

豆豉与淡豆豉的成分测试及微生物菌群分析

董超^{1*}, 孙劲冲¹, 李若楠¹, 薛正¹, 王鑫国²

(1. 河北省科学院生物研究所, 石家庄 050081; 2. 河北中医学院药学院, 石家庄 050091)

摘要: **目的** 测试食品豆豉和中药淡豆豉样本中的药典成分, 分离培养其留存的微生物菌株, 分析微生物类别、发酵过程与功能成分的关系。**方法** 平板筛选培养、菌苔外观和显微镜鉴别微生物菌株, 液相色谱法测定大豆异黄酮及苷元成分的含量, 纤维平板法测试纤溶酶活性。**结果** 中药淡豆豉和食品豆豉的微生物以枯草芽孢杆菌最多, 其次是霉菌和酵母; 样本大豆异黄酮和苷元成分差异较大, 有些中药材淡豆豉低于药典标准; 个别食品豆豉样本具有纤溶酶活性, 中药材淡豆豉少有纤溶酶活性。**结论** 留存于淡豆豉或豆豉中的微生物丰度顺序如下: 枯草芽孢杆菌、霉菌和酵母; 大豆异黄酮和苷元成分的含量与发酵过程有关, 样本的差异较大; 溶栓不是中药材淡豆豉的主要功效。

关键词: 淡豆豉; 豆豉; 大豆异黄酮; 微生物菌群

Ingredient test and microbial flora analysis of the *Fermented Soya Bean* and *Sojae Semen Praeparatum*

DONG Chao^{1*}, SUN Jin-Chong¹, LI Ruo-Nan¹, XUE Zheng¹, WANG Xin-Guo²

(1. Institute of Hebei Biology, Shijiazhuang 050081, China; 2. Pharmacy College of Hebei Chinese Medicine University, Shijiazhuang 050091, China)

ABSTRACT: Objective To test the pharmacopoeia components in the samples of food *Fermented Soya Bean* and Chinese medicine *Sojae Semen Praeparatum*, isolate and culture the remaining microbial strains, and analyze the relationship between microbial types, fermentation process and functional components. **Methods** The microbial strains were identified by plate screening culture, fungus appearance and microscope. The content of soybean isoflavones and aglycones were determined by liquid chromatography, and the fibrinolytic enzyme activity was tested by fiber plate method. **Results** *Bacillus subtilis* was the most microorganism in traditional Chinese medicine *Sojae Semen Praeparatum* and food *Fermented Soya Bean*, followed by mold and yeast. The components of isoflavones and aglycones in the samples were quite different, and some Chinese medicine *Sojae Semen Praeparatum* were lower than the pharmacopoeia standard; individual food *Fermented Soya Bean* samples had fibrinolytic enzyme activity, while traditional Chinese medicine *Sojae Semen Praeparatum* had little fibrinolytic enzyme activity. **Conclusion** The order of microbial abundance in *Sojae Semen Praeparatum* or *Fermented Soya Bean* is as follows: *Bacillus subtilis*, mold and yeast; the content of soybean isoflavone and aglycone are related to the fermentation process, and the samples are quite different. Dissolving thrombus is not the main effect of Chinese medicine *Sojae Semen Praeparatum*.

KEY WORDS: *Sojae Semen Praeparatum*; *Fermented Soya Bean*; soybean isoflavone; microbial flora

基金项目: 河北省科学院科技计划项目(23304)、河北省自然科学基金项目(H2022423341)

Fund: Supported by the Science and Technology Program of Hebei Academy of Sciences (23304), and the Natural Science Foundation of Hebei Province (H2022423341)

*通信作者: 董超, 正高级工程师, 主要研究方向为药物和食品微生物发酵及开发。E-mail: dongchao8605@sina.com

*Corresponding author: DONG Chao, Professor, No.46, Youyi South Street, Shijiazhuang, Hebei 050081, China. E-mail: dongchao8605@sina.com

0 引 言

淡豆豉是指豆科植物大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]的干燥成熟种子(黑豆)的发酵加工品,其味苦辛、性凉,归肺胃经,具有解表、除烦、宣发郁热的功效,用于治疗感冒、寒热头痛、烦躁胸闷、虚烦不眠等症^[1]。淡豆豉中的异黄酮类、苯丙素类、氨基酸类、核苷类等活性成分有抗氧化、调节血脂、抗肿瘤、抗骨质疏松、降糖等药理作用^[2-4],部分豆豉或淡豆豉被检测到纤溶酶活性,具有类似日本纳豆溶解血栓的效果。

豆豉是中国最古老的发酵食品之一,其记载最早见于《楚辞》的“大苦咸酸”^[5]。中药淡豆豉是豆豉发展到一定阶段后的细分品类,具有药食同源的同根性。贾思勰的《齐民要术》对豆豉的制作过程描述最详细^[6],淡豆豉的炮制工艺以李时珍的《本草纲目》为遵从标准^[7],2020 年版《中国药典》中淡豆豉的制法如下:取桑叶、青蒿各 70~100 g,加水煎煮,滤过,煎液拌入净大豆 1000 g 中,俟吸尽后,蒸透,取出,稍晾,再置容器内,用煎过的桑叶、青蒿渣覆盖,闷使发酵至黄衣上遍时,取出,除去药渣,洗净,置容器内再闷 15~20 d,至充分发酵、香气溢出时,取出,略蒸,干燥,即得。该工艺制法基本沿袭了《本草纲目》的记载。淡豆豉的鉴别部分采用的是薄层层析,测定部分采用大豆苷元和染料木素两种成分的总和作为质量标准^[1]。国内不同省份的地方性中药炮制规范也有淡豆豉的收录,制法基本同药典,添加的辅料成分稍有差异,其销售和应用具有地方性标准要求 and 限定。

由于中药的发展历史悠久和生物学的落后,不论是药典还是地方炮制标准,关于淡豆豉的发酵微生物菌群,

均没有具体界定。虽然发酵方法、工艺过程记载详细,但是优劣分辨、评判标准都比较模糊。中药淡豆豉的发酵过程主要是自然发酵,不同地域的自然环境中“黄衣上遍”菌株不同,有米曲霉、黑曲霉和其他霉菌的记载^[8],其密闭兼性厌氧发酵过程的微生物种类更是复杂多样化,筛分出发酵类食品或中药普遍存在的有益发酵菌,如枯草、地衣芽孢杆菌、酵母和乳杆菌等^[9-10]。淡豆豉的微生物菌群生物学特性与药效关系不明确,大豆异黄酮成分分解为苷元的过程是在“黄衣上遍”还是“厌氧密闭”尚不清楚;虽然很多科研工作者从豆豉或淡豆豉中分离筛选分泌纤溶酶的微生物菌株,但是其与日本的纳豆发酵菌株的单一性和溶栓效果还有一定差别;综合以上因素,连带中药淡豆豉原料的黑黄豆颜色、大小和形状之分,造成中药材市场中的淡豆豉质量参差不齐,甚至有些不能达到药典的要求。

本研究采集了全国不同产地的食品豆豉和中药淡豆豉样本,对其黑黄豆原料、大小粒外观、形态和嗅味等进行了对比;测试了样本中大豆异黄酮和苷元成分的含量,按照药典的规定进行了数据分析;分离、筛选了样本中留存的微生物菌株,对菌株进行了初步的分类,分析了发酵过程中微生物的种属、参与顺序和生物学功能,进一步探讨了淡豆豉发酵过程中生物酶活性与药效的关联性。为发酵类食品和曲类中药制备过程中的共性问题提供一定的材料佐证。

