

# 寒地冬小麦冰结构蛋白对冷冻豆腐品质及蛋白质性质的抗冻保护作用

曲敏, 王宇, 陈红丽, 刘琳琳, 张光, 陈凤莲, 鲍欢, 朱颖, 朱秀清\*

(哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江省普通高校食品科学与工程重点实验室, 黑龙江省谷物食品与谷物资源综合加工重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150028)

**摘要:** 冷冻豆腐经常出现质地粗糙、孔径不均、甚至断面等品质问题。该研究采用冰球结合磷酸盐缓冲液法提取寒地冬小麦冰结构蛋白(Winter Wheat Ice Structural Proteins, WISPs), 经检测热滞性为0.46℃, 其溶液的冰晶形态小、数量多, 具有一定的抗冻活性。在不同添加量WISPs各组冷冻豆腐中, 当添加质量分数为1.00%时, 其持水率、复水性、耐煮性及弹性、拉伸性较对照组分别提高了114.17%、57.42%、56.25%、21.52%、23.71%, 硬度、剪切力降低了24.83%、23.75%; 结合水、半结合水、不易流动水含量增加了133.77%、131.78%、26.41%; 横截面光滑细腻, 蜂窝均匀, 孔径大小适中。此时冷冻豆腐蛋白游离巯基含量较对照组增加了37.50%, 二硫键含量减小了29.79%; 对照和0.25%组中90 ku以上的组分全部降解; 除0.75%和1.00%组外, 其余各组的BS亚基中低分子量组分降解; 各组中AS、BS亚基含量均少于1.00%组, 说明1.00%组的蛋白组分最稳定。WISPs作为抗冻保护剂, 改善了冷冻豆腐的品质和蛋白质结构特性, 对其具有抗冻保护作用, 为抗冻蛋白在冷冻食品中的应用提供了理论基础。

**关键词:** 冰结构蛋白; 抗冻活性; 冷冻豆腐; 质构特性; 蛋白质性质

文章编号: 1673-9078(2023)04-126-135

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.4.0482

## Antifreeze Protective Effect of Winter Wheat Ice Structural Proteins on the Quality and Protein Properties of Frozen Tofu

QU Min, WANG Yu, CHEN Hongli, LIU Linlin, ZHANG Guang, CHEN Fenglian, BAO Huan, ZHU Ying, ZHU Xiuqing\*

(College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Key Laboratory of Food Science and Engineering of Heilongjiang Province, Key Laboratory of Grain Food and Comprehensive Processing of Grain Resource of Heilongjiang Province, Harbin 150028, China)

**Abstract:** Frozen tofu is often associated with quality issues, such as coarse texture, inconsistent pore sizes, and even broken sections. Herein, ice balls were combined with phosphate buffer solution (PBS) to extract winter wheat ice structural proteins (WISPs). Based on the analysis, its thermal hysteresis activity (THA) was 0.46 °C. The ice crystals in the solution were small and numerous, and exhibited a certain anti-freezing activity. When 1.00% of WISP was added to frozen tofu, the water holding capacity, rehydration capacity, cooking resistance, elasticity, and stretchability increased by 114.17%, 57.42%, 56.25%, 21.52%, and 23.71%, respectively, compared with those of the control, while the firmness and shear force decreased by 24.83% and 23.75%, respectively. The content of bound water, semi-bound water, and non-flowing water increased by 133.77%, 131.78%, and 26.41%, respectively. The cross section was smooth and delicate, the honeycomb was uniform, and the pore sizes were moderate. Compared with the control, the free sulfhydryl group content of the frozen tofu protein increased by

引文格式:

熊雪梅,李可文,陈苗苗,等.乳双歧杆菌V9对头孢曲松钠作用小鼠肠道菌群的变化[J].现代食品科技,2023,39(4):126-135.

XIONG Xuemei, LI Kewen, CHEN Miaomiao, et al. Effect of *Bifidobacterium lactis* V9 on changes in intestinal microflora of ceftriaxone sodium-treated mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(4): 126-135.

收稿日期: 2022-04-14

基金项目: 黑龙江省“百千万”工程科技重大专项(2021ZX12B04-01)

作者简介: 曲敏(1966-),女,博士,教授,研究方向: 粮食化学与农产品加工技术, E-mail: qumin777@126.com

通讯作者: 朱秀清(1968-),女,硕士,教授,研究方向: 蛋白质分子化学及大豆深加工, E-mail: xqzhuwang@163.com

37.50% and the content of disulfide bonds decreased by 29.79%. All components above 90 ku in the control group and 0.25% group had degraded. Except for the 0.75% and 1.00% groups, the low molecular weight components of the BS subunits in other groups were degraded. The contents of the AS and BS subunits in each group were lower than those in the 1.00% group, indicating that the protein components in the 1.00% group were the most stable. As an antifreeze protective agent, WISPs improved the quality and characteristics of the protein structure of frozen tofu, and exhibited an antifreeze protective effect. This result provides a theoretical basis for the application of antifreeze protein in frozen food.

**Key words:** ice structural protein; antifreeze activity; frozen tofu; texture properties; protein properties

冷冻豆腐是一种以蛋白质网络为骨架的水合凝胶状产品,其结构和品质受到制造过程中诸多因素的影响,如在压制、点脑时,可能造成冷冻豆腐的外观扭曲变形、复水性差、蒸煮损失严重、口感粗糙等问题<sup>[1]</sup>。如何降低冷冻对品质劣变的影响仍然是冷冻豆腐生产的迫切问题,目前国内外一些研究尝试选择在冷冻豆腐生产加工中添加品质改良剂以期改善冷冻豆腐的品质。李良等<sup>[2]</sup>探究了在豆浆中分别添加酪蛋白酸钠、明胶等,发现由此制成的冷冻豆腐耐煮性增强、空间结构更加致密。但在生产中由于常发生冷冻过度,致使冷冻豆腐中冰晶过大且不规律,进而导致孔径粗大不均,甚至出现断裂、咀嚼度下降等现象<sup>[3,4]</sup>。冷冻使食品中的结合水向自由水转变,自由水之间相互汇集经冻结形成冰晶,且由小冰晶逐渐形成形态、大小不一的大冰晶,对食品结构造成不同程度的破坏,导致冻藏食品风味及品质的劣变<sup>[5-7]</sup>。

冰结构蛋白(Ice Structuring Proteins, ISPs),又称为抗冻蛋白或热滞蛋白,是生物体经低温诱导后产生的抗逆蛋白,广泛存在于寒冷、高海拔地区的动植物与昆虫体内<sup>[8,9]</sup>。在冷冻过程中,它能以非依数性的形式降低水溶液的冰点,同时可通过氢键和疏水基团之间的协同作用直接吸附到冰晶上,以此来修饰冰晶形态、控制冰晶生长和抑制细胞外重结晶<sup>[10]</sup>。通过ISPs对水的强有力束缚,可阻止冷冻食品中结合水向自由水的转变和冰晶的生长,使其生成体积小、数量多、分布均匀的冰晶,保护了冷冻食品的品质。曲敏等<sup>[11]</sup>将苜蓿 ISPs 添加在冷冻湿面筋中经低场核磁检测,苜蓿 ISPs 的添加减缓了面筋中可冻结水含量的上升趋势,提高了面筋的持水性。Mei 等<sup>[12]</sup>研究了胡萝卜 ISPs 对冷冻面团的影响,发现胡萝卜 ISPs 减弱了冷冻对面团发酵能力和微观结构的损害,使面包的醒发力和比容较对照组分别提高了 21.63%、13.81%。Ding 等<sup>[13]</sup>利用扫描电镜检测大麦 ISPs 对冷冻面包的影响时发现,大麦 ISPs 的添加使冷冻面包孔洞均匀、无大孔洞生成。近年,本研究组系统研究了苜蓿、胡萝卜、分蘖洋葱及寒地冬小麦等 ISPs 的提取与抗冻活性分析,并应用于多种冷冻食品改善其品质<sup>[11,14,15]</sup>。

