戴意强,刘小莉,吴寒,等.不同凝固剂对大豆分离蛋白分子间作用力及蛋白质二级结构的影响 [J]. 食品工业科技,2021,42(12): 89-94. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020110009

DAI Yiqiang, LIU Xiaoli, WU Han, et al. Effects of Different Coagulants on Intermolecular Forces and Secondary Structure of Soybean Protein Isolate[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(12): 89–94. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020110009

・研究与探讨・

# 不同凝固剂对大豆分离蛋白分子间作用力 及蛋白质二级结构的影响

戴意强<sup>1,2</sup>,刘小莉<sup>1</sup>,吴 寒<sup>1</sup>,尹丽卿<sup>1,2</sup>,周剑忠<sup>1</sup>,董明盛<sup>2</sup>,夏秀东<sup>1,\*</sup>

(1.江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京210014;

2.南京农业大学食品科学技术学院,江苏南京210095)

摘 要:为探究盐类凝固剂和酸类凝固剂在诱导大豆蛋白凝固过程中对分子间作用力和蛋白质二级结构的影响,本 文以大豆分离蛋白(SPI)为研究对象,分析了不同凝固剂对大豆蛋白凝固过程中 pH、表面疏水作用力、游离巯 基(SH)、Zeta 电位、 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规卷曲的变化规律。结果表明:盐类凝固剂和酸类凝固剂均 能降低 SPI 溶液的 pH,其终点 pH 分别为 6.08~6.14 和 5.25~5.58。与仅热处理的 SPI 溶液相比,加入凝固剂会导 致 SPI 溶液中蛋白质表面疏水作用力和游离 SH 含量的增加,Zeta 电位降低。在加入凝固剂后的 0~45 min 内, SPI 的表面疏水作用力呈现先增加后降低的趋势,游离 SH 含量逐渐降低;酸浆处理的 SPI 溶液 Zeta 电位显著高于 其他凝固剂(P<0.05),为 9.19~9.90 mV。此外,盐类凝固剂会导致 SPI 的  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角转变为  $\beta$ -折叠,酸类 凝固剂则会破坏 SPI 中  $\beta$ -折叠。特别地,添加酸浆的 SPI 的  $\alpha$ -螺旋比例介于乳酸和盐类凝固剂之间,而  $\beta$ -转角比 例介于乳酸和醋酸之间。

关键词:大豆分离蛋白,凝固剂,分子间作用力,蛋白质二级结构 中图分类号:TS214.2 文献标识码:A 文章编号:1002-0306(2021)12-0089-06 DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020110009

# Effects of Different Coagulants on Intermolecular Forces and Secondary Structure of Soybean Protein Isolate

DAI Yiqiang<sup>1,2</sup>, LIU Xiaoli<sup>1</sup>, WU Han<sup>1</sup>, YIN Liqing<sup>1,2</sup>, ZHOU Jianzhong<sup>1</sup>, DONG Mingsheng<sup>2</sup>, XIA Xiudong<sup>1,\*</sup>

(1.Institute of Agricultural Product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;
2.College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract**: To study the changes of intermolecular forces and secondary structure of soy protein induced by MgCl<sub>2</sub>, CaSO<sub>4</sub>, lactic acid, acetic acid, GDL and fermented soy whey, the effects of different coagulants on the pH value, surface hydrophobicity, free sulfhydryl group (SH), Zeta potential,  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -turn and random coil during SPI tofu processing were analyzed, while the SPI was used as the research object. Both salt coagulants and acid coagulants could reduce the pH values of SPI solution, and the final pH value was 6.08~6.14 and 5.25~5.58, respectively. Compared with heated SPI solution without coagulant, the addition of coagulants caused increases in the surface hydrophobicity and free SH content, and a decrease in Zeta potential in SPI solution. The surface hydrophobicity of SPI induced by coagulants increased first and then decreased, and free SH content decreased at 0~45 min. The Zeta potential of SPI solution added with fermented soy whey was significantly higher than that of other coagulants (P<0.05), ranging from 9.19 mV to 9.90 mV. In addition, salt coagulants induced a shift of  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -turn into  $\beta$ -sheet of SPI. In particular, the SPI added with fermented soy whey had  $\alpha$ -helix ratio between lactic acid and salt

收稿日期: 2020-11-03

基金项目:江苏省科技计划项目(BE2019355);国家自然科学基金项目(31501460)。

作者简介:戴意强(1995-),男,硕士研究生,研究方向:食品生物技术,E-mail:yq-dai@foxmail.com。

<sup>\*</sup>通信作者:夏秀东(1985-),男,博士,副研究员,研究方向:食品生物技术,E-mail:86084056@163.com。

coagulants, and  $\beta$ -turn ratio between lactic acid and acetic acid.

