

不同菌株及制曲方式对豆瓣酱制曲效果的影响

李雄波¹, 李婷¹, 王芳², 林子然³, 闵星², 周浩宇², 蒋四强¹, 范智义¹, 陈相杰¹, 邓维琴^{1*}
(1. 四川省食品发酵工业研究设计院有限公司, 食品微生物四川省重点实验室, 四川成都 611130)
(2. 成都扬名食品有限公司, 四川成都 611130) (3. 四川振兴产业技术研究院有限公司, 四川成都 610023)

摘要: 为探究发酵菌株和制曲方式对豆瓣曲制曲过程及效果的影响, 分别将 PNM003 和沪酿 3.042 米曲霉应用于圆盘制曲和传统开放制曲, 并考察了几种豆瓣曲制曲过程物料温度、微生物数量、酶活性能、理化指标、游离氨基酸和挥发性成分等差异。结果表明, 圆盘制曲过程具有更稳定的物料温度 (30.8~34.4 ℃), 霉菌数量较开放制曲提高 11.52%~26.27%, 蛋白酶活力提升 16.40~406.79 U·g⁻¹, 淀粉酶活力达 1 500.06~2 062.38 U·g⁻¹, 表现出更优的酶活性能。其中, 菌株 PNM003 制备豆瓣曲霉菌总数及酶活性能最为突出。此外, 采用 PNM003 米曲霉制备的豆瓣曲在圆盘制曲条件下总酸含量 (1.00 g/100 g) 显著低于开放制曲, 且具备更优质的外观品质。同时, 其游离氨基酸滋味特征谱也得到了有效改善。挥发性成分分析显示, PNM003 菌株产生的风味物质种类较沪酿 3.042 更丰富, 圆盘制曲较开放制曲风味物质多样性更高, 且霉味物质百分含量降低至 0.38%~2.97%。由此可见, 相较于开放制曲, 圆盘制曲能显著提升豆瓣曲质量, 尤其是以 PNM003 米曲霉为发酵菌种优势更加明显。该研究为优化豆瓣酱生产工艺、提升豆瓣酱品质提供理论依据。

关键词: 米曲霉; 圆盘制曲; 开放制曲; 豆瓣曲
文章编号: 1673-9078(2026)05-89-100 **DOI:** 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.5.0377

Effects of *Aspergillus oryzae* Strains and Koji-making Methods on Broad Bean Koji Fermentation

LI Xiongbo¹, LI Ting¹, WANG Fang², LING Ziran³, MIN Xing², ZHOU Haoyu², JIANG Siqiang¹, FAN Zhiyi¹,
CHEN Xiangjie¹, DENG Weiqin^{1*}
(1.Sichuan Food Fermentation Industry Research and Design Institute Co. Ltd., Food Microbiology Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 611130, China)(2.Chengdu Yangming Food Co. Ltd., Chengdu 611130, China)
(3.Sichuan Zhenxing Industrial Technology Research Institute Co. Ltd., Chengdu 610023, China)

Abstract: To investigate the effects of fermentation strains and koji-making methods on broad bean koji production, *Aspergillus oryzae* strains PNM003 and HUNIANG 3.042 were applied in disc koji-making and traditional open koji-making systems. Changes in substrate temperature, microbial populations, enzymatic activities, physicochemical properties, free amino acid composition, and volatile flavor compounds were systematically analyzed during the koji-making process. The results demonstrated that disc koji-making maintained more stable substrate temperatures (30.8~34.4 ℃), increased mold counts by 11.52%~26.27%, and significantly enhanced protease (16.40~406.79 U·g⁻¹) and amylase activities (1 500.06~2 062.38 U·g⁻¹) compared with open koji-

引文格式:
李雄波,李婷,王芳,等.不同菌株及制曲方式对豆瓣酱制曲效果的影响[J].现代食品科技,2026,42(5):89-100.

LI Xiongbo, LI Ting, WANG Fang, et al. Effects of *Aspergillus oryzae* strains and koji-making methods on broad bean koji fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(5): 89-100.

收稿日期: 2025-03-17; 修回日期: 2025-06-11; 接受日期: 2025-06-16
基金项目: 四川省中央引导地方科技发展专项 (2024ZYD0252)
作者简介: 李雄波 (1993-), 男, 硕士, 工程师, 研究方向: 传统发酵食品研究与开发, E-mail: li1129531722@163.com; 共同第一作者: 李婷 (1997-), 女, 硕士, 研究方向: 传统发酵食品研究与开发, E-mail: 1569590139@qq.com
通讯作者: 邓维琴 (1990-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 传统发酵食品研究与开发, E-mail: dengweiqin77@163.com

making, indicating superior enzymatic performance. Amongn the tested strains, PNM003-fermented broad bean koji exhibited the highest microbial abundance and enzymatic activities. Moreover, the broad bean koji prepared with *A. oryzae* PNM003 under disc koji-making conditions showed significantly lower total acidity (1.00 g/100 g) than that produced by open koji-making, along with improved visual appearance and a more favorable free amino acid taste profile. Volatile compound analysis revealed that PNM003 generated a richer and more diverse aroma profile than HUNIANG 3.042. Disc-koji-making further increased flavor diversity and reduced the proportion of musty compounds to 0.38%~2.97%. These findings indicate that disc koji-making significantly enhances the quality of broad bean koji, particularly when using the *A. oryzae* PNM003 strain, providing a scientific basis for optimizing Doubanjiang (broad bean paste) fermentation processes and improving product quality.

Key words: *Aspergillus oryzae*; disc koji-making; open koji-making; broad bean koji

豆瓣酱作为中国传统的豆类发酵食品,不仅是中餐中重要的调味基质^[1],更因富含类黄酮、原花青素、活性肽等多种生理活性物质,在抗氧化、抗炎及代谢调节方面展现出独特的功能价值^[2]。豆瓣曲是生产豆瓣酱的中间产品,主要由小麦粉、蚕豆和米曲霉发酵制成^[3]。制曲过程中,米曲霉分泌的酶系将原料中的蛋白质和淀粉降解为肽、游离氨基酸和糖类等小分子物质,这些产物既是风味形成的前体物质,还直接影响豆瓣酱的营养价值和感官特性^[4]。因此,制曲的好坏对豆瓣酱产品的风味和功能具有决定性作用。

制曲过程中,制曲方式和发酵菌株是关键的影响因素^[5]。目前,以厚层通风制曲为代表的传统开放式制曲仍然是豆瓣酱酿造的主流制曲方式。但是,其发酵过程的机械化和自动化程度较低、环境参数不可控等局限性,导致产品质量不稳定且无法满足日益增长的市场需求^[6,7]。相比之下,圆盘制曲作为一种相对成熟的工业化制曲工艺,其技术优势体现在微生物定向调控、环境精准调控、生产效能提升等多维度^[5,8]。目前已在酱油、白酒等发酵食品的生产中得到成功应用^[9,10]。近期研究显示,通过通过智能PID算法可显著提高圆盘制曲机的控制精度,进而提高产品的感官品质及酶活性能^[11]。然而,作为一种新兴的制曲方式,圆盘制曲在豆瓣酱酿造中的应用仍需深入研究,以提高其在制曲质量和生产效率方面的潜力^[5]。此外,米曲霉作为豆瓣酱制曲的核心功能微生物^[12],其增殖期间分泌的酶活性能将影响原料利用率与出品率^[13]。近年来研究表明,通过定向选育米曲霉菌株可显著提升发酵品质,如Niu等^[4]通过筛选高蛋白活性的米曲霉BL18使得豆瓣酱的鲜味氨基酸和挥发性风味物质浓度显著升高。因此,深入研究不同制曲方式和菌种酶活特性对豆瓣酱制曲过程的影响,对于优化生产工艺、提升产品品质具有重要意义。

