



基于综合酶活力优化的豆渣酱油曲制备工艺

段松林¹, 彭 荣¹, 殷钟意¹, 苟婷婷¹, 丁 倩¹, 郑旭煦¹, 姚世勇²

(1. 重庆工商大学 环境与资源学院, 重庆 400067; 2. 内江市环境监测中心站, 四川 内江 641100)

摘 要:为得到豆渣酱油曲的最优制备工艺,以鲜豆渣为原料,以蛋白酶、纤维素酶、糖化酶和淀粉酶的综合酶活力为指标,采用响应面中心复合设计试验方法考察原料比、蒸煮时间、接种量和培养温度对豆渣酱油曲品质的影响。结果表明:豆渣酱油曲综合酶活力的回归模型为: $Y = 548.78 - 110.63A - 18.86B + 3.89C - 69.80D - 0.56AB + 1.45AC - 0.62AD + 2.83BC - 19.41BD + 12.57CD - 12.05A^2 - 0.093B^2 - 38.04C^2 - 24.55D^2 + 22.15ABD + 40.84A^2D + 55.76AB^2$,其中,纤维素酶、中性蛋白酶、淀粉酶和糖化酶的酶活力权重值分别为17%、18%、37%和28%,4个工艺变量对综合酶活力的影响顺序为:原料比>培养温度>蒸煮时间>接种量;豆渣酱油曲的最优制备工艺为:原料比3:1、蒸煮时间18 min、接种量 $0.001\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、培养温度 27°C ,在该工艺条件下,豆渣酱油曲的综合酶活力达 $652.109 \pm 11.333\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,平均值与模型预测值($656.161\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)相差0.618%,利用响应面统计分析方法确定的4种酶活力在综合酶活力的权重值是有效的,建立的响应面模型可用于豆渣酱油曲制备工艺的预测。

关键词:综合酶活力;豆渣;酱油曲;响应面;制备工艺

Preparation Process of Bean Dregs Soy Sauce Koji Based on Comprehensive Enzyme Activity Optimization

DUAN Song-lin¹, PENG Rong¹, YIN Zhong-yi¹, GOU Ting-ting¹, DING Qian¹, ZHENG Xu-xu¹, YAO Shi-yong²

(1. College of Environment and Resources, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China; 2. Neijiang Environmental Monitoring Center Station, Neijiang 641100, China)

Abstract: In order to obtain the optimal preparation technology of soybean residue soy sauce koji, we took fresh bean residue as the raw material and comprehensive enzyme activity of protease, cellulase, glucoamylase and amylase as the index, and study the influence of the raw material ratio, cooking time, inoculum size and culture temperature on the quality of soy sauce soy sauce by using the response surface center composite design experiment method to obtain a optimal preparation process of soybean residue soy sauce. The results showed that: the regression model of the enzyme activity of soybean residue soy sauce: $Y = 548.78 - 110.63A - 18.86B + 3.89C - 69.80D - 0.56AB + 1.45AC - 0.62AD + 2.83BC - 19.41BD + 12.57CD - 12.05A^2 - 0.093B^2 - 38.04C^2 - 24.55D^2 + 22.15ABD + 40.84A^2D + 55.76AB^2$, where in the enzyme activity weight values of cellulase, neutral protease, amylase and glucoamylase were 17%, 18%, 37% and 28% respectively. The order of influence of the four process variables on the comprehensive enzyme activity was: raw material ratio > culture temperature > cooking time > inoculation amount, the optimal preparation process of soybean residue soy sauce was: raw material ratio 3:1, cooking time 18.00 min, the amount of inoculation $0.001\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, culture temperature 27°C . In this conditions, the comprehensive enzyme activity of soybean residue soy sauce $652.109 \pm 11.333\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, the average value and the model predicted value of $656.161\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ was with difference of 0.618%. It suggested that the weight values of the four enzyme activities determined by the response surface statistical analysis method are effective in the comprehensive enzyme activity, and the established response surface model can be used to predict the preparation process of the soybean residue soy sauce.

Keywords: Comprehensive enzyme activity; Bean dregs; Soy sauce koji; Response surface; Optimal preparation technology

豆渣是豆制品企业加工大豆后的剩余物,因其含有大量的水分和丰富的营养物质,易腐烂变质而污染环境。研究表明,干豆渣含粗蛋白10%~23%、纤维素约50%以及多种矿物质和微量元素,若将其直接作为畜禽饲料的原材料会降低它的应用价值,而将豆渣酿造成酱油是实现豆渣高质转化

的一种方法^[1-2]。

将豆渣酿造成酱油,首先要制备酱油曲。酱油曲在制备过程中产生的多种生物酶对后期发酵起着不同的作用。例如,在后期发酵过程中对原料的利用率上,蛋白酶活力越高,原料利用率就越高,蛋白酶活力直接影响产品的产量^[3];纤维素酶主要通

