



基于酸浆量变化的豆腐蛋白沉淀机理研究

张志衡, 陈振家, 王晓闻, 李玉娥, 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:为探究酸浆豆腐凝固过程中蛋白沉淀过程的机理, 以实现 对豆乳凝固过程的有效监测, 本研究添加不同含量酸浆制备豆腐, 建立凝固曲线, 采用 SDS-PAGE 电泳分析蛋白亚基含量变化, 进行粒径分布和 Zeta 电位分析, 采用紫外扫描方法分析蛋白空间结构变化, 并利用激光共聚焦分析凝胶微观结构变化, 研究豆腐凝固过程中蛋白亚基的含量变化和聚集情况。结果表明: 蛋白质沉淀量随酸浆添加量的增加而逐渐增大, 在 20% 时达到最大值并趋于稳定; 豆乳凝固过程中蛋白质亚基组成发生了较大变化, 2% 酸浆添加量是诱导蛋白质凝固和豆乳中蛋白质亚基组成改变的重要拐点, A_3 和 β 亚基最早参与凝胶形成, α 和 α' 亚基表现出明显的聚集延迟; 豆乳中蛋白质粒径和电位绝对值随酸浆添加量的增加而逐渐减小, 体系的稳定性遭到破坏; 随着酸浆添加量的增加, 豆乳中色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸残基逐渐暴露, 豆乳疏水性增强; 酸浆添加量对凝胶微观结构的影响显著, 添加量低于 20% 时, 凝胶网络结构随着酸浆添加量的增加而逐渐变得细腻。综合上述研究结果表明, 在一定的酸浆添加量范围内, 随着酸化速率的增大, 豆乳聚集过程加快, 在此过程中豆乳稳定性、豆乳中蛋白质分子结构以及形成凝胶的微观结构均发生显著变化。

关键词: 豆腐; 酸浆; 添加量; 凝固; 蛋白性状; 凝胶微观结构

Mechanism of Tofu Protein Precipitation Based on Acid-Pulp Content Change

ZHANG Zhi-heng, CHEN Zhen-jia, WANG Xiao-wen, LI Yu-e, ZHANG Xue-bing

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

Abstract: In order to explore the mechanism of protein precipitation in soybean-curd solidification, as well as to effectively monitor the process of soybean-milk solidification, this study used different contents of acid-pulp and established a solidification curve. We analyzed the protein subunit content change by SDS-PAGE electrophoresis, the particle-size distribution and zeta potential, the protein spatial structure change by UV scanning, and the gel microstructure change by laser confocal scanning, and studied the protein subunit content change and aggregation in the process of soybean-curd solidification. The results showed that the precipitation amount of protein gradually increased with increased amount of acid pulp and reached the maximum at 20% before stabilizing. Great changes occurred in the protein-subunit composition during soybean-milk solidification. The addition of 2% acid pulp was an important inflection point to induce protein solidification and changed the protein-subunit composition in soybean milk. The A_3 subunit and the β subunit participated in gel formation at the earliest, as well as the α and α' subunits, showed obvious aggregation delay. The absolute value of particle size and potential of protein in soybean milk gradually decreased with increased acid-pulp addition, and the stability of the system was destroyed. With increased amount of acid pulp, the tryptophan, tyrosine, and phenylalanine residues in soybean milk were gradually exposed, and the hydrophobicity of soybean milk was enhanced. The amount of acid pulp significantly affected the gel microstructure. When the amount of acid pulp was less than 20%, the gel-network structure gradually became fine with increased acid pulp. These results showed that within a certain amount of added acid pulp, with the increase of acidification rate, the soy milk aggregation process was accelerated, within which the stability of soybean milk, the molecular structure of protein in soybean milk, and the microstructure of gel formed significantly changed.

Keywords: tofu; acid pulp; addition amount; solidification; protein character; gel microstructure

酸浆豆腐是我国一种传统的豆制品, 它是以酸浆为凝固剂, 进行点制而成的豆腐。酸浆由制作豆腐的副产物黄浆水经乳酸菌自然发酵而成, 因富含乳酸等有机酸, 整体的 pH 值较低, 因此得名, 这也是酸浆豆腐名字的由来。酸浆豆腐豆香浓郁、口感细腻、营养丰富, 且在生产过程中没有使用任何添加剂和化学物质, 产生的黄浆水也可发酵后再次利

用, 是一种健康无污染的豆制品^[1]。豆腐原材料豆乳是一种重要的植物蛋白乳, 是大豆经过浸泡、磨浆、过滤、煮浆等工艺制备的分散体系^[2-3], 不仅含有丰富的蛋白质和脂肪, 还是维生素、钾、钙、硒等营养素的优质来源^[4]。蛋白质是豆乳的主要成分, 豆乳的加工特性主要与其蛋白质的理化性质有关, 豆乳中的蛋白质主要以两种形式存在, 即直径大于 40 nm 的粒子蛋白和直径小于 40 nm 的可溶性蛋

