

鸭蛋酱的双菌种制曲工艺

丁琦¹, 孙汉巨^{1,*}, 赵红², 朱兆娜¹, 陈哲¹, 石娟¹

(1.合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009; 2.合肥市第六中学, 安徽 合肥 230061)

摘要: 将鸭蛋蛋液用动物蛋白水解酶酶解后, 添加黄豆、面粉制作鸭蛋酱, 并通过正交试验对鸭蛋酱制曲的条件进行优化。采用米曲霉与黑曲霉混合菌种制曲, 并通过对制曲过程中蛋白酶活力变化的分析, 确定混合菌种发酵鸭蛋酱的最佳制曲温度、制曲时间、鸭蛋添加量及米曲霉与黑曲霉的配比。结果表明: 最佳制曲条件是制曲温度 30℃, 鸭蛋添加量 30%, 米曲霉与黑曲霉的质量比为 3:1, 制曲时间 48h, 在此条件下, 蛋白酶的活力最高, 达到 1465.81U/g。

关键词: 米曲霉; 黑曲霉; 双菌种; 制曲; 蛋白酶活力

Process Optimization for Making Double Mold Koji for Duck Egg Sauce

DING Qi¹, SUN Han-ju^{1,*}, ZHAO Hong², ZHU Zhao-na¹, CHEN Zhe¹, SHI Juan¹

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

2. Hefei Sixth Middle School, Hefei 230061, China)

Abstract: Liquid whole duck egg was hydrolyzed by a special-purpose commercial multi-enzyme complex for the hydrolysis of animal proteins and then used to make duck egg sauce with the additions of soybean powder and wheat flour by koji fermentation. Mixed cultures containing *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* were employed for koji making. The koji-making conditions were optimized using orthogonal array design and neutral protease activity was measured during the process. The optimal koji-making conditions were determined to be: 30% (*m/m*) duck egg hydrolysate, 3:1 *Aspergillus oryzae* to *Aspergillus niger* ratio, and cultivation at 30 °C for 48 h. Under these conditions, the protease activity reached 1465.81 U/g dry material.

Key words: *Aspergillus oryzae*; *Aspergillus niger*; double strains; koji making; protease activity

中图分类号: TS253.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0197-04

我国是世界蛋鸭饲养大国, 年产鸭蛋约 350 万 t。目前, 鸭蛋制品主要以松花皮蛋、咸蛋等初级加工产品为主。由于产品品种少, 质量参差不齐, 资源综合利用水平低, 技术创新空间有限, 造成产品附加值极低, 严重挫伤相关企业及蛋鸭养殖户的生产积极性。因此, 大力推进禽蛋的深加工, 积极开发附加值高, 市场前景广阔的新产品, 对发展我国的禽蛋产业, 具有重要的经济和社会效益^[1]。

制酱在我国具有悠久的历史, 其制品不仅营养丰富, 而且易被消化吸收, 深受大众的喜爱。然而, 传统的酱品生产原料主要是蚕豆、大豆、小麦等植物, 产品较为单一, 难以满足多样化的市场需求。利用蛋品作为调味品发酵的原料, 可以大大提高蛋品的综合利用效益, 增加调味品的营养价值, 丰富其产品种类,

并提高鸭蛋的附加值。制曲是酱品酿造的关键环节, 在其期间曲霉在原料上生长繁殖, 分泌大量的蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等, 将大分子的蛋白质、淀粉转化为小分子的氨基酸和糖类, 制曲过程赋予酱品氨基态氮、色泽和风味。良好的曲是酿造出高品质酱品的先决条件^[2]。我国传统的酿造应用米曲霉制曲, 菌种较为单一, 产品风味单调, 且原料的利用率低^[3-4]。采用米曲霉与黑曲霉混合制曲, 不仅丰富蛋白酶的酶系, 从而提高原料中蛋白质的利用率, 改善产品的风味^[5-7]。Sugiyama^[8]指出, 利用米曲霉和酱油曲霉混合制曲酿造酱油能产生较多的蛋白酶和淀粉酶, 还可以提高原料利用率。戴德慧等^[9]利用红曲霉、黑曲霉、米曲霉等菌种制备米渣酱油曲, 温度为 31℃, 米渣接入红曲霉培养 4d 后, 再添加质量分数 5% 米曲霉和 5% 黑曲霉混合菌种, 培养

