11S亚基条带增加,表明11S亚基在凝胶中的参与度提高,经研究证实,11S/7S与豆腐凝胶的质地密切相关^[33],11S/7S的增加有助于提升豆腐凝胶的硬度、弹性等质构特性,与酸浆豆腐质构性的测定结果吻合;对比4b、4d两图可知,加入巯基乙醇后,酸浆豆腐在SA、SB、SC三种溶液中的亚基组成基本不变,而SD溶液中大于97.4ku的亚基条带逐渐消失,11S亚基增加,新的亚基条带(A₃亚基)出现,说明由于稳定蛋白分子结构的二硫键断裂,11S的酸性多肽和碱性多肽发生解离,形成了单个的亚基。

SDS-PAGE电泳的结果与豆腐蛋白含量及分子间作用力的测定结果基本吻合,表明二硫键和疏水作用是维持酸浆豆腐蛋白结构的主要作用力,其中疏水作用是稳定7S蛋白构象的主要作用力,二硫键则是构成11S蛋白结构的主要作用力;酸浆添加量对豆腐中可溶性蛋白的亚基组成有一定影响。

2.6 扫描电子显微镜测定结果

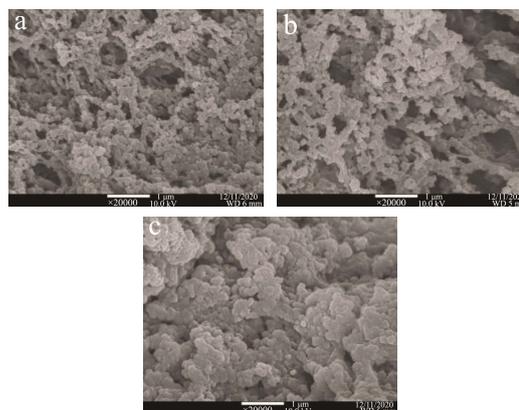


图5 酸浆豆腐的SEM图

Fig.5 SEM pictures of physalis tofu

注: a、b、c分别为20%、23%、26%酸浆制备的豆腐。

有研究表明^[34],有机酸豆腐理化性质的变化与不同的微观结构相对应。不同酸浆添加量制作的豆腐凝胶微观结构如图5所示,由图可知,蛋白质在化学键的作用下结合为聚集体,聚集体相互缠绕形成网络骨架结构,网络间的孔隙可以起到截留豆腐凝胶中水分的作用,从微观角度展现了酸浆豆腐的形成过程。用较低酸浆添加量(20%、23%)制备的豆腐与用较高酸浆添加量(26%)制备的豆腐相比,显示出更小的颗粒和更加细腻的网络结构,这可能是由于酸化速率和酸碱度的差异造成的,酸浆用量的增加导致大豆蛋白的快速聚集,有助于蛋白的局部凝胶化和更大的蛋白聚集体的形成,从而导致形成的蛋白质凝胶结构粗

糙且分布不均匀,事实上,在低酸浆添加量下制备的豆腐内部细腻的网络结构有助于提高豆腐的保水性和得率^[23],而用26%酸浆制备的豆腐的表面结构粗糙,从微观角度解释了豆腐的质地随酸浆添加量的变化规律,同时也反映出高酸浆添加量会使豆腐的质量变差。

2.7 红外光谱测定结果

大豆蛋白质凝胶体系是决定豆腐品质最重要的因素之一。赵雷等^[35]发现在豆腐凝胶形成过程中,蛋白质发生了重要的变化,尤其是其二级结构的变化; Pietrzak 等^[36]认为凝胶网络结构与蛋白质二级结构具有密切的关联性。因此,本试验利用傅里叶变换红外光谱研究酸浆豆腐制备过程中蛋白质二级结构的变化,并构建傅里叶去卷积处理后的图谱。图6为豆浆与酸浆豆腐的红外光谱图,主要由九个波峰组成,不同波峰对应不同的基团,例如3250~3400 cm⁻¹(1号峰)归属于羟基基团,脂肪族氨基酸残基分别在2800~3000 cm⁻¹(2、3号峰)和1440~1465 cm⁻¹(7号峰)附近归属于C-H拉伸和弯曲模式^[37]。在酸浆豆腐制备过程中,脂肪族氨基酸残基对应的峰面积随着酸浆添加量的增加而增大,由于亮氨酸、缬氨酸等脂肪族氨基酸通常位于大豆蛋白分子内部,这些基团的增加表明蛋白质内部的疏水基团逐渐向表面展开,蛋白质聚集的趋势增大。

