

鸡蛋酱油原料熟制和制曲条件优化及挥发性成分分析

车莹¹, 褚彦钧¹, 田笑¹, 吕莹², 智秀娟², 仝其根^{3*}

¹北京农学院食品科学与工程学院 北京 102206

²食品质量与安全北京实验室 北京 100022

³食品安全生产与加工北京市工程研究中心 北京 100094

摘要 为开发鸡蛋酱油,采用米曲霉菌粉沪酿 3.042 制曲,利用单因素和响应面试验,优化鸡蛋酱油原料熟制和制曲的工艺条件,并通过 GC-IMS 方法分析鸡蛋酱油的挥发性有机化合物。结果表明,原料熟制的最佳条件为:熟料水分含量 50%,熟制温度 95 ℃,熟制时间 52 min,在该条件下得到成曲的中性蛋白酶活力为 2 418.5 U/g 干曲,感官评价 81.9 分。制曲的最佳条件为:环境湿度 86%,制曲时间 54 h,麦麸添加量 32%,在该条件下得到成曲的中性蛋白酶活力为 2 970.3 U/g 干曲,感官评价为 94.5 分。GC-IMS 分析结果表明,鸡蛋酱油中共鉴定出挥发性有机物 87 种,主要有酯类、醇类、酮类、醛类,与大豆酱油相比风味物质差异较大,其主要风味成分为 1-戊烯-3-醇、2-己醇、2-甲基丁醇、2-戊醇、2,3-戊二酮、3-戊酮、2-甲基丁酸甲酯、乙酸戊酯、丙烯酸乙酯、丁酸甲酯、四氢呋喃、糠醛、己醛、反式-2-辛烯醛、丁酸等物质。试验结果表明,采用鸡蛋制作酱油曲是可行的,研究结果为后续制作鸡蛋酱油打下基础。

关键词 鸡蛋酱油; 工艺优化; 气相色谱-离子迁移谱; 挥发性有机化合物

文章编号 1009-7848(2023)07-0289-18 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.030

酱油是我国传统的酿造调味品,营养丰富且风味独特,目前酿造酱油多以大豆或者豆粕等植物蛋白为主要原料,以淀粉质原料为辅料,经米曲霉制曲、发酵制成^[1]。原料熟制是酱油原料处理的关键环节,制曲是酱油生产的基础^[2]。成曲的品质可以通过颜色、曲味等感官因素评定,中性蛋白酶是米曲霉生长过程中主要分泌的蛋白酶,其活力受米曲霉所利用的曲料及生长环境等影响,可作为成曲质量评定的主要理化指标^[3]。

鸡蛋主要化学组成为蛋白质和脂质,与大豆和豆粕的主要成分相似。目前传统蛋制品依然占据绝大部分市场,而发酵型蛋制品的品种相对较少,蛋制品深加工产业仍具有相当大的发展空间。仿照大豆酱油的制曲工艺,以鸡蛋、全蛋粉和麦麸为原料接种米曲霉进行制曲,优化原料熟制和制曲的工艺条件,以期为后续制作鸡蛋酱油奠定基础,扩充蛋制品和酱油的种类,进一步开拓蛋制品市场。

收稿日期: 2022-07-10

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0400300, 2018YFD0400305)

第一作者: 车莹,女,硕士生

通信作者: 仝其根 E-mail: tongqigen@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜鸡蛋,北京德青源农业科技股份有限公司;食用盐,中盐上海市盐业有限公司;麸皮,大连正升食品有限公司;米曲霉菌粉(*Aspergillus oryzae*)沪酿 3.042、生香酵母菌粉(Aroma-producing yeast),康源生物科技有限公司;甲醛溶液(37%)、氢氧化钠、葡萄糖、酚酞、无水乙醇,国药集团化学试剂有限公司;干酪素,北京奥博星生物科技有限责任公司。

1.2 仪器与设备

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,上海一恒科学仪器有限公司;美的电炒锅 MC-XZ25X2-101,广东美的生活电器制造有限公司;QZK28-A01 嵌入式蒸汽烤箱,佛山市雷哲电器有限公司;TU-1901 双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;LDZM-80KCS 立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;FlavourSpec 气相色谱离子迁移谱仪,德国 G.A.S 仪器公司。

1.3 试验方法

1.3.1 熟制 新鲜鸡蛋去壳均质得到全蛋液,将全蛋液、全蛋粉和麦麸按一定比例混合均匀,采用

不粘锅低档翻炒的方式进行预熟制,直至原料呈固态且不黏连成坨,倒入不锈钢烤盘中,盖上铝箔纸,放入蒸箱中进行熟制。

1.3.2 制曲 将熟制后的熟料取出,冷却至室温,在无菌条件下接种酱油曲精,充分搅拌使其混合均匀,盖上2层湿润的无菌纱布,放入恒温恒湿培养箱,于29℃和一定湿度下培养一定时间,在制曲12h和制曲24h分别翻曲^[4]1次,即得到鸡蛋曲。

1.3.3 熟制工艺的单因素实验 熟制的目的是使原料中的蛋白质适当变性、淀粉适度糊化、糖类得以分解,促使米曲霉生长,有助于提高米曲霉发酵所产蛋白酶、糖化酶的活力,同时对原料灭菌^[4]。

1.3.3.1 熟料水分含量的影响 称取全蛋液1000g,麦麸添加量为全蛋液的20%(质量分数),通过改变全蛋粉的添加量,90℃熟制30min后,控制熟料的水分含量分别为45%,50%,55%,60%,65%,冷却后接种酱油曲精(接种量为全蛋液的0.6‰),29℃培养48h,环境湿度为80%。以熟料的消化率、成曲蛋白酶活力、孢子数以及感官品质为指标,选择合适的熟料水分含量。

1.3.3.2 熟制温度的影响 制曲原料和制曲条件参照1.3.3.1节的方法,熟料水分含量控制在50%,熟制温度分别为85,90,95,100,105℃,以熟料的消化率、成曲蛋白酶活力、孢子数以及感官品质为指标,研究最佳熟制温度。

1.3.3.3 熟制时间的影响 制曲原料和制曲条件参照1.3.3.1节的方法,熟制温度控制在95℃,熟制时间分别为20,30,40,50,60min,以熟料的消化率、成曲蛋白酶活力、孢子数以及感官品质为指标,研究最佳熟制时间。

1.3.4 熟制工艺响应面优化试验 在单因素实验的基础上,运用Box-Behnken的中心组合试验设计原理,以熟料水分含量、熟制温度和熟制时间为研究对象进行3因素3水平的响应面分析,对熟制条件进行优化。

1.3.5 制曲工艺的单因素实验

1.3.5.1 环境湿度的影响 称取全蛋液1000g,添加质量分数20%的麦麸,添加一定的全蛋粉使熟料的水分含量为50%,冷却后接种酱油曲精(接种量为全蛋液的0.6‰),培养温度为29℃,分别

于70%,75%,80%,85%,90%的湿度条件下培养48h。以成曲的中性蛋白酶活力、糖化酶活力以及感官品质为指标,选择合适的环境湿度。

1.3.5.2 制曲时间的影响 制曲原料和制曲条件参照1.3.5.1节的方法,环境湿度控制在85%,制曲时间分别为40,44,48,52,56h,以成曲的中性蛋白酶活力、糖化酶活力以及感官品质为指标,研究最佳制曲时间。

1.3.5.3 麦麸添加量的影响 制曲原料和制曲条件参照1.3.5.1节的方法,制曲时间控制在52h,麦麸的添加量分别为全蛋液的10%,20%,30%,40%,50%,以成曲的中性蛋白酶活力、糖化酶活力以及感官品质为指标,研究最佳麦麸添加量。

1.3.6 制曲工艺响应面优化试验 在单因素实验的基础上,运用Box-Behnken的中心组合试验设计原理,以环境湿度、制曲时间和麦麸添加量为研究对象进行3因素3水平的响应面分析,对制曲条件进行优化。

1.3.7 水分含量测定方法 依照GB 5009.3-2016^[5]中直接干燥法测定。

1.3.8 熟料消化率测定方法 依照SB/T 10319-1999^[6]测定。

1.3.9 中性蛋白酶活力测定方法 依照SB/T 10317-1999^[7]中福林法测定;以净OD值为横坐标,酪氨酸质量浓度为纵坐标,得到酪氨酸标准曲线,见图1。

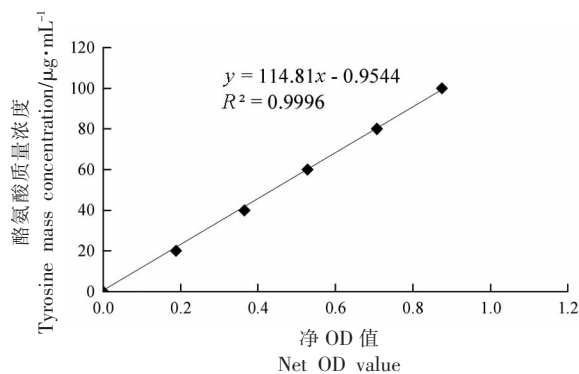


图1 测定中性蛋白酶活力的酪氨酸标准曲线

Fig.1 Standard curve of tyrosine for measuring neutral protease activity

酪氨酸标准曲线回归方程为 $y=114.81x - 0.9544$, $R^2=0.9996$, 酪氨酸质量浓度在0~100 μg/

mL 内,线性关系良好。

1.3.10 糖化酶活力测定方法 依照 QB/T 1803-1993^[8]中糖化酶部分方法测定。

1.3.11 孢子数测定方法 依照 SB/T 10315-1999^[9]方法测定。

1.3.12 感官评价方法 参考 GB 18186-2000^[10]

制定鸡蛋酱油的感官评分表,由 16 位(男:女=1:1)经过感官评价技能培训的食品专业的同学组成感官评价小组,对鸡蛋曲的气味、米曲霉的生长状况(详见表 1)以及鸡蛋酱油的体态、色泽、香气和滋味进行评分(详见表 2),结果取 3 次评分的平均值。