Key words: soy isolate protein; coagulants; intermolecular forces; protein secondary structure

大豆营养价值高,含丰富的蛋白质、脂肪和碳水 化合物,此外,钙、铁、磷等微量元素丰富<sup>[1]</sup>。大豆可 以被加工成各种豆制品,其中最受消费者欢迎的豆制 品是豆腐。在豆腐制作过程中,点浆会影响最终产品 的品质,是大豆蛋白形成凝胶过程中最关键的步骤。 在该过程中,涉及的分子间作用力主要有共价键(二 硫键)以及疏水作用和静电作用等非共价作用。生豆 浆中蛋白质的亲水基团位于分子外部,而疏水基团位 于分子内部,此时蛋白结构稳定。在煮浆过程中,由 于温度的升高,蛋白质分子运动加剧,疏水基团暴露, 氢键被破坏,蛋白质发生变性<sup>[1]</sup>。凝固剂的加入可以 进一步促使蛋白质分子间作用力改变,形成不溶性蛋 白聚集体。

目前,被广泛应用的豆腐凝固剂有 $MgCl_2$ 、CaSO<sub>4</sub> 等盐类凝固剂和葡萄酸- $\delta$ -内酯(glucono- $\delta$ -lactone, GDL)、醋酸等酸类凝固剂<sup>[2]</sup>。盐桥理论是解释盐诱 导大豆蛋白凝固机理的主要理论[3]。盐类凝固剂在 大豆蛋白溶液中解离并释放 Mg2+、Ca2+等阳离子, 通 过屏蔽蛋白质的表面负电荷以减少蛋白质分子之间 的静电斥力,并与蛋白分子结合,充当"桥梁"的作 用<sup>[4-5]</sup>。酸类凝固剂诱导大豆蛋白凝固的机理主要是 酸类凝固剂可以降低蛋白溶液的 pH,当 pH 接近大 豆蛋白等电点时,蛋白质表面负电荷减少,疏水作用 和二硫键含量增加,蛋白分子间静电斥力下降,导致 蛋白质发生聚集形成凝胶[6-7]。尽管目前对蛋白质凝 胶过程中涉及的分子间作用力有所报道,但对不同凝 固剂诱导蛋白聚集的分子间作用力的比较及蛋白质 二级结构变化鲜有研究。本文以大豆分离蛋白(Soy protein isolate, SPI)作为研究对象,研究了不同凝固 剂(MgCl<sub>2</sub>、CaSO<sub>4</sub>、乳酸、醋酸、GDL 和酸浆)对诱 导大豆蛋白凝固过程中分子间作用力和蛋白质二级 结构的影响。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料与仪器

新鲜黄浆水 由南京豆制品生产企业提供;植物乳杆菌 D1031 来自江苏省农业科学院农产品加 工研究所食品生物工程实验室;酸浆(pH4.0) 由黄 浆水经植物乳杆菌 D1031 在 37 ℃ 条件下发酵 24 h 得到; MgCl<sub>2</sub>、CaSO<sub>4</sub>、乳酸和醋酸 国药集团化学试 剂有限公司; GDL 上海瑞永生物科技有限公司; 8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)和 5,5'-二硫代双(DTNB) 上 海麦克林生化科技有限公司。