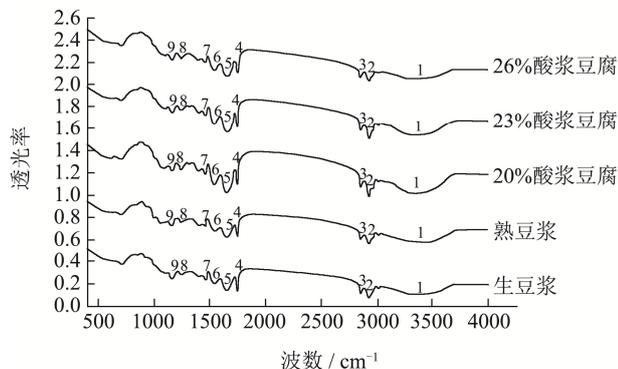


图6 不同酸浆添加量制备的酸浆豆腐中蛋白质红外光谱分析

Fig.6 Infrared spectrum analysis of protein in physalis tofu prepared with different levels of physalis addition

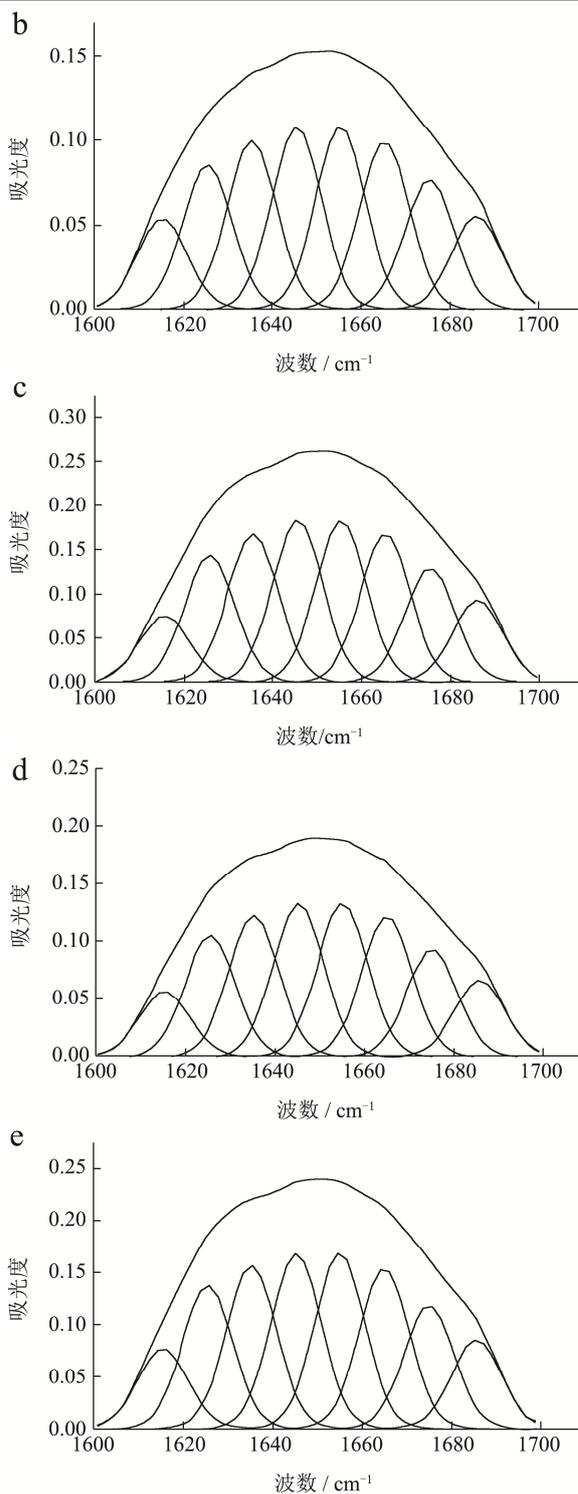
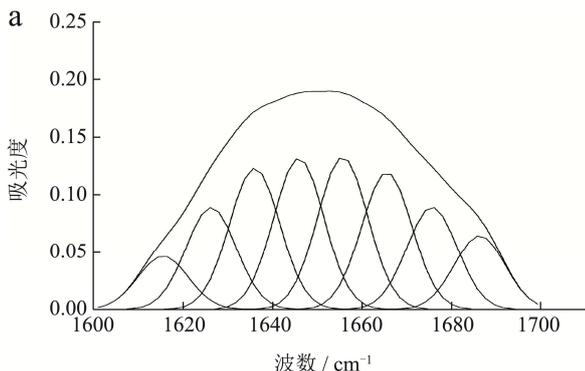


