

不同凝固方式制备豆腐的特性分析

高越^{1,2}, 杨雪飞^{1,2}, 郑志^{1,2*}, 麻志刚³, 季一顺⁴

(1. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 合肥 230009; 2. 安徽省农产品精深加工重点实验室, 合肥 230009; 3. 金菜地食品股份有限公司, 马鞍山 243100; 4. 安徽省粮油产品质量监督检测站, 合肥 230031)

摘要: 目的 研究氯化镁(magnesium chlorid, $MgCl_2$)、葡萄糖酸内酯(glucono- δ -lactone, GDL)和谷氨酰胺转氨酶(transglutaminase, TG) 3种不同的凝固剂对豆腐质构特性、流变特性、微观结构等的影响。**方法** 以“皖豆 21551”大豆品种为原料, 分别添加 $MgCl_2$ 、GDL 和 TG, 测定凝胶化过程中 pH、豆腐凝胶强度、持水性(water holding capacity, WHC)、流变性质、水分分布、微观结构等指标。**结果** 3种凝固剂($MgCl_2$ 、GDL 和 TG)的最佳添加量分别是 0.20%、0.45%和 0.20%。 $MgCl_2$ 豆腐(T_{MgCl_2})具有最高的临界应变(γ_c)、储能模量(G')和损耗模量(G''), TG 促豆腐(T_{TG})处于中间值, GDL 豆腐(T_{GDL})最低。3种凝固剂都能导致豆乳蛋白分子的解折叠和重组, 并增加 β -折叠含量。低场核磁共振(low-field nuclear magnetic resonance, LF-NMR)结果显示豆腐样品中有 3 个峰, 分别代表结合水、固定水和自由水。 T_{MgCl_2} 凝胶强度最高[(62.0 \pm 0.66) g], 但网络结构粗糙; T_{GDL} 凝胶强度为 (20.8 \pm 1.33) g, 网络结构相对均匀; T_{TG} 具有较高的凝胶强度[(54.6 \pm 1.63) g], 均匀致密的网络结构。**结论** 3种凝固剂制备豆腐的特性不同, 可根据加工需要选择不同的凝固剂。

关键词: 皖豆 21551; 氯化镁; 葡萄糖酸内酯; 谷氨酰胺转氨酶; 豆腐; 凝胶性质

Characteristics analysis of tofu prepared by different solidification methods

GAO Yue^{1,2}, YANG Xue-Fei^{1,2}, ZHENG Zhi^{1,2*}, MA Zhi-Gang³, JI Yi-Shun⁴

(1. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; 2. Key Laboratory for Agricultural Products Processing of Anhui Province, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; 3. Golden Caidi Food Co., Ltd., Maanshan 243100, China; 4. Anhui Grain and Oil Products Quality Supervision and Testing Station, Hefei 230031, China)

ABSTRACT: Objective To study the effects of magnesium chloride ($MgCl_2$), glucono- δ -lactone (GDL) and transglutaminase (TG) on the texture, rheological properties and microstructure of tofu. **Methods** The soybean variety “Wandou 21551” was used as raw material, adding $MgCl_2$, GDL and TG to prepare tofu, respectively. The pH during the gelation process, gel strength, water holding capacity (WHC), rheological properties, water distribution and microstructure of Tofu were determined. **Results** The optimal addition of 3 kinds of coagulants ($MgCl_2$, GDL and TG) was 0.20%, 0.45% and 0.20%, respectively. T_{MgCl_2} had the highest critical strain (γ_c), storage modulus (G') and loss modulus (G''), T_{TG} was in the middle, and T_{GDL} was the lowest. The 3 kinds of coagulants could lead to the

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0400600)、安徽省重大科技计划项目(202103b06020009、202003b06020017、202003b06020020)、中央高校基础研究基金项目(PA2020GDSK0058)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0400600), the Key Scientific and Technological Project of Anhui Province of China (202103b06020009, 202003b06020017, 202003b06020020), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (PA2020GDSK0058)

*通信作者: 郑志, 博士, 教授, 主要研究方向为植物蛋白加工技术。E-mail: zhengzhi@hfut.edu.cn

*Corresponding author: ZHENG Zhi, Ph.D, Professor, School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, No.420, Feicui Road, Shushan District, Hefei 230009, China. E-mail: zhengzhi@hfut.edu.cn

unfolding and recombination of soy milk protein molecules and increase the β -sheet content. Low-field nuclear magnetic resonance (LF-NMR) results showed that there were 3 peaks in tofu samples, representing bound water, fixed water and free water. T_{MgCl_2} had the highest gel strength [(62.0±0.66) g], but the network structure was rough. T_{GDL} gel strength was (20.8±1.33) g, and the network structure was relatively uniform. T_{TG} had high gel strength [(54.6±1.63) g], and uniform and dense network structure. **Conclusion** The characteristics of 3 kinds of coagulants for tofu preparation are different, so different coagulants can be selected according to the needs of processing.

KEY WORDS: Wandou 21551; magnesium chloride; glucono- δ -lactone; transglutaminase; tofu; gel property

0 引言

作为中国重要粮食作物之一,大豆富含优质蛋白、脂肪和维生素等营养物质,是优质植物蛋白来源,其含有的大豆异黄酮、多肽、低聚糖等功能因子,具有抗癌、调节肠道菌群等生理活性。豆腐是一种大豆蛋白凝胶产品,通过在豆浆中添加凝固剂而形成,并进一步将水分子等包裹在凝胶网络结构当中^[1]。目前,已有报道揭示了豆腐凝胶凝固机制^[2]。在加热或其他条件下,豆浆中的大豆蛋白变性展开,原本隐藏在内部的游离巯基和一些疏水基团暴露出来,形成一种无规则状态,在二价阳离子(Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等)、 H^+ 等的作用下,相互聚集形成三维网状结构。不同凝固剂的凝固机理和凝固速度有所差别,因而制得的产品也有一定的区别^[3]。

