

## 响应面法优化海带酱的米曲霉和黑曲霉发酵工艺

钟志宏, 苏锦瀚, 陈静茹, 郑宝东, 张 怡, 曾红亮

### Fermentation Process of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* of Kelp Paste Optimized by Response Surface Methodology

ZHONG Zhihong, SU Jinhan, CHEN Jingru, ZHENG Baodong, ZHANG Yi, and ZENG Hongliang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022010248>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 响应面法对藕渣制莲藕醋发酵工艺的优化

Optimization of fermentation process of lotus root vinegar prepared with lotus root pomace by response surface methodology  
食品工业科技. 2017(22): 136-139

#### 响应面法优化蜡质芽孢杆菌低产正丙醇发酵工艺

Optimization of Low Yield Positive N-propyl Alcohol Fermentation Process of *Bacillus cereus* by Response Surface Methodology  
食品工业科技. 2018, 39(18): 170-175,180

#### 利用黑曲霉B1401发酵废弃茶末浸提液产单宁酶的工艺优化

Optimization of Tannase Production from Waste Tea Extract from *Asp.niger* B1401  
食品工业科技. 2018, 39(15): 205-212

#### 米曲霉制备麦糟蛋白肽固态发酵培养基优化

Optimization of Solid-state Fermentation Medium for Preparation of Brewer's Spent Grains Protein Peptide by *Aspergillus oryzae*  
食品工业科技. 2021, 42(23): 135-140

#### 黑曲霉液态发酵韭籽粕提取韭籽多肽工艺

Optimization on the production of polypeptide from Chinese leek seed meal by *Aspergillus niger* liquid fermentation  
食品工业科技. 2017(05): 199-204

#### 响应面法优化干酪风味发酵乳的发酵工艺

Optimization of Fermentation Processing of Cheese Flavor Fermented Milk by Response Surface Methodology  
食品工业科技. 2021, 42(23): 235-242



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

钟志宏, 苏锦瀚, 陈静茹, 等. 响应面法优化海带酱的米曲霉和黑曲霉发酵工艺 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(22): 238-245. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010248

ZHONG Zhihong, SU Jinhan, CHEN Jingru, et al. Fermentation Process of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* of Kelp Paste Optimized by Response Surface Methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(22): 238-245. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010248

· 工艺技术 ·

# 响应面法优化海带酱的米曲霉 和黑曲霉发酵工艺

钟志宏<sup>1,2</sup>, 苏锦瀚<sup>1,2</sup>, 陈静茹<sup>2</sup>, 郑宝东<sup>1,2</sup>, 张 怡<sup>1,2</sup>, 曾红亮<sup>1,2,\*</sup>

(1. 闽台特色海洋食品加工及营养健康教育部工程研究中心, 福建福州 350002;

2. 福建农林大学食品科学学院, 福建福州 350002)

**摘要:** 为研究海带酱的最佳发酵工艺, 在考察湿海带与湿黄豆比例、米曲霉与黑曲霉比例、盐浓度和盐水添加量等单因素对海带酱氨基态氮影响的基础上, 采用响应面法对海带酱的米曲霉和黑曲霉发酵工艺进行优化。结果表明, 海带酱的最佳发酵条件为: 湿海带与湿黄豆比例为 3:1, 米曲霉与黑曲霉比例为 2:1, 盐浓度为 14.5%, 盐水添加量为 77%, 该条件下海带酱中氨基态氮值达到最高, 为  $0.76\% \pm 0.04\%$ , 与理论预测值基本一致。这表明使用最佳发酵条件制作海带酱, 可提高氨基态氮含量, 增强海带酱的鲜味。同时, 该海带酱营养成分为: 能量  $171.33 \pm 1.15$  kJ/100 g, 蛋白质  $3.22 \pm 0.04$  g/100 g, 脂肪  $1.92 \pm 0.03$  g/100 g, 碳水化合物  $5.68 \pm 0.06$  g/100 g, 钠  $2633.00 \pm 1.00$  mg/100 g; 其中, 氨基态氮含量符合 GB/T 24399-2009《黄豆酱》标准。本研究可为发酵酱制品的进一步开发与利用提供一定的技术指导。

**关键词:** 海带酱, 米曲霉, 黑曲霉, 发酵工艺, 响应面法

中图分类号: TS205.5

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)22-0238-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010248



本文网刊:

## Fermentation Process of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* of Kelp Paste Optimized by Response Surface Methodology

ZHONG Zhihong<sup>1,2</sup>, SU Jinhan<sup>1,2</sup>, CHEN Jingru<sup>2</sup>, ZHENG Baodong<sup>1,2</sup>, ZHANG Yi<sup>1,2</sup>, ZENG Hongliang<sup>1,2,\*</sup>

(1. Engineering Research Center of Fujian-Taiwan Special Marine Food Processing and Nutrition, Ministry of Education, Fuzhou 350002, China;

2. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** In order to study the optimal fermentation process of kelp paste, the effect of four single factors (the ratio of wet kelp to wet soybean, the ratio of *Aspergillus oryzae* to *Aspergillus niger*, the salt concentration and the amount of brine addition) on the amino nitrogen of kelp paste was investigated. Based on the single factor experiments, the fermentation process of kelp paste was optimized by response surface methodology. Results showed that, the optimal fermentation conditions for kelp paste were as follows: 3:1 of the ratio of wet kelp to wet soybean, 2:1 of the ratio of *Aspergillus oryzae* to *Aspergillus niger*, 14.5% of salt concentration, and 77% of the amount of brine addition. The amino nitrogen was up to  $0.76\% \pm 0.04\%$  under these conditions, which was basically consistent with the theoretical prediction value. This indicated that using these conditions to make kelp paste could increase the amino nitrogen content and enhance the umami taste. Meanwhile, the nutritional components of the kelp paste were as follows:  $171.33 \pm 1.15$  kJ/100 g of energy,  $3.22 \pm 0.04$  g/100 g of protein,  $1.92 \pm 0.03$  g/100 g of fat,  $5.68 \pm 0.06$  g/100 g of carbohydrate,  $2633.00 \pm 1.00$  mg/100 g of sodium. Among them, the amino nitrogen content conformed to the requirements of the standard of GB/T 24399-2009 "Soybean Paste". This study

收稿日期: 2022-01-26

基金项目: 福建省科技计划项目区域发展项目 (2020N3003)。

作者简介: 钟志宏 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工, E-mail: 1367580737@qq.com。

\* 通信作者: 曾红亮 (1986-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养与化学, E-mail: zhlfst@163.com。

could provide a certain technical guidance for the development and utilization of fermented sauce products.