本研究分别以PNM003米曲霉和沪酿3.042米曲霉为发酵起始菌种,考察了传统开放式制曲和圆盘制

曲两种制曲方式对制曲过程中微生物量、酶活指标、理化指标以及成曲质量的影响,旨在为豆瓣酱制曲工艺的优化提供理论依据,同时为高品质豆瓣酱的开发提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

沪酿3.042米曲霉(HN),济宁玉园生物科技有限公司(中国山东);PNM003米曲霉(PN),实验室前期筛选得到的优质米曲霉菌种,保存于中国广东微生物培养保藏中心,保藏号GDMCC 60615的米曲霉菌株。

蚕豆、面粉、食盐,市售;葡萄糖、可溶性淀粉、甲醛、正己烷、三乙胺、异硫氰酸苯酯、水合茚三酮、氯化镉、福林酚、对硝基苯胺等(分析纯),成都市科隆化学品有限公司;N-苄氧羰酰基-L-苯丙氨酰-L-亮氨酸、L-亮氨酸-4-硝基苯胺,上海源叶生物科技有限公司;乙腈、甲醇、游离氨基酸混合标准品(色谱纯),美国Sigma-Aldrich公司;PDA培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;3,5-二硝基水杨酸(纯度98%),上海泰坦科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

GC MS-TQ8040 三重四级杆气质联用仪(GC-MS),日本岛津公司;GERSTEL 多功能自动进样器,德国哲思泰公司;50/30 μm DVB/CWR/PDMS 固相微萃取头,广州智达实验室科技有限公司;VF-WAXms 色谱柱(60 m $\times$ 2.5 mm $\times$ 0.25 μm),美国安捷伦公司;Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱仪:美国安捷伦科技有限公司;Multiskan FC 型酶标仪,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司;SevenDirect SD20 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;MODEL ESJ200-4B 分析天平,沈阳龙腾电子有限公司;CM-10 圆盘制曲机,

中山市中酿机械设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 制曲

开放制曲：去壳蚕豆沸水漂烫 3 min 后，立即水冷至 35 ℃ 左右，沥干水分后，与 15%（蚕豆质量计）的小麦粉混合，并分别接种质量分数为 0.03% 的沪酿 3.042 米曲霉和 PNM003 米曲霉。混合料输送至通风条池，自然制曲发酵，12 h 后进行人工翻曲，48 h 后获得成曲。制曲过程跟踪其温度变化情况，并在 0、12、24、36、48 h 采样，采用五点法取样。采集的样品立即送回实验室进行微生物计数和酶活测定，其余样品保藏于 -20 ℃，以供后续分析检测。

圆盘制曲：去壳蚕豆沸水漂烫 3 min 后，立即风冷却至 35 ℃ 左右，与 15%（蚕豆质量计）的小麦粉混合，并分别接种 0.03% 的沪酿 3.042 米曲霉和 PNM003 米曲霉。混合料输送至圆盘制曲机中进行制曲发酵，12 h 后进行翻曲一次，48 h 后获得成曲。制曲过程跟踪其温度变化情况，并在 0、12、24、36、48 h 采样，采用五点法取样。采集的样品立即送回实验室进行微生物计数和酶活测定，其余样品保藏于 -20 ℃，以供后续分析检测。

1.3.2 豆瓣曲理化测定

水分参考《GB 5009.235-2016 食品中水分的测定》中直接干燥法测定；总酸测定参考《GB 12456-2021 食品中总酸的测定》中自动电位滴定法；氨基酸态氮测定参考《GB 5009.235-2016 食品中氨基酸态氮的测定》中酸度计法；还原糖测定采用 3,5-二硝基水杨酸法测定^[14]。

1.3.3 豆瓣曲酶活力测定

淀粉酶活力的测定参考李洁芝等^[15]的测定方法。蛋白酶活力的测定参考 SB/T 10317-1999《蛋白酶活力测定法》的测定方法。

1.3.4 豆瓣曲风味成分测定

使用 HPLC 测定游离氨基酸（FAAs）。准确称取 2.0 g 均匀粉碎后的样品于 50 mL 离心管中，加入 18 g 蒸馏水涡旋混匀，超声提取 30 min（30 ℃，功率 100%），最后以 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min，取上清液为待测液。待测液衍生方法、HPLC 分析方法均参照李雄波等^[16]报道的方法进行。

使用 GC-MS 测定挥发性成分。样品处理参考 Li 等^[17]文中的方法。GC 程序：50 ℃，保持 3 min；以 5 ℃·min⁻¹

的速度升温至 85 ℃，保持 1.5 min；以 10 ℃·min⁻¹ 的速度升温至 100 ℃，保持 0.5 min；以 2.5 ℃·min⁻¹ 的速度升温至 145 ℃，保持 0.5 min；以 2 ℃·min⁻¹ 的速度升温至 175 ℃，保持 1.5 min；以 10 ℃·min⁻¹ 的速度升温至 250 ℃；高纯氦气为载气，柱流量为 1 mL·min⁻¹。MS 程序：采集方式为 Q3 Scan，离子源温度为 230 ℃，溶剂延迟时间 2 min，扫描范围为 35~350 *m/z*。数据处理：未知化合物在 NIST17s 谱库进行检索匹配，仅采用相似度 ≥ 80% 的匹配结果实现化合物定性。采用面积归一化法实现挥发性风味物质的相对定量。

1.3.5 微生物菌落计数

将取得的豆瓣曲样品进行细菌总数和霉菌总数测定。细菌总数的测定：根据 GB 4789.2-2022《食品微生物学检验菌落总数测定》中方法稍作调整，用含有 0.003% 纳他霉素的平板计数培养基倾注培养。霉菌总数的测定：根据 GB 4789.15-2016《食品微生物学检验霉菌和酵母菌计数》中平板计数法进行计数。

1.4 数据处理与分析

本文中每个样品均设置三个平行，所测指标数据均以干基计算。Excel 用于数据的初步处理，Origin 64 用于绘制折线图、Tbtools 绘制 Upset 图、使用 IBM SPSS Statistics 25 对数据进行单因素 ANOVA 检验分析（*P* < 0.05）、Adobe illustrator CC 用于图象美化。

2 结果与讨论

2.1 制曲过程中物料温度变化情况

对不同菌种在开放制曲和圆盘制曲过程中物料温度进行了跟踪，结果如图 1 所示。由图 1 可知，圆盘制曲过程中，物料温度始终维持相对稳定（30.8~34.4 ℃），期间无显著波动，这说明圆盘制曲系统能够对制曲过程中温度进行精准调控。温度过高或过低都会抑制米曲霉菌丝生长和分生孢子的形成，最终影响米曲霉的糖代谢、甘油脂途径、甘油磷脂途径和亚油酸代谢过程^[18]。圆盘制曲过程中物料温度维持在米曲霉的最适生长附近，有利于提高成曲的酶活性。相比之下，开放制曲过程中物料温度波动剧烈（19.3~42.9 ℃），这表明开放制曲对过程的温度调控较为粗放。然而，在相同制曲条件下，PNM003 米曲霉和沪酿 3.042 米曲霉制曲过程中温度变化情况较为一致。由此可知，影响制曲过程中温度的主要因素是制曲方式而

不是菌种。

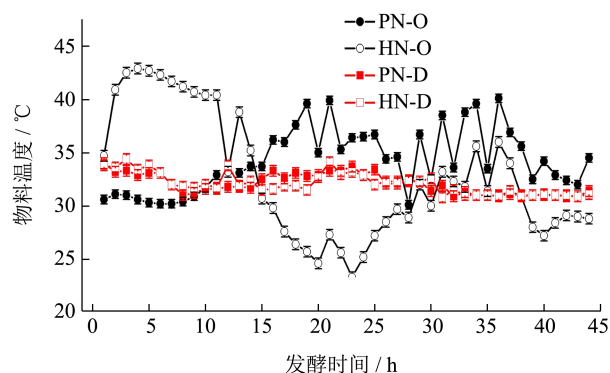


图1 不同菌种在不同制曲方式过程中物料温度变化情况

Fig.1 Substrate temperature profiles during koji-making with different strains and fermentation systems