豆腐制备过程中常用的凝固剂为氯化镁(magnesium chlorid, $MgCl_2$)、葡萄糖酸内酯(glucono- δ -lactone, GDL),近年来逐渐发展谷氨酰胺转氨酶(transglutaminase, TG)为豆腐的凝固剂,它通过催化谷氨酰胺残基中的酰胺基团和赖氨酸残基侧链上 ϵ -氨基之间形成异肽键从而促进蛋白质分子之间产生交联^[4]。已有研究曾报道过利用 TG 诱导形成豆腐,如刘张菊等^[5]在蛋白质溶液中添加木薯淀粉,在 TG 的作用下形成豆腐,发现该产品具有较好的硬度、弹性和咀嚼性;QIN 等^[6]将 TG 作为豆腐的凝固剂,得到了凝胶强度、持水性(water holding capacity, WHC)好、网络结构均匀致密的豆腐凝胶。一般说来, $MgCl_2$ 制得的豆腐得率低,硬度大,被称为“老豆腐”,而 GDL 制备的豆腐因质地较软有“嫩豆腐”之称。豆腐的老嫩并无好坏,不同人群喜好不同,选择不同,如有些人爱吃老豆腐,有些人更喜欢嫩的;且具有不同特性豆腐的适宜加工方式也各有不同,如有些适合做菜,有些适合凉拌,有些可能更适合作为生物活性物质的载体应用于医药行业。另外,目前的研究主要集中在凝固剂添加量、复合凝固剂的开发等加工工艺方面,忽略了不同凝固剂制备豆腐的特性及差异性。因此,需要对不同凝固剂制备豆腐的特性进行系统的分析,满足不同的加工需要和不同人群的需求,以期为豆腐生产过程中凝固剂的选择提供理论基础。本研究分别以 $MgCl_2$ 、GDL 和

TG 为凝固剂制备豆腐,通过对样品质构特性、流变特性、水分分布以及微观结构等的测定,对不同凝固剂制备的豆腐进行特性分析,为豆腐的生产加工和品质控制提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

皖豆 21551,食品级,由安徽省农业科学院作物研究所提供,于 2021 年种植并收获。

考马斯亮蓝 G250(纯度 99%,北京索莱宝科技有限公司);甘氨酸、氢氧化钠、盐酸、氯化钠、 β -巯基乙醇、磷酸盐缓冲溶液、 $MgCl_2$ 、GDL(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);1-苯胺基-8-萘磺酸盐(8-anilino-naphthalene 1-sulphonate, ANS)(纯度 97%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);TG(1000 U/g,江苏一鸣生物股份有限公司)。

1.2 仪器与设备

IKA MS3 漩涡混合器(德国 IKA 公司);GR22GII 高速冷冻离心机(日本 HITACHI 公司);TA-XTplus 质构仪(英国 Stable Micro System 公司);Nicolet 6700 傅里叶红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司);DHR-3 流变仪(美国 TA 仪器公司);NMI20-015V-I 核磁共振成像分析仪(上海纽迈电子科技有限公司);Gemini 500 热场扫描电子显微镜(德国 Carl Zeiss 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 豆腐的制备

称取 300 g 无虫蛀、霉变大豆,清洗后用 1:3 ($m:V$)的水浸泡过夜(12 h)。以 1:8 ($m:V$)的磨浆比磨浆 2 min,再用 100 目滤布过滤以除尽豆渣获得生豆浆,将生豆浆冷冻干燥得到生豆浆粉原料。

$MgCl_2$ 豆腐的制备:生豆浆粉溶解到蒸馏水中,获得 100 mL 蛋白浓度为 8% ($m:V$)的生豆浆,生豆浆水浴加热处理,冷却后加入一定的 $MgCl_2$,搅拌 5 min 使其充分溶解后在 85°C 水浴保温 30 min,后破脑压制。样品命名为 T_{MgCl_2} ,在 4°C 冰箱保存过夜后进行后续的测定。

GDL 豆腐的制备: 生豆浆粉溶解到蒸馏水中, 获得 100 mL 蛋白浓度为 8% ($m:V$) 的生豆浆, 生豆浆水浴加热处理, 冷却后加入一定的 GDL, 搅拌 5 min 使其充分溶解后在 85°C 水浴保温 30 min, 冰水浴冷却。样品命名为 T_{GDL} , 在 4°C 冰箱保存过夜后进行后续的测定。

TG 促豆腐的制备: 生豆浆粉溶解到蒸馏水中, 获得 100 mL 蛋白浓度为 8% ($m:V$) 的生豆浆, 生豆浆水浴加热处理, 冷却后加入一定的 TG, 先 45°C 水浴孵育 30 min 后 90°C 处理 10 min 以灭酶, 冰水浴冷却。样品命名为 T_{TG} , 在 4°C 冰箱保存过夜后进行后续的测定。

1.3.2 豆浆游离巯基的测定

根据 ZHAO 等^[7]报道的方法, 分别配制 Ellman 试剂和 Tris-Gly 缓冲液以测定样品游离巯基 (free sulfhydryl group, -SH) 含量。称取 0.02 g 冻干豆浆粉, 分散在 Tris-Gly 缓冲液中, 在 25°C 下搅拌 30 min, 8000 r/min、25°C 条件下离心 20 min 后取上清液与 Ellman 试剂混合 (3 mL+0.03 mL) 并置于黑暗处反应 15 min, 测定样品在 412 nm 处的吸光度, 同时, 根据考马斯亮蓝法测定样品的蛋白质浓度。-SH 含量的计算公式如式(1):

$$-\text{SH} = \frac{10^6}{1.36 \times 10^4} \times D \times A_{412} / C \quad (1)$$

式中, -SH 为样品中游离巯基含量 ($\mu\text{mol/g}$ 蛋白); 1.36×10^4 为 DTNB 的摩尔消光系数; D 为稀释倍数 1.01; A_{412} 为样品在 412 nm 处的吸光度; C 为样品的最终蛋白质量浓度 (mg/mL)。

1.3.3 豆浆表面疏水性的测定

根据 FANG 等^[8]的方法, 使用荧光探针 ANS 测定样品的表面疏水性 (surface hydrophobicity, H_0)。用磷酸盐缓冲液 (pH 7.0、0.01 mol/L) 稀释样品, 得到 0.25% ($m:V$) 豆浆溶液。25°C 搅拌 30 min、离心 (10000 r/min、4°C、20 min) 后取上清液, 并分别将上清液稀释 100、50、25 和 10 倍即为待测液。用相同的磷酸盐缓冲液配制 ANS 原液 (8 mmol/L), 取 3 mL 待测液, 分别加入 60 μL ANS 原液, 混匀静置 15 min 后在 25°C、390 nm (激发波长) 和 484 nm (发射波长) 条件下测量荧光强度 (fluorescence intensity, FI), 并利用考马斯亮蓝法测定待测液蛋白浓度。 H_0 被定义为 FI 值相对于蛋白质浓度的图的初始斜率。