**Key words:** kelp paste; *Aspergillus oryzae*; *Aspergillus niger*; fermentation process; response surface methodology

发酵海产品在我国有着悠久的历史记载,是一种风味独特、营养价值丰富,且具备一定保健功效的调味品<sup>[1-4]</sup>。我国自古代起,已采用自然发酵的方式发酵多种海产品<sup>[5-6]</sup>,随着社会的发展,发酵海产品的种类层出不穷,以鱼类、虾类、牡蛎类原材料制作的发酵产品琳琅满目,但以海带为原材料发酵的酱制品研究较少<sup>[2]</sup>。

海带,别名纶布,属于褐藻类植物,具有丰富的营养价值与保健功效<sup>[7-9]</sup>。据 2021 年中国渔业统计年鉴记载,我国的海带养殖面积已达到 46132 公顷,福建省的海带养殖面积占全国总量的 45.5%,因此,海带是我省的重要经济作物。目前,我省海带加工方式仍然处于初级阶段,主要以传统的初级加工形式为主,在很大程度上限制了海带产业的健康发展。现下,急需改变海带加工单一的现状,充分利用我省丰富的海带资源,研发一款新型发酵海带产品,为海带加工方向提供一个新思路。

目前,国内外学者对发酵海产品中的发酵菌种投入极大的关注,主要集中在乳酸菌、红曲霉、酵母菌、米曲霉、黑曲霉等方面<sup>[10-13]</sup>。Annette 等<sup>[12]</sup>通过乳酸菌单菌发酵制备糖海带,得出发酵后的糖海带更具有海带风味,同时能够有效减少海带中的微量金属含量;严超等<sup>[13]</sup>通过米曲霉发酵扇贝豆酱,制得的扇贝豆酱香味浓郁,海鲜味突出;Yuan 等<sup>[14]</sup>通过混合发酵的方式发酵鲶鱼肌肉,发现混合发酵的 pH 和总挥发性盐基氮均低于未发酵组,总酸度与氨基态氮、游离氨基酸含量较高,使发酵鲶鱼酱具有浓郁的鲜味和发酵风味。

因此,本实验采用米曲霉与黑曲霉混合制曲的方式来发酵海带酱,考察物料比、种曲比、盐浓度以及盐水添加量对海带酱发酵品质的影响,同时优化工艺参数,以为海带酱的工业化生产提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

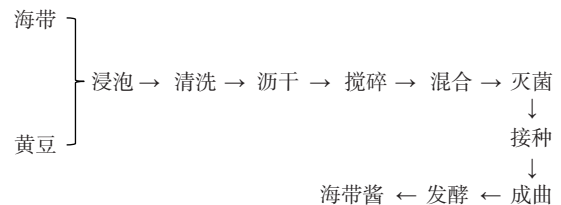
米曲霉(*Aspergillus oryzae*) 3.042(编号 CICC 2339,孢子数  $\geq 180$  亿/g)、黑曲霉(*Aspergillus niger*) 3.758(编号 CGMCC32783,孢子数  $\geq 180$  亿/g) 沂源康源生物科技有限公司;盐渍海带片 福州海林食品有限公司;黄豆、食盐 福州家乐福超市;36%~38% 甲醛溶液、氢氧化钠 分析纯,成都市科龙化工试剂厂。

SH10A 型电子水分测定仪 上海菁海仪器有限公司;PL602-L 型精密天平、FE28 型标准 pH 计 梅特勒-托利多仪器上海有限公司;YXQ-LS-30S II 全自动立式压力蒸汽灭菌锅 上海精宏实验设备有限公

司;SPX-270 智能生化培养箱 宁波江南仪器厂;HX-PB9538 型破壁机 佛山市海迅电器有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 海带酱制备流程



1.2.2 原料处理 参照李次力<sup>[15]</sup>的方法对海带酱原材料进行处理,挑选优质黄豆,用蒸馏水浸泡 12 h,黄豆与蒸馏水的质量比为 1:3,浸泡后清洗、沥干,用破壁机搅碎,以 36000 r/min 搅碎 25 s;参照聂小伟等<sup>[16]</sup>的方法,挑选盐渍海带片,用蒸馏水浸泡 3 h,海带与蒸馏水的质量比为 1:3,浸泡后洗净海带表面的沙砾,沥干后用破壁机搅碎,以 36000 r/min 搅碎 20 s。

1.2.3 海带酱的制备 将处理过后的海带酱原料根据比例装入 500 mL 烧杯中,原料总添加量为 160 g/瓶,牛皮纸进行封口。将盛有物料的烧杯放入高压灭菌锅中,以 121 °C 灭菌 15 min,灭菌降温后,在无菌环境中将种曲按照比例加入,充分搅拌使物料和种曲混合均匀,封口,置于 34 °C 的恒温培养<sup>[16]</sup>,2 d 后,海带曲成熟,加入相对曲料重量 75% 的盐水搅拌均匀,盐水浓度为 14.5%,封口,置于 34 °C 恒温发酵。参照何天明等<sup>[17]</sup>的方法,进行预实验,海带酱发酵到 10 d 时,其氨基态氮值已符合 GB/T 24399-2009《黄豆酱》的标准,因此,后续的发酵时间均确定为 10 d。

#### 1.2.4 海带酱发酵条件优化单因素实验

1.2.4.1 物料配比的确定 以物料比为变量的单因素实验中,湿海带和湿黄豆的质量比分别按照 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1 的比例分装在 500 mL 烧杯中,物料总重量为 160 g,灭菌条件同 1.2.3,接入米曲霉与黑曲霉的比例为 2:1,种曲总量为 0.064 g,搅拌均匀,封口。34 °C 下培养 2 d,加入相对曲料重量 75% 的盐水搅拌均匀,盐水浓度为 14.5%,继续发酵,待发酵 10 d 后测海带酱中氨基态氮含量。

1.2.4.2 种曲配比的确定 以种曲比为变量的单因素实验中,米曲霉与黑曲霉的种曲质量比分别为 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1,种曲总量为 0.064 g,将其分别添加到湿海带与湿黄豆的质量比为 3:1 的物料中,物料总重量为 160 g,分装在 500 mL 烧杯中,搅拌均匀,封口。34 °C 下培养 2 d,加入相对曲料重量 75% 的盐水搅拌均匀,盐水浓度为 14.5%,继续发酵,待发酵 10 d 后测海带酱中氨基态氮含量。

