(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105524905 A
(43)申请公布日 2016.04.27

(21)申请号 201410514236.7

(22)申请日 2014.09.29

(83)生物保藏信息
CCTCC NO:M 2013601 2013.11.24

(71)申请人 湖南新鸿鹰生物工程有限公司
地址 415400 湖南省常德市津市市工业新区鸿鹰路10号

(72)发明人 李洪兵 李海清 张锦杰 朱永明 胡永明 向左东

(51)Int.Cl.
C12N 9/50(2006.01)
C12N 9/26(2006.01)
C12N 9/42(2006.01)
C12N 9/18(2006.01)
C12N 9/88(2006.01)
C12N 9/16(2006.01)
C12N 9/80(2006.01)
C12N 9/34(2006.01)
C12N 9/30(2006.01)
C12N 9/44(2006.01)
C12N 9/24(2006.01)
C12N 9/20(2006.01)
A23L 1/238(2006.01)

权利要求书2页 说明书15页

(54)发明名称

一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶，以含高活力酸性蛋白酶的蛋白酶和其他食品级酶制剂为主要原料，科学复配具有高活力酸性蛋白酶和抑制黄曲霉、大肠杆菌的生长繁殖、分解黄曲霉毒素的霉菌培养物，含有多种植物酶系的植物提取物，能有效抑制黄曲霉、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌，对黑曲霉、米曲霉抑制效果不明显且增香调味的香辛料提取物，具有选择性吸附黄曲霉毒素的脱霉素，可明显提高酱油复合酶存储稳定性的保护剂、激活剂和抗氧化剂等，制得的酱油复合酶酶系全、酶活力高、稳定性强、效力高，食品安全性高。可显著提高酱油产量24%，提高酿造酱油的全氮利用率16.5%和氨基酸生成率18.4%。

CN 105524905 A

1. 一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶，由以下重量份数的原料组成：蛋白酶 25-35 份，淀粉酶 10-20 份，植物提取物 10-15 份，霉菌培养物 5-15 份，半纤维素酶 10-12 份，果胶酶 6-10 份，植酸酶 6-9 份，酯酶 5-8 份，香辛料提取物 5-8 份，保护剂 4-6 份，激活剂 4-6 份，脱霉素 1-3 份，抗氧化剂 0.2-0.5 份；

所述蛋白酶是由以下质量百分比组成的酶制剂均匀混合而成：酸性蛋白酶 70％，中性蛋白酶 10％，碱性蛋白酶 10％，耐盐谷氨酰胺酶 10％；

所述淀粉酶是由以下质量百分比组成的酶制剂均匀混合而成：30％糖化酶，30％真菌 α－淀粉酶，20％普鲁兰酶，10％ β－淀粉酶，10％中温 α－淀粉酶；

所述半纤维素酶是由以下质量百分比组成的酶制剂均匀混合而成：30％耐温 β－葡聚糖复合酶，30％ β－葡聚糖复合酶，15％甘露聚糖酶，15％木聚糖酶，10％戊聚糖酶。

所述酯酶是由以下质量百分比组成的酶制剂均匀混合而成：60％酸性脂肪酶，15％中性脂肪酶，10 碱性脂肪酶，10％酸性磷酸酶，5％磷酸酯酶；

所述激活剂是由如下质量组份的无机盐均匀混合而成：氯化锌 20-30 份，氯化钙 10-20 份，硫酸钠 10-20 份，氯化镁 5-10 份；

所述保护剂由以下重量份数的原料组成：灵芝多糖 20-30 份，海藻糖 20-30 份，NaCl 10-20 份，$(NH_4)_2SO_4$ 10-15 份，半胱氨酸 10-15 份。

2. 如权利要求 1 所述的一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶，其特征在于，所述酸性蛋白酶的制备方法包括以下步骤：保存完好的宇佐美曲霉 CCTCC NO：M 2013601 的菌种经斜面菌种活化、一级、二级、三级液体种子扩大培养至种子罐，将种子罐液体种子以 5％接种量接入发酵罐培养基，培养温度 31-32℃，搅拌速度 200-400r/m，通风量 1:1-2，培养时间 10-12h；然后以 1-2℃ /h 降温速率缓慢降温至 26-30℃，搅拌速度 400-600r/m，通风量 1:1-3，恒温培养 8-10h；继续以 1-2℃ /h 降温速率缓慢降温至 23-25℃，搅拌速度 500-700r/m，通风量 1:2-4，培养时间 22-31h，然后，将种子罐液体种子以 3％接种量追加接入发酵罐，最后以 1-2℃ /h 升温速率缓慢升温至 31-32℃，搅拌速度 200-400r/m，通风量 1:1-2，恒温培养 10-12h；接着以 1-2℃ /h 降温速率缓慢降温至 23-25℃，搅拌速度 500-700r/m，通风量 1:2-4，恒温培养 22-31h；发酵液经过滤、浓缩、调配、精滤、干燥得固体酸性蛋白酶。

3. 如权利要求 1 所述的一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶，其特征在于，所述植物提取物的制备方法为：将大麦芽和小麦芽按质量比 4-6:1-3 均匀混合，粉碎至粒度 0.5-1mm，得粉碎麦芽；然后将木瓜、菠萝、无花果分别于超声波清洗机中在功率 200W、频率 30KHz 条件下超声清洗 5-10min，沥干，室温下破碎至粒度 0.5-1mm，并按质量比 5-7:2-4:1-3 均匀混合，加入混合物质量 2-4 倍的粉碎麦芽得原料混合物，加入原料混合物质量 1-3 倍的水，用柠檬酸调节 pH 值为 3-4，在功率 150-300W、频率 2000Hz 条件下进行微波提取，其中，每次微波辐照总时间 60-80s，进行间隔式辐照：辐照 10s，间隔 10s，控制温度 20-35℃，如此辐照 10 次，同时在功率 200-300W，频率 30-40KHz 条件下进行超声波辅助提取；保温 1-3h，然后，在功率 200-400W、频率 2000Hz 条件下进行微波提取，其中，每次微波辐照总时间 90-105s，进行间隔式辐照：辐照 15s，间隔 10s，控制温度 40-60℃，如此辐照 10 次，同时在功率 300-500W，频率 40-50KHz 条件下进行超声波辅助提取，最后自然降温至室温，于电场强度 25-35kV/cm，脉冲时间 400-600μs，脉冲频率 200-300Hz 条件下进行高压脉冲电场提

取 15-20min ;提取液过滤得第一滤液,加滤渣 2 倍的水漂洗、过滤得第二滤液,将第一滤液和第二滤液按质量比 1:1-2 均匀混合,混合液超滤浓缩、冷冻干燥、低温粉碎即得植物提取物。

4. 如权利要求 1 所述的一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶,其特征在于,所述霉菌培养物活菌含量为 $7x10^{10}$-$9x10^{10}$CFU/g。

5. 如权利要求 1 所述的一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶,其特征在于,所述香辛料提取物的制备方法为 :将香辛料清洗、沥干,加入其质量 0.1-1 倍的苹果醋润湿 2-6h,于 -18—-22℃冷冻 1-2h 后立即进行粉碎,冷冻料层厚度 3-5cm,粉碎粒度 0.5-3mm, 接着加入香辛料质量 1-3 倍的苹果醋,在功率 150-300W、频率 2000Hz 条件下进行微波提取,其中,每次微波辐照总时间 60-80s, 进行间隔式辐照 :辐照 10s,间隔 10s,控制温度 20-35℃,如此辐照 10 次,同时在功率 200-300W, 频率 30-40KHz 条件下进行超声波辅助提取 ;保温 1-3h, 然后,在功率 200-400W、频率 2000Hz 条件下进行微波提取,其中,每次微波辐照总时间 90-105s, 进行间隔式辐照 :辐照 15s,间隔 10s,控制温度 40-60℃,如此辐照 10 次,同时在功率 300-500W, 频率 40-50KHz 条件下进行超声波辅助提取,最后自然降温至室温,于电场强度 25-35kV/cm,脉冲时间 400-600μs, 脉冲频率 300-500Hz 条件下进行高压脉冲电场提取 15-20min ;充分搅拌提取液,密封,自然发酵 3-5d,过滤,滤液减压浓缩、冷冻干燥、低温粉碎至粒度为 0.1-0.3mm 即得香辛料提取物。