收稿日期:2018-07-31

基金项目:重庆市高层次人才特殊支持计划(科技创新领军人才)(渝委组[2013]139号)。

第一作者简介:段松林(1993-),男,硕士,主要从事生物化工研究。E-mail:civiliansonglin@163.com。

通讯作者:彭荣(1978-),男,博士,助理研究员,主要从事应用微生物和发酵工程研究。E-mail:47513433@qq.com。

过破坏原料的细胞壁,使原料中的蛋白质和淀粉等物质释放出来,辅助于其它酶发挥作用,并对发酵后的产品起到增色和还原作用^[4];糖化酶和淀粉酶主要是将淀粉物质分解为葡萄糖,增加产品中葡萄糖含量,改善产品口味,为发酵后期生成风味产香物质提供丰富的原料^[5]。由此可见,蛋白酶、纤维素酶、糖化酶和淀粉酶等主要生物酶在酱油曲制备过程中的活力大小直接反映酱油曲的品质高低。而且,酱油曲品质的高低也将影响后期发酵程度和酱油产品的品质。酱油曲品质越高,为后期发酵创造的条件就越好,所得到的酱油产品的品质也就越好。因此,在酱油曲制备工艺优化过程中,可以用其主要生物酶活力的大小来反映酱油曲品质的高低。

但是,国内研究者在酱油曲制备过程中通常以一种生物酶活力的大小来反映酱油曲品质的高低^[6-7],而以多种生物酶的综合酶活力为指标来优化豆渣制曲工艺的相关报道鲜有。为弥补用单一酶活力或多种酶活力为指标来评价酱油曲品质的不足,本文以鲜豆渣和麸皮为原料,以蛋白酶、纤维素酶、糖化酶、淀粉酶的综合酶活力为指标,通过采用响应面中心复合设计试验方法,考察原料比、蒸煮时间、接种量、培养温度等因素对酱油曲品质的影响,得到酱油曲的最优制备工艺,为鲜豆渣制备酱油曲以及酿造酱油提供相应的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

麸皮:市售;豆渣:重庆奇爽集团有限责任公司提供;酱油曲精:购于上海佳民酿造食品有限公司。磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、乙酸钠、冰醋酸、柠檬酸、柠檬酸钠、Tris-HCl 缓冲液、羧甲基纤维素钠、3,5 - 二硝基水杨酸、酒石酸甲钠、苯酚、无水亚硫酸钠、氢氧化钠、淀粉、葡萄糖等均为国产分析纯,酪氨酸标准品、干酪素购于 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 仪器与设备

GZX-GF 电热恒温鼓风干燥箱,上海龙跃仪器设备有限公司;TDZ5-WS 型离心机,湘仪离心机仪器有限公司;Infinite-M200 型酶标仪,上海安景科技有限公司;LRH-250F 型生化培养箱,上海齐欣科学仪器有限公司;YM30-B 型不锈钢立式电热蒸汽消毒器,上海三申医疗器械有限公司;DF-101S 型电热恒温水浴锅,巩义市予华仪器有限公司;BSA224S 型电子分析天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;艾卡 RT-15 多点磁力搅拌器,艾卡(广州)仪器设备

有限公司。

1.3 方法

1.3.1 制曲的方法及工艺流程 将豆渣和麸皮混合均匀后,经 121℃ 高压灭菌,冷却至室温,接种酱油曲精;然后在特定的条件下进行培养,待基料上长出白色菌丝体时将其翻料,以使基料底部有空气进入;继续在翻料前同样的条件下培养,待菌丝体出现黄绿色的孢子时即得成熟的曲料^[8]。取样,测定曲料中各主要酶的酶活。制曲流程图见图 1。

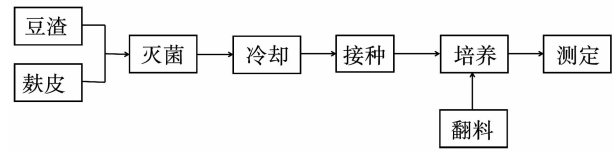


图 1 制备酱油曲流程图

Fig. 1 Preparation of soy sauce song flow chart

1.3.2 待测酶液的制备 取成熟的酱油曲 5 g,按照 1:4 的比例加入相关缓冲溶液。中性蛋白酶的待测液加入 pH7.2 的磷酸缓冲溶液,纤维素酶的待测液加入 0.1 mol·L⁻¹、pH4.6 的醋酸 - 醋酸钠缓冲液,糖化酶的待测液加入 pH4.6 的乙酸 - 乙酸钠缓冲液,淀粉酶的待测液加入 0.05 mol·L⁻¹、pH7.2 的 Tris-HCl 缓冲液。分别充分研磨后在 40℃ 恒温水浴锅中搅拌提取 30 min,经过 4 000 r·min⁻¹ 离心后取其上清液,即得待测酶液,冷藏,备用^[9]。