注: PN-O 代表 PNM003 米曲霉开放制曲, HN-O 代表沪酿 3.042 米曲霉开放制曲, PN-D 代表 PNM003 米曲霉圆盘制曲, HN-D 代表沪酿 3.042 米曲霉圆盘制曲。下同。

2.2 制曲过程中微生物数量变化情况

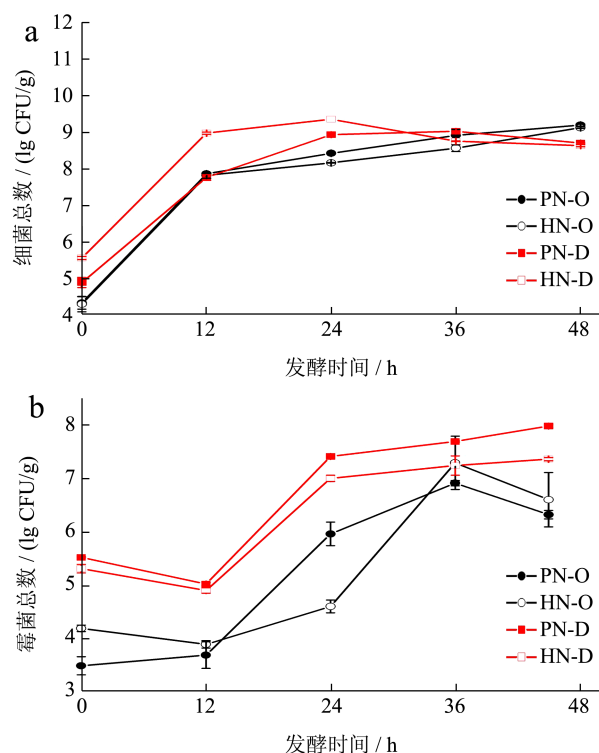


图2 不同菌种在不同制曲方式过程中微生物变化

Fig.2 Microbial population dynamics during koji-making with different strains and fermentation systems

微生物量是表征豆瓣酱制曲过程是否正常、是否被杂菌污染的重要指标。其中,霉菌生长越旺盛、细菌数量越低,则表明制曲质量越好。两株米曲霉菌种分别在开放制曲和圆盘制曲过程中微生物数量变化情况如图2所示。由图可知,不同米曲霉菌种在开放制

曲和圆盘制曲过程中霉菌数量、细菌数量变化趋势一致。其中,细菌均在发酵前12 h迅速增殖,之后趋于稳定或略微增长(图2a);而霉菌数量则主要在发酵12~36 h迅速增殖(图2b),这是由于细菌与霉菌增殖速度不同导致。因此,在制曲起始阶段,尤其是前12 h加强环境管理至关重要,以避免杂菌的过度增殖。但是,不同发酵菌种和制曲方式间微生物数量水平也存在一定差异。具体而言,PNM003 米曲霉和沪酿 3.042 米曲霉在圆盘制曲结束时成曲的细菌总数分别为 8.63、8.70 lg CFU/g,略低于开放制曲成曲的 9.12、9.19 lg CFU/g,这是由于开放制曲过程中环境微生物接触广泛造成^[19]。此外,两株米曲霉在圆盘制曲过程中霉菌数量均明显高于开放制曲(提升了 11.52% 和 26.27%),这表明圆盘制曲的环境条件更适宜米曲霉等霉菌的生长。特别值得注意的是,PNM003 米曲霉在圆盘制曲条件下生长表现优于沪酿 3.042 米曲霉。制曲结束时,PNM003 米曲霉制备成曲的霉菌数量达到 7.98 lg CFU/g,而沪酿 3.042 米曲霉制备成曲的霉菌数量为 7.36 lg CFU/g。

2.3 制曲过程中酶活指标变化情况

制曲的主要目的是富集米曲霉产生的各种生物酶,因此酶活指标是评价制曲效果的核心指标^[20]。两株米曲霉菌种分别在开放制曲和圆盘制曲过程中酶活变化情况如图3所示。由图3a可知,相较于开放制曲,圆盘制曲能够显著提升制曲过程中淀粉酶活($P<0.05$)。其中,制曲结束时 PNM003 米曲霉和沪酿 3.042 米曲霉制备的成曲中淀粉酶活达到 2 062.38、1 500.06 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$,分别提升 1 524.67 和 678.09 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$,这远高于 Peng 等^[5]在圆盘发酵系统中制备的蚕豆曲淀粉酶活(953 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)。此外,在圆盘制曲条件下 PNM003 米曲霉在 24 h 淀粉酶活便显著高于沪酿 3.042 米曲霉($P<0.05$),这是由于开放制曲后期湿度下降导致米曲霉的生长代谢停滞所致。同样地,圆盘制曲在提升豆瓣酱制曲过程中的中性蛋白酶活和酸性蛋白酶活效果显著(图3b、3c)。制曲结束时,PNM003 米曲霉和沪酿 3.042 米曲霉圆盘制曲的中性蛋白酶活和酸性蛋白酶活,相较于开放制曲分别提升 406.79、92.88 和 47.43、93.99 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ 。这可能是由于开放制曲温度波动较大,导致米曲霉生长受到影响,进而导致其产酶能力下降^[21]。特别值得注意的是,PNM003 米曲霉与沪酿 3.042 米曲霉在开放制曲过程中中性蛋白酶活和酸性蛋白酶活无明显差异;但是在圆盘制曲过程中 PNM003 米曲霉的中性蛋白酶远远高于沪酿 3.042 米曲霉,尤其是制曲 24 h 后。由此可知,制曲方式对发

酵菌种的生长代谢影响较大。总体而言,在豆瓣酱制曲过程中,与开放制曲相比,圆盘制曲可显著提高淀粉酶、中性蛋白酶以及酸性蛋白酶的活性。此外,在圆盘制曲条件下,PNM003 米曲霉能够提升淀粉酶和中性蛋白酶的活性。