收稿日期: 2021-09-22

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

第一作者: 张志衡 (1997—), 男, 硕士研究生, 主要从事食品科学与工程研究。E-mail: 18335462754@163.com。

通讯作者: 陈振家 (1981—), 男, 博士, 副教授, 主要从事植物蛋白提取分离及修饰改性研究。E-mail: 13453216350@163.com。

白,两者各占 50% 左右,蛋白粒子与可溶性蛋白的变化主要与豆乳中大豆球蛋白(11S)和 β -伴大豆球蛋白(7S)的聚集和解离有关^[5]。11S 和 7S 是大豆中主要的贮藏蛋白,约占大豆蛋白的 70% 左右,决定了大豆蛋白的主要功能特性^[5],并且与豆乳蛋白的凝固过程密切相关^[6]。11S 是一种六聚体蛋白,由 6 个亚基组成,每个亚基由 1 个酸性亚基(分子量约 35 kDa)和 1 个碱性亚基(分子量约 20 kDa)通过二硫键连接而成;7S 是一种三聚体蛋白,主要由 α (68 kDa)、 α' (72 kDa)和 β (52 kDa)亚基通过疏水作用组成^[7-8]。两种蛋白的性质有很大差异,11S 变性温度为 90 ℃ 左右,7S 变性温度为 75 ℃ 左右^[9],11S 蛋白的构象比 7S 更加稳定。因此,研究豆乳蛋白沉淀机理对监测豆乳凝固过程、保证豆腐品质具有重要意义。

通常情况下,豆乳这一胶体系统是稳定的,因为蛋白质或其他带电大分子周围存在电化学双层^[10],颗粒周围的电化学双层阻碍它们接近具有高度吸引力的范德华力可以作用的距离,从而防止聚集^[11]。而酸度或离子强度的变化可使原本稳定的系统失稳,最终导致凝胶化。豆乳凝胶化过程中蛋白质发生聚集,蛋白质结构发生变化。Guo 等^[12]研究表明,在氯化钙浓度达到 0.008 mol·L⁻¹ 时豆乳会产生沉淀,而在传统豆腐制作过程中添加酸浆会导致豆乳的 pH 值降低,说明豆乳中蛋白质发生聚集需要在一定金属阳离子或 H⁺ 的作用下实现。除此之外,豆乳系统稳定性与蛋白粒径、电位变化、空间结构和凝胶微观结构密切相关。蛋白质分子的粒径分布会影响溶液的界面性质^[13]。根据粒径分布可以计算出豆乳中蛋白质的平均粒径,平均粒径可以表征蛋白质的聚集程度,也可以反映蛋白质空间构象的改变^[14]。豆乳的主要成分为大豆蛋白,蛋白质表面氨基酸所带的电荷量及电荷的正负性有关可以导致其电位的变化。当带正电荷的氨基酸多于带负电荷氨基酸时,Zeta 电位值为正,反之,若蛋白质表面带负电荷氨基酸多于带正电荷的氨基酸时,则 Zeta 电位值为负^[15]。蛋白质的紫外吸收主要是由于蛋白质中的发色基团可吸收紫外光。蛋白质的发色基团主要包括色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸 3 种芳香族氨基酸残基的侧链基团,通过分析蛋白质的紫外光谱吸收情况,可以推断其分子的构象变化^[16]。葡萄糖酸内酯(GDL)的添加量对豆乳体系的流变性和凝胶微观结构有显著影响,GDL 浓度越高,胶凝速度越快,凝胶微观结构越细腻^[17],而凝

固剂的添加量可以控制酸凝胶的凝胶化过程。

本研究通过调节酸浆添加量制备豆腐,分析豆腐凝固过程中蛋白亚基含量、粒径、Zeta 电位、蛋白空间结构和凝胶微观结构变化规律,研究豆乳凝胶化过程中蛋白质的聚集和蛋白质结构变化情况。需要强调的是,研究中使用的酸浆的酸度和 pH 值固定,由于同样的酸浆添加量并不适用于不同指标的研究,因此为了实现对豆乳凝固过程的有效监测,不同试验部分对酸浆添加量的选择略有差异。本研究旨在深入探究豆乳凝固过程中蛋白质变化规律与酸浆添加量的关系,促进豆乳凝固过程的有效监测。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆为市售;酸浆购自大同广灵神泉豆制品有限公司,pH3.9,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、甘氨酸、甲双叉丙烯酰胺、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)、尿素和罗丹明 B 均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

JYL-G12E 九阳高速破壁养生机;九阳股份有限公司;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;Zetasizer Nano ZS90 型电位仪;Malvern;TCS SP8 型激光扫描共聚焦显微镜;Leica;Cary 60 型紫外可见分光光度计;安捷伦;HC-2064 高速离心机、KDC-1044L 大容量低速离心机;安徽中科中佳科学仪器有限公司;CanoScan LiDE 120 型扫描仪;佳能公司。

1.3 方法

1.3.1 豆乳的制备 参考 Guo 等^[18]的方法并做一定调整。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(W/V)磨浆,粗浆 200 目过筛去除豆渣后,加热煮沸 5 min,保温备用。

