

## 发酵鸡蛋酱制曲菌种、原料配方及工艺参数优化

王泽琳<sup>1</sup>, 仝其根<sup>2\*</sup>, 吕莹<sup>3</sup>, 王宗义<sup>4</sup>, 郭慧园<sup>5</sup>

<sup>1</sup>北京农学院食品科学与工程学院 北京 102206

<sup>2</sup>食品质量与安全北京实验室 北京 102206

<sup>3</sup>食品安全生产与加工北京市工程研究中心 北京 102206

<sup>4</sup>农产品有害微生物及农残安全检测与控制北京市重点实验室 北京 102206

<sup>5</sup>中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083

**摘要** 以感官评价结果为依据,采用单因素实验初步确定发酵鸡蛋酱制曲菌种及原料配方。结果表明:当制曲菌种为米曲霉与酿酒酵母、蛋坯原料为 80%的全蛋液+20%的黑豆粉时,酱曲的风味最好,具有橄榄菜味及淡淡的咸蛋黄味。选择蒸坯时间、蛋坯中的水分含量、制曲时间 3 个因素为自变量,以蛋白酶活力为指标,利用响应面法优化的制曲工艺条件是:蒸坯时间 41 min、蛋坯中水分含量 66.1%、制曲时间 50 h,酱曲中蛋白酶的活力最高为 5 797 U/g。本研究结果为鸡蛋酱产品的开发提供可行的方案。

**关键词** 鸡蛋酱; 制曲; 米曲霉; 酿酒酵母; 蛋白酶活力; 感官评价

**文章编号** 1009-7848(2022)05-0200-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.05.022

我国禽蛋的消费以鲜蛋为主,传统加工蛋制品有皮蛋<sup>[1]</sup>、咸蛋<sup>[2]</sup>、卤蛋<sup>[3]</sup>、醉蛋<sup>[4-5]</sup>、包咸蛋<sup>[6]</sup>等。近年来专用蛋粉、专用液蛋<sup>[7]</sup>作为食品原辅料产量快速增加,而新型蛋制品如蛋品饮料<sup>[8-9]</sup>、鸡蛋腐乳<sup>[10]</sup>、臭蛋<sup>[11-13]</sup>还处于研发阶段。

酱类是我国人民日常调味食品,豆酱是主要的酱类之一。它是将黄豆、黑豆等材料经蒸煮等处理,使得原料中的部分蛋白质变性,然后利用多种微生物发酵分解其中的蛋白质和糖类,经一系列生物的、化学的变化而酿造出的半固体状调味品<sup>[14]</sup>。我国制酱的常用菌种可分为霉菌<sup>[15]</sup>、细菌<sup>[16]</sup>、酵母菌<sup>[17]</sup>及乳酸菌<sup>[18]</sup>4 大类。霉菌、细菌是在制曲阶段产生多种酶系,如淀粉酶<sup>[19]</sup>、蛋白酶<sup>[20-21]</sup>等,后期将原材料中的大分子物质蛋白质、淀粉等分解成小分子物质;酵母菌、乳酸菌则是将这些小分子物质转化为醇、酸、酯等,从而形成酱类特有风味<sup>[22]</sup>。

本文以全蛋液、面粉、黑豆等为主要原料,仿效黄豆酱的加工技术,经制坯、接种、制曲、发酵等

工艺研发一种新型半固体状的发酵蛋制品——鸡蛋酱。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

新鲜鸡蛋,北京德青源农业科技股份有限公司;黑豆,北京昌平区永旺超市;面粉,益海(石家庄)粮油工业有限公司;大豆分离蛋白,河南万邦实业有限公司。

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)沪酿 3.042、生香酵母(*Aroma-producing yeast*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),康源生物科技有限公司;腐乳曲(Fermented bean curd piece),安琪酵母股份有限公司;藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、五通桥毛霉(*Mucor wutungkiao*)、米根霉(*Rhizopus oryzae*)、鲁氏酵母(*Saccharomyces rouxii*),中国工业微生物菌种保藏管理中心;双歧杆菌(*Bifidobacterium*),北京川秀科技有限公司。

甲醛溶液(37%),天津市致远化学试剂有限公司;氢氧化钠,天津市华东试剂产;葡萄糖、酚酞,国药集团化学试剂有限公司;乙醇,北京东方博远科技发展有限公司;氯化钠,天津市风船化学试剂科技有限公司;酵母浸粉、蛋白胨、麦芽汁琼脂、营养琼脂、琼脂粉,北京奥博星生物技术有限

收稿日期: 2021-05-13

项目基金: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFDO400305)

作者简介: 王泽琳(1996—),女,硕士生

通信作者: 仝其根 E-mail:tongqigen@163.com

公司; 营养肉汤(不含糖)、马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)、麦芽浸粉肉汤(MEB), 北京陆桥技术股份有限公司; 丙三醇, 福晨(天津)化学试剂有限公司。

## 1.2 仪器与设备

Sh10A 水分快速测定仪, 上海民桥精密科学仪器有限公司; VD-650-U 洁净工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; LHS-50CL 恒温恒湿箱, 上海一恒学仪器有限公司; BPX-82 电热恒温培养箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; LDZM-80KCS 立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂。

## 1.3 方法

1.3.1 鸡蛋酱制作工艺及要点 参照黄豆酱、东北大酱<sup>[2]</sup>等酱制品的工艺流程和制作技术, 具体方法如下: 蛋液→搅拌→过滤→加“黑豆粉”或“熟面粉”→装模→蒸煮→冷却→接菌→制曲→加盐、水拌匀→保温发酵→后熟→灭菌→成品。

1) 过滤 将鸡蛋去壳, 搅拌均匀, 用 30 目的滤网过滤, 以滤去蛋壳碎片、鸡蛋系带、蛋壳膜、蛋黄膜及其它杂质。

2) 加“黑豆粉”或“熟面粉” “黑豆粉”是将清洗干净的黑豆用 6~7 倍体积的纯净水浸泡 8 h, 121 ℃、0.1 MPa 蒸煮 20 min, 再用大火翻炒 30 min, 打碎即可。“熟面粉”即经蒸煮或翻炒后的小麦粉。用大火翻炒面粉, 直至面粉变色, 并有麦香