1.3.4 pH 的测定

先对 pH 计进行校准, 然后直接使用 pH 计进行测定, 记下读数。

1.3.5 质构特性、凝胶强度的测定

参考 ZHAO 等^[9]的方法, 质构特性分析 (texture profile analysis, TPA) 由质构仪直接测定, 该分析仪配备 P/36 探头和 P/5 探头。取豆腐中心样品, 将其切成大小 20 mm \times 20 mm 的方块, 直接用 P/36 探头进行 TPA 实验。压缩测试模式设置如下: 预测试速度 1.00 mm/s、实验速度 5.00 mm/s、测

试后速度 5.00 mm/s、触发力 5 g。根据姜永鹏等^[10]的方法测定凝胶强度, 利用 P/5 探头进行样品凝胶强度的测定, 并将用于穿刺的最大力记录为凝胶强度。探头以 5.0 mm/s 的恒定速度穿透样品至最大目标深度 5 mm, 并记录最大力。

1.3.6 持水性的测定

持水性 (water holding capacity, WHC) 的测定参考 XU 等^[11]的方法并稍作修改。取 0.5 g 豆腐样品, 置于离心机中, 4°C, 10000 r/min 离心 10 min。除去水, 称量剩余样品。WHC 按照式(2)计算:

$$\text{WHC} = \frac{W_2}{W_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中, W_1 为原始凝胶中水的总重量 (g), W_2 为离心后样品中残留水的重量 (g)。

1.3.7 傅里叶红外光谱分析

根据 ZHANG 等^[12]的方法, 利用 KBr 压片法, 先进行背景扫描, 再进行样品扫描, 在 4000~400 cm^{-1} 波段进行 32 次扫描。得到红外光谱图后, 根据 1600~1700 cm^{-1} 波段的谱图, 通过软件进行拟合, 计算二级结构百分比。

1.3.8 流变特性

根据 WANG 等^[13]的方法, 在 25°C 进行应变扫描, 恒定频率为 1 Hz, 应力从 0.01% 逐渐增加到 100%。确定临界应变值 (γ_c) 后, 进行频率扫描 (0.1~10 Hz)。

1.3.9 低场核磁共振

根据 ULLAH 等^[14]的方法, 低场核磁共振 (low-field nuclear magnetic resonance, LF-NMR) 主要用来测定凝胶样品的 T_2 弛豫时间和水分子状态, 并利用核磁成像系统直观地显示凝胶中水分子的分布状况。 T_2 采用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 序列测定。参数设置如下: 谐振频率 18 MHz、谱宽 200 kHz、回波时间 0.2 ms、等待时间 5000 ms、射频延时时间 0.08 ms。收集 15000 次回波和 8 次扫描重复的数据进行后续的分析。

1.3.10 豆腐凝胶的外观和热场扫描电子显微镜分析

参考 QIN 等^[15]的方法, 进行豆腐凝胶样品的扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察。将样品切成小块, 冻干后表面喷金, 随后观察。样品的放大倍数为 200。

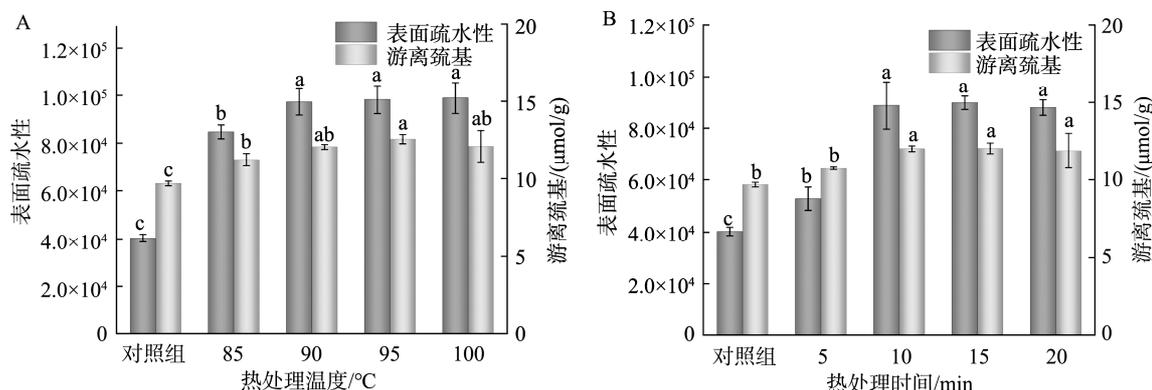
1.4 数据处理与分析

每组实验做 3 组平行, 结果均以平均值 \pm 标准偏差表示, 数据通过 Excel 2016 和 SPSS 22 软件分析, 并利用 Origin 2021 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 热处理温度和时间的优化

热处理是食品加工的基本方法, 它可以使蛋白发生一定程度的变性^[16]。图 1A 显示了豆浆-SH 和 H_0 随热处理



注: 不同小写字母分别表示各组间存在显著性差异($P < 0.05$), 下同。

图 1 热处理温度(A)和时间(B)对豆浆游离巯基和表面疏水性的影响

Fig.1 Effects of heat treatment temperature (A) and time (B) on free sulfhydryl group and surface hydrophobicity of soybean milk

温度的变化, 结果表明, 对照组-SH 和 H_0 最低, 随热处理温度增加到 95°C, 豆浆-SH 和 H_0 逐渐增加。随着热处理温度的升高, 豆乳蛋白热变性加剧, 分子逐渐展开, 隐藏在球形结构内部的游离巯基和疏水基团暴露在表面, 从而引起-SH 和 H_0 的增加。陶汝青等^[17]曾研究热处理温度对大豆分离蛋白结构的影响, 结果发现在一定限度内, 热处理能够使大豆分离蛋白分子解离, -SH 及 H_0 均增加, 这与本研究的结果相似。豆浆体系中的蛋白质可以根据沉降系数分为 4 类: 2S、7S、11S 和 15S, 其中, 7S 和 11S 是含量最多的亚基。NIU 等^[18]研究发现 7S 变性温度约为 65~70°C, 11S 的变性则发生在 92°C 左右。在本研究中, 当温度升高到 95°C 时, 豆乳蛋白几乎完全变性, 结构基本展开, 此时-SH 和 H_0 均较大, 而继续升高温度至 100°C, 两者不再发生显著性增加($P > 0.05$)。图 1B 中结果显示, 当热处理时间为 10 min 时, -SH 和 H_0 达到较大值, 继续增加热处理时间, 两者不再出现显著性增加($P > 0.05$), 可以认为蛋白结构完全展开。因此, 最佳热处理温度和时间分别为 95°C 和 10 min。

