

大豆球蛋白 G4 蛋白 B₃ 亚基导致中式高盐稀态酱油二次沉淀的形成

冯拓¹, 单培¹, 高献礼^{1*}, 符姜燕², 胡锋², 林虹², 徐婷², 王博¹, 张雅琼¹

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013) (2. 广东美味鲜调味食品有限公司, 广东中山 528401)

摘要: 该文以日式酱油为对照, 系统分析了 pH、Fe³⁺/Fe²⁺、多酚、大豆多糖、大豆蛋白酶解物、NaCl、乙醇和温度对中式高盐稀态酱油二次沉淀生成量的影响, 并对比分析了它们的游离氨基酸组成和敏感蛋白。结果显示除乙醇 (<1.8%) 外, 上述其他因素均对中式高盐稀态酱油二次沉淀生成量具有显著影响 ($p<0.05$), 仅 pH (6.5)、大豆蛋白酶解物、NaCl 和温度 (60 °C) 对日式酱油二次沉淀生成量有显著影响 ($p<0.05$); 中式高盐稀态酱油 15 种游离氨基酸含量及其平均疏水值 (H Φ _{avg}) 显著低于日式酱油相应值; 中式高盐稀态酱油中大豆球蛋白中的 B₃ 亚基 (敏感蛋白) 含量显著高于日式酱油 (未检出)。综合上述结果推测大豆球蛋白 G4 蛋白 B₃ 亚基是中式高盐稀态酱油二次沉淀形成的关键物质, 中式高盐稀态酱油二次沉淀可能是通过 B₃ 亚基-Fe³⁺/Fe²⁺-多酚复合物和 B₃ 亚基-大豆多糖-Na⁺-Cl⁻复合物途径形成。上述研究结果将为解决中式高盐稀态酱油二次沉淀问题提供理论参考。

关键词: 酱油; 二次沉淀; 大豆; 球蛋白

文章编号: 1673-9078(2021)11-261-269

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0352

B₃ Subunit in Soy Globulin G4 Protein Leads to the Formation of Secondary Precipitation in Chinese-type High-salt and Diluted-state Soy Sauce

FENG Tuo¹, SHAN Pei¹, GAO Xianli^{1*}, FU Jiangyan², HU Feng², LIN Hong², XU Ting², WANG Bo¹, ZHANG Yaqiong¹

(1.College of Food and Bioengineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

(2.Guangdong Meiweixian Flavoring Foods Co. Ltd., Zhongshan 528401, China)

Abstract: In this paper, Japanese-type soy sauce was used as control, the effects of pH, Fe³⁺/Fe²⁺, polyphenol, soybean polysaccharide, soybean protein hydrolysate, NaCl, ethanol and temperature on the secondary precipitation, and the free amino acid composition and sensitive proteins in Chinese-type high-salt and diluted-state soy sauce were systematically analyzed. The results showed that all the above factors except ethanol (<1.8%) had significant effects on the secondary precipitate formation of Chinese-type high-salt and diluted-state soy sauce ($p<0.05$), only pH (6.5), soy protein hydrolysate, NaCl and temperature (60 °C) had markedly effects on the secondary precipitate formation of Japanese-type soy sauce ($p<0.05$); the contents of 15 free amino acids and their average hydrophobic value (H Φ _{avg}) in Chinese-type high-salt and diluted-state soy sauce were significantly lower than those in Japanese-type soy sauce; the content of soy globulin B₃ subunit (sensitive protein) in Chinese-type high-salt and diluted-state soy sauce was significantly higher than that in Japanese-type soy sauce (not detected). Based on the above results, it was speculated that B₃ subunit in soy globulin G4 protein was the key substance of secondary precipitate formation in

引文格式:

冯拓,单培,高献礼,等.大豆球蛋白 G4 蛋白 B₃ 亚基导致中式高盐稀态酱油二次沉淀的形成[J].现代食品科技,2021,37(11):261-269

FENG Tuo, SHAN Pei, GAO Xianli, et al. B₃ subunit in soy globulin G4 protein leads to the formation of secondary precipitation in chinese-type high-salt and diluted-state soy sauce [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 261-269

收稿日期: 2021-03-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31301537); 中山市科技专项 (2018A1007); 中国博士后科学基金 (2016M600380)

作者简介: 冯拓 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 2211918008@stmail.ujs.edu.cn

通讯作者: 高献礼 (1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: gaoxianli@ujs.edu.cn

Chinese-type high-salt and diluted-state soy sauce, the secondary precipitate in Chinese-type high-salt and diluted-state soy sauce may be formed through B_3 subunit- Fe^{3+}/Fe^{2+} -polyphenol complex and B_3 subunit-soybean polysaccharide- Na^+ - Cl^- complex. The above results will provide a theoretical reference for solving the secondary precipitation problem in Chinese-type high-salt and diluted-state soy sauce.

Key words: soy sauce; secondary precipitate; soybean; glycinin

酱油二次沉淀是指酱油包装之后在储存、运输和销售过程中在瓶底形成的沉淀, 酱油二次沉淀一般为土黄色或红棕色状^[1]。二次沉淀已成为影响中式高盐稀态酱油外观质量的主要问题。本课题组前期对市售中式高盐稀态酱油和日式酱油二次沉淀含量进行了系统分析, 结果显示中式高盐稀态酱油二次沉淀含量比日式酱油高 64%以上, 外观质量明显低于日式酱油^[2,3]。此外, 中式高盐稀态酱油平均价格仅为日式酱油的 1/12, 两者外观质量的差异被认为是造成两者巨大价格差异的关键原因之一^[2]。

日本科研人员已对日式酱油二次沉淀组成和影响其形成的因素进行了深入的研究。日式酱油二次沉淀由约 90%的蛋白质及少量的多糖和食盐组成^[4]。日式酱油在加热过程中可形成促进“不稳定蛋白质”沉淀的酯类物质, 该酯类物质主要为谷氨酸正丁酯及其类似物, 其中谷氨酸正丁酯在 60 °C 时形成, 是这类“促沉因子”主要成分^[5-7]。此外, 日本学者研究认为大曲中带入的耐热中性蛋白酶和碱性蛋白酶与日式酱油二次沉淀的形成存在密切关系^[2,7]。目前日式酱油已成功解决二次沉淀问题, 但由于技术保密的原因, 尚未见到日式酱油二次沉淀去除技术的相关研究报道。