FiveEasy PluspH 计 梅特勒-托利多有限公司; FDU-1200 冷冻干燥机 日本 EYELA 公司; T25 分 散机 德国 IKA 公司; Cytation5 多功能酶标仪 美 国伯腾仪器有限公司; ZSP 纳米粒度电位仪 马尔 文 仪 器 公 司; J-1500 圆 二 色 谱 仪 (CD) 日本 JASCO 公司; 3K15 离心机 美国 Sigma 公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 SPI 的提取 SPI 的制备参照 Chen 等<sup>[8]</sup> 报道的方法。脱脂豆粉按照 1:15 的料液比加入去离子水溶解,并用 2 mol/L NaOH 调至 pH 为 7.5, 25 ℃ 下搅拌 2 h 后,在4℃,8000 g 下离心 20 min。上清液用 2 mol/L 盐酸调至 pH 为 4.5 后,在4℃,8000 g 下离心 10 min,此时获得的沉淀用其 5 倍质量的去离子水清洗 2 次,并于 8000 g 离心 10 min。沉淀按 1:5 的料液比加入去离子水后,用 2 mol/L NaOH 调至 pH 为 7.0,经冷冻干燥获得 SPI 粉末。利用凯氏定 氮法测定冻干 SPI 粉末中蛋白质含量为 93.62%。

1.2.2 SPI 豆腐的制作 800 mL 5%(w/v)的 SPI 溶 液煮沸 5 min, 并于 85 ℃ 保温, 缓慢加入凝固剂(3‰ MgCl<sub>2</sub>、3‰ CaSO<sub>4</sub>、3‰ GDL, 20% pH 2.0 乳酸, 30% pH 3.0 醋酸或 35% pH 4.0 酸浆), 制成 6 种凝固剂 处理的 SPI 凝胶。在加入凝固剂 0、3、10、20、30、和 45 min 后, 将 SPI 溶液或凝胶迅速放置于冰浴中 至其温度降至室温(处理 0 min 是指 SPI 溶液加入凝 固剂后立刻进行冰浴)。另取二分之一的样品冻干, 用于游离巯基(SH)和蛋白质二级结构的测定。

1.2.3 pH 的测定 利用 pH 计测定加入凝固剂后 SPI 溶液的 pH 变化。

1.2.4 表面疏水性的测定 SPI 溶液表面疏水性的 测定参照 Shigeru 等<sup>[9]</sup> 所述方法并做适当修改。 SPI 凝胶 5000 r/min 匀浆 3 min 后,用 0.01mol/L pH 7.0 磷酸缓冲溶液(PBS)进行梯度稀释,得到 0%~ 0.05% 蛋白浓度的系列溶液,取 20 μL 8.0 mmol/L ANS 溶液添加到 2 mL 稀释样品中。避光反应 20 min 后,利用多功能酶标仪测定样品的荧光强度。激发波 长和发射波长分别为 390 和 470 nm,狭缝宽度为 10 nm。 SPI 表面疏水力指数以荧光强度与蛋白质浓度曲线 的初始斜率表示。

1.2.5 游离巯基的测定 SPI 溶液游离巯基的测定 参照 Zhang 等<sup>[10]</sup> 报道的方法。称取 40 mg 冻干样 品并溶解于 4 mL Tris-Gly 缓冲溶液(0.086 mol/L Tris, 0.09 mol/L Gly 和 4 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.0)中,并于 25 ℃ 下放置 30 min。10000 g 离心 20 min 后,上清液中加入 30 µL Ellman 试剂溶液(4 mg DTNB 溶于 1 mL Tris-Gly 缓冲溶液), 25 ℃ 反应 15 min 后,在 412 nm 处测定吸光值。上清液中蛋白 质含量使用考马斯亮蓝法测定。游离巯基含量用以 下公式计算:

游离巯基含量=(A<sub>412</sub>/ε)×D/c

式中: A<sub>412</sub> 表示在波长 412 nm 下的吸光值, ε 表示吸光系数(13600 mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>L), D 表示稀释倍数, c 表示离心后上清液蛋白浓度(mg/mL)。

1.2.6 Zeta 电位的测定 Zeta 电位的测定参照 Liang 等<sup>[11]</sup> 所述方法。SPI 凝胶于 5000 r/min 匀浆 3 min 后, 用去离子水稀释 200 倍, 使用电位仪测定 SPI 凝 胶的 Zeta 电位。溶剂为去离子水, 折光系数为 1.33, 介电常数为 78.54。

1.2.7 蛋白质二级结构的测定 称取 0.1 g SPI 冻干 样品, 溶于 5 mL 去离子水中, 利用 CD 测定蛋白质 二级结构, 并利用仪器自带软件模拟蛋白质二级结构 (α-螺旋, β-折叠, β-转角和无规卷曲)的比例。测定条 件: 0.1 cm 厚度的石英比色皿; 190~250 nm 波长扫 描; 扫描 3 次取平均值。