6. 如权利要求 5 所述的一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶,其特征在于,所述香辛料的重量份数组成为 :花椒 20-30 份,黑胡椒 20-30 份,草果 10-15 份,肉蔻 10-15 份,八角 8-12 份,小茴香 8-10 份,陈皮 5-8 份,肉桂 3-5 份,丁香 2-4,沙姜干 1-3 份。

7. 如权利要求 1 所述的一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶,其特征在于,所述抗氧化剂为葡萄籽原花青素、迷迭香提取物和杏叶提取物中的任一一种或几种组合。

8. 如权利要求 1 所述一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶的制备方法,其特征在于,包括如下步骤 :首先将所述保护剂、激活剂超微粉碎,随后立即依次加入蛋白酶、淀粉酶、半纤维素酶、果胶酶、植酸酶、酯酶、植物提取物均匀混合,最后依次加霉菌培养物、香辛料提取物、抗氧化剂及脱霉素,混合均匀后密封包装即得含酸性蛋白酶的酱油复合酶。

9. 如权利要求 8 所述的一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶的制备方法,其特征在于,所述抗氧化剂为葡萄籽原花青素、迷迭香提取物和杏叶提取物按质量比 2-4:2-4:1-3 均匀混合。

10. 如权利要求 1 所述的一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶在酱油酿造中的应用。

一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及酱油复合酶，具体涉及一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶。

背景技术

[0002] 我国酱油酿造从古代劳动人民的自然网落制曲到19世纪50年代末期开始的深层通风制曲，都离不开制曲工艺，曲子中的微生物是否优良，酶活是否高，酶系是否丰富，直接影响到酱油的产量和质量。众所周知，制曲工艺不仅占地面积大，而且劳动强度高，若采用直接加酶不制曲工艺，不仅省去了制曲工序，大大降低了劳动强度，而且由于曲子中酶系复配合理，还能提高酱油的产量和质量。

[0003] 酿造酱油是利用制曲过程中微生物的多种酶对原料中的蛋白质和淀粉进行水解，形成酱油的色、香、味、体等成分的过程。目前国内普遍采用的酱油菌种是沪酿3.042米曲霉，该菌分泌的蛋白酶多以中性和碱性蛋白酶为主，而酸性蛋白酶含量较低。发酵过程中随着酱醅pH值得下降，中性和碱性蛋白酶活力逐渐下降，而酸性蛋白酶活力又过低，最终导致原料全氮利用率不高，酱油鲜味不足等缺陷。因此，提高酱油曲中酸性蛋白酶的比例是解决酱油生产上原料利用率不高和产品质量较差的有效途径之一。

[0004] 中国专利CN 102488181 A公开了一种复合酶制剂及其在酱油发酵头渣中的应用。本发明的复合酶制剂，由以下重量百分比组成：淀粉酶3～8%，复合蛋白酶50～70%，纤维素酶15～35%，果胶酶10～20%，β-葡聚糖酶2～5%，所述复合蛋白酶由木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶组成。本发明还公开了上述复合酶制剂在酱油发酵头渣中提高蛋白质收得率的应用，将所述复合酶制剂溶于水，添加到天然晒制或保温发酵的酱油酿造提取第一道酱油后的酱渣（头渣）中，可以有效分解头渣中与蛋白质结合的淀粉、纤维质、果胶和β-葡聚糖，进而将头渣中的蛋白质分解成为氨基酸，提高酱油中的氨基态氮和固形物的含量。本发明的复合酶制剂可以有效补充酱渣中的酶系的不足，提高酱油生产中原料蛋白质的收得率，降低酱油生产成本。上述公开的专利中复合蛋白酶不含酸性蛋白酶，其中的木瓜蛋白酶和胰蛋白酶分别为植物酶和动物酶，成本高，酶制剂获取原料缺乏，工业化和规模化受到制约，并且复合酶酶系不全，活力低，主要适用于酱油发酵头渣的添加，应用范围受限。《中国调味品》公开了“酿造酱油专用酶制剂在酿造酱油生产中的应用”（蔡坤华、戎文文、蒋永杰、陈永林，2002年3月，第3期，文章编号：1000-9973(2002)03-0010-03）。其中专用酶制剂含有真菌α-淀粉酶、复合蛋白酶、纤维素酶、植酸酶、果胶酶等多种酶系，跟稀糖浆盐水和成曲混合，拌料入池进行保温发酵，促进了酱油生产原料中蛋白质和淀粉原料的的分解，提高了原料利用率，同时促进了风味物质的形成，改善了酱油风味，全氮利用率达到79.30%，比对照组提高了7.15%；氨基酸生成率大53.45%，比对照组提高8.20%。酿造酱油专用酶制剂应用在酱油酿造中取得了成功。上述公开的技术文献酶系仍然不全，比如，虽然采用了脱脂豆粕，但仍然存在残留脂肪，脂肪酶的添加可有酶解解残留脂肪细胞，加速其他酶制剂的渗透，提高酶解效率，进而提高蛋白质及淀粉原料利用率，缩短发酵时间等，同时，专用酶制剂作为一种商品，其存储稳定性及效力是需要考虑的很重要的问

题，并且，还应考虑防止黄曲霉菌（毒素）、细菌杂菌污染等食品安全性问题，以同时提高酿造酱油的产量和质量（理化指标和卫生指标）。

[0005] 因此，开发和研究适合与人民生活息息相关的调味品——酿造酱油的复合酶制剂仍是本领域技术人员的责任和追求。

发明内容

[0006] 本发明所解决的技术问题是克服现有酿造酱油复合酶的缺陷，以含高活力酸性蛋白酶的蛋白酶和其他食品级酶制剂为主要原料，科学复配具有高活力酸性蛋白酶和抑制黄曲霉、致病性大肠杆菌的生长繁殖、分解黄曲霉毒素的霉菌培养物，含有多种植物酶系的的植物提取物，能有效抑制黄曲霉、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌，对黑曲霉、米曲霉抑制效果不明显且增香调味的香辛料提取物，具有选择性吸附黄曲霉毒素的脱霉素，可明显提高酱油复合酶存储稳定性（酶活力和效力）的保护剂、激活剂和抗氧化剂等，制备一种酶系全、酶活力高、稳定性强、效力高，有效提高酿造酱油产量和质量及食品安全性的酱油复合酶。

[0007] 为了达到上述目的，本发明采用以下技术方案：

[0008] 一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶，由以下重量份数的原料组成：

[0009] 蛋白酶 25-35 份，淀粉酶 10-20 份，植物提取物 10-15 份，霉菌培养物 5-15 份，半纤维素酶 10-12 份，果胶酶 6-10 份，植酸酶 6-9 份，酯酶 5-8 份，香辛料提取物 5-8 份，保护剂 4-6 份，激活剂 4-6 份，脱霉素 1-3 份，抗氧化剂 0.2-0.5 份；

[0010] 所述植物提取物中含有丰富的植物蛋白酶、淀粉酶、半纤维素酶、酯酶、氧化还原酶等多种植物酶；

[0011] 所述植物提取物中还含有植物多糖和单糖、植物淀粉、植物蛋白等营养物质，不仅可为酱油复合酶提供全面、丰富的植物酶，还可作为制备酸性蛋白酶和霉菌培养物的发酵培养基成分，提高蛋白酶活力和微生物产酶能力；同时可为酱油曲提供全面、丰富的营养物质；

[0012] 所述植物提取物采用超声清洗、微波辅助超声提取和高压脉冲电场提取、超滤浓缩等低温提取技术，有效提高了原料利用率、植物酶活性和产率；有效保证了植物提取物的食品安全性；