1.3.3 主要生物酶活力的测定 中性蛋白酶:采用 GB/T28715 - 2012《饲料添加剂酸性、中性蛋白酶活力测定》中的方法测定中性蛋白酶活力^[10]。

纤维素酶:采用 CMC 糖化力法^[11]测定纤维素酶活力。

糖化酶:采用 QB/T1803 - 1993《工业酶制剂通用实验方法》^[12]测定糖化酶活力。

淀粉酶:采用朱秀燕^[13]的测定方法。

1.3.4 综合酶活力加权系数的确定 综合酶活力是对各主要酶活力的权重指定一个加权系数,通过加权得到一种能够反映各主要酶活力关系的综合指标。综合酶活力的加权系数以 Design-Expert 8.0 软件预测的模型 F 值最大和试验结果相关系数 R² 和矫正后的 Adj-R² 最大且两者差值最小来确定。

1.3.5 响应面分析 选取原料比、蒸煮时间、接种量、培养温度等开展单因素实验^[14-16],得到制备豆渣酱油曲的适宜工艺条件为原料比 4:0、蒸煮时间 17.50 min、接种量 0.001 g·g⁻¹、培养温度约 28℃。在此基础上,以原料比 4:0、蒸煮时间 17.50 min、接种量 0.001 g·g⁻¹、培养温度 28℃ 为响应面理论中心参考条件,设计表 1 的因素水平表。

表 1 因素水平表
Table 1 Factor level table

水平 Level	因素 factor			
	A 原料比	B 蒸煮时间	C 接种量	D 培养温度
	A Raw material ratio	B Cooking time/min	C Inoculum/(g·g ⁻¹)	D Culture temperature/℃
-2	2.00	10.00	0.00050	24.00
-1	3.00	13.75	0.00075	26.00
0	4.00	17.50	0.00100	28.00
1	5.00	21.25	0.00125	30.00
2	6.00	25.00	0.00150	32.00

2 结果与分析

2.1 响应面分析及模型建立

利用 Design-Expert 8.0 软件对 4 种主要酶活力结果见表 2。

表 2 响应面实验设计和结果

Table 2 Response surface experimental design and results

序号 Number	A 原料比 A Raw material ratio	B 蒸煮时间 B Cookingtime /min	C 接种量 C Inoculum /(g·g ⁻¹)	D 培养温度 D Culture temperature /℃	生物酶活力 Biological enzyme activity/(U·g ⁻¹)				综合酶活 Comprehensive enzyme activity/(μ·g ⁻¹)
					Y ₁ 纤维素酶 Y ₁ Cellulase	Y ₂ 中性蛋白酶 Y ₂ Neutral protease	Y ₃ 淀粉酶 Y ₃ Amylase	Y ₄ 糖化酶 Y ₄ Saccharifying enzyme	
1	4	17.50	0.001	28	75.26	1449.39	176.50	448.69	464.62
2	4	17.50	0.001	32	137.14	503.89	197.36	453.22	313.94
3	4	17.50	0.001	28	111.99	1935.36	168.61	594.08	596.13
4	5	21.25	0.001	26	91.44	1556.91	149.58	211.30	410.30
5	4	17.50	0.001	24	93.75	2071.04	184.96	485.70	593.15
6	5	13.75	0.001	26	56.42	1579.52	201.11	355.92	467.97
7	3	13.75	0.001	30	126.37	1797.12	224.18	466.49	558.53
8	4	17.50	0.001	28	63.94	1062.83	155.64	504.75	401.09
9	5	21.25	0.001	26	91.39	1778.35	144.20	169.92	436.57
10	2	17.50	0.001	28	77.41	2020.69	295.70	851.77	724.79
11	5	13.75	0.001	26	60.63	1726.29	179.38	310.16	474.26
12	4	17.50	0.001	28	116.15	1806.51	176.40	476.95	543.73
13	3	21.25	0.001	30	127.97	1399.47	207.26	404.80	463.69
14	4	17.50	0.002	28	82.78	1097.13	157.75	457.43	398.00
15	4	17.50	0.001	28	121.01	1886.29	182.74	464.93	557.90
16	5	13.75	0.001	30	126.32	1174.19	195.63	454.78	432.55
17	3	13.75	0.001	26	58.88	1698.99	214.37	455.71	522.74
18	4	25.00	0.001	28	123.71	1568.43	190.63	523.18	520.37
19	5	21.25	0.001	30	113.19	1155.41	163.23	218.80	348.88
20	6	17.50	0.001	28	77.77	870.40	121.32	240.98	282.25
21	4	17.50	0.001	28	110.94	1707.09	196.01	638.75	577.51
22	5	21.25	0.001	30	125.87	1154.99	162.08	362.01	390.63
23	3	13.75	0.001	30	117.45	1445.97	270.90	650.93	562.73
24	5	13.75	0.001	30	123.36	1019.73	193.80	372.01	380.39
25	3	21.25	0.001	26	107.33	1949.87	214.37	468.52	579.73
26	4	10.00	0.001	28	132.48	2012.59	209.28	429.01	582.34
27	4	17.50	0.001	28	115.35	1742.93	173.90	553.95	552.79
28	3	21.25	0.001	26	114.59	1953.28	194.57	471.33	575.03
29	3	21.25	0.001	30	121.31	989.44	235.04	449.16	411.45
30	3	13.75	0.001	26	63.03	1679.79	230.52	526.15	545.69