味产生。蛋液中加入“黑豆粉”或“熟面粉”, 拌匀, 70 ℃水浴加热, 直至该混合液呈黏稠状。

3) 装模、蒸煮 将料液盛放于 4 cm×3 cm×1 cm 的模具中, 95 ℃蒸煮 30~60 min。

4) 冷却 冷却至 25 ℃左右, 无菌条件下将蛋坯切成 1 cm<sup>3</sup> 的小方块。

5) 接菌 将菌曲均匀地喷洒在蛋坯表面。接菌量为 0.05%, 霉菌或细菌与酵母菌或乳酸菌的质量比为 1:1。

6) 制曲 在温度为 28~30 ℃、空气湿度为 85%~90% 的条件下制曲 24~72 h。

7) 加盐、水 将成曲打碎, 按配比加入一定量的盐和水, 充分搅拌。最终产品中盐的含量为 12%, 水的含量为 40%。

8) 保温发酵 加入盐、水后装罐, 压实, 于 40 ℃的环境中通风发酵 20~25 d, 且每隔 24 h 搅拌一次酱坯。

9) 后熟 将发酵罐密封, 室温放置 3~5 d。

10) 杀菌 于 80~85 ℃的环境中杀菌 30 min 即可。

1.3.2 感官评定标准 选择 10 位食品相关专业的同学组成感官评价小组, 其中男女比例为 1:1, 且均经过感官评价技能培训。对发酵后酱曲的气味(详见表 1)、菌丝、孢子或菌落的生长状况(详见表 2 和 3)及鸡蛋酱成品的组织状态、香气、口感、滋味进行评分(详见表 4), 结果取平均值。

表 1 酱曲气味评分表

Table 1 Taste score of sauce koji

评价项目	评价标准	感官评分
气味(40分)	曲香味浓厚或有酱香味, 风味较好	32~40
	曲香味较浓或有微微酱香味, 无不良气味	24~31
	曲香味淡薄, 无不良气味	16~23
	酱曲有不良气味, 但在可接受范围内	8~15
	酱曲有不良气味, 且难以接受	0~7

表 2 菌丝生长状况评分表(毛霉、米根霉)

Table 2 Score table of mycelium growth (*Mucor*, *Rhizopus oryzae*)

评价项目	评价标准	感官评分
菌丝生长状况(60分)	菌丝色泽鲜亮, 生长旺盛	50~60
	菌丝色泽鲜亮, 菌丝略短	40~49
	菌丝颜色发灰, 生长旺盛	30~39
	菌丝颜色发灰, 菌丝略短	20~29
	菌丝色泽鲜亮或发灰, 菌丝极短	10~19
	菌丝不生长	0~9

表3 孢子或菌落的生长状况评分表(米曲霉、藤黄微球菌)

Table 3 Rating scale for the growth of spores or colonies (*Aspergillus oryzae*, *Micrococcus luteus*)

评价项目	评价标准	感官评分
孢子或菌落的生长状况(60分)	孢子或菌落色泽鲜亮,生长旺盛,且蛋坯覆盖率为70%~100%	50~60
	孢子或菌落色泽鲜亮,生长旺盛,且蛋坯覆盖率 $\geq$ 50%	40~49
	孢子或菌落色泽偏深,生长旺盛,且蛋坯覆盖率 $\geq$ 50%	30~39
	孢子或菌落色泽偏深,生长稀疏	20~29
	孢子或菌落色泽鲜亮或偏深,几乎不长	10~19
	孢子或菌落不生长	0~9

表4 鸡蛋酱感官评分表

Table 4 Sensory score of egg paste

评价项目	评价标准	感官评分
组织状态(20分)	质地均匀,黏稠适度	14~20
	质地较均匀,微干或微黏	7~13
	质地不均匀,偏干偏硬	0~6
香气(30分)	有酱香味、咸蛋黄味、醋味、橄榄菜味中的一种及以上且味道浓郁,不刺鼻	24~30
	有酱香味、咸蛋黄味、醋味、橄榄菜味中的一种及以上且味道较淡,不刺鼻	18~23
	气味一般,不刺鼻	12~17
	气味一般,微微冲鼻	6~11
	异味较重且刺鼻	0~5
口感(25分)	口感细腻,不黏牙	18~25
	口感较细腻,有轻微颗粒感,不黏牙	12~17
	口感一般,有颗粒感,且黏牙	6~11
	口感较差,颗粒感较重,且黏牙	0~5
滋味(25分)	味鲜醇厚,无酸涩味	16~25
	味鲜,不酸,有涩味	8~15
	味鲜,发酸发涩	0~7

1.3.3 水分的测定 水分的测定采用 GB 5009.3-2010《食品安全国家标准 食品中水分的测定》的直接干燥法<sup>[24]</sup>。

1.3.4 蛋白酶活力的测定 采用国家标准 SB/T 10317-1999《蛋白酶活力测定法》中的甲醛法<sup>[25]</sup>。

1.3.5 数据处理 数据处理及图表制作分别使用了 Design-Expert.V8.0.6.1、Microsoft Excel 2016、IBM SPSS Statistics 25 及 Origin 2018 64Bit。

## 2 结果与分析

### 2.1 制曲菌种的选择与初步确定

2.1.1 制曲菌种的选择 黄豆酱、东北大酱制曲的菌类主要有霉菌、细菌、酵母菌、乳酸菌等,常用霉菌主要有米曲霉、黑曲霉、毛霉、根霉等,不同菌种的生长特性、适应性及代谢产物均有一定差异。米曲霉能产生多种酶系,分泌糖化酶活力高,分解

蛋白质及淀粉的能力较强,同时还具有生长迅速,次级代谢产物少等特点;毛霉分泌的蛋白酶活力较高,对蛋白质的水解度较大;根霉适应力强,生长速度快,且菌丝健壮,在高温季节能减轻杂菌的污染<sup>[15]</sup>。

细菌以藤黄微球菌为主,该菌种易培养,酶活力高,成熟期短,不易退化,且成品质地细腻<sup>[15]</sup>。乳酸菌有利于产品中的有机酸发生酯化反应,使得酯类物质增多<sup>[26]</sup>;加入一定量的酵母菌有利于酱类特殊风味的形成<sup>[26-28]</sup>。

选择全蛋液为制曲原料,当蒸坯条件为 95℃,40 min 时,按 1.3.1 节的方法制曲,所用菌种见表 5,制曲 48 h 后的感官评分结果见图 1。

由图 1 可知,霉菌或细菌相同,分别与酵母菌或乳酸菌复配制曲时,酱曲的感官评分由高到低依次为:酿酒酵母 $\approx$ 鲁氏酵母>生香酵母>双歧杆

菌≈空白对照试验组；酵母菌或乳酸菌相同，分别与霉菌或细菌复配制曲时，米曲霉>腐乳曲>米根霉>五通桥毛霉>藤黄微球菌。结果显示，米曲霉分别与酿酒酵母、鲁氏酵母复配制曲时，酱曲的感官评价评分最高，其次是腐乳曲与酿酒酵母、鲁氏酵母复配。

