

响应面分析法优化核桃酱油的发酵条件

王晓楠¹, 蔺立杰^{1,2}, 王丰俊^{1,*}

(1.北京林业大学食品科学与工程系, 北京 100083;

2.烟台大学环境与材料工程学院, 山东烟台 264005)

摘 要:以核桃粕为蛋白质原料, 氨基酸氮含量为指标对核桃酱油的低盐固态发酵工艺进行研究。在单因素实验基础上选取实验因素与水平, 根据 Box-Benhnken 中心组合设计原理和响应面分析法, 建立了盐水原料比、发酵温度和发酵时间影响因素与响应值氨基酸氮含量间的回归方程预测模型, 确定最佳发酵工艺条件为盐水原料比 1.65、发酵温度 45℃、发酵时间 6d。在此条件下, 发酵产品中氨基酸氮含量均值为 0.835g/100mL, 与理论值基本相符。

关键词:核桃粕, 低盐固态发酵, 氨基酸氮, 响应面法

Optimization of fermentation conditions for preparing walnut soy sauce

WANG Xiao-nan¹, LIN Li-jie^{1,2}, WANG Feng-jun^{1,*}

(1.Department of Food Science and Engineering, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2.School of Environment and Materials Engineering, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: The low-salt solid-state fermentation technology of walnut soy sauce was studied with the formation of amino acid nitrogen as index and walnut meal as raw protein material. The single factor experiment was used to set up the simulated quadratic polynomial regression equation of prediction model about independent variable and response value by using Box-Benhnken central composite design and response surface analysis theory. The results showed that the optimum fermentation conditions were as follows: the ratio of brine and material was 1.65, fermentation temperature was 45℃, fermentation time was 6d. Under above conditions, the amino nitrogen content reached to 0.835g/100mL, which was equal to the predictable value.

Key words: walnut meal; low-salt solid-state fermentation; amino nitrogen; response surface method

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)05-0209-04

酱油是我国传统的酿造调味品, 营养丰富且风味独特, 含有多多种氨基酸、有机化合物和矿物质^[1]。长期以来, 酿造酱油是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、发酵酿制而成^[2]。如何因地制宜, 就地取材, 综合利用, 来拓宽酱油生产蛋白质类原料的来源, 成为当务之急。目前, 已有利用花生饼、玉米渣、大米蛋白渣等生产酱油的报道, 但利用核桃粕酿造酱油鲜有报道。核桃位居世界四大坚果之首^[3], 具有很高的食用价值, 在国内资源丰富, 是传统的食品加工原料^[4-5]。核桃粕是核桃经过物理压榨提取出大部分油脂后剩下的部分, 蛋白含量可达到 40% 左右^[6], 在核桃蛋白中含有 18 种氨基酸, 有 8 种必需氨基酸, 其中精氨酸和谷氨酸含量较高^[7], 而核桃蛋白制品品种较少, 主要有核桃粉、浓缩蛋白、分离蛋白、蛋白肽等^[8]。以榨油后的核桃粕为蛋白原料生产核桃酱油, 蛋白含量

充足且利用率很高^[6]。既为核桃的综合利用提供了广阔的前景, 有利于提高核桃粕附加值, 又为生产营养酱油提供了方向。本研究在低盐固态发酵基础上以核桃粕代替大豆酿造酱油, 控制发酵工艺、跟踪检测理化指标、探讨发酵规律, 进而优化工艺条件, 为酱油酿造提供新材料。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

核桃粕 由河北晶品果业有限公司提供, 油脂含量为 32%; 麸皮 购于北京本乡面粉厂; 沪酿 3.042 北京林业大学微生物系提供; 培养基 PDA 培养基。

DHP-9272 型电热恒温培养箱 上海一恒科技有限公司; LDZX-40AI 型立式自动电热压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂; B-260 型恒温水浴锅 上海亚荣生化仪器厂; KDY-9830 凯氏定氮仪 北京瑞邦兴业科技有限公司; 95-1 磁力搅拌器 上海司乐仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 工艺流程 原料→润水→蒸煮→冷却→接种→制曲→发酵→淋油→成品

1.2.2 操作要点

收稿日期: 2013-06-17 * 通讯联系人

作者简介: 王晓楠 (1971-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 植物蛋白功能性研究。

基金项目: 北京市农业科技项目 (20130110); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (TD2012-03)。