本研究采用冰结合磷酸盐缓冲溶液法提取寒地冬

小麦冰结构蛋白(Winter Wheat Ice Structural Proteins, WISPs),并将 WISPs 添加在冷冻豆腐的加工中,通过考察 WISPs 添加量对冷冻豆腐品质和冷冻豆腐蛋白性质的影响,旨在探究冷冻豆腐品质提升的工艺改善和 WISPs 作为抗冻保护剂在冷冻豆腐中的应用,为规模化工业生产提供理论参考。2006年,我国卫生部批准 ISPs 为食品添加剂,由于 ISPs 的广泛性和高效性,为 ISPs 在冷冻食品领域的应用提供新机遇。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

大豆,黑龙江哈高科大豆食品有限公司;氯化钙,山东海化股份有限公司;消泡剂,河北万邦实业有限公司;寒地冬小麦粉,黑龙江省农业科学院提供;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠,天津市天力化学试剂有限公司;考马斯亮蓝,上海迈坤化工有限公司;十二烷基硫酸钠,北京生东科技有限公司;冰醋酸,上海豪申化学试剂有限公司;溴酚蓝,沈阳先创化工有限公司;丙烯酰胺、双丙烯酰胺、甘氨酸、过硫酸铵,天津市旭泰化学试剂有限公司。

DK-8D 型恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司;DW-45W88 型低温冷冻柜,浙江捷胜制冷科技有限公司;L2-4K 型低速台式离心机,湖南可成仪器设备有限公司;ESJ180-4 型电子天平,上海恒平科学仪器有限公司;TA-XT2i 型质构分析仪,英国 Stable Micro System 公司;S-3400N 型,扫描电镜日本 Hitachi 公司;NM120 型,低场核磁共振仪,上海纽迈科技有限公司;05400088 型体式镜,上海彼爱姆光学仪器制造有限公司;722G 型可见分光光度计,上海精科有限公司;F97Pro 型荧光光谱仪,上海凌光技术有限公司;FTIR-650 型傅里叶红外光谱仪,杭州格图科技有限公司;Zetasizer Nano-ZS90 型激光粒度仪,英国 Malvern 公司;DYCZ-24DN 型电泳仪,北京六一仪器厂;R-250 旋转蒸发仪,北京市君意机电技术公司;DL-1 冷冻干燥机,宁波市双嘉仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

### 1.2.1 WISPs 提取流程

采用本研究组的冰球结合磷酸缓冲溶液法制备 WISPs。参考曲敏等<sup>[11]</sup>、陈凤莲等<sup>[14]</sup>的方法,并改进。称取寒地冬小麦面粉,与 10 mol/L pH 值 7.8 的磷酸缓冲溶液 (PBS) 1:15 (m/V) 混合,在 800 r/min 的条件下磁力搅拌 2 h,在 2 000 r/min 的条件下离心 15 min,取上清液,将上清液置于冰箱预冷。加入直径为 1 cm 的冰球(每 100 mL 上清液加入 25 颗冰球),在 -10 °C 环境下静置 2 min,收集冰球弃去溶液,待冰球自然融化即形成 WISPs 溶液,经旋转蒸发浓缩至原体积的 1/6。于 -18 °C 下冷冻后,再转入 -52 °C、真空度 0.1 MPa 的真空冷冻干燥器中冷冻干燥 36 h,制成 WISPs 冻干粉样品。

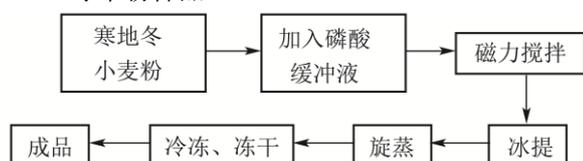


图 1 WISPs 提取流程图

Fig.1 Extraction flow chart

### 1.2.2 冷冻豆腐样品的制备

参考 Chua 等<sup>[16]</sup>和何婉莹等<sup>[17]</sup>的方法制作冷冻豆腐,并进行改进。称取 1 kg 大豆,去杂、清洗,按干物质与水比例 1:3 (m/V) 混合,浸泡 12~15 h 后,磨浆 5 min,制成豆浆。以 200 目滤布过滤进行浆渣分离,加入  $m=0.01\%$  的消泡剂。待消泡后,边搅拌边煮浆,搅拌机条件设置为 130~140 r/min,煮浆至沸腾,转小火持沸 15 min,将熟浆冷却至 85 °C,添加  $m=3\%$  氯化钙作为凝固剂进行点脑,于 85 °C 水浴锅中蹲脑 25 min 制成豆花,将豆花移至模具中,在 10 kg 的压力下缓慢压制排出黄浆水,至不再有水析出为止,得到鲜豆腐切块,放入 -18 °C 下冷冻 48 h 得到冷冻豆腐。

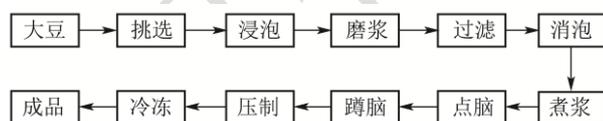


图 2 冷冻豆腐制作流程图

Fig.2 Frozen tofu making flowchart

### 1.2.3 WISPs 冷冻豆腐样品的制备

以 WISPs 作为抗冻保护剂,按照 1.2.2 的方法制备冷冻豆腐,将豆浆煮浆冷却后,分别添加  $m=0$ 、0.25%、0.50%、0.75%、1.00%、1.25% 的 WISPs,经点脑、蹲脑、压制成型、切块后,于 -18 °C 的条件下冷冻 48 h,用于后续检测。

### 1.2.4 冷冻豆腐蛋白检测样品的制备

参考 Wang 等<sup>[18]</sup>和 Kobayashi 等<sup>[19]</sup>的方法,将 1.2.2

和 1.2.3 制备的冷冻豆腐样品,于 -52 °C、真空度 0.1 MPa 的真空冷冻干燥器中冷冻干燥 36 h,经研磨制备成冷冻豆腐冻干粉,用于检测 WISPs 对冷冻豆腐蛋白分子量和功能性质的影响。

### 1.2.5 指标测定方法

#### 1.2.5.1 WISPs 样品溶液冰晶观察

将 WISPs 样品配置成质量分数为 3% 的蛋白溶液,使用移液枪匀速吸取 50  $\mu$ L 溶液,注入到双凹载玻片的凹槽中,整个过程防止产生气泡,在 -18 °C 环境下冷冻 2 h 以上。取出后在融化前迅速在 40 $\times$ 显微镜下观察冰晶形态,拍照记录。