2.1.2 制曲菌种的初步确定 酱曲的好坏是酱产品品质重要的影响之一。良好的酱曲是否可以酿制出可以接受的蛋酱，还需要将曲料进一步发酵进行验证，以此确定最优的菌种或组合。

将 2.1.1 节中感官评分较高的 4 种酱曲打碎，按 1.3.1 节中的工艺流程制成鸡蛋酱并进行感官评分，验证上述结论，其结果详见图 2。

由图 2 可知，鸡蛋酱的感官评分由高到低依次为：米曲霉+酿酒酵母≈米曲霉+鲁氏酵母>腐乳曲+酿酒酵母≈腐乳曲+鲁氏酵母。该结果与酱曲感官评定的结果一致，故选择米曲霉+酿酒酵母、米曲霉+鲁氏酵母两个组合菌种进行下一步的研究。

## 2.2 蛋坯原料配方的研究与初步确定

2.2.1 蛋坯原料配方的研究 大豆分离蛋白的主要成分是蛋白质，熟面粉的主要成分是淀粉，黑豆粉的主要成分是蛋白质及淀粉，制曲时大豆分离蛋白、熟面粉及黑豆粉的加入可改变蛋坯中的碳源和氮源种类，可为霉菌、细菌、酵母菌及乳酸菌的生长代谢提供充足的氮源及碳源，促进微生物的生长繁殖；同时该物质也可在多种微生物及酶的作用下，降解成小分子物质，生成醇、醛、酯等，形成酱特有的色泽与风味<sup>[29]</sup>。

以鸡蛋液、大豆分离蛋白、熟面粉、馒头干粉、黑豆粉为原料制成不同种类的蛋坯后分别接 2.1.2 节中选出的两个组合的菌种，制曲原料试验设计及感官评价结果详见表 6。

由表 6 可知，蛋坯原料相同，米曲霉分别与酿酒酵母、鲁氏酵母复配制曲时，酱曲的感官评分几乎相同。制曲菌种相同，蛋坯原料相同，处理方式不同时， $A_1$  的感官评分明显高于  $B_1$ ，可能是因为经翻炒后的蛋坯颗粒较小，堆放制曲时原料间隙小，不利于空气流通，导致曲料温度过高，感染高温菌，出现腐败现象<sup>[30-31]</sup>；蛋坯原料为  $A_1$  时酱曲的感官评分与  $C_1$ 、 $D_1$  相近，且低于  $E_1$ 、 $F_1$ ，可

表 5 制曲菌种一览表

Table 5 List of starter making strains

制曲菌种类别	制曲菌种类别
米曲霉	米根霉+生香酵母
腐乳曲	米根霉+酿酒酵母
米根霉	米根霉+双歧杆菌
五通桥毛霉	米根霉+鲁氏酵母
藤黄微球菌	五通桥毛霉+生香酵母
米曲霉+生香酵母	五通桥毛霉+酿酒酵母
米曲霉+酿酒酵母	五通桥毛霉+双歧杆菌
米曲霉+双歧杆菌	五通桥毛霉+鲁氏酵母
米曲霉+鲁氏酵母	藤黄微球菌+生香酵母
腐乳曲+生香酵母	藤黄微球菌+酿酒酵母
腐乳曲+酿酒酵母	藤黄微球菌+双歧杆菌
腐乳曲+双歧杆菌	藤黄微球菌+鲁氏酵母
腐乳曲+鲁氏酵母	

注：表中空白对照试验指制曲时为单一菌种。

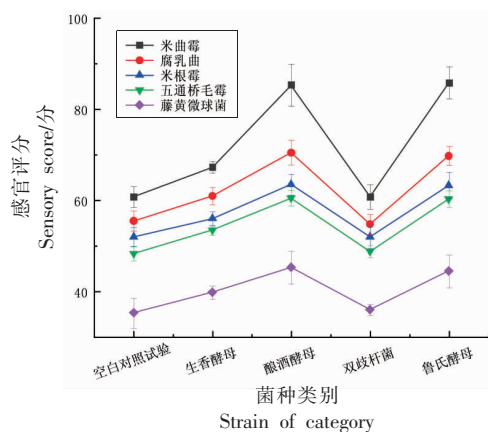


图 1 不同菌种制曲后的感官评分结果

Fig.1 Sensory evaluation results of different strains after koji making

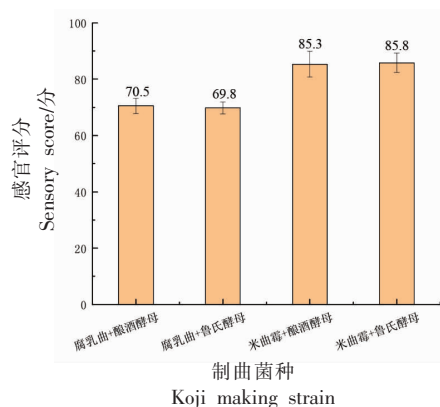


图 2 不同酱曲制酱后的感官评分结果

Fig.2 Sensory evaluation results of different soy sauce koji after sauce making

表6 不同种类的蛋坯及菌种制曲后的感官评分结果

Table 6 Sensory evaluation results of different kinds of egg and strain after koji making

蛋坯原料	感官得分/分	
	米曲霉+酿酒酵母	米曲霉+鲁氏酵母
鸡蛋液-蒸( $A_1$ )	85.30 ± 4.55 <sup>c</sup>	85.80 ± 3.49 <sup>c</sup>
鸡蛋液-炒( $B_1$ )	68.00 ± 1.67 <sup>d</sup>	68.50 ± 2.50 <sup>d</sup>
90%全蛋液+10%大豆分离蛋白( $C_1$ )	85.00 ± 3.24 <sup>c</sup>	84.30 ± 3.77 <sup>c</sup>
90%全蛋液+10%熟面( $D_1$ )	86.00 ± 2.12 <sup>c</sup>	85.80 ± 2.86 <sup>c</sup>
90%全蛋液+10%馒头干粉( $E_1$ )	90.50 ± 1.12 <sup>b</sup>	90.80 ± 1.92 <sup>b</sup>
90%全蛋液+10%黑豆粉( $F_1$ )	93.30 ± 2.68 <sup>ab</sup>	93.50 ± 1.66 <sup>ab</sup>
80%全蛋液+20%黑豆粉( $G_1$ )	96.30 ± 1.09 <sup>a</sup>	96.00 ± 1.22 <sup>a</sup>