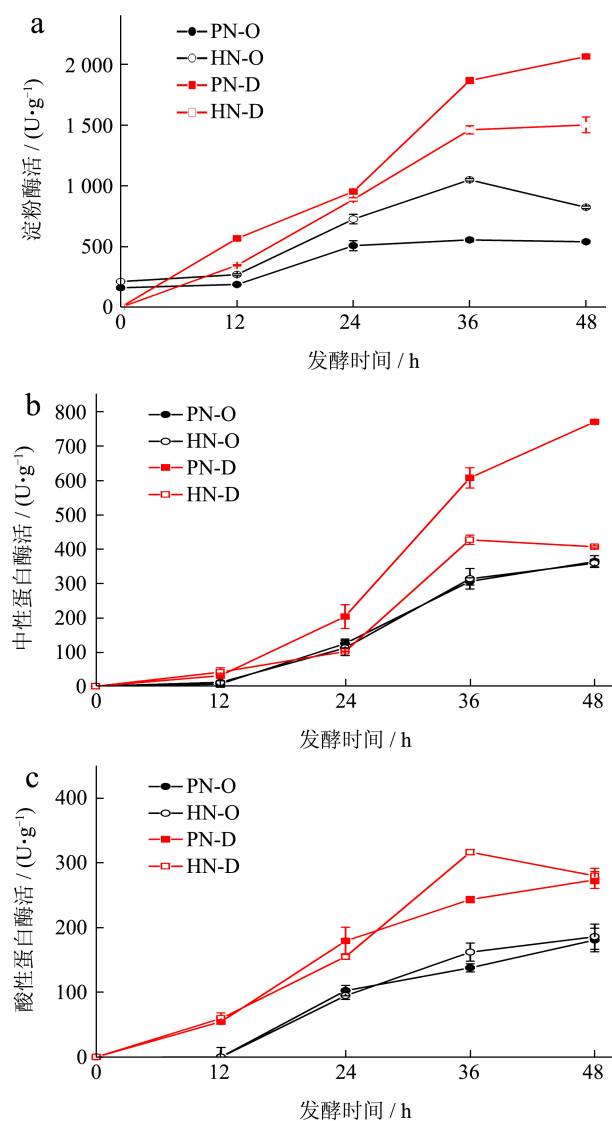


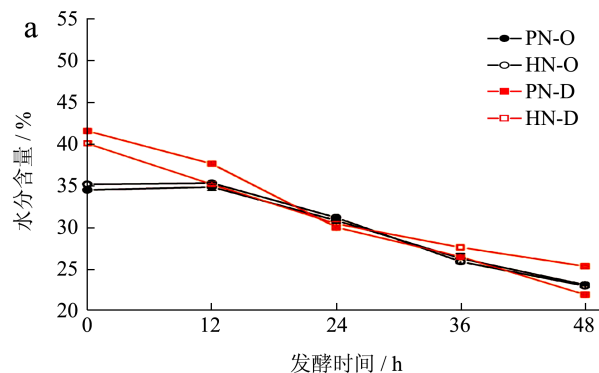
图3 不同菌种在不同制曲方式过程中酶活性变化

Fig.3 Enzymatic activity evolution during koji-making with different strains and fermentation systems

2.4 制曲过程中理化指标分析

理化指标是评价制曲效果的重要指标^[22]。跟踪了PNM003 米曲霉和沪酿 3.042 米曲霉在圆盘制曲和开放制曲过程中理化指标变化情况,结果如图4所示。由图4a可知,水分含量随着制曲的进行逐渐下降,制曲结束时水分质量分数在21.96%~25.35%范围,各实

验组之间差异较小。但与开放制曲相比,圆盘制曲起始时(0 h)的水分质量分数更高,这是由于两种制曲方式前处理略微差异导致。然而,制曲方式对总酸、氨基酸态氮以及还原糖等理化指标影响显著;与之相比发酵菌种的影响相对较小(图4b~4d)。其中,两株米曲霉菌种开放制曲过程中总酸含量始终高于圆盘制曲(图4b)。制曲结束时,PNM003 米曲霉和沪酿 3.042 米曲霉圆盘制曲的成曲中总酸含量分别为1.00 g/100 g、1.09 g/100 g;而开放制曲分别高达1.24 g/100 g、1.17 g/100 g。成曲总酸含量过高,将抑制后续发酵过程中各种微生物生长代谢及酶解反应,因此认为成曲酸度接近中性为宜。此外,总酸含量可反映微生物代谢及杂菌污染等情况^[19],由于开放制曲过程中温度调控粗放(图1)和细菌数量水平更高(图2a),因此导致开放制曲的总酸含量更高。制曲过程中氨基酸态氮含量变化情况如图4c所示,在制曲前24 h圆盘制曲与开放制曲的氨基酸态氮含量无明显差异(0.29~0.34 g/100 g),但是之后开放制曲的氨基酸态氮含量大幅上升。制曲结束时,相较于圆盘制曲,PNM003 米曲霉和沪酿 3.042 米曲霉制备的成曲中氨基酸态氮含量分别显著提升了45.16%、46.67% ($P<0.05$)。虽然圆盘制曲的蛋白酶活性更高,但其制曲后期氨基酸态氮含量反而更低,其原因是在低水分的固态条件下酶解反应受到抑制,更多的是微生物的生长活动的结果。此外,开放制曲过程中还原糖含量也显著高于圆盘制曲($P<0.05$),这与开放制曲过程中温湿度变化复杂促进了更剧烈的生化反应有关^[23],而非米曲霉酶解反应结果。进一步从成曲外观来看(图4e),开放制曲的豆瓣曲颜色呈土黄绿色,颜色不均一,且存在部分坏曲现象,成曲品质较差;而圆盘制曲的豆瓣曲呈黄绿色,菌丝生长均匀,颜色均一,曲料干燥疏松。总而言之,圆盘制曲效果更好,尤其是总酸含量更低,成曲外观品质更佳。



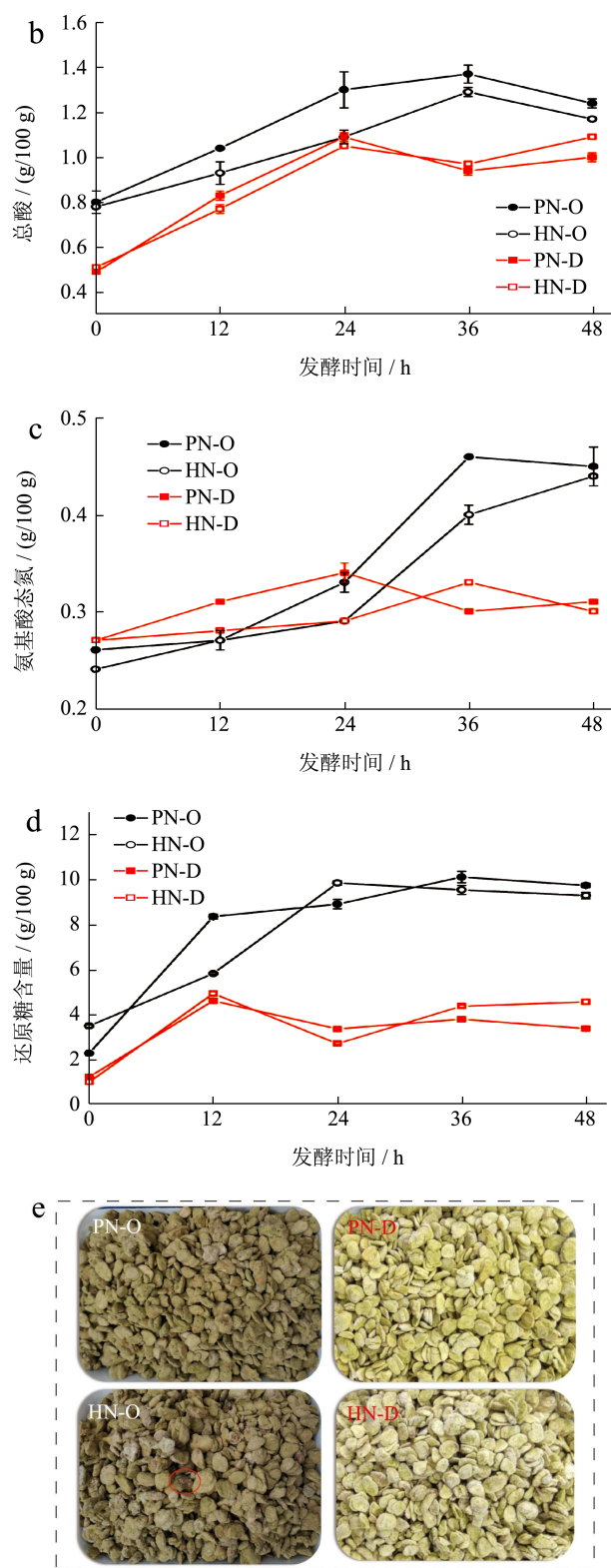


图4 不同菌种在不同制曲方式过程中理化指标变化及成曲状态

Fig.4 Physicochemical parameter variations during koji-making with different strains and fermentation systems and broad bean koji morphology