1.3.2 不同酸浆添加量下豆乳蛋白质沉淀量测定 向 10 mL 豆乳中分别加入 0,0.05,0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.5,2.0,2.3,2.6 和 3.0 mL 酸浆,使得豆乳中的酸浆添加量($V_{\text{酸浆}}:V_{\text{豆乳}}$)分别为:0、0.5%、1%、2%、4%、6%、8%、10%、15%、20%、23%、26%、30%,振荡混匀后于室温下静置 20 min,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,通过考马斯亮蓝法测定上清液中可溶性蛋白含量。实际蛋白质沉淀量等于未添加酸浆时

上清中的可溶性蛋白质含量减去加入酸浆后上清中的可溶性蛋白质含量。

1.3.3 SDS-PAGE 电泳 根据上清液中可溶性蛋白含量,加入样品处理液(0.4% SDS、0.2 mol·L⁻¹ Tris-HCl,pH6.8、2% 溴酚蓝、尿素),使得溶液中蛋白质浓度为 1 mg·mL⁻¹。

采用 Laemmli^[17] 的方法进行 SDS-PAGE 电泳,并做一定改动。制备 12% 分离胶浓度和浓 5% 浓缩胶,上样量 6 μL,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 3 h,用 CanoScan LiDE 120 型扫描仪扫描并保存图像。

1.3.4 粒径分布分析和 Zeta 电位测定 按照 1.3.1 的方法制备豆乳,参照杨锋等^[19]的方法并稍做改动,加入不同体积的酸浆至酸浆添加量分别为 0、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9% 和 10%,振荡混匀后离心(4 000 r·min⁻¹,10 min),测定上清液中可溶性蛋白的含量,取上清液稀释至蛋白浓度为 1 mg·mL⁻¹,用 0.45 μm 水系滤膜过滤,通过 Zetasizer Nano ZS90 型电位仪测定体系中蛋白粒子的粒径分布及其电位。参数设置如下:分散介质为蛋白质;分散剂为水;温度 25 ℃,平衡时间 120 s。

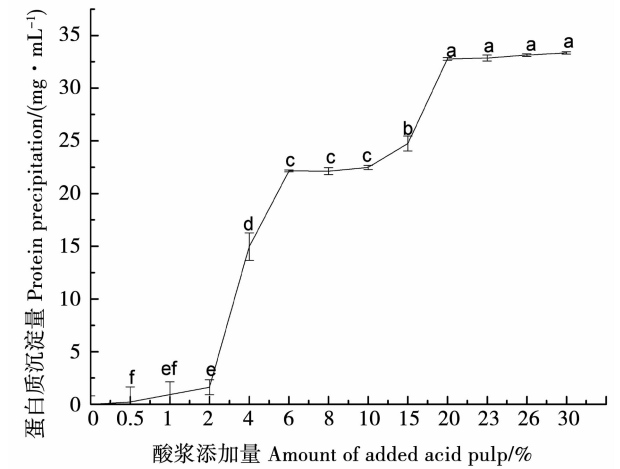
1.3.5 芳香族氨基酸残基结构变化分析 于豆乳中加入不同体积的酸浆,使得酸浆的添加量分别为 0、1%、2%、3%、4%、5%,振荡混匀后 4 000 r·min⁻¹离心 10 min,测定上清液中可溶性蛋白的含量。参照 Liang 等^[20]的方法并稍做改动,将上清液的蛋白浓度稀释至 1 mg·mL⁻¹,用 0.45 μm 水系滤膜过滤,用安捷伦 Cary 60 型紫外可见分光光度计进行紫外扫描,扫描波长范围为 200 ~ 300 nm,扫描速率为 100 nm·min⁻¹,分辨率为 0.2 nm。由于谱峰的信号叠加,很难分辨出峰的具体特征,因此对紫外吸收光谱进行二阶求导,以分析 3 种芳香族氨基酸残基的结构变化。

1.3.6 凝胶微观结构分析 依据上述的方法制备豆乳,参考 Kuipers 等^[21]的方法测定微观结构并稍做改动,取 100 mL 豆乳加入 1 mL 0.2% (W:V) 罗丹明溶液,搅拌均匀后,分别配制 5%、10%、15% 和 20% 酸浆浓度的混合溶液,迅速振荡均匀,取 10 μL 滴在载玻片上,盖上盖玻片,周围滴加少量透明指甲油防止水分蒸发,然后用锡纸包裹,在 90 ℃ 保温箱中保温 1 h,冷却至室温,测试前样品置于阴暗处。使用 TCS SP8 型激光共聚焦显微镜对凝胶的内部结构进行观察,样品的激发波长是 543 nm,检测范围 580 ~ 700 nm。

1.4 数据分析 使用 Excel 2010 和 PASW Statistics 18 软件进行数据处理和显著性分析,采用 Origin 8.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同酸浆添加量下豆乳蛋白凝固曲线建立 如图 1 所示,随着酸浆添加量的增加,蛋白质沉淀的生成量大致呈逐渐上升趋势,酸浆添加量低于 0.5% 时没有蛋白质沉淀产生,说明在较低的酸浆添加量下,H⁺ 不会引起豆乳中蛋白质的大量交联。在 2% ~ 20% 酸浆添加量范围内蛋白质沉淀量呈现快速增加趋势,此后随着酸浆添加量的增加,沉淀的生成速度逐渐减缓直至趋于稳定。最终趋于稳定的水平渐近线反映了单位体积的豆乳可得到的最大蛋白质沉淀量,即豆乳中的蛋白向凝胶或豆腐中蛋白的转化程度。结果说明沉淀产生量并不会随着酸浆添加量的增加而无限增加,而主要与豆乳中的可溶性蛋白含量有关。