注:表格中同列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ );制曲时间为48 h。

能是因为黑豆粉及馒头干粉中的大分子物质的变性度大于熟面粉及大豆分离蛋白中大分子物质的变性度,更易被微生物利用,进而影响菌种的生长状况;蛋坯原料为 $G_1$ 时酱曲的感官评分高于 $F_1$ ,可能是因为黑豆粉的添加影响了蛋坯中的水分含量,进而影响曲料的疏松度及制曲温度,影响了酱曲的质量<sup>[30-31]</sup>。结果显示,米曲霉分别与酿酒酵母、鲁氏酵母协同制曲时,制曲原料为 $G_1$ 时酱曲感官评分最高,具有橄榄菜味及淡淡的咸蛋黄味, $F_1$ 次之。

2.2.2 蛋坯原料配方的初步确定 蛋坯原料配方的改变影响了制曲菌种的生长及酶的产生,进而影响成曲品质,影响发酵风味,良好的酱曲能否酿制出风味较好的蛋酱,仍需将酱曲进一步发酵进行验证,以此确定最佳原料配方。

将2.2.1节中感官评分较高的4种酱曲打碎,按1.3.1节中的工艺流程制成鸡蛋酱并进行感官评分,以验证上述结论,其结果详见图3。

由图3得,制曲原料配方的改变对鸡蛋酱的感官品质影响显著。米曲霉和酿酒酵母或鲁氏酵母协同制曲,蛋坯原料为80%的全蛋液加20%的黑豆粉的鸡蛋酱的感官评分明显高于蛋坯原料为90%的全蛋液加10%的黑豆粉的鸡蛋酱。该结果与2.2.1节中酱曲的感官评定结果一致,故初步确定当制曲菌种为米曲霉与酿酒酵母或鲁氏酵母、蛋坯原料为80%的全蛋液加20%的黑豆粉时,酱曲的风味最好。

综上所述,蛋坯原料一定,米曲霉分别与酿酒酵母、鲁氏酵母复配制曲时酱曲的感官评分相近,

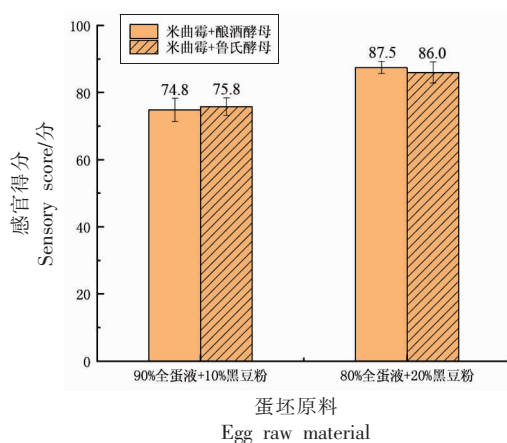


图3 不同酱曲制酱后的感官评分结果

Fig.3 Sensory evaluation results of different soy sauce koji after sauce making

酱曲打碎后制酱的感官评分也相近,说明两种酵母菌对酱曲及鸡蛋酱成品风味的影响效果几乎相同。因接种鲁氏酵母时需先对该菌种进行活化培养,耗时较长,故后续试验选用酿酒酵母与米曲霉协同制曲。

当制曲菌种为米曲霉与酿酒酵母、蛋坯原料为80%的全蛋液加20%的黑豆粉时,酱曲的风味最好,具有橄榄菜味及淡淡的咸蛋黄味。

### 2.3 制曲工艺参数优化

制曲是鸡蛋酱生产的一道重要工序,酱曲的质量直接关系到产品品质及原料的利用率,而酱曲质量的好坏,可通过蛋白酶活力来衡量。

相关资料表明制曲菌种为米曲霉和酿酒酵母时,制曲温度为30℃,空气湿度为85%。上述研究表明最适制曲原料为全蛋液、黑豆粉。

酱曲中的蛋白酶活力还受制曲时间、制曲原料中的水分含量及变性度的影响,而制曲原料的变性程度又随蒸坯条件的变化而变化。故选择这 3 个影响因素进行后续试验,以得到最佳酱曲。

### 2.3.1 单因素实验结果

#### 2.3.1.1 蒸坯时间对蛋白酶活力的影响

蛋坯原料的蒸煮条件与酶的作用密切相关,鸡蛋及黑豆粉在制曲前经高温蒸煮处理,可使得其中的大分子物质——蛋白质变性。在后期制曲发酵过程中,变性后的蛋白质更易被微生物所产生的多种酶系分解,提高原料的利用,降低成本,提高成品风味,改善成品品质。蒸煮时间过长,蛋白质变性过度,蛋坯色泽加深,结实且无弹性,不易被米曲霉所分解的蛋白酶作用,不利于制曲;蒸煮时间过短,蛋白质变性不完全,原料利用率降低。

选择蛋坯原料为 80% 的全蛋液加 20% 的黑豆粉,研究蒸坯时间 (20, 30, 40, 50, 60 min) 对酱曲中蛋白酶活力的影响,制曲 48 h 后酱曲中的蛋白酶活力结果见图 4。

由图 4 可知,随着蒸坯时间的延长,酱曲中的蛋白酶活力呈先升高后降低的趋势,蒸坯时间为 40 min 时蛋白酶的活力最大,此时原料中的蛋白质变性适度,提高了酶作用的程度。

#### 2.3.1.2 蛋坯中的水分含量对蛋白酶活力的影响

水分含量是制曲的重要参数之一,曲料中水分含量太低,曲料偏干,不易于曲料中的营养物质通过自由水扩散到基质表面,从而抑制菌体的生长;曲料中水分含量太高,不利于维持曲料中细小微粒间的空隙和疏松度,从而影响空气流通,影响制曲过程中温度的控制<sup>[30-31]</sup>。

本试验通过改变黑豆粉的添加量改变蛋坯中的水分含量。选择蒸坯时间为 40 min,研究蛋坯中的水分含量 (55%, 60%, 65%, 70%, 75%) 对酱曲中蛋白酶活力的影响,制曲 48 h 后酱曲中的蛋白酶活力结果见图 5。

由图 5 得,蛋坯中的水分含量对酱曲中的蛋白酶活力影响显著。随着水分含量的增加,酱曲中的蛋白酶活力在水分含量为 55%~65% 时呈上升的趋势,当水分含量为 65% 时蛋白酶活力达到最大,为 5 522 U/g;水分含量为 65%~70% 时,酱曲中的蛋白酶活力急剧下降。综上,制曲时蛋坯中的水