#### 1.2.5.2 WISPs 分离组分的热滞活性 (Thermal Hysteresis Activity, THA) 检测

参照曲敏等<sup>[11]</sup>方法利用 DSC 检测仪对其 THA 值和冰核含量进行检测, ( $\Phi$ ) 和 THA 计算方法如下:

$$\Phi = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_m} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$\Phi$ ——样品中的冰核含量, %;

$\Delta H_f$ ——停留温度停留后继续降温过程中体系的结晶焓;

$\Delta H_m$ ——样品熔融焓。

$$THA = T_h - T_0 \quad (2)$$

式中:

THA——样品的热滞活性, °C;

$T_h$ ——停留温度, °C;

$T_0$ ——不同停留温度下体系的开始结晶温度, °C。

#### 1.2.5.3 冷冻豆腐持水性测定

取解冻后的冷冻豆腐样品切成 3.0 cm $\times$ 3.0 cm $\times$ 2.0 cm 的小块,称重。将其置于底部充填足量脱脂棉的 50 mL 离心管中,在 8 000 r/min 离心 25 min,去掉冷冻豆腐表面的脱脂棉,弃上清,用干燥的滤纸吸去冷冻豆腐表面残留的液体,称重。根据下式计算持水性。

$$B = \frac{W_t - W_r}{W_t} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

B——持水性, %;

$W_t$ ——离心前冷冻豆腐的质量, g;

$W_r$ ——离心后冷冻豆腐的质量, g。

#### 1.2.5.4 冷冻豆腐复水性测定

取解冻后的冷冻豆腐样品切成 3.0 cm $\times$ 3.0 cm $\times$ 2.0 cm 的小块,称重。然后将冷冻豆腐样品置于沸水中煮制 10 min,取出静置沥水 5 min 后称取重量,复水性按下式计算。

$$E = \frac{M_2 - M_1}{M_2} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

$E$ —复水性, %;

$M_1$ —复水前冷冻豆腐的质量, g;

$M_2$ —复水后冷冻豆腐的质量, g。

#### 1.2.5.5 冷冻豆腐耐煮性测定

冷冻豆腐样品切成 3.0 cm×3.0 cm×2.0 cm 的小块并进行编号, 在 100 °C 的水中煮 30 min, 观察冷冻豆腐的碎裂程度与其边缘出现破损的时间。

#### 1.2.5.6 冷冻豆腐质构测定

参照刘张菊等<sup>[20]</sup>的方法, 将冷冻豆腐于室温解冻后, 切成 2.0 cm×2.0 cm×1.0 cm 的小块, 利用质构分析仪对其进行分析。使用 P/36R 探针将样品压缩变形, 触发力 5.0 g, 预测速度 5.0 mm/s, 测试速度 1.0 mm/s, 测试后速度 10.0 mm/s, 测定每个冷冻豆腐样品的质构参数。

#### 1.2.5.7 冷冻豆腐拉伸特性的测定

参照 Wang 等<sup>[21]</sup>的方法, 稍作改动, 将冷冻豆腐于室温解冻后, 切成 3.0 cm×1.0 cm×0.1 cm 的小块, 利用质构分析仪对其进行分析。选用 A/KIE 探头测定, 参数如下: 测前速度: 2.0 mm/sec, 测试速度: 3.0 mm/sec 侧后速度: 10.0 mm/sec, 探头距离: 30 mm, 受力: 5.0 g。

#### 1.2.5.8 冷冻豆腐剪切特性的测定

参照 Shu 等<sup>[22]</sup>的方法, 将冷冻豆腐于室温解冻后, 切成 3.0 cm×3.0 cm×1.0 cm 的小块。用物性测试仪测定剪切力, 探头选用 A/CKB, 参数如下: 测前速度: 1.0 mm/sec, 测试速度: 2.0 mm/sec, 侧后速度: 10.0 mm/sec, 切距离 95%, 临界力 10 g。

#### 1.2.5.9 冷冻豆腐蛋白二硫键的测定

参考荣荟等<sup>[23]</sup>的方法, 并进行改进。将冷冻豆腐冻干样品配制成浓度为 10 mg/mL 的溶液, 取 400 μL 溶液于 10 mL 离心管中, 加入 20 μL 巯基乙醇和 1.6 mL 尿素-盐酸胍溶液, 置于 25 °C 恒温水浴锅中静置 1 h 后, 于 5 000 r/min 条件下离心 10 min, 取出沉淀, 清洗两次。向二次清洗、离心后的沉淀中加入 4 mL 磷酸缓冲溶液 (0.01 mol/L, pH 值 8.0) 和 32 μL 的 DTNB, 于 25 °C 恒温水浴锅中 1 h, 于 10 000 r/min 条件下离心 30 min, 取上清液在 412 nm 处测定 OD 值, 即为总巯基含量。

将冷冻豆腐冻干样品配制成浓度为 10 mg/mL 的溶液, 取 2 mL 溶液加入等量的磷酸缓冲溶液 (0.01 mol/L, pH 值 8.0) 和 67 μL 的 DTNB, 放置于 25 °C 恒温水浴锅中 1 h, 在 10 000 r/min 条件下离心 30 min, 取上清液在 412 nm 处测定 OD 值, 即为游离巯基含量。

$$F = \frac{73.53A_{412} \cdot D}{C} \quad (5)$$

式中:

$F$ —巯基含量, μmol/mg;

$A_{412}$ —吸光度值, nm;

$C$ —蛋白质溶液的质量浓度, mg/mL;

$D$ —稀释倍数。

$$G = \frac{F_1 - F_2}{2} \quad (6)$$

式中:

$G$ —二硫键含量, μmol/mg;

$F_1$ —总巯基含量, μmol/mg;

$F_2$ —游离巯基含量, μmol/mg。

#### 1.2.5.10 冷冻豆腐蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳

参考曲敏等<sup>[11]</sup>的实验方法, 采用 10% 的分离胶, 4% 的浓缩胶来测量。将冷冻豆腐冻干样品以 2 mg/mL 的浓度溶于 8 mol/L 尿素溶液中保持 1 h, 在 5 000 r/min 条件下离心 10 min; 取 10 μL 上清液与 10 μL 还原型上样缓冲液混合 (含 β-巯基乙醇), 在 95 °C 下加热 5 min 后, 每个胶道上 15 μL 的样品。

#### 1.2.5.11 冷冻豆腐低场核磁的测定

参考史晓斐等<sup>[24]</sup>的方法, 采用低场核磁检测冷冻豆腐的水分迁移。用打孔器取 2.0 g 冷冻豆腐样品, 放入核磁共振专用试管, 随后置于核磁共振成像分析仪测试探头中, T 使用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 序列进行测定, 累加扫描次数为 8, 回波数为 4 000。对所得图谱进行反演, 得到弛豫时间 T 的分布情况。

#### 1.2.5.12 冷冻豆腐 SEM 观察与表征

参考 Zhu 等<sup>[25]</sup>实验方法, 稍作改进, 将冷冻豆腐样品切成约 0.8 cm×0.6 cm×0.1 cm 薄片, 然后用 pH 值 6.8 戊二醛溶液进行固定, 用 pH 值 6.8 磷酸缓冲溶液冲洗冷冻豆腐切片样品, 后进行脱水、干燥。将处理后的冷冻豆腐样品均匀固定在贴胶的电镜进样台上, 进行喷金后, 在 SEM 下观察试验结果。