通过对模型显著性、失拟项以及相关性的数据进行对比,选择比较适合的模式,最后进行模型建立。

利用软件拟合的回归模型方程为:

$$Y = 548.78 - 110.63A - 18.86B + 3.89C - 69.80D - 0.56AB + 1.45AC - 0.62AD + 2.83BC - 19.41BD + 12.57CD - 12.05A^2 - 0.093B^2 - 38.04C^2 - 24.55D^2 + 22.15ABD + 40.84A^2D + 55.76AB^2$$

式中 Y 为综合酶活力的大小, A 为原料比, B 为蒸煮时间, C 为接种量, D 为培养温度。

从此回归模型方程可以看出, A 系数的绝对值 $> D$ 系数的绝对值 $> B$ 系数的绝对值 $> C$ 系数的绝对值,说明 A 、 B 、 C 、 D 各因素对回归模型的贡献大小顺序为: $A > D > B > C$,即各因素对模型的影响顺序为:原料比 $>$ 培养温度 $>$ 蒸煮时间 $>$ 接种量。

2.2 方差分析

对模型进行方差分析,对影响模型的各个交互作用项以及影响曲面作用多次项进行显著性分析检验,其检验结果如表 3 所示。

表 3 回归方程的方差分析表
Table 3 Analysis of variance of regression equation

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
Model	276356.70	17.00	16256.27	16.66	< 0.0001	**
A	97919.49	1.00	97919.49	100.34	< 0.0001	**
B	8532.93	1.00	8532.93	8.74	0.0120	*
C	363.18	1.00	363.18	0.37	0.5532	
D	38981.06	1.00	38981.06	39.95	< 0.0001	**
AB	5.06	1.00	5.06	0.01	0.9438	
AC	33.53	1.00	33.53	0.03	0.8560	
AD	6.07	1.00	6.07	0.01	0.9384	
BC	128.13	1.00	128.13	0.13	0.7234	
BD	6026.50	1.00	6026.50	6.18	0.0287	*
CD	2529.23	1.00	2529.23	2.59	0.1334	
A2	3983.88	1.00	3983.88	4.08	0.0662	
B2	0.24	1.00	0.24	0.00	0.9878	
C2	39700.25	1.00	39700.25	40.68	< 0.0001	**
D2	16525.40	1.00	16525.40	16.93	0.0014	**
ABD	7848.64	1.00	7848.64	8.04	0.0150	*
A2D	8894.93	1.00	8894.93	9.11	0.0107	*
AB2	16579.50	1.00	16579.50	16.99	0.0014	**
残差 Residual	11710.29	12.00	975.86			
失拟项 Lack of fit	1434.87	7.00	204.98	0.10	0.9957	
纯误差 Pure error	10275.42	5.00	2055.08			
总差 Cor total	288066.90	29.00				

* 代表各组间彼此显著性差异 ($P < 0.05$), ** 代表各组间彼此显著性差异 ($P < 0.01$)。
* and ** represent the significant difference among groups at $P < 0.05$, $P < 0.01$.

从表 3 可以看出,整个设计模型 $P < 0.0001$,显著性极高,而失拟项 $P = 0.9957 > 0.05$ 具有不显著性,说明该设计模型具有统计学意义,对于酱油曲综合酶活力研究的回归区域内拟合性较好,可用该模型对酱油曲的综合酶活力进行测定和分析^[17]。

A 和 D 因素 $P < 0.0001$,影响非常显著; B 因素 $P < 0.05$,影响显著; C 因素 $P > 0.05$,影响不显著,即原料比、蒸煮时间、培养温度影响显著,接种量影响不显著。从模型 F 值的大小顺序也可以看出 $A > D > B > C$,说明原料比、培养温度、蒸煮时间对综合酶活力的影响大于接种量对综合酶活力的影响,且影响的顺序为原料比 $>$ 培养温度 $>$ 蒸煮时间,与回