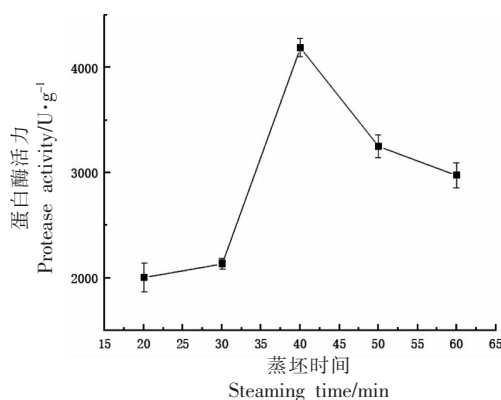


图 4 蒸坯时间对蛋白酶活力的影响

Fig.4 Effects of steaming time on protease activity

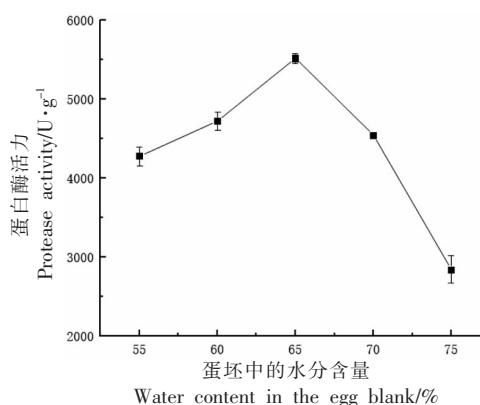


图 5 蛋坯中的水分含量对蛋白酶活力的影响

Fig.5 Effects of water content in egg blank on protease activity

分含量为 65% 时为宜。

#### 2.3.1.3 制曲时间对蛋白酶活力的影响

在蛋坯中的水分含量为 65%, 蒸坯时间为 40 min 的条件下,考察制曲时间 (24, 36, 48, 60, 72 h) 对酱曲中蛋白酶活力的影响,其结果见图 6。

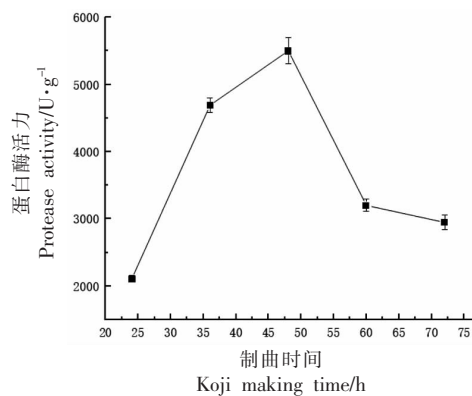


图 6 制曲时间对蛋白酶活力的影响

Fig.6 Effects of koji making time on protease activity

微生物的生长可以分为4个时期,分别为:迟缓期、对数期、稳定期和衰亡期。霉菌在对数期时其生长速率的常数最大,酶系活跃,代谢旺盛,即图6中制曲时间为24~48 h时,并在48 h时酶活呈最大值。之后随着制曲时间的延长,酱曲中的蛋白酶活力急剧下降,其可能是因为制曲48 h后霉菌开始衰老,产酶速率下降,且部分蛋白酶活力下降;也可能是因为微生物过度繁殖,加剧了对氧气以及酱曲中营养成分的竞争。制曲时间过长,产生大量的孢子污染环境,成品的苦味也会加重,故本试验的最佳制曲时间为48 h。

### 2.3.2 制曲条件响应面优化试验

2.3.2.1 优化试验设计及结果 为了全方面分析及优化制曲工艺参数,以单因素实验结果为基础,根据 Box-Behnken 中心组和设计原理<sup>[32-33]</sup>,选择蒸坯时间(A)、蛋坯中的水分含量(B)、制曲时间(C)3个因素为自变量,以蛋白酶活力为评价指标,研究鸡蛋酱的制曲工艺参数。试验设计因素水平详见表7,试验设计及结果详见表8。

2.3.2.2 回归方程的建立与检验 对表8中的试验数据进行多元回归拟合,应用 Design-Expert V8.0.6.1 软件分析,建立蛋白酶活力对蒸坯时间(A)、蛋坯中的水分含量(B)、制曲时间(C)的二元多项回归方程:

蛋白酶活力 = 5545.00 + 255.63A + 265.50B + 200.88C + 17.75AB + 63.50AC - 46.25BC - 1146.25A<sup>2</sup> - 593.00B<sup>2</sup> - 604.25C<sup>2</sup>。回归方程方差分析见表9。

由表9可知,蛋白酶活力评价模型中  $P < 0.0001$ ,表明二次回归方程模型极显著( $P < 0.01$ ),故该方程能够很好的描述各影响因素与响应值之间的真实关系;失拟项不显著( $P_{失拟} = 0.1405 > 0.05$ ),则无失拟因素存在;模型的决定系数  $R^2 = 0.9927$ ,说明该响应面的二次回归方程的可靠性较高,且试验所得结果与数学模型的拟合度较好,试验误差小,预测值与实测值之间的相关性良好;校正决定系数  $R^2_{adj} = 0.9833$ 。综上所述,对制曲工艺条件的研究可使用该模型。其中,蒸坯时间(A)、蛋坯中的水分含量(B)、蒸坯时间的二次项(A<sup>2</sup>)、蛋坯中的水分含量的二次项(B<sup>2</sup>)、制曲时间的二次项(C<sup>2</sup>)的  $P$  值均小于 0.001,表明对酱曲中的蛋白酶活力影响极显著;制曲时间(C)的  $P$  值小于

表7 Box-Behnken 试验设计因素水平表

Table 7 Test design factor level table for Box-Behnken

水平	蒸坯时间 (A)/min	蛋坯中的水分 含量(B)/%	制曲时间 (C)/h
-1	30	60	36
0	40	65	48
1	50	70	60

表8 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 8 Box-Behnken experimental design and results

试验号	蒸坯时 间(A)/ min	蛋坯中的 水分含量 (B)/%	制曲时 间(C)/h	蛋白酶活力/ U·g <sup>-1</sup>
1	30	60	48	3 265 ± 50.73
2	50	60	48	3 745 ± 56.86
3	30	70	48	3 831 ± 95.18
4	50	70	48	4 382 ± 86.30
5	30	65	36	3 327 ± 83.75
6	50	65	36	3 707 ± 46.97
7	30	65	60	3 755 ± 70.80
8	50	65	60	4 389 ± 64.68
9	40	60	36	3 947 ± 103.52
10	40	70	36	4 500 ± 27.15
11	40	60	60	4 288 ± 74.93
12	40	70	60	4 656 ± 88.09
13	40	65	48	5 455 ± 88.97
14	40	65	48	5 499 ± 100.69
15	40	65	48	5 528 ± 39.88
16	40	65	48	5 643 ± 88.79
17	40	65	48	5 600 ± 109.87