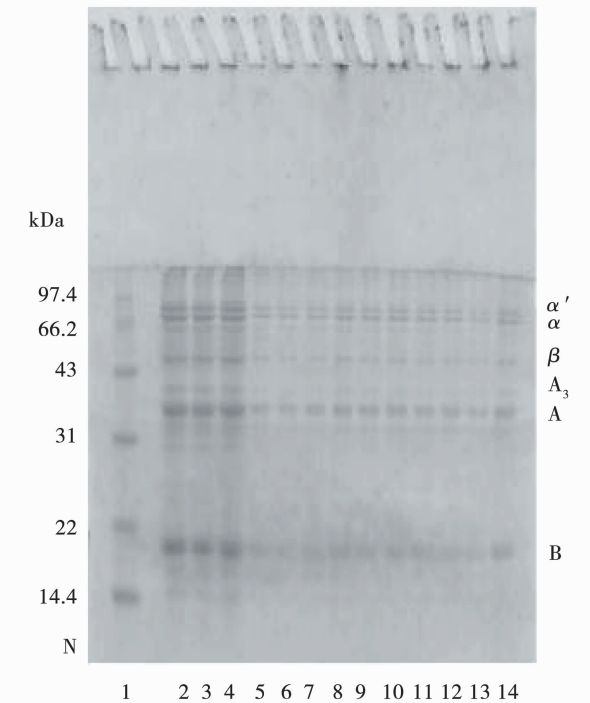
注:不同字母代表处理间差异显著(P<0.05)。下同。
Note: Different letter indicate significant difference. The same below.

图1 豆乳蛋白凝固曲线

Fig. 1 The coagulation curve of soybean milk protein

2.2 不同酸浆添加量下蛋白亚基含量变化分析 由图 2 所示,豆乳中的蛋白质由 6 种亚基组成: B 亚基、A 亚基、A₃ 亚基、β 亚基、α 亚基和 α' 亚基,随着酸浆添加量的增加,电泳图中各亚基条带明显变浅,说明参与凝固过程的蛋白质在逐渐增加。未添加酸浆时,大部分蛋白质亚基存在于上清液中,亚基条带非常深,可以很明显地观察到 6 条条带,同时存在大聚集体(>100 kDa),说明仅通过加热无法使豆乳发生大规模聚集;当酸浆添加量达到 2% 时,蛋白亚基组成发生骤变,条带均明显变浅,A₃ 亚基、β 亚基和大聚集体均逐渐消失,表明豆乳发生失

稳聚集,各亚基及聚集体间通过分子间作用力结合形成沉淀。推断2%左右的酸浆添加量可能是豆乳凝固过程的一个转折点,大于2%时,豆乳发生快速聚集,蛋白沉淀大量增加,沉淀量随酸浆添加量的变化规律与凝固曲线结果一致。



注:泳道1为低分子蛋白质Marker;泳道2~14分别为酸浆添加量为0、0.5%、1%、2%、4%、6%、8%、10%、15%、20%、23%、26%和30%。

Note: Lane 1 is a low molecular weight protein marker; Lanes 2-14 are with the addition of acid pulp of 0, 0.5%, 1%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 15%, 20%, 23%, 26% and 30% respectively.

图2 不同酸浆添加量下蛋白质的亚基 SDS-PAGE 凝胶电泳

Fig. 2 The SDS-PAGE gel electrophoresis of protein subunits with different acid pulp addition content

2.3 不同酸浆添加量下蛋白粒径分布与平均粒径变化分析

2.3.1 粒径分布 如图3所示,在酸浆浓度为0~10%时,豆乳中蛋白粒子的粒径分布曲线呈单峰分布,主要分布在100~1 000 nm范围内。酸浆对豆乳蛋白粒子的粒径分布影响较大,随着酸浆添加量的增加,粒径曲线整体向左偏移,说明蛋白分子粒径整体逐渐减小。峰的形状也发生了明显变化,最初未添加酸浆时,峰形较宽,粒径分布范围较大,体系呈现大粒子化;而随着酸浆添加量的增加,峰形变窄,粒径分布范围变小。表明在豆乳凝固过程中,大颗粒蛋白优先参与沉淀形成,小颗粒蛋白则留在上清液中,从而使得上清中的蛋白质分子颗粒减小,粒径分布范围变小。