#### 1.3 数据处理

实验数据测定三次,结果用"平均值±标准差"表示。采用 SPSS 22.0 对数据进行分析,多组数据差异性分析采用 Duncan 比较模型,差异显著(P<0.05)。

# 2 结果与分析

#### 2.1 不同凝固剂对 SPI 溶液 pH 的影响

由图 1 可知, 乳酸、醋酸和酸浆能降低 SPI 溶液 的 pH,并在 3 min 内达到稳定,而加入 GDL 的 SPI 溶液 pH 在 10 min 之内达到稳定,为 5.40~5.48, 这与 Cao 等[12] 的研究一致, 即加入 0.30 g/100 mL GDL 的豆乳凝胶的最终 pH 为 5.42。盐类凝固剂的 加入也会降低 SPI 溶液的 pH, 这可能与凝固剂中 Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>与植酸作用有关<sup>[13]</sup>。值得注意的是,加 入酸类凝固剂的 SPI 溶液的 pH 显著低于加入盐类 凝固剂的 SPI 溶液。Hsia 等<sup>[14]</sup> 研究表明大豆蛋白 7S  $\alpha'$ , 7S  $\alpha$ , 7S  $\beta$ , 11S A1a, 11S A1b, 11S B1a, 11S B1b、11S A2、11S A3 和 11S A4 的等电点分别为 5.23, 5.07, 5.88, 5.78, 5.28, 5.46, 5.73, 5.46, 5.60 和 5.29。MgCl<sub>2</sub>和 CaSO<sub>4</sub>的加入虽然能使 SPI 溶液 pH 降低,但与大豆蛋白的等电点相差较大,因此盐类 凝固剂导致的 SPI 溶液 pH 的降低不是大豆蛋白聚 集的主要原因。pH 的降低减弱了蛋白质分子之间的 静电斥力,有利于蛋白质聚集,而 Ca2+和 Mg2+以"盐





Fig.1 Changes of pH value of SPI solution induced by different coagulants

桥"的方式与蛋白质分子结合,形成大豆蛋白凝胶[15]。

# 2.2 不同凝固剂对 SPI 溶液表面疏水作用力的影响

蛋白质分子间的疏水相互作用会导致蛋白质的 随机聚集和凝胶形成,亚基的解离和多肽链的展开都 能引起疏水作用力的升高,因此表面疏水作用力的变 化在一定程度上能够反映蛋白质聚集过程中的结构 变化[16]。由图 2 可知,与仅热处理的 SPI(312.94)相 比,加入凝固剂的 SPI 溶液表面疏水作用力显著增 加(P<0.05)。MgCl,和CaSO4引起SPI溶液中离子 强度增加,并改变蛋白质分子的空间结构,隐藏在 SPI 内部的疏水区域暴露出来,导致蛋白疏水性增 加<sup>[17]</sup>。乳酸、醋酸、GDL 和酸浆会降低 SPI 溶液的 pH, 当溶液 pH 接近蛋白质的等电点时, 蛋白的表面 电荷和溶解度均降低,空间结构发生改变,进而引起 蛋白表面疏水作用力升高,蛋白质发生聚集。随着凝 固剂加入时间的延长, SPI 溶液表面疏水性逐渐降 低,这可能是因为暴露出来的疏水基团由于疏水性聚 集,导致疏水基团再次被包埋在蛋白聚集体内部[18], 此外,当蛋白质的疏水区域靠近带电荷的侧链残基, 静电相互作用会影响探针与蛋白质的结合,从而影响 蛋白质疏水作用力<sup>[19]</sup>。特别的, GDL 诱导的 SPI 凝 胶表面疏水性在 45 min 内持续下降,这可能与 GDL 缓慢释放 H<sup>+</sup>导致蛋白质缓慢聚集有关。



图 2 不同凝固剂诱导 SPI 溶液表面疏水作用力的变化 Fig.2 Changes of surface hydrophobicity of SPI solution induced by different coagulants