0.01,表明对酱曲中蛋白酶活力影响高度显著。又由  $F$  值的大小可知,影响蛋白酶活力的因素由大到小依次为  $B > A > C$ ,即蛋坯中的水分含量 > 蒸坯时间 > 制曲时间。

2.3.2.3 回归模型等高线及响应面分析 利用响应面图及等高线图来反应各影响因素两两交互后对酱曲中蛋白酶活力的影响,其影响结果详见图7。

由上述 3D 响应曲面图可得制曲过程中各影响因素对蛋白酶活力的影响,响应面曲面的陡峭

表 9 回归方程方差分析表

Table 9 Variance analysis of regression model

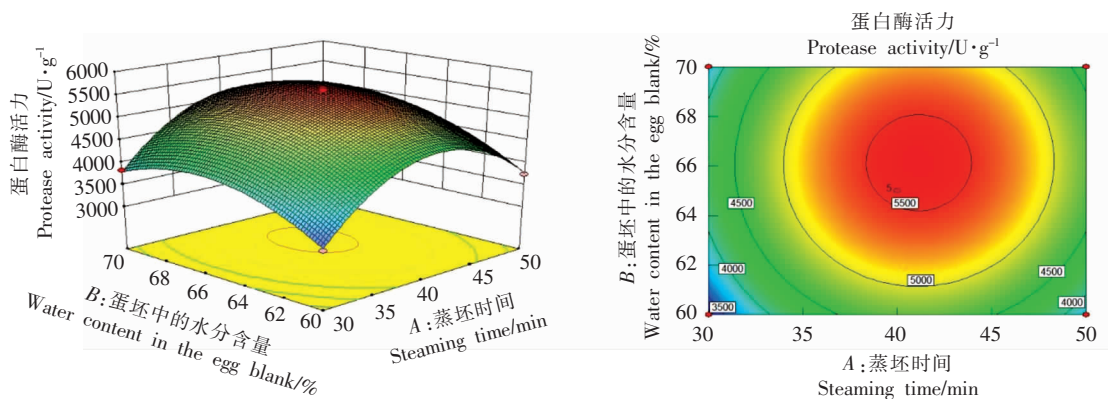
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.085×10 <sup>7</sup>	9	1.206×10 <sup>6</sup>	105.38	<0.0001	***
A	5.228×10 <sup>5</sup>	1	5.228×10 <sup>5</sup>	45.69	0.0003	***
B	5.639×10 <sup>5</sup>	1	5.639×10 <sup>5</sup>	49.29	0.0002	***
C	3.228×10 <sup>5</sup>	1	3.228×10 <sup>5</sup>	28.22	0.0011	**
AB	1 260.25	1	1 260.25	0.11	0.7497	
AC	16 129.00	1	16 129.00	1.41	0.2738	
BC	8 556.25	1	8 556.25	0.75	0.4158	
A <sup>2</sup>	5.532×10 <sup>6</sup>	1	5.532×10 <sup>6</sup>	483.57	<0.0001	***
B <sup>2</sup>	1.481×10 <sup>6</sup>	1	1.481×10 <sup>6</sup>	129.42	<0.0001	***
C <sup>2</sup>	1.537×10 <sup>6</sup>	1	1.537×10 <sup>6</sup>	134.38	<0.0001	***
残差	80 081.75	7	11 440.25			
失拟项	56 947.75	3	18 982.58	3.28	0.1405	不显著
纯误差	23 134.00	4	5 783.50			
总和	1.093×10 <sup>7</sup>	16				

注:\*\*\* 表示差异极显著,  $P < 0.001$ ; \*\* 表示差异高度显著,  $P < 0.01$ 。

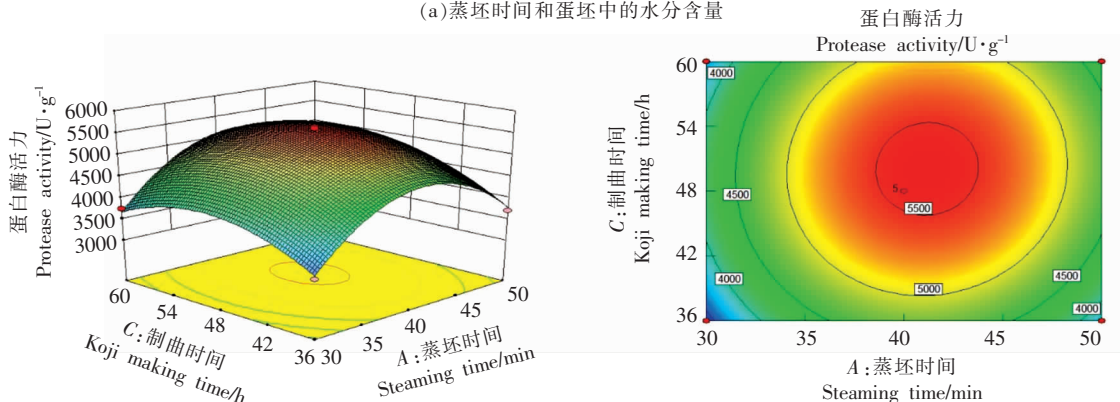
程度反映了该响应条件的改变对响应值影响的大小, 响应曲面越陡峭, 响应值越灵敏。

2.3.2.4 验证试验 应用 Design-Expert.V8.0.6.1

软件分析得最佳制曲工艺条件为: 蒸坯时间 41.17 min, 蛋坯中的水分含量为 66.1%, 制曲时间为 49.96 h, 结合实际应用, 各工艺条件可调整为: 蒸