表 1 鸡蛋曲感官评分表

Table 1 Sensory scores of egg koji

评价项目	评价标准	感官评分
气味(50分)	具有米曲霉生长特有的浓郁曲香,无不良气味	39~50
	曲香味较淡,无不良气味	26~38
	有微微的不良气味	13~25
	有较重的不良气味	0~12
米曲霉的生长状况(50分)	孢子或菌落浓密厚实,分布均匀,呈黄绿色,覆盖率 \geq 95%	39~50
	孢子或菌落较浓密,分布均匀,呈黄绿色,覆盖率 \geq 90%	26~38
	孢子或菌落较稀疏,分布均匀,呈浅绿色,覆盖率 \geq 85%	13~25
	孢子或菌落很稀疏,分布不均匀,呈白色,或几乎不生长	0~12

表 2 鸡蛋酱油感官评分表

Table 2 Sensory scores of egg soy sauce

评价项目	评价标准	感官评分
体态(20分)	澄清,无悬浮物,无杂质	15~20
	较澄清,无明显悬浮物和杂质	10~14
	有少量悬浮物和杂质	5~9
	有较多悬浮物和杂质	0~4
色泽(20分)	色泽鲜艳,呈深红褐色,有光泽	15~20
	呈红褐色或棕褐色,有光泽	10~14
	色泽暗淡,呈深褐色,无光泽	5~9
	棕褐色,色泽发黑、发暗,无光泽	0~4
香气(30分)	具有酱香特有的浓郁芳香,无不良气味	20~30
	酱香较淡,无不良气味	10~19
	酱香很淡,无不良气味	0~9
滋味(30分)	味道鲜美适口,醇厚柔和,无明显酸涩味和苦味,咸味适度	20~30
	鲜味较淡,有微微酸涩味或苦味,咸味适度	10~19
	鲜味很淡,有较重酸涩味或苦味,咸味适度	0~9

1.3.13 风味物质 GC-IMS 测定法

1.3.13.1 顶空进样条件 取样品 2 g 置于 20 mL 顶空瓶中,80 °C 孵育 15 min 后进样。进样体积 200 μ L;进样针温度 85 °C;孵化转速 500 r/min。

1.3.13.2 GC-IMS 检测条件 选取参数为 MXT-WAX,长 30 m,内径 0.53 mm,膜厚 1 μ m 的色谱柱,色谱柱温度保持在 60 °C,IMS 温度为 45 °C,分

析时间 50 min。载气为高纯度 N₂,流速为 150 mL/min。电离源为氘源,电离模式为正离子模式。载气流量:初始时设置为 2 mL/min,保持 2 min,之后在 18 min 内线性增至 100 mL/min。每个样品平行测定 3 次。

1.3.14 数据统计分析 用 Excel、SPSS、Design-Expert.V8.0.6.1 和 OriginPro 2021 软件对数据进

行处理和图表的绘制,VOCal和三款插件(Reporter, Gallery Plot, Dynamic PCA)分别从不同角度对样品挥发性物质进行分析。

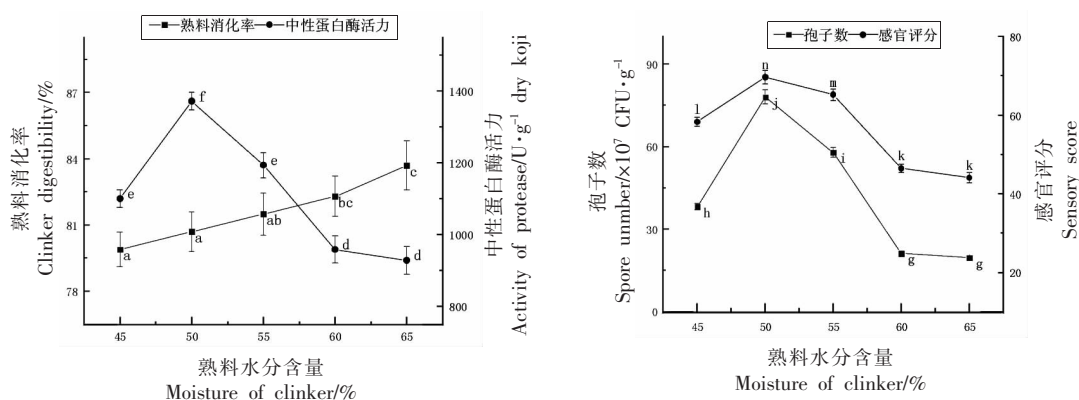
2 结果与分析

2.1 熟制工艺的单因素实验结果

2.1.1 熟料水分含量的确定 由图2可知,当熟料水分含量在45%~65%时,成曲的熟料消化率随水分含量升高而升高,熟料水分含量于65%处,消化率显著升高至 $83.7\% \pm 1.1\%$ 。随着熟料消化率的升高,成曲的中性蛋白酶活力、孢子数和感官评分均呈先升高后降低的趋势,且均在熟料消化率为

($80.7 \pm 0.9\%$)(水分含量50%)处达到最大值,分别为(1371.7 ± 24.6)U/g干曲, (78.1 ± 2.6) $\times 10^7$ CFU/g和 69.7 ± 1.7 。

可以发现对于米曲霉的生长,熟料消化率水平不是越高越好。适宜的水分有利于米曲霉生长和分泌蛋白酶,水分过低会降低营养物质的溶解性,不利于营养成分的传递,水分过高会损失原料的微粒结构,降低透气性,增加黏度^[4],使温度难以控制,导致杂菌繁殖甚至产生氨味,影响米曲霉正常生长,降低成曲的中性蛋白酶活力、孢子数和感官品质。综上,熟料水分含量控制在50%左右为宜。



(a) 熟料水分含量对熟料消化率和成曲中性蛋白酶活力的影响

(b) 熟料水分含量对成曲孢子数和感官评分的影响

注:不同字母表示组间存在显著差异($P < 0.05$)。

图2 熟料水分含量对熟料消化率、成曲中性蛋白酶活力、孢子数和感官评分的影响

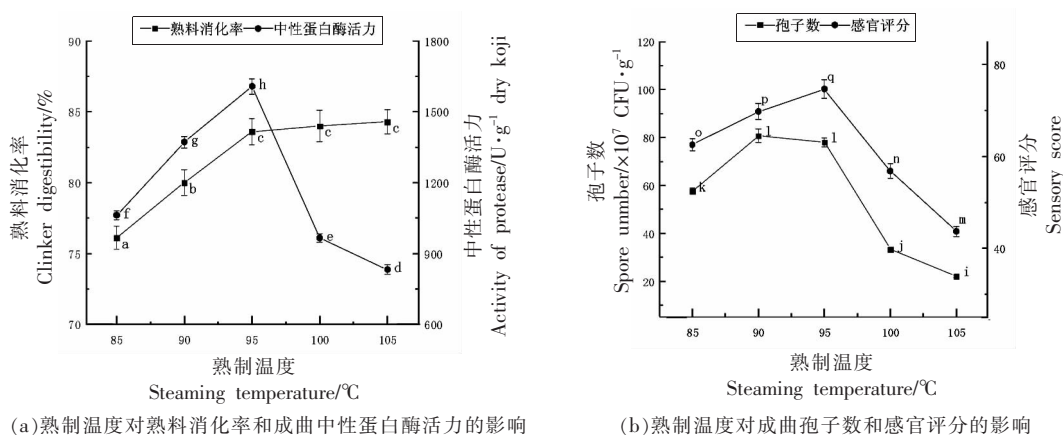
Fig.2 Effects of steamed material water content on digestibility of steamed material, koji neutral protease activity, spore number and sensory score

2.1.2 熟制温度的确定 由图3可知,当熟制温度在85~105℃时,成曲的熟料消化率随熟制温度升高而升高,95℃开始趋于平缓,于105℃处升至($84.3 \pm 0.9\%$)。随着熟料消化率的升高,成曲的中性蛋白酶活力、孢子数和感官评分均先升高后降低,中性蛋白酶活力和感官评分在消化率为($83.6 \pm 0.9\%$)(温度95℃)时达到最大值,分别为(1606.9 ± 32.1)U/g干曲和 74.7 ± 2.0 ,孢子数在消化率为($80.7 \pm 0.9\%$)(温度90℃)时出现最大值为(80.7 ± 3.0) $\times 10^7$ CFU/g,与消化率为($83.6 \pm 0.9\%$)(温度95℃)时(78.0 ± 1.9) $\times 10^7$ CFU/g的差距较小。

这是由于适当的热处理能破坏蛋白质的紧密

结构,暴露包裹在分子内部的酶切位点,使其变成松散、柔韧的直链状态,从而提高熟料消化率^[11]。而熟制温度过高会造成蛋白质变性过度,过度变性的蛋白质黏度大,分子结构紊乱,水解度降低,还会产生一种不能被米曲霉分泌的蛋白酶分解的N性物质^[4],减少原料中的有效营养物质,降低成曲的中性蛋白酶活力、孢子数和感官品质。综上,熟制温度控制在95℃为宜。

2.1.3 熟制时间的确定 由图4可知,当熟制时间在20~60 min时,成曲的熟料消化率随熟制时间延长而升高,30 min开始趋于平缓,于60 min达到 $85.2\% \pm 1.0\%$ 。随着熟料消化率的升高,成曲