2.2 MgCl₂、GDL 和 TG 添加量的优化

TPA 用于评估食品的质构特性^[19]。MgCl₂、GDL 和 TG 作为豆腐的凝固剂, 其添加量显著影响豆腐样品的质构特性^[20]。因此, 先进行单因素实验, 并以 TPA 参数为评价指标, 确定 MgCl₂、GDL 和 TG 的最佳添加量。

2.2.1 MgCl₂ 添加量的确定

由表 1 可以看出, MgCl₂ 添加量显著影响豆腐的硬度 ($P < 0.05$), 而对豆腐的弹性没有显著性的影响 ($P > 0.05$)。MgCl₂ 的加入使得蛋白质凝固速度加快, 瞬间形成的豆腐粗糙而老硬、保水性差, 这与陶康等^[21]的结果一致。当 MgCl₂ 添加量为 0.10%~0.20% 时, 随 MgCl₂ 含量的增加, 在盐桥作用下, 豆腐样品的硬度值呈现显著性增加的趋势 ($P < 0.05$), 当 MgCl₂ 的添加量从 0.20% 继续增加至 0.25% 时, 豆腐样品的硬度值并未出现显著性增加 ($P > 0.05$), 之

后到 0.30% 时开始降低, 因此, 确定 MgCl₂ 的最佳添加量为 0.20%。

表 1 MgCl₂ 添加量对豆腐 TPA 的影响
Table 1 Effects of MgCl₂ addition on TPA of tofu

| MgCl ₂ 添加量/% | 硬度/g | 弹性/mm | 黏附性 | 回复力 |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0.10 | 198.68±18.69 ^d | 0.965±0.007 ^a | 0.824±0.016 ^b | 0.424±0.006 ^b |
| 0.15 | 325.71±27.95 ^c | 1.022±0.063 ^a | 0.844±0.008 ^{ab} | 0.447±0.007 ^{ab} |
| 0.20 | 570.52±31.80 ^a | 0.996±0.004 ^a | 0.858±0.004 ^{ab} | 0.464±0.006 ^a |
| 0.25 | 590.23±24.52 ^a | 0.989±0.002 ^a | 0.864±0.007 ^a | 0.465±0.008 ^a |
| 0.30 | 505.80±9.51 ^b | 0.988±0.010 ^a | 0.843±0.031 ^{ab} | 0.434±0.028 ^b |

注: 同列不同小写字母表示各组间存在显著性差异($P < 0.05$), 下同。

2.2.2 GDL 添加量的确定

表 2 显示 GDL 添加量对豆腐硬度、弹性、回复力等质构参数的影响。GDL 通过降低豆浆的 pH, 使之靠近蛋白的等电点发生絮凝, 从而进一步使蛋白质凝固, 由表 2 可知, 在 GDL 添加量为 0.30%~0.45% 范围内时, 随 GDL 添加量的增加, 豆腐样品的硬度、弹性等逐渐增加, 但当 GDL 含量较高时, 从 0.45% 增加到 0.50%, 豆腐的硬度、弹性等开始降低, RUI 等^[22]的结果也显示, GDL 含量对豆腐硬度等的增加是有限度的, 即在高浓度 GDL 条件下, 豆腐的硬度并不会持续性增加。最终, 确定 GDL 最佳添加量为 0.45%。

表 2 GDL 添加量对豆腐 TPA 的影响
Table 2 Effects of GDL addition on TPA of tofu

| GDL 添加量/% | 硬度/g | 弹性/mm | 黏附性 | 回复力 |
|-----------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0.30 | 66.23±3.25 ^c | 0.814±0.002 ^d | 0.306±0.010 ^d | 0.167±0.005 ^d |
| 0.35 | 72.78±2.58 ^b | 0.848±0.004 ^c | 0.375±0.019 ^c | 0.206±0.016 ^c |
| 0.40 | 93.04±2.64 ^a | 0.903±0.011 ^b | 0.564±0.012 ^b | 0.309±0.018 ^b |
| 0.45 | 97.48±1.30 ^a | 0.930±0.006 ^a | 0.681±0.010 ^a | 0.368±0.017 ^a |
| 0.50 | 73.21±3.44 ^b | 0.827±0.022 ^{cd} | 0.304±0.016 ^d | 0.126±0.010 ^e |

2.2.3 TG 添加量的确定

TG 添加量对豆腐 TPA 的影响结果如表 3 所示, 当 TG 添加量为 0.10%~0.20% 时, 随 TG 含量的增加, 豆腐样品的硬度、弹性出现显著性增加 ($P < 0.05$), 而 TG 含量超过 0.20% 后, 继续增加 TG, 硬度、弹性未发生显著性增加 ($P > 0.05$)。GUO 等^[23]也报道了相似的结果, 即高浓度的 TG 并不能继续改善花生豆腐凝胶的质构特性。由于 TG 的交联位点是谷氨酰胺的酰胺基团与赖氨酸的氨基, 在蛋白浓度一定的情况下, 酰胺基团与氨基的数量也是确定的, TG 使这两种基团的交联饱和后, 即使继续增加 TG 的添加量, 在底物缺乏的条件下, 两种基团不会进一步产生交联, 因此, TG 不能无限度提高蛋白的凝胶性。最终, 确定 TG 最佳添加量为 0.20%。

表 3 TG 添加量对豆腐 TPA 的影响
Table 3 Effects of TG addition on TPA of tofu

| TG 添加量 /% | 硬度/g | 弹性/mm | 黏附性 | 回复力 |
|-----------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0.10 | 87.24±4.00 ^c | 0.919±0.004 ^c | 0.912±0.014 ^d | 0.660±0.007 ^c |
| 0.15 | 101.79±3.15 ^b | 0.970±0.007 ^b | 0.960±0.025 ^{bc} | 0.691±0.005 ^{bc} |
| 0.20 | 117.99±3.30 ^a | 1.037±0.033 ^a | 0.988±0.005 ^{ab} | 0.724±0.011 ^{ab} |
| 0.25 | 116.87±1.69 ^a | 1.039±0.016 ^a | 0.996±0.011 ^a | 0.732±0.036 ^a |
| 0.30 | 118.79±6.00 ^a | 1.033±0.021 ^a | 0.941±0.048 ^c | 0.707±0.008 ^{ab} |

2.3 不同凝固剂对凝胶化过程中 pH 的影响

根据图 2 可知, 在 3 种凝固剂诱导豆腐形成过程中, 添加 GDL 的豆浆最终 pH 最低, 为 5.62±0.03。由于 GDL 带有 H⁺, 在溶液中呈酸性, 通过在蛋白质溶液中不断缓慢的释放质子, 它可以降低体系的 pH, 使其接近蛋白质的等电点, 从而使蛋白产生絮凝。添加 MgCl₂ 诱导豆腐形成过程中, 豆浆体系 pH 在 10 min 左右达到终值, 随后大体上保持不变, 最终 pH 为 5.86±0.03。其中, 0~5 min 体系 pH