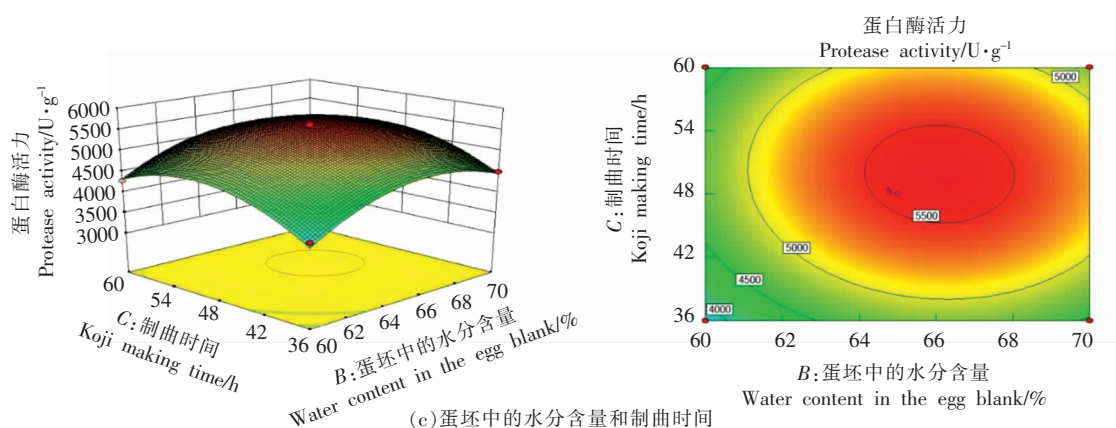


(a) 蒸坯时间和蛋坯中的水分含量



(b) 蒸坯时间和制曲时间





(c) 蛋坯中的水分含量和制曲时间

图7 响应曲面图和等高线图

Fig.7 Response surface and contour chromatograms

坯时间 41 min, 蛋坯中的水分含量为 66.1%, 制曲时间为 50 h, 重复 3 次试验取平均值, 得酱曲中的蛋白酶活力为  $(5\,797 \pm 90.64) \text{U/g}$ , 与模型预测值接近, 表明该模型得到的最佳制曲工艺条件准确可靠。

### 3 结论

良好风味的制曲菌种为: 米曲霉和酿酒酵母。当制曲菌种为米曲霉与酿酒酵母、蛋坯原料为 80% 的全蛋液加 20% 的黑豆粉时, 酱曲的风味最好, 具有橄榄菜味及淡淡的咸蛋黄味。鸡蛋酱最佳制曲工艺条件为: 蒸坯时间 41 min, 蛋坯中的水分含量为 66.1%, 制曲时间为 50 h。

### 参 考 文 献

- [1] 周黎, 王蓉蓉, 刘玮, 等. 皮蛋加工及食用安全性研究[J]. 南京晓庄学院学报, 2016, 32(6): 5-8.  
ZHOU L, WANG R R, LIU W, et al. A study on the processing and food safety of preserved eggs[J]. Journal of Nanjing Xiaozhuang University, 2016, 32(6): 5-8.
- [2] 蒲跃进. 不同咸蛋腌制工艺在南北方鸭蛋腌制效果的比较研究: 第四届中国水禽发展大会会刊 [C]. 南昌: 中国畜牧业协会, 2011: 278-283.  
PU Y J. Comparative study on salting effect of different salted egg salting techniques in north and South China: The Fourth China Waterfowl Development Conference Catalogue [C]. Nanchang: China Animal Agriculture Association, 2011: 278-283.
- [3] 杨军军. 卤蛋的加工工艺及质量控制[J]. 肉类工业, 2009(8): 20-21.  
YANG J J. Processing technology and quality control of salted eggs[J]. Meat Industry, 2009(8): 20-21.
- [4] 丰技. 醉蛋的制作方法[J]. 湖南农机, 2003(6): 26.  
FENG J. Method for making drunk egg[J]. Hunan Agricultural Machinery, 2003(6): 26.
- [5] 张华智. 当前我国禽蛋加工的主要方式与未来发展的几点建议[J]. 广西畜牧兽医, 2016, 32(4): 213-215.  
ZHANG Z H. The main ways of poultry egg processing in China and some suggestions for future development [J]. Guangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, 32(4): 213-215.
- [6] 秦丹, 李建雄. “包咸蛋”的加工工艺[J]. 中国禽业导刊, 2006(13): 32.  
QIN D, LI J X. Processing technology of ‘wrapped salted egg’[J]. Guide to Chinese Poultry, 2006(13): 32.
- [7] 马美湖. 蛋品加工技术与质量安全控制战略研究[J]. 中国家禽, 2009, 31(12): 1-6.  
MA M H. Research on egg processing technology and quality safety control strategy[J]. China Poultry, 2009, 31(12): 1-6.
- [8] 潘凯文, 黄露露, 罗祖友. 富硒醋蛋饮料的开发[J]. 农产品加工, 2016(10): 9-12, 15.  
PAN K W, HUANG L L, LUO Z Y. Development of selenium enriched vinegar egg beverage [J]. Farm Products Processing, 2016(10): 9-12, 15.
- [9] 尹忠平, 洪艳平, 徐明生. 凝固型降胆固醇全蛋发酵饮料加工工艺研究[J]. 食品与机械, 2007(6):