国内学者已对中式高盐稀态酱油二次沉淀成分进行了初步分析, 但对影响中式高盐稀态酱油二次沉淀形成的因素及其形成机制尚未进行深入研究。曾新安等^[1]和张志航等^[8]研究指出中式高盐稀态酱油二次沉淀由大量无机盐 (NaCl)、蛋白质、多糖及少量脂肪组成。这说明中式高盐稀态酱油和日式酱油二次沉淀组成存在显著差异。这是由于中式高盐稀态酱油和日式酱油所用菌种、原料、原料处理方式和发酵工艺的差异造成的^[9,10]。本课题组在前人研究的基础上, 对中式高盐稀态酱油二次沉淀蛋白进行了分离、鉴定和系统分析。结论如下: 大豆 11 S 球蛋白 G4 蛋白中的 B_3 亚基 (76%) 和 G1 蛋白中的 A_{1a} 亚基 (19%) 是中式高盐稀态酱油二次沉淀蛋白的主要成分, 两种亚基“有序”二级结构比例高和疏水性强导致其溶解度低, 进而形成沉淀^[11]。令人困惑的是, 中式高盐稀态酱油中存在大量 NaCl 和多糖, 两者远未达到其理论饱和度, 上述研究并不能合理解释中式高盐稀态酱油二次沉淀中为何会存在大量 NaCl 和多糖。

因此, 本研究以日式酱油为对照, 在系统分析影

响中式高盐稀态酱油二次沉淀影响因素的基础上, 尝试总结和推理中式高盐稀态酱油二次沉淀形成的机制, 以期为解决中式高盐稀态酱油二次沉淀问题提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 实验原料和试剂

国产生抽酱油 (广东某酱油厂) 和日本龟甲万酱油 (原产地日本) 均为市售酱油, 购买于江苏省镇江市华润万家超市。中式高盐稀态酱油以大豆、面粉和食盐为原料, 采用高盐稀态酿造工艺生产而成, 日本龟甲万酱油以脱脂大豆、小麦、食盐为原料, 采用日式工艺生产而成。中式高盐稀态酱油生产日期为 2019 年 10 月 (距购买和实验日期 1 个月), 日式酱油生产日期为 2019 年 8 月 (距购买和实验日期 3 个月), 两种酱油瓶底均暂无肉眼可见沉淀。

可溶性大豆多糖购买于河南万邦实业有限公司。三氯化铁、二氯化亚铁、亚铁氰化钾、三氯乙酸、碘化钾、甲醛、乙醇、NaCl、没食子酸、盐酸、硫酸、硼酸、四硼酸钠、硫酸铜、葡萄糖、 $AgNO_3$ 、NaOH、 Na_2HPO_4 等均为分析纯, 购自中国医药集团上海化学试剂公司。蛋白质标准品 IV 和蛋白质电泳预制胶均购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

大豆蛋白本酶解物制备方法: 将 5% 大豆分离蛋白 (河南万邦实业有限公司) 在 121 °C 下蒸煮 15 min, 降温至 45 °C 时添加诺维信风味蛋白酶 (Flavourzyme 1000 L (液体)), 添加量为 2000 U/g 大豆分离蛋白, 在摇床内 45 °C 恒温酶解 5 h (120 r/min)。酶解结束后升温至 100 °C 灭酶 10 min, 定性滤纸过滤, 过滤液经冷冻干燥得到大豆蛋白酶解物。

1.1.2 主要仪器和设备

MJ-70-I 培养箱, 上海恒一科学仪器有限公司; Kjeitec2300 凯氏定氮仪, 瑞典 FOSS 分析仪器有限公司; ULTS1368 超低温冰箱, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; WFZ UV-2100 紫外分光光度计, 尤尼柯 (上海) 仪器有限公司; 5415D 高速离心机, 德国艾本德股份公司; THZ-300 THZ-300C 恒温摇床, 上海一恒科学仪器有限公司; FE 20 pH 计, 梅特勒-托利多仪器

(上海)有限公司; DZF-6020 真空干燥箱, 绍兴市苏珀仪器有限公司; Mini-PROTEAN[®] Tetra System 垂直电泳 (BIO-RAD, 美国); JEDA 电泳扫描仪 (JD-801, 中国); 高效液相色谱仪及 PICO.TAG 色谱柱 (Waters, 美国); 基质辅助激光解吸电离串联飞行时间质谱 (MALDI-TOF/TOF MS) (Bruker-Daltonics, 德国)。

1.2 实验方法

1.2.1 中式高盐稀态酱油和日式酱油常规理化指标分析

总氮、氨基酸态氮、氯化钠、可溶性无盐固形物、总酸的测定均按照 GB 18186-2000 规定检测。总糖和还原糖测定按照 ZBX 66040-1987 规定检测。pH 采用 pH 计直接测定。

1.2.2 影响中式高盐稀态酱油二次沉淀形成因素分析

1.2.2.1 pH 对酱油二次沉淀形成的影响

用浓度为 6 mol/L 的 HCl 或 NaOH 调整酱油 (200 mL) 的 pH 分别至 2.5、3.5、4.5、5.5 和 6.5。将上述酱油样品置于摇床中, 在 200 r/min 的条件下震荡 7 d (50 °C), 使潜在的“二次沉淀”快速形成。参照文献^[12]的方法收集和制备酱油二次沉淀, 并做如下修改: 震荡结束后的酱油在 0 °C 和 10000 r/min 条件下离心 10 min, 采用虹吸法移除上清, 收集沉淀; 将收集的沉淀在 105 °C 烘干至恒重, 计算酱油二次沉淀生成量。

1.2.2.2 铁离子对酱油二次沉淀形成的影响

以三氯化铁和二氯化铁为铁离子源, 往中式高盐稀态酱油和日式酱油中分别添加铁离子, 添加的 Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 量分别为 0、0.04‰、0.08‰ 和 0.12‰。将上述酱油样品置于摇床中, 在 200 r/min 的条件下震荡 7 d (50 °C), 参照 1.2.3.1 部分方法收集和制备酱油二次沉淀。

1.2.2.3 多酚对酱油二次沉淀形成的影响

以没食子酸为多酚源, 往中式高盐稀态酱油和日式酱油中分别添加没食子酸, 添加量分别为 0、0.3%、0.6% 和 0.9%。将上述酱油样品置于摇床中, 在 200 r/min 的条件下震荡 7 d (50 °C), 参照 1.2.3.1 部分方法收集和制备酱油二次沉淀。