1 材料与amp;方法

1.1 材 料

1.1.1 检测的样本

豆豉和淡豆豉测试的样本来源如表 1 所示,有地方性特产食品的豆豉,也有淡豆豉的中药饮片或者中药材。

表 1 豆豉和淡豆豉样本
Table 1 Samples of Sojae Semen Praeparatum and Fermented Soya Bean

编号	名称	产地	原料	样本品类	外观及颜色	内芯颜色	椭圆的长度/mm 长/宽/厚的比例	嗅味
1	淡豆豉	安徽亳州	大圆粒黑豆	中药材	黑色,褶皱,大多光滑,个别有白色绒膜	褐色	10.94 1/0.76/0.68	豆豉味,无其他嗅味
2	黄毛淡豆豉、香豉	四川泸州	小圆粒黑豆	食品	黑褐色,个别有白点	深褐色	8.24 1/0.79/0.60	微香豆豉味
3	淡豆豉	安徽涡阳	大圆粒黑豆	中药饮片	黑色,褶皱,大多光滑,个别有白色绒膜	深褐色	8.94 1/0.72/0.69	豆豉味,无其他嗅味
4	淡豆豉	安徽亳州	大圆粒黑豆	中药材	黑色,褶皱,大多光滑,个别有白色绒膜	褐色	11.40 1/0.71/0.56	豆豉味,无其他嗅味
5	淡豆豉	安徽亳州	大圆粒黑豆	食用农产品	黑色,褶皱,大多光滑,个别有白色绒膜	黑褐色	10.24 1/0.78/0.68	豆豉味,无其他嗅味
6	豆豉	河北辛集	小圆粒黄豆	农家自制食品	淡黄色,表面有褐绿色的绒膜	黄白色	9.72 1/0.64/0.57	豆酱味
7	淡豆豉	安徽亳州	大、小圆粒黑豆	代用茶	黑色,褶皱,大多光滑,个别有白色绒膜	褐色	12.54 (大 1/0.75/0.57) 9.64 (小 1/0.81/0.62)	豆豉味,无其他嗅味

表 1(续)

编号	名称	产地	原料	样本品类	外观及颜色	内芯 颜色	椭圆的长度/mm 长/宽/厚的比例	嗅味
8	无盐淡 豆豉	山东 临沂	中圆粒黑豆	食品	黑色, 表面光滑, 少许有褶皱, 大多有白色绒膜	浅褐色	8.56 1/0.74/0.63	微香豆豉味
9	淡豆豉	广东 普宁	小瘪粒黑豆	中药材	黑色, 褶皱, 大多光滑, 白色绒膜很少	青色	6.98 1/0.68/0.46	纯正淡豆豉味道
10	淡豆豉	四川 成都	小圆粒黑豆	中药材	黑色, 不光滑, 有白色绒膜	青色	8.94 1/0.65/0.59	豆豉味, 无其他 嗅味
11	淡豆豉	广西 玉林	小瘪粒黑豆	中药材	黑色, 褶皱	黑色	7.46 1/0.79/0.23	豆豉味, 无其他 嗅味
12	淡豆豉	山东 泰安	大圆粒黑豆	古法食品	黑褐色, 不光滑, 有白色绒膜	青色	11.42 1/0.63/0.46	豆豉味, 稍有 鱼香味
13	淡豆豉	江西 九江	大圆粒黑豆	食品	黑褐色, 褶皱, 粒不圆, 不光滑, 含水量大	棕褐色	11.62 1/0.64/0.53	豆豉味道浓
14	淡豆豉	四川 成都	圆饼状黄豆	食品	黄褐色, 有褶皱, 个别有白色绒膜	浅褐色	8.92 1/0.73	豆豉味
15	豆豉	广西 昭平	大瘪粒黑豆	特产食品	黑色, 褶皱, 个别有白色绒膜	黑色	9.84 1/0.55/0.29	豆豉味道浓
16	淡豆豉	广东 揭阳	小瘪粒黑豆	食品	黑褐色, 褶皱, 不光滑	褐色	7.66 1/0.63/0.29	豆豉味道
17	淡豆豉	安徽 亳州	大、小圆粒黑豆	食品	黑色, 光滑, 褶皱, 个别有白色绒膜	黑色	11.94 (大 1/0.83/0.63) 9.42 (小 1/0.87/0.57)	味道轻微
18	淡豆豉	河北 安国	小圆粒黑豆	农副产品	黑色, 光滑, 大多有黄色绒膜	褐色	8.38 1/0.64/0.45	豆豉味
19	淡豆豉	湖北 襄阳	小瘪粒黑豆	初级农产品	黑色, 光滑, 褶皱, 少数有白绒膜	褐色	8.38 1/0.75/0.57	豆豉味较浓
20	干豆豉	湖北 恩施	圆饼状黄豆	食品	黄褐色表面	浅褐色	7.26 1/0.73	食品, 盐、辣椒、 香辛料味道复杂, 有豆豉味
21	无盐豆豉	湖南 长沙	大、小圆粒黑豆	特产食品	黑色, 瘪, 光滑有褶皱	褐色	10.38 (大 1/0.66/0.37) 8.72 (小 1/0.56/0.34)	豆豉味浓
22	豆豉	陕西 安康	圆饼状黄豆	食品	红褐色, 去皮的黄豆瓣, 含水量大	红褐色	6.80 1/0.79	有辣椒等食品佐料 味, 也有豆豉味
23	淡豆豉	四川 成都	圆饼状黄豆	食品	黄色, 个别褐色, 不光滑, 有白色绒膜	浅褐色	9.90 1/0.80	豆豉味, 无杂味
24	淡豆豉	安徽 亳州	大、小圆粒黑豆	中药材	白色绒膜, 无褶皱, 干燥含水量小	褐色	9.48 (大 1/0.70/0.45) 7.66 (小 1/0.63/0.45)	豆豉味
25	淡豆豉	河北 安国	小瘪粒黑豆	霉菌发酵的 药材	湿度大, 黑色	黑色	10.60 1/0.59/0.28	豆豉味轻微

注: 普通样本是粒长度、宽度、厚度的比例, 圆饼状样本粒只有长度、厚度的比例。

1.1.2 仪 器

Waters e2695 高效液相色谱仪、Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(美国 Waters 公司); FA2104N 电子分析天平(精度 0.0001 g, 上海精琪仪器有限公司); DK-98 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司); PW-002 恒温培养箱(重庆试验设备厂); 苏净 SW-2 FD 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); 01010259 游标卡尺(杭州工具总厂); 纤溶酶测试平板(自制)。

1.1.3 试剂及标准品

黄豆黄苷、染料木苷、染料木素、大豆苷(纯度≥98%, 北京索莱宝科技有限公司); 大豆苷元(纯度 100%, 中国食品药品检定研究院); 黄豆黄素(纯度≥98%, 成都曼思特生物技术有限公司); 乙腈、甲酸(色谱纯, 德国默克公司); 超纯水(娃哈哈集团有限公司); 0.22 μm 微孔滤膜(天津市科亿隆实验设备有限公司); 尿激酶 10 万单位(天津生物化学制药有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 豆豉和淡豆豉样本的外观和嗅味检测

分别取样本 10~15 粒, 观察其外观颜色, 判断其原料的品类、特点; 用游标卡尺测试其长度、宽度和厚度, 圆饼状样本只测长度和厚度, 以 10~15 粒的均值为最终数据。以其大小和形状判断其豆原料的品类; 横切开其粒状样本, 观察其横切面的颜色; 并品鉴其嗅味。