2.5 制曲过程中游离氨基酸变化情况

跟踪了制曲过程中游离氨基酸变化情况, 结果如图5所示。由图可知, 制曲过程中游离氨基酸总含量在初始阶段保持稳定, 制曲12 h开始迅速增加, 并在36 h时达到峰值, 之后趋于稳定或略微下降。从图5e可知, 两株米曲霉菌种在开放制曲过程中游离氨基酸总含量显著高于圆盘制曲过程中 ($P < 0.05$), 尤其是发酵结束两者相差1倍左右。但是相同制曲方式条件下, PNM003米曲霉和沪酿3.042米曲霉的游离氨基酸总含量差异较小(开放制曲: $13.75 \sim 13.82 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 圆盘制曲: $7.00 \sim 7.16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。由此说明, 制曲方式对制曲过程中游离氨基酸变化影响显著; 而发酵菌种对制曲过程中游离氨基酸变化影响较小。

16种游离氨基酸在制曲过程中含量变化如图5a~5d所示, 除精氨酸外, 其余游离氨基酸含量均呈现先增加后减少的变化趋势。精氨酸是豆瓣曲中含量最高的游离氨基酸, 其主要由蚕豆原料带入, 并在制曲过程中呈逐渐下降趋势^[24]。圆盘制曲过程中精氨酸含量由0 h时的 $3.62 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $4.17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (PNM003米曲霉和沪酿3.042米曲霉) 下降至48 h的 $1.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $1.46 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 而开放制曲过程中精氨酸含量由0 h时的 $3.65 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $3.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 下降至48 h的 $2.41 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $2.36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。开放制曲和圆盘制曲中精氨酸含量分别显著下降了29.13%~33.97%、62.71%~64.99% ($P < 0.05$)。精氨酸可以转化为瓜氨酸^[25]、鸟氨酸^[26]和脯氨酸^[27], 甚至可能会进一步转化为腐胺^[28]。此外, 开放制曲过程中其余氨基酸的变化幅度也明显高于圆盘制曲, 这可能是开放制曲更高温度下更剧烈的微生物代谢活动及开放环境下杂菌共同作用的结果^[29]。

图5f根据不同氨基酸的呈味特性对豆瓣曲中测定的游离氨基酸进行了分类。本次制备豆瓣曲中主要包含三种呈味氨基酸, 分别是苦味、甜味、鲜味氨基酸^[30]。其中苦味氨基酸是曲中的主要氨基酸。制曲结束时, PNM003米曲霉和沪酿3.042米曲霉菌圆盘制曲的成曲中苦味氨基酸含量占比分别为53.29%、52.23%, 而开放制曲分别高达55.43%、53.60%; 鲜味氨基酸含量占比分别为19.71%、18.58%, 高于开放制曲曲样(15.77%、16.73%), 这表明圆盘制曲能提高鲜味氨基酸的占比, 降低苦味氨基酸的占比, 改善豆瓣曲的氨基酸风味谱系。

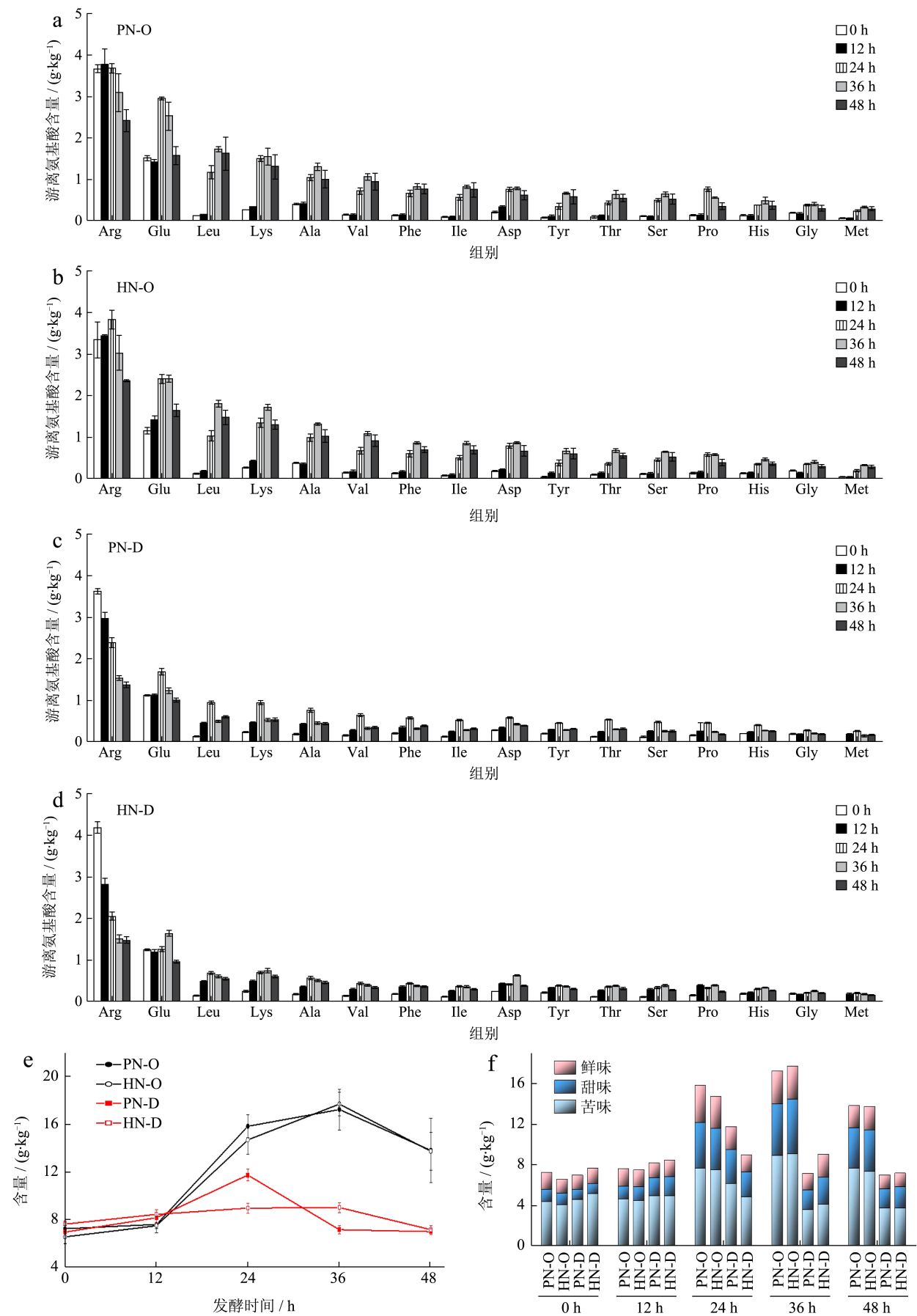


图 5 不同菌种在不同制曲方式过程中游离氨基酸变化

Fig.5 Free amino acid profile changes during koji-making with different strains and fermentation systems

2.6 成曲挥发性组分对比分析

采用 GC-MS 对不同菌株在不同制曲方式下制备的成曲样品中挥发性成分进行测定，得到 4 种成曲样品中的总离子流图（图 6）。在此基础上，采用面积归一化法实现成曲中挥发性物质的相对定量，结果如表 1 所示。由于豆瓣酱制曲时间相对较短（48 h），发酵基质中的大分子物质未被完全水解，因此产生的挥发性成分较少^[23]。由图 7a 可知，成熟豆瓣曲的主要挥发性成分为酯类和醇类^[24]，且圆盘制曲条件下豆瓣曲中酯类、醛类、烃、酮类化合物比开放制曲曲样中更为丰富。为更直观表现不同制曲方式和不同菌株制备的豆瓣曲的挥发性成分的重叠情况，对挥发性成分做 Upset 图分析。如图 7b 所示，PNM003 米曲霉和沪酿 3.042 米曲霉在圆盘制曲条件下成曲的挥发性成分种类数分别为 37 种、35 种，显著高于开放制曲（25 种、24 种）（ $P<0.05$ ），且不论是圆盘制曲还是开放制曲，PNM003 菌株制备的豆瓣曲挥发性成分种类多样性都比沪酿 3.042 多。PNM003 米曲霉和沪酿