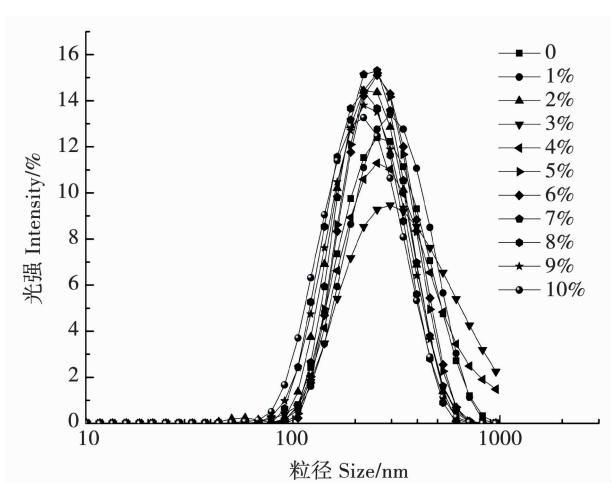


图3 不同酸浆添加量下豆腐凝固过程中蛋白粒径分布变化

Fig. 3 The changes of protein particle size distribution with different acid pulp addition content during tofu solidification

2.3.2 平均粒径 如图4所示,随着酸浆添加量的增加,豆乳上清液中的蛋白质平均粒径大致呈逐渐下降趋势。表明在 H^+ 的作用下,豆乳的凝固过程加快,有更多的蛋白质参与了聚集体的形成,但尚有一些小分子蛋白未参与凝固。当酸浆添加量为2%时,平均粒径突然下降,而在3%时又突然升高,推测在酸浆添加量很少时,豆乳的凝固过程属于局部凝固,只有和酸浆接触的部分豆乳参与了凝固过程。这主要与酸浆的添加方式有关,因此在0~4%的酸浆添加量区间内才会出现平均粒径忽高忽低的情况,增加酸浆添加量后,由于豆乳与酸浆充分接触,局部凝固的现象消失,蛋白质聚集程度提高,表现为上清液中的蛋白质分子平均粒径逐渐减小。

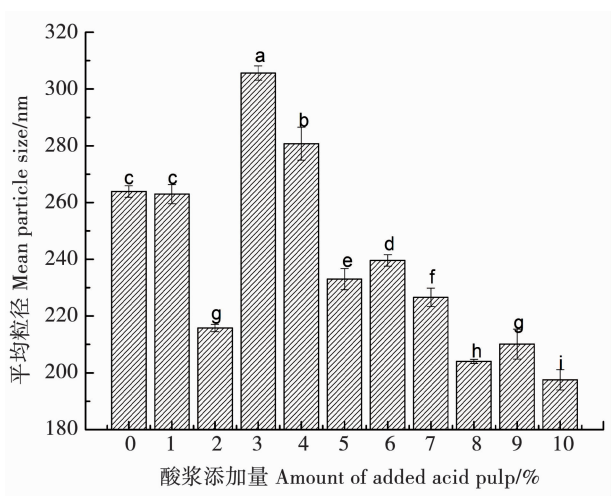


图4 不同酸浆添加量下豆腐凝固过程中蛋白平均粒径变化

Fig. 4 The changes of average particle size with different acid pulp addition content during tofu solidification

2.4 不同酸浆添加量下豆乳 Zeta 电位变化分析

如图 5 所示,在不同酸浆添加量下,豆乳的电位值均为负值,说明蛋白质表面负电荷的数量远大于正电荷。随着酸浆添加量的增加,豆乳电位绝对值呈现逐渐降低的趋势。当豆乳电位绝对值较大时,蛋白质表面同性电荷数量增加,同性电荷之间的相互排斥使得蛋白质分子难以聚集,豆乳更加稳定;当豆乳电位绝对值降低时,异性电荷逐渐增加,静电斥力的削弱使得蛋白质分子发生聚集的趋势增大,豆乳的稳定性降低。结果说明,豆乳经过加热后,体系带有大量的负电荷,随着 H⁺ 浓度的逐渐增加,pH 值逐渐降低,蛋白质表面负电荷被中和,静电斥力减弱,蛋白分子发生聚集形成大量聚集体,带氨基酸数量的减少导致 Zeta 电位绝对值的降低,从而使得豆乳体系的稳定性遭到破坏。

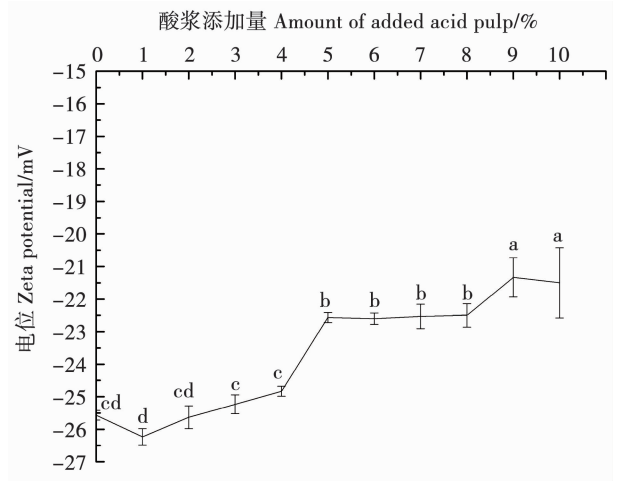


图 5 不同酸浆添加量下豆腐凝固过程中豆乳 Zeta 电位变化

Fig.5 The changes of zeta potential of soybean milk with different acid pulp addition content during tofu solidification