1.2.2 微生物菌株的筛选

称取豆豉或者淡豆豉样本 3~5 粒, 放入 50 mL 菌水和玻璃珠的三角烧瓶中, 振摇 30 min, 使之充分混匀, 依次制备 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 不同稀释浓度的样本悬液。依次吸取不同稀释浓度的悬液 0.1 mL, 均匀涂布于马铃薯葡萄糖琼脂培养基和牛肉膏蛋白胨琼脂培养基 1:1 的混合平板上, 并倒置放入 28℃ 恒温培养, 24~48 h 后, 挑取单菌落。

1.2.3 菌株的鉴别和筛选

圆点状或者放射状的黏性菌苔, 涂玻片染色, 显微镜观察, 初步确定为细菌的菌株涂布于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基平板, 将平板倒置放入 30℃ 恒温培养。如有不同外观、颜色的菌株产生, 再次重复分别涂布, 至细菌单菌落培养完成。

有丝状或者孢子产生的, 初步确定为真菌菌株, 取菌丝或者孢子涂布于马铃薯葡萄糖琼脂培养基平板, 将平板倒置放入 28℃ 恒温培养, 如有细菌类干扰, 再次重复挑取, 至真菌单菌落培养完成。

1.2.4 纤溶酶活性的测试方法

改进版纤溶酶测试透明圈法, 对照标品为尿激酶^[11]。

1.2.5 样本中黄酮类成分测试方法

取豆豉或淡豆豉样本约 1 g, 研钵粉碎后过 2 号筛, 电子天平精密称重, 置具塞锥形瓶中, 加 70% 甲醇 25 mL, 加热沸腾, 冷却回流, 处理 60 min, 放冷, 用 70% 甲醇补足减失的体积, 摇匀, 滤纸初滤过, 取滤液, 再过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得^[12]。

分别精密称取大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素对照品适量, 加甲醇制质量浓度分别为 195.320、126.117、178.050、172.116、111.330、97.012 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

精密吸取混合对照品溶液 1、2、4、8、12、16、20 μL 进入高效液相色谱仪, 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 的冰醋酸(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~5 min, 93%~87% A; 5~20 min, 87%~76% A; 20~35 min, 72% A; 35~36 min), 流速 1.0~1.2 mL/min; 柱温 33℃; 检测波长 260 nm; 以进样量 10 μL 的色谱条件进行测定。

1.3 数据处理

实验样本测试 3 个平行, 取均值。使用 Excel 2021 进行数据柱形图处理, Venny 2.1 在线软件生成韦恩图, 软件 SPSS 26.0 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 样本的外观和嗅味检测结果

关于 25 个样本的豆类原料、发酵产物分类差异的韦恩图见图 1。其中标称中药材淡豆豉的 8 个, 其原料均采用黑豆发酵, 大小粒均有。其他食品或者农产品的样本 17 个。图 1 显示, 中药材都是以黑豆为发酵原料的, 有的用大粒黑豆, 也有用小瘪粒黑豆, 即小粒“肾型”黑豆。宋代之前淡豆豉原料无明确要求^[13], 苏颂《本草图经》首次描述“黑着入药、白者不用”^[14], 《本草纲目》记载也是“黑豆最佳”。中国药典从 1953 年第一版至 2015 年第十版均没有明确原料是黑豆或黄豆, 至 2020 年, 中国药典第十一版规定了“淡豆豉”采用黑豆原料, 未具体限制其外形和大小。豆豉的发酵后产物颜色会逐渐变暗、硬度降低、豆芯显红褐色, 这与美拉德反应和氨基酸态氮的含量增加相关^[15]。

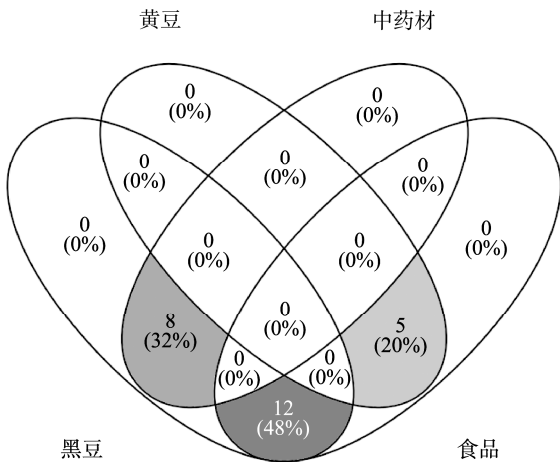


图 1 样本原料和品类的韦恩图

Fig.1 Wayne diagram of sample raw materials and categories

标称淡豆豉的 19 个样本, 多为药食同源的产品, 因为生产许可或者市场销售的限制, 市场上有很多食品或者农产品也称为“淡豆豉”, 但不是中药淡豆豉; 一些地方性食品—豆豉有特殊的发酵方式, 或有其他的佐料成分, 比如辣椒、香料等, 其嗅味、功能与中药淡豆豉差别较大, 具体见表 1。中药材淡豆豉来源于食品豆豉, 很多标称淡豆豉的产品还是以食品的形式在销售。其历史性、地域性影响使食品豆豉、淡豆豉与中药材淡豆豉容易混淆。

2.2 样本中微生物的筛选和鉴别结果

表 2 显示, 淡豆豉和豆豉的样本中留存的微生物有两大类, 包括以芽孢杆菌、球菌为主的细菌和以霉菌、酵母为主的真菌。其中可以产芽孢的杆菌最多, 其在牛肉膏蛋白胨琼脂培养基平板上的生长状态相似, 多为有延展性的黏性菌苔, 显微镜下先是长链状杆菌, 培养 24~48 h 后有大量芽孢生成; 其他细菌有链球菌和大肠杆菌, 不生成芽孢的杆菌推测多为大肠杆菌, 多来自于自制食品豆豉; 球菌多为

表 2 样本中留存微生物的种类和鉴别
Table 2 Species and identification of microorganisms retained in samples