### 2 结果与讨论

每组实验重复 3 次, 实验数据经 SPSS 17.0 软件分析, 在 0.05 水平上对实验结果进行差异显著性分析, 用 Origin 2018 进行作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1. WISPs 冰晶形态和热滞性分析

#### 2.1.1 WISPs 溶液的冰晶形态观察

由图 3、4 可观察到, 以水作为对照, 水形成的冰晶体积大、排列密集、无规则形状, 3.00% WISPs 溶液所形成的冰晶细小、密集、分布均匀, 出现水滴型、小圆型、短棒型、线性。可见, 在冷冻过程中, WISPs 抑制了大冰晶的形成, 并对其形态进行修饰。Deng

等<sup>[26]</sup>利用显微镜和红外激光器检测时发现,水形成的冰晶较大、形态无规则,ISP<sub>s</sub> 溶液的冰晶较小、呈菱形,分布均匀。因此,WISP<sub>s</sub> 具有抑制冰晶长大、修饰冰晶形态的作用。

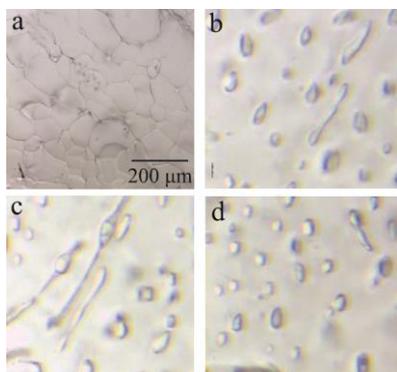


图3 3% WISP<sub>s</sub> 溶液、水冰晶形态 (40×)

Fig.3 Ice crystal morphology of 3% WISP<sub>s</sub> solution, aqueous solution and 3% sucrose solution (40×)

注: a 为水, b~d 为 3% WISP<sub>s</sub> 溶液。

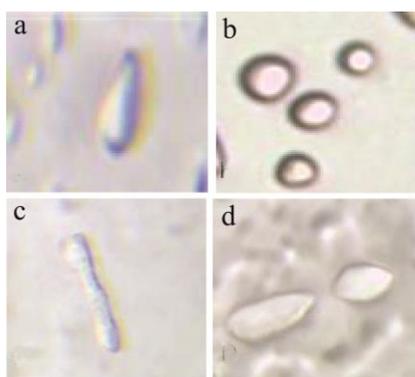


图4 WISP<sub>s</sub> 冰晶放大图

Fig.4 Ice-crystal magnification plot of WISP<sub>s</sub>

注: a: 水滴形; b: 小圆形; c: 线性; d: 短棒形。

### 2.1.2 THA 的 DSC 检测结果

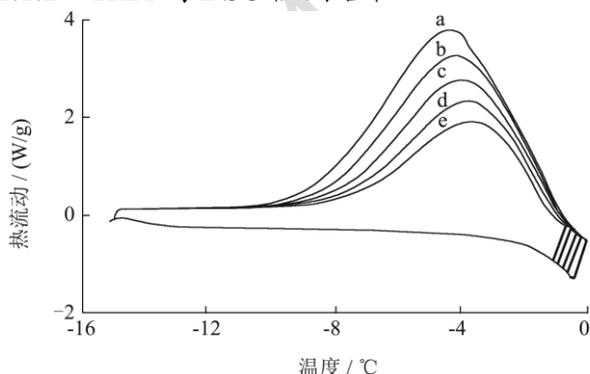


图5 WISP<sub>s</sub> 的 THA 值及冰核含量

Fig.5 THA value and ice core content of WISP<sub>s</sub>

注: a~e 分别为 -0.00、-0.18、-0.34、-0.53、-0.70 °C。

DSC 法是一种热分析方法,能够通过测定升、降温过程中热焓的变化直接反映样品冰点与熔点之间的差异,获得其 THA<sup>[27]</sup>。由图 5、表 1 可看出,随着停

留温度升高,放热曲线面积变大。当停留温度从 -0.70 °C 升高至 -0.00 °C 时,冰核含量从 64.12% 降至 12.57%,THA 先稳定后降低再上升,从 0.28 °C 升高至 0.46 °C,高于谷朊粉 ISP<sub>s</sub> 的 0.27 °C<sup>[28]</sup>,表明 WISP<sub>s</sub> 组分的 THA 良好。结合 WISP<sub>s</sub> 溶液的冰晶形态特点及其 THA,说明 WISP<sub>s</sub> 具有植物 ISP<sub>s</sub> 的特点,即较低的热滞活性与良好的冰晶修饰性,因此,具有较好的抗冻活性。

表 1 WISP<sub>s</sub> 组分的 THA 检测结果

Table 1 THA measurement of component of WISP<sub>s</sub>

停留温度 T <sub>p</sub> /°C	再次冻结起始 温度 T <sub>0</sub> /°C	热滞活性 THA/°C	冰核 含量/%
-0.70	-0.98	0.28	54.56
-0.53	-0.81	0.32	42.82
-0.34	-0.66	0.33	27.22
-0.18	-0.51	0.46	12.57
-0.00	-0.46	0.28	64.12

### 2.2 不同 WISP<sub>s</sub> 添加量对冷冻豆腐品质的影响

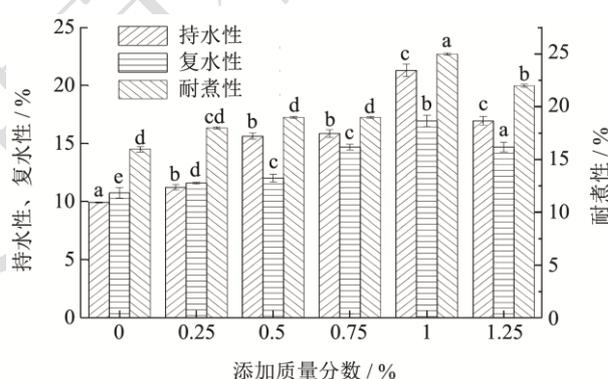


图6 持水性、复水性及耐煮性检测

Fig.6 Water holding and rehydration and boiling resistance test

从图 6、图 7、表 2 可见,随着 WISP<sub>s</sub> 添加量的增加,冷冻豆腐的持水性、复水性、耐煮性、拉伸力、弹性呈现先上升后下降的趋势,硬度、剪切力呈现先下降后上升的趋势,在添加质量分数 1.00% 时各项指标最佳,其持水性、复水性、耐煮性及弹性、拉伸性等质构特性较对照组分别提高了 114.17%、57.42%、56.25%、21.52%、23.71%,硬度、剪切力降低了 24.83%、23.75%;其中,0%、0.25% 组的冷冻豆腐孔径粗大不均、部分断裂,0.50%、0.75%、1.25% 组冷冻豆腐孔径较均匀、表面粗糙,1.00% 组冷冻复水豆腐样品的孔径大小均匀、冷冻豆腐块完整。鲜豆腐在冷冻过程中,水分子相互汇集经冻结形成冰晶,形成冷冻豆腐独特的多孔型态<sup>[23]</sup>,若冷冻过度,则冰晶过大且分布不均,造成冷冻豆腐的孔径粗大,甚至出现断面。ISP<sub>s</sub> 具有一定的热滞活性和冰晶修饰性,可降