(a) 熟制温度对熟料消化率和成曲中性蛋白酶活力的影响

(b) 熟制温度对成曲孢子数和感官评分的影响

注：不同字母表示组间存在显著差异 ($P < 0.05$)。

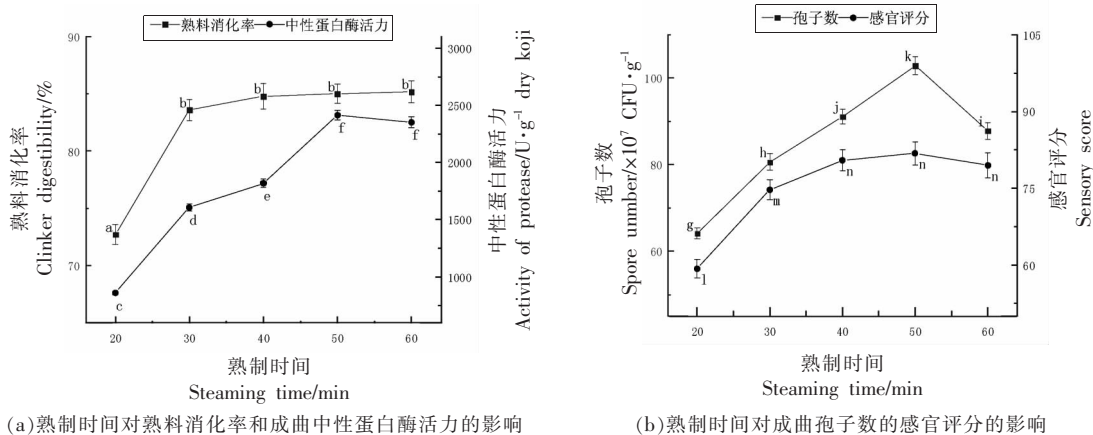
图 3 熟制温度对熟料消化率、成曲中性蛋白酶活力、孢子数和感官评分的影响

Fig.3 Effects of steaming temperature on digestibility of steamed material, koji neutral protease activity, spore number and sensory score

的中性蛋白酶活力、孢子数和感官评分均先升高后降低,且均在消化率为 $(85.0 \pm 0.9)\%$ (熟制时间 50 min) 处达到最大值为 $(2\,414.3 \pm 43.5) \text{U/g}$ 干曲, $(102.9 \pm 2.1) \times 10^7 \text{CFU/g}$ 和 81.8 ± 2.3 。

这种现象是因为熟制时间过长导致原料变性过度,熟制过度使蛋白质热分解,易于被先分泌的

蛋白酶水解,造成环境中氨基酸态氮含量过高,不利于米曲霉分泌蛋白酶,也会降低蛋白质利用率^[12],导致成曲的中性蛋白酶活力、孢子数和感官品质降低。综上,熟制时间控制在 50 min 左右为宜。



(a) 熟制时间对熟料消化率和成曲中性蛋白酶活力的影响

(b) 熟制时间对成曲孢子数的感官评分的影响

注：不同字母表示组间存在显著差异 ($P < 0.05$)。

图 4 熟制时间对熟料消化率、成曲中性蛋白酶活力、孢子数和感官评分的影响

Fig.4 Effects of steaming time on digestibility of steamed material, koji neutral protease activity, spore number and sensory score

2.2 熟制工艺响应面优化试验结果

2.2.1 优化试验设计及结果 在单因素实验的基础上,运用 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理^[13],选择熟料水分含量(A)、熟制温度(B)、熟制

时间(C)3个因素作为自变量,以中性蛋白酶活力为指标,研究鸡蛋酱油的熟制工艺参数。因素编码见表 3,试验结果详见表 4。

表3 Box-Behnken 试验因素水平编码

Table 3 Coding table of factor level for Box-Behnken

编码水平	A(熟料水分含量)/%	B(熟制温度)/°C	C(熟制时间)/min
-1	45	90	40
0	50	95	50
1	55	100	60

表4 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 4 Experimental design and results of Box-Behnken

试验号	A(熟料水分含量)/%	B(熟制温度)/°C	C(熟制时间)/min	R1(中性蛋白酶活力)/U·g ⁻¹ 干曲	试验号	A(熟料水分含量)/%	B(熟制温度)/°C	C(熟制时间)/min	R1(中性蛋白酶活力)/U·g ⁻¹ 干曲
1	-1	-1	0	1 706.4	10	0	1	-1	1 452.1
2	1	-1	0	1 600.3	11	0	-1	1	1 856.7
3	-1	1	0	1 620.3	12	0	1	1	1 763.8
4	1	1	0	1 456.3	13	0	0	0	2 412
5	-1	0	-1	1 707.5	14	0	0	0	2 365.7
6	1	0	-1	1 529.7	15	0	0	0	2 370
7	-1	0	1	2 071.3	16	0	0	0	2 406.7
8	1	0	1	1 898.1	17	0	0	0	2 399.3
9	0	-1	-1	1 553					

2.2.2 回归方程的建立与检验 采用 Design-Expert.V8.0.6.1 对表 4 的试验数据进行多元回归拟合,得到中性蛋白酶活力(R1)对熟料水分含量(A)、熟制温度(B)和熟制时间(C)编码值的二次回归方程如下:

$$R1 = 2390.74 - 77.64A - 52.99B + 168.45C - 14.48AB + 1.15AC + 2.00BC - 324.83A^2 - 470.08B^2 - 264.26C^2$$

由表 5 可知,中性蛋白酶活力模型的 F 值为 369.16, $P < 0.0001$,表明模型极显著,该方程能够很好地描述各影响因素与响应值之间的真实关系;失拟项的 P 值为 0.2634,大于 0.05,说明该模型拟合程度较好;模型的决定系数 $R^2 = 0.9909$,校正 $R^2 = 0.9792$,说明该模型可靠性较高,且预测值与实测值之间的相关性良好;综上得出,可用此模型对熟制工艺条件进行优化。由 F 值的大小可知,影响中性蛋白酶活力的因素主次顺序依次为:熟制时间 > 熟料水分含量 > 熟制温度。

2.2.3 回归模型等高线及响应面分析 响应面和二维等高线图可以较直观地反映各种因素间的交

互作用,响应面图的曲面越陡峭表明该因素对响应值的影响越显著,二维等高线图呈现椭圆形表示两因素交互作用显著,圆形则表示交互作用不显著。图 5 可以得出,熟料水分含量(A)、熟制温度(B)和熟制时间(C)对中性蛋白酶活力的影响均显著,熟制温度与熟制时间之间交互作用明显。

2.2.4 响应面优化及验证 依据建立的模型进行优化,得到最佳中性蛋白酶活力时三因素真实值:熟料水分含量 49.394%,熟制温度 94.685 °C,熟制时间 51.553 min,此时预测中性蛋白酶活力为 2 416.483 U/g 干曲。考虑实际操作,修正为熟料水分含量 50%,熟制温度 95 °C,熟制时间 52 min,重复 3 次试验取平均值,得到成曲的中性蛋白酶活力为 2 418.5 U/g 干曲,与模型预测值接近,表明该模型能良好预测实际情况,且经感官评价得到感官评分为 81.9 分。

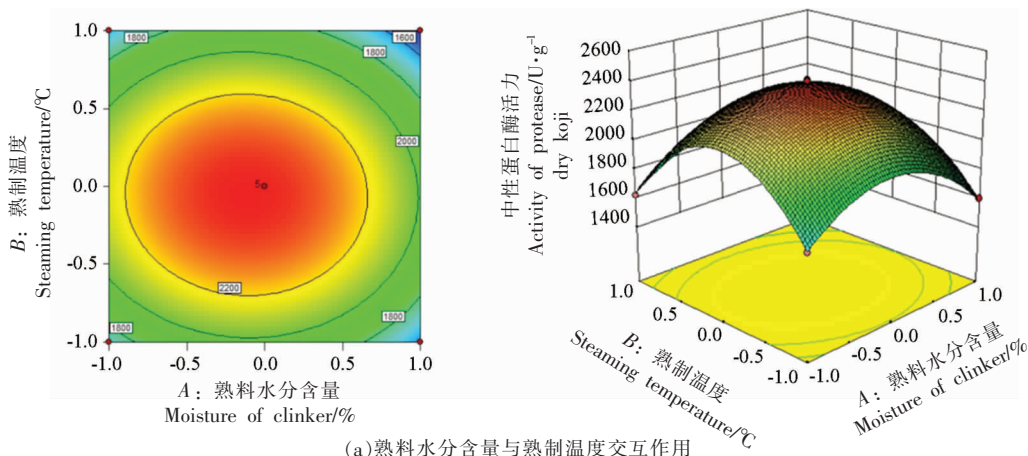
2.3 制曲工艺的单因素实验

2.3.1 环境湿度的确定 由图 6 可知,当制曲湿度在 70%~90%时,成曲的中性蛋白酶活力、糖化酶活力和感官评分均随环境湿度的升高,呈现先

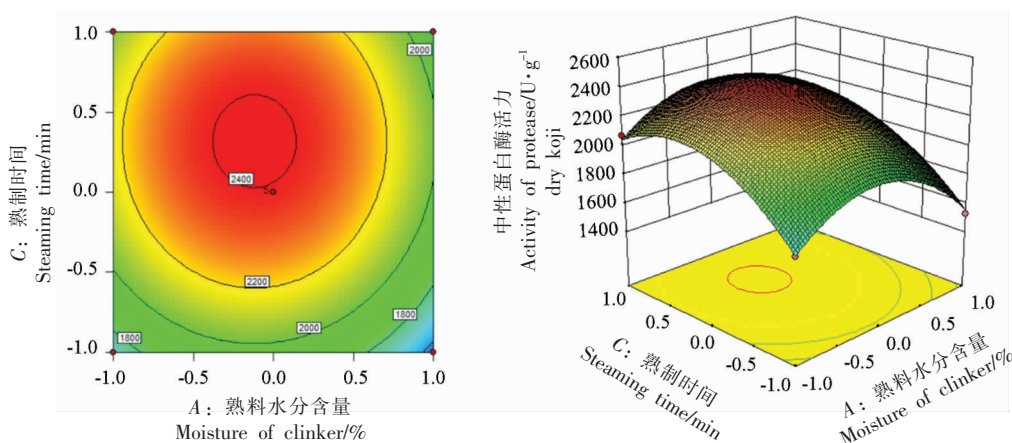
表 5 中性蛋白酶活力方差分析表

Table 5 Variance analysis of neutral protease activity

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2 147 811.46	9	238 645.72	369.16	< 0.0001	极显著
A	48 220.65	1	48 220.65	74.59	< 0.0001	极显著
B	22 461.40	1	22 461.40	34.75	0.0006	极显著
C	227 003.22	1	227 003.22	351.15	< 0.0001	极显著
AB	838.10	1	838.10	1.30	0.2923	
AC	5.29	1	5.29	0.008	0.9305	
BC	16.00	1	16.00	0.025	0.8794	
A ²	444 278.54	1	444 278.54	687.25	< 0.0001	极显著
B ²	930 431.82	1	930 431.82	1439.27	< 0.0001	极显著
C ²	294 029.58	1	294 029.58	454.83	< 0.0001	极显著
残差	4 525.22	7	646.46			
失拟项	2 688.09	3	896.03	1.95	0.2634	不显著
纯误差	1 837.13	4	459.28			
总变异	2 152 336.69	16				