收稿日期: 2011-01-20

基金项目: 安徽省 2008 年重大科技专项(08010302085)

作者简介: 丁琦(1984—), 男, 硕士, 研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: dingqi0524@163.com

* 通信作者: 孙汉巨(1966—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: sunhanju@163.com

2d后,中性蛋白酶活力达到2521U/g干曲。王素珍^[10]利用米曲霉与黑曲霉分别制曲,然后混合,原料蛋白质利用率较米曲霉单独制曲提高了12%。

目前,鲜有利用鸭蛋制酱的研究报道。本研究探索性利用米曲霉及黑曲霉混合发酵制曲,通过对曲料中蛋白酶活力的变化分析,研究制曲温度、制曲时间、鸭蛋添加量及米曲霉与黑曲霉的质量比对制曲效果的影响,并通过单因素及正交试验得出鸭蛋酱制曲的最佳工艺条件,为酿造营养丰富,口味独特的新型酱品——鸭蛋酱提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种来源

米曲霉(沪酿3.042曲精)、黑曲霉(AS3.758曲精)均购于北京食品酿造研究所菌种站。

1.2 材料与试剂

鸭蛋、黄豆 安徽省合肥市周谷堆农贸市场;动物蛋白水解酶(酶活力 $\geq 200\text{U}/\text{mg}$) 广西南宁庞博生物工程有限公司;Folin试剂、三氯乙酸、碳酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等均为分析纯;酪氨酸、干酪素均为生化试剂。

1.3 仪器与设备

722E型可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司;HH-2数显恒温水浴锅 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;电热鼓风干燥箱 上海试验仪器有限公司;YXQ.SG41.280B电热蒸汽灭菌锅 上海医用核子仪器厂;FA1004型电子天平 上海精科天平有限公司;DHZ-DA型恒温电热培养箱 太仓市实验设备厂。

1.4 方法

1.4.1 水分测定

采用GB 5009.3—2010《食品中水分的测定》恒温干燥法测定。

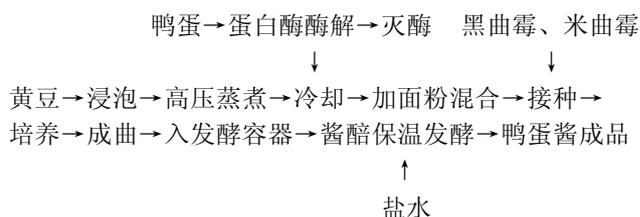
1.4.2 酱曲中蛋白酶活力测定

采用福林法^[11]测定。

1.4.3 酪氨酸标准曲线的制备。

将酪氨酸在105℃烘箱中烘至质量恒定,精确称取100.0mg,放入烧杯中,逐步加入1mol/L盐酸6mL使其溶解,用0.2mol/L盐酸定容至100mL,其质量浓度为1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。吸取此溶液10.0mL,用0.2mol/L盐酸定容至100mL,即成100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准液。分别移取标准液0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0mL加入10mL容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,在660nm波长处测吸光度($A_{660\text{nm}}$),以蒸馏水为空白对照。以吸光度(A)为横坐标,以酪氨酸质量浓度(ρ)为纵坐标,绘制标准曲线回归方程为: $\rho = 100.68A - 0.8602 (R^2 = 0.9995)$ 。

1.5 工艺流程



1.6 操作要点

鸭蛋预处理:将鸭蛋洗净、去壳,搅拌均匀,在60℃条件下,添加鸭蛋质量分数0.2%的动物蛋白水解酶,水解4h后,在95℃条件下加热20min钝化酶。

黄豆的预处理:将黄豆去杂、洗净后,加5~8倍体积的纯净水,在室温下浸泡8h,再在高温高压(121℃、0.1MPa)条件下蒸煮20min,再在室温下冷却至40℃以下。