[0013] 所述植物提取物的制备方法为：将大麦芽和小麦芽按质量比 4-6:1-3 均匀混合，粉碎至粒度 0.5-1mm，得粉碎麦芽；然后将木瓜、菠萝、无花果分别于超声波清洗机中在功率 200W、频率 30KHz 条件下超声清洗 5-10min，沥干，室温下破碎至粒度 0.5-1mm，并按质量比 5-7:2-4:1-3 均匀混合，加入混合物质量 2-4 倍的粉碎麦芽得原料混合物，加入原料混合物质量 1-3 倍的水，用柠檬酸调节 pH 值为 3-4，在功率 150-300W、频率 2000Hz 条件下进行微波提取，其中，每次微波辐照总时间 60-80s，进行间隔式辐照：辐照 10s，间隔 10s，控制温度 20-35℃，如此辐照 10 次，同时在功率 200-300W，频率 30-40KHz 条件下进行超声波辅助提取；保温 1-3h，然后，在功率 200-400W、频率 2000Hz 条件下进行微波提取，其中，每次微波辐照总时间 90-105s，进行间隔式辐照：辐照 15s，间隔 10s，控制温度 40-60℃，如此辐照 10 次，同时在功率 300-500W，频率 40-50KHz 条件下进行超声波辅助提取，最后自然降温至室温，于电场强度 25-35kV/cm，脉冲时间 400-600μs，脉冲频率 200-300Hz 条件下进行高压

脉冲电场 (PEF) 提取 15-20min ;提取液过滤得第一滤液,加滤渣 2 倍的水漂洗、过滤得第二滤液,将第一滤液和第二滤液按质量比 1:1-2 均匀混合,混合液超滤浓缩、冷冻干燥、低温粉碎即得植物提取物 ;

[0014] 优选地,所述超声波清洗机中清洗液为 0.3-0.5%的碳酸氢钠溶液。

[0015] 所述蛋白酶是由以下质量百分比组成的酶制剂均匀混合而成 :酸性蛋白酶 70%,中性蛋白酶 10%,碱性蛋白酶 10%,耐盐谷氨酰胺酶 10% ;

[0016] 所述酸性蛋白酶和霉菌培养物是以高产酸性蛋白酶的菌株宇佐美曲霉 (Aspergillususamil)CCTCC NO :M 2013601 为出发菌株,经特定发酵条件下的液体深层发酵而制得,并且发酵培养基中科学复配了上述制备的植物提取物 ;

[0017] 优选地,所述酸性蛋白酶的制备方法包括以下步骤 :保存完好的宇佐美曲霉 CCTCC NO :M 2013601 的菌种经斜面菌种活化、一级、二级、三级液体种子扩大培养至种子罐,将种子罐液体种子以 5%接种量接入发酵罐培养基,培养温度 31-32℃,搅拌速度 200-400r/m,通风量 1:1-2, 培养时间 10-12h ;然后以 1-2℃ /h 降温速率缓慢降温至 26-30℃,搅拌速度 400-600r/m,通风量 1:1-3, 恒温培养 8-10h ;继续以 1-2℃ /h 降温速率缓慢降温至 23-25℃,搅拌速度 500-700r/m,通风量 1:2-4, 培养时间 22-31h,然后,将种子罐液体种子以 3%接种量追加接入发酵罐,最后以 1-2℃ /h 升温速率缓慢升温至 31-32℃,搅拌速度 200-400r/m,通风量 1:1-2, 恒温培养 10-12h ;接着以 1-2℃ /h 降温速率缓慢降温至 23-25℃,搅拌速度 500-700r/m,通风量 1:2-4, 恒温培养 22-31h ;发酵液经过滤、浓缩、调配、精滤、干燥得固体酸性蛋白酶 ;

[0018] 所述斜面培养基组成为 :葡萄糖 20g,琼脂 20g,中草药提取物 5-10g, 干酪素 4g,磷酸氢二钾 2g,氯化镁 0.6g,氯化钾 0.8g,蒸馏水 1000mL,pH 值 5.8,121℃灭菌 20min。

[0019] 所述一级、二级、三级种子培养基组成为 :麸皮 60-80g, 玉米粉 50-60g,豆饼粉 35-40g,海藻糖 10-15g,鱼粉 6-10g,氯化铵 10-12g,氯化钙 5-10g,干酪素 5-10g,中草药提取物 5-10g,硫酸镁 2-4g,磷酸氢二钾 1-3g,纯净水 1000mL,pH 值 5-7,121℃灭菌 20min ;

[0020] 所述种子罐培养基组成为 :麸皮 60-80g, 玉米粉 50-60g,豆饼粉 35-40g,海藻糖 10-15g,中草药提取物 10-15g,鱼粉 6-10g,氯化铵 10-12g,氯化钙 5-10g,干酪素 5-10g,硫酸镁 2-4g,磷酸氢二钾 1-3g,纯净水 1000mL,pH 值 5-7,121℃灭菌 20min ;

[0021] 所述种子罐发酵液菌体浓度为 7.0×10^{8}-8.0×10^{8} 个 /ml ;

[0022] 所述发酵罐培养基组成为 :麸皮 60-80g, 玉米粉 50-60g,植物提取物 40-60g,豆饼粉 35-40g,中草药提取物 20-30g,海藻糖 10-30g,鱼粉 6-10g,氯化铵 10-12g,氯化钙 5-10g,干酪素 3-5g,硫酸镁 2-4g,磷酸氢二钾 1-3g,硝酸钾 1-2g, 硫酸锌 0.1-0.2g, 纯净水 1000mL,pH 值 5-7,121℃灭菌 20min ;

[0023] 所述中草药提取物的制备方法如下 :

[0024] 按重量份数计,称取黄芪 60-70 份,当归 50-60 份,党参 40-45 份,甘草 40-45 份,鱼腥草 35-45 份,神曲 35-45 份,柴胡 10-15 份,黄芩 10-15 份 ;将上述中草药粉碎至粒径为 2 毫米以下,然后于容器中均匀混合并添加 3-6 倍重量的水,控制温度 70℃ -90℃保持 2-4h,然后降温至 45-60℃,加入混合物料总重量 5-10%的混合酶制剂进行酶解,用乳酸调节 pH 值为 5.5-6.8,酶解 2-4h,最后添加混合物料 0.5-3 倍重量乙醇和丙醇的混合物,乙醇和丙醇混合的质量比为 1:1.5,控制温度至 60℃ -78℃保持 3-4h,过滤,得第一滤液 ;添加滤渣

1-3 倍重量的水，控制温度 85℃ -95℃保持 1-3h，然后降温至 25-35℃，过滤，得第二滤液；将第一滤液和第二滤液按照质量比 2-4:1-3 合并，滤液真空浓缩后冷冻干燥、粉碎即得中草药提取物；

[0025] 所述混合酶为葡聚糖酶、木聚糖酶、戊聚糖酶、果胶酶按质量比 5:3:1:0.5 均匀混合。

[0026] 所述霉菌培养物含有较强的微生物活性，在酱油发酵过程中不仅可持续提供高活力酸性蛋白酶，而且可有效抑制黄曲霉、致病性大肠杆菌的生长繁殖、分解黄曲霉毒素；

[0027] 优选地，所述霉菌培养物是上述酸性蛋白酶制备时的发酵液经减压浓缩、冷冻干燥、低温粉碎而得到的；

[0028] 所述霉菌培养物活菌含量为 $7x10^{10}$-$9x10^{10}$CFU/g。

[0029] 所述淀粉酶是由以下质量百分比组成的酶制剂均匀混合而成：30％糖化酶，30％真菌 α－淀粉酶，20％普鲁兰酶，10％ β－淀粉酶，10％中温 α－淀粉酶；

[0030] 所述半纤维素酶是由以下质量百分比组成的酶制剂均匀混合而成：30％耐温 β－葡聚糖复合酶，30％ β－葡聚糖复合酶，15％甘露聚糖酶，15％的木聚糖酶，10％的戊聚糖酶。