1.2.4.3 盐浓度的确定 以盐浓度为变量的单因素实验中,按照湿海带与湿黄豆的质量比为 3:1、米曲霉与黑曲霉的种曲质量比为 2:1 的比例制备成曲,物料总重量为 160 g,种曲总量为 0.064 g,分装在 500 mL 烧杯中,将相对曲料重量 75% 的盐水加入物料中(盐水浓度分别为 5.5%、10%、14.5%、19%、23.5%),搅拌均匀,封口。置于 34 °C 恒温培养箱中,待发酵 10 d 后测海带酱中氨基态氮含量。

1.2.4.4 盐水添加量的确定 以盐水添加量为变量的单因素实验中,按照湿海带与湿黄豆的质量比为 3:1、米曲霉与黑曲霉的种曲质量比为 2:1 的比例制备成曲,物料总重量为 160 g,种曲总量为 0.064 g,分装在 500 mL 烧杯中,将浓度为 14.5% 的盐水分别按相对曲料重量 50%(80 mL)、62.5%(100 mL)、75%(120 mL)、87.5%(140 mL)、100%(160 mL)加入物料中,搅拌均匀,封口。置于 34 °C 恒温培养箱中,发酵 10 d 后测海带酱中氨基态氮含量。

1.2.5 感官评定方法 参照食品安全国家标准 GB 19643-2016《藻类及其制品》和 GB/T 24399-2009《黄豆酱》的感官要求,对海带酱样品进行感官分析。由 20 名经过专业感官培训的专家组成感官评定小组,感官评价的全过程均在标准感官实验室内进行。根据表 1 对海带酱样品的色泽、滋味、气味、体态进行评分,其中色泽占 20 分、滋味占 30 分、气味占 40 分、体态占 10 分,总计 100 分。

表 1 感官评定标准  
Table 1 Sensory evaluation standard

评价项目	感官评分标准	得分(分)	总分(分)
色泽	深褐色或褐绿色,鲜艳,有光泽	16~20	20
	深褐色或褐绿色,略有光泽	11~15	
	棕褐色,光泽暗淡	<10	
气味	酱香、酯香浓郁,无腥味	26~30	30
	酱香、酯香味较淡,有少许腥味	21~25	
	酱香、酯香味较淡,腥味较重	<20	
滋味	鲜味醇厚,浓厚海带风味,咸甜适度	36~40	40
	有鲜味,有海带风味,无异味	31~35	
	鲜味较差,无海带风味,有异味	<30	
体态	粘稠适宜,混合均匀,有明显黄豆和海带颗粒状	9~10	10
	偏稀或偏稠,混合较均匀,黄豆和海带颗粒状不明显	6~8	
	偏稀或偏稠,混合不均匀,无大豆和海带颗粒状	<5	

1.2.6 响应面试验 根据单因素实验结果,设计以种曲比、盐浓度、盐水添加量 3 个因素为自变量,以氨基态氮值为响应值,设计 3 因素 3 水平的响应面试验,考察种曲比、盐浓度、盐水添加量对发酵海带酱氨基态氮含量的影响,确定海带酱的最佳发酵工艺。根据预测的海带酱最佳发酵条件,测定氨基态氮的实际得率,比较预测值和实际值,验证其准确性。

1.2.7 基本营养成分分析 对 0 与 10 d 的海带酱基

表 2 响应面试验设计方案

Table 2 Design scheme of response surface methodology

水平	因素		
	A米曲霉:黑曲霉	B盐浓度(%)	C盐水添加量(%)
-1	1:1	10	62.5
0	2:1	14.5	75
+1	3:1	19	87.5

本营养成分进行测定,其中,参照 GB 5009.39-2003《酱油卫生标准的分析方法》测定氨基态氮的含量;参照 GB 5009.3-2016《食品中水分的测定》测定水分的含量;参照 GB 5009.5-2016《食品中蛋白质的测定》测定蛋白质的含量;使用 pH 计测定样品的 pH;参照 GB 5009.6-2016《食品中脂肪的测定》测定脂肪的含量;参照 GB 28050-2011《预包装食品营养标签通则》测定碳水化合物的含量;参照 GB 28050-2011《预包装食品营养标签通则》测定能量的含量;参照 GB 5009.91-2017《食品中钾、钠的测定》测定钠的含量。

1.3 数据处理

采用 Design-Expert 8.0.6 对实验数据进行处理和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 物料配比的确定 从图 1a 可知,由于物料中黄豆比例的降低导致氨基态氮值不断减小,其原因主要为,黄豆中蛋白质含量较海带丰富,当物料总量不

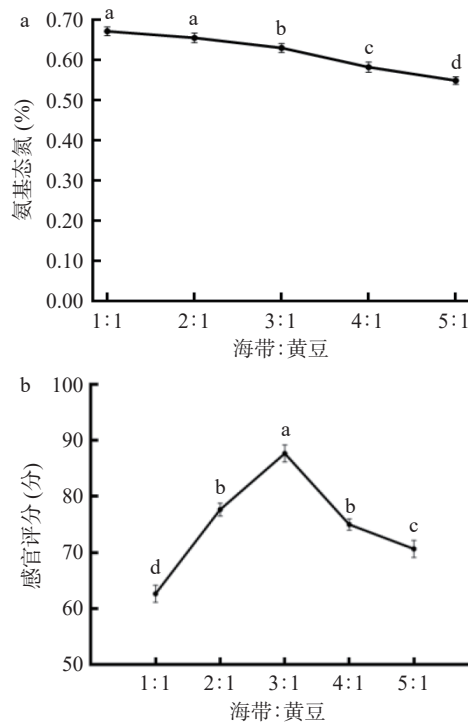


图 1 不同物料配比的海带酱氨基态氮含量  
Fig.1 Amino nitrogen content of kelp paste with different material ratios

注:不同的小写字母代表组间差异显著(P<0.05);图 2~图 4 同。



变的情况下, 黄豆比例降低, 海带酱内相对的蛋白质含量减少, 因此蛋白酶酶解条件受限, 使氨基态氮值减小。因本实验是为了研发一款新型海带酱产品, 产品的主原料应以海带为主, 考虑到图 1a 中各比例的氨基态氮值变化趋势较小, 同时, 结合图 1b 中各比例的海带酱感官评分, 因此, 最终选择口感风味较好的湿海带与湿黄豆比例为 3:1 作为海带酱的较优物料配比, 后续单因素实验均以 3:1 的湿海带与湿海带比例为物料配比。