2.5 不同酸浆添加量下蛋白分子结构变化分析

如图 6 所示,随着酸浆添加量的增加,紫外吸光度值逐渐增加,表明蛋白质的结构遭到破坏,空间构象发生变化,具有紫外吸收特性的氨基酸的含量逐渐增加。如图 7 所示,随着酸浆添加量的增加,255 nm 谷峰出现轻微蓝移,280、287 以及 295 nm 谷峰也发生了不同程度蓝移。说明在酸浆诱导下,豆乳中一部分蛋白分子结构展开,苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸残基暴露出来,体系由极性变为非极性,疏水性增强。豆乳中蛋白质溶解性随酸浆添加量的增加而逐渐降低,与豆乳中蛋白质沉淀量的测定结果一致,从豆乳中氨基酸组成和结构变化角度解释了不同酸浆添加量下豆乳的凝固规律。

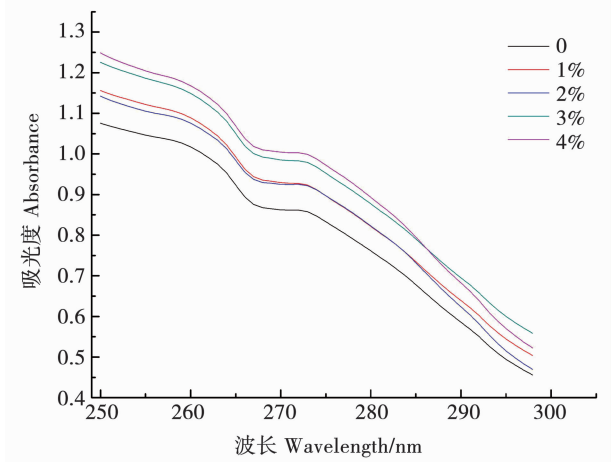


图 6 不同酸浆添加量下豆乳紫外吸收光谱图

Fig.6 The UV absorption spectrum of soybean milk with different acid pulp addition content

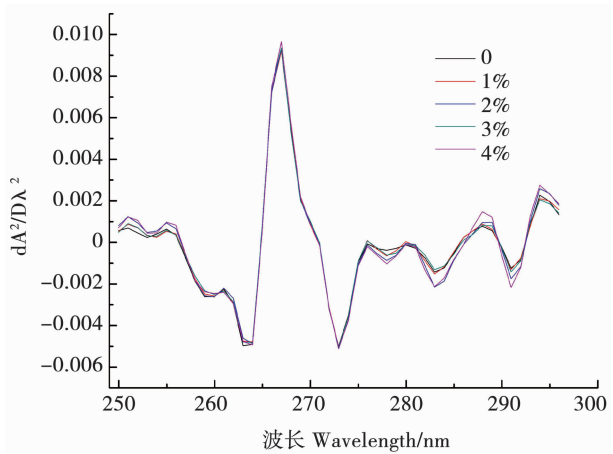
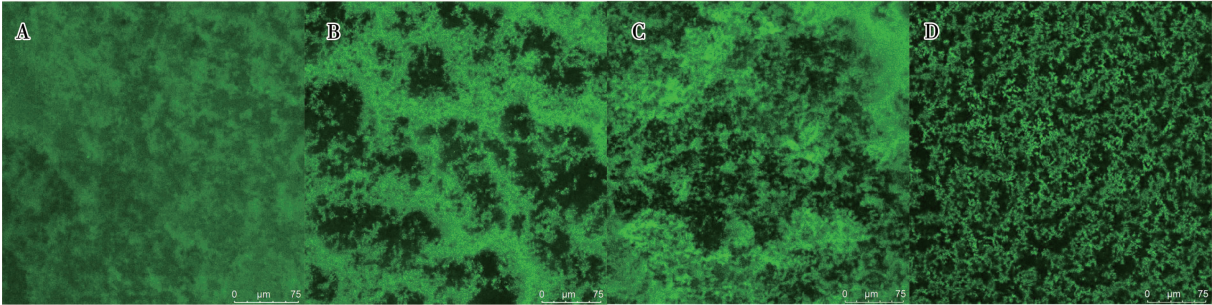


图 7 不同酸浆添加量下豆乳紫外二阶导数光谱图

Fig.7 The UV second derivative spectra of soybean milk with different acid pulp addition content

2.6 不同酸浆添加量下豆腐微观结构变化分析

如图 8 所示,不同酸浆添加量下所有凝胶都呈现出致密多孔的团簇状结构。有研究表明,酸诱导的豆乳凝胶属于颗粒或颗粒-链状混合结构,热变性蛋白质颗粒通过疏水聚集形成高度分枝簇,然后随 pH 的降低发生交联以形成 3D 网络^[22]。本研究中,当添加 5%、10% 和 15% 的酸浆时,形成的凝胶结构极为粗糙,并有大蛋白质聚集体的形成,凝胶空隙粗大且分布不均匀;酸浆添加量达到 20% 时,形成的凝胶网络结构均匀、致密,蛋白间空隙小且分布均匀。酸浆添加量过低时,可能由于酸化速率慢,蛋白质分子聚集速率过慢,导致无法形成均匀致密的凝胶结构。



注:A、B、C和D依次为5%、10%、15%和20%酸浆添加量。绿色区域代表蛋白质聚集体;黑色区域代表蛋白质间的空隙。

Note: A, B, C and D are 5%, 10%, 15% and 20% acid pulp addition content respectively. The green area represents the protein aggregate; The black area represents the gap between protein.