[0031] 所述酯酶是由以下质量百分比组成的酶制剂均匀混合而成：60％酸性脂肪酶，15％中性脂肪酶，10 碱性脂肪酶，10％酸性磷酸酶，5％磷酸酯酶。

[0032] 所述香辛料提取物可有效抑制黄曲霉、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌，对黑曲霉、米曲霉抑制效果不明显；

[0033] 所述香辛料可有效防止酱油发酵过程杂菌污染，保证发酵正常进行，还可代替食品防腐剂延长酱油的保质期，并且可为酿造酱油调味增香；

[0034] 进一步地，所述香辛料提取物的制备方法为：将香辛料清洗、沥干，加入其质量 0.1-1 倍的苹果醋润湿 2-6h，于 -18——-22℃冷冻 1-2h 后立即进行粉碎，冷冻料层厚度 3-5cm，粉碎粒度 0.5-3mm，接着加入香辛料质量 1-3 倍的苹果醋，在功率 150-300W、频率 2000Hz 条件下进行微波提取，其中，每次微波辐照总时间 60-80s，进行间隔式辐照：辐照 10s，间隔 10s，控制温度 20-35℃，如此辐照 10 次，同时在功率 200-300W，频率 30-40KHz 条件下进行超声波辅助提取；保温 1-3h，然后，在功率 200-400W、频率 2000Hz 条件下进行微波提取，其中，每次微波辐照总时间 90-105s，进行间隔式辐照：辐照 15s，间隔 10s，控制温度 40-60℃，如此辐照 10 次，同时在功率 300-500W，频率 40-50KHz 条件下进行超声波辅助提取，最后自然降温至室温，于电场强度 25-35kV/cm，脉冲时间 400-600μs，脉冲频率 300-500Hz 条件下进行高压脉冲电场（PEF）提取 15-20min；充分搅拌提取液，密封，自然发酵 3-5d，过滤，滤液减压浓缩、冷冻干燥、低温粉碎至粒度为 0.1-0.3mm 即得香辛料提取物；

[0035] 优选地，所述香辛料为花椒、黑胡椒、草果、肉蔻、八角、小茴香、陈皮、肉桂、丁香、沙姜干中的一种或多种完整香辛料；

[0036] 优选地，所述香辛料的重量份数组成为：花椒 20-30 份，黑胡椒 20-30 份，草果 10-15 份，肉蔻 10-15 份，八角 8-12 份，小茴香 8-10 份，陈皮 5-8 份，肉桂 3-5 份，丁香 2-4，沙姜干 1-3 份。

[0037] 所述激活剂是由如下质量组份的无机盐均匀混合而成：氯化锌 20-30 份，氯化钙 10-20 份，硫酸钠 10-20 份，氯化镁 5-10 份。

[0038] 所述保护剂由以下重量份数的原料组成：灵芝多糖 20-30 份，海藻糖 20-30 份，NaCl 10-20 份，$(NH_4)_2SO_4$10-15 份，半胱氨酸 10-15 份。

[0039] 所述脱霉素是由美国杜邦公司生产的一种不同于普通硅铝酸盐的硅铝酸盐衍生物，具有网格状多层或链状结构，二价或三价阳离子与氧或羟基形成八面体的共价结构；二氧化硅则与氧或羟基形成四面体的共价结构。具有强选择性吸附作用，能有效吸附原料（大豆、小麦、豆饼、豆粕等）中黄曲霉毒素、呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、T-2 毒素等多种毒素，而且不会吸附氨基酸、维生素、微量元素等营养成份，不影响微生物的正常生长和繁殖，可有效防止原料毒素对酱油发酵过程中糖化、发酵菌种的危害，促进其健康增殖和发酵，提高产酶、发酵能力。

[0040] 所述抗氧化剂为葡萄籽原花青素、迷迭香提取物和杏叶提取物中的任一一种或几种组合；

[0041] 优选地，所述抗氧化剂为葡萄籽原花青素、迷迭香提取物和杏叶提取物按质量比 2-4:2-4:1-3 均匀混合；

[0042] 所述葡萄籽原花青素、迷迭香提取物和杏叶提取物均为市购商品。

[0043] 上述含酸性蛋白酶的酱油复合酶的制备方法，包括如下步骤：

[0044] 首先将所述保护剂、激活剂超微粉碎，随后立即依次加入蛋白酶、淀粉酶、半纤维素酶、果胶酶、植酸酶、酯酶、植物提取物均匀混合，最后依次加霉菌培养物、香辛料提取物、抗氧化剂及脱霉素，混合均匀后密封包装即得含酸性蛋白酶的酱油复合酶。

[0045] 本发明另一个目的是含酸性蛋白酶的酱油复合酶在酱油酿造中的应用。

[0046] 使用方法：

[0047] 1. 复合酶作用条件：适应 pH 值 2-6，最适 pH 值 3.5-5.5；适应温度 30-55℃，最适反应温度 42-45℃。

[0048] 2. 使用方法：1) 在制作酱醅过程与酱油成曲、稀糖浆盐水混合后进行酱醅保温发酵，也可在润料过程添加进行原料预处理；2) 将复合酶与 45℃水按质量比 1:10 均匀混合，调整 pH 值为 3.5-5.5，活化 30-50min，使用效果最佳。

[0049] 3. 使用量：施曲发酵时为原粮干重的 0.02-0.2％；原料预处理时为原粮干重的 0.01-0.05％。

[0050] 本发明提供的宇佐美曲霉 801-2 是由实验室保藏的一株产酸性蛋白酶的宇佐美曲霉 801 依次经紫外线复合氯化锂诱变、亚硝基胍诱变、硫酸二乙酯诱变，并对突变株分离、筛选，最后对优良菌株经发酵性能测试筛选得到产高活力酸性蛋白酶的宇佐美曲霉 801-2。

[0051] 本发明提供的产高活力酸性蛋白酶的菌株具体为宇佐美曲霉 (Aspergillus usamil)801-2。该菌株已于 2013 年 11 月 24 日保藏于中国典型培养物保藏中心（简称 CCTCC，地址为：中国．武汉．武汉大学邮编：430072），保藏号为 CCTCC NO：M 2013601，分类命名为宇佐美曲霉 801-2Aspergillus usamil 801-2。

[0052] 本发明宇佐美曲霉 (Aspergillus usamil)801-2(CCTCC NO：M 2013601) 具有以下微生物学特征：

[0053] 1、形态学特征：

[0054] 宇佐美曲霉 (Aspergillus usamil)801-2，生物学形态为包括分生孢子、胞梗、顶

囊、产胞结构等几部分。分生孢子头球形至辐射形，直径 150-450μm，分生孢子梗发生于基质。胞梗茎 1000-3000（长度）×12-20（直径）μm，黄色或黄褐色，壁平滑；顶囊球形或近似球形，直径 35-50μm，表面全面可育；产胞结构双层，梗基 15-20（长度）×3-4.0（直径）μm，瓶梗 6-8（长度）×2-4（直径）μm，分生孢子球形或近球形，较小，直径 3.5-5.0μm，褐色，壁粗糙。

[0055] 2、培养学特征：

[0056] 宇佐美曲霉 (Aspergillus usamil)801-2 菌株在麦芽汁琼脂培养基上生长迅速，32℃ 4 天菌落直径 82mm；质地丝绒状或稍带絮状；分生孢子结构大量，褐黑色，有少量渗出液；菌落反面略带黄色。

[0057] 3、生理生化特征：

[0058] 宇佐美曲霉 (Aspergillus usamil)801-2 可在马铃薯、玉米粉、可溶性淀粉，糖蜜等上生长，最适 PH 值 5-6，最适生长温度 31-32℃，最适产酶温度 23-25℃。

[0059] 本发明菌株宇佐美曲霉 (Aspergillus usamil)801-2 的筛选技术路线为：出发菌株→斜面培养→孢子悬液的制备→诱变处理→平板分离→初筛→复筛→再复筛→扩大实验（发酵性能测定）。