混合:将鸭蛋与黄豆混匀,添加30%面粉(以干黄豆质量计),再添加0.8%米曲霉和黑曲霉(以干黄豆和面粉总质量计),最后将所有原料混合均匀。

培养:在25~40℃条件下培养36~60h。

酶活力测定:在原料中接种质量分数0.8%米曲霉和黑曲霉(两者的质量比为3:1、2:1、1:1、1:2)后,每隔12h测定原料中中性蛋白酶的活力。

1.7 正交试验确定各制曲条件对蛋白酶活力的影响

考察制曲时间、鸭蛋添加量(以干黄豆和面粉总质量计)、制曲温度、菌种的配比对酱曲中蛋白酶活力的影响。在单因素试验的基础上,设计四因素三水平 $L_9(3^4)$ 的正交试验,以蛋白酶活力为评价指标,确定影响最显著的因素,因素水平见表1。

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters involved in orthogonal array design

水平	A 制曲时间/h	B 鸭蛋添加量/%	C 制曲温度/℃	D 米曲霉与黑曲霉质量比
1	36	30	25	1:1
2	48	40	30	2:1
3	60	50	35	3:1

2 结果与分析

2.1 制曲时间对酱曲中蛋白酶活力的影响

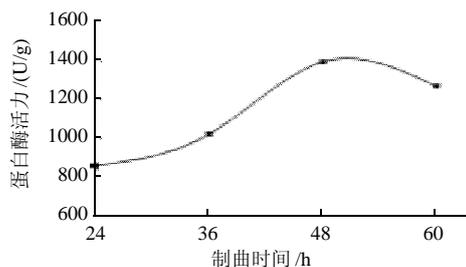


图1 制曲时间对酱曲蛋白酶活力的影响

Fig.1 Effect of cultivation time on koji protease activity

选择鸭蛋的添加量为30%，米曲霉与黑曲霉的质量配比为3:1，在30℃条件下，制曲时间24~60h，每隔12h取样，测定蛋白酶的酶活力，结果见图1。在制曲的前48h，随着时间的延长，蛋白酶的活力逐渐增加。在该阶段，曲霉快速生长，分泌蛋白酶逐渐增多；到48h时，酱曲中蛋白酶活力达到最高值，为1398.15U/g(占干曲质量，下同)；之后，随着时间的延长，蛋白酶活力逐渐下降。造成该现象的原因可能是米曲霉与黑曲霉过度繁殖，加剧了对原料中可利用的营养物质、水分及氧气的竞争，影响蛋白酶的产生^[12]。因此，最终确定鸭蛋酱制曲的最佳时间为48h。

2.2 鸭蛋添加量对酱曲中蛋白酶活力的影响

选择米曲霉与黑曲霉的质量比为3:1，鸭蛋的添加量分别为20%、30%、40%、50%，在30℃条件下培养48h后，检测蛋白酶的活力，结果见图2。

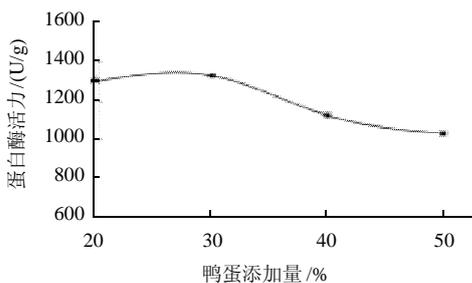


图2 鸭蛋添加量对酱曲蛋白酶活力的影响

Fig.2 Effect of duck egg hydrolysate amount on koji protease activity

由图2可知，随着鸭蛋添加量的增加，蛋白酶的活力逐渐增加，当鸭蛋添加量为30%时，蛋白酶活力达到最大值，为1354.86U/g。之后，随着鸭蛋添加量的进一步增加，蛋白酶的活力逐渐降低。鸭蛋添加量对蛋白酶活力的影响可解释如下：一定量的鸭蛋的添加，赋予原料中更多的蛋白质、脂肪、糖类、维生素及矿物质等营养成分，促进米曲霉与黑曲霉分泌大量蛋白酶，因此蛋白酶的活力逐渐增加；然而，随着鸭蛋的进一步增加，物料中的水分含量逐渐增加，氧气的运输途径被逐渐阻断，影响曲霉分泌蛋白酶，从而影响鸭蛋酱的制曲效果^[13]。最终，鸭蛋酱制曲时，鸭蛋的最佳添加量确定为30%。