**2.1.2 种曲配比的确定** 种曲比例对海带酱发酵过程可能有显著作用, 能够直接影响发酵产物的种类和数量<sup>[18]</sup>。如图 2 所示, 当菌种比在 1:1 到 2:1 之间时, 氨基态氮值呈上升趋势。且当种曲比为 2:1 时, 氨基态氮值处于最高点, 表明在发酵过程中米曲霉产生酶系对蛋白质的酶解作用较大; 当菌种比在 3:1 到 5:1 之间时, 氨基态氮值呈下降趋势, 可能是由于米曲霉比例逐渐增大, 对黑曲霉的生长起到了一定的抑制作用, 导致黑曲霉在发酵后期的酶系活力降低<sup>[19-20]</sup>; 同时, 米曲霉分泌的中性蛋白酶易在发酵后期受酸性环境抑制, 使原料的转化率降低, 从而导致氨基态氮值降低<sup>[21-23]</sup>。该实验结果与零春甜等<sup>[24]</sup>的研究结果相似, 因此, 采用米曲霉比黑曲霉比例为 2:1 发酵得到的海带酱, 其氨基态氮含量要比其余四种的比例要高, 海带酱的鲜味更好。

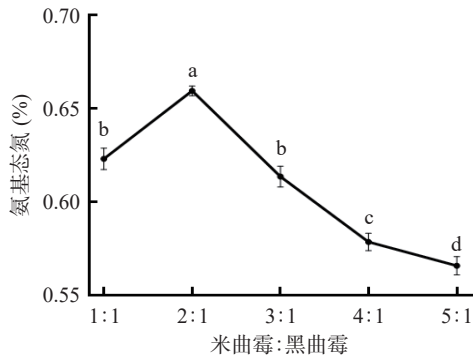


图 2 不同种曲配比的海带酱氨基态氮含量  
Fig.2 Amino nitrogen content of kelp paste with different seed ratios

**2.1.3 盐浓度的确定** 如图 3 所示, 盐浓度对氨基态氮含量的变化可能有重要影响。随着盐浓度的增加, 氨基态氮值呈现先增加后降低的趋势。当盐浓度在 5.5% 时, 由于盐浓度过低, 易使发酵环境中的产酸性细菌大量进行繁殖, 导致发酵环境的 pH 下降, 从而抑制了中性蛋白酶和碱性蛋白酶的酶解作用<sup>[25]</sup>, 因此氨基态氮含量较低; 当盐浓度从 5.5% 逐渐增大到 14.5% 时, 发酵环境中的盐浓度逐渐加大, 对产酸性细菌的抑制作用也增大, 同时, 由于较低的盐浓度状态渗透压较低, 对蛋白质酶解的抑制作用较小<sup>[26]</sup>, 因此, 氨基态氮值逐渐增大。盐浓度继续增加, 使发酵环境处于高盐浓度状态, 抑制米曲霉的生长, 蛋白酶

含量减少, 同时, 由于渗透压变大使酶活性降低, 原料分解不完全, 从而氨基态氮值逐渐降低<sup>[27]</sup>。该实验结果与谢主兰等<sup>[28]</sup>的研究结果相似, 因此, 选择 14.5% 为最佳盐浓度, 能抑制有害微生物的生长繁殖、保持酶活性, 同时, 氨基态氮含量达到最高。

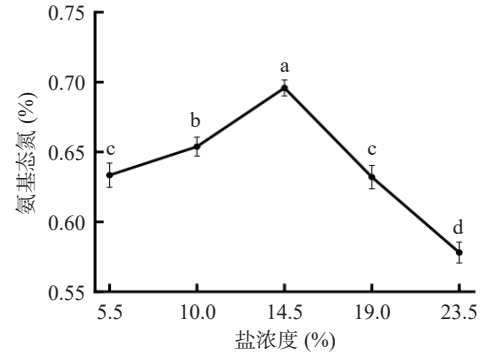


图 3 盐浓度对海带酱氨基态氮含量的影响  
Fig.3 Effect of salt concentration on amino nitrogen content in kelp sauce

**2.1.4 盐水添加量的确定** 如图 4 所示, 盐水添加量与海带酱发酵过程中产生的氨基态氮含量的变化可能有密切关系。随着盐水添加量的增加, 氨基态氮值呈现先增加后降低的趋势。当盐水添加量在 50%~75% 之间时, 由于酱中的水分含量得当, 米曲霉保持较为旺盛的生命活力, 水分子进入曲料内部, 有利于曲料中营养物质的溶出, 便于蛋白酶酶解蛋白质<sup>[29]</sup>; 同时, 随着盐水添加量的增大, 盐浓度也随着增大, 适当的盐浓度能够抑制产酸性细菌的大量繁殖, 有利于蛋白质的酶解<sup>[25]</sup>, 因此, 氨基态氮含量逐渐增加, 并在盐水添加量为 75% 时, 氨基态氮值达到最高。当盐水添加量超过 75% 时, 盐水中的盐浓度也逐渐增大, 氨基态氮值逐渐降低, 原因主要为大量的水分与种曲充分接触, 对蛋白酶酶解速率有抑制作用, 同时, 盐浓度过大也会对酶解产生较大的抑制作用, 蛋白质分解不完全, 氨基态氮含量逐渐降低<sup>[30-34]</sup>。该实验结果与康蕾等<sup>[35]</sup>的研究结果相似, 因此, 选择 75% 为盐水添加量, 既不影响酶活性, 又能够抑制有害微生物的生长繁殖, 氨基态氮含量达到最高。

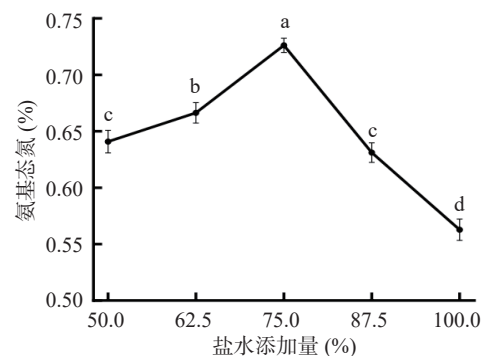


图 4 盐水添加量对海带酱氨基态氮含量的影响  
Fig.4 Effect of salt water addition on amino nitrogen content in kelp sauce

## 2.2 响应面试验

2.2.1 响应面的试验设计及结果 由单因素实验可知:米曲霉与黑曲霉的混合比例以选择为 2:1 为宜、盐浓度以选择 14.5% 为宜、盐水添加量以选择 75% 为宜。根据单因素实验结果,选取种曲比、盐浓度、盐水添加量为主要考察因素,以氨基态氮值为响应值,进行响应面试验。响应面试验设计方案见表 2。试验设计及结果见表 3。

表 3 海带酱发酵响应面试验设计及结果

Table 3 Design and results of response surface experiment for kelp paste fermentation