编号	微生物的种类	菌株的生长状态、特点	菌株丰度/(CFU/g)
1	1 株芽孢杆菌	白色、透明、有褶皱,黏性延展性 5~8 mm。大多为芽孢	2.67×10^7
2	1 株芽孢杆菌	白色、透明、有凸起的褶皱,延展性宽度在 8~12 mm	2.33×10^9
3	1 株芽孢杆菌	白色、透明、有凸起的褶皱,延展性宽度在 8~10 mm	6.67×10^8
4	1 株芽孢杆菌	白色、透明、有褶皱的菌苔,延展性较小。芽孢杆菌,有 4~5 个菌体的长链	1.00×10^9
	1 株酵母	白色、黏性菌苔。梭状不规则菌体	2.20×10^6
5	1 株芽孢杆菌	透明、黏性褶皱菌苔,延展性强,达到 10~15 mm。有个别芽孢两侧有黑色未脱离的杆菌菌体	2.00×10^9
6	1 株酵母菌株	白色,凸起的黏性菌苔。梭状菌体,体积是芽孢杆菌的 3 倍左右	2.00×10^9
	1 株球菌	透明黏性菌苔,直径 1~2 mm。球菌,圆状,直径约是芽孢杆菌长度的 1/3	6.67×10^8
	1 株霉菌	开始白色菌丝,出黑色孢子,最后全黑色菌丝体	/
7	1 株芽孢杆菌	白色、褶皱菌苔,延展性较小,边缘有分支不整齐	1.00×10^9
8	1 株长杆菌	白色、透明,凸起的黏性菌苔,延展性较小	5.68×10^9
	1 株霉菌	开始黄色菌丝,最后黄绿色菌丝体,有黄绿色孢子	/
9	1 株无芽孢杆菌	透明、黏性凸起褶皱菌苔,边缘雪花状,直径 5~8 mm	2.03×10^{10}
10	1 株芽孢杆菌	乳白色、凸起、褶皱小,延展性 5~10 mm	2.33×10^9
11	1 株无芽孢杆菌	白色、褶皱、有黏性的菌苔,延展性较小	6.67×10^8
12	1 株无芽孢杆菌	白色透明褶皱有黏性的菌苔,延展性较小	2.00×10^9
13	1 株芽孢的杆菌	白色、凸起褶皱菌苔,无黏性,延展性小	16.67×10^8
	1 株无芽孢杆菌	透明,凸起的黏性菌苔,延展性较小	6.67×10^8
14	1 株无芽孢杆菌	白色,透明,凸起,黏性拉丝菌苔	3.21×10^5
	1 株芽孢杆菌	白色,凸起褶皱,延展性 5~10 mm	6.67×10^8
15	1 株杆菌	白色,凸起,黏性,褶皱菌苔,延展性小,短棒状杆菌	6.33×10^9
16	1 株芽孢杆菌	白色,有雪花状延展,直径 5 mm,芽孢较多	1.00×10^{10}
17	1 株芽孢杆菌	表面褶皱,拉丝,黏,菌苔厚	1.33×10^9
18	1 株杆菌	白色、透明、褶皱、有黏性的菌苔,延展性较小。菌株为棒状,没有芽孢	1.33×10^9
19	1 株杆菌	透明、凸起的褶皱菌苔,延展性 2~4 mm。长链状杆菌,没有芽孢	2.00×10^9
20	1 株芽孢杆菌	表面褶皱,拉丝,白色,黏,菌苔延展性小。多为芽孢	1.00×10^9
21	1 株酵母菌株	白色,凸起褶皱,有黏性。菌株明显比细菌大,形状椭圆,无规则	6.81×10^8
	1 株链状杆菌	透明,菌苔小,直径 1~2 mm。成束的链状杆菌,无芽孢	2.01×10^8
22	1 株杆菌	透明、凸起的黏性菌苔,延展性 5 mm,边缘雪花状。不形成芽孢	1.00×10^9
23	1 株无芽孢杆菌,	白色凸起褶皱菌苔,黏性拉丝,延展性较小。无芽孢,杆菌	1.00×10^9
24	1 株长链杆菌	透明、凸起的黏性菌苔,直径 3~5 mm,不形成芽孢	8.33×10^9
	1 株小球菌	透明,圆菌苔,直径 1~2 mm,双联球菌	1.10×10^{10}
25	1 株霉菌	菌丝体先是白色、然后黄色,最后是黄绿色,有大量孢子产生	/

注: /代表无。

链球菌,也有双联或者四联球菌;留存的真菌包括菌丝颜色不同的霉菌和酵母,从自制豆豉中分离得到了黑曲霉菌 1 株,进一步筛选得到黄绿色霉菌 2 株,外观符合米曲霉的生长特点;筛选分离酵母菌 2 株,其菌体体积是细菌的 5~10 倍,并且多为梭状或者不规则的粒状,相对好鉴别。由于样本中微生物以芽孢杆菌较多,推测以枯草芽孢杆菌为主,其丰度要远远高于真菌类,大多在 $10^8\sim 10^{10}$ CFU/g,此结果同黑龙江中医学院的石柳等^[16]的研究结果一致。

梳理其发酵工艺,可以确定淡豆豉的发酵分为两个部分:前发酵和后发酵^[17]。前发酵是霉菌发酵,采用自然菌株发酵大豆,分解部分大豆蛋白和黄酮成分,生长菌丝体或生成孢子。两个发酵过程的中间需要一个清洗过程,主要是除去辅料药渣,用清水洗脱真菌的残留菌丝体;后发酵是兼性厌氧发酵,采用密闭容器,高温发酵多日,得

到淡豆豉成品。样本中的微生物与发酵工艺具有直接的关联性,表 2 显示留存较多的微生物以枯草芽孢杆菌、酵母和乳酸菌为主,真菌属的霉菌类留存较少,很多样本中甚至没有检出真菌的菌株。本研究认为淡豆豉的前期发酵,除了霉菌,枯草芽孢杆菌、酵母和其他细菌类也一起介入,只是由于此温度、湿度条件更适合霉菌的生长,菌丝繁殖迅速,同时桑叶和青蒿的汁液对细菌有一定的抑制作用,所以外观表现是“黄衣上遍”。药典中“除去药渣,洗净”即中间的清洗过程,去除了前发酵残留的大部分菌丝体和孢子,所以样本中留存的霉菌属微生物丰度远远小于细菌类。前发酵工艺在霉菌“黄衣上遍”后要及时处理,不能进一步延长发酵过程,因为霉菌产生孢子后,在开放条件下,枯草类细菌的好氧发酵过程会使其溃烂,即《齐民要术》所记载的“失节伤热,臭烂如泥,猪狗亦不食”^[6]。本研究认

为枯草类细菌在淡豆豉的整体发酵过程中是“承上启下”的作用,在前发酵阶段介入,在后发酵的起始阶段耗去氧气,防止豆豉的“溃烂”,同时给兼性厌氧菌株的生长繁殖提供了合适的环境。大多枯草类菌株可以产生芽孢,所以在淡豆豉样本中留存较多。后发酵阶段的酵母和乳酸等菌株的厌氧发酵过程产生挥发性产物,这也是淡豆豉的特征性臭味来源,其菌株一般会留存于淡豆豉样本中,但是其繁殖量远小于好氧的枯草类菌株,所以留存数量也不是很高。

2.3 样本的纤溶酶活性测试结果

淡豆豉是否具有治疗或者预防血栓的效果,史书不明确。张仲景的《伤寒杂病论》记载淡豆豉有“心中懊憹,栀子豉汤主之;而烦热、胸中窒者,栀子豉汤主之”^[18]。本研究认为淡豆豉对胸闷的治疗可能与纤溶酶活性有关联。样本的纤溶酶活性检测结果如图 2。

图 2 显示中药材淡豆豉的纤溶酶活性都较低,只有 11 号样本达到 302.0 U/g,食品类豆豉的纤溶酶活性相对较高,如 6 号的农家豆豉,达到 2008.8 U/g。一般霉菌、酵母和乳酸菌株的纤溶酶活性都很低,枯草芽孢杆菌是纤溶酶的主要分泌菌株,不同地域性自然环境中的枯草芽孢杆菌,参与淡豆豉的发酵过程,是样本产生纤溶酶活性的主要影响因素。样本中最高纤溶酶活性达到 2008 U/g,也远远小于纳豆冻干粉的 22000 U/g。淡豆豉是多菌种发酵,纳豆是纯菌种发酵,其微生物特点、发酵工艺和周期具有较大差别,同时纤溶酶活性不属于淡豆豉的质量检测指标。