2.3 制曲温度对酱曲中蛋白酶活力的影响

选择鸭蛋的添加量为30%，米曲霉与黑曲霉的质量比为3:1，在制曲温度分别为25、30、35、40℃条件下，培养48h后，检测酱曲中蛋白酶的酶活力，结果见图3。

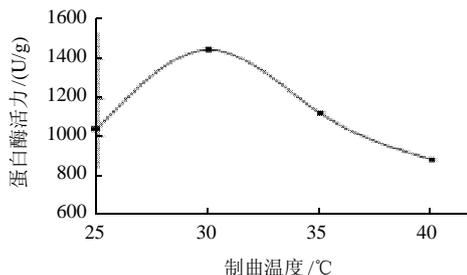


图3 制曲温度对酱曲蛋白酶活力的影响

Fig.3 Effect of cultivation temperature on koji protease activity

由图3可知，从25℃开始，随着温度的增加，蛋白酶的活力迅速增加；在30℃时，蛋白酶活力最高，达到1452.89U/g，这表明30℃是米曲霉与黑曲霉产蛋白酶的最适温度，而在此温度下，酶的活力也最高。之后，随着温度的进一步增加，蛋白酶的活力逐渐下降。其机制可能有两方面原因：一方面，温度过高，远离曲霉分泌蛋白酶的最适温度，造成酱曲中蛋白酶的含量降低，蛋白酶的活力也下降；另一方面温度过高，可能更适合杂菌的生长，抑制霉菌的生长及蛋白酶的分泌，影响酱曲的质量^[14]。综上分析，鸭蛋酱制曲时，最佳温度确定为30℃。

2.4 菌种质量比对酱曲中蛋白酶活力的影响

选择鸭蛋的添加量为30%，米曲霉与黑曲霉的质量比分别为3:1、2:1、1:1、1:2，在30℃条件下，培养48h后，检测酱曲中蛋白酶的酶活力，结果见图4。

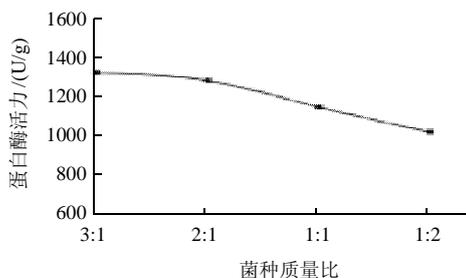


图4 米曲霉与黑曲霉菌种质量比对酱曲蛋白酶活力的影响

Fig.4 Effect of *Aspergillus oryzae* to *Aspergillus niger* ratio on koji protease activity

由图4可知，随着米曲霉添加比例的增加，蛋白酶的活力逐渐增强，当米曲霉与黑曲霉的质量比为3:1，蛋白酶的活力达到最高为1331.53U/g。结果表明，在制曲过程中，米曲霉是产生蛋白酶的主导菌种。因此，在制备鸭蛋酱成曲时，米曲霉与黑曲霉的最佳菌种配比为3:1。

2.5 制曲工艺条件的优化

在上述单因素试验的基础上，通过正交试验对影响蛋白酶活力较为显著的4个因素(制曲时间、鸭蛋添加

量、制曲时间、米曲霉与黑曲霉的质量比)进行优化,确定制曲的最佳工艺条件。从表2可以看出,对蛋白酶活力的影响大小为制曲温度>鸭蛋添加量>制曲时间>米曲霉与黑曲霉质量比,其中,制曲温度对成曲蛋白酶活力影响最显著。通过蛋白酶的活力大小分析,确定了四因素的最优组合为 $C_2B_1A_2D_3$,即制曲温度为30℃,制曲时间为48h,鸭蛋添加量为30%,米曲霉与黑曲霉的质量比为3:1。在该条件下,所制得的成曲蛋白酶活力最高,为1465.81U/g。