低蛋白骨架中包裹的水分子的冰点,抑制了冷冻过程中大冰晶的形成,修饰了冰晶形态和大小<sup>[29,30]</sup>。Zhang等<sup>[31]</sup>研究了燕麦 ISPs 对冷冻面团的影响,结果表明添加 ISPs 可保护面筋机制不受破坏、提高面团含水量。

水形成的大冰晶对冷冻豆腐品质造成破坏力,致使其失水、导致硬度、剪切力升高,弹性、回复性降低。添加 WISPs 有效改善了冷冻豆腐的品质特性,其中以 1.00%添加量为最优。

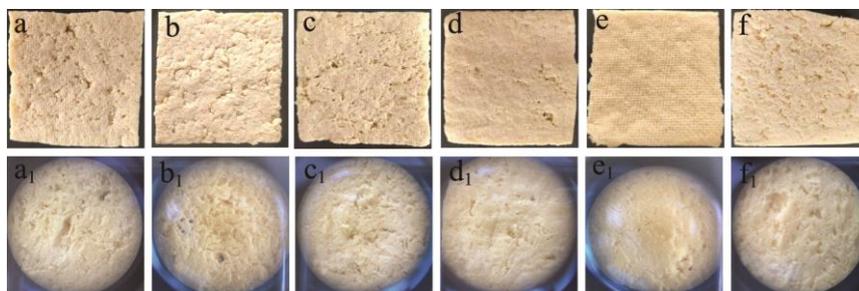


图7 冷冻豆腐实物图、10×体式镜图

Fig.7 Physical picture of frozen tofu and 10×body type mirror map

注: a~f 为 WISPs 添加量 0~1.25%冷冻豆腐实物图; a<sub>1</sub>~f<sub>1</sub> 为 WISPs 添加量 0~1.25%冷冻豆腐 10×体式镜图。

表2 冷冻豆腐质构特性

Table 2 Texture characteristics of frozen tofu

添加质量分数/%	硬度/gf	弹性	黏聚性	回复性	剪切力/gf	拉伸力/gf
0	1390.67±6.15 <sup>a</sup>	0.79±0.02 <sup>b</sup>	1.11±0.01 <sup>a</sup>	0.22±0.01 <sup>a</sup>	2678.67±6.16 <sup>a</sup>	21±0.84 <sup>b</sup>
0.25	1301.33±2.89 <sup>b</sup>	0.82±0.01 <sup>b</sup>	1.10±0.01 <sup>a</sup>	0.22±0.01 <sup>a</sup>	2648.00±8.66 <sup>a</sup>	23.12±0.54 <sup>b</sup>
0.50	1254.00±5.78 <sup>b</sup>	0.92±0.01 <sup>a</sup>	1.11±0.01 <sup>a</sup>	0.22±0.01 <sup>a</sup>	2322.67±24.64 <sup>b</sup>	24.63±1.44 <sup>ab</sup>
0.75	1232.33±2.67 <sup>c</sup>	0.93±0.01 <sup>a</sup>	1.11±0.01 <sup>a</sup>	0.22±0.01 <sup>a</sup>	2064.67±19.55 <sup>d</sup>	25.36±0.72 <sup>ab</sup>
1.00	1045.33±4.04 <sup>d</sup>	0.96±0.02 <sup>a</sup>	1.12±0.01 <sup>a</sup>	0.23±0.01 <sup>a</sup>	2042.00±2.89 <sup>d</sup>	25.98±0.78 <sup>a</sup>
1.25	1110.00±1.85 <sup>d</sup>	0.94±0.02 <sup>a</sup>	1.11±0.02 <sup>a</sup>	0.23±0.01 <sup>a</sup>	2135.67±5.75 <sup>c</sup>	23±0.58 <sup>b</sup>

注: 采用 SPSS 进行显著性分析, 同一列中不同小写字母表示显著性差异 (P<0.05)。

## 2.3 不同 WISPs 添加量对蛋白结构和性质的影响

### 影响

#### 2.3.1 不同 WISPs 添加量对冷冻豆腐蛋白游离巯基和二硫键的影响

二硫键是连接不同肽链或同一肽链中两个不同半胱氨酸残基的巯基组成的化学键。当外界环境改变时,蛋白质结构展开、二硫键断裂、巯基含量增加,或引发蛋白聚集和内部巯基的包埋,导致巯基向二硫键的转化<sup>[32]</sup>。

由图 8 可知,对照组的二硫键含量最高、游离巯基含量最低,随着 WISPs 浓度的增加,二硫键含量逐渐减小,游离巯基含量逐渐增加。其中,1.25%组较对照组游离巯基增加了 37.50%、二硫键含量减少减少了 29.79%,且 1.00%和 1.25%组的游离巯基和二硫键含量相差较小。Miyawaki 等<sup>[33]</sup>发现,冷冻会使水分子中的氢键发生断裂,使蛋白表面的游离巯基失去支撑,导致原本的蛋白质-水之间的相互作用向蛋白质-蛋白质的相互作用转化,引起二硫键的增加。Jia 等<sup>[34]</sup>认为添加女贞叶 ISPs 能够抑制冰晶重结晶,在一定程度上

阻止蛋白侧链上水分子的迁移,减少蛋白之间的交联。因此, WISPs 的添加减弱了冷冻豆腐蛋白中游离巯基向二硫键转变的趋势,降低了蛋白的聚集程度,减小了由于蛋白过度聚集导致的冷冻豆腐构象不稳定,使冷冻豆腐耐煮性、持水性等品质上升,其中 1.00%组的二硫键含量最少,蛋白聚集度最低。

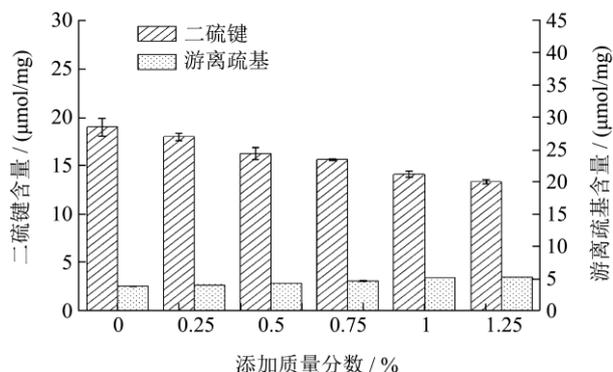


图8 游离巯基及二硫键含量

Fig.8 Free sulfhydryl group and disulfide bond content

#### 2.3.2 不同 WISPs 添加量对冷冻豆腐蛋白分子量的影响

大豆蛋白主要由大豆球蛋白 (Glycinin, 11S) 和 β-伴球蛋白 (β-Conglycinin, 7S) 组成,其分子量范

围分别为 14.4~43.0 ku 和 43~97.4 ku。其中 11S 的亚基组成主要分为酸性亚基 (AS)、分子量约为 38 ku 和碱性亚基 (BS)、分子量约为 17 ku, 二者通过二硫键连接; 7S 主要是由  $\alpha$  (分子量约为 67 ku)、 $\alpha'$  (分子量约为 71 ku) 和  $\beta$  (分子量约为 50 ku) 三种亚基所组成。