归模型展示的结果一致^[18]。

2.3 交互作用分析

由表3可知, BD 、 C^2 、 D^2 、 ABD 、 A^2D 、 AB^2 对制备酱油曲的综合酶活力影响显著,说明原料比、培养

温度、蒸煮时间、接种量4个因素间存在曲面作用影响项。

在两两交互作用中,仅 BD 的 $P < 0.05$,对模型影响显著,其等高线和三维立体结构图如图2所示。

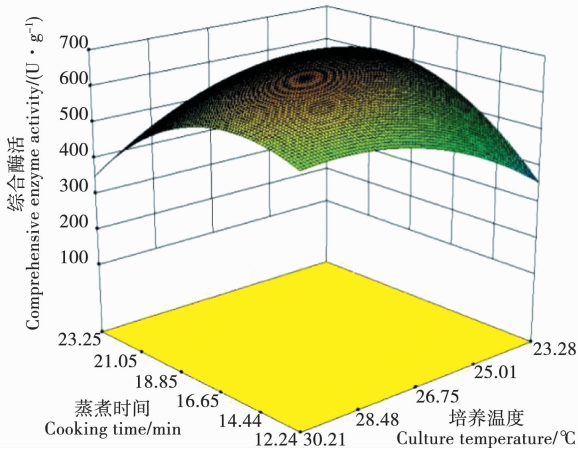
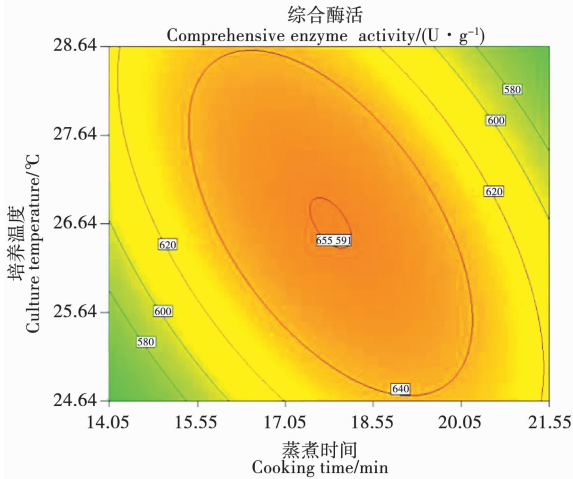


图2 蒸煮时间和培养温度的交互影响

Fig. 2 Interaction between cooking time and culture temperature

由图2可知,培养温度和蒸煮时间两因素间存在协同作用,综合酶活力呈现先上升后下降的变化趋势,在中心点附近出现综合酶活力的最大值,且培养温度和蒸煮时间交互作用的等高线为椭圆形,说明交互作用显著^[19-20]。当培养温度一定时,随着蒸煮时间的延长,综合酶活力呈现先上升后下降的趋势,在蒸煮时间18.00 min附近达到最大值;当蒸煮时间一定时,随着培养温度的上升,综合酶活力呈现先上升后下降的趋势,在培养温度为27℃附件达到最大值,同时三维立体结构在蒸煮时间18.00 min、培养温度27℃附近存在综合酶活的极大值。

2.4 误差分析

利用 Design-Expert 8.0 软件对模型的精密度、多元相关系数、可信度、精确度进行了计算,进一步对回归方程的误差进行分析。其结果如表4所示。

表4 回归方程误差分析表

Table 4 Error analysis table of regression equation

项目	值	项目	值
Item	Value	Item	Value
方差 SD	31.2387	R^2	0.9593
均值 Mean	488.9919	校正 R^2 Adjusted R^2	0.9018
变异系数 CV	6.3884	预测 R^2 Predicted R^2	0.8861
Press	32800.4297	精密度 Adeqt precision	18.2886

相关系数 R^2 越大,相关性越好;若校正 R^2 和预测 R^2 这两个值高且接近(二者差值应 < 0.2),说明回归模型对工艺条件的优化能够进行充分解释;若校正 R^2 和预测 R^2 这两个值不高,则说明回归模型对工艺条件不能进行充分的解释,需再次对其条件

或者模型进行优化。从表4可知, R^2 为0.9593,说明该模型拟合程度较高可以解释95.93%的响应值,校正 R^2 为0.9018说明在试验过程中有9.82%的综合酶活性发生变异不能用该模型进行解释,其余有90.18%的综合酶活性可以用该模型解释。同时, CV 为6.39% $< 10\%$,表明该方案优化的试验可信度和精确度比较高;且精密度是有效信号与噪声的比值 > 4 ,说明试验设计合理^[21-22]。表4结果表明,拟合的回归方程的误差分析值符合以上检验原则,适应性较好,试验设计可行。

2.5 最佳工艺预测与验证

利用 Design-Expert 8.0 软件对豆渣酱油曲制备工艺的响应面曲线进行预测,得到最佳工艺条件为:原料比3:1、蒸煮时间17.81 min、接种量 $0.001\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、培养温度26.65℃,此时,模型预测综合酶活力为 $656.161\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