实验号	A	B	C	氨基态氮(%)
1	-1	-1	0	0.65
2	1	-1	0	0.54
3	-1	1	0	0.60
4	1	1	0	0.57
5	-1	0	-1	0.62
6	1	0	-1	0.59
7	-1	0	1	0.64
8	1	0	1	0.59
9	0	-1	-1	0.69
10	0	1	-1	0.67
11	0	-1	1	0.69
12	0	1	1	0.70
13	0	0	0	0.78
14	0	0	0	0.74
15	0	0	0	0.76
16	0	0	0	0.76
17	0	0	0	0.75

2.2.2 模型的建立及显著性分析 采用 Design-Expert 8.0.6 对表 3 中的实验数据进行分析,得到各项的显著性分析,并建立提取模型,分析结果见表 4。由表 4 可知,回归模型  $P < 0.0001$ ,表明该回归模型达极显著水平;在一次项中,A 对海带酱发酵的氨基态氮含量达到显著水平;在交互项中,AB 对海带酱发酵的氨基态氮含量达到显著水平;在二次项中, $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  均对海带酱发酵后的氨基态氮含量达到极显著水平;失拟项  $P = 0.5903$ ,失拟项不显著,并且该模型的决定系数  $R^2 = 0.9849$ ,校正决定系数  $R^2_{Adj} = 0.9654$ ,变异系数  $C.V. \% = 2.0857\%$ ,说明响应值的变化有 98.49% 来源于所选变量,该值接近于 100%,说明优化后的回归模型能够较好地反应实际操作(种曲比、盐浓度、盐水添加量)与氨基态氮含量的实际关系,可用于海带酱最佳发酵工艺参数的确定。在所选取的各因素水平范围内,各因素对海带酱发酵后的氨基态氮含量的影响程度依次为:种曲比>盐水添加量>盐浓度。

各因素经二次多项式回归拟合后,得到氨基态氮值对种曲比、盐浓度、盐水添加量 3 个因素的二次多项回归方程:

$$Y = 0.758 - 0.0275A - 0.00375B + 0.00625C + 0.02AB - 0.005AC + 0.0075BC - 0.12275A^2 - 0.04525B^2 - 0.02525C^2$$

2.2.3 响应面图和等高线图分析 由以上方差分析

表 4 方差分析结果

Table 4 Results of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方差	F值	P值
回归模型	0.088197941	9	0.009799771	50.6261245	<0.0001
A	0.00605	1	0.00605	31.25461255	0.0008
B	0.0001125	1	0.0001125	0.581180812	0.4708
C	0.0003125	1	0.0003125	1.614391144	0.2445
AB	0.0016	1	0.0016	8.265682657	0.0238
AC	0.0001	1	0.0001	0.516605166	0.4956
BC	0.000225	1	0.000225	1.162361624	0.3167
$A^2$	0.063442368	1	0.063442368	327.7465527	<0.0001
$B^2$	0.008621316	1	0.008621316	44.53816275	0.0003
$C^2$	0.002684474	1	0.002684474	13.86812973	0.0074
残差	0.001355	7	0.000193571		
失拟项	0.000475	3	0.000158333	0.71969697	0.5903
纯误差	0.00088	4	0.00022		
总离差	0.089552941	16			

注:  $R^2 = 0.9849$ ,  $R^2_{Adj} = 0.9654$ ,  $C.V. \% = 2.0857\%$ ;  $P < 0.05$  表示检测水平上显著;  $P < 0.01$  表示检测水平上极显著。

结果可知,各因素对氨基态氮值的影响依次为:  $A > C > B$ 。A、B、C 二次项系数均为负值,方程表示的抛物面开口向下有极大值点。综合图 5~图 7 的数据,比较三张曲面图,可以看出种曲比的曲线最陡峭,表明其对氨基态氮含量的影响最大,这与方差分析的结果一致;通过比较 3 张等高线图,发现种曲比和盐浓度对氨基态氮值含量的影响最显著,其表现为等高线呈现明显的椭圆形。而图 6 和图 7 的等高线图则椭圆性较差,与其相对应的响应面图形也较为平缓,这表明种曲比和盐水添加量、盐浓度和盐水添加量

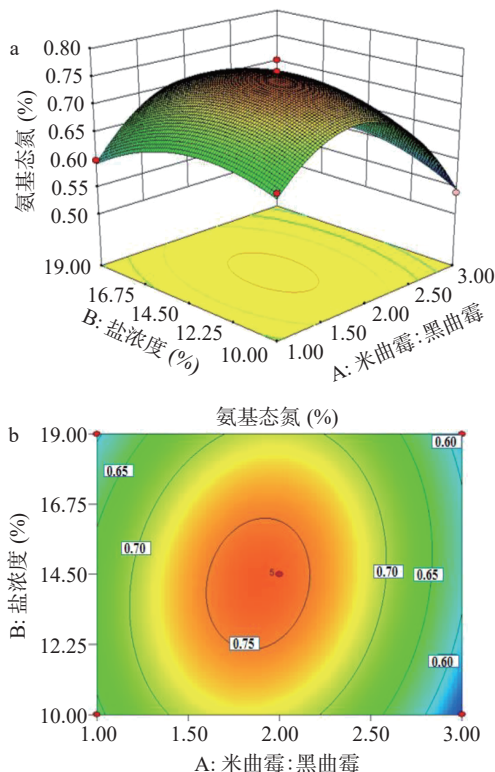


图 5 种曲比和盐浓度对氨基态氮含量的响应面图  
Fig.5 Response surface diagram of seed ratio and salt concentration to amino nitrogen content

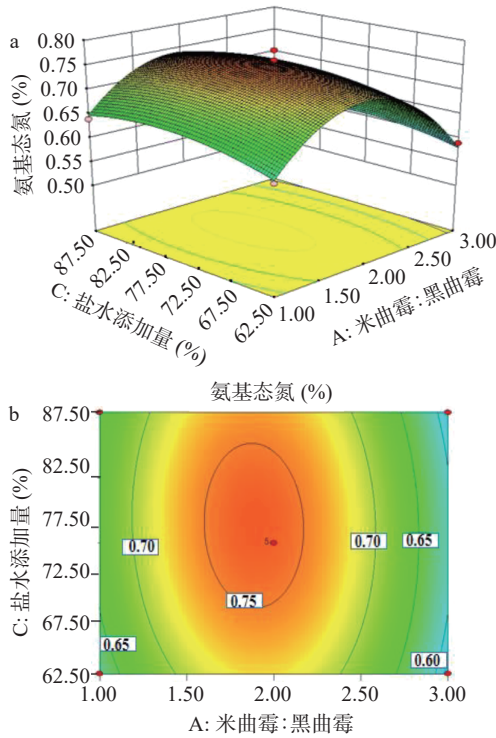


图 6 种曲比和盐水添加量对氨基态氮含量的响应面图  
Fig.6 Response surface diagram of seed ratio and salt water addition to amino nitrogen content