## 2.3 不同凝固剂对 SPI 溶液中游离 SH 含量的影响

物理和化学处理可使蛋白质构象改变并影响 SPI 溶液中 SH 基团含量,因此,游离 SH 含量可作为 添加凝固剂后 SPI 变性程度的评价指标<sup>[20]</sup>。与仅热 处理的 SPI(4.28 μmol/g 蛋白质)相比,凝固剂处理 的 SPI 溶液中游离 SH 含量显著增加(*P*<0.05),这可 能是因为来自盐类凝固剂的 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>和酸类凝固 剂产生的 H<sup>+</sup>与蛋白质分子上带负电荷的基团结合<sup>[16,21]</sup>, 导致蛋白质多肽链的展开,隐藏于蛋白质分子内部的 巯基暴露。大豆 11S 蛋白酸性多肽链和碱性多肽链 通过二硫键连接,凝固剂的加入可能会导致二硫键的 断裂,从而引起 SPI 溶液中游离 SH 含量的增加。由 图 3 可知,在加入凝固剂 0~45 min 内, SPI 溶液中游 离 SH 含量持续减少(图 3),这是由于在高温条件





下,暴露的游离巯基氧化反应形成二硫键[22]。

## 2.4 不同凝固剂对 SPI 溶液 Zeta 电位的影响

Zeta 电位通常被用来测定蛋白表面电荷性质, 并可以作为评价蛋白质胶体稳定性的指标<sup>[23]</sup>。 Zeta 电位绝对值越高,表明体系中静电斥力越强,胶 体系统越稳定<sup>[24]</sup>。加热处理后的 SPI 溶液 Zeta 电位 绝对值从 30.37 mV 降低至 22.43 mV,表明加热后 的 SPI 溶液中蛋白质粒子稳定性下降。当加入凝固 剂后, SPI 溶液的 Zeta 电位进一步降低。当胶体体 系中 Zeta 电位绝对值低于 10 mV,胶体体系中的粒 子趋向于聚集<sup>[23]</sup>。如表1所示,与仅加热处理的 SPI 溶液相比,向 SPI 溶液中加入凝固剂会释放金属 离子(如 Ca<sup>2+</sup>或 Mg<sup>2+</sup>)或 H<sup>+</sup>,中和变性蛋白质表面的 负电荷,导致蛋白质分子之间的静电斥力降低, Zeta 电位的绝对值下降<sup>[25]</sup>。

由表1可知,加入凝固剂的 SPI 溶液的 Zeta 电 位在短时间达到稳定,这表明凝固剂能快速破坏蛋白 质分子间的静电斥力,且该过程对蛋白质稳定性的破 坏是不可逆的。此外,加入 MgCl,、乳酸和醋酸的 SPI 溶液的 Zeta 电位在极短时间内达到稳定,这可 能与 MgCl<sub>2</sub>、乳酸和醋酸诱导蛋白凝固速率快有 关。GDL 诱导的 SPI 凝胶的 Zeta 电位在 10~20 min 内由负变正,这是因为 GDL 可在 SPI 溶液中缓慢释 放 H<sup>+</sup>, 使得最终 SPI 溶液呈正电价<sup>[5]</sup>。与其他凝固 剂处理的 SPI 相比, 加入酸浆的 SPI 溶液的 Zeta 电 位绝对值最大,这可能与酸浆中的复杂组成有关。 Li 等[26] 研究表明酸浆中含有大量有机酸、可溶性蛋 白质、氨基酸、脂质、可溶性糖、维生素和矿物质 等。以上研究结果表明,不同凝固剂的加入均会降低 蛋白质分子间的静电斥力,使 SPI 溶液趋于不稳定, 促使蛋白质的聚集并产生沉淀。