- 114-118, 132.
- YIN Z P, HONG Y P, XU M S. Study on processing of cholesterol-reducing fermented coagulated whole egg beverage[J]. Food & Machinery, 2007 (6): 114-118, 132.
- [10] 沙菲, 仝其根, 王芳. 鸡蛋发酵食品(蛋腐乳)工艺探索与优化[J]. 食品工业科技, 2017, 38(18): 140-144.
- SHA F, TONG Q G, WANG F. Exploration and optimization of egg fermented food (egg sufu)[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(18): 140-144.
- [11] 吴松根. 一种风味臭蛋类产品及其制作方法: CN1545929A[P]. 2004-11-17[2021-01-13].
- WU S G. A flavor smelly egg product and a preparation method thereof: CN1545929A.2004-11-17[P]. 2004-11-17[2021-01-13].
- [12] 迟同生. 一种风味臭蛋的淹制方法: CN1701720A[P]. 2005-11-30[2021-01-13].
- CHI T S. A method for making flavoured rotten eggs by drowning: CN1701720A [P]. 2005-11-30 [2021-01-13].
- [13] 夏侯晓雷. 一种膏状臭蛋产品及其生产工艺: CN1729863A[P]. 2006-02-08[2021-01-13].
- XIAHOU X L. A paste rotten egg product and a production process thereof: CN1729863A [P]. 2006-02-08[2021-01-13].
- [14] 于新. 发酵豆制品的制作原理[J]. 农产品加工, 2011(8): 26-27.
- YU X. The principle of making fermented soybean products[J]. Farm Products Processing, 2011(8): 26-27.
- [15] 张兰威. 发酵食品工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011: 8-10.
- ZHANG L W. Fermentation food technology[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2011: 8-10.
- [16] 于新. 发酵豆制品的制作原理[J]. 农产品加工, 2011(8): 26-27.
- YU X. Production principle of fermented bean products[J]. Farm Products Processing, 2011(8): 26-27.
- [17] 王传荣. 发酵食品生产技术[M]. 北京: 科学出版社, 2014: 98-99.
- WANG C R. Production technology of fermented food [M]. Beijing: China Science Publishing, 2014: 98-99.
- [18] 韩春然. 传统发酵食品工艺学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 29-30.
- HAN C R. Traditional fermented food technology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 29-30.
- [19] ZHAO G Z, DING L L, PAN Z H, et al. Proteinase and glycoside hydrolase production is enhanced in solid -state fermentation by manipulating the carbon and nitrogen fluxes in *Aspergillus oryzae* [J]. Food Chemistry, 2019, 271: 606-613.
- [20] NIU C T, MIN S H, JIA Y, et al. Adaptive evolution of *Aspergillus oryzae* 3.042 strain and process optimization to reduce the formation of tyrosine crystals in broad bean paste[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(2): 12716.
- [21] 樊明涛, 张文学. 发酵食品工艺学 [M]. 北京: 科学出版社, 2014: 324-325.
- FAN M T, ZHANG W X. Fermentation food technology[M]. Beijing: China Science Publishing, 2014: 324-325.
- [22] DEVANTHI P V P, GKATZIONIS K. Soy sauce fermentation: Microorganisms, aroma formation, and process modification[J]. Food Research International, 2019, 120: 364-374.
- [23] 郭朔, 杜连启. 新版风味酱类生产技术[M].北京: 化学工业出版社, 2016: 16-32.
- GUO S, DU L Q. Production technology of flavor sauce [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2016: 16-32.
- [24] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中水分的测定: GB 5009.3-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 3-4.
- National Municipal Commission of Health and Family Planning. National food safety standard determination of moisture in foods; GB 5009.3-2016[S]. Beijing: China Standard Press, 2016: 3-4.
- [25] 国家国内贸易局. 蛋白酶活力测定法: SB/T 10317-1999[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999: 233-234.
- Bureau of Internal Trade. Measurement of proteinase activity: SB/T 10317-1999[S]. Beijing: China Standard Press, 1999: 233-234.
- [26] 王莉. 酱油酿造过程控制参数优化分析[J]. 中国调味品, 2020, 45(10): 108-111, 116.
- WANG L. Optimization of control parameters in soy sauce brewing process [J]. China Condiment, 2020, 45(10): 108-111, 116.
- [27] 吉艳莉, 李瑞英, 仝其根, 等. 不同发酵菌种及发酵时间对蛋酪风味成分的影响[J]. 食品与发酵工业,

- 2020, 46(2): 214-221.
- JI Y L, LI R Y, TONG Q G, et al. Effect of different fermentation strains and fermentation time on the flavor components of egg cheese [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(2): 214-221.
- [28] 张辉. 工业生产黄豆酱乳酸菌和酵母菌的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007.
- ZHANG H. The study on lactic acid bacteria and yeast by industrial producing soybean paste [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2007.
- [29] 符姜燕, 赵颖, 孔军平, 等. 特性面粉对酱油氨基酸态氮及还原糖含量影响的研究[J]. 安徽农学通报, 2020, 26(11): 134-136.
- FU J Y, ZHAO Y, KONG J P, et al. Study on the effect of special flour on the content of amino acid nitrogen and reducing sugar in soy sauce[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2020, 26(11): 134-136.
- [30] 栾庆祥, 赵杨, 周欣, 等. 单因素试验结合响应面分析法优化杜仲最佳提取工艺[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(5): 859-865.
- LUAN Q X, ZHAO Y, ZHOU X, et al. Optimization on extraction technology for *Eucommia ulmoides* by single-factor experiment combined with response surface methodology [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2013, 33(5): 859-865.
- [31] 李艳艳, 王俊青, 刘王文, 等. 响应面法优化超声辅助提取大果青扞叶总黄酮及抗氧化性研究 [J]. 食品研究与开发, 2020, 41(395): 30-36.
- LI Y Y, WANG J Q, LIU W W, et al. Study on optimization of ultrasonic assisted extracting process of total flavonoids from *Picea neoveitchii* leaves by response surface methodology and its antioxidant activity[J]. Food Research and Development, 2020, 41(395): 30-36.
- [32] 刘平安. 酱油制曲过程中常见杂菌污染及防治措施 [J]. 中国调味品, 2001(8): 23-24, 27.
- LIU P A. Preventive method and common mixed fungi pollution on soy-making[J]. Chinese Condiment, 2001(8): 23-24, 27.
- [33] 戴德慧, 胡伟莲, 冯纬. 制醋酒渣生产酱油制曲工艺条件研究[J]. 中国调味品, 2016, 41(11): 110-113, 117.
- DAI D H, HU W L, FENG W. Study on koji-making technology of brewed soy sauce with lees from vinegar production[J]. China Condiment, 2016, 41(11): 110-113, 117.

### Koji Making Strains and Raw Material Formula for Fermented Egg Paste and Process Parameters Optimization

Wang Zelin<sup>1</sup>, Tong Qigen<sup>2\*</sup>, Lü Ying<sup>3</sup>, Wang Zongyi<sup>4</sup>, Guo Huiyuan<sup>5</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206

<sup>2</sup>Beijing Laboratory for Food Quality and Safety, Beijing 102206

<sup>3</sup>Beijing Engineering Center for Egg Safety Production and Processing, Beijing 102206

<sup>4</sup>Beijing Key Laboratory of Agricultural Product Detection and Control for Spoilage Organisms and Pesticides, Beijing 102206

<sup>5</sup>College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

**Abstract** Based on the results of sensory evaluation, single factor test was used to determine the koji making strains and the formula of raw materials for good flavor. The results showed that when koji-making strains were *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*, raw materials were 80% egg liquid and 20% black bean powder, the flavor of koji was the best, and it had olive and vegetable flavor and slight salted egg yolk flavor. The time of steaming, the moisture content and the time of koji making were selected as independent variables, the activity of protease was taken as an index, Box-Behnken was used to optimize the koji-making process. The results showed that when the steaming egg curd time was 41 min, the moisture content in egg curd was 66.1%, and the koji ferment time was 50 h, the highest protease activity in egg koji was 5 797 U/g. The study has found a feasible scheme for the development of egg sauce products.

**Keywords** dried egg paste; koji-making; *Aspergillusoryzae*; *Saccharomyces cerevisiae*; protease activity; sensory evaluation