图7 酸浆豆腐形成过程中酰胺I带高斯拟合曲线

Fig.7 Gaussian fitting curves of amide I band during the formation of physalis tofu

注: a、b、c、d、e 分别为生豆浆、熟豆浆、20%酸浆豆腐、23%酸浆豆腐和26%酸浆豆腐酰胺I带高斯拟合曲线。

有研究表明,蛋白质的酰胺键存在几种不同的振动模式^[37],其中酰胺I带是研究二级结构最有用的带,被指定为C=O拉伸振动,由1600~1700 cm⁻¹范围内的波段组成,1600~1640 cm⁻¹、1640~1650 cm⁻¹、

1650~1660 cm^{-1} 、1660~1700 cm^{-1} 分别属于 β 折叠、无规则卷曲、 α 螺旋、 β 转角结构。计算出的酸浆豆腐中二级结构所占比例如表 2 所示。可以看出, 生豆浆中蛋白质结构主要是以 β 折叠 (32.47%) 和 β 转角 (34.33%) 为主, α 螺旋和无规则卷曲含量相近, 分别为 16.66%、16.54%; 与生豆浆相比, 熟豆浆中除 β 折叠含量增加外, 其他三种结构都有不同程度的减少, 这主要是由于加热使得豆浆中蛋白质变性, 空间结构展开, 在氢键、疏水作用等化学键的作用下, 蛋白质发生聚集的趋势增大, 即大豆蛋白的热聚集行为^[38]; 添加酸浆制备成豆腐后, β 折叠含量减少, 无规则卷曲、 α 螺旋和 β 转角增加, 随着酸浆添加量的增加, β 折叠含量从 33.84% 增加到 34.80%, 无规则卷曲从

16.04% 下降到 15.80%, α 螺旋从 16.00% 下降到 15.83%, β 转角从 34.12% 下降到 33.57%, 表明其他三种结构逐渐向 β 折叠转变, 蛋白质结构逐渐变得有序, 推测可能是由于 H^+ 的增加导致维持蛋白构象的内部作用力 (如疏水作用) 暴露, 分子间作用力的增加使得蛋白质快速聚集, 有助于形成有序稳定的结构。

综上所述, 在酸浆豆腐制备过程中, 蛋白质的二级结构主要是以 β 结构为主, 煮浆导致 β 折叠含量增加, 其他结构含量均减少; 豆腐压制成型后, β 折叠含量有所减少, 但随着酸浆添加量的增加, β 折叠含量不断回升, 无规则卷曲含量减少, 蛋白质二级结构有序性提高。

表 2 酸浆添加量对豆腐二级结构的影响

Table 2 Effect of physalis addition on secondary structure of tofu

项目	二级结构			
	β 折叠/%	无规则卷曲/%	α 螺旋/%	β 转角/%
生豆浆	32.47±0.25 ^c	16.54±0.18 ^a	16.66±0.29 ^a	34.33±0.64 ^a
熟豆浆	34.78±0.20 ^a	15.75±0.19 ^b	15.78±0.13 ^a	33.69±0.46 ^a
20%酸浆豆腐	33.84±0.45 ^b	16.04±0.25 ^b	16.00±0.20 ^a	34.12±0.85 ^a
23%酸浆豆腐	34.25±0.33 ^{ab}	15.97±0.24 ^b	15.98±0.10 ^a	33.81±0.65 ^a
26%酸浆豆腐	34.80±0.37 ^a	15.80±0.10 ^b	15.83±0.13 ^a	33.57±0.57 ^a