1.2.2.4 多糖对酱油二次沉淀形成的影响

往中式高盐稀态酱油和日式酱油中分别添加大豆多糖, 多糖添加量分别为 0、3%、6% 和 9%。将上述酱油样品置于摇床中, 在 200 r/min 的条件下震荡 7 d (50 °C), 参照 1.2.3.1 部分方法收集和制备酱油二次沉淀。

1.2.2.5 大豆蛋白酶解物对酱油二次沉淀形成的影响

往中式高盐稀态酱油和日式酱油中分别添加大豆蛋白酶解物, 大豆蛋白酶解物添加量分别为 0、1.5%、3% 和 4.5%。将上述酱油样品置于摇床中, 在 200 r/min 的条件下震荡 7 d (50 °C), 参照 1.2.3.1 部分方法收集和制备酱油二次沉淀。

1.2.2.6 NaCl 对酱油二次沉淀形成的影响

往中式高盐稀态酱油和日式酱油中分别添加 NaCl, 添加量分别为 0、5%、10% 和 15%。将上述酱油样品置于摇床中, 在 200 r/min 的条件下震荡 7 d (50 °C), 参照 1.2.3.1 部分方法收集和制备酱油二次沉淀。

1.2.2.7 乙醇对酱油二次沉淀形成的影响

往中式高盐稀态酱油和日式酱油中分别添加乙醇, 添加量分别为 0、0.6%、1.2% 和 1.8%。将上述酱油样品置于摇床中, 在 200 r/min 的条件下震荡 7 d (50 °C), 参照 1.2.3.1 部分方法收集和制备酱油二次沉淀。

1.2.2.8 温度对酱油二次沉淀形成的影响

将中式高盐稀态酱油和日式酱油中分别在 -20、0、20、40 和 60 °C 恒温箱保存 7 d。将上述酱油样品置于摇床中, 在 200 r/min 的条件下震荡 7 d (50 °C), 参照 1.2.3.1 部分方法收集和制备酱油二次沉淀。

1.2.3 中式高盐稀态酱油和日式酱油游离氨基酸及疏水性分析

采用高效液相色谱 (HPLC) 分析中式高盐稀态酱油和日式酱油中的氨基酸组成。氨基酸检测条件: 美国 Waters HPLC, PICO.TAG 氨基酸分析柱, 温度为 38 °C, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 254 nm, 采用外标法对氨基酸进行定量。

根据 Lozano 等^[13]的经验公式计算样品氨基酸的疏水值 (HΦ_{avg}): 某游离氨基酸的疏水值为其占总游离氨基酸摩尔百分含量乘以其疏水值, 总疏水值为所有氨基酸的疏水值之和。

1.2.4 中式高盐稀态酱油和日式酱油大豆蛋白 B3 亚基分析

采用低温-超声法快速制备中式高盐稀态酱油和日式酱油中的“潜在二次沉淀蛋白”^[12]。收集两种酱油二次沉淀, 冷冻干燥后溶解于含有 8 M 尿素、60 mM DTT、50 mM Tris 和 1% SDS 的水溶液中, 并调整溶液蛋白质含量至 1 mg/mL。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 法分离酱油二次沉淀蛋白, 采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 法对所分离的蛋白质进行鉴定, 具体方法参照 Gao 等^[11]的方法。

1.2.5 统计分析

表1 中式高盐稀态酱油和日式酱油常规理化指标

Table 1 Proximate indices of Chinese-type high-salt and diluted-state soy sauce and Japanese-type soy sauce

	总氮/ (g/100 mL)	氨基酸态氮/ (g/100 mL)	总糖/ (g/100 mL)	还原糖/ (g/100 mL)	总酸/ (g/100 mL)	NaCl/ (g/100 mL)	非盐固形物/ (g/100 mL)	pH
中式高盐稀态酱油	1.53±0.06 ^a	0.91±0.03 ^b	4.81±0.25 ^b	3.47±0.19 ^b	1.76±0.07 ^a	17.22±0.41 ^a	19.84±0.47 ^a	4.61±0.02 ^b
日式酱油	1.43±0.05 ^a	1.05±0.04 ^a	6.11±0.30 ^a	5.43±0.27 ^a	1.70±0.06 ^a	16.98±0.40 ^a	19.09±0.46 ^a	4.90±0.02 ^a

注: a、b 同一列数值标注不同字母代表数值之间存在显著性差异, ($p < 0.05$)。

本文的所有实验均重复 3 次, 实验数据分析采用 SPSS 15.0 软件 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 完成, 在检验水平为 0.05 的条件下进行显著性差异分析。

2 结果与讨论

2.1 中式高盐稀态酱油与日式酱油理化指标分析

由表 1 可知, 中式高盐稀态酱油与日式酱油的氨基酸态氮、总糖和还原糖含量及 pH 存在显著差异 ($p < 0.05$), 两种酱油的总氮、总酸、NaCl 和非盐固形物含量无显著差异 ($p > 0.05$)。其中, 中式高盐稀态酱油、日式酱油氨基酸态氮含量分别为 0.91、1.05 g/100 mL, 均高于 0.80 g/100 mL (我国酿造酱油标准中的特级酱油标准), 说明本研究所选用的两种酱油的品质优于一般酱油, 具备一定的代表性。中式高盐稀态酱油与日式酱油的总酸含量与 pH 相符, 且日式酱油的总酸含量为 1.70 g/100 mL, 略低于中式高盐稀态酱油 (1.76 g/100 mL), 可能原因在于在日式酱油的发酵过程中会人为添加耐盐酵母菌, 而酵母的加入势必会产生一定量的乙醇, 产生的部分乙醇会作为底物与有机酸类物质反应生成酯类化合物, 从而导致日式酱油总酸含量的降低; 此外, 酵母的加入会在一定程度上消耗日式酱油中的还原糖物质, 但日式酱油还原糖含量为 5.43 g/100 mL, 约为中式高盐稀态酱油还原糖含量 (3.47 g/100 mL) 的 1.6 倍, 原因可能是日本酱油发酵工艺相对更为成熟, 能够显著地提高原料中淀粉等物质的转化利用率。除总酸和 pH 之外, 本次所检测的中式高盐稀态酱油和日式酱油的其他指标与冯云子等^[14]所检测的中式高盐稀态酱油和日式酱油指标值基本相当。酱油在酱醪发酵阶段属于开放式发酵, 酱醪中微生物种类和数量受温度、湿度、卫生条件和环境中的微生物种类和数量的影响, 这是造成两次分析中总酸和 pH 差异较大的原因。值得注意的是, 日式酱油的氨基酸转化率 (氨基酸态氮/总氮×100%) 为 73.43%, 而中式高盐稀态酱油的氨基酸转化率仅为 59.48%, 说明日式酱油中蛋白质降解更彻底、残留的