纤溶酶是丝氨酸蛋白酶,可以溶解纤维蛋白,临床上

具有溶解血栓的效果。很多枯草芽孢杆菌具有分泌纤溶酶的作用。江西中医药大学的翁美芝团队^[19-20]采用古法炮制淡豆豉,从中筛选到产纤溶酶的菌株有枯草芽孢杆菌、微球菌和嗜麦芽窄食单胞菌,其中嗜麦芽窄食单胞菌产纤溶酶达到 527.49 IU/mL。温嘉敏等^[21]采用根霉发酵黑豆,其纤溶酶活性达到 17122 IU/g,但是其发酵工艺与淡豆豉不相符,更类似东南亚的天贝。董科等^[22]从中国东南地方性水豆豉中筛选得到贝莱斯芽孢杆菌,纤溶酶活力达到 826.25 IU/mL。豆豉中纤溶酶的活性大多来自枯草芽孢杆菌,吕美云等^[23]从豆豉中分离产纤溶酶的 5 个菌株均为枯草芽孢杆菌。国内科研人员从淡豆豉中分离产纤溶酶的菌株,与纳豆激酶等纤溶酶进行对比研究,彭勇等^[24]研究发现豆豉溶栓酶基因与来源于 *B.subtilis*K-54 的丝氨酸蛋白酶同源性 97.8%,与纳豆激酶核苷酸的同源性仅有 80.0%,氨基酸序列的同源性仅为 86.5%。纳豆芽孢杆菌是枯草芽孢杆菌的亚属,纤溶酶是其特征性产物,虽然很多枯草芽孢杆菌可以分泌纤溶酶,但是由于自然环境、发酵工艺不同,豆豉中筛选的枯草芽孢杆菌产纤溶酶的量普遍低于纳豆芽孢杆菌。

2.4 样本中大豆黄酮类与苷元成分的检测结果

通过液相色谱法检测大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷 3 种大豆黄酮成分,以对照品进样量为横坐标($X, \mu\text{g}$),测定的峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素的回归方程和线性范围,见表 3,在测试成分的线性范围内检测对应大豆异黄酮成分。

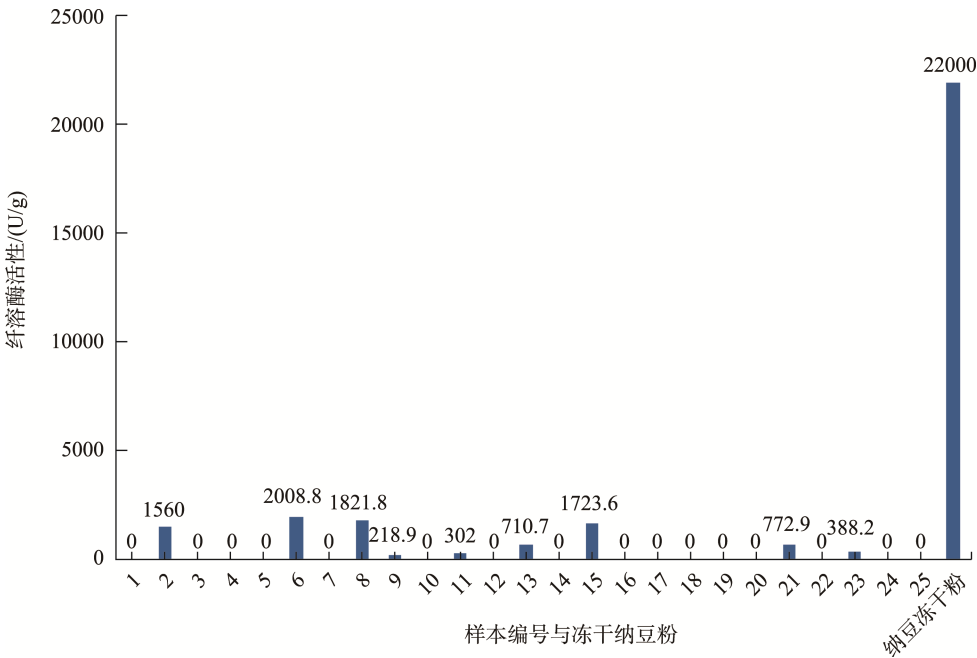


图 2 25 个样本与纳豆冻干粉的纤溶酶活性对比图

Fig.2 Comparison of fibrinolytic enzyme activity between 25 samples and natto lyophilized powder

表 3 大豆异黄酮成分的线性关系及线性范围
Table 3 Linear relationships and linear ranges of soybean isoflavone components

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
大豆苷	$Y=3571689.641X-1133.259$	0.9999	0.1082~0.3594
黄豆黄苷	$Y=575324.144X+464.911$	0.9999	0.0021~0.0456
染料木苷	$Y=5419113.146X-14544.739$	1.0000	0.0284~0.5753
大豆苷元	$Y=5020282.178X-4587.209$	1.0000	0.0099~0.2001
黄豆黄素	$Y=5134583.424X-529.267$	0.9999	0.0079~0.0171
染料木素	$Y=10435045.126X-10670.622$	0.9999	0.0056~0.1076

3 种大豆异黄酮和对应的苷元成分测定结果如表 4, 最右列为大豆苷元和染料木素含量相加后的质量百分比, 对比 2020 版中国药典规定的 0.04% 指标如图 3。

目前已知的大豆异黄酮有 12 种组分, 分别是糖苷和对应的苷元成分^[25]。大豆中的大豆苷、黄豆黄苷和染料木苷通过淡豆豉发酵, 由 β -葡萄糖苷酶分解为大豆苷元、黄豆黄素和染料木素。研究表明糖苷型异黄酮需要先肠道代谢, 再进入肝循环, 相比之下苷元型黄酮更易被人体吸收^[26]。中国药典规定淡豆豉的鉴别是采用薄层色谱法, 含量检测是采用高效液相色谱法: 大豆苷元和染料木素的总含量不低于 0.040% ($m:m$ 干燥品)^[1]。对比表 4 的样本成分检测结果发现: 大豆苷和染料木苷远大于黄豆黄苷的含量; 大豆苷元和染料木素含量高的样本, 其原料成分大豆苷和染料木苷相对含量低, 反之, 含量相对较高。所以药典规定的成分限制是对黄酮苷成分分解为苷元成分的要求, 也是对中药淡豆豉的实际发酵过程的要求。

表 4 淡豆豉药典标准含量的结果(mg/g)
Table 4 Results of standard content in pharmacopoeia of *Sojae Semen Praeparatum* (mg/g)

编号	大豆苷	黄豆黄苷	染料木苷	大豆苷元	黄豆黄素	染料木素	大豆苷元和染料木素的含量占比/%
1	0.3786	0.0615	0.4888	0.0997	0.0290	0.0522	0.015
2	0.1383	0.0274	0.2886	0.5435	0.0904	0.3216	0.087
3	0.3989	0.0721	0.4980	0.0542	0.0174	0.0281	0.008
4	0.3412	0.0701	0.4492	0.0712	0.0239	0.0357	0.011
5	0.3285	0.0640	0.4763	0.0680	0.0171	0.0368	0.010
6	0.0853	0.0140	0.4543	0.6392	0.0274	0.4114	0.105
7	0.2249	0.0666	0.3289	0.1586	0.0470	0.0876	0.025
8	0.3671	0.0605	0.5893	0.1331	0.0203	0.1048	0.024
9	0.0039	0.0028	0.0796	0.3383	0.1253	0.3851	0.072
10	0.2200	0.0303	0.3160	0.2813	0.0446	0.1876	0.047
11	0.0071	0.0038	0.0323	0.3895	0.1264	0.3413	0.073
12	0.2553	0.0453	0.3205	0.2396	0.0647	0.1548	0.039
13	0.0172	0.0039	0.0565	0.4532	0.0839	0.2204	0.067
14	0.5090	0.0625	0.8814	0.2261	0.0269	0.1592	0.039
15	0.0217	0.0052	0.3187	1.1037	0.1428	0.7341	0.184
16	0.0063	0.0091	0.0493	0.2900	0.0955	0.1716	0.046
17	0.2829	0.0554	0.3981	0.0739	0.0269	0.0331	0.011
18	0.9821	0.1388	0.8731	0.5004	0.0754	0.1937	0.069
19	0.6511	0.0590	0.7826	0.2960	0.0312	0.1420	0.044
20	0.2217	0.0177	0.3556	0.4598	0.0385	0.1839	0.064
21	0.0068	0.0034	0.1784	0.9440	0.2106	0.5332	0.148
22	0.1330	0.0054	0.1984	0.2610	0.0305	0.1752	0.044
23	0.1485	0.0391	0.3132	0.2889	0.0780	0.1740	0.046
24	0.1647	0.0230	0.1804	0.0304	0.0097	0.0137	0.004
25	0.0126	0.0129	0.1064	1.1517	0.2089	0.7123	0.186