利用 QUANTITY-ONE 软件对电泳图进行分析, 整理条带分析结果见表 3。从图 9 和表 3 可以看出, 冷冻豆腐蛋白的 7S 和 11S 的各个亚基组成完整, 且 11S 的 AS 和 BS 亚基、7S 的  $\beta$  亚基分子量变化较小; 但  $\alpha$  和  $\alpha'$  亚基则有一定变化, 0.50%~1.25% 组分子量均高于对照组。对照和 0.25% 组的 90 ku 以上的组分条带全部消失, 其余各组均有该条带; 除 0.75% 和 1.00% 组, 其余各组出现了 BS 亚基中低分子量组分向下降解。其中, 0%、0.25%、0.75%、1.25% 组条带的 AS、BS 亚基颜色较 1% 组的浅。可见, 经过冷冻处理后, 各组冷冻豆腐蛋白的亚基组成完整, 且 AS、BS 和  $\beta$  亚基稳定,  $\alpha$  和  $\alpha'$  亚基发生变化; 对照与 0.25% 组的大分子量全部降解, 0.75% 和 1% 组的低分子量较稳定, 而其余各组发生了向更低分子量的降解。同时, 除了 1.00% 组的 AS、BS 亚基含量较高外, 其余各组都有不同程度降解。说明, WISPs 的添加不同程度地保护了冷冻豆腐蛋白组分的完整, 其中 1.00% 组的蛋白各组分及亚基在冷冻中较其余各组更稳定。而冷冻对蛋白组分的破坏相对集中在 90 ku 以上的高分子量和 14 ku 的低分子量组分, 以及 7S 的  $\alpha$  和  $\alpha'$  亚基。

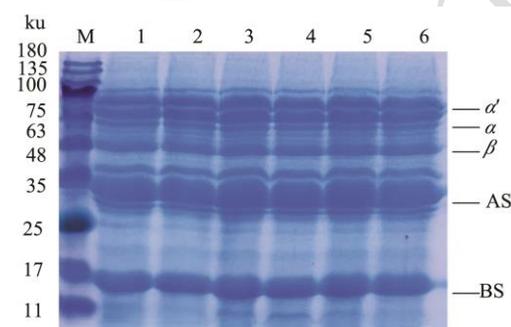


图 9 不同 WISPs 添加量的冷冻豆腐蛋白分子量检测

Fig.9 Molecular weight detection of frozen tofu protein with different added amounts of WISPs

注: M 为 Marker 条带; 1~6 为 WISPs 添加量 0%~1.25%。

### 2.3.3 不同 WISPs 添加量对冷冻豆腐水分迁移的影响

从图 10 低场核磁共振反演谱可知, 冷冻豆腐在 1~1 000 ms 的弛豫时间内分布有 4 个峰, 4 个峰分别对应冷冻豆腐中 4 种状态的水: 深层结合水 0.1~1 ms ( $T_{21}$ )、半结合水 1~10 ms ( $T_{22}$ )、不易流动的水 10~100 ms ( $T_{23}$ ), 自由水 100~1 000 ms ( $T_{24}$ )。如

图 10a、10b 可知, 随着 WISPs 添加量的增加,  $T_{21}$ 、 $T_{22}$ 、 $T_{23}$  均呈现先增大后减小的趋势, 在 1% 组时达到最大值, 分别高于对照组 133.77%、131.78%、26.41%,  $T_{24}$  呈现先逐渐增大的趋势, 在 1.25% 组达到最大值, 高于对照组 13.60%。可见, 1.00% 组的深层结合水、半结合水和不易流动的水最多, 对照组自由深层结合水与半结合水最少。说明, 冷冻造成了豆腐中水分存在方式的改变, 即结合水向自由水转变, 自由水冻结形成冰晶, 随着冷冻时间的延长, 结合水向自由水的不断转变, 使小冰晶聚集成大冰晶, WISPs 抑制结合水迁移, 来控制冰晶长大。ISPs 可附着在冰晶上, 防止蛋白侧链上的水分迁移, 稳定了蛋白骨架, 有效降低了结合水向自由水转变的速率并减少了自由水的相互汇集, 进而阻止大冰晶的生成<sup>[35,36]</sup>。而 ISPs 的过量添加则发生了与蛋白质的水分竞争, 造成了蛋白质侧链上水分的迁移, 影响了结合水向自由水的转变。因此, 冷冻使豆腐中结合水向自由水迁移, 适当的 WISPs 添加抑制了该趋势的发生, 其中, 1.00% 的抑制效果较好。

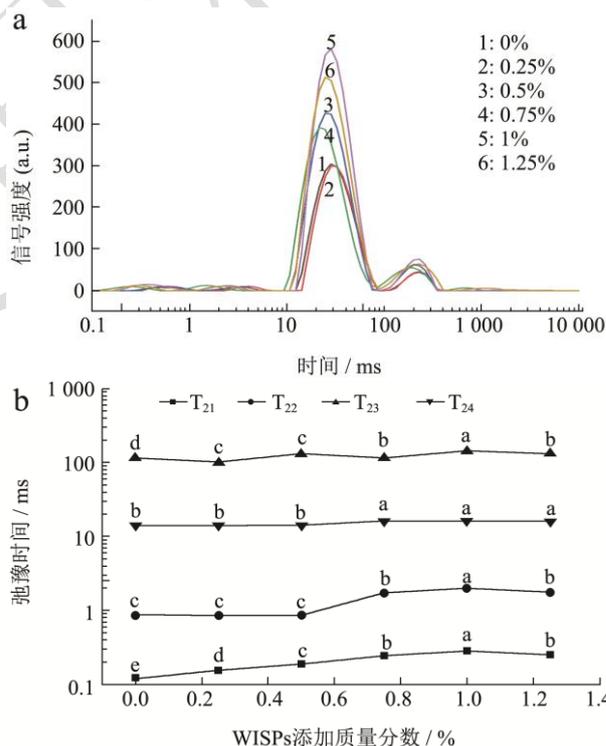


图 10 WISPs 添加量对冷冻豆腐水分迁移的影响

Fig.10 Effect of trehalose on water migration of frozen tofu

注: a 为峰谱图, b 为弛豫时间图。

### 2.3.4 不同 WISPs 添加量对冷冻豆腐微观结构的影响

由图 11 冷冻豆腐电镜图可知, 对照组的冷冻豆腐表面粗糙成絮状、断面严重、孔径松散、无规则, 随着 WISPs 添加量的增加, 冷冻豆腐表面逐渐光滑、结构完整连续, 孔洞均匀, 其中 1.00% 组冷冻豆腐蜂窝

最为均匀、结构紧密。结合 2.3.3 结果来看,在冷冻过程中,结合水向可冻结水转变,可冻结水形成大小不一的冰晶,大冰晶挤压冷冻豆腐使其扭曲变形、甚至断面,解冻后汁液流失增加,使其质地松散,WISPs 能够抑制可冻结水的增加,减少大冰晶的生成,虽然因一定的水分流失使冷冻豆腐骨架趋于海绵化,但 WISPs 起到阻止了冷冻豆腐的过度变性和均匀冷冻豆腐孔洞的作用,从而一定程度防止冷冻豆腐断面、干硬,有利于其复水后持水性强,富有弹性、咀嚼性和耐煮性。