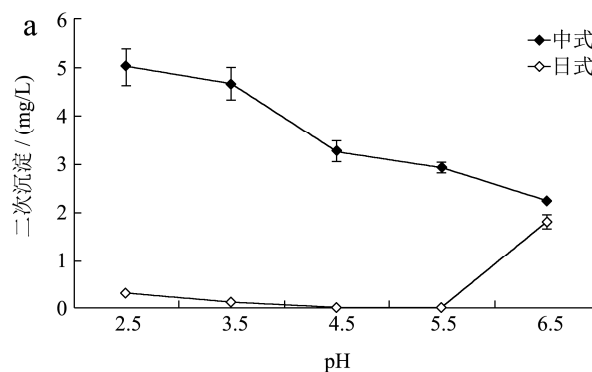
蛋白质更少。

2.2 影响中式高盐稀态酱油二次沉淀形成因素分析

素分析

如图 1a 所示, 中式高盐稀态酱油二次沉淀生成量随着 pH 的升高显著下降 (从 5.01 mg/mL 至 2.23 mg/mL), 说明中式高盐稀态酱油二次沉淀中存在大量“酸不溶性物质”。日式酱油 pH 从 2.5 升至 5.5 时二次沉淀生成量略有下降, pH 升至 6.5 时二次沉淀生成量 (1.8 mg/mL) 显著升高。上述结果说明中式高盐稀态酱油和日式酱油二次沉淀成分和形成机制存在差异。中式高盐稀态酱油二次沉淀主要成分为 NaCl、蛋白质和多糖等^[2], 早期的文献报道显示日式酱油二次沉淀中 90% 以上的为蛋白质^[4]。

由图 1b 和图 1c 可知, 中式高盐稀态酱油二次沉淀生成量随着铁离子 (从约 2.72 mg/mL 至 4.90 mg/mL) 和没食子酸 (从约 2.72 mg/mL 至 5.19 mg/mL) 含量的升高而增加, 其中 Fe^{3+} 比 Fe^{2+} 对中式高盐稀态酱油二次沉淀生成量的影响更大。随着铁离子和没食子酸添加量的增加, 日式酱油几乎未出现二次沉淀, 说明铁离子和没食子酸对日式酱油二次沉淀的生成量几乎未产生影响。敏感蛋白和敏感多酚被认为是黄酒产生二次沉淀的关键原因, 其中敏感多酚和敏感蛋白在铁离子的催化下形成的敏感蛋白- Fe^{3+}/Fe^{2+} -敏感多酚复合物是黄酒二次沉淀的主要成分^[15]。上述研究结果表明中式高盐稀态酱油中可能存在这类似的“敏感蛋白”和“敏感多酚”, 两者在酱油中铁离子的催化作用下形成类似的“敏感蛋白- Fe^{3+}/Fe^{2+} -敏感多酚复合物”。