[0060] 按诱变筛选方案，对突变株逐级筛选淘汰，最后对优良菌株经发酵性能测试筛选，得到一株高产酶性能菌株宇佐美曲霉 801-2，发酵 72-96 小时后酸性蛋白酶酶活可达 14000U/mL，对酶的热稳定性进行了分析，将粗酶液分别置于 40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃下，每隔 10 分钟取样测定酶活。40℃、45℃、50℃下，60 分钟酶活没有下降。55℃与 60℃下，30 分钟降到原有酶活的 95%，60 分钟降到 90%。65℃下，30 分钟降到原有酶活的 85%，60 分钟降到 80%。70℃下，30 分钟降到原有酶活的 80%，60 分钟降到原有酶活的 75%。酸性蛋白酶适应反应温度 30-55℃，最适反应温度 40-50℃，同样条件下达到同样酶活耐受温度比出发菌平均提高了 8-12℃，适应 pH 值范围 2-6，最适 pH 值 2.5-3.5。

[0061] 有益效果：

[0062] 本发明酱油复合酶以含高活力酸性蛋白酶的蛋白酶和其他食品级酶制剂为主要原料，科学复配具有高活力酸性蛋白酶和抑制黄曲霉、致病性大肠杆菌的生长繁殖、分解黄曲霉毒素的霉菌培养物，含有多种植物酶系的的植物提取物，能有效抑制黄曲霉、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌，对黑曲霉、米曲霉抑制效果不明显且增香调味的香辛料提取物，具有选择性吸附黄曲霉毒素的脱霉素，可明显提高酱油复合酶存储稳定性（酶活力和效力）的保护剂、激活剂和抗氧化剂等，制得的酱油复合酶酶系全、酶活力高、稳定性强、效力高，食品安全性高。本发明酱油复合酶可显著提高酱油产量，与对照组相比，提高 21-28%，平均提高酱油产量 24%。可显著提高酿造酱油的口感，与对照组相比香味更浓，口感更醇厚、味更鲜，色泽和体态差异不大；可显著提高酿造酱油的全氮利用率和氨基酸生成率，与对照组相比，分别提高 16.5%和 18.4%；全氮和氨基态氮含量分别提高 22.8%和 32.9%。

[0063] 具体表现在：

[0064] 1. 本发明的植物提取物中含有丰富的植物蛋白酶、淀粉酶、半纤维素酶、酯酶、氧化还原酶等多种植物酶；还含有植物多糖和单糖、植物淀粉、植物蛋白等营养物质，不仅可为酱油复合酶提供全面、丰富的植物酶，还可作为制备酸性蛋白酶和霉菌培养物的发酵培

养基成分，提高蛋白酶活力和微生物产酶能力；同时可为酱油曲提供全面、丰富的营养物质；所述植物提取物采用超声清洗、微波辅助超声提取和高压脉冲电场提取、超滤浓缩等低温提取技术，有效提高了原料利用率、植物酶活性和产率；有效保证了植物提取物的食品安全性。

[0065] 2. 本发明的酸性蛋白酶以高产酸性蛋白酶的菌株宇佐美曲霉 CCTCC NO：M 2013601 为出发菌株，根据其最适生长温度和最适产酶温度，细化了孢子增殖和发酵产酶阶段的工艺参数，采用梯度降温和梯度升温的发酵工艺，同时予以追加接种，尤其是梯度降温和梯度升温的发酵工艺显著提高了出发菌株的抗应激能力，致使菌种的产酶能力最大限度地显现。并且本发明对培养基组成实施全程优化，添加了具有抗热应激原作用的黄芩、柴胡，添加了具有调整和修复机体功能、增强机体的免疫功能、具有微生态调节功能的黄芪、党参等，进一步增强了微生物在同一发酵环境下的机体功能性、传代适应性和共同协作性，进而增强了微生物的代谢功能，使得本发明所产酸性蛋白酶活力高、耐受温度较高、稳定性强、适于工业化生产。

[0066] 3. 本发明酸性蛋白酶制备过程中发酵培养基植物提取物的添加，使得发酵液酸性蛋白酶酶活力大幅度提高，由 13000-14000U/mL 提高至 19000-22000U/mL，增幅 57.14％；发酵液粗酶液可耐受较高温度，40℃、45℃、50℃下，60 分钟酶活没有下降。55℃与 60℃下，30 分钟降到原有酶活的 95％，60 分钟降到 90％。65℃下，30 分钟降到原有酶活的 85％，60 分钟降到80％。70℃下，30 分钟降到原有酶活的80％，60分钟降到原有酶活的75％。酸性蛋白酶适应反应温度 30-55℃，最适反应温度 40-50℃，适应 pH 值范围 2-6，最适 pH 值 2.5-3.5。宽泛的 pH 作用范围和温度作用范围、高活力和强热稳定性更加适合酱油酿造，可充分酶解大豆等蛋白质原料，提高全氮利用率和氨基酸生成率，进而提高酱油的产量和质量，降低生产成本。

[0067] 4. 本发明的霉菌培养物含有较强的微生物活性，活菌含量为 $7x10^{10}$-$9x10^{10}$CFU/g。在酱油发酵过程中不仅可持续提供高活力酸性蛋白酶，而且可有效抑制黄曲霉、致病性大肠杆菌的生长繁殖、分解黄曲霉毒素。对黄曲霉菌的抑制率为 73-95％，对黄曲霉毒素 B1 的降解率为 58.78％。

[0068] 5. 本发明的香辛料提取物可有效抑制黄曲霉、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌，对黑曲霉、米曲霉抑制效果不明显；可有效防止酱油发酵过程杂菌污染，保证发酵正常进行，还可代替食品防腐剂延长酱油的保质期，并且可为酿造酱油调味增香。

[0069] 6. 本发明的脱霉素是由美国杜邦公司生产的一种不同于普通硅铝酸盐的硅铝酸盐衍生物，具有网格状多层或链状结构，二价或三价阳离子与氧或羟基形成八面体的共价结构；二氧化硅则与氧或羟基形成四面体的共价结构。具有强选择性吸附作用，能有效吸附原料（大豆、小麦、豆饼、豆粕等）中黄曲霉毒素、呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、T-2 毒素等多种毒素，而且不会吸附氨基酸、维生素、微量元素等营养成份，不影响微生物的正常生长和繁殖，可有效防止原料毒素对酱油发酵过程中糖化、发酵菌种的危害，促进其健康增殖和发酵，提高产酶、发酵能力。

[0070] 7. 本发明的抗氧化剂可有效防止复合酶酶分子结构氧化而造成酶活性损失，提高酶活力稳定性。在 0℃和 40℃条件下储存 12 个月，复合酶中单酶酶活损失分别为 0.37％和 0.50％，比对比例分别降低 22.9％和 66.7％，有效防止在包装、储存、运输、使用等环节

因环境改变、操作方法不当而造成酶的失活，尤其可防止高温造成的酶失活。

[0071] 8. 本发明的保护剂有效减缓了复合酶制剂的回潮；同时可增强复合酶的耐冻、耐热性能，保持相同的酶活力，其耐热温度可提高 20-30℃，耐冷冻温度可降低 10-15 摄氏度，有效防止了复合酶在运输、保存和使用过程中酶活力的损失，延长了复合酶的保质期，达到同样的酶活力，比同类产品保质期可延长 2-3 年。

[0072] 9. 本发明的激活剂创造了酶催化作用的最佳条件，充分发挥了酶的活力，彻底有效的分解了酿造原料中蛋白质、淀粉、半纤维素、脂肪等大分子物质，不仅提高了原料利用率，而且增加酱油曲和霉菌孢子的营养物质，同时提供了酱油必须的香味物质及其前体物。

具体实施方式

[0073] 下面通过具体的实施方案叙述本发明。除非特别说明，本发明中所用的技术手段均为本领域技术人员所公知的方法。另外，实施方案应理解为说明性的，而非限制本发明的范围，本发明的实质和范围仅由权利要求书所限定。对于本领域技术人员而言，在不背离本发明实质和范围的前提下，对这些实施方案中的物料成分和用量进行的各种改变或改动也属于本发明的保护范围。

