

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241028001

中国豆豉与日本纳豆的发酵微生物特性对比研究

董超^{1*}, 李若楠¹, 陈敬², 孙劲冲¹, 王鑫国²

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

摘要: **目的** 对比研究中国豆豉与日本纳豆的发酵微生物特性。**方法** 采集中国陕西、四川、广西、贵州、河南和山东等地方特产豆豉样本, 通过平板筛选、菌苔观察、显微镜鉴别得到目标菌株; 采用改进的蛋白纤维平板法测定纳豆激酶活性, 采用硝基苯酚显色法测定 β -葡萄糖苷酶活性; 采用同日本纳豆的发酵工艺, 液体培养筛得的枯草芽孢杆菌种子液, 固体发酵大豆产物, 其发酵物与纳豆的外观、嗅味和酶活性进行对比。**结果** 国内细菌型豆豉的微生物以枯草类芽孢杆菌丰度最高; 其菌苔褶皱、凸起、透明、拉丝有黏性; 其发酵大豆产物的外观、性状、嗅味与纳豆高度一致, 纤溶酶活性范围为 1700~12000 U/g; 豆豉中的霉菌具有 β -葡萄糖苷酶活性, 而枯草芽孢杆菌不分泌 β -葡萄糖苷酶。**结论** 中国细菌型豆豉的主要发酵菌株是枯草芽孢杆菌, 有些菌株的纤溶酶活性高于日本的纳豆芽孢杆菌; 有的豆豉样本中留存参与发酵的霉菌, 具有 β -葡萄糖苷酶活性, 参与分解大豆黄酮苷成分; 日本的纳豆起源于中国的细菌型豆豉, 具有菌株明晰、无辅料和过程简化易控等优点。

关键词: 细菌型豆豉; 纳豆; 纤溶酶; β -葡萄糖苷酶

Comparative study of fermentation strains about Chinese Douchi and Japanese natto

DONG Chao^{1*}, LI Ruo-Nan¹, CHEN Jing², SUN Jin-Chong¹, WANG Xin-Guo²

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

ABSTRACT: Objective To comparative study of fermentaion staina about Chinese Douchi and Japanese natto. **Methods** The samples of Douchi from Shaanxi, Sichuan, Guangxi, Guizhou, Henan and Shandong were collected, and the strains of target strain were identified by plate screening, bacterial coating observation and microscope. The nattokinase activity was determined by the modified protein fiber plate method, and the β -glucosidase activity was determined by the nitrophenol chromogenic method. Using the same fermentation process as Japanese natto, the liquid culture screening of *Bacillus subtilis* seed solution, solid-state fermentation of soybean, the fermentation

基金项目: 河北省科学院科技计划项目(23304)

Fund: Supported by the Science and Technology Program of Hebei Academy of Sciences (23304)

*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, Hebei Academy of Sciences, No.46, Youyi South Street, Shijiazhuang 050081, China. E-mail: dongchao8605@sina.com

products were compared with natto in appearance, smell and enzyme activity. **Results** The predominant microorganism in domestic bacterial Douchi was *Bacillus subtilis*; its bacterial film was wrinkled, protruding transparent, and sticky; the appearance, texture, and smell of its Douchi products were highly consistent with natto, and the activity range of plasmin was from 1700 to 12000 U/g. The mold in tempeh had β -glucosidase activity, which *Bacillus subtilis* did not secrete β -glucosidase. **Conclusion** *Bacillus subtilis* is the main fermentation strain of Chinese bacterial Douchi, and some strains has higher plasminase activity than *Bacillus natto* of Japan. Some Douchi mold remained in the samples, which has β -glucosidase activity and participated in the decomposition of daidzein glycosides. Natto in Japan originated from the Douchi in China, which has the advantages of clear strains, no excipients and easy control of the process.