1.2.2.1 种曲培养基^[9] 按照麸皮:豆粕质量比为4:1的比例在250mL三角瓶中加入20g过10目筛的干料,12g蒸馏水,拌匀。121℃,0.1MPa灭菌30min。

1.2.2.2 制曲 核桃粕、麸皮和面粉按55:40:5的比例混合,加入原料总重量115%的水混合拌匀,润水20min后蒸料,在0.15MPa灭菌32min。熟料冷却到40℃左右,按接种量0.5%(原料重量计)接入三角瓶菌种拌匀。制曲过程控制品温28~32℃,最高不超过35℃,制曲时间在33h,待曲料疏松、孢子丛生、无夹生、无异味、无其他霉菌,具有正常曲香时,即为成曲^[10]。

1.2.2.3 发酵 将成曲粉碎按照一定的比例加入盐水混匀装入发酵容器中,保温发酵。盐水浓度为12~13°Bé,发酵时间7d左右。当酱醅呈红褐色,有光泽,不发乌,醅层颜色一致,且柔软,松散不黏,不干燥,无硬心,有酱香时,即为成熟酱醅^[11]。酱醅在90℃下浸泡后淋油,经12h后取上清液得到生酱油,测其理化指标。

1.2.3 研究低盐固态发酵条件的单因素实验

1.2.3.1 盐水原料比对氨基态氮含量的影响 在发酵工程中,盐水和成曲的比例,即盐水原料比对氨基酸的生成率有很大的影响,也影响发酵周期。在盐水原料比为1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1条件下把成曲与盐水混匀,将混合物置于发酵罐中,控制发酵温度为45℃,发酵时间为6d,检测不同盐水原料比条件下酱油中氨基态氮的含量。

1.2.3.2 发酵温度对氨基态氮含量的影响 以盐水原料比为1.5的比例把成曲与盐水混匀,将混合物置于发酵罐中,分别在32、36、40、44、48℃温度下发酵6d,检测不同发酵温度条件下酱油中氨基态氮的含量。

1.2.3.3 发酵时间对氨基态氮含量的影响 以盐水原料比为1.5的比例将成曲与盐水混匀,将混合物置于发酵罐中,在45℃的发酵温度,分别发酵2、4、6、8、10、12、14d,检测不同发酵时间条件下酱油中氨基态氮的含量。

1.3 发酵工艺最优参数的确定

以氨基态氮含量为评价指标,依次进行盐水原料比、发酵温度、发酵时间的单因素实验,并确定三因素三水平的最佳参数进行响应面分析。实验设计的水平及编码见表1。

表1 响应面实验因素水平编码表

Table 1 Factors and levels of response surface experiments

因素	水平		
	-1	0	1
A 盐水原料比	1	1.5	2
B 发酵温度(℃)	40	44	48
C 发酵时间(d)	5	6	7

1.4 测定方法

氨基态氮含量的测定:采用GB/T 5009.39-2003方法。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果与分析

2.1.1 盐水原料比对氨基态氮含量的影响 盐水原料比对氨基态氮含量的影响结果见图1。从图1可知,当盐水原料比为1.5时,氨基态氮含量达到最大,随着盐水原料比进一步增加,氨基态氮含量大幅下降。食盐能抑制杂菌生长,但也是各种酶活力的抑制剂,随着食盐含量的增加,会抑制酶的活力,减弱其对蛋白质的分解能力,致使氨基态氮含量下降。

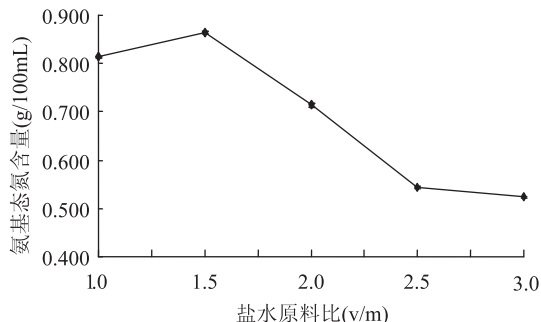


图1 盐水原料比对氨基态氮含量的影响

Fig.1 Influence of the ratio of brine and material on the formation of amino acid nitrogen

2.1.2 发酵温度对氨基态氮含量的影响 发酵过程中控制盐水原料比为1.5,发酵时间为6d,设置不同的发酵温度,研究发酵温度对氨基态氮含量的影响,结果见图2。从图2可以看出,在32~44℃之间氨基态氮含量平稳上升,到44~48℃之间大幅度下降。这是因为发酵过程中酶活力与温度有一定的关系,酶有最适的作用温度,如果温度过高,酶结构遭到破坏,酶活力下降,对蛋白质的分解减弱,进而影响氨基态氮含量。