3.042 米曲霉在开放制曲和圆盘制曲条件下制备的 4 种豆瓣曲的共有挥发性成分为 14 种，其中 PNM003 米曲霉制备两种豆瓣曲特有挥发性成分为辛酸甲酯，主要呈蔬果香。此外，圆盘制曲条件下豆瓣曲特有挥发性成分数量比开放制曲豆瓣曲中特有挥发性成分数量更为丰富。开放制曲方式下特有 4 种风味物质，分别为芳樟醇、十二甲基十六烷酸甲酯、2,3-丁二醇、4-乙烯基愈创木酚，主要能赋予豆瓣曲花果香、焦糖香、烟熏风味；圆盘制曲方式下豆瓣曲种特有 10 种风味物质，分别为辛醇、烃类物质、十五烷酸甲酯、(E,E)-2,4- 壬二烯醛、2-庚烯醛、(2R,3R)-(-)-2,3-丁二醇、(E)-2-辛烯醛、4-甲基戊酸甲酯、2-羟基-4-甲基戊酸甲酯，主要能赋予豆瓣曲果香、脂香、草本香、奶酪香。上述结果说明相比于沪酿 M3.042，PNM003 米曲霉菌株在圆盘制曲条件下，能显著提升豆瓣酱制曲的挥发性成分及风味丰富度。表 1 中物质风味信息源自 The Good Scents Company Information System^[31]。

表 1 不同豆瓣曲中挥发性成分
Table 1 Volatile components in different watercress songs

保留时间	中文名称	英文名称	CAS	分类	峰面积相对含量/%				风味特征
					HN-D	HN-O	PN-D	PN-O	
10.687	己醛	hexanal	66-25-1	醛	6.92	7.08	5.02	11.46	醛香、果香、汗味
13.396	2-羟基-4-甲基戊酸甲酯	2-hydroxy-4-methyl-pentanoic acid methyl ester	40348-72-9	酯	59.45	0.00	64.29	0.00	—
13.759	4-甲基戊酸甲酯	methyl 4-methylvalerate	2412-80-8	酯	1.28	0.00	1.33	0.00	果香、甜香、奶酪香
14.060	己酸甲酯	methyl-hexanoate	106-70-7	酯	0.00	0.00	0.10	0.00	果香、脂肪香、奶油香
14.535	异戊醇	3-methyl-1-butanol	123-51-3	醇	1.51	2.45	0.63	3.62	果香、醇香
15.114	2-戊基呋喃	2-pentyl-furan	3777-69-3	呋喃	0.64	1.68	0.55	2.11	果香、泥土香、豆香
15.900	戊醇	pentanol	71-41-0	醇	1.15	1.12	0.78	1.80	甜香、油脂香
17.159	3-羟基-2-丁酮	acetoin	513-86-0	酮	0.00	0.00	0.28	0.00	甜香、奶油香、黄油香
17.180	甲氧基乙酸己酯	methoxyacetic acid, hexyl ester	6290-49-9	酯	0.20	0.00	0.00	0.00	—
18.226	2-甲基-3-辛烷酮	2-methyl-3-octanone	923-28-4	酮	0.00	0.00	0.16	0.00	—
18.539	2-庚烯醛	(E)-2-heptenal	18829-55-5	醛	0.66	0.00	0.30	0.00	辛辣、清香
19.440	己醇	hexanol	111-27-3	醇	3.19	12.33	2.41	13.31	甜香、果香、醇香
20.796	辛酸甲酯	octanoic acid, methyl ester	111-11-5	酯	0.00	0.00	0.14	0.58	蔬果香、草本香
20.993	壬醛	nonanal	124-19-6	醛	0.35	1.21	0.37	0.80	花香、果香、脂香
21.654	3-辛烯-2-酮	oct-3-en-2-one	1669-44-9	酮	0.00	0.00	0.22	0.00	泥土香、辛辣、甜香、草本香
22.128	3-乙基-2-甲基-1,3-己二烯	3-ethyl-2-methyl-1,3-hexadiene	61142-36-7	烃	0.28	0.00	0.23	0.00	—
22.470	(E)-2-辛烯醛	(E)-2-octenal	2548-87-0	醛	1.20	0.00	0.85	0.00	草本香、脂香、果香
22.989	乙酸	acetic acid	64-19-7	酸	1.42	0.00	0.00	0.00	酸香、辛辣
23.065	2-甲氧基丙酸甲酯	methyl 2-methoxypropenoate	17639-76-8	酯	0.00	0.00	2.91	0.00	—

续表1

保留时间	中文名称	英文名称	CAS	分类	峰面积相对含量/%				风味特征
					HN-D	HN-O	PN-D	PN-O	
23.075	1-辛烯-3-醇	1-octen-3-ol	3391-86-4	醇	2.57	11.52	0.00	5.15	泥土香、蘑菇香、霉味
23.353	庚醇	heptanol	111-70-6	醇	0.40	1.94	0.38	2.00	霉味儿、草本香、甜香
25.526	2-乙基己醇	2-ethyl-1-hexanol	104-76-7	醇	0.00	1.12	0.10	0.92	花香、甜香、柑橘香
26.155	苯甲醛	benzaldehyde	100-52-7	醛	0.56	3.14	0.45	1.76	苦杏仁味、樱桃味、甜香
26.732	(2R,3R)-(-)-2,3-丁二醇	[R-(R*,R*)]-2,3-butanediol	24347-58-8	醇	1.13	0.00	2.54	0.00	—
27.549	辛醇	octanol	111-87-5	醇	0.21	0.00	0.21	0.00	果香、蜡质香
27.661	2,3-丁二醇	2,3-butanediol	513-85-9	醇	0.00	2.22	0.00	3.25	果香、奶油香
27.872	芳樟醇	linalool	78-70-6	醇	0.00	0.68	0.00	0.51	柑橘香、花香、甜香
29.296	十八烷	octadecane	593-45-3	烃	0.10	0.00	0.00	0.00	—
29.308	十九烷	nonadecane	629-92-5	烃	0.10	0.00	0.00	0.00	—
30.741	2-辛烯-1-醇	(E)-2-octen-1-ol	18409-17-1	醇	0.00	0.00	0.00	0.69	柑橘清香、脂肪香
32.231	2,6,10,14-四甲基十五烷	Pentadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	1921-70-6	烃	0.41	0.00	0.00	0.00	—
32.364	3-甲基丁酸	Butanoic acid,3-methyl-	503-74-2	酸	2.09	0.00	0.00	0.00	酸香、奶酪香
33.609	二十烷	eicosane	112-95-8	烃	0.11	0.00	0.34	0.76	—
33.761	(E,E)-2,4-壬二烯醛	(E,E)-2,4-nonadienal	5910-87-2	醛	0.33	0.00	0.22	0.00	果香、脂香、奶油香
34.630	α -松油醇	terpineol	98-55-5	醇	0.00	0.62	0.00	0.00	松木香、柑橘香、花香
35.909	甲氧基苯基肼	oxime-, methoxy-phenyl-	67160-14-9	其他	1.22	0.49	1.03	0.57	—
36.960	二十五烷	pentacosane	629-99-2	烃	0.28	0.00	0.00	0.00	—
36.979	二十六烷	hexacosane	630-01-3	烃	0.34	0.00	0.00	0.00	—
38.643	(E,E)-2,4-癸二烯醛	(E,E)-2,4-decadienal	25152-84-5	醛	0.17	0.39	0.18	0.50	果香、坚果香、油脂香
39.200	反式茴香脑	anethole	4180-23-8	醚	0.00	0.00	0.10	0.00	甜香、茴香、辛辣
40.250	4-乙基-3-壬烯-5-炔	4-ethyl-3-nonen-5-yne	74685-67-9	烃	0.28	0.00	0.21	0.00	—
41.847	十六碳醇酯	2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	6846-50-0	酯	2.61	6.04	0.44	1.27	—
44.452	苯乙醇	phenylethyl Alcohol	60-12-8	醇	0.00	0.46	0.18	0.38	花香、玫瑰香
47.816	肉豆蔻酸甲酯	methyl tetradecanoate	124-10-7	酯	0.26	1.25	0.39	0.00	花香
48.437	9-十八碳烯酸甲酯	(E)-9-octadecenoic acid, methyl ester	1937-62-8	酯	0.86	4.69	1.33	4.70	—
51.415	十二甲基十六烷酸甲酯	(S)-12-methyl-tetradecanoic acid, methyl ester	62691-05-8	酯	0.00	0.75	0.00	1.08	—
51.735	十五烷酸甲酯	pentadecanoic acid, methyl ester	7132-64-1	酯	0.29	0.00	0.38	0.00	—
52.043	亚油酸甲酯	methyl linoleate	112-63-0	酯	1.36	8.95	2.79	7.75	木质香、油香
52.361	甲基十三烷酸甲酯	tridecanoic acid, 12-methyl-, methyl ester	5129-58-8	酯	0.00	0.77	0.10	2.39	—
53.491	亚油酸乙酯	linoleic acid ethyl ester	544-35-4	酯	0.00	0.00	0.27	0.00	果香、油脂香
54.207	十六酸甲酯	hexadecanoic acid, methyl ester	112-39-0	酯	6.04	22.97	7.80	26.10	油腻的、蜡质感、鸢尾根
54.315	4-乙基愈创木酚	4-vinyl-guaiacol	7786-61-0	酚	0.00	6.11	0.00	6.53	辛辣的、花香、烟熏味