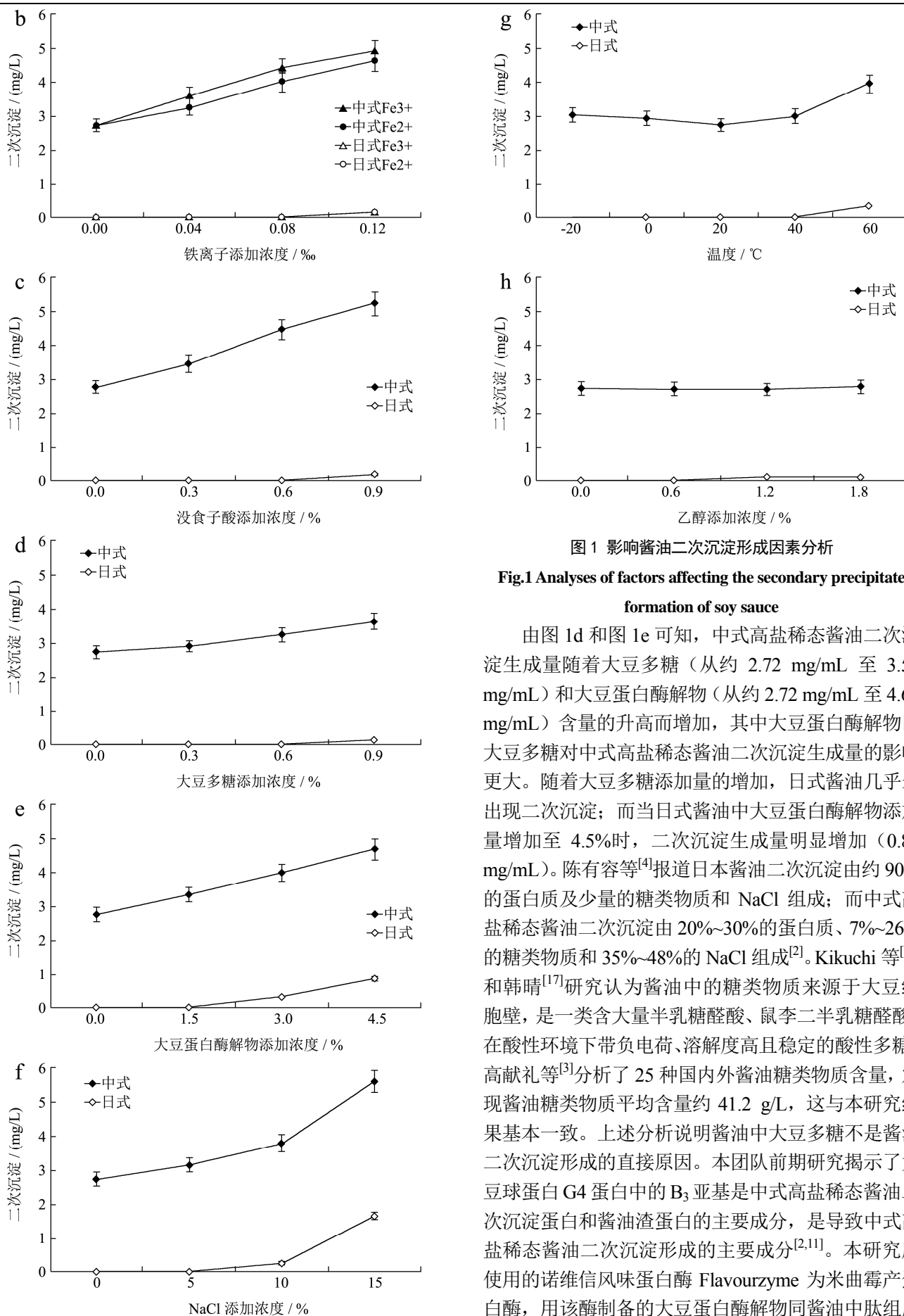


图1 影响酱油二次沉淀形成因素分析

Fig.1 Analyses of factors affecting the secondary precipitate formation of soy sauce

由图 1d 和图 1e 可知, 中式高盐稀态酱油二次沉淀生成量随着大豆多糖(从约 2.72 mg/mL 至 3.59 mg/mL)和 大豆蛋白酶解物(从约 2.72 mg/mL 至 4.68 mg/mL)含量的升高而增加, 其中大豆蛋白酶解物比大豆多糖对中式高盐稀态酱油二次沉淀生成量的影响更大。随着大豆多糖添加量的增加, 日式酱油几乎未出现二次沉淀; 而当日式酱油中大豆蛋白酶解物添加量增加至 4.5% 时, 二次沉淀生成量明显增加 (0.84 mg/mL)。陈有容等^[4]报道日本酱油二次沉淀由约 90% 的蛋白质及少量的糖类物质和 NaCl 组成; 而中式高盐稀态酱油二次沉淀由 20%~30% 的蛋白质、7%~26% 的糖类物质和 35%~48% 的 NaCl 组成^[2]。Kikuchi 等^[16]和韩晴^[17]研究认为酱油中的糖类物质来源于大豆细胞壁, 是一类含大量半乳糖醛酸、鼠李二半乳糖醛酸、在酸性环境下带负电荷、溶解度高且稳定的酸性多糖。高献礼等^[3]分析了 25 种国内外酱油糖类物质含量, 发现酱油糖类物质平均含量约 41.2 g/L, 这与本研究结果基本一致。上述分析说明酱油中大豆多糖不是酱油二次沉淀形成的直接原因。本团队前期研究揭示了大豆球蛋白 G4 蛋白中的 B₃ 亚基是中式高盐稀态酱油二次沉淀蛋白和酱油渣蛋白的主要成分, 是导致中式高盐稀态酱油二次沉淀形成的主要成分^[2,11]。本研究所使用的诺维信风味蛋白酶 Flavourzyme 为米曲霉产蛋白酶, 用该酶制备的大豆蛋白酶解物同酱油中肽组成

存在一定的相似性, 存在一定量的大豆球蛋白 B₃ 亚基。因此, 随着大豆蛋白酶解物添加量的增加, 不但中式高盐稀态酱油二次沉淀生成量显著增加, 而且日式酱油二次沉淀生成量也显著增加。

由图 1f 可知, 随着 NaCl 添加量的增加中式高盐稀态酱油 (从 2.72 mg/mL 至 5.58 mg/mL) 和日式酱油 (从 0 mg/mL 至 1.65 mg/mL) 二次沉淀生成量均显著增加, 但在 NaCl 添加量相同的条件下中式高盐稀态酱油二次沉淀生成量显著高于日式酱油。常温 (20~25 °C) 下 NaCl 在水中达到饱和时其浓度约为 27% (*m/m*)。本研究中 NaCl 最大添加量 15 g/100 mL (*m/V*), 加上酱油中原有的 NaCl, 中式高盐稀态酱油和日式酱油中 NaCl 最大含量分别为 24.8% (*m/m*) 和 24.6% (*m/m*) (酱油密度按照 1.15 g/mL 计算), 两种酱油中 NaCl 均未达到饱和。实验过程中观察到 NaCl 添加量小于 10 g/100 mL 时, 中式高盐稀态酱油二次沉淀生成量增加, 瓶底未见肉眼可见 NaCl; NaCl 添加量达到 15 g/100 mL 时, 二次沉淀含量显著增加, 且瓶底可见未溶解 NaCl。NaCl 添加量达到 15 g/100 mL 时, 日式酱油二次沉淀生成量显著增加, 但主要为未溶解的 NaCl。NaCl 含量的增加可能破坏了酱油体系中蛋白质周围水分子双电层, 导致相对稳定的胶体体系被进一步破坏, 进而生成了更多的二次沉淀。同时, 酱油系统内丰富的有机物与 NaCl 竞争水分子, 引起 NaCl 饱和度下降, 导致其在酱油体系中未达到理论饱和度即沉淀。

如图 1g 可知, 乙醇在添加量在 0.6%~1.8% 范围对中式高盐稀态酱油和日式酱油二次沉淀的生成均无显著影响。传统的中式高盐稀态酱油在生产过程中不人为添加耐盐乳酸菌和酵母菌, 而日式酱油在酱醪发酵阶段会人为添加耐盐乳酸菌和酵母菌, 两种微生物可丰富和提高酱油香气物质, 以改善酱油风味^[18-20]。报道^[21,22]显示日式酱油中乙醇含量可达到 1.5%~2%, 而中式高盐稀态酱油乙醇含量一般低于 0.5%。乙醇可以使蛋白质间正负电荷结合力增加, 形成厌水性胶体, 使蛋白质和水间作用力降低, 使敏感蛋白沉淀。本研究证明低浓度乙醇对酱油二次沉淀生成量无显著影响。

如图 1h 可知, 中式高盐稀态酱油二次沉淀生成量随着温度的升高呈现先下降 (20 °C) 后显著上升 (60 °C, 3.94 mg/mL) 的趋势。日式酱油除了在 60 °C 时生成少量二次沉淀之外, 在 -20~40 °C 均未见二次沉淀生成。上述结果说明中式高盐稀态酱油和日式酱油中二次沉淀成分存在差异。Tomita 等^[6]研究显示日式酱油在 60 °C 加热杀菌过程中会形成谷氨酸丁酯, 该酯可促进日式酱油形成沉淀。这可能是两种酱油在 60 °C