#### 2.5 不同凝固剂对 SPI 溶液蛋白质二级结构的影响

表 2 为不同凝固剂对 SPI 溶液中 α-螺旋, β-折

时间(min)	Zeta电位(mV)								
	MgCl <sub>2</sub>	$CaSO_4$	乳酸	醋酸	GDL	酸浆			
0	$-3.40{\pm}0.17^{a}$	$-8.79{\pm}0.19^{a}$	-5.36±0.23ª	$-3.09{\pm}0.18^{a}$	$-3.90{\pm}0.16^{a}$	-9.90±0.13ª			
3	$-3.42{\pm}0.14^{a}$	-7.63±0.13 <sup>b</sup>	$-5.25 \pm 0.37^{a}$	$-3.22\pm0.08^{a}$	$-3.27 \pm 0.35^{a}$	-9.20±0.16 <sup>b</sup>			
10	$-3.35{\pm}0.13^{a}$	-7.60±0.03 <sup>b</sup>	-5.15±0.38ª	-3.25±0.13ª	$-2.34{\pm}0.47^{b}$	-9.20±0.32b			
20	$-3.36{\pm}0.12^{a}$	$-7.57{\pm}0.08^{b}$	-5.42±0.42ª	-3.21±0.15ª	2.41±0.23°	-9.21±0.31 <sup>b</sup>			
30	$-3.45{\pm}0.09^{a}$	$-7.51{\pm}0.18^{b}$	$-5.40\pm0.54^{a}$	$-3.22\pm0.10^{a}$	2.47±0.13°	$-9.26 \pm 0.09^{b}$			
45	$-3.35{\pm}0.12^{a}$	-7.46±0.06 <sup>b</sup>	$-5.43 \pm 0.56^{a}$	$-3.13{\pm}0.36^{a}$	2.47±0.18°	-9.19±0.37 <sup>b</sup>			

	表 1	不同凝固剂诱导 SPI 溶液 Zeta 电位的变化
Table 1	Changes of	zeta potential of SPI solution induced by different coagulant

注:不同小写字母表示不同凝固剂制得的豆腐之间Zeta的显著性差异(P<0.05)。

# 表 2 不同凝固剂诱导 SPI 溶液蛋白质二级结构比例的变化(%)

		Table 2	Changes	of secondary	structure	percent o	f SPI indu	iced by diffe	rent coagu	lants (%)		
时间(min) -	MgCl <sub>2</sub>			CaSO <sub>4</sub>			乳酸					
	<i>α</i> -螺旋	β-折叠	β-转角	无规卷曲	<i>α</i> -螺旋	β-折叠	β-转角	无规卷曲	<i>α</i> -螺旋	β-折叠	β-转角	无规卷曲
0	10.5	40.8	0	48.7	9.5	35.6	0	54.9	0	0	39.5	60.5
3	10.7	36.5	0	52.8	10.5	23.4	0	66.1	0	0	36.3	63.7
10	11.8	35.7	0	52.5	9.0	23.6	0	67.4	0	0	32.4	67.6
20	10.9	32.2	0	56.9	9.9	24.8	0	65.3	0	0	33.6	66.4
30	12.5	32.9	0	54.6	9.5	26.5	0	64.0	0	0	30.4	69.6
45	10.9	32.3	0	56.8	10.6	22.1	0	67.3	0	0	32.8	67.2
时间(min)	醋酸			GDL			酸浆					
	α-螺旋	β-折叠	β-转角	无规卷曲	α-螺旋	$\beta$ -折叠	β-转角	无规卷曲	α-螺旋	$\beta$ -折叠	β-转角	无规卷曲
0	0	0	0.3	99.7	24.9	0	0	75.1	7.7	0	5.3	87.0
3	0	0	0	100.0	19.1	0	0	80.9	7.9	0	5.9	86.2
10	0	0	0.2	99.8	12.9	0	0	87.1	8.2	0	6.0	85.8
20	0	0	0	100.0	5.8	0	0	94.2	7.9	0	5.9	86.2
30	0	0	0	100.0	0	0	0	100.0	8.0	0	5.3	86.7
45	0	0	0	100.0	0	0	0	100.0	8.2	0	5.8	86.0
				• • • •	-			• • • • •	-			



Fig.4 Reaction scheme of different coagulants inducing SPI aggregation

叠,β-转角和无规卷曲比例的影响。与仅热处理的 SPI 二级结构(α-螺旋=26.4%, β-折叠=6.0%, β-转 角=5.4%, 无规卷曲=62.2%)相比, 加入盐类凝固剂 的 SPI 的 α-螺旋和 β-转角的比例降低, 而 β-折叠的 比例增加,这可能是因为盐类凝固剂可以通过改变氢 键位置将 α-螺旋和 β-转角转变成 β-折叠<sup>[27]</sup>。乳酸和 醋酸可以完全破坏 SPI 中 α-螺旋和 β-折叠, 加入醋 酸和 GDL 的 SPI 的  $\beta$ -转角的比例降低。特别地, 加 入 GDL 的 SPI 的 α-螺旋比例在 0~30 min 内从 24.9% 逐渐降低到 0,这可能与 GDL 在 SPI 溶液中缓慢释 放H<sup>+</sup>有关。添加酸浆的SPI的α-螺旋比例介于加 入乳酸和盐类凝固剂的 SPI 溶液之间, 而  $\beta$ -转角比 例介于加入乳酸和醋酸的 SPI 溶液之间, 这是因为 酸浆中主要的有机酸是乳酸和醋酸[28],此外还含有一 定量的盐离子,这些物质共同作用于蛋白质并表现出 与单一盐类凝固剂和酸类凝固剂不同的规律。