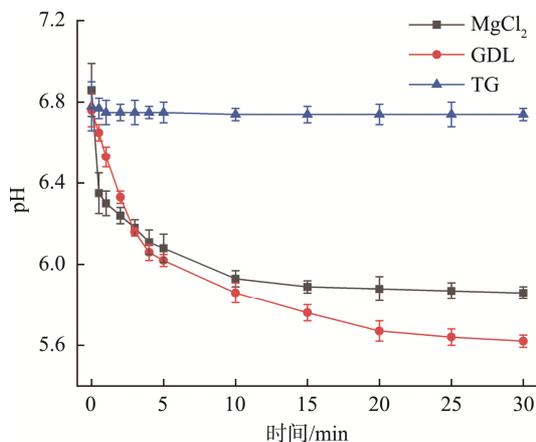


图 2 添加不同凝固剂后豆浆体系中 pH 变化曲线
Fig.2 pH change curve of soybean milk system after adding different coagulants

快速降低, 而 5~10 min 时, pH 降低速度变慢。离子桥的形成与盐离子和 H⁺的反离子交换有关, 从而导致 pH 下降^[24]。但其 pH 降幅小于酸类凝固剂, 这说明 pH 的降低并不是盐离子导致蛋白凝固的唯一原因, 静电斥力的减弱和盐桥的形成也是蛋白凝固的原因, 戴意强等^[25]也曾报道过相似的结果。Mg²⁺是二价阳离子, 而 H⁺只带有一个单位的正电荷, 因此豆浆在添加 MgCl₂ 后, 短时间内体系 pH 快速降低, 而添加 GDL 组豆浆 pH 降低较为缓慢。由于 TG 以肽链上谷氨酰胺残基上的酰胺基为酰基供体, 通过催化与酰基受体间的酰基转移反应, 使蛋白质发生交联, 因此不会对体系的 pH 产生影响。

2.4 不同凝固剂对豆腐凝胶强度和 WHC 的影响

凝胶强度和 WHC 是评价食品凝胶性质的重要因素^[26]。如图 3 所示, 由于压制过程去除大部分的水分, T_{MgCl₂} 凝胶强度最高, 为 (62.0±0.66) g, T_{TG} 次之, 为 (54.6±1.63) g, T_{GDL} 最低, 只有 (20.8±1.33) g。Mg²⁺带 2 个单位正电荷, 加入豆浆溶液中后, 局部快速凝固导致网络结构不均匀, 因此它的 WHC 并不是最好的。由于 T_{TG} 凝胶网络呈现蜂窝状的均匀致密结构(图 7), 其表现出较高的凝胶强度和最好的 WHC。

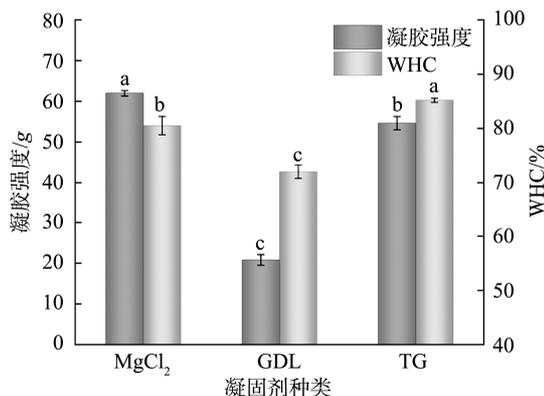


图 3 不同凝固剂制备豆腐的凝胶强度和 WHC
Fig.3 Gel strength and WHC of tofu prepared by different coagulants

2.5 不同凝固剂对傅里叶红外光谱及蛋白二级结构的影响

傅里叶红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)主要用来分析蛋白质的二级结构^[27]。不同凝固剂制备豆腐的 FT-IR 图(4000~400 cm⁻¹)如图 4 所示。酰胺 I 带光谱(1600~1700 cm⁻¹)主要源于蛋白结构中 C=O 键的弯曲振荡。

根据 FT-IR 图, 确定各样品的二级结构, 如表 4 所示。添加不同凝固剂都能使豆乳蛋白分子发生解折叠和重组, 从而导致豆乳蛋白的二级结构发生显著变化, 特别是增加 β -折叠结构, 另外, 从 T_{GDL} 到 T_{MgCl₂} 再到 T_{TG}, α -螺旋含量显

著性降低, 而 β -折叠含量显著性增加($P<0.05$)。其中, T_{TG} 样品 β -折叠含量最多, 为 $(35.36\pm 0.36)\%$, 而 T_{GDL} 样品 β -折叠含量最少, 只有 $(28.19\pm 0.55)\%$ 。由于 β -折叠的特殊结构, 它可以将疏水基团隐藏在内部, 水化作用更强, 因此 T_{TG} 样品 WHC 最好, 这与图 3 豆腐样品中 WHC 的变化是一致的。

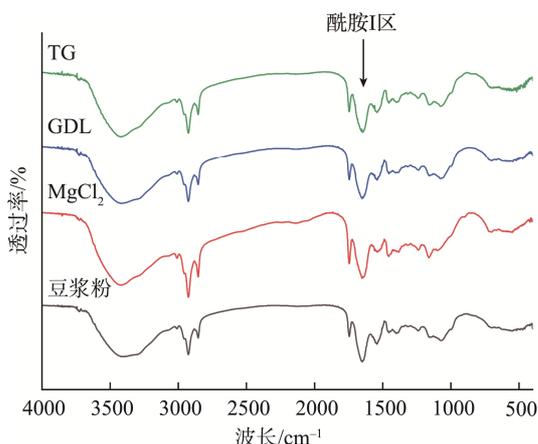


图 4 不同凝固剂制备豆腐的 FT-IR 图

Fig.4 FT-IR diagram of tofu prepared by different coagulants

表 4 不同凝固剂制备豆腐中豆乳蛋白的二级结构分析
Table 4 Secondary structure analysis of soybean milk protein in Tofu prepared by different coagulants

| 凝固剂 | α -螺旋/% | β -折叠/% | β -转角/% | 无规则卷曲/% |
|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 豆浆粉 | 13.46 ± 0.26^a | 25.61 ± 0.42^d | 34.60 ± 0.49^a | 26.33 ± 0.54^a |
| $MgCl_2$ | 11.77 ± 0.19^c | 33.50 ± 0.52^b | 29.88 ± 0.24^b | 24.85 ± 0.33^b |
| GDL | 12.75 ± 0.14^b | 28.19 ± 0.55^c | 33.90 ± 0.69^a | 25.16 ± 0.10^b |
| TG | 11.24 ± 0.17^d | 35.36 ± 0.36^a | 29.42 ± 0.40^b | 23.98 ± 0.29^c |