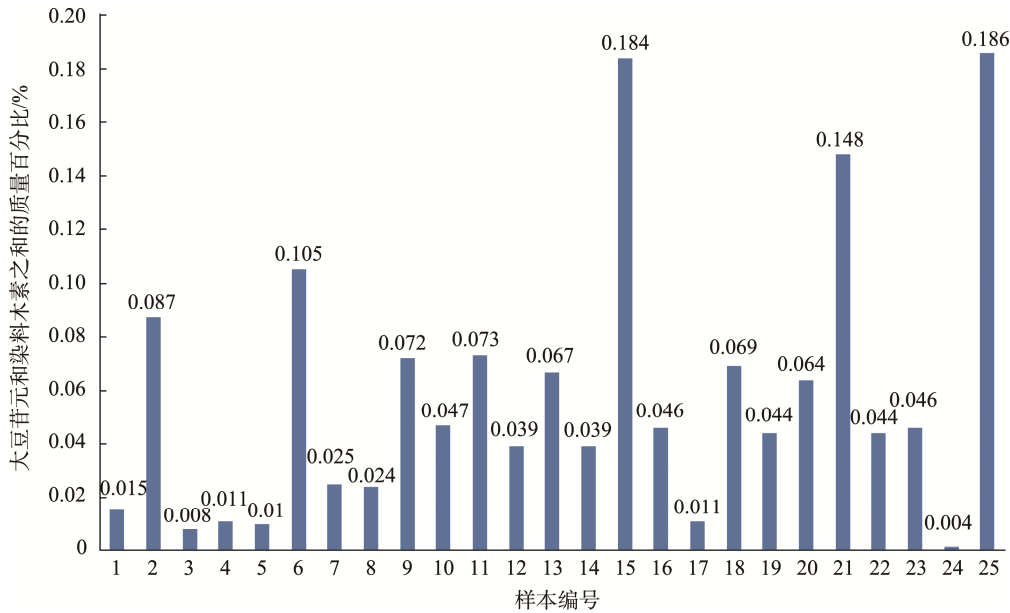


图 3 样本中大豆苷元和染料木素之和的质量百分比对比图
Fig.3 Comparison of the mass percentage of the sum of daidzein and genistein in the sample

图 3 显示,其大豆苷元和染料木素的总量大于等于 0.04% 的样本有 2、6、9、10、11、13、15、16、18、19、20、21、22、23、25, 共计 15 个。其中较高的是 25、15、21 号样本, 其中的 15 号(广西昭平)、21 号(湖南长沙)是食品类豆豉, 25 号是中药材; 1、3、4、9、10、11、24、25 为中药材, 但是其中 1、3、4、24 均不达标, 尤其是 24 号样本最低。很多地方性特产豆豉的发酵成分要高于中药材淡豆豉, 其中 2、6、15、21 号的微生物菌群 β -葡萄糖苷酶活性更强。

3 讨论与结论

3.1 食品豆豉、中药淡豆豉的关联与渊源

食品豆豉历史悠久、地域差异大, 按照其发酵微生物分类可以分为: 芽孢类细菌型、毛霉型、曲霉型和其他细菌型豆豉^[27]。其中的贵州、重庆、广西、陕西南部的豆豉多为枯草芽孢细菌型; 湖南、安徽和重庆等多毛霉型豆豉; 江西、河南、湖北和浙江多曲霉型豆豉; 云南、福建和广东有其他细菌型豆豉。中药淡豆豉是从江西、浙江一带的曲霉型豆豉中剥离出来的细化分支, 米曲霉的发酵符合“黄衣上遍”, 以无盐为入药特点。在《齐民要术》的基础上, 《本草纲目》逐步严谨了其炮制规范。其他类型的食品豆豉随历史发展延申, 逐步有了地方性特产的标签, 微生物菌株更加多样化。例如贵州的臭豆豉、四川的水豆豉和陕西的干豆豉都属于枯草菌发酵豆豉, 重庆永川豆豉属于毛霉型豆豉, 广东阳江豆豉属于四联球菌和乳杆菌的发酵豆豉^[28]。很多食品豆豉中, 添加盐、辣椒、白酒和香料等辅料, 不但可以提升食品豆豉的食用效果, 而且可以掩盖豆豉发酵的其他味道。这些豆豉多以地方性特产或民间作坊为特点, 不同于中药淡豆豉, 但是也造成了食品豆豉和中药材淡豆豉的混淆。

3.2 淡豆豉发酵菌株的菌属

中药淡豆豉来自于中国的传统食品-豆豉, 其制备工艺一直采用自然发酵方法, 包括药典也是遵从《本草纲目》的记载。由于中国地域辽阔, 不同地区的温度、湿度环境差异较大, 同菌属的微生物的生物特性也有很大差别。药典描述的淡豆豉前发酵阶段“黄衣上遍”应该是米曲霉发酵为主, 米曲霉属于不产黄曲霉毒素 B 和圆弧偶氮酸的菌群, 这些霉菌多分布于农村用传统方法酿造黄豆酱的地区, 尤其是河北、山东和山西等省份^[29]。关于黄曲霉和米曲霉的鉴别原来采取颜色和产孢结构差异区分^[30], 现在采用基因序列比对和系统发育分析方法辨别菌株, 或者酶联免疫试剂盒和液相色谱法测定毒素的分泌。有学者在发酵豆豉中筛选得到了黑曲霉、犁头曲霉、总状毛霉或者根霉等^[31], 这应该是地域性食品豆豉的特征。

本研究结果显示从样本中分离的细菌类其 β -葡萄糖苷酶活性均较低, 而所有筛选的真菌均可分泌 β -葡萄糖苷酶, 本研究认为霉菌是大豆黄酮分解为苷元的主要生物功能性

菌株。这与冯伦元等^[32]从贵州传统发酵豆制品中筛得枯草芽孢杆菌为水解银杏黄酮苷的微生物有不同结果。也有人检测市场上的淡豆豉黄酮类苷元成分偏低, 推测是发酵过程中部分没有“再闷”的步骤所致^[33], 兼性厌氧的“再闷”微生物, 其菌株的 β -葡萄糖苷酶也不高, 此结论值得商榷。

3.3 淡豆豉和豆豉的溶栓作用

菌株的筛选结果显示大多样本中留存枯草芽孢杆菌, 而且其丰度是最高的, 纳豆芽孢杆菌是枯草芽孢杆菌的亚属, 所以推测豆豉或淡豆豉样本中含有纤溶酶活性应该是来自枯草芽孢杆菌。历史记载唐朝鉴真大师东渡将豆豉带去日本, 那么日本的纳豆与中国的枯草芽孢细菌型豆豉更接近, 也符合生物学菌群的分类。有些科研学者认为纳豆是来自中国的豆豉^[34-35], 本研究认为日本纳豆与中国的枯草类细菌型豆豉有渊源, 但是与中药淡豆豉关系较远。检测结果显示所采样本的纤溶酶活性差别很大, 最高的酶活在 2000 U/g 左右, 有的基本没有纤溶酶活性, 均远低于日本纳豆。纳豆的发酵是采用单一的纳豆芽孢杆菌, 发酵周期只有 24 h 左右。其拉丝和嗅味特征同中国的枯草类细菌豆豉最相似, 本研究认为纳豆是在日本确定了单一菌株、缩短了发酵时间、不添加辅料的、即整体简化版的中国臭豆豉。中药淡豆豉中也有枯草类菌株参与, 但是纤溶酶不是其特征性产物。通过检测发现, 淡豆豉中筛选得到的霉菌菌株基本不分泌纤溶酶类, 并且枯草芽孢杆菌和纳豆芽孢杆菌也没有 β -葡萄糖苷酶活性。所以大豆中黄酮成分的分解、蛋白分解和风味物质的生成是中药淡豆豉的生物学特点, 虽然有可能具有一定的纤溶酶活性, 但是溶栓不是其主要的中药药效。在地方中药炮制规范中, 只有黑龙江省收录的“黄豆豉饮片”^[36], 药效功能是降脂、溶栓、整肠, 发酵菌株采用纳豆芽孢杆菌, 其制法是单独的细菌发酵, 发酵时间短^[37], 也是国内唯一的以地方性中药命名的纳豆发酵产品。