(a) 熟料水分含量与熟制温度交互作用



(b) 熟料水分含量与熟制时间交互作用

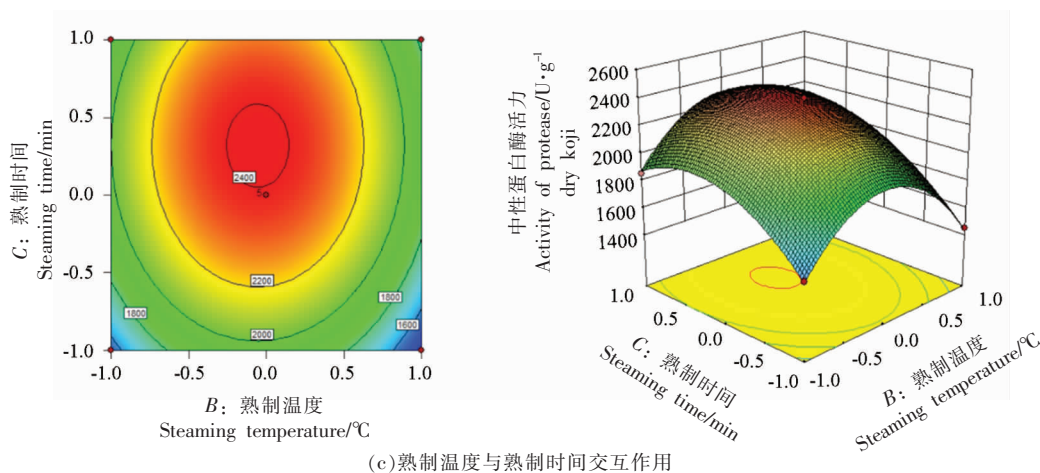


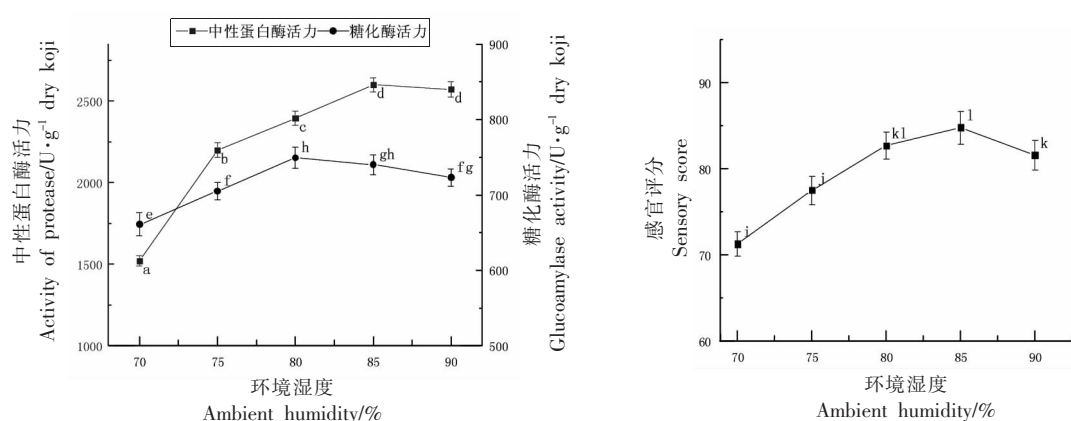
图5 熟制参数对成曲中性蛋白酶活力影响的响应面分析

Fig.5 Response surface and contour diagram of effect of steaming parameters on koji neutral protease activity

升高后降低的趋势, 中性蛋白酶活力和感官评分均在湿度为 85% 时达到最大值, 分别为 $(2\ 600.6 \pm 41.9)$ U/g 干曲和 84.8 ± 1.9 ; 而糖化酶活力在湿度 80% 处出现最大值为 (749.3 ± 14.3) U/g 干曲, 与湿度 85% 时 (740.2 ± 13.4) U/g 干曲差距较小。

这种现象是由于环境湿度保持在适宜的水

平, 可以减慢曲料水分的散失, 使米曲霉一直保持较旺盛的活性, 而环境湿度过高, 会使曲料吸水, 内部黏连, 难以通风, 抑制米曲霉的生长, 容易滋生杂菌甚至变质, 从而导致中性蛋白酶和糖化酶活力下降。综上, 环境湿度控制在 85% 左右为宜。



(a) 环境湿度对成曲中性蛋白酶活力和糖化酶活力的影响

(b) 环境湿度对成曲感官评分的影响

注: 不同字母表示组间存在显著差异 ($P < 0.05$)。

图6 环境湿度对成曲中性蛋白酶活力、糖化酶活力和感官评分的影响

Fig.6 Effect of ambient humidity on koji neutral protease activity, glucoamylase activity and sensory score

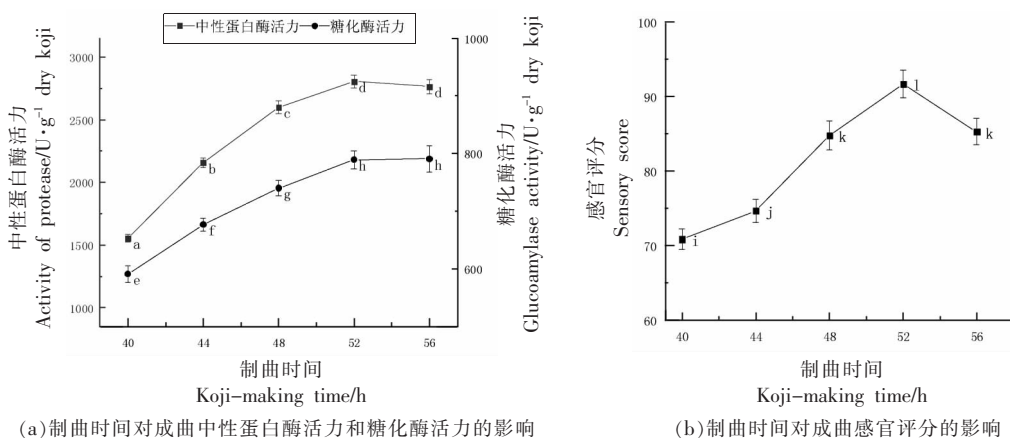
2.3.2 制曲时间的确定 由图 7 可知, 当制曲时间在 40~56 h 时, 成曲的中性蛋白酶活力和感官评分均随制曲时间的延长, 呈先升高后降低的趋势, 且均在 52 h 达到最大值, 分别为 $(2\ 805.8 \pm 50.6)$ U/g 干曲和 91.7 ± 1.8 ; 而糖化酶活力随制曲

时间延长不断升高, 52 h 开始变平缓, 56 h 升至 (791.0 ± 23.0) U/g 干曲, 与 52 h 时 (789.3 ± 15.8) U/g 干曲差距较小。

这说明制曲时间不足, 会导致微生物来不及充分利用原料的营养成分, 达不到最佳的生长效

果,而制曲时间过长,米曲霉进入衰亡期,代谢能力减弱,产酶速率下降,同时已经产生的酶不断失活,导致中性蛋白酶和糖化酶的活力下降,也可能

由于微生物过度繁殖,加剧了对氧气以及曲料中营养成分的竞争所致。综上,制曲时间控制在 52 h 左右为宜。



(a) 制曲时间对成曲中性蛋白酶活力和糖化酶活力的影响

(b) 制曲时间对成曲感官评分的影响

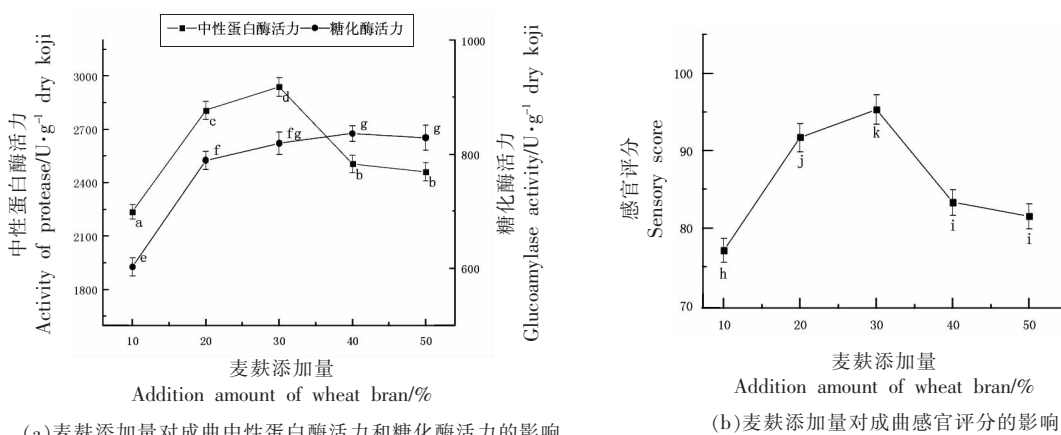
注:不同字母表示组间存在显著差异($P < 0.05$)。

图 7 制曲时间对成曲中性蛋白酶活力、糖化酶活力和感官评分的影响

Fig.7 Effect of koji-making time on koji neutral protease activity, glucoamylase activity and sensory score

2.3.3 麦麸添加量的确定 由图 8 可知,当麦麸添加量在 10%~50%时,成曲的中性蛋白酶活力、糖化酶活力和感官评分均随麦麸添加量的增加,呈先升高后降低的趋势,中性蛋白酶活力和感官评分均在 30%达到最大值,分别为(2 939.2±52.9) U/g 干曲和 95.3±1.9;而糖化酶活力在 40%处出现最大值为(836.4±13.4)U/g 干曲,与 30%时(819.2±19.6)U/g 干曲差距较小。