储存时二次沉淀显著增加的原因之一。此外, 加热可加速酱油中分子运动, 增加分子之间碰撞的几率, 破坏原有相对稳定的胶体体系, 使二次沉淀生成量增加。

2.3 中式高盐稀态酱油和日式酱油游离氨基酸及疏水性分析

由表 2 可知, 除色氨酸之外, 日式酱油游离氨基酸含量均高于中式高盐稀态酱油。方差分析显示日式酱油中有 15 种游离氨基酸含量显著高于中式高盐稀态酱油 ($p < 0.01$), 两种酱油中天门冬氨酸、半胱氨酸和色氨酸含量不存在显著性差异 ($p > 0.01$)。日式酱油总游离氨基酸含量比中式高盐稀态酱油高 29.0%。谷氨酸、天门冬氨酸和亮氨酸是中式高盐稀态酱油中含量最高的 3 种游离氨基酸, 而谷氨酸、亮氨酸和脯氨酸是日式酱油中含量最高的 3 种游离氨基酸。按照绝对含量计算, 两种酱油中游离氨基酸含量差异最大的分别为谷氨酸 (2.39 mg/mL)、脯氨酸 (1.64 mg/mL) 和亮氨酸 (1.30 mg/mL)。上述结果说明中式高盐稀态酱油和日式酱油中游离氨基酸组成存在显著性差异。冯云子等^[14]研究表明中式高盐稀态酱油和日式酱油在游离氨基酸组成上存在显著性差异, 中式高盐稀态酱油除了谷氨酸和色氨酸含量显著高于日式酱油外, 其他游离氨基酸含量均显著低于日式酱油。中式高盐稀态酱油在勾兑过程中人为添加谷氨酸钠是造成中式高盐稀态酱油谷氨酸含量高于日式酱油的原因。中式高盐稀态酱油是以全大豆、面粉和食盐为主要原料经米曲霉发酵生产而成^[18,23], 而日式酱油是以脱脂大豆、炒小麦和食盐为原料经米曲霉、乳酸菌和酵母菌发酵生产而成^[20]。脱脂大豆中蛋白质含量显著高于大豆, 这可能是造成两种酱油中游离氨基酸含量存在显著差异的主要原因。

前期研究发现中式高盐稀态酱油二次沉淀中不但含有 25% 左右的蛋白质, 而且含有约 0.15% 的游离氨基酸^[24]。前人研究认为部分氨基酸的强疏水性是导致其在酱油中不稳定的主要原因^[1,24]。如表 2 所示, 中式高盐稀态酱油和日式酱油中游离氨基酸的平均疏水值分别为 0.82 和 0.97, 日式酱油中游离氨基酸的平均疏水值比中式高盐稀态酱油高 18.3%。如上所述, 两种酱油中游离氨基酸含量差异最大的分别为谷氨酸、脯氨酸和亮氨酸, 这三种氨基酸的疏水值分别为 0、2.60 和 1.80, 说明脯氨酸和亮氨酸是引起两种酱油中游离氨基酸疏水值差异的主要贡献者。令人意外的是, 虽然日式酱油中游离氨基酸的疏水性显著高于中式高盐稀态酱油, 但日式酱油二次沉淀中游离氨基酸含量

极少, 说明强疏水性游离氨基酸可能不是引起中式高盐稀态酱油二次沉淀的主要原因。

表 2 中式高盐稀态酱油和日式酱油游离氨基酸组成及其疏水值

Table 2 Free amino acids composition and their hydrophobic values of Chinese-type high-salt and diluted-state soy sauce and Japanese-type soy sauce

氨基酸	疏水值	分子量	浓度/(mg/mL)		疏水值(H Φ _{avg})	
			中式高盐稀态酱油	日式酱油	中式高盐稀态酱油	日式酱油
天冬氨酸 (Asp)	0	133	4.09±0.15 ^a	4.40±0.17 ^a	0	0
谷氨酸 (Glu)	0	147	7.25±0.26 ^a	9.64±0.36 ^b	0	0
丝氨酸 (Ser)	-0.30	105	2.79±0.05 ^b	3.11±0.07 ^a	-0.02	-0.02
组氨酸 (His)	0.50	155	0.77±0.04 ^b	1.22±0.06 ^a	0.01	0.01
甘氨酸 (Gly)	0	75	3.09±0.08 ^b	3.37±0.10 ^a	0	0
苏氨酸 (Thr)	0.40	119	1.68±0.05 ^b	2.09±0.06 ^a	0.01	0.02
精氨酸 (Arg)	0.75	174	1.72±0.07 ^b	2.86±0.10 ^a	0.02	0.03
丙氨酸 (Ala)	0.50	89	3.10±0.14 ^b	3.67±0.17 ^a	0.05	0.05
酪氨酸 (Tyr)	2.30	181	0.32±0.02 ^b	0.61±0.03 ^a	0.01	0.02
半胱氨酸 (Cys-s)	1.00	121	0.04±0.02 ^a	0.05±0.02 ^a	0	0
缬氨酸 (Val)	1.59	117	2.23±0.12 ^b	3.16±0.17 ^a	0.08	0.10
蛋氨酸 (Met)	1.30	149	0.69±0.03 ^b	0.97±0.04 ^a	0.02	0.02
色氨酸 (Trp)	0.81	204	0.12±0.01 ^a	0.10±0.01 ^a	0	0
苯丙氨酸 (Phe)	2.50	165	1.94±0.08 ^b	3.06±0.12 ^a	0.08	0.10
异亮氨酸 (Ile)	2.95	131	2.19±0.11 ^b	2.81±0.14 ^a	0.13	0.14
亮氨酸 (Leu)	1.80	131	3.95±0.15 ^b	5.25±0.21 ^a	0.14	0.16
赖氨酸 (Lys)	1.50	146	2.92±0.13 ^b	3.21±0.14 ^a	0.08	0.07
脯氨酸 (Pro)	2.60	115	3.61±0.25 ^b	5.25±0.36 ^a	0.21	0.27
合计			42.50	54.83	0.82	0.97