3.4 豆豉的药效与发酵工艺的关系分析

淡豆豉的质量标准是以大豆苷元和染料木素的含量为检测指标, 但是不能以此认定大豆苷元和染料木素是主要的药效成分, 而是道地中药淡豆豉炮制过程的特征性产物和指示性标志物。淡豆豉发酵后的蛋白、小分子多肽、活性酶类与其宣发郁热、解表除烦的功效相关; 其大豆异黄酮的苷元含量提升, 更利于人体吸收利用, 其类雌激素作用, 与改善骨质疏松、缓解女士更年期症状和抗氧化相关; 风味物质和 γ -氨基丁酸可能与除烦、抗抑郁有关。淡豆豉发酵工艺、成分和药效关系图如图 4。

为了淡豆豉的质量保证和中药提升, 建议进一步筛选优良的发酵菌株, 传承、保护传统发酵微生物的菌株, 根据不同发酵阶段的代谢作用, 明确产物的药效成分相关性。在古法炮制的传承性基础上, 与现代微生物学和分子生物学的科学性相结合, 改进优化传统发酵工艺, 提升曲类中药的发酵生产技术和质量标准, 更好满足人们的健康需求。

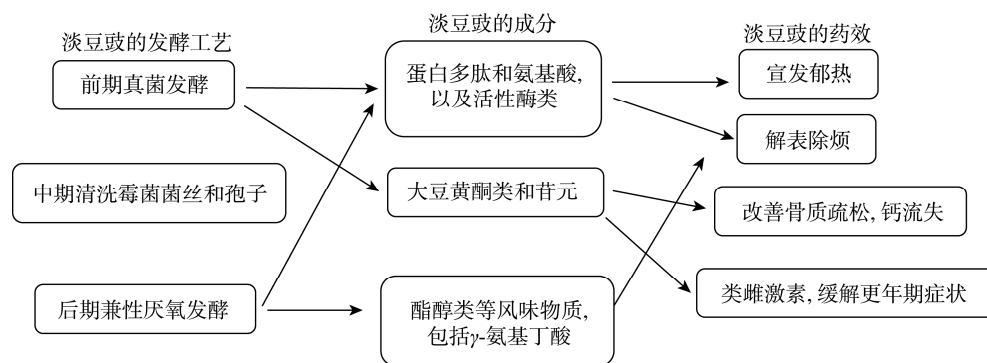


图 4 淡豆豉发酵工艺、成分和药效的关联图

Fig.4 Correlation diagram of fermentation process, composition and efficacy of *Sojae Semen Praeparatum*

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China I [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
- [2] LEE HJ, CHO HE, PARK HJ. Germinated black soybean fermented with *Lactobacillus pentosus* SC65 alleviates DNFB-induced delayed-type hypersensitivity in C57BL/6N mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 265: 113236.
- [3] LIU L, CHEN X, HAO L, *et al.* Traditional fermented soybean products: Processing, flavor formation, nutritional and biological activities [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2020, (4): 1–19.
- [4] 刘俊泽, 朱德龙, 王仁广, 等. 超声波法提取淡豆豉总黄酮工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(7): 2176–2183.
LIU JZ, ZHU DL, WANG RG, *et al.* Study on optimization of ultrasonic extraction process and antioxidant activity of total flavonoids from *Sojae Semen Praeparatum* [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(7): 2176–2183.
- [5] 朱熹. 楚辞集注[M]. 上海: 上海古籍出版社, 2001.
ZHU X. Chuci collection notes [M]. Shanghai: Shanghai Ancient Books Publishing House, 2001.
- [6] 贾思勰. 齐民要术[M]. 北京: 中华书局出版社, 2015.
JIA SX. Qi Min Yaoshu [M]. Beijing: China Publishing House, 2015.
- [7] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
LI SZ. Compendium of materia medica [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015.
- [8] 乔延江, 王延年, 史新元, 等. 中药发酵炮制学[M]. 北京: 科学出版社, 2013.
QIAO YJ, WANG YN, SHI XY, *et al.* Traditional Chinese medicine fermentation and processing [M]. Beijing: Science Press, 2013.
- [9] JEONG DY, DAILY J, LEE G, *et al.* Short-term fermented soybeans with *Bacillus amyloliquefaciens* potentiated insulin secretion capacity and improving gut microbiome diversity and intestinal integrity to alleviate type 2 diabetic symptoms [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(46): 13168–13178.
- [10] WANG S, HOU Q, GUO Q, *et al.* Isolation and characterization of a deoxynivalenol-degrading bacterium *Bacillus licheniformis* YB9 with the capability of modulating intestinal microbial flora of mice [J]. *Toxins*, 2020, 12(3): 184.
- [11] 杨明, 董超, 史延茂, 等. 纤维蛋白平板法测定纳豆激酶方法的改进[J]. 中国酿造, 2008, (4): 77–80.
YANG M, DONG C, SHI YM, *et al.* Improvement on the method of measuring the activity of nattokinase with agarose-fibrin plate [J]. *China Brew*, 2008, (4): 77–80.
- [12] 支雅婧, 王梦, 甄亚钦, 等. 淡豆豉活性成分—测多评检测方法建立[J]. 大豆科学, 2021, 40(5): 696–702.
ZHI YJ, WANG M, ZHEN YQ, *et al.* Determination of active ingredients of *Sojae Semen Praeparatum* by multi components with single marker [J]. *Soybean Sci*, 2021, 40(5): 696–702.
- [13] 林王敏, 翁倩倩, 邓爱平, 等. 淡豆豉的发酵工艺沿革及过程控制概述[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11): 222–232.
LIN WM, WENG QQ, DENG AIP, *et al.* An overview of fermentation technology evolution and process control of *Sojae Semen Praeparatum* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2021, 27(11): 222–232.
- [14] 王伟明. 淡豆豉本草考证及应用[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2021.
WANG WM. Research and application of light tempeh herbal medicine [M]. Beijing: Traditional Chinese Medicine Ancient Books Press, 2021.
- [15] 索化夷, 赵欣, 蹇宇, 等. 永川豆豉发酵过程中质构色泽形成规律[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(7): 80–85.
SUO HY, ZHAO X, QIAN Y, *et al.* The formation of texture and color during the fermentation process of Yongchuan tempeh [J]. *Food Ferment Ind*, 2016, 42(7): 80–85.
- [16] 石柳, 丁纯洁, 陈丽艳, 等. 发酵类中药饮片淡豆豉和六神曲微生物污染情况及耐热菌考察[J]. 中国医药导报, 2021, 18(7): 39–42.
SHI L, DING CJ, CHEN LY, *et al.* Investigation of microbial contamination and the rmoduric bacteria in fermented traditional Chinese medicine decoction pieces contained *Sojae Semen Praeparatum* and massa medicata fermentat [J]. *China Med Her*, 2021, 18(7): 39–42.
- [17] 方秋野, 张弛松, 狄飞达, 等. 不同光质条件对毛霉型豆豉前发酵品质的影响[J]. 中国调味品, 2023, 48(1): 93–96.
FANG QY, ZHANG CS, DI FD, *et al.* Effects of different light quality conditions on pre-fermentation quality of *Mucor*-type fermented soybeans [J]. *China Cond*, 2023, 48(1): 93–96.
- [18] 成无己. 注解伤寒论[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2018.
CHENG WJ. Annotated typhoid theory [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2018.
- [19] WENG MZ, DENG XW, CHEN QF, *et al.* Discovery and contents