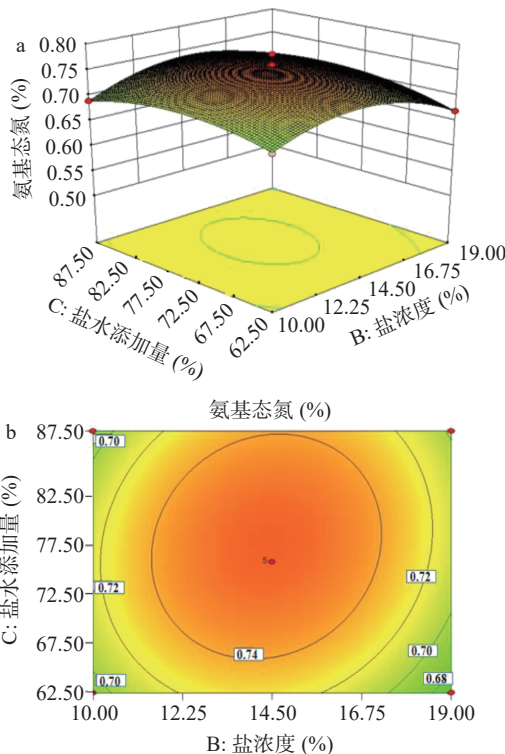


图 7 盐浓度和盐水添加量对氨基态氮含量的响应面图  
Fig.7 Response surface diagram of salt concentration and salt water addition to amino nitrogen content

的交互作用对氨基态氮含量的影响不显著。

2.2.4 工艺验证 结合回归模型,由 Design-Expert 8.0.6 软件分析得到最佳海带酱发酵工艺为:米曲霉与黑曲霉比例为 1.88:1,盐浓度为 14.45%,盐水添

加量为 76.59%,在此条件下,氨基态氮值为 0.76%。考虑到实际操作条件,将最佳工艺条件修正为:米曲霉与黑曲霉比例为 2:1,盐浓度为 14.5%,盐水添加量为 77%。在此条件下重复 3 次实验,氨基态氮得率分别为 0.72%、0.80%、0.77%,氨基态氮平均值为 0.76%±0.04%,与理论预测值基本一致,这说明回归模型具有可靠性。氨基态氮实际值与预测值的线性关系见图 8,其实际值与回归模型预测值呈现良好的线性关系,说明模型的预测值能较好地反应实际氨基态氮值。

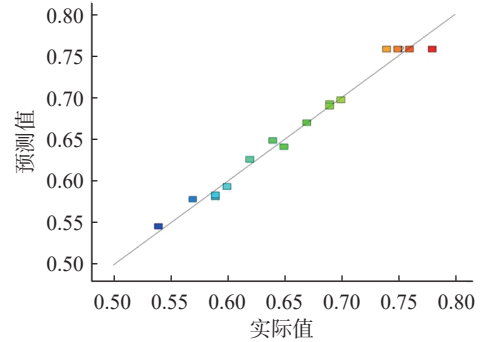


图 8 实际值与预测值的线性关系图  
Fig.8 Linearity plot of the actual and predicted values

### 2.3 发酵对海带酱基本营养成分的影响

由表 5 可知,以米曲霉和黑曲霉混合发酵的方式发酵海带酱,在最佳工艺条件下,海带酱中的基本营养成分为:能量 171.33±1.15 kJ/100 g,蛋白质 3.22±0.04 g/100 g,脂肪 1.92±0.03 g/100 g,碳水化合物 5.68±0.06 g/100 g,钠 2633.00±1.00 mg/100 g。以 60 kg 的成年男性为例,食用海带酱时,其提供的营养素参考值为:能量 2%、蛋白质 5%、脂肪 3%、碳水化合物 1%、钠 131%,根据中国营养学会提出的建议,并与汪洪涛<sup>[36]</sup>对市面上 32 款调味酱的调查结果进行比较,得出海带酱属于低能量、低脂肪的食品。根据 GB/T 24399-2009《黄豆酱》中要求,氨基态氮(g/100 g)≥0.50,海带酱中氨基态氮为 0.76%±0.04%,与普通酱制品比较,海带酱的氨基态氮含量较高。与 0 d 的营养成分进行比较,除氨基态氮外,发酵 10 d 后其他成分均呈下降趋势,可能的原因是,黄豆中的大豆蛋白在米曲霉和黑曲霉的酶系作用下,将蛋白质分解为具有多种呈味作用的小分子多肽、氨基酸以及多种风味前体物质,显著增强海带酱的风味<sup>[37]</sup>;脂肪在发酵过程中发生水解作用生成甘油、甘油单酯、甘油二酯以及脂肪酸,能够有效增强海带酱的独特风味<sup>[38]</sup>;碳水化合物中的淀粉在糖化酶与 α-淀粉酶的作用下生成麦芽糖、葡萄糖和有机酸、酯类等物质,葡萄糖为部分微生物提供生长所需碳源,酯类物质为海带酱的提供独特的色泽与风味<sup>[39]</sup>。因此,在最佳发酵参数下,能够得到最佳品质的海带酱。

### 3 结论

海带酱发酵的最佳工艺参数为:湿海带与湿黄



表5 海带酱的基本营养成分  
Table 5 Basic nutrients of kelp sauce

样品	能量(kJ/100 g)	蛋白质(g/100 g)	脂肪(g/100 g)	碳水化合物(g/100 g)	钠(mg/100 g)	氨基态氮(%)
0 d	333.00±2.00 <sup>a</sup>	4.61±0.01 <sup>a</sup>	2.76±0.05 <sup>a</sup>	9.03±0.06 <sup>a</sup>	2690.67±0.58 <sup>a</sup>	0.03±0.05 <sup>b</sup>
10 d	171.33±1.15 <sup>b</sup>	3.22±0.04 <sup>b</sup>	1.92±0.03 <sup>b</sup>	5.68±0.06 <sup>b</sup>	2633.00±1.00 <sup>b</sup>	0.76±0.04 <sup>a</sup>

注: 分别比较各组不同发酵时间的基本营养成分平均数, 同列相同小写字母表示差异不显著( $P>0.05$ ); 不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