如图 12 所示,在冷冻过程中,WISPs 具有良好的热滞活性,可非依数性的降低冰点,并可通过氢键和疏水基团之间的协同作用直接吸附到正在生长的冰晶上,以此来修饰冰晶形态、控制冰晶生长。在凝固

剂氯化钙的作用下,豆浆蛋白的-COOH 与  $Ca^{2+}$  结合为  $Ca^{2+}$ -COOH 盐桥,构成豆腐蛋白骨架结构,水被包裹其中,形成蛋白质的水合凝胶产品—豆腐。鲜豆腐在冷冻过程中,由于冷冻破坏了水和巯基之间的平衡,导致蛋白表面的游离巯基失去支撑,从而使豆腐中原来的蛋白质-水之间的相互作用向蛋白质-蛋白质之间的相互作用转化,引起二硫键的增加,即蛋白质产生聚集变性。WISPs 可通过控制冰晶长大和修饰冰晶形态,来抑制大冰晶对蛋白的破坏,从而减小蛋白过度聚集和变性,进而使蛋白质与水的结合力增强,深层结合水和结合水含量增加,自由水含量减少,形成均匀的冰晶,导致冷冻豆腐孔径均匀、表面光滑、质地细腻,且耐煮性、持水性、复水性等较对照组均有提升。

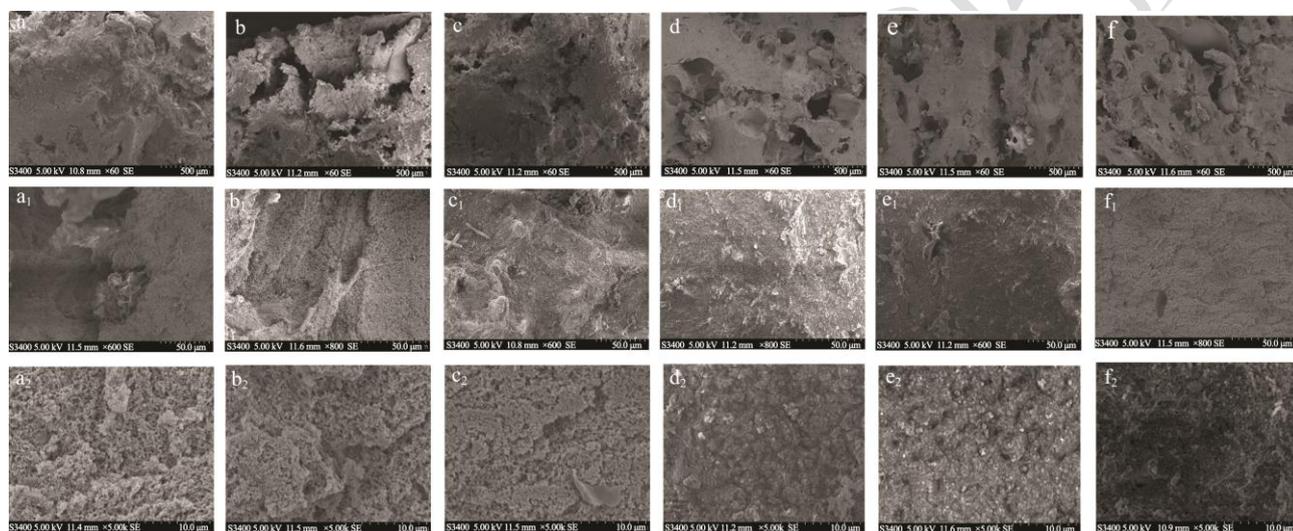


图 11 冷冻豆腐扫描电镜检测

Fig.11 SEM detection of frozen tofu

注: a~f、a<sub>1</sub>~f<sub>1</sub>、a<sub>2</sub>~f<sub>2</sub> 分别为 WISPs 添加量 0~1.25% 的冷冻豆腐电镜观察图 (60 kV)、(800 kV)、(5000 kV)。

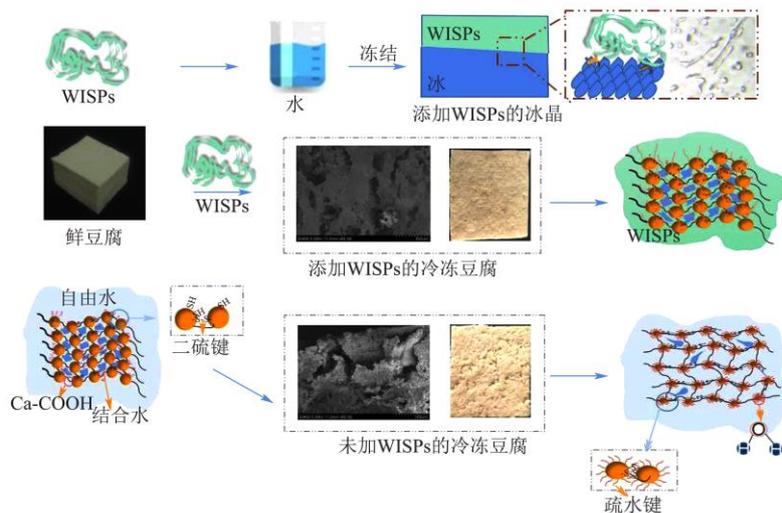


图 12 WISPs 对冷冻豆腐品质影响机理

Fig.12 Effect mechanism of WISPs on frozen tofu quality

### 3 结论

WISPs 的 THA 为 0.46 °C, 其溶液形成的冰晶细小、分布均匀, 形态多样。将 WISPs 添加到冷冻豆腐中, 随着 WISPs 添加量的增加, 冷冻豆腐的持水性、复水性、耐煮性、弹性、拉伸特性, 以及结合水、半结合水、不易流动水含量均呈现先升高后下降的趋势, 硬度、剪切力则逐渐下降, 当添加量为 1.00% 时, 其持水率、复水性、耐煮性及弹性、拉伸性等质构特性较对照组分别提高了 114.17%、57.42%、56.25%、21.52%、23.71%, 硬度、剪切力降低了 24.83%、23.75%, 结合水、半结合水、不易流动的水分别增加了 133.77%、131.78%、26.41%; 二硫键的含量逐渐减小, 游离巯基含量逐渐增加; 较对照组, 1.25% 组游离巯基增加了 37.50%、二硫键含量减少了 29.79%, 1.00% 组则与之相差较小; 冷冻豆腐蛋白的 7S 和 11S 的亚基组成完整; 随着 WISPs 添加量的增加,  $\alpha'$  和  $\alpha$  亚基的分子量有一定的增加; 对照和 0.25% 组中 90 ku 以上的组分全部降解; 除了 0.75% 和 1.00% 组外, 其余各组的 BS 亚基中低分子量组分向下降解; 且各组中 AS、BS 亚基含量均少于较 1.00% 组。冷冻豆腐由质地疏松、孔洞大小不一、不规则断面产生转变, 其中以 1.00% 组横截面光滑细腻, 蜂窝均匀, 孔径大小适中, 外观完整。