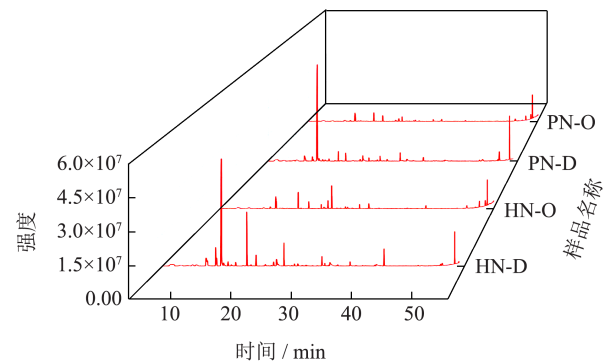


图 6 不同菌株在不同制曲方式下制备成曲的总离子流图

Fig.6 Total ion current chromatogram of broad bean koji produced by different strains and fermentation systems

通过挥发性成分聚类热图分析（图 7c），可将

4 种豆瓣曲样品分为 2 类，PNM003 米曲霉和沪酿 3.042 米曲霉圆盘制曲曲样为第一类，开放制曲曲样为第二类。第一类豆瓣曲中 2-羟基-4-甲基戊酸甲酯含量最高，占比达 59.45%~64.29%，主要呈甜香、果香。第二类豆瓣曲中十六酸甲酯、乙醇、1-辛烯-3-醇含量较高，相对含量占比分别达 22.97%~26.10%、12.33%~13.31%、5.15%~11.52%，主要呈油脂味、腊味、醇香、霉味。相比于第二类样品，第一类样品中呈现霉味的物质“1-辛烯-3-醇”和“庚醇”相对含量占比显著下降 ($P<0.05$)，且 PNM003 圆盘豆瓣曲中不含有 1-辛烯-3-醇。这说明圆盘制曲不仅能提升豆瓣曲的风味丰富度，还可以有效减弱不良风味，其中 PNM003 菌株表现最为突出。

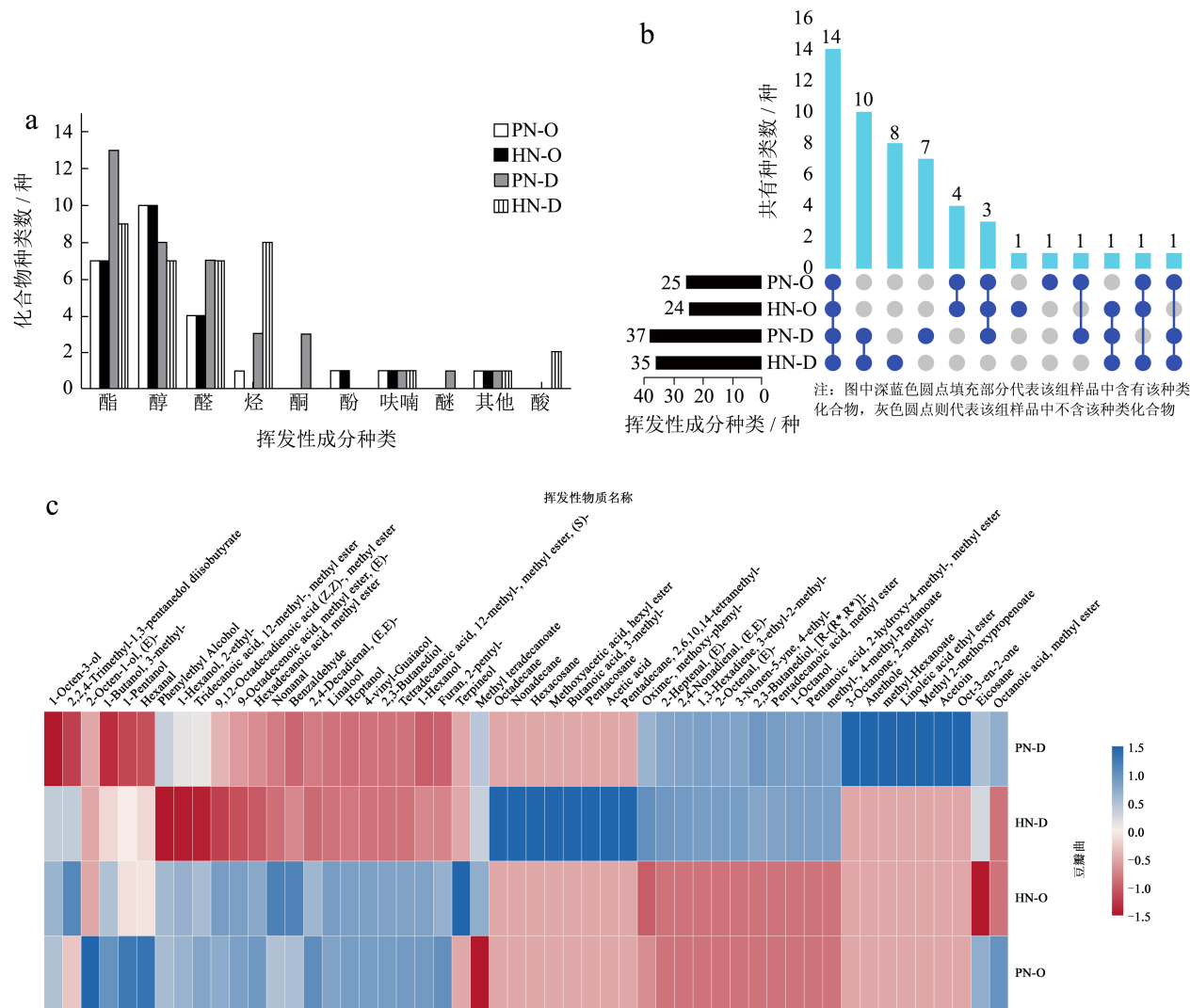


图 7 不同菌种在不同制曲方式下制备成曲挥发性成分概况

Fig.7 Volatile compound characteristics of broad bean koji produced by different strains and fermentation systems