表2 正交试验酶活力测定结果
Table 2 Orthogonal array design matrix and results

试验号	A 制曲时间/h	B 鸭蛋添加量/%	C 制曲温度/℃	D 菌种质量比	蛋白酶活力/(U/g)
1	1(36)	1(30)	1(25)	1(1:1)	982.23
2	1	2(40)	2(30)	2(2:1)	1224.92
3	1	3(50)	3(35)	3(3:1)	1050.47
4	2(48)	1	2	3	1465.81
5	2	2	3	1	1089.67
6	2	3	1	2	1003.16
7	3(60)	1	3	2	1201.48
8	3	2	1	3	923.14
9	3	3	2	1	1186.55
k_1	1085.87	1216.51	969.51	1086.15	
k_2	1186.21	1079.24	1292.43	1143.19	
k_3	1103.72	1080.06	1113.87	1146.47	
R	100.34	137.27	323.22	60.32	

3 结 论

以鸭蛋、黄豆、面粉为原料,采用米曲霉与黑曲霉为菌种进行制曲,先将鸭蛋用动物蛋白水解酶在60℃条件下,酶解4h,可以有效地去除鸭蛋的腥味,改善鸭蛋酱的风味。然后,在95℃条件下加热20min,钝

化酶及杀死鸭蛋中的微生物,防止其影响制曲效果。通过单因素与正交试验,确定了鸭蛋酱曲的最佳制备条件为:制曲温度30℃、鸭蛋添加量30%、接种比例3:1、制曲时间48h。在此条件下,蛋白酶的活力最高,达到1465.81U/g。所制得的酱曲呈黄绿色,微带一点黑色,孢子有飞扬感,有浓厚曲香味、手感柔软,无酸臭气及其他不良气味。本研究为鸭蛋酱的发酵及规模化生产提供了可靠的保证。

参 考 文 献:

- [1] 李志义,刘学武,张晓冬,等.液体蛋的超高压处理[J].食品研究与开发,2004,25(4):94-97.
- [2] 朱史齐.对酱油调味品行业现状的几点看法[J].中国调味品,1999,24(1):2-4.
- [3] 蒋家新.酱油酿造的比较研究[J].中国调味品,1998,23(9):2-3.
- [4] 李莉.用黑曲霉、绿色木霉制备酱油种曲的工艺参数确定[J].中国调味品,2008,33(9):42-45.
- [5] 毋瑾超,胡锡钢,陈全震.酱油发酵中制曲条件对制曲效果的影响[J].粮油食品科技,2004,12(2):7-8.
- [6] 杨玉华,王子光,刘德海,等.混合菌种发酵提高酱油产量和质量的研究[J].食品与发酵工业,2002,28(3):80-82.
- [7] 邱立友,宫名宇,朱光州.多菌种在酱油酿造中的应用[J].中国酿造,1993(1):2-7.
- [8] SUGIYAMA S. Selection of micro-organisms for use in the fermentation of soy sauce[J]. Food Microbiol, 1984, 1(4): 339-347.
- [9] 戴德慧,黄光荣,蒋家新,等.米渣酱油多菌种制曲工艺研究[J].食品科学,2007,28(3):234-237.
- [10] 王素珍.利用双菌种制曲提高原料蛋白质的利用率的探讨[J].中国酿造,2005(7):35-37.
- [11] 上海市酿造科学研究所.发酵调味品生产技术[M].北京:中国轻工业出版社,1998:70-74.
- [12] 车科,麻成金,黄群,等.保靖酱油双菌种制曲工艺研究[J].中国调味品,2009,34(11):63-66.
- [13] 苏东林,张忠刚,谭欢,等.永丰辣酱人工接种双菌种制曲工艺的优化研究[J].食品工业科技,2009,30(9):159-163.
- [14] 袁园,纪凤娣,鲁绯,等.多菌种制曲在原池浇淋酱油制曲工艺中的应用研究[J].中国酿造,2010(7):53-56.