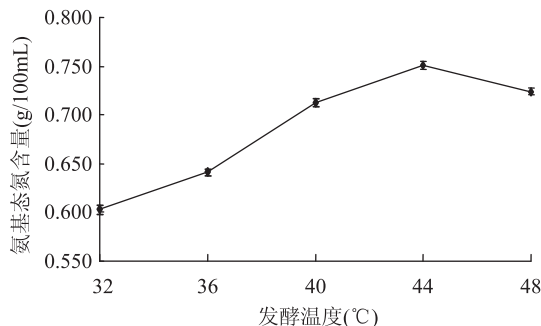


图2 发酵温度对氨基态氮含量的影响

Fig.2 Influence of fermentation temperature on the formation of amino acid nitrogen

2.1.3 发酵时间对氨基态氮含量的影响 发酵时间对氨基态氮含量的影响结果见图3。如图所示,氨基态氮含量随着发酵时间的增加而增加,6d以后氨基态氮含量趋于稳定。发酵初期,酱醅中的蛋白质只是初步被酶解,而在第5d时大部分蛋白质已被酶解完成,直至8d时酶解基本完成,并趋于平衡。

2.2 响应面实验结果与分析

2.2.1 响应面实验设计及结果 根据Box-Behnken中心组合设计原理,在单因素实验的基础上,以盐水原料比(A)、发酵温度(B)、发酵时间(C)为实验因素设计了3因素3水平的响应面分析实验,实验设计及结果见表2。

表 3 回归方程方差分析表
Table 3 Analysis results of regression and variance

项目	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	0.13	9	0.015	26.34	<0.0001	**
A	0.024	1	0.024	42.83	0.0002	**
B	0.016	1	0.016	28.07	0.0007	**
C	5.151E-003	1	5.151E-003	9.28	0.0159	*
AB	8.410E-004	1	8.410E-004	1.52	0.2532	
AC	1.440E-004	1	1.440E-004	0.26	0.6242	
BC	0.010	1	0.010	18.57	0.0026	**
A ²	0.041	1	0.041	73.18	<0.0001	**
B ²	0.016	1	0.016	28.99	0.0007	**
C ²	7.055E-003	1	7.055E-003	12.72	0.0073	**
残差	4.439E-003	8	5.548E-003			
失拟项	3.231E-003	3	1.077E-003	4.46	0.0705	
净误差	1.207E-003	5	2.415E-004			
总离差	0.14	17				

$R^2 = 0.9674, R^2_{Adj} = 0.9306$

注：** 表示极显著 ($p < 0.01$)，* 表示显著 ($p < 0.05$)。

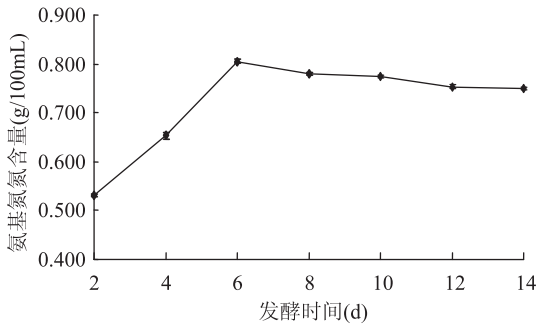


图 3 发酵时间对氨基态氮含量的影响
Fig.3 Influence of fermentation time on the formation of amino acid nitrogen

表 2 Box-Behnken 实验设计及结果
Table 2 Results of response surface experiments

实验号	A	B	C	氨基态氮含量 (g/100mL)
1	-1	-1	0	0.591
2	-1	0	-1	0.700
3	-1	0	1	0.621
4	-1	1	0	0.629
5	0	-1	-1	0.749
6	0	-1	1	0.613
7	0	1	-1	0.757
8	0	1	1	0.824
9	1	-1	0	0.701
10	1	0	-1	0.767
11	1	0	1	0.712
12	1	1	0	0.797
13	0	0	0	0.830
14	0	0	0	0.829
15	0	0	0	0.868
16	0	0	0	0.834
17	0	0	0	0.832
18	0	0	0	0.827