- variation analysis of fibrinolytic enzyme in *Sojae Semen Praeparatum* fermentation [J]. Wuhan Univ J Nat Sci, 2020, 25(1): 87–92.
- [20] 翁美芝, 邓雄伟, 王立元, 等. 淡豆豉炮制过程中产纤溶酶微生物的筛选和鉴定[J]. 中草药, 2020, 51(24): 6221–6228.
- WENG MZ, DENG XW, WANG LY, *et al.* Screening and identification of fibrinolytic enzyme-producing microbes in fermentation process of *Sojae Semen Praeparatum* [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2020, 51(24): 6221–6228.
- [21] 温嘉敏, 蔡允林, 黎攀, 等. 应用中国根霉 12 发酵制备高溶栓活性淡豆豉的条件优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(20): 98–104.
- WEN JM, CAI YL, LI P, *et al.* Optimization of conditions for using *Rhizopus chinesis* 12 to ferment and produce *Sojae Semen Praeparatum* with high-activity fibrinolytic enzyme [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(20): 98–104.
- [22] 董科, 陈宇航, 沈丹芸, 等. 水豆豉中高产豆豉纤溶酶的菌株筛选、鉴定及生长性能研究[J]. 中国调味品, 2019, 44(9): 85–89.
- DONG K, CHEN YH, SHEN DY, *et al.* Research on screening, identification and growth performance of high-yield douchi fibrinolytic enzyme strain from fermented soybeans [J]. China Cond, 2019, 44(9): 85–89.
- [23] 吕美云, 刘紫英. 豆豉中 5 株产纤溶酶的筛选与鉴定[J]. 大豆科学, 2016, 35(1): 165–170.
- LV MY, LIU ZY. Isolation and identification of five fibrinolytic enzyme producing strains from douche (Chinese traditional food) [J]. Soil Sci, 2016, 35(1): 165–170.
- [24] 彭勇, 张义正. 豆豉溶栓酶产生菌的筛选及其酶学性质的初步研究[J]. 高技术通讯, 2002, 12(2): 30–34.
- PENG Y, ZHANG YZ. Screening of thrombolytic enzyme-producing bacteria in tempeh and preliminary study of their enzymatic properties [J]. Chin High Technol Lett, 2002, 12(2): 30–34.
- [25] HSU C, WANG ST, WU BY, *et al.* Isolation of individual isoflavone species from soybean by solvent extraction followed by the combination of microporous resin and aluminium oxide separation [J]. Food Chem, 2020, 331: 127312.
- [26] 王伟明, 董坤, 霍金海, 等. 发酵中药淡豆豉概述及新型食用豆豉应用研究[J]. 中国现代中药, 2022, 24(11): 2073–2079.
- WANG WM, DONG K, HUO JH, *et al.* *Sojae Semen Praeparatum* and new types of fermented soybean: A review [J]. Chin Med, 2022, 24(11): 2073–2079.
- [27] 周旭, 曾涛, 王洪伟, 等. 不同制曲工艺对速成永川豆豉后发酵过程和产品品质的影响[J/OL]. 微生物学报: 1–17. [2023-05-23]. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20220679
- ZHI X, ZENG T, WANG HW, *et al.* Effect of different koji-making processes on the post-fermentation process and product quality of rapid Yongchuan Douchi [J/OL]. Acta Microbiol Sin: 1–17. [2023-05-23]. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20220679
- [28] 徐菁雯, 王伟明, 史海粟, 等. 豆豉和淡豆豉微生物组与功能成分研究进展[J]. 中国酿造, 2022, 41(6): 18–23.
- XU JW, WANG WM, SHI HS, *et al.* Advances in microbiome and functional components of Douchi and Dan-douchi [J]. China Brew, 2022, 41(6): 18–23.
- [29] 余仲东, 余知和, 金世宇, 等. 我国黄曲霉遗传多样性与产毒特性[J]. 生物多样性, 2019, 27(8): 842–853.
- YU ZD, YU ZH, JIN SY, *et al.* Genetic diversity and toxin-producing characters of *Aspergillus flavus* from China [J]. Biodivers Sci, 2019, 27(8): 842–853.
- [30] 齐祖同. 中国真菌志第五卷: 曲霉属及其相关有性型[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- QI ZT. Chinese mycology volume V: *Aspergillus* and its associated sexual types [M]. Beijing: Science Press, 1997.
- [31] 狄飞达, 纪芯钥, 邹强, 等. 毛霉型豆豉的研究进展[J]. 农产品加工, 2021, 521(2): 80–83.
- DI FD, JI XY, ZOU Q, *et al.* Research progress on mucor-Fermented Soya Bean [J]. Farm Prod Process, 2021, 521(2): 80–83.
- [32] 冯伦元, 何腊平, 李翠芹, 等. 贵州传统发酵豆制品中水解银杏黄酮苷的微生物 β -葡萄糖苷酶筛选[J]. 微生物学报, 2020, 60(2): 320–332.
- FENG LY, HE LP, LI CQ, *et al.* Microbial β -glucosidase screening of hydrolyzed ginkgo flavone glycosides in traditional fermented soybean products in Guizhou [J]. Acta Microbiol Sin, 2020, 60(2): 320–332.
- [33] 李鹭, 曹冬英, 许文, 等. 基于发酵过程的淡豆豉 6 种黄酮类成分质量控制研究[J]. 药学研究, 2019, 38(10): 563–566.
- LI Z, CAO DY, XU W, *et al.* Quality control of six flavonoids in *Sojae Semen Praeparatum* based on fermentation process [J]. J Pharm Res, 2019, 38(10): 563–566.
- [34] 宋永生, 张炳文. 日本纳豆与中国豆豉营养成分的研究进展[J]. 中国调味品, 2004, (12): 6–9, 26.
- SONG YS, ZHANG BW. Research progress on the component of nutrimental and functional in Nattokinase and Lobster sauce [J]. China Cond, 2004, (12): 6–9, 26.
- [35] 高秀丽. 纳豆与纳豆激酶[M]. 北京: 科学出版社, 2020.
- GAO XL. Natto and Nattokinase [M]. Beijing: Science Press, 2020.
- [36] 黑龙江省食品药品监督管理局. 黑龙江省中药饮片炮制规范及标准[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2012.
- Heilongjiang Food and Drug Administration. Norms and standards for the preparation of traditional Chinese medicine pieces in Heilongjiang Province [M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press, 2012.
- [37] DONG MZ, AN JY, WANG LT, *et al.* Development of fermented chestnut with *Bacillus natto*: Functional and sensory properties [J]. Food Res Int, 2020, 130: 108941.

(责任编辑: 张晓寒 韩晓红)

作者简介



董 超, 正高级工程师, 主要研究方向为药物和食品微生物发酵及开发。
E-mail: dongchao8605@sina.com