2.6 流变特性分析

图 5A 为样品的应变扫描曲线, 所有样品表现出相似的行为。在比较小的应变下(应变值位于 0.01% ~ 5.00% 范围内), 可以认为储能模量(G')与应变无关, 表现出一定的线

性黏弹性行为。而在大应变条件下(应变值超过 5.00%), 随应变的增加, G' 降低。根据 ZHAO 等^[28]的方法, G' 迅速降低时, 其对应的应变值被称为 γ_c 。 T_{MgCl_2} 、 T_{GDL} 和 T_{TG} 的 γ_c 分别为 11% 、 5% 和 10% , 说明在这 3 种凝胶中, T_{MgCl_2} 的凝胶结构最难发生弹性变形, 也最不容易被破坏, T_{TG} 次之, 而 T_{GDL} 最容易被破坏, 这与图 3 中凝胶强度的结果一致。不同凝固剂制备豆腐的频率扫描曲线如图 5B 所示, 在测试范围内, 所有豆腐样品的 G' 、损耗模量(G'')能够在一定程度上保持相对稳定, 且 $G'>G''$, 表明凝胶化行为已经发生。随频率的增加, 所有样品的 G' 、 G'' 略微增加, 表现出一定的频率依赖性。YANG 等^[29]利用 Ca^{2+} 诱导藜麦蛋白凝胶的报道中均发现类似的结果, 这被认为是凝胶的典型特征。而在所有样品中, T_{MgCl_2} 的 G' 、 G'' 均最高, T_{TG} 处于中间值, T_{GDL} 最低, 这可能是由于盐桥作用更容易形成凝胶。

2.7 低场核磁分析

LF-NMR 主要用来分析凝胶当中的水分分布情况, 它可以通过分析 T_2 弛豫时间和相应峰面积来评估被凝胶网络结构固定的水分子, 并利用核磁成像系统以伪彩图的形式直观表现出来^[30]。如图 6A, 所有凝胶样品中显示出 3 个独立的峰(T_{21} 、 T_{22} 和 T_{23}), T_{21} 弛豫时间最短, 分布在 $0.1\sim 10$ ms 之间, 这部分水分被认为是与食品中其他大分子物质紧密结合或者存在于组织结构中的结合水, T_{22} 被认为是固定在凝胶网络结构中的固定水, 其主要分布在 $10\sim 300$ ms 内, 而弛豫时间最长的 T_{23} (1000 ms 以外), 代表着分布在组织间隙的自由水。其中, 占比最多的是固定水, 这表明大部分水分已经被固定在凝胶网络结构中。图 6B 为样品的伪彩图, 红、黄、蓝 3 种颜色分别代表水分含量的高、中、低 3 种状态, 即右侧刻度对应数值越大, 水分含量越高, 可以发现, T_{MgCl_2} 中红色分布区域较少, 分布也较为不规则, 这主要是因为制备中存在压制过程, 大部分游离的水分被去除, 而在 T_{TG} 样品中, 红色区域的均匀分布表明水分在豆腐中的分布也是均匀的。

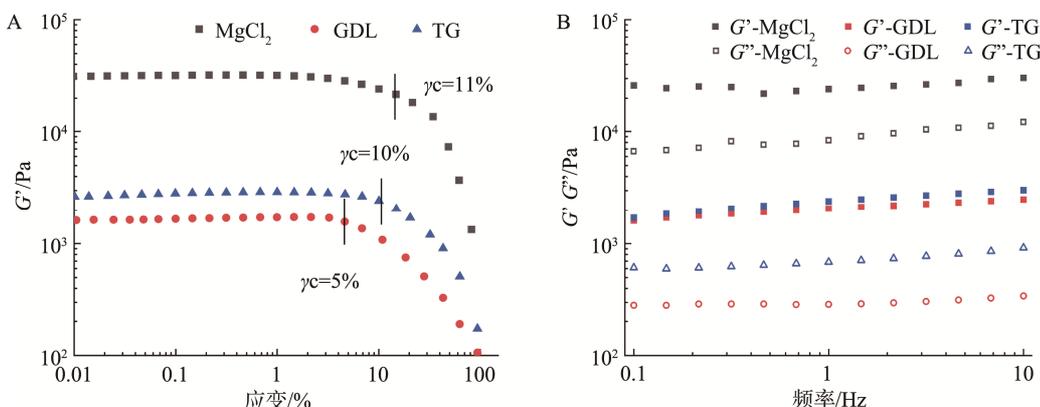


图 5 不同凝固剂制备豆腐的应变扫描曲线(A)和频率扫描曲线(B)

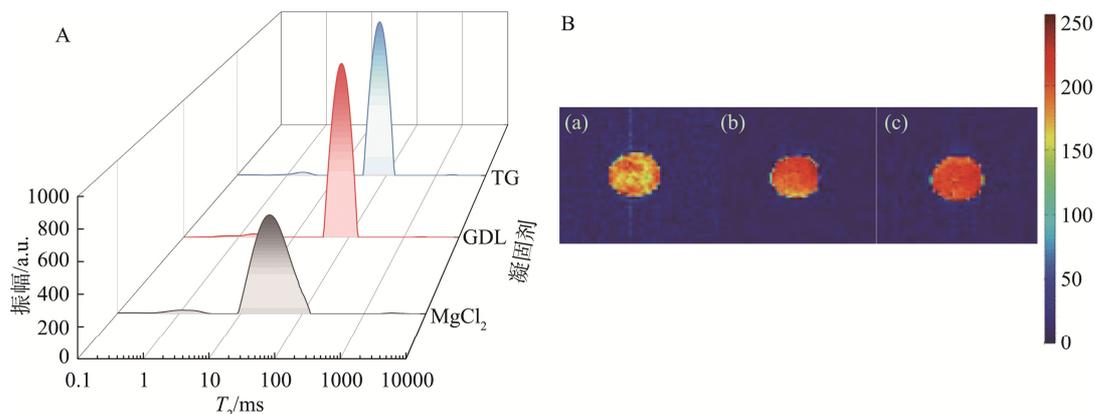
Fig.5 Strain scanning curves (A) and frequency scanning curves (B) of tofu prepared by different coagulants