在原料比为3:1、蒸煮时间为18.00 min、接种量为 $0.001\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、培养温度为27℃的条件下进行3次平行验证实验,得到的实际综合酶活力为 $652.109 \pm 11.333\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,其平均值与模型预测值相比相差0.618%,说明建立的响应面模型优化豆渣酱油曲制备工艺是可行的。

3 讨论

在我国酱油酿造中,酱油曲的制备主要采用单一的米曲霉菌种进行制曲,这种方法具有工艺参数易于控制等优点,但所产生的酶系单一,对后发酵过程中的淀粉等物质酶解不够完全,影响酱油的风

味。若采用多菌种制曲,虽然弥补了酶系单一的缺点,但不同的菌种之间存在着一定的相互作用,而且各菌种在后发酵过程中所要求的最佳生长条件不一样,导致所产生的多种生物酶的活力高低不一致,很难找到一个合适的条件使得多菌种产生的生物酶的活力均达到最高值,因此,采用多种酶活力共同优化酱油曲制备工艺的研究报道鲜见^[23]。

为提高豆渣酱油酿造的效率,我们使用多菌种孢子混合物的酱油曲精作为发酵菌种;因该菌种能够产生丰富的酶系,利用制曲过程中主要生物酶活力的加权方法得到综合酶活力,间接确定多菌种在同一制取工艺条件下多种生物酶活力的最高值。

由于响应面-中心复合设计实验能够简单有效地进行实验分析,清楚得出响应目标与设计变量之间的关系,为分析实验结果提供可靠的理论支持^[24-25]。所以,本文采用响应面-中心复合设计方法进行实验设计,根据实验结果,利用 Design-Expert 8.0 软件对 4 种主要生物酶活力的权重进行统计分析和验证,得到纤维素酶、中性蛋白酶、淀粉酶和糖化酶的酶活力在综合酶活力中的权重值,根据综合酶活力的回归模型,得到最优工艺条件,再通过验证实验,证明在最优工艺条件下得到的综合酶活力与响应面模型预测值仅相差 0.618%,说明以综合酶活力优化确定酱油曲制备工艺是可行的。

4 结 论

以鲜豆渣为原料,利用蛋白酶、纤维素酶、糖化酶、淀粉酶的综合酶活力为指标来考察豆渣酱油曲的品质,弥补了用单一酶活力或多种酶活力共同评价酱油曲品质的不足。利用响应面中心复合设计实验方法考察原料比、蒸煮时间、接种量、培养温度等因素对综合酶活力的影响,优化了豆渣酱油曲的制备工艺。结果表明,工艺参数对综合酶活力的影响顺序为原料比>培养温度>蒸煮时间>接种量,酱油曲最优制备工艺为:原料比 3:1、蒸煮时间 18.00 min、接种量 0.001 g·g⁻¹、培养温度 27℃,在此工艺条件下,酱油曲综合酶活力为 652.109 ± 11.333 μ·g⁻¹,平均值与模型预测值 656.161 μ·g⁻¹ 相差 0.618%。提示利用响应面统计分析方法确定的 4 种酶活力在综合酶活力的权重值是有效的,建立的响应面模型可用于豆渣酱油曲制备工艺的预测。

参考文献

[1] 程姣姣, 罗仓学, 刘剑, 等. 豆渣超微粉制备工艺优化及其特性分析[J]. 食品工业科技, 2018(2):202-206. (Cheng J J, Luo C X, Liu J, et al. Optimization of preparation process and characteristics of bean dregs ultrafine powder[J]. Science and

Technology of Food Industry, 2018(2): 202-206.)

[2] 许培文. 复合菌固态发酵豆渣工艺[J]. 农业工程, 2018, 8(4):69-72. (Xu P W. Process of solid fermentation of bean dregs by compound bacteria[J]. Agriculture Engineering, 2018, 8(4): 69-72.)

[3] 严鹤松, 夏俊松, 梁运祥. 黑曲霉发酵豆粕的研究[J]. 饲料工业, 2009, 30(13):16-19. (Yan H S, Xia J S, Liang Y X. Study on *Aspergillus niger* fermented soybean meal[J]. Feed Industry, 2009, 30(13): 16-19.)

[4] 张梦茹, 刘美蓉, 朱娜丽, 等. 豆渣发酵酱油关键技术[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(12):104-109. (Zhang M R, Liu M R, Zhu N L, et al. Key technologies of soybean fermented soy sauce[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(12): 104-109.)

[5] 马晓娇. 豆渣酱油种曲的诱变育种及制曲工艺研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2011. (Ma X J. Mutagenesis breeding and koji-making process of bean dregs soy sauce[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2011.)