KEY WORDS: bacterial Douchi; natto; plasminase; β -glucosidase

0 引言

豆豉是中国最古老的发酵食品之一, 古称“幽菽”或“嗜”。其记载最早见于《楚辞·招魂》的“大苦咸酸, 辛甘行些”, 其中的“大苦”就是指的豆豉^[1]。豆豉是以大豆为原料, 经过浸泡、蒸煮、自然发酵等工艺制成的食品。由于中国地域辽阔, 发酵食品的传承历史悠久, 逐步生成了多种具有地域特色的豆豉产品。以豆豉的主要发酵微生物分类, 可以分为细菌型、曲霉型、毛霉型和根霉型豆豉^[2]。其发酵微生物具有地域相关性, 川渝地区多毛霉型豆豉, 西南地区多细菌型豆豉, 东南地区多曲霉型豆豉。例如广东阳江豆豉是曲霉型, 重庆永川豆豉、湖南浏阳豆豉是毛霉型, 山东临沂八宝豆豉是细菌型^[3]。根霉型豆豉国内较少, 以东南亚印尼的丹贝为经典, 在世界食品领域占有著名素食之称号^[4]。随着历史沿革, 在元明时期, 中药淡豆豉又从食品豆豉中剥离出来, 需要“黄衣上遍”和“密闭高温”两个发酵阶段^[5], 原料中的黄酮成分被 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, β -GC)分解生成苷元, 发酵过程比细菌型豆豉复杂, 微生物菌群有其特殊性^[6]。

纳豆是日本的一种传统食品, 与中国的细菌型豆豉高度相近。鉴真大师东渡日本, 其备办的海粮即有: “甜豉三十石”^[7], 豆豉首先在寺庙(日本称为纳所)和皇室食用, 明治维新时期逐步流向民间, 成为日本的一种特色健康大众食品^[8]。其制作工艺包括泡豆、蒸熟, 接种纳豆芽孢杆菌和固体发酵, 生成一款外观黄褐色、有黏性拉丝和特殊嗅味的发酵食品^[9]。1905 年北海道大学的迟村博士从中分离了纳豆芽孢杆菌, 1980 须见洋行博士发现了纳豆激酶的溶栓效果。20 世纪末, 国内开始发表相关纳豆的研究和报道^[10]。虽然中国豆豉有 2000 年以上的历史, 日本纳豆记载只有约 1000 年, 但是在国际上的健康食品领域, 豆豉和淡豆豉的影响力不如纳豆^[11]。

本研究采集了不同省份的食品豆豉样本, 包括地域特产、民间传承工艺和具有民族特色的豆豉。采用多级和多种培养基的富集培养方式, 筛选了样本中的微生物菌株, 得到了较高丰度的细菌和真菌菌株。结合微生物菌株镜检、菌苔形态观察, 针对优选目标菌株进行了 16S rRNA 基因检测, 确定其枯草芽孢杆菌的菌属。鉴于细菌型豆豉与纳豆的相近特点, 采用同日本纳豆的固体发酵方法, 得到豆豉枯草芽孢杆菌的大豆固体发酵物, 对比了其外观嗅味特征, 检测了其纤溶酶活性, 进一步验证了中国细菌型豆豉和日本纳豆的渊源关系。对筛得的细菌和霉菌分别进行了 β -GC 活性检测, 分析了不同霉菌在豆豉发酵过程中的作用, 细分了豆豉、纳豆和中药淡豆豉的区别。借鉴日本纳豆和东南亚丹贝的发展模式, 指出了中国传统发酵豆类食品的主要缺点。有助于中国传统发酵豆类的相关健康功能性食品走向国际市场。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 测试的样本

豆豉的样本如表 1, 纳豆样本来自河北省科学院生物研究所。

1.1.2 试剂

牛纤维蛋白原(纯度 $\geq 98\%$, 都莱生物科技有限公司); 凝血酶(2000 U, 湖南一格制药有限公司); 牛肉膏、蛋白胨、琼脂(北京奥博星生物技术有限责任公司); 葡萄糖(天津市百世化工有限公司); 琼脂糖(上海麦克林生化科技股份有限公司); β -葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); 纯净水(娃哈哈集团有限公司); 0.22 μm 、0.45 μm 微孔滤膜(天津市科亿隆实验设备有限公司); 尿激酶(10 万 U, 天津生物化学制药有限公司)。