表 5 显示了不同样品中 3 种水分的 T_2 弛豫时间及相应峰面积, T_{21} 主要与羧基、羟基等基团的化学交换有关, 对 WHC 和物理性质影响不大, 因而本研究不作进一步的讨论。对于 3 种凝固剂制备的豆腐而言, 其 T_{22} 和 T_{23} 及相应的峰面积都是有变化的, 特别是在 T_{TG} 中 PT_{22} 最高, PT_{23} 最低, 这表示该凝胶网络结构能够固定的水分子最多, 而自由流动的水分子最少, 这与图 3 中 WHC 的改善是一致的。 T_{GDL} 样品中自由流动的水分子占比最多, PT_{23} 达到 $(0.16 \pm 0.01)\%$, 表明在该凝胶网络结构当中, 水的流动性相对较强, 在外力条件下容易流失, 因而其捕获水分子的

能力较差。

2.8 豆腐的外观和 SEM 分析

不同凝固剂下的外观和 SEM 图像如图 7 所示, 对于 T_{MgCl_2} 样品, 外观较为粗糙, SEM 图像也显示其孔径较大, 堆叠的片状结构和无序结构较多, 网络结构不均匀, 这与图 6B 伪彩图显示的结果一致。 T_{GDL} 样品外观相对较为光滑, 但表面有少量气孔, 微观结构孔径较小, 网络结构相对均匀, 而 T_{TG} 组表面最为光滑, 孔径最小, 三维网络结构最为均匀致密, 这也是其凝胶强度和 WHC 均较好的原因。



注: 图 B 中(a) $MgCl_2$; (b) GDL; (c) TG, 图 7 同。

图 6 不同凝固剂制备豆腐的 T_2 弛豫曲线(A)及伪彩图(B)

Fig.6 T_2 relaxation curves (A) and pseudo-color maps (B) of tofu prepared by different coagulants

表 5 不同凝固剂制备豆腐的 T_2 弛豫时间和相应峰面积

Table 5 T_2 relaxation times and corresponding peak areas of tofu prepared by different coagulants

| 凝固剂 | T_{21}/ms | $PT_{21}/\%$ | T_{22}/ms | $PT_{22}/\%$ | T_{23}/ms | $PT_{23}/\%$ |
|----------|-------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|
| $MgCl_2$ | 1.40 ± 0.03^b | 3.12 ± 0.06^b | 50.90 ± 0.32^b | 96.74 ± 0.11^{ab} | 1244.57 ± 173.07^a | 0.14 ± 0.02^b |
| GDL | 2.05 ± 0.05^a | 3.47 ± 0.08^a | 53.23 ± 0.44^a | 96.37 ± 0.16^c | 1981.22 ± 4.72^b | 0.16 ± 0.01^a |
| TG | 1.13 ± 0.03^b | 2.82 ± 0.05^c | 50.19 ± 0.09^{bc} | 97.06 ± 0.22^a | 556.45 ± 3.24^c | 0.12 ± 0.01^c |

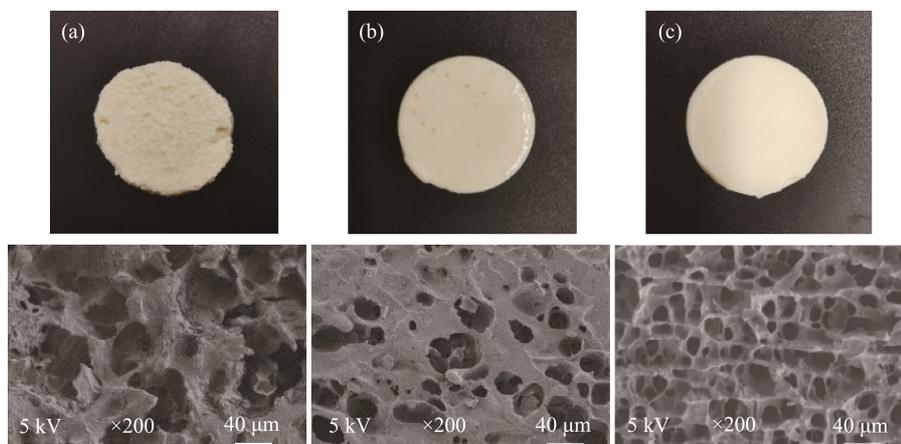


图 7 不同凝固剂制备豆腐凝胶的外观和 SEM 图像

Fig.7 Appearance and SEM image of tofu prepared by different coagulants

3 结 论

3 种凝固剂(MgCl_2 、GDL 和 TG)的最佳添加量分别是 0.20%、0.45% 和 0.20%, 它们都能导致豆乳蛋白分子的解折叠和重组, 增加 β -折叠含量。 T_{MgCl_2} 具有最高的 γc 、 G' 和 G'' , T_{TG} 处于中间值, T_{GDL} 最低。另外, T_{MgCl_2} 凝胶强度最高, 水分含量较少, 网络结构粗糙, 孔隙较大, 容易入味, 比较适合用来做菜; T_{GDL} 质地较软, 口感更嫩, 网络结构相对较为均匀, 适合凉拌; T_{TG} 凝胶强度较高, WHC 好, 网络结构最为均匀致密, 更适合作为一些生物活性的载体, 应用于医药、保健品行业。 MgCl_2 、GDL 和 TG 所制备豆腐的特性不同, 可根据不同加工需要选择不同的凝固剂。