[6] 宗玉梅, 蒋正国, 刘凯, 等. 多菌种酱油酿造中蛋白酶系的研究进展[J]. 食品安全导刊, 2018(3):116-118. (Zong Y M, Jiang Z G, Liu K, et al. Research progress of protease system in multi-strain soy sauce brewing[J]. Food Safety Guide, 2018(3): 116-118.)

[7] 易九龙, 伍加文, 田坡, 等. 豆渣酶制剂及减时制曲技术在酱油制曲中的应用研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(25):62-64. (Yi J L, Wu J W, Tian P, et al. Application of bean dregs enzyme preparation and time-varying koji technique in soy sauce koji[J]. Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(25): 62-64.)

[8] 林祖申. 米曲霉制曲过程中酶活性变化及其工艺优化[J]. 中国酿造, 2007, 26(5):56-59. (Lin Z S. Changes of enzyme activity and optimization of process in *Aspergillus oryzae* process [J]. China Brewing, 2007, 26(5): 56-59.)

[9] 冷云伟. 酱油曲中米曲霉及制曲工艺的研究[D]. 无锡:江南大学, 2004. (Leng Y W. Study on *Aspergillus oryzae* and the process of making music in soy sauce [D]. Wuxi:Jiangnan University, 2004.)

[10] 中华人民共和国国家标准. 饲料添加剂酸性、中性蛋白酶活力测定分光光度法:GB/T28715-2012[S]. 北京:中国标准出版社,2013. (National standard of the People's Republic of China. Determination of acidity and neutral protease activity of feed additives by spectrophotometry:GB/T28715-2012[S]. Beijing: China Standards Press,2013.)

[11] 李兰晓, 杜金华, 李军训, 等. CMC 糖化力法测定纤维素酶活性条件的研究[J]. 饲料工业, 2006, 27(24):49-52. (Li L X, Du J H, Li J X, et al. Study on the determination of cellulase activity conditions by CMC saccharification method[J]. Feed Industry, 2006, 27(24): 49-52.)

[12] 中华人民共和国轻工行业标准. 工业酶制剂通用实验方法:QB/T1803-1993[S]. 北京:中国标准出版社,1994. (Light industry standards of the People's Republic of China. QB/T1803-1993 General experimental methods for industrial enzyme preparations [S]. Beijing: China Standards Press,1994.)

[13] 朱秀燕. 酿造酱油米曲霉淀粉酶分离纯化及性质研究[D]. 保定:河北大学, 2011. (Zhu X Y. Separation, purification and properties of brewing soy sauce aspergillus oryzae amylase [D]. Baoding:Hebei University, 2011.) (下转第 974 页)

- [35] 苏伟, 叶艳, 王倩, 等. 传统发酵与接种发酵豆豉风味物质的比较研究[J]. 食品科学, 2016, 8: 421-431. (Su W, Ye Y, Wang Q, et al. Comparison of aroma compounds in traditional fermented and inoculated Douchies, A Chinese traditional fermented soybean food[J]. Food Science, 2016, 8: 421-431.)
- [36] 李慧. 混菌型豆豉发酵及风味物质的研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2009. (Li H. Study on fermented and flavor substance in Multi-Strain Douchi[D]. Dalian: Dalian University of Industry, 2009.)
- [37] 杨军, 陈九武, 彭仲雄, 等. 曲霉豆豉生产工艺的研究[J]. 中国调味品, 1998(4): 17-18. (Yang J, Chen J W, Peng Z X, et al. Study on the production process of *Aspergillus* lobster sauce [J]. China Condiment, 1998(4): 17-18.)
- [38] 范琳, 陶湘林, 欧阳晶, 等. 曲霉型豆豉后发酵过程中挥发性成分的动态变化[J]. 食品科学, 2012, 33(22): 274-277. (Fan L, Tao X L, Ouyang J, et al. Dynamic changes in volatile components in *Aspergillus*-Type douchi during post-fermentation [J]. Food Science, 2012, 33(22): 274-277.)
- [39] Nunomura N, Sasaki M, Yokotsuka T. Shoyu (soy sauce) flavor components: Neutral fraction [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1984, 48(7): 1753-1762.
- [40] Park J S, Lee M Y, Kim K S, et al. Volatile flavor components of soybean paste (doenjang) prepared from different types of strains [J]. Journal of Classroom Interaction, 1994, 49: 26-32.
- [41] 赵建新, 顾小红, 刘岷岷, 等. 传统豆豉挥发性风味化合物的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 684-687. (Zhao J X, Gu X H, Liu Y M, et al. Study on the volatile flavor compounds of the traditional Chinese soybean paste [J]. Food Science, 2006, 27(12): 684-687.)
- [42] 高瑞萍, 刘辉, 刘嘉, 等. 纳豆的研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2011, 47(1): 23-26. (Gao D P, Liu H, Liu J, et al. Advances in the research of natto [J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2011, 47(1): 23-26.)
- [43] Sugawara E, Ito T, Odagiri S, et al. Comparison of compositions of odor components of natto and cooked soybeans [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1985, 49(2): 311-317.
- [44] Tanaka T, Muramatsu K, Kim H R, et al. Comparison of volatile compounds from Chungkuk-Jang and Itohiki-Natto [J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 1998, 62(7): 1440-1444.
- [45] Huang X, Liao L Y, Fan L, et al. Analysis of volatile components from natto by solid-phase microextraction [J]. Science & Technology of Food Industry, 2012, 33(10): 58-61.
- [46] Liu Y, Su H, Song H L. Comparison of four extraction methods, SPME, DHS, SAFE, Versus SDE, for the analysis of flavor compounds in natto [J]. Food Analytical Methods, 2017: 1-12.
- [47] 张晓鸣. 食品风味化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009. (Zhang X M. Food flavor chemistry [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2009.)
- [48] 夏延斌. 食品风味化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 120-150. (Xia Y B. Food flavor chemistry [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008.)