3 结论

豆瓣酱制曲过程受发酵菌株和制曲方式的影响,其中制曲方式对豆瓣曲品质影响最为关键。圆盘制曲过程具有相对稳定的物料温度(30.8~34.4℃),能显著提升米曲霉酶活性能。在圆盘制曲条件下,PNM003曲表现出最高的霉菌总数(7.98 lg CFU/g)、更强的综合酶活(淀粉酶活 2 062.38 U·g⁻¹,中性蛋白酶活 769.99 U·g⁻¹,酸性蛋白酶活 273.81 U·g⁻¹)和更优的外观品质。此外,其游离氨基酸滋味特征谱也得到了有效改善。挥发性成分聚类分析表明,不同菌株在相同制曲方式下制备的豆瓣曲被聚为一类。相同制曲方式下,PNM003制备的豆瓣曲挥发性成分种类(37种、25种)比沪酿3.042(35种、24种)更为丰富。相同菌株时,圆盘豆瓣曲的风味丰富度高于开放制曲,且霉味风味物质数量及相对含量占比低于开放制曲。本研究结果表明,相较于传统开放制曲,圆盘制曲能显著提升豆瓣酱制曲效果,尤其是以PNM003米曲霉为发酵菌种优势更加明显。本研究为优化豆瓣曲生产工艺及开发高品质发酵食品提供了理论依据和技术支持。

参考文献

- [1] ZHAO S, NIU C, SUO J, et al. Unraveling the mystery of 'bask in daytime and dewed at night' technique in doubanjiang (broad bean paste) fermentation [J]. LWT, 2021, 149: 111723.
- [2] SHUKLA S, PARK J, KIM D-H, et al. Total phenolic content, antioxidant, tyrosinase and α -glucosidase inhibitory activities of water soluble extracts of noble starter culture Doenjang, a Korean fermented soybean sauce variety [J]. Food Control, 2016, 59: 854-861.
- [3] YANG Y, NIU C, SHAN W, et al. Physicochemical, flavor and microbial dynamic changes during low-salt doubanjiang (broad bean paste) fermentation [J]. Food Chemistry, 2021, 351: 128454.
- [4] NIU C, XING X, YANG X, et al. Isolation, identification and application of *Aspergillus oryzae* BL18 with high protease activity as starter culture in doubanjiang (broad bean paste) fermentation [J]. Food Bioscience, 2023, 51: 102225.
- [5] PENG C, ZHANG Y, YE X, et al. Physicochemical properties and aroma characteristics of broad bean koji produced by disk starter propagation technology [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2023, 123: 105643.
- [6] YANG M, HUANG J, ZHOU R, et al. Characterization of the flavor in traditional Pixian Doubanjiang by polyphasic quantitative detection technology [J]. Food Research International, 2020, 138: 109753.
- [7] DING W, ZHAO X, XIE S, et al. Dynamics and correlation of microbial community and flavor in Pixian Douban fermented with closed process of constant temperature [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(10): 4142-4153.
- [8] 刘杰,任博,王家法,等.圆盘制曲机的结构、自动化控制以及在白酒行业中的应用[J].酿酒科技,2020,7:46-49,57.
- [9] 许锡飏,陈伟峰.圆盘制曲机在黄酒制曲中的应用[J].中国酒,2022,4:64-67.
- [10] 闫景勇,刘建华,阮冲冲,等.酱油种曲四阶段培养法及其在圆盘制曲中的应用研究[J].现代食品,2023,29(15):68-72.
- [11] 何辉,吴卫良,钟任强,等.基于非线性模糊逻辑PID的圆盘制曲机控温控湿系统的研究[J].包装与食品机械,2023,41(3):82-88.
- [12] JIA Y, NIU C T, LU Z M, et al. A bottom-up approach to develop a synthetic microbial community model: application for efficient reduced-salt broad bean paste fermentation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(12): e00306-00320.
- [13] 贾云,蚕豆酱发酵过程微生物群落结构及其功能分析[D].无锡:江南大学,2021.
- [14] 周雯君,工厂化条件下豆酱品质监测与鲁氏酵母增香技术研究[D].大庆:黑龙江八一农垦大学,2016.
- [15] 李洁芝,邓维琴,张其圣,等.7株米曲霉与沪酿3.042发酵制备郫县豆瓣用甜瓣子的对比研究[J].中国调味品,2020,45(5):124-129.
- [16] 李雄波,范智义,王泽亮,等.不同品种蚕豆原料对郫县豆瓣品质的影响研究[J].食品工业科技,2024,45(9):72-82.
- [17] LI H, DENG W, LU Z M, et al. Salinity plays a dual role in broad bean paste-meju fermentation [J]. LWT, 2023, 173: 114181.
- [18] JIANG C, GE J, HE B, et al. Transcriptomic analysis reveals *Aspergillus oryzae* responds to temperature stress by regulating sugar metabolism and lipid metabolism [J]. Plos One, 2022, 17(9): e0274394.
- [19] 李晓阳,汪溢恒,钮成拓,等.温度对豆瓣酱发酵过程理化指标、风味物质和微生物群落的影响[J].食品与发酵工业,2024,50(2): 112-118.
- [20] 亢乐,张丽杰,徐岩.优质米曲霉筛选及复合菌剂构建提升郫县豆瓣蚕豆曲品质[J].食品与发酵工业,2022,48(22):18-25.
- [21] LIN Y, YANG J G, MA Y Y, et al. Optimization of conditions for glucoamylase, α -amylase and acidic protease production by *Aspergillus oryzae* koji [J]. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2014, 6(9): 360-364.
- [22] 刘敏芳,王昊乾,唐艺婧,等.后火曲制作过程中理化、生化指标和微生物菌群变化及其相关性分析[J].中国酿造,2023,42(5):70-77.
- [23] 谢思,赵晓燕,杨舒郁,等.郫县豆瓣自然与恒温后熟发酵工艺对比分析[J].食品科学,2020,41(10):138-144.
- [24] LI H, LU Z M, DENG W Q, et al. The differences between broad bean koji fermented in laboratory and factory conditions by an efficient *Aspergillus oryzae* [J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 113940.
- [25] HILL J A, SOUTHWOOD S, SETTE A, et al. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule1 [J]. The Journal of

- Immunology, 2003, 171(2): 538-541.
- [26] POOLMAN B, DRIESSEN A J, KONINGS W N. Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5597-5604.
- [27] VAN HOOFF D, PINKSE M W H, OOSTWAARD D W-V, et al. An experimental correction for arginine-to-proline conversion artifacts in SILAC-based quantitative proteomics [J]. *Nature Methods*, 2007, 4(9): 677-678.
- [28] 惠红杰,重组大肠杆菌全细胞催化L-精氨酸合成腐胺[D].无锡:江南大学,2021.
- [29] NIU C, XING X, WANG Y, et al. Characterization of color, metabolites and microbial community dynamics of doubanjiang during constant temperature fermentation [J]. *Food Research International*, 2023, 174: 113554.
- [30] WU Q, XU Z, FENG S, et al. Correlation analysis between microbial communities and flavor compounds during the post-ripening fermentation of traditional chili bean paste [J]. *Foods*, 2024, 13(8): 1209.
- [31] 范智义,张敏,邓维琴,等.不同产地辣椒挥发性成分的对比研究[J].*食品与发酵科技*,2022,58(3):113-118.