这是因为麦麸在制曲原料中主要起到通风散热以及保持水分的作用,添加太多会使曲料难以固定水分,且不足以提供微生物生长阶段所需的营养成分^[4],添加太少则不利于散热和通风,曲料吸水变成糊状,阻碍微生物作用,两种情况都会降低米曲霉的产酶能力,导致中性蛋白酶活力和糖化酶活力降低。综上,麦麸添加量控制在 30%左右为宜。



(a) 麦麸添加量对成曲中性蛋白酶活力和糖化酶活力的影响

(b) 麦麸添加量对成曲感官评分的影响

注:不同字母表示组间存在显著差异($P < 0.05$)。

图 8 麦麸添加量对中性蛋白酶活力、糖化酶活力和感官评分的影响

Fig.8 Effect of wheat bran content on neutral protease activity, glucoamylase activity and sensory score

2.4 制曲工艺响应面优化试验

2.4.1 优化试验设计及结果 在单因素实验的基础上,运用 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理^[13],选择环境湿度(A)、制曲时间(B)、麦麸添加

量(C)3个因素作为自变量,以中性蛋白酶活力为指标,研究鸡蛋酱油的制曲工艺参数。因素编码见表6,试验结果详见表7。

表6 Box-Behnken 试验因素水平编码

Table 6 Coding table of factor level for Box-Behnken

编码水平	A(环境湿度)/%	B(制曲时间)/h	C(麦麸添加量)/%
-1	80	48	20
0	85	52	30
1	90	56	40

表7 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 7 Experimental design and results of Box-Behnken

试验号	A(环境湿度)/%	B(制曲时间)/h	C(麦麸添加量)/%	R1(中性蛋白酶活力)/U·g ⁻¹ 干曲	试验号	A(环境湿度)/%	B(制曲时间)/h	C(麦麸添加量)/%	R1(中性蛋白酶活力)/U·g ⁻¹ 干曲
1	-1	-1	0	2 536.2	10	0	1	-1	2 564.7
2	1	-1	0	2 630.2	11	0	-1	1	2 471.8
3	-1	1	0	2 829	12	0	1	1	2 674
4	1	1	0	2 914.9	13	0	0	0	2 912
5	-1	0	-1	2 497.9	14	0	0	0	2 948.5
6	1	0	-1	2 600	15	0	0	0	2 908.3
7	-1	0	1	2 609.2	16	0	0	0	2 939.3
8	1	0	1	2 758.6	17	0	0	0	2 955
9	0	-1	-1	2 316					

2.4.2 回归方程的建立与检验 采用 Design-Expert.V8.0.6.1 对表7的试验数据进行多元回归拟合,得到中性蛋白酶活力(R1)对环境湿度(A)、制曲时间(B)和麦麸添加量(C)编码值的二次回归方程如下:

$$R1 = 2932.62 + 53.93A + 128.55B + 66.88C - 2.03AB + 11.83AC - 11.63BC - 47.62A^2 - 157.42B^2 - 268.57C^2$$

由表8可知,中性蛋白酶活力模型的F值为111.90, $P < 0.0001$,表明模型极显著,该方程能够很好地描述各影响因素与响应值之间的真实关系;失拟项的P值为0.2642,大于0.05,说明该模型拟合程度较好;模型的决定系数 $R^2 = 0.9931$,校正 $R^2 = 0.9842$,说明该模型可靠性较高,且预测值与实测值之间的相关性良好;综上得出,可用此模型对制

曲工艺条件进行优化。由F值的大小可知,影响中性蛋白酶活力的因素主次顺序依次为:制曲时间>麦麸添加量>环境湿度。

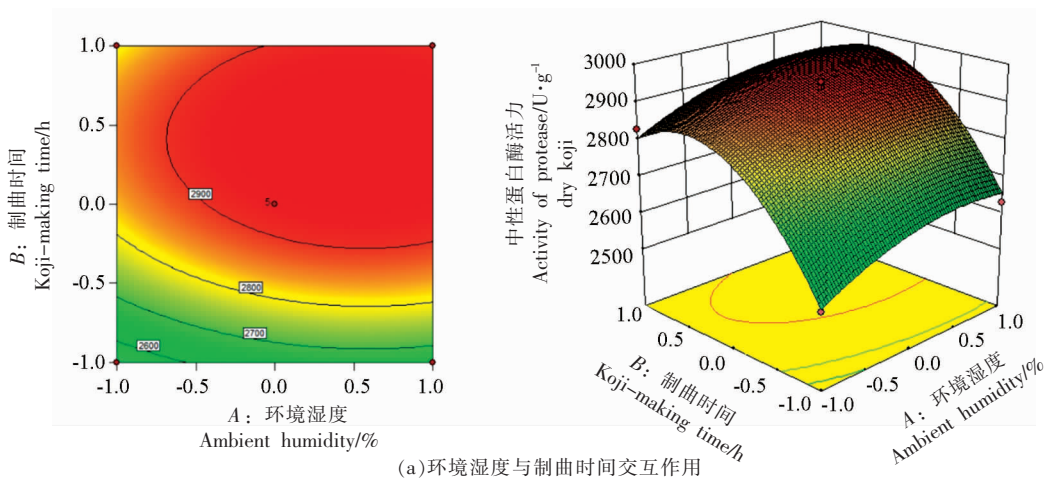
2.4.3 回归模型等高线及响应面分析 由图9可知,环境湿度(A)、制曲时间(B)和麦麸添加量(C)对中性蛋白酶活力的影响均显著,环境湿度与制曲时间、环境湿度与麦麸添加量之间的交互作用明显。

2.4.4 响应面优化及验证 依据建立的模型进行优化,得到最佳中性蛋白酶活力时的三因素真实值:环境湿度86.443%,制曲时间53.898h,麦麸添加量32.353%,此时预测中性蛋白酶活力为2 969.861 U/g干曲。考虑实际操作,修正为环境湿度86%,制曲时间54h,麦麸添加量32%,重复3次试验取平均值,得到成曲的中性蛋白酶活力为

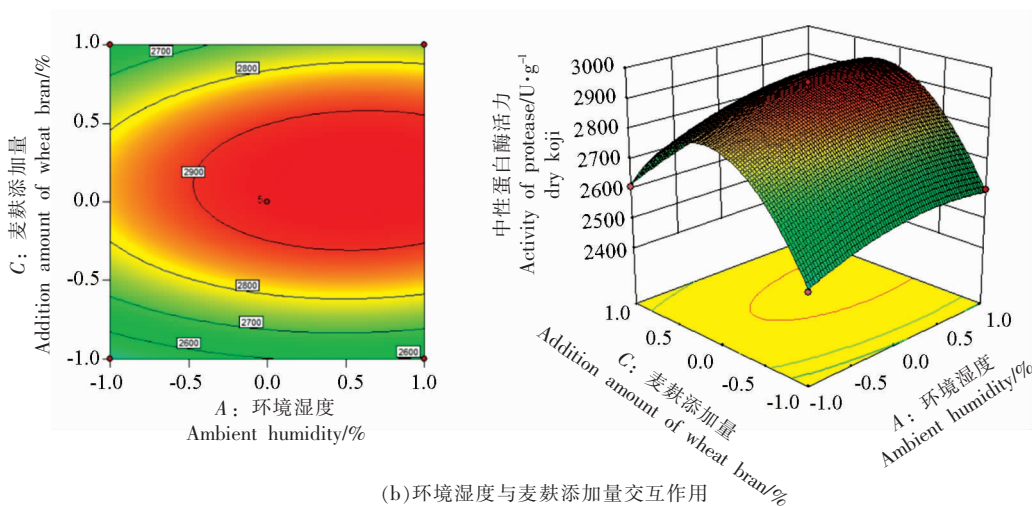
表 8 中性蛋白酶活力方差分析表

Table 8 Variance analysis of neutral protease activity

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	641 861.87	9	71 317.99	111.90	< 0.0001	极显著
A	23 263.25	1	23 263.25	36.50	0.0005	极显著
B	132 200.82	1	132 200.82	207.42	< 0.0001	极显著
C	35 778.13	1	35 778.13	56.14	0.0001	极显著
AB	16.40	1	16.40	0.026	0.8771	
AC	559.32	1	559.32	0.88	0.3801	
BC	540.56	1	540.56	0.85	0.3877	
A ²	9 549.06	1	9 549.06	14.98	0.0061	高度显著
B ²	104 344.60	1	104 344.60	163.72	< 0.0001	极显著
C ²	303 710.26	1	303 710.26	476.52	< 0.0001	极显著
残差	4 461.45	7	637.35			
失拟项	2 647.15	3	882.38	1.95	0.2642	不显著
纯误差	1 814.31	4	453.58			
总变异	646 323.32	16				



(a)环境湿度与制曲时间交互作用



(b)环境湿度与麦麸添加量交互作用

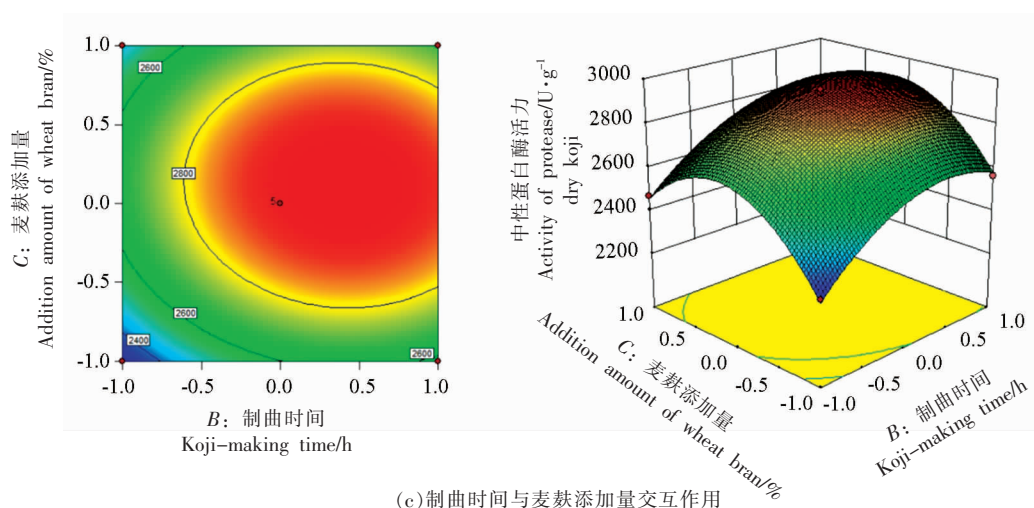


图9 制曲参数对成曲中性蛋白酶活力影响的响应面分析

Fig.9 Response surface and contour diagram of effect of koji-making parameters on koji neutral protease activity