豆比例为 3:1, 米曲霉与黑曲霉比例为 2:1, 盐浓度为 14.5%, 盐水添加量为 77%, 发酵温度为 34 °C, 发酵时间 10 d, 氨基态氮值为 0.76%±0.04%, 与理论预测基本一致; 在此条件下, 对海带酱的基本营养成分进行测定, 能量 171.33±1.15 kJ/100 g, 蛋白质 3.22±0.04 g/100 g, 脂肪 1.92±0.03 g/100 g, 碳水化合物 5.68±0.06 g/100 g, 钠 2633.00±1.00 mg/100 g, 得出海带酱属于低能量、低脂肪的食品; 氨基态氮 0.76%±0.04%, 结果符合 GB/T 24399-2009《黄豆酱》的标准。海带酱作为一款风味发酵酱, 在实际生产过程中, 种曲比、盐浓度、盐水添加量均会对发酵过程产生影响, 这与发酵的工艺参数有重要关系。而这种核心菌群的变化与风味之间构成的关系还有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] WU Y, CHEN X E, FANG X B, et al. Isolation and identification of aroma-producing yeast from mackerel fermentation broth and its fermentation characteristics[J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2021, 30(10): 1264-1280.
- [2] 周泽华, 徐莹. 利用海洋生物资源制作发酵食品的现状与设想[J]. *南通航运职业技术学院学报*, 2018, 17(1): 39-41. [ZHOU Z H, XU Y. Status quo and assumption of producing fermented food with marine biological resources[J]. *Journal of Nantong Vocational & Technical Shipping College*, 2018, 17(1): 39-41.]
- [3] 孙为刚. 螻子虾酱[J]. *走向世界*, 2017, 44: 82-83. [SUN W G. Grasshopper sub shrimp paste[J]. *Go to the World*, 2017, 44: 82-83.]
- [4] 李莹, 白凤翎, 励建荣. 传统海产调味品中微生物及其发酵作用研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(10): 187-191. [LI Y, BAI F L, LI J R. Recent advances of microorganisms and its fermentation in traditional seafood sauces[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(10): 187-191.]
- [5] 黄晓婷. 关于发酵型海鲜调味品的营养应用研究[J]. *食品安全导刊*, 2020(24): 53-54. [HUANG X T. Study on nutritional application of fermented seafood condiment[J]. *China Food Safety Magazine*, 2020(24): 53-54.]
- [6] 马臣臣, 姜帅铭, 彭倩楠, 等. 海南黎族发酵海产品中微生物多样性分析[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(8): 270-277. [MA C C, JIANG S M, PENG Q N, et al. Analysis of microbial diversity of traditional fermented seafood from Li Nationality in Hainan [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(8): 270-277.]
- [7] 高绍金, 李金娜, 李一博, 等. 海带猪肉脯的研制[J]. *肉类工业*, 2017(9): 7-9. [GAO S J, LI J N, LI Y B, et al. Development of dried kelp pork[J]. *Meat Industry*, 2017(9): 7-9.]
- [8] 宁芊, 庞杰. 即食海带脯加工参数的优化[J]. *中国调味品*, 2019, 44(1): 58-62, 66. [NING Q, PANG J. Optimization of processing parameters of instant preserved kelp[J]. *China Seasoning*, 2019, 44(1): 58-62, 66.]
- [9] 杨星星, 崔迎雪, 武凌宇, 等. 一种新型功能性海带豆酱的制备工艺研究[J]. *海洋科学*, 2017, 44(6): 48-54. [YANG X X, CUI Y X, WU L Y, et al. Research on the preparation process of a new functional kelp bean paste[J]. *Ocean Science*, 2017, 44(6): 48-54.]
- [10] RACIOPPO A, CAMPANIELLO D, SINIGAGLIA M, et al. Use of food spoilage and safety predictor for an "a priori" modeling of the growth of lactic acid bacteria in fermented smoked fish products[J]. *Foods*, 2022, 11(7): 946.
- [11] LIU J X, CHEN J L, WANG S, et al. Effects of *Monascus* application on *in vitro* digestion and fermentation characteristics of fish protein[J]. *Food Chemistry*, 2022, 377: 132000.
- [12] ANNETTE B, GUNHILD B, AASE J, et al. Fermentation of sugar kelp (*Saccharina latissima*)-effects on sensory properties, and content of minerals and metals[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2019, 13: 3175-3187.
- [13] 严超, 牟建楼, 孙剑锋, 等. 扇贝豆酱制曲工艺条件的研究[J]. *食品工业*, 2017, 38(6): 166-169. [YAN C, MOU J L, SUN J F, et al. Study on koji-making technology of scallop bean paste[J]. *Food Industry*, 2017, 38(6): 166-169.]
- [14] YUAN L, ZHANG Q Q, ZHENG Z Y, et al. Isolation of protease-producing bacteria from shrimp paste and the characteristics of fermenting catfish paste[J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2022, 31(4): 332-343.
- [15] 李次力. 浸泡、蒸煮工艺对大豆品质特性的研究[J]. *中国粮油学报*, 2008, 23(5): 46-49. [LI C L. Effects of soaking and cooking treatment on quality characters of soybean[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2008, 23(5): 46-49.]
- [16] 聂小伟, 何粉霞, 王龙江. 真空微波膨化即食海带脆片工艺研究[J]. *水产科技情报*, 2018, 45(3): 176-180. [NIE X W, HE F X, WANG L J. Study on processing technology of insant kelp flake products with vacuum microwave[J]. *Aquatic Science and Technology Information*, 2018, 45(3): 176-180.]
- [17] 何天明, 刘章武. 苦荞麦豆酱自然发酵工艺研究[J]. *中国酿造*, 2013, 32(10): 57-60. [HE T M, LIU Z W. Natural fermentation process of *Fagopyrum tararicum* and soybean paste[J]. *China Brewing*, 2013, 32(10): 57-60.]
- [18] 刘焯. 海藻发酵酱加工工艺研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011. [LIU Y. Research on the processing technology of seaweed fermented sauce[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011.]
- [19] 古小露, 谢跃杰, 熊政委, 等. 菌种接种方式对黄豆酱品质的影响[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(10): 118-123, 130. [GU X L, XIE Y J, XIONG Z W, et al. Effects of bacterial inoculation meth-