通过 Design Expert 软件中的 Box - Behnken Design 模型对表 2 数据进行二次响应面回归分析,得到回归方程为: $Y = 0.84 + 0.055A + 0.044B - 0.025C + 0.015AB + 6.000E - 003AC + 0.051BC - 0.096A^2 - 0.061B^2 - 0.04C^2$ 对模型进行方差分析及回归系数显著性检验,结果见表 3。

由表 3 回归方差分析显著性检验表明,该模型回归显著 ($p < 0.0001$),失拟项不显著,并且该模型 $R^2 = 0.9674, R^2_{Adj} = 0.9306$,说明该模型与实际实验拟合较好^[12],能够很好地反映响应值,可以用于核桃酱油发酵工艺实验的预测。

通过表 3 中: $F(A) = 42.83, F(B) = 28.07, F(C) = 9.28$,可知各因素对发酵条件的影响程度大小顺序为:盐水原料比 > 发酵温度 > 发酵时间。由显著性检验结果得:回归方程一次项 A、B 极显著,C 显著;二次项 A²、B²、C² 极显著;交互项除 BC 外,其他均不显著。

2.2.2 响应面优化与分析 利用 Design Expert 8.0.6 软件,作出各因素对氨基态氮含量的响应面分析图,考察所拟合的响应曲面的形状,分析盐水原料比、发酵时间、发酵温度对氨基态氮含量的影响。通过图 4 ~图 6 可知,盐水原料比、发酵温度、发酵时间与氨基态氮含量有显著的相关性,表现为曲面较陡,其中盐水原料比对氨基态氮含量影响最大。结合等高线的疏密程度可知^[13],发酵温度与发酵时间的交互作用影响显著,盐水原料比与发酵温度、盐水原料比与发酵时间两两之间有一定的交互作用,但交互作用的影响不显著。

2.2.3 发酵条件的优化与验证 依据 Design Expert 软件进行优化配置,得到最佳工艺条件为盐水原料比 1.65,发酵温度 45.51℃,发酵时间 5.95d,氨基态氮含量的理论值为 0.854g/100mL。考虑实际操作条件,将上述最佳发酵条件修正为盐水原料比 1.65,发酵温度 45℃,发酵时间 6d。该条件下平行 3 次测氮

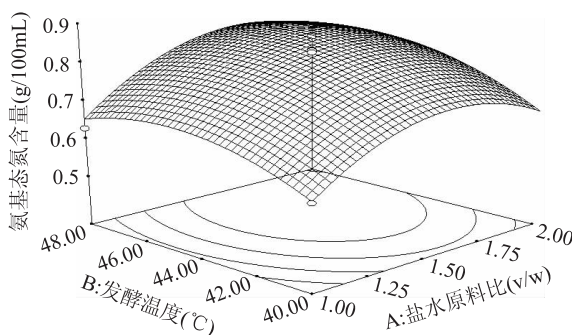


图4 盐水原料比和发酵温度
对氨基态氮含量影响的响应面图

Fig.4 Response surface of brine-to-material ratio and fermentation temperature on the formation of amino acid nitrogen

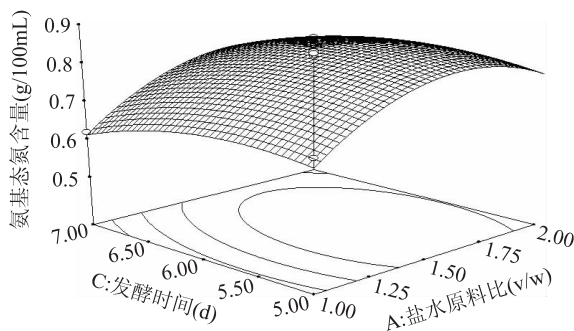


图5 盐水原料比和发酵时间
对氨基态氮含量影响的响应面图

Fig.5 Response surface of brine-to-material ratio and fermentation time on the formation of amino acid nitrogen

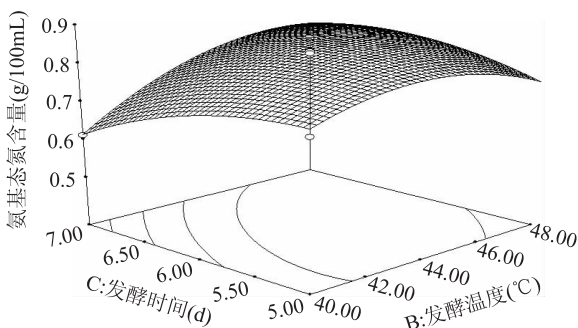


图6 发酵温度和发酵时间
对氨基态氮含量影响的响应面图

Fig.6 Response surface of fermentation temperature and fermentation time on the formation of amino acid nitrogen