(上接第 960 页)

- [14] 刘志刚, 范亚苇, 贾才华, 等. 利用豆渣双菌混合发酵生产酱油[J]. 食品与发酵工业, 2010(4): 111-115. (Liu Z G, Fan Y W, Jia C H, et al. Production of soy sauce by mixed fermentation of bean dregs [J]. Food and Fermentation Industries, 2010(4): 111-115.)
- [15] 张长贵, 董加宝, 何绍洋, 等. 影响豆渣酱油品质的因素及其优化[J]. 中国调味品, 2015(8): 10-14. (Zhang C G, Dong J B, He S Y, et al. Factors affecting the quality of soybean sauce and its optimization [J]. Chinese Condiment, 2015(8): 10-14.)
- [16] 严碧云, 朱云蔚, 郑清. 豆渣制酱油曲工艺条件的优化[J]. 科学技术创新, 2016(32): 79-80. (Yan B Y, Zhu Y W, Zheng Q. Optimization of process conditions for soybean sauce [J]. Science and Technology Innovation, 2016(32): 79-80.)
- [17] Montgomery D C. Design and analysis of experiments [J]. Technometrics, 1991, 48(1): 158.
- [18] 李珍, 哈益明, 李安, 等. 响应面优化苹果皮渣多酚超声提取工艺研究[J]. 中国农业科学, 2013, 46(21): 4569-4577. (Li Z, Ha Y M, Li A, et al. Response surface slag apple polyphenol ultrasound studies process [J]. Extraction China Agricultural Science, 2013, 46(21): 4569-4577.)
- [19] 赵莉娟, 胥江河, 王星敏, 等. 紫苏梗酶解糖化条件优化[J]. 南方农业学报, 2017, 48(6): 1054-1061. (Zhao L J, Xu J H, Wang X M, et al. Such as basil stems enzymatic saccharification optimization [J]. Southern Agricultural Sciences, 2017, 48(6): 1054-1061.)
- [20] 康永锋, 薛永刚, 韩巧英, 等. 响应面优化黑豆总黄酮微波辅助提取工艺及其抗氧化性能评价[J]. 大豆科学, 2017(6): 958-964. (Kang Y F, Xue Y G, Han Q Y, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of total flavonoids from black bean by response surface and its antioxidant performance [J]. Soybean Science, 2017(6): 958-964.)
- [21] 张泽志, 韩春亮, 李成未. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 河南教育学院学报(自然科学版), 2011, 20(4): 34-37. (Zhang Z Z, Han C L, Li C W. Application of response surface method in experimental design and optimization [J]. Journal of Henan Institute of Education (Natural Science Edition), 2011, 20(4): 34-37.)
- [22] 费荣昌. 试验设计与数据处理[M]. 4版. 无锡: 江南大学出版社, 2001. (Fei R C. Experimental design and data processing [M]. 4 edition. Wuxi: Jiangnan University Press, 2001.)
- [23] 王宪斌, 冯霞, 刘义, 等. 多菌种制曲在酱油发酵中的研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2016, 52(3): 60-64. (Wang X B, Feng X, Liu Y, et al. Research progress of multi-strain variety in soy sauce fermentation [J]. Food and Fermentation Technology, 2016, 52(3): 60-64.)
- [24] Gençec E, Özdemir U, Özbay B, et al. Optimizing dye adsorption onto a waste-derived (modified charcoal ash) adsorbent using box-behnken and central composite design procedures [J]. Water Air & Soil Pollution, 2013, 224(10): 1-12.
- [25] Mason R L, Gunst R F, Hess J L. Statistical design and analysis of experiments: With applications to engineering and science [M]. Second Edition. New York: John Wiley & Sons, Ltd. 2003.