注: 同一列字母不同表示组间差异显著 ($p < 0.05$)。

3 结论

3.1 通过比较不同酸浆添加量制备的酸浆豆腐的凝胶特性发现: 随着酸浆添加量的增加, 豆腐的质构性增强, 硬度、弹性和咀嚼性均在 26% 时达到最大值; 豆腐的保水性、含水量及得率均随酸浆添加量的增加而降低, 酸浆豆腐中的蛋白质含量约占 13%~16%, 其中可溶性蛋白约占总蛋白的 2%~4%, 随酸浆添加量的增加, 豆腐中蛋白含量逐渐增加, 可溶性蛋白逐渐减少; 酸浆豆腐中的主要分子间作用力为疏水作用和二硫键, 二者合计占比超过 90%, 离子键和氢键的贡献率相对较低, 其中疏水作用是 7S 蛋白参与凝胶的主要作用力, 11S 蛋白的部分 A 亚基通过离子键和氢键参与凝胶形成, 大分子蛋白聚集体、11S 蛋白的 B 亚基和 A₃ 亚基主要通过二硫键参与凝胶的形成; 酸浆添加量为 20% 和 23% 时, 豆腐凝胶具有相对细腻的网络结构, 添加量为 26% 时, 豆腐凝胶空隙增大且粗糙; β 结构是维持酸浆豆腐中蛋白质构象的主要结构, 随着酸浆添加量的增加, α 螺旋含量从 16.00% 减少到 15.83%, 无规则卷曲从 16.04% 减少到 15.80%, β 转角从 34.12% 减少到 33.57%, β 折叠从 33.84% 增加到 34.80%。

3.2 目前我国各地酸浆豆腐的生产条件和酸浆品质存在很大差异, 因此在实际生产中, 需要根据豆腐生产的具体要求以及酸浆性质来选择合适的酸浆添加量。统一酸浆豆腐的工艺条件及豆腐品质和酸浆添加量的量化工作仍需进一步的研究。

参考文献

- [1] Joo K H, Cavender G A. Investigation of tofu products coagulated with trimagnesium citrate as a novel alternative to nigari and gypsum: comparison of physical properties and consumer preference [J]. LWT, 2020, 118: 108819
- [2] 钟芳, 王璋, 许时婴. 大豆蛋白速凝特性研究-II 不同凝固剂对速凝特性的影响[J]. 中国粮油学报, 2002, 1: 50-53
ZHONG Fang, WANG Zhang, XU Shiyong. Instant-gelation property of soy protein - II influence of coagulant [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2002, 1: 50-53
- [3] 刘宁, 高艺笑, 孙钰姬, 等. 豆腐凝固剂的研究进展[J]. 中国调味品, 2021, 46(3): 189-194
LIU Ning, GAO Yixiao, SUN Yuji, et al. Research progress of tofu coagulants [J]. Chinese Condiments, 2021, 46(3): 189-194
- [4] 江振桂, 王秋普, 张一震, 等. 不同凝固剂对豆腐品质的影响