表 1 豆豉样本
Table 1 Samples of Douchi

编号	名称	产地	生产企业名称	原料	外观及颜色	内芯颜色	嗅味
1	阳江豆豉	广东阳江	广东阳帆食品有限公司	黑豆	黑色, 褶皱, 大多光滑, 个别有白色绒膜, 有盐, 密度小	褐色	豆豉味
2	太和豆豉	四川成都	成都太和坊酿造有限公司	黑豆	黑褐色, 有黏性发酵豆, 个别有白点, 有盐	深褐色	豆豉味
3	郑场豆豉	湖北仙桃	仙桃市六月曝豆豉制品有限公司	黑豆	黑色, 豆瓣状, 湿, 有辣椒和盐	深褐色	浓郁豆豉味
4	易门豆豉	云南玉溪	云南易门山里香食品有限公司	大圆粒青豆	豆豉与小米辣腌制, 青绿色, 表面光滑	绿色	香辣、豆瓣味
5	开元豆豉	湖北咸宁	通山县杨芳开元豆制品厂	黑豆	黑褐色, 褶皱扁豆, 表面光滑, 微盐	黑褐色	豆豉味
6	罗定豆豉	广东云浮	罗定泮江调味食品厂	黄豆	黄褐色, 饱满, 部分表面有不均匀黄色膜, 有盐, 半干	深褐色	微豆豉味
7	湖口豆豉	江西九江	九江石钟山豆制品有限公司	黑豆	黑色, 半干, 有褶皱, 表面光滑	黑褐色	浓郁豆豉味
8	哈尼豆豉	云南红河	金平诺玛养殖专业合作社	黄豆	与花椒、辣椒、食用盐等粉碎后的发酵豆碎块, 表面光滑, 半干, 微盐、辣	深褐色	浓郁豆豉味
9	潼川豆豉	四川绵阳	四川省三台县潼川农产品开发有限公司	黑豆	黄褐色, 半干, 表面有黄色膜, 有盐	深褐色	豆豉味
10	永川豆豉	重庆	重庆市永川区君意食品厂	黑豆	黑褐色, 有黏性发酵豆	黄褐色	豆豉味
11	灵溪豆豉	湖北黄石	湖北天天红食品有限公司	黄豆	黄褐色, 与辣椒、植物油、生姜、大蒜等腌制, 有油	黄褐色	香辣豆豉味
12	黄姚豆豉	广西昭平	昭平县黄姚镇郭氏天和豆豉	黑豆	黑色, 褶皱, 表面有淡淡的白色绒膜	黑色	豆豉味
13	陕南豆豉	陕西安康	陕南农家	黄豆	去皮黄豆瓣, 半干, 有辣椒和盐, 微酒味	深褐色	香辣豆豉味
14	寻百草豆豉	四川成都	四川寻百草药业有限公司	黄豆	黄豆颗粒完整, 个别裂开, 有白色膜, 无盐, 干燥	黄褐色	轻微豆豉味
15	念乡人干豆豉	湖南怀化	怀化新晃德元酱醋厂	黄豆	黄豆表面有膜, 盐咸, 半干	暗褐色	有微臭的豆豉味
16	古蔺干豆豉	四川泸州	农家手工豆豉	黄豆	发酵豆和辣椒香料等团成一个直径 4~5 cm 的球状, 干品, 有盐、辣味	红褐色	香料和辣椒混合的豆豉味
17	酱香豆豉	贵州黔南	贵州美之选食品有限公司	黄豆	黄豆表面有膜, 有盐, 半干	暗黄色	有微臭的豆豉味
18	土家风味豆豉(干豆豉)	重庆	重庆豆灵香食品开发有限公司	黄豆	黄豆表面有膜, 盐咸, 半干	暗褐色	有微臭的豆豉味
19	毛豆子咸菜	山东临沂	临沂市兰陵县小作坊制售	黄豆	发酵后表面覆盖淀粉, 半干, 有盐	白色	微豆豉味
20	纳豆冻干颗粒	河北石家庄	河北省科学院生物研究所自制	黄豆	发酵后黏连黄豆的干品	褐色	纳豆臭味

1.1.3 仪器

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); 纤溶酶测试平板(自制); P4 紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 豆豉样本的外观和嗅味检测