[0074] 实施例 1 原料制备

[0075] 1. 植物提取物的制备：

[0076] 将大麦芽、小麦芽按质量比 5:2 均匀混合，粉碎至粒度 0.8mm，得粉碎麦芽；然后将木瓜、菠萝、无花果分别于盛有 0.4％的碳酸氢钠溶液的超声波清洗机中在功率 200W、频率 30KHz 条件下超声清洗 8min，沥干，室温下破碎至粒度 0.8mm，并按质量比 6:3:2 均匀混合，加入混合物质量 3 倍的粉碎麦芽得原料混合物，加入原料混合物质量 2 倍的水，用柠檬酸调节 pH 值为 3.5，在功率 200W、频率 2000Hz 条件下进行微波提取，其中，每次微波辐照总时间 70s，进行间隔式辐照：辐照 10s，间隔 10s，控制温度 30℃，如此辐照 10 次，同时在功率 250W，频率 35KHz 条件下进行超声波辅助提取；保温 2h，然后，在功率 300W、频率 2000Hz 条件下进行微波提取，其中，每次微波辐照总时间 105s，进行间隔式辐照：辐照 15s，间隔 10s，控制温度 50℃，如此辐照 10 次，同时在功率 400W，频率 45KHz 条件下进行超声波辅助提取，最后自然降温至室温，于电场强度 30kV/cm，脉冲时间 500μs，脉冲频率 250Hz 条件下进行高压脉冲电场提取 18min；提取液过滤得第一滤液，加滤渣 2 倍的水漂洗、过滤得第二滤液，将第一滤液和第二滤液按质量比 1:1.5 均匀混合，混合液超滤浓缩、冷冻干燥、低温粉碎即得植物提取物；

[0077] 2. 酸性蛋白酶的制备：

[0078] 所述酸性蛋白酶的制备方法包括如下步骤：

[0079] (1) 菌种活化

[0080] 将保存完好的宇佐美曲霉 CCTCC NO：M 2013601 的斜面菌种接种于斜面培养基，32℃培养 40h 进行菌种活化，如此活化 3 次；

[0081] (2) 液体种子扩大培养

[0082] ①一级种子培养：将步骤 (1) 活化后斜面菌种以无菌水洗下孢子，接入 500 毫升摇瓶中，液体种子培养基装量 100 毫升，32℃、100rpm 摇床培养 40h；

[0083] ②二级种子培养：将一级种子按照 10％的接种量接入 500 毫升二级种子摇瓶中，

培养条件与一级种子相同；

[0084] ③三级种子培养：将二级种子以8%接种量接入5000毫升三级种子摇瓶中，液体培养基装量1000毫升，32℃、100rpm摇床培养40h；

[0085] ④种子罐培养：将三级种子以8%接种量接入总容积为150L的一级种子罐，种子罐培养基装量100L，控制pH值为6，培养温度31℃，搅拌速度300rpm，通风量(V/V)1:1，培养时间40h；

[0086] 所述种子罐发酵液菌体浓度为8.0x 10^8 个/ml；

[0087] (3)发酵罐发酵

[0088] 将步骤(2)中种子罐液体种子以5%接种量接入发酵罐培养基，培养温度32℃，搅拌速度300r/m，通风量(V/V)1:1.5，培养时间11h；然后以2℃/h降温速率缓慢降温至28℃，搅拌速度500r/m，通风量(V/V)1:2，恒温培养9h；继续以2℃/h降温速率缓慢降温至24℃，搅拌速度600r/m，通风量(V/V)1:3，培养时间27h，然后，将步骤(2)中种子罐液体种子以3%接种量追加接入发酵罐，最后以2℃/h升温速率缓慢升温至32℃，搅拌速度300r/m，通风量(V/V)1:1.5，恒温培养11h；接着以2℃/h降温速率缓慢降温至24℃，搅拌速度600r/m，通风量(V/V)1:3，恒温培养27h；

[0089] (4)发酵液经过滤、浓缩、调配、精滤、干燥得固体酸性蛋白酶。

[0090] 经上述方法制备的酸性蛋白酶在室温下保存12个月后酶活损失为1.8%，发酵液酸性蛋白酶酶活力可达22000U/mL。

[0091] 所述斜面培养基组成为：葡萄糖20g，琼脂20g，中草药提取物7g，干酪素4g，磷酸氢二钾2g，氯化镁0.6g，氯化钾0.8g，蒸馏水1000mL，pH值5.8，121℃灭菌20min。

[0092] 所述一级、二级、三级种子培养基组成为：麸皮70g，玉米粉55g，豆饼粉38g，海藻糖12g，鱼粉8g，氯化铵11g，氯化钙8g，干酪素8g，中草药提取物8g，硫酸镁3g，磷酸氢二钾2g，纯净水1000mL，pH值6，121℃灭菌20min；

[0093] 所述种子罐培养基组成为：麸皮70g，玉米粉55g，豆饼粉38g，海藻糖12g，中草药提取物12g，鱼粉8g，氯化铵11g，氯化钙8g，干酪素8g，硫酸镁3g，磷酸氢二钾2g，纯净水1000mL，pH值6，121℃灭菌20min；

[0094] 所述发酵罐培养基组成为：麸皮70g，玉米粉55g，植物提取物50g，豆饼粉38g，中草药提取物25g，海藻糖20g，鱼粉8g，氯化铵11g，氯化钙8g，干酪素4g，硫酸镁3g，磷酸氢二钾2g，硝酸钾2g，硫酸锌0.2g，纯净水1000mL，pH值6，121℃灭菌20min；

[0095] 所述中草药提取物的制备方法如下：按重量份数计，称取黄芪65份，当归55份，党参42份，甘草42份，鱼腥草40份，神曲40份，柴胡12份，黄芩12份；将上述中草药粉碎至粒径为2毫米以下，然后于容器中均匀混合并添加5倍重量的水，控制温度80℃保持3h，然后降温至52℃，加入混合物料总重量8%的混合酶制剂进行酶解，用乳酸调节pH值为6.2，酶解3h，最后添加混合物料2倍重量乙醇和丙醇的混合物，乙醇和丙醇混合的质量比为1:1.5，控制温度至70℃保持4h，过滤，得第一滤液；添加滤渣2倍重量的水，控制温度90℃保持2h，然后降温至30℃，过滤，得第二滤液；将第一滤液和第二滤液按照质量比3:2合并，滤液真空浓缩后冷冻干燥、粉碎即得中草药提取物；

[0096] 所述混合酶为葡聚糖酶、木聚糖酶、戊聚糖酶、果胶酶按质量比5:3:1:0.5均匀混合。

[0097] 酶活力单位定义：1mL 粗酶液，于 40℃、pH 3.0 条件下，1min 水解酪蛋白产生 1μg 酪氨酸的酶量为 1 个酶活力单位，以 U/mL 表示。

[0098] 3. 霉菌培养物的制备：酸性蛋白酶制备时的发酵液经减压浓缩、冷冻干燥、低温粉碎即得霉菌培养物；所述霉菌培养物中活菌含量为 $9x10^{10}$CFU/g。

[0099] 4. 香辛料提取物的制备：

[0100] 所述香辛料提取物的制备方法为：将香辛料清洗、沥干，加入其质量 0.5 倍的苹果醋润湿 4h，于 -18℃冷冻 1.5h 后立即进行粉碎，冷冻料层厚度 4cm，粉碎粒度 2mm，接着加入香辛料质量 2 倍的苹果醋，在功率 200W、频率 2000Hz 条件下进行微波提取，其中，每次微波辐照总时间 70s，进行间隔式辐照：辐照 10s，间隔 10s，控制温度 30℃，如此辐照 10 次，同时在功率 300W，频率 40KHz 条件下进行超声波辅助提取；保温 2h，然后，在功率 400W、频率 2000Hz 条件下进行微波提取，其中，每次微波辐照总时间 90s，进行间隔式辐照：辐照 15s，间隔 10s，控制温度 50℃，如此辐照 10 次，同时在功率 500W，频率 50KHz 条件下进行超声波辅助提取，最后自然降温至室温，于电场强度 30kV/cm，脉冲时间 500μs，脉冲频率 400Hz 条件下进行高压脉冲电场（PEF）提取 20min；充分搅拌提取液，密封，自然发酵 4d，过滤，滤液减压浓缩、冷冻干燥、低温粉碎至粒度为 0.2mm 即得香辛料提取物；