2 970.3 U/g 干曲,与模型预测值接近,表明该模型能良好预测实际情况,且经感官评价得到感官评分为 94.5 分。

2.5 GC-IMS 结果与分析

2.5.1 GC-IMS 谱图分析 分别对最佳条件下制

得的鸡蛋酱油和制作工艺相同的大豆酱油进行测定,如图 10 所示,以鸡蛋酱油图谱(a 图)为参比,扣除与鸡蛋酱油图谱中相同的信号峰得到大豆酱油图谱(b 图),得到二者的差异谱图。如果二者挥发性有机物一致,则扣减后的背景为白色。

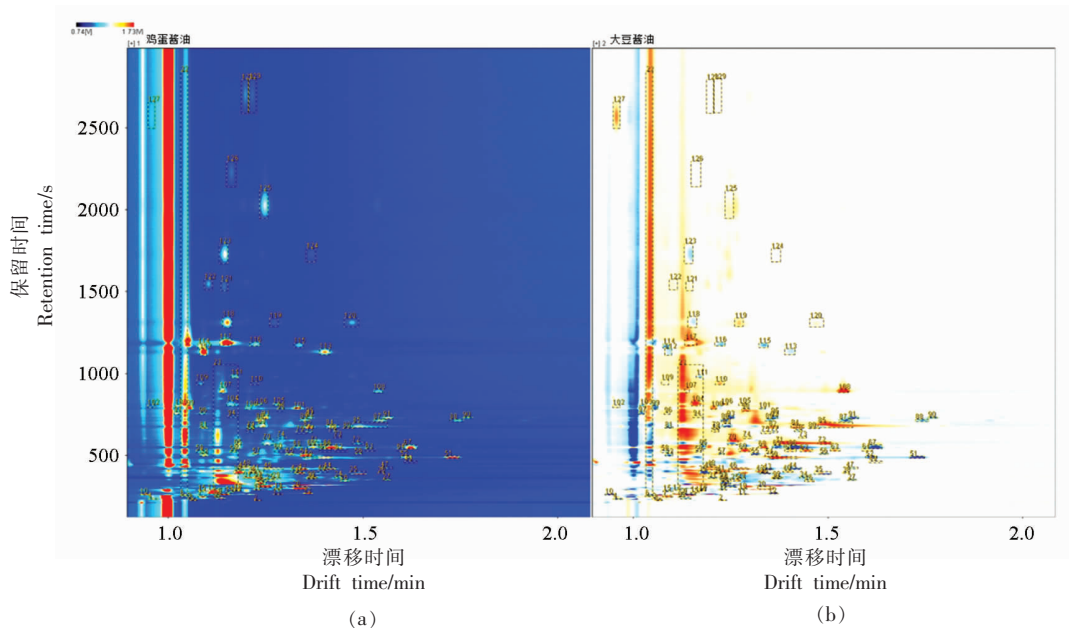


图 10 样品的 GC-IMS 谱图(差异图)

Fig.10 GC-IMS spectrum of the samples (difference diagram)

如图 10 所示,图 10a 中红色区域说明这些物质的浓度在大豆酱油中较鸡蛋酱油高,蓝色区域

说明这些物质浓度在大豆酱油中较鸡蛋酱油低,颜色越深表示差异越大。以鸡蛋酱油谱图为背景

参照,大豆酱油本谱图中出现大量红色和蓝色斑点,这说明两种酱油挥发性物质组成差异较大,大豆酱油中既有含量高于鸡蛋酱油的挥发性物质,也有含量低于鸡蛋酱油的挥发性物质。

两种酱油中共检测出 129 种挥发性组分,定性检出 87 种 VOCs,

见表 9,包括醇类 14 种,酮类 15 种,酯类 16 种,醛类 12 种,吡嗪类 4 种,酸类 2 种,噻唑类 2 种,呋喃类 2 种,蒽类 1 种和含硫化物 1 种。

表 9 鸡蛋酱油和大豆酱油挥发性物质归类

Table 9 Classification of volatile compounds in egg soy sauce and soy sauce

类别	中文名称	英文名称	CAS 号	保留指数	保留时间/s	漂移时间/ms	气味特征
醇类	乙醇(单体)	Ethanol M	64-17-5	938.4	330.309	1.04321	甜香 ^[15]
	乙醇(二聚体)	Ethanol D		974.6	353.647	1.12919	甜香 ^[15]
	正丙醇(单体)	1-Propanol M	71-23-8	1030.4	419.185	1.19556	醇香、成熟水果香 ^[16]
	正丙醇(二聚体)	1-Propanol D		1030.4	419.14	1.25477	醇香、成熟水果香 ^[16]
	丙硫醇	1-Propanethiol	10-70-39	841.7	267.95	1.36111	-
	正丁醇(单体)	1-Butanol M	71-36-3	1122.7	573.76	1.25479	水果、青草 ^[16] 、麦芽 ^[17]
	正丁醇(二聚体)	1-Butanol D		1122.6	573.481	1.37858	水果、青草 ^[16] 、麦芽 ^[17]
	正丁醇(三聚体)	1-Butanol T		1121.5	571.407	1.4867	水果、青草 ^[16] 、麦芽 ^[17]
	异丁醇	2-Methyl-1-propanol	78-83-1	1078.1	485.882	1.36532	杂醇油、酒精味 ^[16]
	仲丁醇(单体)	Butan-2-ol M	78-92-2	1018.5	403.97	1.23142	葡萄酒 ^[15]
	仲丁醇(二聚体)	Butan-2-ol D		1017.7	402.95	1.32956	葡萄酒 ^[15]
	2-甲基丁醇	2-Methylbutanol	13-73-26	1200.9	714.786	1.23488	酒香、洋葱味 ^[15]
	异戊醇(单体)	3-Methylbutanol M	12-35-13	1179.8	679.33	1.24371	臭味、咸味、酒香 ^[18]
	异戊醇(二聚体)	3-Methylbutanol D		1178	676.202	1.42059	臭味、咸味、酒香 ^[18]
	异戊醇(三聚体)	3-Methylbutanol T		1179.8	679.33	1.49024	臭味、咸味、酒香 ^[18]
	3-甲基-2-丁醇	3-Methyl-2-butanol	59-87-54	1139.4	606.598	1.4384	杂醇、发酵、果香 ^[17]
	3-甲基-3-丁醇-1-醇	3-Methyl-but-3-en-1-ol	76-33-26	1214.2	737.267	1.16696	-
	2-戊醇(单体)	2-Pentanol M	603-22-97	1111	550.698	1.17919	焙烤香、甜香、奶油味 ^[18]
	2-戊醇(二聚体)	2-Pentanol D		1110.1	548.815	1.41751	焙烤香、甜香、奶油味 ^[18]
	2-戊醇(三聚体)	2-Pentanol T		1110.8	550.227	1.62508	焙烤香、甜香、奶油味 ^[18]
	1-戊烯-3-醇	1-Penten-3-ol	616-25-1	1201.3	715.441	1.35443	黄油、辛辣 ^[15]
	2-己醇	2-Hexanol	62-69-37	1210.6	731.166	1.56507	树脂、花香、青香 ^[17]
	桉叶油醇	1,8-Cineole	47-08-26	1238.5	778.306	1.29283	薄荷、甜香 ^[19]

(续表 9)