金属离子(如 Ca<sup>2+</sup>或 Mg<sup>2+</sup>)和 H<sup>+</sup>可以中和蛋白 质表面电荷,破坏蛋白质分子之间的静电作用和多肽 链上-CO 和-NH 之间氢键的稳定性,导致 SPI 的蛋 白质二级结构发生变化<sup>[29]</sup>,并降低 SPI 中 α-螺旋比例。

# 2.6 盐类凝固剂和酸类凝固剂对 SPI 结构变化的影响

7S 蛋白和 11S 蛋白是 SPI 中主要的蛋白成分, 分别呈现三聚体结构和六聚体结构。7S 蛋白和 11S 蛋白的变性温度分别在 65~75 ℃ 和 85~95 ℃<sup>[15]</sup>。 本文 SPI 溶液煮沸并在 85 ℃ 保温,7S 蛋白和 11S 蛋白完全变性,大豆蛋白亚基解离,稳定的球状结构 被打开,转变为伸展状态<sup>[30]</sup>(图 4),并在氢键、疏水作 用力和静电作用力等分子间作用力下形成可溶性聚 集体<sup>[31]</sup>。高温会破坏大豆蛋白质分子的三级结构但 对蛋白质的二级结构影响较小<sup>[32]</sup>。

盐类凝固剂(MgCl<sub>2</sub>、CaSO<sub>4</sub>)和酸类凝固剂(乳酸、醋酸、GDL 和酸浆)的加入会导致蛋白质疏水基

团和巯基暴露,蛋白质分子之间静电斥力降低,但随 着反应时间增加,蛋白质分子则会发生不同程度的疏 水聚集,且游离巯基氧化形成二硫键。在这些蛋白质 分子间作用力的共同作用下,大豆蛋白形成不溶性聚 集体。盐类凝固剂可以以"盐桥"的方式连接大豆蛋 白分子,将蛋白质二级结构的 α-螺旋和 β-转角转变 成 β-折叠。酸类凝固剂降低蛋白溶液的等电点,破 坏了蛋白质 β-转角,并诱导蛋白质发生聚集。

# 3 结论

在大豆蛋白凝胶形成过程中,盐类凝固剂和酸 类凝固剂均能降低 SPI 溶液的 pH,但加入盐类凝固 剂的 SPI 溶液的 pH 降幅小于酸类凝固剂。与仅热 处理的 SPI 溶液相比,加入凝固剂的 SPI 溶液表面 疏水作用力和游离 SH 含量增加,而 Zeta 电位降低; 但不同凝固剂对 SPI 蛋白质二级结构的影响具有一 定差异,盐类凝固剂会促使 SPI 的 α-螺旋和 β-转角 转变为 β-折叠,酸类凝固剂则会破坏 SPI 中 β-折 叠。本文可为研究复合凝固剂诱导大豆蛋白凝胶机 理提供一定的基础,并对比较不同凝固剂作用下的大 豆蛋白聚集和凝胶行为具有参考意义。

#### 参考文献

[1] 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: 1-2.

[2] Chang K L B, Lin Y S, Chen R H. The effect of chitosan on the gel properties of tofu (soybean curd)[J]. Journal of Food Engineering, 2003, 57(4): 315–319.

[3] Lee C H, Rha C. Microstructure of soybean aggregates and its relation to the physical and textural properties of the curd[J]. Journal of Food Science, 1978, 43(6): 79–84.

[4] Lu X, Lu Z, Yin L, et al. Effect of preheating temperature and calcium ions on the properties of cold-set soybean protein gel[J]. Food Research International, 2010, 43: 1673–1683.

[5] 王旭峰. CaSO<sub>4</sub> 诱导大豆分离蛋白乳状液凝胶性质影响因素的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2017: 4-5.