- ods on the quality of soybean paste[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(10): 118–123, 130. ]
- [ 20 ] 闫冬梅, 邓远均, 刘凯, 等. 采用多菌种酿造酱油技术及应用与工业生产的研究进展[J]. *现代食品*, 2018(1): 142–146. [ YAN D M, DENG Y J, LIU K, et al. Research progress on the technology of brewing soy sauce using multi-strain and its application in industrial production[J]. *Modern Food*, 2018(1): 142–146. ]
- [ 21 ] 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 L N, et al. Study of fermenting soy sauce using bean dregs [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2013, 39(12): 104–109. ]
- [ 22 ] 李保英, 姜佳丽, 蒋予箭. 酱油生产中应用米曲霉和黑曲霉混合制曲的探索[J]. *中国酿造*, 2011(12): 70–74. [ LI B Y, JIANG J L, JIANG Y J. Exploration on the application of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* in the production of soy sauce[J]. *China Brewing*, 2011(12): 70–74. ]
- [ 23 ] 刘晔, 朱媛媛, 冯纬, 等. 豆酱生产菌株米曲霉 ZJGS-LZ-12 的分泌蛋白组学研究[J]. *中国酿造*, 2019, 38(10): 143–148. [ LIU Y, ZHU Y Y, FENG W, et al. Secretoproteomic study of the soybean paste-producing strain *Aspergillus oryzae* ZJGS-LZ-12[J]. *China Brewing*, 2019, 38(10): 143–148. ]
- [ 24 ] 零春甜, 汤辉煌, 周彩莹, 等. 米曲霉和黑曲霉协同发酵杏仁粕风味物质的变化[J]. *天津科技大学学报*, 2021, 36(5): 10–15. [ LING C T, TANG H H, ZHOU C Y, et al. Variations of flavor compounds in almond meal co-fermented by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*[J]. *Journal of Tianjin University of Science and Technology*, 2021, 36(5): 10–15. ]
- [ 25 ] 代弟. 南瓜籽粕酱油的开发与研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2011. [ DAI D. Development and researching of soy sauce of pumpkin seeds cake[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2011. ]
- [ 26 ] 杨希. 盐浓度对蚕豆酱发酵过程中原核微生物多样性及理化因子的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(4): 200–206. [ YANG X. Effects of salt concentration on prokaryotic microbial diversity and physicochemical factors during fermentation of broad bean paste[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2022, 48(4): 200–206. ]
- [ 27 ] 周琳, 易谦武, 钟小廷, 等. 基于酱肉制备的甜面酱复合菌种酶解工艺研究[J]. *中国调味品*, 2021, 46(5): 28–31. [ ZHOU L, YI Q W, ZHONG X Y, et al. Study on the enzymatic hydrolysis process of sweet noodle sauce compound bacteria based on sauce meat preparation[J]. *Modern Food*, 2021, 46(5): 28–31. ]
- [ 28 ] 谢主兰, 雷晓凌, 何晓丽, 等. 食盐添加量对低盐虾酱品质特征的影响[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(9): 116–119. [ XIE Z L, LEI X L, HE X L, et al. Effect of salt addition on the quality characteristics of low-salt shrimp paste[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(9): 116–119. ]
- [ 29 ] 张忠刚. 永丰辣酱自然发酵的菌相与成分分析及人工接种发酵工艺研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007. [ ZHANG Z G. Tendency analysis on natural fermentation about microorganisms and chemical contents of Yongfeng hot pepper sauce and research on the fermentation using multi-cultures by artificial inoculation[D]. Changsha: Agricultural University of Hunan, 2007. ]
- [ 30 ] 杜云建, 赵玉巧, 马晨艳, 等. 虾酱的研究[J]. *中国调味品*, 2009, 34(8): 81–84. [ DU Y J, ZHAO Y Q, MA C Y, et al. Research on shrimp paste[J]. *China Condiments*, 2009, 34(8): 81–84. ]
- [ 31 ] 李志方, 钱亚飞, 刘思思, 等. 多菌株制曲混合发酵制备龙香芋酱工艺优化[J]. *中国酿造*, 2021, 40(8): 139–144. [ LI Z F, QIAN Y F, LIU S S, et al. Optimization of multi-strain koji-making mixed fermentation to prepare Longxiang taro paste[J]. *China Brewing*, 2021, 40(8): 139–144. ]
- [ 32 ] 王立江. 不同发酵方法对酱油品质的影响[J]. *江苏调味副食品*, 2006(3): 20–21. [ WANG L J. Effects of different fermentation methods on the quality of soy sauce[J]. *Jiangsu Seasoning and Non-staple Food*, 2006(3): 20–21. ]
- [ 33 ] 肖龙泉, 何苗, 江鹏, 等. 低盐接种发酵对黄豆酱的发酵过程的影响[J]. *中国调味品*, 2021, 46(10): 83–86. [ XIAO L Q, HE M, JIANG P, et al. Effects of low-salt inoculation fermentation on the fermentation process of soybean paste[J]. *China Condiments*, 2021, 46(10): 83–86. ]
- [ 34 ] 谢主兰, 涂苏红, 陈龙, 等. 响应面法优化酶法制备低盐虾酱的工艺[J]. *中国酿造*, 2013, 32(1): 40–45. [ XIE Z L, TU S H, CHEN L, et al. Optimization of enzymatic preparation of low-salt shrimp paste by response surface methodology[J]. *China Brewing*, 2013, 32(1): 40–45. ]
- [ 35 ] 康蕾, 刘素纯, 胡茂丰. 纯种米曲霉 AS3.042 制曲黄豆酱的后发酵条件优化[J]. *食品与机械*, 2015, 31(4): 203–207. [ KANG L, LIU S C, HU M F. Optimization of post-fermentation conditions for making koji soybean paste with pure *Aspergillus oryzae* AS3.042 [J]. *Food and Machinery*, 2015, 31(4): 203–207. ]
- [ 36 ] 汪洪涛. 市售调味酱营养成分和添加剂调查分析[J]. *食品工业*, 2020, 41(5): 337–340. [ WANG H T. Investigation and analysis of nutritional components and additives of sauces on market[J]. *Food Industry*, 2020, 41(5): 337–340. ]
- [ 37 ] 陈怡, 刘洋, 蒋立文, 等. 浏阳豆豉发酵中高产酶活菌株的分离鉴定及酶活性分析[J]. *中国酿造*, 2020, 39(8): 37–41. [ CHEN Y, LIU Y, JIANG L W, et al. Isolation, identification and enzyme activity analysis of high enzyme-producing strains in Liuyang Douchi fermentation[J]. *China Brewing*, 2020, 39(8): 37–41. ]
- [ 38 ] 杨杨, 曾剑华, 王冰, 等. 中国传统发酵豆制品风味物质的研究进展[J]. *大豆科学*, 2018, 37(6): 969–974. [ YANG Y, ZENG J H, WANG B, et al. Research progress on flavor compounds in traditional Chinese fermented soybean products[J]. *Soybean Science*, 2018, 37(6): 969–974. ]
- [ 39 ] 赵文佳, 梁强, 尹忠平, 等. 芡实酒糟酱油生产工艺的研究[J]. *食品科技*, 2018, 43(12): 305–313. [ ZHAO W J, LIANG Q, YIN Z P, et al. Research on the production process of gorgon glutinous rice soy sauce[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(12): 305–313. ]