类别	中文名称	英文名称	CAS号	保留指数	保留时间/s	漂移时间/ms	气味特征	
酮类	丙酮	Acetone	67-64-1	846.4	270.972	1.11785	微绿焦糖 ^[16]	
	羟基丙酮	1-Hydroxy-2-propanone	116-09-6	1256	814.079	1.23471	-	
	2-丁酮	2-Butanone	78-93-3	907.1	310.106	1.24843	焦糊味 ^[18]	
	3-羟基-2-丁酮(单体)	3-Hydroxy-2-butanone M	513-86-0	1 245.1	791.033	1.05576	黄油、奶油 ^[15]	
	3-羟基-2-丁酮(二聚体)	3-Hydroxy-2-butanone D		1 243.9	788.292	1.2065	黄油、奶油 ^[15]	
	3-羟基-2-丁酮(三聚体)	3-Hydroxy-2-butanone T		1 243.7	787.95	1.33249	黄油、奶油 ^[15]	
	2-戊酮	2-Pentanone	107-87-9	988.2	365.197	1.37114	甜、水果香 ^[15]	
	3-戊酮	3-Pentanone	96-22-0	1 028.7	416.976	1.34893	甜香 ^[15]	
	4-甲基-2-戊酮	4-Methyl-2-pentanone	10-81-01	1 008.5	391.145	1.48286	甜香 ^[15]	
	2,3-戊二酮	2,3-Pentanedione	60-01-46	1 090.2	509.751	1.22404	黄油、奶油香 ^[16]	
	4-甲基-3-戊烯-2-酮	4-Methyl-3-penten-2-one	141-79-7	1 101.2	531.401	1.44698	甜香、化学品 ^[15]	
	环己酮	Cyclohexanone	10-89-41	1 255.2	812.421	1.15773	-	
	5-甲基-3-庚酮	5-Methyl-3-heptanone	54-18-55	1 255.5	813.019	1.28311	-	
	6-甲基-5-庚烯-2-酮	6-Methylhept-5-en-2-one	110-93-0	1 334.7	981.575	1.17274	胡椒、蘑菇、橡胶 ^[15]	
	呋喃酮	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one	3658-77-3	2 144.1	2 703.359	1.19911	焦糖香 ^[15]	
	普油酮	5-Ethyl-4-hydroxy-2-methyl-3(2H)-furanone	27538-09-6	2 144.3	2 703.761	1.21627	棉花糖、甜香 ^[15]	
	酯类	2-甲基四氢呋喃-3-酮	Dihydro-2-methyl-3(2H)-furanone	318-800-9	1 315.4	940.463	1.08452	焦甜香 ^[19]
		丁酸甲酯	Methyl butanoate	62-34-27	990.1	367.598	1.44001	苹果香 ^[20]
		2-甲基丁酸甲酯	Methyl 2-methylbutanoate	86-85-75	1 010.7	393.969	1.5482	苹果香 ^[15]
		乙酸乙酯	Ethyl acetate	14-17-86	892.9	300.946	1.33989	水果香、酒香 ^[16]
2-甲基丁基乙酸酯		2-Methylbutyl acetate	62-44-19	1 079.1	487.907	1.73586	水果香 ^[15]	
丙酸乙酯(单体)		Ethyl propanoate M	10-53-73	962.1	345.622	1.26728	菠萝、微涩似芝麻 ^[21]	
丙酸乙酯(二聚体)		Ethyl propanoate D		963.1	346.234	1.45884	菠萝、微涩似芝麻 ^[21]	
丁酸乙酯		Ethyl butanoate	10-55-44	1 040.2	431.703	1.20328	玫瑰、菠萝香 ^[16]	
异丁酸乙酯		Ethyl 2-methylpropanoate	97-62-1	971.6	351.742	1.56736	甜、果香 ^[20]	
丙烯酸乙酯		Ethyl acrylate	14-08-85	1 029.6	418.119	1.41763	-	
2-甲基戊酸乙酯		Ethyl 2-methylpentanoate	392-553-28	1 140.9	609.492	1.29274	-	
醋酸异丙酯		1-methylethyl acetate	10-82-14	853.2	275.367	1.16062	-	
乙酸丁酯		Butyl acetate	12-38-64	1 061.8	459.391	1.6238	香蕉、水果香 ^[16]	
丁酸 2-甲基丁酯		Butyl 2-methylbutanoate	157-067-37	1 221.9	750.34	1.36727	水果、可可 ^[15]	
丙酸异丁酯		Isobutyl propionate	54-04-21	1 100.1	529.209	1.28512	-	

(续表 9)

类别	中文名称	英文名称	CAS号	保留指数	保留时间/s	漂移时间/ms	气味特征
	乙酸戊酯	Amyl acetate	62-86-37	1 210.6	731.166	1.77286	甜香 ^[16]
	γ -丁内酯	Tetrahydro-2-furanone	96-48-0	1 604.9	1 556.381	1.1034	桃子香 ^[21]
	丙位庚内酯	4-Heptanolide	10-52-15	1 826.4	2 027.548	1.25197	焦糖、甜香 ^[19]
醛类	苯甲醛(单体)	Benzaldehyde M	10-05-27	1 492.9	1 318.2	1.15237	杏仁香、蔗糖香 ^[23]
	苯甲醛(二聚体)	Benzaldehyde D		1 490.7	1 313.325	1.27365	杏仁香、蔗糖香 ^[23]
	苯甲醛(三聚体)	Benzaldehyde T		1 490.7	1 313.325	1.47392	杏仁香、蔗糖香 ^[23]
	丙醛	Propanal	12-33-86	828.1	259.159	1.14458	青香、可可、咖啡香 ^[24]
	3-甲硫基丙醛(单体)	Methional M	326-84-93	1 406.8	1 134.9	1.09413	腐臭味 ^[22]
	3-甲硫基丙醛(二聚体)	Methional D		1 406.8	1 134.9	1.4037	腐臭味 ^[22]
	正丁醛	Butanal	12-37-28	886.4	296.794	1.28359	刺激性青香 ^[16]
	异丁醛	2-Methyl propanal	78-84-2	837.9	265.478	1.28426	青草、麦芽香 ^[16]
	3-甲基-2-丁烯醛	3-Methyl-2-butenal	107-86-8	1 211.4	732.477	1.36297	青香、水果 ^[15]
	正戊醛	Valeraldehyde	11-06-23	1 013.2	397.237	1.18236	似坚果、苦杏仁、辛香 ^[16]
	反式-2-戊烯醛(单体)	(E)-2-pentenal M	157-68-70	1 174	669.496	1.09506	草莓、水果、番茄味 ^[15]
	反式-2-戊烯醛(二聚体)	(E)-2-pentenal D		1 176.2	673.151	1.36242	草莓、水果、番茄味 ^[15]
	正己醛	Hexanal	66-25-1	1 032	421.281	1.56341	果香、青香、青草香 ^[16]
	庚醛	Heptanal	11-17-17	1 156.7	640.255	1.34213	香脂味、柑橘香 ^[25]
	反式-2-辛烯醛	(E)-2-octenal	254-88-70	1 426.2	1 176.163	1.33815	青香、坚果、油脂味 ^[26]
	糠醛	Furfural	98-01-1	1 422.4	1 168.05	1.08774	甜香、蔗糖香 ^[27]
吡嗪类	2-甲基吡嗪	Methylpyrazine	10-90-80	1 225.2	755.814	1.08859	爆米花 ^[15]
	2,6-二甲基吡嗪(单体)	2,6-Dimethylpyrazine M	10-85-09	1 296.9	901.034	1.13914	烤坚果、可可、烤牛肉 ^[15]
	2,6-二甲基吡嗪(二聚体)	2,6-Dimethylpyrazine D		1 293.1	893.114	1.54127	烤坚果、可可、烤牛肉 ^[15]
	2,3-二甲基-5-乙基吡嗪	2,3-Dimethyl-5-ethylpyrazine	157-073-43	1 428.3	1 180.725	1.22737	焦香、爆米花 ^[15]
	2-乙酰吡嗪	2-Acetylpyrazine	220-472-52	1 591.7	1 528.252	1.14375	焙烤香 ^[15]
酸类	醋酸	Acetic acid	64-19-7	1 429.8	1 183.807	1.14544	刺激性酸味 ^[16]
	丁酸(单体)	Butanoic acid M	10-79-26	1 689.2	1 735.706	1.14742	酸味、奶酪味 ^[15]
	丁酸(二聚体)	Butanoic acid D		1 685.9	1 728.674	1.36935	酸味、奶酪味 ^[15]
噻唑类	噻唑	Thiazole	28-84-71	1 251.6	804.738	1.02583	-
	苯并噻唑	Benzothiazole	95-16-9	1 917.3	2 220.937	1.16209	汽油、橡胶味 ^[15]
咪唑类	2-正戊基咪唑	2-Pentylfuran	377-76-93	1 211.7	733.132	1.24911	青豆味、黄油味 ^[28]
	四氢呋喃	Tetrahydrofuran	109-99-9	876.7	290.476	1.23146	-
萜类	萜品油烯	Terpinolene	58-66-29	1 316	941.715	1.22288	松香味 ^[25]
含硫化物	二甲基硫	Dimethyl sulfide	75-18-3	791	235.175	0.96118	卷心菜、硫磺味 ^[29]

注:“-”表示在两种酱油中,气味不明显。

结合图 10 和表 9 的数据得出,大豆酱油中的特征成分为仲丁醇、3-甲基-2-丁醇、桉叶油醇、丙酸异丁酯、2-甲基丁酸甲酯、乙酸丁酯、4-甲基-3-戊烯-2-酮等物质,主要赋予了大豆酱油甜香、水果香、葡萄酒香、化学品味和薄荷味。鸡蛋酱油特征成分为 1-戊烯-3-醇、2-己醇、2-甲基丁醇、2-戊醇、2,3-戊二酮、3-戊酮、2-甲基丁基乙酸酯、乙酸戊酯、丙烯酸乙酯、丁酸甲酯、四氢呋喃、糠醛、己醛、反式-2-辛烯醛、丁酸等物质,主要赋予了鸡蛋酱油甜香、水果香、奶油香、酒香、焙烤香、焦糖香、青香、酸味、辛辣味和奶酪味。

2.5.2 PCA 分析 运用 FlavourSpec® 风味分析仪自带的 Dynamic PCA 插件,对鸡蛋酱油和大豆酱油中挥发性有机物质进行动态主成分分析。从图 11 可以看出,两种样品分布区域不重叠(椭圆框内为大豆酱油的样品分布区域,矩形框内为鸡蛋酱油的样品分布区域),说明两种样品的挥发性风味物质差异明显。PC1 的主成分贡献率为 96%,说明能够很好地反映原始数据的大部分信息。

3 结论

以米曲霉为菌种,原料熟制的各因素对成曲的中性蛋白酶活力均有显著影响,主次顺序为熟制时间>熟料水分含量>熟制温度,最佳熟制工艺条件为:熟料水分含量 50%,熟制温度 95℃,熟制时间 52 min,得到成曲的中性蛋白酶活力达到 2 418.5 U/g 干曲,经感官评价得到感官评分为 81.9 分,且熟制温度与熟制时间之间存在一定的交互作用。熟料消化率与成曲的中性蛋白酶活力的变化趋势不总是一致的。

制曲的各因素对成曲的中性蛋白酶活力均有显著影响,主次顺序为制曲时间>麦麸添加量>环境湿度,最佳制曲工艺条件为:环境湿度 86%,制曲时间 54 h,麦麸添加量 32%,得到成曲的中性蛋白酶活力达到 2 970.3 U/g 干曲,经感官评价得到感官评分为 94.5 分,环境湿度与制曲时间、环境湿度与麦麸添加量之间存在一定的交互作用。

通过 GC-IMS 相关数据分析,与大豆酱油相比,鸡蛋酱油特征风味成分为 1-戊烯-3-醇、2-己醇、2-甲基丁醇、2-戊醇、2,3-戊二酮、3-戊酮、2-甲基丁酸甲酯、乙酸戊酯、丙烯酸乙酯、丁酸甲酯、