- [J].食品与发酵工业,2019,45(7):229-234
- JIANG Zhengui, WANG Qiupu, ZHANG Yizhen, et al. Effects of different coagulants on the quality of tofu [J]. Food and Fermentation Industry, 2019, 45(7): 229-234
- [5] Zhu J R, Han D, Yang A S, et al. Effect of microbial transglutaminase cross-linking on the quality characteristics and potential allergenicity of tofu [J]. Food & Function, 2019, 10(9): 5485-5497
- [6] 高若珊,孙亚东,张光,等.酸浆豆腐研究进展[J].大豆科技, 2020,1:32-37
- GAO Ruoshan, SUN Yadong, ZHANG Guang, et al. Research progress of producing tofu with sour pulp [J]. Soybean Technology, 2020, 1: 32-37
- [7] 吕博.发酵黄浆水有机酸凝固剂的制备及应用研究[D].哈尔滨:哈尔滨商业大学,2014
- LYU Bo. The preparation and application of organic acid coagulant by yellow serofluid fermentation [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2014
- [8] 宋莲军,高晓延,胡丽娜,等.豆腐酸性凝固剂的研究[J].大豆科学,2012,31(6):1002-1006
- SONG Lianjun, GAO Xiaoyan, HU Lina, et al. Selection of acid coagulant for tofu [J]. Soybean Science, 2012, 31(6): 1002-1006
- [9] 宋俊梅,曲静然,李燕,等.脆豆腐老浆液点浆机理的研究[J].食品科技,2002,4:14-15
- SONG Junmei, QU Jingran, LI Yan, et al. Study on the mechanism of crisp tofu coagulation by laojiang [J]. Food Science and Technology, 2002, 4: 14-15
- [10] Qiao Z H, Chen X D, Cheng Y Q, et al. Microbiological and chemical changes during the production of acidic whey, a traditional Chinese tofu-coagulant [J]. International Journal of Food Properties, 2010, 13(1): 90-104
- [11] 李娟娟.酸浆豆腐加工工艺的研究[D].杭州:浙江工商大学, 2020
- LI Juanjuan. Study on processing technology of physalis tofu [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2020
- [12] 贺云.豆腐酸浆中乳酸菌的分离鉴定及其在酸浆豆腐中的应用[D].无锡:江南大学,2018
- HE Yun. The isolation and identification of lactic acid bacterial from naturally fermented tofu whey and application of the strains in the acid whey tofu [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018
- [13] Kamizake N K K, Silva L C P, Prudencio S H. Effect of soybean aging on the quality of soymilk, firmness of tofu and optimum coagulant concentration [J]. Food Chemistry, 2016, 190: 90-96
- [14] Khoder R M, Yin T, Liu R, et al. Effects of nano fish bone on gelling properties of tofu gel coagulated by citric acid [J]. Food Chemistry, 2020, 332: 1-30
- [15] Chen L, Opara U L. Approaches to analysis and modeling texture in fresh and processed foods - a review [J]. Journal of Food Engineering, 2013, 119(3): 497-507
- [16] Kang S W, Rahman M S, Kim A N, et al. Yield and physicochemical properties of low fat tofu prepared using supercritical carbon dioxide treated soy flours with different fat levels [J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(7): 2712-2720
- [17] GB/T 5009.3-2016.食品安全国家标准食品中水分的测定[S]
- GB/T 5009.3-2016. National Standard for Food Safety Determination of Moisture in Food [S]
- [18] 王睿粲.豆乳中植酸、钙镁与蛋白质的相互作用及其对蛋白质聚集的影响[D].北京:中国农业大学,2018
- WANG Ruican. Interactions among phytate, calcium/magnesium and proteins in soymilk and their effects on protein aggregation [D]. Beijing: China Agricultural University, 2018
- [19] GB/T 5009.5-2016.食品安全国家标准食品中蛋白质的测定[S]
- GB/T 5009.5-2016. National Standard for Food Safety Determination of Protein in Food [S]
- [20] Gómez-guillén M C, Borderías A J, Montero P. Chemical interactions of nonmuscle proteins in the network of sardine (*Sardina pilchardus*) muscle gels [J]. LWT - Food Science and Technology, 1997, 30(6): 602-608
- [21] Lars B, Karina P. The no-nonsens sds-page [J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2018, 1721: 89-94
- [22] Guo Y L, Hu H, Wang Q, et al. A novel process for peanut tofu gel: its texture, microstructure and protein behavioral changes affected by processing conditions [J]. LWT, 2018, 96: 140-146
- [23] Shin W K, Wicker L, Kim Y. HPMC (hydroxypropyl methylcellulose) as a fat replacer improves the physical properties of low-fat tofu [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(11): 3720-3726
- [24] Zheng L, Wang Z J, Kong Y, et al. Different commercial soy protein isolates and the characteristics of Chiba tofu [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 110: 106115
- [25] Liu H H, Chien J T, Kuo M I. Ultra high pressure homogenized soy flour for tofu making [J]. Food