[0101] 所述香辛料的重量份数组成为：花椒 25 份，黑胡椒 25 份，草果 12 份，肉蔻 12 份，八角 10 份，小茴香 9 份，陈皮 7 份，肉桂 4 份，丁香 3，沙姜干 2 份。

[0102] 实施例 2

[0103] 一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶，由以下重量份数的原料组成：蛋白酶 30 份，淀粉酶 15 份，植物提取物 12 份，霉菌培养物 10 份，半纤维素酶 11 份，果胶酶 8 份，植酸酶 8 份，酯酶 7 份，香辛料提取物 6 份，保护剂 5 份，激活剂 5 份，脱霉素 2 份，抗氧化剂 0.4 份；

[0104] 所述蛋白酶是由以下质量百分比组成的酶制剂均匀混合而成：酸性蛋白酶 70%，中性蛋白酶 10%，碱性蛋白酶 10%，耐盐谷氨酰胺酶 10%；

[0105] 所述淀粉酶是由以下质量百分比组成的酶制剂均匀混合而成：30%糖化酶，30%真菌 α-淀粉酶，20%普鲁兰酶，10% β-淀粉酶，10%中温 α-淀粉酶；

[0106] 所述半纤维素酶是由以下质量百分比组成的酶制剂均匀混合而成：30%耐温 β-葡聚糖复合酶，30% β-葡聚糖复合酶，15%甘露聚糖酶，15%的木聚糖酶，10%的戊聚糖酶；

[0107] 所述酯酶是由以下质量百分比组成的酶制剂均匀混合而成：60%酸性脂肪酶，15%中性脂肪酶，10 碱性脂肪酶，10%酸性磷酸酶，5%磷酸酯酶；

[0108] 所述激活剂是由如下质量组份的无机盐均匀混合而成：氯化锌 25 份，氯化钙 15 份，硫酸钠 15 份，氯化镁 8 份；

[0109] 所述保护剂由以下重量份数的原料组成：灵芝多糖 25 份，海藻糖 25 份，NaCl 15 份，$(NH_4)_2SO_4$12 份，半胱氨酸 12 份；

[0110] 所述抗氧化剂为葡萄籽原花青素、迷迭香提取物和杏叶提取物按质量比 3:3:2 均匀混合；

[0111] 所述酸性蛋白酶、植物提取物、霉菌培养物、香辛料提取物均为实施例 1 制备；

[0112] 上述含酸性蛋白酶的酱油复合酶的制备方法，包括如下步骤：首先将所述保护剂、激活剂超微粉碎，随后立即依次加入蛋白酶、淀粉酶、半纤维素酶、果胶酶、植酸酶、酯酶、植

物提取物均匀混合，最后依次加霉菌培养物、香辛料提取物、抗氧化剂及脱霉素，混合均匀后密封包装即得含酸性蛋白酶的酱油复合酶。

[0113] 实施例 3

[0114] 一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶，由以下重量份数的原料组成：蛋白酶 25 份，淀粉酶 10 份，植物提取物 10 份，霉菌培养物 5 份，半纤维素酶 10 份，果胶酶 6 份，植酸酶 6 份，酯酶 5 份，香辛料提取物 5 份，保护剂 4 份，激活剂 4 份，脱霉素 1 份，抗氧化剂 0.2 份；

[0115] 所述激活剂是由如下质量组份的无机盐均匀混合而成：氯化锌 20 份，氯化钙 10 份，硫酸钠 10 份，氯化镁 5 份；

[0116] 所述保护剂由以下重量份数的原料组成：灵芝多糖 20 份，海藻糖 20 份，NaCl 10 份，$(NH_4)_2SO_4$10 份，半胱氨酸 10 份；

[0117] 所述抗氧化剂为葡萄籽原花青素、迷迭香提取物和杏叶提取物按质量比 2:2:1 均匀混合；

[0118] 所述蛋白酶、淀粉酶、半纤维素酶、酯酶同实施例 2；

[0119] 所述酸性蛋白酶、植物提取物、霉菌培养物、香辛料提取物均为实施例 1 制备；

[0120] 上述含酸性蛋白酶的酱油复合酶的制备方法同实施例 2。

[0121] 实施例 4

[0122] 一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶，由以下重量份数的原料组成：蛋白酶 35 份，淀粉酶 20 份，植物提取物 15 份，霉菌培养物 15 份，半纤维素酶 12 份，果胶酶 10 份，植酸酶 9 份，酯酶 8 份，香辛料提取物 8 份，保护剂 6 份，激活剂 6 份，脱霉素 3 份，抗氧化剂 0.5 份；

[0123] 所述激活剂是由如下质量组份的无机盐均匀混合而成：氯化锌 30 份，氯化钙 20 份，硫酸钠 20 份，氯化镁 10 份；

[0124] 所述保护剂由以下重量份数的原料组成：灵芝多糖 30 份，海藻糖 30 份，NaCl 20 份，$(NH_4)_2SO_4$15 份，半胱氨酸 15 份；

[0125] 所述抗氧化剂为葡萄籽原花青素、迷迭香提取物和杏叶提取物按质量比 4:4:3 均匀混合；

[0126] 所述蛋白酶、淀粉酶、半纤维素酶、酯酶同实施例 2；

[0127] 所述酸性蛋白酶、植物提取物、霉菌培养物、香辛料提取物均为实施例 1 制备；

[0128] 上述含酸性蛋白酶的酱油复合酶的制备方法同实施例 2。

[0129] 实施例 5

[0130] 一种含酸性蛋白酶的酱油复合酶，由以下重量份数的原料组成：蛋白酶 25 份，淀粉酶 20 份，植物提取物 15 份，霉菌培养物 5 份，半纤维素酶 10 份，果胶酶 10 份，植酸酶 9 份，酯酶 5 份，香辛料提取物 8 份，保护剂 4 份，激活剂 4 份，脱霉素 3 份，葡萄籽原花青素 0.2 份；

[0131] 所述激活剂是由如下质量组份的无机盐均匀混合而成：氯化锌 30 份，氯化钙 10 份，硫酸钠 10 份，氯化镁 10 份；

[0132] 所述保护剂由以下重量份数的原料组成：灵芝多糖 30 份，海藻糖 30 份，NaCl 10 份，$(NH_4)_2SO_4$10 份，半胱氨酸 15 份；

[0133] 所述蛋白酶、淀粉酶、半纤维素酶、酯酶同实施例 2；

[0134] 所述酸性蛋白酶、植物提取物、霉菌培养物、香辛料提取物均为实施例 1 制备；

[0135] 上述含酸性蛋白酶的酱油复合酶的制备方法同实施例 2。

[0136] 实施例 6 酸性蛋白酶的热稳定性分析

[0137] 将实施例 1 酸性蛋白酶发酵粗酶液分别置于 40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃下，每隔 10 分钟取样测定酶活。40℃、45℃、50℃下，60 分钟酶活没有下降。55℃与 60℃下，30 分钟降到原有酶活的 95%，60 分钟降到 90%。65℃下，30 分钟降到原有酶活的 85%，60 分钟降到 80%。70℃下，30 分钟降到原有酶活的 80%，60 分钟降到原有酶活的 75%。说明酸性蛋白酶热稳定性较强。

[0138] 实施例 7 酸性蛋白酶的 pH 稳定性分析

[0139] 将实施例 1 酸性蛋白酶发酵粗酶液分别置于 pH 值 2.0、2.5、3.5、4.5、5.5、6.0 下，每隔 10 分钟取样测定酶活。粗酶液 pH 值 2.0、2.5、3.5 下，60 分钟酶活没有下降。pH 值 4.5 下，30 分钟降到原有酶活的 95%，60 分钟降到 90%。pH 值 5.5 下，30 分钟降到原有酶活的 90%，60 分钟降到 85%。pH 值 6.0 下，30 分钟降到原有酶活的 85%，60 分钟降到 80%，说明酸性蛋白酶耐 pH 范围较宽泛。