[6] 王宸之,陈宇,万重,等. 豆腐凝胶成型机理研究进展[J]. 东 北农业大学学报,2017,48(10):88-96.

[7] 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.

[8] Chen N, Zhao M, Sun W, et al. Effect of oxidation on the emulsifying properties of soy protein isolate[J]. Food research international, 2013, 52(1): 26–32.

[9] Shigeru H, Shuryo N. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins [J]. Journal of Food Science, 1985, 50: 486–491.

[10] Zhang M, Wang P, Zou M, et al. Microbial transglutaminasemodified protein network and its importance in enhancing the quality of high-fiber tofu with okara[J]. Food Chemistry, 2019, 289: 169–176.

[11] Liang X, Ma C, Yan X, et al. Structure, rheology and functionality of whey protein emulsion gels: Effects of double crosslinking with transglutaminase and calcium ions[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 102: 105569.

 [12] Cao F, Li X, Luo S, 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: 58–65.

[13] Liu Z, Chang S. Effect of soy milk characteristics and cooking conditions on coagulant requirements for making filled tofu[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(11): 3405–3411.

[14] Hsia S, Hsiao Y, Li W, et al. Aggregation of soy protein isoflavone complexes and gel formation induced by glucono-δ-lactone in soymilk[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 35718.

[15] 赵海波. 硫酸钙诱导热变性大豆蛋白凝胶的影响因素及应用研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2017: 1-6.

[16] Hu H, Li-Chen E C Y, Wan L, et al. The effect of high intensity ultrasonic pre-treatment on the properties of soybean protein isolate gel induced by calcium sulfate[J]. Food Hydro-colloids, 2013, 32(2): 303–311.

[17] Chen J, Sun Y. Modeling of the salt effects on hydrophobic adsorption equilibrium of protein[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 992(1-2): 29–40.

[18] Haskard C A, Li-Chen E C Y. Hydrophobicity of bovine serum albumin and ovalbumin determined using uncharged (PRODAN) and anionic (ANS-) fluorescent probes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(7): 2671-2677.

[19] Greene F C. Interactions of anionic and cationic fluorescent probes with proteins: The effect of charge[J]. Journal of Protein Chemistry, 1984, 3: 167–180.

[20] Zhao J, Dong F, Li Y, et al. Effect of freeze-thaw cycles on the emulsion activity and structural characteristics of soy protein isolate[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(2): 1607–1613.

[21] Kohyama K, Sano Y, Doi E. Rheological characteristics and gelation mechanism of tofu (Soybean Curd)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(10): 1808–1812.

[22] 李传运. 酶处理对大豆蛋白凝胶性的影响研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2019: 1-2.

[23] 左锋. 微压煮浆对豆乳蛋白粒子形成及其加工特性的影响 机制研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2016: 17-18.

[24] Ryan K N, Zhong Q, Foegeding E A. Use of whey protein soluble aggregates for thermal stability-a hypothesis paper[J]. Journal of Food Science, 2013, 78(8); R1105–1115.

[25] Akbari A, Wu J. Cruciferin nanoparticles: Preparation, characterization and their potential application in delivery of bioactive compounds [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 54: 107–118.

[26] Li C, Rui X, Zhang Y, et al. Production of tofu by lactic acid bacteria isolated from naturally fermented soy whey and evaluation of its quality[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 82: 227–234.

[27] 杨芳. 豆腐凝胶形成机理及水分状态与品质关系研究 [D]. 武汉:华中农业大学, 2009: 34-37.

[28] Qiao Z, Chen X, Cheng Y, 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.

[29] Liu R, Zhao S M, Xiong S B, et al. Role of secondary structures in the gelation of porcine myosin at different pH values[J]. Meat Science, 2008, 80(3): 632–639.

[30] 杨岚. 热处理强度对大豆蛋白凝胶性质的影响及机制初探 [D]. 无锡: 江南大学, 2018: 18-23.

[31] Utsumi S, Damodaran S, Kinsella J. Heat-induced interactions between soybean proteins: Preferential association of 11S basic subunits and. beta. subunits of 7S[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1984, 32(6): 1406-1412.

[32] HerreroA, Jiménez-Colmenero F, Carmona P. Elucidation of structural changes in soy protein isolate upon heating by Raman spectroscopy[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2009, 44: 711–717.