- Hydrocolloids, 2013, 32(2): 278-285
- [26] Cao F H, Li X J, Luo S Z, et al. Effects of organic acid coagulants on the physical properties of and chemical interactions in tofu [J]. LWT - Food Science and Technology, 2017, 85: 59-65
- [27] 刘香英,田志刚,康立宁.大豆品种和凝固剂种类对豆腐保水性的影响[J].吉林农业科学,2012,37(6):56-60
LIU Xiangying, TIAN Zhigang, KANG Lining. Effects of soybean varieties and coagulant types on the water holding capacity of tofu [J]. Jilin Agricultural Science, 2012, 37(6): 56-60
- [28] 戴意强,周剑忠,刘小莉,等.不同凝固剂对豆腐品质特性及风味成分的影响[J].食品工业科技,2021,42(15):17-26
DAI Yiqiang, ZHOU Jianzhong, LIU Xiaoli, et al. Effects of different coagulants on quality characteristics and flavor components of tofu [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(15): 17-26
- [29] Niu H L, Xia X F, Wang C, et al. Thermal stability and gel quality of myofibrillar protein as affected by soy protein isolates subjected to an acidic pH and mild heating [J]. Food Chemistry, 2018, 242: 188-195
- [30] Zheng L, He M Y, Zhang X N, et al. Gel properties and structural characteristics of soy protein isolate treated with different salt ions before spray drying combined with dynamic high-pressure micro-fluidization [J]. Food and Bioproducts Processing, 2021, 125: 68-78
- [31] Yang X Y, Su Y, Li L. Study of soybean gel induced by *Lactobacillus plantarum*: protein structure and intermolecular interaction [J]. LWT, 2020, 119: 108794
- [32] 金杨,刘丽莎,张小飞,等.凝固温度对填充豆腐凝胶特性及分子间作用力的影响[J].食品科学,2020,41(23):49-55
JIN Yang, LIU Lisha, ZHANG Xiaofei, et al. Effect of coagulation temperature on gelling properties and chemical forces of tofu coagulated with glucono- δ -lactone [J]. Food Science, 2020, 41(23): 49-55
- [33] 周宇锋,宋莲军,乔明武,等.大豆蛋白亚基与豆腐的质构特性的相关性[J].中国粮油学报,2014,29(4):22-25,31
ZHOU Yufeng, SONG Lianjun, QIAO Mingwu, et al. Correlation of soybean protein subunits of tofu texture characteristics [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2014, 29(4): 22-25, 31
- [34] Lee C Y, Kuo M I. Effect of γ -polyglutamate on the rheological properties and microstructure of tofu [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 1034-1040
- [35] 赵雷,朱杰,苏恩谊,等.南豆腐加工过程中品质及蛋白质结构的变化[J].食品科学,2019,40(1):62-69
ZHAO Lei, ZHU Jie, SU Enyi, et al. Effect of processing conditions on quality and protein secondary structure tofu [J]. Food Science, 2019, 40(1): 62-69
- [36] Pietrzak L N, Miller S S. Microchemical structure of soybean seeds revealed in situ by ultraspatially resolved synchrotron Fourier transformed infrared microspectroscopy [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(24): 9304-9311
- [37] Liu R, Zhao S M, Xie B J, et al. Contribution of protein conformation and intermolecular bonds to fish and pork gelation properties [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 898-906
- [38] Wang J M, Xia N, Yang X Q, et al. Adsorption and dilatational rheology of heat-treated soy protein at the oil-water interface: relationship to structural properties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(12): 3302-3310

(上接第 33 页)

- [20] 马雪妮,许慧梅,程龙,等.中性粒细胞外诱捕网与炎症性肠病关系的研究进展[J].中国免疫学杂志,2021,23:2937-2941
MA Xueni, XU Huimei, CHENG Long, et al. Research progress on the relationship between neutrophil extra trapping net and inflammatory bowel disease [J]. Chinese Journal of Immunology, 2021, 23: 2937-2941
- [21] Wang Q Q, Gao H, Yuan R, et al. Procyanidin A2, a polyphenolic compound, exerts anti-inflammatory and anti-oxidative activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells [J]. PLoS One, 2020, 15(8): e0237017
- [22] Tian Y, Yang C, Yao Q, et al. Procyanidin B2 activates PPAR γ to induce M2 polarization in mouse macrophages [J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 1895
- [23] Le Bourvellec C, Bagano Vilas Boas P, Lepercq P, et al. Procyanidin-cell wall interactions within apple matrices decrease the metabolization of procyanidins by the human gut microbiota and the anti-inflammatory effect of the resulting microbial metabolome *in vitro* [J]. Nutrients, 2019, 11(3): 664