基态氮含量均值为 0.835g/100mL, 相对误差为 2.22%, 说明该方程与实际情况拟合很好, 具有一定的实践指导意义。

3 结论

在单因素的实验基础上, 利用响应面法, 结合回归模型的数学分析, 对核桃酱油低盐固态发酵工艺进行了优化, 进一步得到了最优工艺参数为: 盐水原料比 1.65、发酵温度 45℃、发酵时间 6d。在此工艺条件下, 进行 3 次平行实验测得氨基态氮含量达 0.835g/100mL, 相对误差为 2.22%。将核桃粕制曲生产核桃酱油, 产品保持了核桃的营养特性, 既拓宽了核桃粕的利用价值, 又为消费者提供了新型的健康调味品。

参考文献

- [1] 于海玲, 姚永明. 发酵酱油制曲工艺的化学实验研究[J]. 中国调味品, 2011, 36(4): 69-71.
- [2] 黄持都, 鲁绯, 纪凤娣, 等. 酱油研究进展[J]. 中国酿造, 2009, 10: 7-9.
- [3] 戴宝合. 野生植物资源学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 89-90.
- [4] 王丰俊, 王建中, 周鸿升, 等. 核桃产品开发技术进展[J]. 河北林果研究, 2009, 24(3): 301-304.
- [5] 史双枝, 李疆, 王新刚. 核桃蛋白质的开发现状及前景[J]. 安徽农学通报, 2008, 14(7): 93-94.
- [6] 王丰俊, 王希群, 李保国, 等. 核桃酱油的开发及市场潜力分析[J]. 中国调味品, 2011, 36(5): 116-120.
- [7] 张庆祝, 丁晓雯, 陈宗道, 等. 核桃蛋白质研究进展[J]. 粮食与油脂, 2003, 5: 21-23.
- [8] 毛晓英, 华欲飞, 卢伟. 核桃蛋白质的研究进展[J]. 食品工业科技, 2009, 30(9): 328-330.
- [9] 魏鹏飞, 冯杰, 王栋, 等. 响应面法优化酱油生产用大曲培养基[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(3): 422-426.
- [10] 蔺立杰, 赵媛, 王建中, 等. 核桃酱油制曲条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(5): 96-100.
- [11] 林祖申. 酱油生产技术问答[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007: 69-70.
- [12] 徐向宏, 何明珠. 实验设计与 Design-Expert、SPSS 应用[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 154-155.
- [13] 陈莉, 屠康, 王海, 等. 采用响应面法对采后红富士苹果热处理条件的优化[J]. 农业工程学报, 2006, 22(2): 159-163.

- [14] 江炜. 超临界萃取技术在辣椒红色素中的应用[J]. 南京理工大学学报, 2002, 26(1): 79-82.
- [15] 刘成国, 王冬冬, 陈瑶, 等. CO₂ 超临界萃取桂皮精油工艺条件的优化[J]. 食品与机械, 2011, 27(2): 41-43.
- [16] 杨靖. 葡萄籽油超临界流体萃取工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(3): 41-44.
- [17] 朱子华. 超临界 CO₂ 萃取枸杞籽油数值模拟及工艺优化[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(4): 101-104.
- [18] 弥宏, 曲莉莉, 任玉林, 等. 超临界萃取中药白芷的化学成分的气相色谱质谱分析[J]. 分析化学, 2005, 22(3): 366-370.
- [19] 胡圣尧, 聂志妍, 宋聿文, 等. 超临界萃取后紫草籽中黄酮类化合物的提取及其抗氧化性研究[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(2): 100-103.
- [20] 刘艳清, 汪洪武. 超临界萃取荷花玉兰叶挥发油及其成分分析[J]. 精细化工, 2008, 25(6): 573-575.

(上接第 208 页)

- [14] 江炜. 超临界萃取技术在辣椒红色素中的应用[J]. 南京理工大学学报, 2002, 26(1): 79-82.
- [15] 刘成国, 王冬冬, 陈瑶, 等. CO₂ 超临界萃取桂皮精油工艺条件的优化[J]. 食品与机械, 2011, 27(2): 41-43.
- [16] 杨靖. 葡萄籽油超临界流体萃取工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(3): 41-44.
- [17] 朱子华. 超临界 CO₂ 萃取枸杞籽油数值模拟及工艺优化[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(4): 101-104.