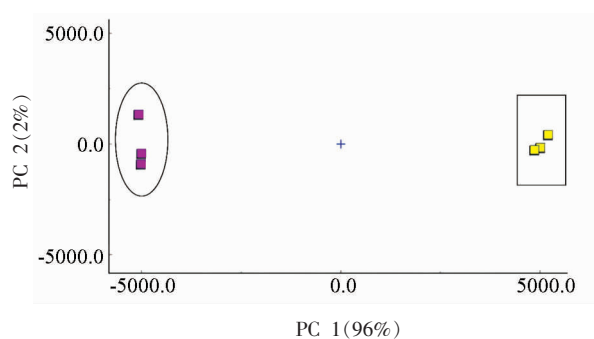


图 11 样品的 PCA 分析

Fig.11 PCA analysis of the samples

四氢呋喃、糠醛、己醛、反式-2-辛烯醛、丁酸等物质。PCA 分析结果显示,鸡蛋酱油和大豆酱油分布区域不重叠,表明两种酱油风味物质差异较大。

试验结果表明采用鸡蛋制作酱油曲是可行的,为后续制作鸡蛋酱油打下了基础,扩充了蛋制品和酱油的种类。

参 考 文 献

- [1] 张艳芳. 多菌株制曲促进酶系优化与提高酱油质量的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
ZHANG Y F. Study on optimizing enzyme system by using multi-strains during koji making and improving quality of soy sauce[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009.
- [2] 贾爱娟. 提高高盐稀态法酿造酱油原料蛋白质利用率及氨基酸出品率的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
JIA A J. Research on enhancing the protein utilizable ratio and amino acid productive rate from the soy sauce by high-salt diluted state fermentation[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2006.
- [3] 姚永明. 酱油制曲与发酵工艺的实验研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2006.
YAO Y M. Experimental research on koji-making and fermentation in the process of soy sauce [D]. Jilin: Jilin University, 2006.
- [4] 李国平, 姬玉梅. 粮油食品加工技术[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 2017: 247.
LI G P, JI Y M. Processing technology of cereal and oil food[M]. Chongqing: Chongqing University Press, 2017: 247.
- [5] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理

- 理总局. 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, 2017: 1-5.
- National Health and Family Planning Commission, China Food and Drug Administration. National Standard for food safety, determination of moisture in food; GB 5009.3-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017: 1-5.
- [6] 国家国内贸易局. 商业标准 熟料消化率测定法: SB/T 10319-1999[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999: 237-238.
- State Bureau of Internal Trade. Commercial Standard, method for determination of clinker digestibility, SB/T 10319-1999[S]. Beijing: Standards Press of China, 1999: 237-238.
- [7] 国家国内贸易局. 商业标准 蛋白酶活力测定法: SB/T 10317-1999[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999: 230-234.
- State Bureau of Internal Trade. Commercial Standard, method for determination of protease activity: SB/T 10317-1999[S]. Beijing: Standards Press of China, 1999: 230-234.
- [8] 轻工业部. 轻工标准 工业酶制剂通用试验方法 QB/T 1803-1993[S]. 北京: 中国标准出版社, 1994: 117-135.
- Ministry of Light Industry. Standard for light industry, general test methods for industrial enzyme preparations: QB/T 1803-1993[S]. Beijing: Standards Press of China, 1994: 117-135.
- [9] 国家国内贸易局. 商业标准 孢子数测定法: SB/T 10315-1999[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999: 226-227.
- State Bureau of Internal Trade. Commercial standard, spore count method: SB/T 10315-1999[S]. Beijing: Standards Press of China, 1999: 226-227.
- [10] 国家质量技术监督局. 国家标准 酿造酱油 GB/T 18186-2000[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021: 1-4.
- State Bureau of Quality and Technical Supervision. National standards, brewing soy sauce: GB/T 18186-2000[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021: 1-4.
- [11] 韩亚芬, 程永强, 纪凤娣, 等. 低盐固态酱油原料熟制过程中蛋白质变性的研究[J]. 中国调味品, 2015, 40(2): 66-71.
- HAN Y F, CHENG Y Q, JI F D, et al. Protein denaturation during the steaming process of low-salt solid-state soy sauce[J]. China Condiment, 2015, 40(2): 66-71.
- [12] 马爱进, 孙纪录, 贾英明, 等. 论提高酱油原料蛋白质利用率的途径[J]. 中国调味品, 2000(6): 3-5.
- MA A J, SUN J L, JIA Y M, et al. Discussion on the ways of improving the utilization ratio of soy sauce raw material protein [J]. China Condiment, 2000(6): 3-5.
- [13] 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.
- [14] 杨铭铎, 董继生, 李国栋, 等. 膨化原料在酱油种曲中的应用[J]. 食品与发酵工业, 1989(3): 30-39.
- YANG M D, DONG J S, LI G D, et al. Application of expanded raw materials in soy sauce koji[J]. Food and Fermentation Industry, 1989(3): 30-39.
- [15] Flavornet and human odor space [EB/OL].(2022-01-07) [2020-06-12]. <http://www.flavornet.org/flavornet.html>.
- [16] 范文来, 徐岩. 酒类风味化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2019: 3.
- FAN W L, XU Y. Flavor chemistry of alcohol[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2019: 3.
- [17] WANG Y H, ZHAO J W, XU F, et al. GC-MS, GC-O and OAV analyses of key aroma compounds in Jiaozi steamed bread[J]. Grain & Oil Science and Technology, 2020, 3(1): 9-17.
- [18] 周轩. 浓香型白酒基酒挥发性成分分析及等级识别研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2019.
- ZHOU X. Analysis of volatile compounds of strong-flavor base liquor and study on grade recognition[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2019.
- [19] 范丽, 徐晓东, 宋泽, 等. 自制调味汁烹饪红烧肉中关键香气活性化合物的分析研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(7): 245-253, 230.
- FAN L, XU X D, SONG Z, et al. Study on preparation of braised sauce and its application research on braised pork[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(7): 245-253, 230.
- [20] 项攀. 芒果香气化合物协同作用研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2020.

- XIANG P. Study on the perceptual interactions among odorants in mangoes[D]. Shanghai: Shanghai Institute of Technology, 2020.
- [21] 贾智勇. 中国白酒勾兑宝典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2017: 9.
- JIA Z Y. The Chinese liquor blending book[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2017: 9.
- [22] RAY M. 风味, 香气和气味分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2020: 10.
- RAY M. Flavor, aroma and odor analysis[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2020: 10.
- [23] WANG Q S, CHEN D, ZHANG Q W, et al. Volatile components and nutritional qualities of *Viscum articulatum* Burm. f. parasitic on ancient tea trees[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(9): 3017–3029.
- [24] 孙宝国. 食用调香术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 203.
- SUN B G. Flavoring of food[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 203.
- [25] 高歌, 庞雪莉, 刘海华, 等. 基于 GC-MS-O 香气成分分析和多元统计分析的柚子品种鉴别[J]. 中国食品学报, 2020, 20(5): 283–292.
- GAO G, PANG X L, LIU H H, et al. Volatiles identification of pomelo based on GC-MS-O and multivariate statistical analysis[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(5): 283–292.
- [26] MAKKUMRAI W, HUANG Y, XU Q. Comparison of pomelo (*Citrus maxima*) grown in China and Thailand[J]. Frontiers of Agricultural Science and Engineering, 2021, 8(2): 335–352.
- [27] 张玉玉, 宋弋, 李全宏. 食品中糠醛和 5-羟甲基糠醛的产生机理、含量检测及安全性评价研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(5): 275–280.
- ZHANG Y Y, SONG Y, LI Q H. A review on formation mechanism, determination and safety assessment of furfural and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in foods[J]. Food Science, 2012, 33(5): 275–280.
- [28] YANG P, ZHENG Y Y, YOU M C, et al. Characterization of key aroma-active compounds in four commercial egg flavor Sachimas with differing egg content[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(12): 1–15.

Optimization of Steaming and Koji-Making Conditions and Analysis of Volatile Components in Egg Soy Sauce

Che Ying¹, Chu Yanjun¹, Tian Xiao¹, Lü Ying², Zhi Xiujian², Tong Qigen^{3*}

¹College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206

²Beijing Key Laboratory of Food Quality and Safety, Beijing 100022

³Beijing Engineering Center for Egg Safety Production and Processing, Beijing 100094

Abstract In order to develop egg soy sauce, *Aspergillus oryzae* HN3.042 was used for Koji-making, and the processing conditions were optimized by single factor and response surface methods. The volatile organic compounds (VOCs) in egg sauce were studied by GC-IMS. The results showed that the optimum conditions of raw material steaming were as follows: moisture content of the raw material was 50%, temperature of the raw material was 95 °C, and time of raw material steaming was 52 min. Under these conditions, the neutral protease activity was 2 418.5 U/g, and the sensory score was 81.9. The optimum conditions for Koji-making were as follows: ambient humidity was 86%, time of Koji-making was 54 h, addition amount of wheat bran was 32%. Under these conditions, the neutral protease activity was 2 970.3 U/g, and the sensory score was 94.5. The results of GC-IMS analysis showed that there were 87 kinds of Volatile organic compounds in egg soy sauce, including esters, alcohols, ketones, aldehydes. The flavor components of egg soy sauce are different from that of soybean soy sauce. The relative main flavor components of egg soy sauce are 1-pentene-3-ol, 2-hexanol, 2-methyl-butanol, 2-pentanol, 2, 3-pentanedione, 3-pentanone, methyl 2-methyl butyrate, pentyl acetate, ethyl acrylate, methyl butyrate, oxolane, furfural, hexanal, trans-2-octenonal, butyric acid and other substances. The results showed that it is feasible to make soy sauce koji with eggs, which laid a foundation for the subsequent fermentation of egg soy sauce.

Keywords egg soy sauce; process optimization; gas chromatography-ion mobility spectrometry (GC-IMS); volatile organic compounds (VOCs)