图8 不同酸浆添加量时形成凝胶的 CLSM 图

Fig. 8 The CLSM diagram of gel formation under different amount of acid pulp

3 讨论

在酸浆豆腐形成过程中,首先加热使豆乳中的蛋白质变性,内部的疏水基团和巯基暴露。其次酸浆的加入使蛋白表面的电荷被中和,分子间的斥力降低,从而蛋白质分子依靠各种分子间作用力聚集形成凝胶结构。研究表明维持凝胶结构的主要分子间作用力为二硫键和疏水作用,离子键和氢键虽然含量较低,但对维持酸浆豆腐结构起着重要作用^[23-24]。随着酸浆添加量的增加,越来越多的蛋白参与凝胶的形成,未形成凝胶的蛋白分子的行为将影响凝胶的进一步形成。原因其一,不同蛋白亚基的凝胶化行为受酸浆添加量影响的差异较大,本研究显示7S的 β 亚基和11S的 A_3 亚基在较低的酸浆添加量时开始凝固,而7S的 α 和 α' 亚基则表现出明显的聚集延迟现象,这与Wu^[25]和RINGENBERG等^[26]的研究结果一致;其二,蛋白分子粒径逐渐减小,电位的绝对值逐渐降低,整体的稳定性变差,耿蕊等^[27]研究表明豆乳中蛋白质分子结构也发生了变化,其中的发色基团残基暴露,体系变为非极性;其三,豆乳凝胶的微观结构随酸浆添加量的增加逐渐变得细腻,推测有两方面的原因,一方面, H^+ 浓度增加,蛋白分子表面的电荷量减少,分子间作用力增强,酸化速率增加,豆乳中蛋白质分子的聚集程度增强,有助于形成孔径更小、分布更加均匀致密的凝胶网络结构^[11,23-24],另一方面,与11S/7S的值有关,在低酸浆添加量时参与凝胶形成的主要是11S蛋白,在较高酸浆添加量时7S在凝胶形成过程中占主导地位^[19,25-26]。

综上所述,酸浆添加量可能影响了豆乳中蛋白粒子的行为及凝胶的形成过程,不同的添加量导致豆乳中的蛋白质在不同的聚集水平上发生了结构、亚基组成等方面的变化,这一系列的变化使最终形

成的凝胶微观结构呈现出不同的特征。随酸浆添加量的增加,蛋白质沉淀量逐渐增加,沉淀中的蛋白质亚基的含量与组成逐渐增加,豆乳中蛋白质分子的粒径及电位绝对值均逐渐减小,体系稳定性变差,紫外吸光度值的增加和谷峰的蓝移表明体系由极性向非极性转变,凝胶的微观结构随酸浆添加量的增加逐渐变得均匀细腻。

4 结论

酸浆豆腐制作过程中,蛋白质的沉淀行为受酸浆添加量显著影响,2%添加量是豆乳发生大规模聚集的转折点。在蛋白质聚集过程中,豆乳中 β 亚基和 A_3 亚基最早参与蛋白质聚集,而 α 和 α' 亚基参与聚集的时间较晚。随酸浆添加量的逐渐增加,豆乳中蛋白质分子的粒径变小,电位绝对值降低,蛋白质中的发色氨基酸基团逐渐解离出来。酸浆豆腐凝固过程中大致呈现出先缓慢沉淀而后快速聚集,最终趋于稳定的趋势。酸浆添加量过低时,豆乳凝固过程缓慢,形成的凝胶结构粗糙,孔隙较大;当添加量达到20%时,酸化速率加快,蛋白质聚集程度增大,有利于形成均匀致密的网络结构。

参考文献

[1] 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 R S, SUN Y D, ZHANG B, et al. Research progress of producing tofu with sour pulp[J]. Soybean Technology, 2020(1): 32-37.)

[2] 陈洋,林最其,徐丽,等. 豆浆制备工艺对豆腐品质的影响[J]. 大豆科学,2011,30(5): 838-842. (CHEN Y, LIN Z Q, XU L, et al. Effects of different preparation of soymilk on the quality of tofu[J]. Soybean Science, 2011, 30(5): 838-842.)

[3] ROSSI F, FELIS G E, MARTINELLI A, et al. Microbiological characteristics of fresh tofu produced in small industrial scale and identification of specific spoiling microorganisms(SSO)[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 70: 280-285.

[4] 范柳,刘海宇,赵良忠,等. 不同制浆工艺对豆乳品质的影响[J]. 食品与发酵工业,2020,46(7): 148-154. (FAN L,LIU H Y,ZHAO L Z,et al. Study on the influence of different pulping processes on the quality of soymilk[J]. Food and Fermentation Industry,2020,46(7): 148-154.)