参考文献

- [1] 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 YQ, ZHOU JZ, LIU XL, *et al.* Effects of different coagulants on quality characteristics and flavor components of tofu [J]. Food Ind Sci Technol, 2021, 42(15): 17–26.
- [2] ANDREWS JM, ROBERTS CJ. A lumry-eyring nucleated polymerization model of protein aggregation kinetics: Aggregation with pre-equilibrated unfolding [J]. J Phys Chem B, 2007, 111(27): 7897–7913.
- [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 N, GAO YX, SUN YJ, *et al.* Research process of tofu coagulants [J]. Chin Cond, 2021, 46(3): 189–194.
- [4] ZHAO YY, ZHOU GH, ZHANG WG. Effects of regenerated cellulose fiber on the characteristics of myofibrillar protein gels [J]. Carbohydr Polym, 2019, 209: 276–281.
- [5] 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.
LIU ZJ, QIAO MW, SONG LJ, *et al.* Formulation of TG enzymatic solidified tofu [J]. J Henan Agric Univ, 2021, 55(4): 744–751.
- [6] QIN XS, LUO SZ, CAI J, *et al.* Transglutaminase-induced gelation properties of soy protein isolate and wheat gluten mixtures with high intensity ultrasonic pretreatment [J]. Ultrason Sonochem, 2016, 31: 590–597.
- [7] ZHAO CB, YIN HH, YAN JN, *et al.* Structure and acid-induced gelation properties of soy protein isolate-maltodextrin glycation conjugates with ultrasonic pretreatment [J]. Food Hydrocolloid, 2021, 112: 106278.
- [8] FANG LY, XIANG H, SUN-WATERHOUSE D, *et al.* Enhancing the usability of pea protein isolate in food applications through modifying its structural and sensory properties via deamidation by glutaminase [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(6): 1691–1697.
- [9] ZHAO J, WU JH, CHEN YN, *et al.* Gel properties of soy protein isolate modified by lipoxigenase-catalyzed linoleic acid oxidation and their influence on pepsin diffusion and *in vitro* gastric digestion [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(20): 5691–5698.
- [10] 姜永鹏, 刘娟, 朱颖, 等. 冷榨豆粉凝胶特性及其在千页豆腐制作中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(12): 3771–3779.
JIANG YP, LIU J, ZHU Y, *et al.* Properties of cold-pressing soybean meal gel and its application in the production of Chiba tofu [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(12): 3771–3779.
- [11] XU JJ, GUO SY, LI XJ, *et al.* Gel properties of transglutaminase-induced soy protein isolate-polyphenol complex: Influence of epigallocatechin-3-gallate [J]. J Sci Food Agric, 2021, 101(9): 3870–3879.
- [12] ZHANG XL, GAO H, WANG CY, *et al.* Characterization and comparison of the structure and antioxidant activity of glycosylated whey peptides from two pathways [J]. Food Chem, 2018, 257: 279–288.
- [13] WANG XF, YU MQ, WANG ZZ, *et al.* Modulation of soy protein isolate gel properties by a novel “two-step” gelation process: Effects of pre-aggregation with different divalent sulfates [J]. Food Chem, 2022, 394: 133515.
- [14] ULLAH I, HU Y, YOU J, *et al.* Influence of okara dietary fiber with varying particle sizes on gelling properties, water state and microstructure of tofu gel [J]. Food Hydrocolloid, 2019, 89: 512–522.
- [15] QIN XS, CHEN SS, LI XJ, *et al.* Gelation properties of transglutaminase-induced soy protein isolate and wheat gluten mixture with ultrahigh pressure pretreatment [J]. Food Bioproc Technol, 2017, 10(5): 866–874.
- [16] 王冰, 杨杨, 范洪臣, 等. 热处理温度和离子强度对汉麻蛋白热聚集行为的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(16): 5337–5344.
WANG B, YANG Y, FAN HC, *et al.* Effects of heat treatment temperature and ionic strength on thermal aggregation behavior of hemp protein [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(16): 5337–5344.
- [17] 陶汝青, 夏宁, 滕建文. 热处理对大豆分离蛋白结构和凝胶性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(9): 60–66.
TAO RQ, XIA N, TENG JW. Effect of heat treatment on the secondary structure and gel property of soybean protein isolate [J]. Food Sci, 2018, 39(9): 60–66.
- [18] NIU HL, XIA XF, 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 Chem, 2018, 242: 188–195.
- [19] LEE EJ, HONG GP. Effect of the double heating cycle on the thermal gelling properties of vicilin fractions from soy, mung bean, red bean and their mixture with soy glycinin [J]. Food Hydrocolloid, 2023, 137: 108370.
- [20] 谢春平, 赵良忠, 周晓洁, 等. 响应面法优化全豆豆腐复配凝固剂工艺[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(10): 4034–4041.
XIE CP, ZHAO LZ, ZHOU XJ, *et al.* Optimization of whole soybean curd compound coagulant using response surface methodology [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(10): 4034–4041.
- [21] 陶康, 任凯, 于政鲜, 等. 凝固剂种类及添加量对豆腐质构的影响[J].

- 南昌大学学报(理科版), 2020, 44(3): 268–273.
- TAO K, REN K, YU ZX, *et al.* Effect of the type and amount of coagulant on texture of tofu [J]. *J Nanchang Univ (Nat Sci Ed)*, 2020, 44(3): 268–273.
- [22] RUI X, FU YT, ZHANG QQ, *et al.* A comparison study of bioaccessibility of soy protein gel induced by magnesiumchloride, glucono- δ -lactone and microbial transglutaminase [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2016, 71: 234–242.
- [23] GUO YL, 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-Food Sci Technol*, 2018, 96: 140–146.
- [24] CANABADY-ROCHELLE LS, SANCHEZ C, MELLEMA M, *et al.* Study of calcium–soy protein interactions by isothermal titration calorimetry and pH cycle [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(13): 5939–5947.
- [25] 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.
- DAI YQ, LIU XL, WU H, *et al.* Effects of different coagulants on intermolecular forces and secondary structure of soybean protein isolate [J]. *Food Ind Sci Technol*, 2021, 42(12): 89–94.
- [26] MU DD, LI HW, LI XJ, *et al.* Enhancing laccase-induced soybean protein isolates gel properties by microwave pretreatment [J]. *J Food Process Pres*, 2020, 44(4): 1–8.
- [27] FAN XJ, LI S, ZHANG A, *et al.* Mechanism of change of the physicochemical characteristics, gelation process, water state, and microstructure of okara tofu analogues induced by high-intensity ultrasound treatment [J]. *Food Hydrocolloid*, 2021, 111: 106241.
- [28] ZHAO H, CHEN J, HEMAR Y, *et al.* Improvement of the rheological and textural properties of calcium sulfate-induced soy protein isolate gels by the incorporation of different polysaccharides [J]. *Food Chem*, 2020, 310: 125983.
- [29] YANG Z, CAMPO L, GILBERT EP, *et al.* Effect of NaCl and CaCl₂ concentration on the rheological and structural characteristics of thermally-induced quinoa protein gels [J]. *Food Hydrocolloid*, 2022, 124: 107350.
- [30] PHUHONGSUNG P, ZHANG M, DEVAHASTIN S. Investigation on 3D printing ability of soybean protein isolate gels and correlations with their rheological and textural properties via LF-NMR spectroscopic characteristics [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 122: 109019.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介



高 越, 硕士研究生, 主要研究方向为植物蛋白加工。

E-mail: gy15551198501@163.com



郑 志, 博士, 教授, 主要研究方向为植物蛋白加工技术。

E-mail: zhengzhi@hfut.edu.cn