分别取样本 10~15 粒或者 3~5 g, 观察其外观颜色、黏

性和水分, 判断其原料的品类、形状和体积大小; 切开样本, 观察其内部颜色; 综合多人鼻、舌品鉴其嗅味的结果。

1.2.2 发酵微生物的筛选

称取豆豉样本 3~5 粒或者 1~2 g, 放入 50 mL 无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} 不同稀释浓度的悬液。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(potato dextrose agar, PDA)培养基和牛肉膏蛋白胨琼脂(beef extract peptone, PB)培养基 1:1 的混合平板上, 倒置放入 28 °C 恒温培养, 24~48 h 后, 分辨、观察并挑取单菌落。

1.2.3 菌株的鉴别和筛选

圆点状或者放射状的黏性单株菌苔, 涂玻片染色, 显微镜观察, 初步确定为细菌的单菌落, 菌株涂布于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基平板上, 将平板倒置放入 30 °C 恒温培养。如有不同形态、大小或颜色的多菌株混合存在, 再次重复 1.2.2 实验过程再涂布, 至细菌单菌落筛选完成。

有丝状或者孢子产生的, 初步确定为真菌的单菌落菌株, 用灭菌接种针挑取菌丝或者孢子, 涂布于马铃薯葡萄糖琼脂培养基平板上, 将平板倒置放入 28 °C 恒温培养, 如有细菌或者多种菌丝体生长, 再次重复 1.2.2 实验过程再涂布, 至真菌单菌落培养完成。

1.2.4 菌株的生长状态和菌株显微镜观察方法

取单菌落平板, 观察其菌苔的直径大小、外观和正反面的颜色等生长特点; 挑取菌苔涂布于玻片上, 用复红染色, 显微镜观察其菌株形态、大小以及繁殖分裂方式等特点。

1.2.5 菌株的基因鉴定方法

取单菌落的培养试管, 使用试剂盒方法分别对细菌、真菌提取 DNA, 分别利用上游引物 27F, 下游引物 1492R 或上游引物 TSI, 下游引物 TS4, 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增其 16S rDNA 序列, 采用凝胶电泳法进行 PCR 产物检测, 挑选出在琼脂糖凝胶电泳出现单一明亮条带的样品, 将其 PCR 产物送至华大集团检测有限公司进行测序工作, PCR 产物测序完成后, 进行 RNA 检测和结果比对, 最后获得 Blast 测序结果, 确定菌株的种属。

1.2.6 枯草芽孢菌株的纳豆发酵

取筛选的枯草芽孢类细菌菌株, 采用 PB 培养基液体基, 锥形瓶装量 100 mL/500 mL, 33 °C 恒温, 摇床转速 200 r/min, 培养时间 15 h, 得到种子液; 同纳豆制作工艺, 接入大豆中, 接种量 2% (m/m), 锥形瓶装量 100 g/500 mL, 固态发酵纳豆, 恒温 33 °C, 发酵时间 24 h, 得到发酵大豆样本。

1.2.7 溶酶活性的测试

取发酵大豆样本 4~5 粒, 在研钵内捣碎搅拌均匀, 精密称重 0.5~1.0 g, 加入 10 mL 无菌水, 摇匀 30 min, 自然沉淀, 取上层液体过 0.45 μm 滤膜, 滤液点样测试纤溶酶活性。改进版纤溶酶测试透明圈法测试, 对照标本为尿激酶^[12]。

1.2.8 β-GC 的测试

取筛选的细菌菌株, 采用 PB 液体培养基, 锥形瓶装量 100 mL/500 mL, 33 °C 恒温, 摇床转速 200 r/min, 培养时间 30 h, 发酵液自然沉淀, 取上清液过 0.45 μm 滤膜, 备用。

取筛选的真菌菌株, 采用 PDA 液体培养基, 装量 150 mL/500 mL, 28 °C 恒温, 摇床转速 140 r/min, 培养时间 72 h, 得到菌丝体发酵液, 过 0.45 μm 滤膜, 备用。

采用索莱宝 β-GC 检测试剂盒测定菌株培养液的 β-GC 活性, 其机制为对硝基苯-β-D-吡喃葡萄糖苷被 β-GC

分解后生成对硝基苯酚(p-nitrophenol, P-NP), 其吸光度在 400 nm 波长下灵敏度最高, 以标准曲线获得检测液体中的 β-GC 活性。

1.3 数据处理

实验样本的数据测试采用 3 个平行, 取平均值。菌株外观观察和嗅味鉴别采用 6 个平行。采用 Excel 2021 进行数据处理和制图, 软件 SPSS 26.0 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 豆豉样本的外观和嗅味检测结果