[0140] 实施例 8 植物提取物对酸性蛋白酶酶活力的影响

[0141] 采用本发明实施例 1 中酸性蛋白酶的制备方法，其它工艺条件、工艺参数、培养基等发酵条件完全相同，唯一区别是发酵培养基不加植物提取物，形成对比例，发酵完毕，采用同一检测方法测定发酵液酸性蛋白酶活力，检测结果如表 1：

[0142] 表 1 发酵液酸性蛋白酶活力

[0143]

项目	实施例 1	对比例	差异	增幅
发酵液酸性蛋白酶活力	22000U/mL	14000U/mL	8000U/mL	57.14%

[0144] 以上结果表明：本发明制备的植物提取物含有较高的酸性蛋白酶活力，发酵培养基中添加植物提取物，发酵液酸性蛋白酶活力可从 14000U/mL 提高至 22000U/mL，酸性蛋白酶酶活力提高 57.14%，同时也表明：本发明酱油复合酶中科学复配植物提取物，可提供丰富、全面的植物酶系。

[0145] 实施例 9 抗氧化剂对酱油复合酶酶活力的影响

[0146] 采用本发明实施例 2 制备的含酸性蛋白酶的酱油复合酶，其它原料、原料组份、制备方法完全相同，唯一区别是原料组分不含抗氧化剂，形成对比例，分别于 0℃和 40℃条件下储存 12 个月，采用《GB/T 23535-2009 脂肪酶制剂》中检测方法测定酸性脂肪酶的酶活力，计算酶活损失率，酶活损失率是指实际检测的酶活力与产品标注酶活力的差值占标注酶活力的百分率，结果如表 2

[0147] 表 2 储存期复合酶中酸性脂肪酶酶活力损失率

[0148]

项目	40℃		0℃	
对比例	6 个月	12 个月	6 个月	12 个月
	0.9%	1.5%	0.30%	0.48%
实施例 2	6 个月	12 个月	6 个月	12 个月
	0.35%	0.50%	0.23%	0.37%

[0149]

差异	-61.1%	-66.7%	-23.3%	-22.9%

[0150] 以上结果表明，在 0℃和 40℃条件下储存 12 个月，实施例 2 中的酸性脂肪酶比对比例中的酸性脂肪酶酶活损失分别降低 18％和 65.6％，说明抗氧化剂的科学复配，显著提高了复合酶中各组分酶的活力，酶活损失大幅降低，尤其在高温条件下效果更加显著。

[0151] 实施例 10 本发明霉菌培养物对黄曲霉菌孢子数的影响及产毒的抑制率、毒素分解率

[0152] 将本发明实施例 1 制备的霉菌培养物与黄曲霉菌均以 5％接种量在 PDA 液体培养基上 31℃共同培养 7 天，形成试验组，对照组不接种霉菌培养物，其他培养条件完全相同，自第 3 天开始，每天测定发酵液黄曲霉菌孢子数和培养物孢子数及对黄曲霉菌产毒的抑制率，检测结果如表 3，发酵终了，采用酶联免疫法分别测定对照组和试验组发酵液中黄曲霉毒素 B1(AFB1) 含量，结果如表 4

[0153] 表 3

[0154]

发酵时间	性状	孢子含量 logCFU/mL)	抑制率
第 3 天	黄曲霉菌孢子数	5.2	73%
	培养物孢子数	4.6	
第 4 天	黄曲霉菌孢子数	5.6	75%
	培养物孢子数	4.5	
第 5 天	黄曲霉菌孢子数	6.2	92%
	培养物孢子数	4.4	
第 6 天	黄曲霉菌孢子数	5.8	90%
	培养物孢子数	4.1	
第 7 天	黄曲霉菌孢子数	5.4	95%
	培养物孢子数	4.0	

[0155] 表 4

[0156]

项目	AFB1 含量（ng/kg）	AFB1 降解率
对照组	4855.68±52.8	58.78%
试验组	2001.42±26.6	

[0157] 以上结果表明：本发明霉菌培养物可显著抑制黄曲霉霉菌的生长繁殖，抑制率为73-95%，有效降解黄曲霉毒素，对黄曲霉毒素 B1 的降解率为 58.78%。

[0158] 实施例 11 酱油复合酶对酿造酱油产量和质量的影响

[0159] 一、试验地点：湖南某一酱油厂酿造车间。

[0160] 二、试验时间：2013 年 10 月 8 日 -2014 年 4 月 8 日，历时 180 天。

[0161] 三、试验方案设计：1. 试验为单因子设计，设置试验组和对照组，对照组和试验组的原料、工艺、设备、操作人员、环境及管理方式均相同，区别是：试验组在酱醅制作过程添加本发明实施例 2-5 制备的酱油复合酶，对照组不添加。2. 按原料干重 0.02-0.2%准确称取本发明实施例 2-5 制备的酱油复合酶，将其与 45℃水按质量比 1:10 均匀混合，调整 pH 值为 4，活化 40min，与稀糖浆盐水混合后，加入酱油成曲制作成酱醅，保温发酵。3. 对酱油产量和成品部分理化指标及卫生指标进行检测。4. 试验组和对照组中每种复合酶（实施例 2-5）各投料 10 批次，计算平均值。

[0162] 四、检测结果

[0163] 1. 酱油复合酶对酱油产量的影响：投料量（豆粕、麸皮、面粉）1000kg，43℃发酵 14 天，复合酶添加量 0.03%。

[0164] 表 5 复合酶对酱油产量的影响 单位：kg

[0165]

复合酶	试验组	对照组	差异
实施例 2	3411	2665	28%
实施例 3	3213	2634	22%
实施例 4	3355	2684	25%
实施例 5	3127	2548	21%
平均	3277	2633	24%

[0166] 注：1. 试验组和对照组均折合为二级酱油标准计算；2. 套用油的在计算中减去套拥油的量。

[0167] 以上结果表明，本发明酱油复合酶可显著提高酱油产量，与对照组相比，提高 21-28%，平均提高酱油产量 24%。

[0168] 2. 酱油复合酶对酱油质量的影响对上述试验组和对照组的成品酱油的主要质量指标：全氮、氨基态氮进行检测，计算全氮利用率和氨基酸生成率，同时聘请 10 位经验丰富的职业酿造师对成品酱油的综合口感进行 100 分值评分，其中香气、色泽、滋味、体态各占 25 分，试验组和对照组均取平均值，结果如表 6

[0169] 表 6 复合酶对酱油质量的影响

[0170]

检测指标	设计组	实例 2	实例 3	实例 4	实例 5	平均	差异
全氮（以 N 计）（g/100mL）	试验组	1.99	1.87	1.93	1.96	1.94	22.8%
	对照组	1.66	1.52	1.54	1.60	1.58	
氨基态氮（以 N 计）（g/100mL）	试验组	1.12	1.01	1.02	1.00	1.05	32.9%
	对照组	0.82	0.76	0.80	0.77	0.79	
全氮利用率（%）	试验组	88.8	86.5	85.9	86.4	86.9	16.5%
	对照组	75.9	74.8	72.6	75.1	74.6	
氨基酸生成率（%）	试验组	60.6	60.0	59.8	56.9	59.3	18.4%
	对照组	50.2	50.3	49.8	50.0	50.1	
感官评定（分）	试验组	93	92	89	90	91.0	10.6%
	对照组	82	80	83	84	82.3	

[0172] 以上结果表明：本发明酱油复合酶可显著提高酿造酱油的口感，与对照组相比香味更浓，口感更醇厚、味更鲜，色泽和体态差异不大；可显著提高酿造酱油的全氮利用率和氨基酸生成率，与对照组相比，分别提高 16.5％和 18.4％；全氮和氨基态氮含量分别提高 22.8％和 32.9％。大大提高了原料利用率，降低了酿造酱油的生产成本。