注: a、b 同一行数值标注不同字母代表数。

2.4 中式高盐稀态酱油和日式酱油中大豆蛋白 B₃ 亚基分析

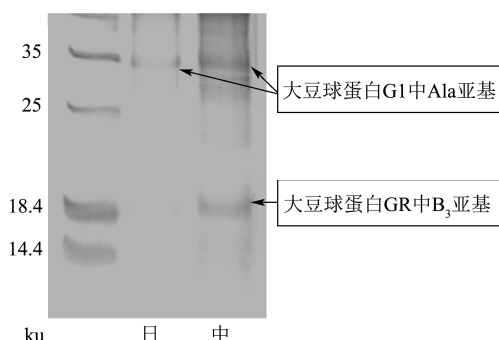


图2 中式高盐稀态酱油和日式酱油大豆中B₃亚基分析

Fig.2 Analysis of B₃ subunit of soybean protein in Chinese-type high-salt and diluted-state soy sauce and Japanese-type soy sauce

如图 2 可知,中式高盐稀态酱油中大豆球蛋白 G4 中 B₃ 亚基和 G1 中 A_{1a} 亚基含量均显著高于日式酱油,其中日式酱油中 B₃ 亚基被全部降解。大豆球蛋白 G4

蛋白中的 B₃ 亚基分别占中式高盐稀态酱油二次沉淀蛋白和酱油渣蛋白总量的 76%和 59%^[11,25]。与大豆球蛋白中的其他酸性亚基相比 (A_{1a}、A_{1b}、A₂、A₃、A₄ 和 A₅), 该 B₃ 亚基酸性氨基酸 (Glu、Asp) 含量低和疏水性氨基酸 (Ala、Ile、Leu 等) 含量高, 在强疏水力作用下 (pH 4~7) 可形成溶解度低的聚合物^[26]。课题组前期研究证明该 B₃ 亚基二级结构中的 β -折叠和无规则卷曲比例显著低于酱油上清液蛋白中两种二级结构的比例, 而其 α -螺旋比例显著高于酱油上清液蛋白中 α -螺旋比例^[11]。Wang 等^[27]研究指出大豆蛋白中 β -折叠和无规则卷曲比例与大豆蛋白溶解度高度正相关。因此, 该 B₃ 亚基疏水性强导致其形成低溶解度的聚合物是导致 B₃ 亚基在酱油体系中不稳定进而形成沉淀的可能原因。利用 NCBI 数据库 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001236061.2)检索到该 B₃ 亚基氨基酸序列(见图 3), 并利用 ExPASy 对该亚基性质进行分析。结果显示该 B₃ 亚基是由 165 个氨基酸残基组成的亚基, 其分子量 18195.22 u、pI 为 6.1。由于酱油中 pH 在 5.5 以下, 因此, 可以预测该

B₃亚基在酱油体系中带正电荷。上述 B₃亚基含量的显著差异可能是导致中式高盐稀态酱油和日式酱油二次沉淀含量的显著差异的关键原因。

中式高盐稀态酱油和日式酱油的 SDS-PAGE 电泳图结果说明, 日式酱油中蛋白质降解程度较“彻底”, 更多的蛋白质被降解成小分子量寡肽和游离氨基酸, 这与上述分析的两种酱油中的游离氨基酸含量和氨基酸转化率结果一致。

```

1  MAESDNDSSG AQNAGNSGNL SELSPREQDR
31  FLPIANVSRI MKKALPANAK ISKDAKETVQ
61  ECVSEFISFI TGEASDKCQR EKRKTINGDD
91  LLWAMTTLGF EEYVEPLKIY LQRFREMEGE
121 KTVAARDSSK DSASASSYHQ GHVYGGSPAYH
151 HQVPGPTYPA PGRPR
  
```

图3 B₃亚基氨基酸残基序列

Fig.3 Amino acid sequence of B₃ subunit

3 结论

综合以上分析可知, pH、高温及 Fe³⁺/Fe²⁺、多酚、大豆多糖、大豆蛋白酶解物和 NaCl 含量对中式高盐稀态酱油二次沉淀的生成具有显著影响。低浓度 (<1.8%) 的乙醇对酱油二次沉淀的生成无显著影响。中式高盐稀态酱油与日式酱油在蛋白质 (特别是 B₃亚基) 组成上的显著差异可能是导致两种酱油二次沉淀生成量存在显著差异的关键原因。中式高盐稀态酱油二次沉淀形成可能存在多种机制, 其中之一可能为经典的敏感蛋白-Fe³⁺/Fe²⁺-敏感多酚复合物途径, 其中大豆球蛋白 G4 蛋白中的 B₃亚基为敏感蛋白。此外, 酱油中带正电荷的不稳定 B₃亚基与带负电荷的大豆多糖在静电引力作用下逐渐靠近、聚集, 在此过程中大豆多糖空间结构发生改变, 使其更多亲水性醛羧基团暴露并与 Na⁺通过静电作用互相吸引, Na⁺屏蔽了大豆多糖亲水性基团, 最终形成了不稳定的 B₃亚基-大豆多糖-Na⁺-Cl⁻复合物。该复合物逐渐聚集最终形成酱油二次沉淀, 这是中式高盐稀态酱油形成二次沉淀的另一可能途径。在中式高盐稀态酱油二次沉淀形成的两种可能途径中大豆球蛋白 G4 蛋白中的 B₃亚基均扮演着关键作用, 是中式高盐稀态酱油二次沉淀形成的关键物质。因此, 筛选可高效降解大豆球蛋白 G4 蛋白中 B₃亚基的安全微生物 (或蛋白酶) 将是本实验室的研究重点。

参考文献

[1] 曾新安, 李国基, 于淑娟. 酱油沉淀成分研究[J]. 食品科学, 2002, 23(11): 32-34
ZENG Xin'an, LI Guoji, YU Shujuan. Study on the sediment

composition of soy sauce [J]. Food Science, 2002, 23(11): 32-34

[2] 杨明泉, 高献礼, 刘占, 等. 国产酱油二次沉淀研究进展和展望[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(10): 250-255

YANG Mingquan, GAO Xianli, LIU Zhan, et al. Research progress and prospect of secondary sediment in domestic soy sauce [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(10): 250-255

[3] 高献礼, 闫爽, 陈燕斌, 等. 基于统计学方法的酱油二次沉淀形成的初步研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(3): 188-192

GAO Xianli, YAN Shuang, CHEN Yanbin, et al. Preliminary study on secondary sediment formation of soy sauces based on statistics methods [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(3): 188-192