### 参考文献

- [1] Kobayashi R, Ishiguro T, Ozeki a, et al. Property changes of frozen soybean curd during frozen storage in "Kori-tofu" manufacturing process [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 104: 105714.
- [2] 李良, 田甜, 刘军, 等. 不同添加剂对冷冻豆腐结构特性影响研究[J]. 食品工业, 2019, 40(3): 95-99.
- [3] Vieira A, Silva A, Albuquerque A, et al. Effects of long-term frozen storage on the quality and acceptance of gluten free cassava pasta [J]. Heliyon, 2021, 7(12): 07844.
- [4] Kumar P K, Rasco B A, Tang J, et al. State phase transitions, ice recrystallization, and quality changes in frozen foods subjected to temperature fluctuations [J]. Food Engineering Reviews, 2020, 12(2): 1-31.
- [5] 廖丹, 陈雪, 张原. 海藻糖抗冻保护作用研究进展[J]. 广东农业科学, 2011, 38(18): 83-85.
- [6] Yuan K, Yang Y W, Wen P D, et al. Effects of inulin on protein in frozen dough during frozen storage [J]. Food and Function. 2020, 11(9): 7775-7783.
- [7] Chen X, Shi X, Cai X, et al. Ice binding proteins: a remarkable ice crystal regulator for frozen foods [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 17: 1-14.
- [8] 史羽瑶, 郑尧, 王红丽, 等. 抗冻蛋白对冷冻虾夷扇贝闭壳肌持水性及质构特性的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(10): 22-28.
- [9] Li F, Du X, Ren Y, et al. Impact of ice structuring protein on myofibrillar protein aggregation behaviour and structural property of quick frozen patty during frozen storage [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 178(2): 136-142.
- [10] Li F, Du X, Wang B, et al. Inhibiting effect of ice structuring protein on the decreased gelling properties of protein from quick frozen pork patty subjected to frozen storage [J]. Food Chemistry, 2021, 353(2): 129104.
- [11] 曲敏, 吴征, 杜婷婷, 等. 苜蓿冰结构蛋白对冷冻湿面筋品质及结构的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 42-50.
- [12] Mei L, Liang Y, Zhang H, et al. Production of a recombinant carrot antifreeze protein by pichia pastoris GS115 and its cryoprotective effects on frozen dough properties and bread quality [J]. LWT, 2018, 96: 543-550.
- [13] Ding X D, Li T, Zhang H, et al. Effect of barley antifreeze protein on dough and bread during freezing and freeze thaw cycles [J]. Foods, 2020, 9(11): 1698.
- [14] 陈凤莲, 鲍欢, 曲敏, 等. 寒地冬小麦冰结构蛋白的提取及抗冻活性的检测[J]. 食品工业科技, 2016, 37(20): 280-284, 305.
- [15] 李亚楠, 曲敏, 田野, 等. 胡萝卜冰结构蛋白的诱导及对淀粉凝胶冻融稳定性的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(7): 70-75, 81.
- [16] Chua J Y, Lu Y, Liu S Q. Biotrans formation of soy whey into soy alcoholic beverage by four commercial strains of saccharomyces cerevisiae [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 262: 14-22.
- [17] 何婉莹, 黄展锐, 赵良忠, 等. 生浆法制作豆腐的工艺优化[J]. 现代食品科技, 2021, 5(17): 1-9.
- [18] Wang C, Li J, Zhou S, et al. Application of transglutaminase for quality improvement of whole soybean curd [J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(1): 233-244.
- [19] Kobayashi R, Ishiguro T, Ozeki A, et al. Property changes of frozen soybean curd during frozen storage in "Kori-tofu" manufacturing process [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 104: 105714.
- [20] 刘张菊, 乔明武, 宋莲军, 等. TG 酶凝固豆腐的工艺配方研究[J]. 河南农业大学学报, 2021, 55(4): 744-751.
- [21] Wang Y, Zhang Y, Xu F, et al. Effects of water addition and noodle thickness on the surface tackiness of frozen cooked noodles [J]. Journal of Food Processing and Preservation,

- 2020, 9(44): 1-11.
- [22] Shu L, Xiao H Z, Zhen Y Z, et al. Effects of immersion freezing on ice crystal formation and the protein properties of snakehead (*Channa argus*) [J]. Foods, 2020, 9(4): 411.
- [23] 荣荟, 汤辉煌, 赵娅柔, 等. 冷冻诱导对大豆分离蛋白结构和聚集行为的影响[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(3): 8-14.
- [24] 史晓斐, 辛颖, 陈复生, 等. 市售盐凝豆腐品质特性指标分析与评价模型的建立[J]. 河南工业大学学报, 2021, 42(4): 50-57.
- [25] Zhu Z W, Zhou Q Y, Sun D W. Measuring and controlling ice crystallization in frozen foods: A review of recent developments [J]. Trends in Food Science and Technology, 2019, 90(15): 13.
- [26] Deng J, Apfelbaum E, Ran D. Ice growth acceleration by antifreeze proteins leads to higher thermal hysteresis activity [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2020, 124(49): 11081-11088.
- [27] Toda A, Yamamura R, Taguchi K, et al. Kinetics of "melting" of sucrose crystals [J]. Crystal Growth and Design, 2018, 18(4): 2602-2608.
- [28] 赵源. 谷朊粉中抗冻蛋白及其多肽制备条件的研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2014.
- [29] Sun X, Zhang C Y, Wu M Y, et al. MAL62 overexpression and NTH1 deletion enhance the freezing tolerance and fermentation capacity of the baker's yeast in lean dough [J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 1-8.
- [30] Cong T N, Min Y, Jing S Y, et al. Isolation of ice structuring collagen peptide by ice affinity adsorption, its ice binding mechanism and breadmaking performance in frozen dough [J]. Journal of Food Biochemistry, 2018, 42(3): 12506.
- [31] Zhang Y, Zhang Y, Wang L, et al. Extraction of oat (*Avena sativa* L.) antifreeze proteins and evaluation of their effects on frozen dough and steamed bread [J]. Food & Bioprocess Technology, 2015, 8(10): 2066-2075.
- [32] Zhang T, Guan E, Yang Y, et al. Underlying mechanism governing the influence of peanut oil addition on wheat dough viscoelasticity and Chinese steamed bread quality [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 156(15): 113007.
- [33] Miyawaki O, Nishino H. Kinetic analysis of freeze denaturation of soyprotein by a generalized theoretical model for freeze acceleration reaction [J]. Journal of Food Engineering, 2016, 190: 109-115.
- [34] Jia C, Huang W, Rayas D P, et al. Hydration, polymerization and rheological properties of frozen gluten water dough as influenced by thermostable ice structuring protein extract from Chinese privet (*Ligustrum vulgare*) leaves [J]. Journal of Cereal Science, 2014, 59(2): 132-136.
- [35] Ding X L, Zhang W H, Liu W, et al. Extraction of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins and evaluation of their effects on frozen white salted noodles [J]. Food Bioprocess Technology, 2014, 7: 842-852.
- [36] Luo L J, Guo X N, Zhu K X. Effect of steaming on the quality characteristics of frozen cooked noodles [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 62(2): 1134-1140.