[5] 吴海波,邱硕,朱秀清,等. 不同 11S/7S 比值原料豆乳的乳液特性研究[J]. 食品工业科技,2019,40(22): 49-55. (WU H B, QIU S,ZHU X Q,et al. Emulsion properties of soymilk prepared by different 11S/7S ratio soybean[J]. Food Science and Technology, 2019,40(22): 49-55.)

[6] BLAZEK V,CALDWELL R A. Comparison of SDS gel capillary electrophoresis with microfluidic lab-on-a-chip technology to quantify relative amounts of 7S and 11S proteins from 20 soybean cultivars [J]. International Journal of Food Science and Technology,2009,44(11): 2127-2134.

[7] NISHINARI K,FANG Y, GUO S, et al. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification [J]. Food Hydrocolloids,2014,39: 301-318.

[8] WU C,MA W,CHEN Y, et al. The water holding capacity and storage modulus of chemical cross-linked soy protein gels directly related to aggregates size[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019,103: 125-130.

[9] KITABATAKE N,TAHARA M, DOI E. Thermal denaturation of soybean protein at low water contents [J]. Agricultural and Biological Chemistry,1990,54(9): 2205-2212.

[10] HENDERSON D,BODA D. Insights from theory and simulation on the electrical double layer [J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2009,11: 3822-3830.

[11] SCHULDT S,RAAK N,JAROS D, et al. Acid-induced formation of soy protein gels in the presence of NaCl[J]. LWT-Food Science and Technology,2014,57(2): 634-639.

[12] GUO S T,ONO T,MIKAMI M. Incorporation of soy milk lipid into protein coagulum by addition of calcium chloride [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1999,47(3): 901-905.

[13] 孙领鸽,毛晓英,吴庆智,等. 蛋白质氧化对核桃蛋白界面性质的影响[J]. 中国食品学报,2020,20(9): 59-66. (SUN L G, MAO X Y,WU Q Z,et al. Effect of protein oxidation on interfacial properties of walnut protein[J]. Chinese Journal of Food Science, 2020,20(9): 59-66.)

[14] KARKI B,LAMSAL B P,GREWELL D,et al. Functional properties of soy protein isolates produced from ultrasonicated defatted soy flakes[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society,2009,86(10): 1021-1028.

[15] BOUZID H,RABILLER-BAUDRY M,PAUGAM L,et al. Impact of zeta potential and size of caseins as precursors of fouling deposit on limiting and critical fluxes in spiral ultrafiltration of modified skim milks[J]. Journal of Membrane Science,2008,314(1): 67-75.

[16] XU Y,WANG G,WANG X,et al. Effects of homogenization on the molecular flexibility and emulsifying properties of soy protein isolate [J]. Food Science and Biotechnology, 2018, 27 (5) : 1293-1299.

[17] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature,1970,227(5259): 680-685.

[18] GUO S T,TSUKAMOTO C,TAKAHASI K,et al. Incorporation of soymilk lipid into soy protein coagulum by the addition of calcium chloride[J]. Journal of Food Science,2002,67(9): 3215-3219.

[19] 杨锋,刘雪,任仙娥,等. 不同商用大豆分离蛋白结构特征和功能性质的比较[J]. 现代食品科技,2016,32(9): 107-115. (YANG F, LIU X, REN X E, et al. Comparison of structure characteristics and functional properties of different commercial soy protein isolates[J]. Modern Food Science and Technology,2016, 32(9): 107-115.)

[20] LIANG H N,TANG C H. Emulsifying and interfacial properties of vicilins: Role of conformational flexibility at quaternary and/or tertiary levels [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013,61(46): 11140-11150.

[21] KUIPERS B J H,ALTING A C,DRIEHUIS F, et al. Enzymatic hydrolysis as a means of expanding the cold gelation conditions of soy proteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005,53(4): 1031-1038.

[22] PANG Z, XU R, ZHU Y, et al. Comparison of rheological, tribological, and microstructural properties of soymilk gels acidified with glucono-δ-lactone or culture [J]. Food Research International,2019,121: 798-805.

[23] 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.

[24] 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 Y, LIU L S,ZHANG X F,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.)

[25] WU H,DONG J J,DAI Y Q, et al. Effects of lactic acid bacteria fermented yellow whey on the protein coagulation and isoflavones distribution in soymilk[J]. Food Chemistry,2021,334:127484.

[26] RINGGENBERG E,ALEXANDER M,CORREDIG M. Effect of concentration and incubation temperature on the acid induced aggregation of soymilk [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30 (1) : 463-469.

[27] 耿蕊,刘骞,卢岩,等. pH 偏移结合加热处理对大豆分离蛋白结构特性的影响[J]. 中国食品学报,2015,15(11):219-226. (GENG R, LIU Q, LU Y, et al. The effect of pH - shifting combined with heating treatment on structural properties of soybean protein isolate [J]. Chinese Journal of Food Science, 2015, 15 (11):219-226.)