[4] 陈有容, 刘庆玮. 酱油中沉淀及混浊物产生的原因初探[J]. 天津微生物, 1989, 2: 32-37

CHEN Yourong, LIU Qingwei. Preliminary study on the cause of sediment and turbidity in soy sauce [J]. Tianjin Microbiology, 1989, 2: 32-37

[5] Tomita M, Okubo K, Yamauchi F. Factors influencing the formation of sediment from raw soy sauce by heating [J]. Hakkokogaku, 1987, 65(3): 185-189

[6] Tomita M, Motomura Y, Kitahara H, et al. Purification and identification of the promoter of sediment formation from raw soy sauce by heating [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 86(4): 373-378

[7] Tamura J, Aiba T, Mogi K. Sediment-forming promoter and its activity in fermented raw soy sauce during pasteurizing process [J]. Journal of Japanese Soy Sauce Research Institute, 1987, 13(1): 244-250

[8] 张志航, 李国基, 于淑娟, 等. 酱油沉淀物的溶解性能[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2000, 28(11): 59-63

ZHANG Zhihang, LI Guoji, YU Shujuan, et al. Solubility of soy sauce sediment [J]. Journal of South China University of Technology (Nature Science Edition), 2000, 28(11): 59-63

[9] Harada R, Yuzuki M, Ito K, et al. Microbe participation in aroma production during soy sauce fermentation [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 125(6): 688-694

[10] Gao X L, Liu E M, Yin Y Y, et al. Enhancing activities of salt-tolerant proteases secreted by *Aspergillus oryzae* using atmospheric and room temperature plasma mutagenesis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(9): 2757-2764

[11] Gao X L, Sun P F, Lu J, et al. Characterization and formation mechanism of proteins in the secondary precipitate of soy

- sauce [J]. *European Food Research and Technology*, 2013, 237(4): 647-654
- [12] 高献礼,孙鹏飞,闫爽,等.酱油二次沉淀制备方法的对比[J].*食品与发酵工业*,2013,39(1):46-50
GAO Xianli, SUN Pengfei, YAN Shuang, et al. Comparison of preparation methods for secondary sediment of soy sauce [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(1): 46-50
- [13] Lozano P, Combes D, Iborra J L. Food protein nutrient improvement by protease at reduced water activity [J]. *Journal of Food Science*, 1994, 59(4): 876-880
- [14] 冯云子,崔春,高献礼,等.中式酱油与日式酱油非挥发性成分的比较[J].*食品与发酵工业*,2010,37(7):62-66
FENG Yunzi, CUI Chun, GAO Xianli, et al. Comparison of non-volatile components between Chinese and Japanese soy sauce [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 37(7): 62-66
- [15] 谢广发,陆健,孙军勇,等.黄酒非生物稳定性的预测模型[J].*食品科学*,2020,41(5):31-38
XIE Guangfa, LU Jian, SUN Junyong, et al. Predictive modeling of the nonbiological stability of Chinese yellow wine [J]. *Food Science*, 2020, 41(5): 31-38
- [16] Kikuchi T, Yokotsuka T. Studies on the polysaccharides from soy sauce part I. Purification and properties of two acidic polysaccharides [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1972, 36(4): 544-550
- [17] 韩晴.不同来源水溶性大豆多糖功能特性及结构的比较研究[D].北京:中国农业科学院,2019
HAN Qing. Comparative study on functional properties and basic structure of soluble soybean polysaccharides from different sources [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019
- [18] Gao X L, Zhang J K, Liu E M, et al. Enhancing the taste of raw soy sauce using low intensity ultrasound treatment during moromi fermentation [J]. *Food Chemistry*, 2019, 298: 124928
- [19] 王靖雯,赵谋明,陈涛,等.高盐稀态酱醪中功能性酵母菌的筛选、鉴定及发酵特性[J/OL].*食品科学*,2020,DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20200809-118
WANG Jingwen, ZHAO Mouming, CHEN Tao, et al. Screening, identification and fermentation characteristics of functional yeast from high-salt liquid-state moromi [J/OL]. *Food Science*, 2020, DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20200809-118
- [20] Devanthi P, Gkatzionis K. Soy sauce fermentation: microorganisms, aroma formation, and process modification [J]. *Food Research International*, 2019, 120: 364-374
- [21] 吕变梅,蒋雪薇,彭东,等.酱油酿造用耐盐产乙醇风味酵母的选育及其应用[J].*食品科学*,2020,41(20):119-124
LYU Bianmei, JIANG Xuewei, PENG Dong, et al. Breeding and application of salt-tolerant ethanol-producing yeast for soy sauce brewing [J]. *Food Science*, 2020, 41(20): 119-124
- [22] Feng Y Z, Cai Y, Su G W, et al. Evaluation of aroma differences between high-salt liquid-state fermentation and low-salt solid-state fermentation soy sauces from China [J]. *Food Chemistry*, 2014, 145: 126-134
- [23] 汪卓,陈楚锐,许立镛,等.pH 值对酱油中呈味肽种类和呈味特性的影响[J].*食品科学*,2021,42(2):60-65
WANG Zhuo, CHEN Churui, XU Liqiang, et al. Effects of pH on the types and taste characteristics of flavor peptides in soy sauce produced under low temperature stress [J]. *Food Science*, 2021, 42(2): 60-65
- [24] 孙鹏飞,高献礼,闫爽,等.酱油二次沉淀蛋白质的分离、鉴定及氨基酸分析[J].*食品工业科技*,2014,35(5):87-90
SUN Pengfei, GAO Xianli, YAN Shuang, et al. Distribution, identification and amino acid composition analysis of proteins in the secondary sediment of soy sauce [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(5): 87-90
- [25] 高献礼,赵斯薇,孙鹏飞,等.酱油渣蛋白质的分离、鉴定和氨基酸组成特征研究[J].*现代食品科技*,2013,29(10):2512-2516
GAO Xianli, ZHAO Siwei, SUN Pengfei, et al. Isolation, identification and amino acid composition of proteins in soy sauce residue [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(10): 2512-2516
- [26] Yuan D B, Yang X Q, Tang C H, et al. Physicochemical and functional properties of acidic and basic polypeptides of soy glycinin [J]. *Food Research International*, 2009, 42(5): 700-706
- [27] Wang C, Jiang L Z, Wei D X, et al. Effect of secondary structure determined by FT-IR spectra on surface hydrophobicity of soybean protein isolate [J]. *Procedia Engineering*, 2011, 15: 4819-4827