19 个豆豉样本均为地域性特产, 具有年代久远、工艺独特等特点。原料有黑豆和黄豆之分, 其中云南的易门豆豉是采用的大粒青豆品种, 不同于普通大豆; 阳江、湖口、潼川、开元和黄姚豆豉均为有褶皱的、单粒的黑豆发酵物; 成都寻百草、怀化念乡人、贵州黔南和重庆土家豆豉均为单粒的黄豆发酵物; 郑场、灵溪、永川和太和豆豉均为含水量较多的、多粒的、类似酱类的发酵物; 哈尼豆豉是碎大豆与其他辅料的发酵颗粒物; 陕南安康豆豉是不带皮的豆瓣发酵物; 四川古蔺豆豉是团成球状的、干燥的黄豆发酵物; 临沂的臭豆豉采用淀粉覆盖发酵豆, 其颗粒虽然含水量高, 但不黏连, 显白色。外观和嗅味的具体结果见表 1。所有豆豉均含盐, 其中单粒、黑豆型豆豉含盐量较低, 其含盐量最低的 3 个样本分别是: 黄姚豆豉<开元豆豉<湖口豆豉, 其他豆豉均含盐量较高; 四川古蔺、陕南安康、郑场、哈尼、灵溪和易门豆豉都含有辣椒辅料, 其中以四川古蔺辣味为最。纳豆冻干颗粒的发酵过程中没有添加任何无机盐类、香料类等辅料, 只具有纳豆的特殊微臭味。

2.2 样本中微生物的筛选结果

由表 2 中 19 个样本筛选菌株结果显示所有豆豉中均存在芽孢杆菌, 并且丰度最高, 其在 PB 培养平板上的菌苔特点是透明、褶皱、有黏性, 正反面均没有色素。显微镜下观察含有大量棒状杆菌和部分形成的芽孢; 个别样本含有另一株芽孢杆菌, 其菌苔正反面白色、有颗粒感, 无黏性, 菌苔平铺生长, 延展性强, 显微镜下也有大量芽孢和杆菌; 样本中筛得其他细菌还包括小球菌, 菌苔直径较小, 只有 1~2 mm, 显微镜下有双联或者四联存在。由少量样本中筛得的杆菌在 PB 培养基上生长无色、透明, 分泌大量黏液, 镜检不产芽孢, 体积小于先前的芽孢杆菌。这与 NAM 等^[13]的检测结果一致, 自然发酵的豆制品中未分类的芽孢杆菌和乳酸菌丰度最高。

筛得的真菌包括起始白色、黑色菌丝和青绿色孢子的霉菌, 确定为产菌丝的霉菌; 酵母菌株一般为白色的凸起菌苔, 镜检其菌株为不规则椭圆状, 远大于细菌, 形态特殊, 易分辨挑取单菌落。

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

编号	微生物的种类	菌株的生长状态和特点	菌株丰度/(CFU/g)	菌株编号
1	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, 多杆菌	1.23×10^9	1-1
2	1 株芽孢杆菌	白色颗粒感、平铺的菌苔, 延展性宽度在 8~12 mm	2.18×10^9	2-1
	1 株霉菌	菌苔绒状, 先白色菌丝, 逐渐黄绿色	1.65×10^2	2-2
3	1 株芽孢杆菌	白色、透明、有凸起的褶皱, 拉丝, 延展性宽度在 8~10 mm	3.67×10^8	3-1
	1 株酵母	白色、黏性菌苔, 梭状不规则菌体	1.20×10^6	3-2
4	1 株芽孢杆菌	透明、褶皱的菌苔, 黏性拉丝, 易挑取	3.33×10^8	4-1
	1 株球菌	圆球菌株, 双联或者四联, 微黄色素	2.21×10^3	4-2
5	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	5-1
	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	5-2
6	1 株芽孢杆菌	透明、黏性褶皱菌苔, 延展性强, 有个别芽孢两侧有黑色未脱离的杆菌菌体	2.10×10^9	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	1.67×10^5	7-1
7	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	7-2
	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	7-3
8	1 株芽孢杆菌	透明、有凸起的褶皱, 拉丝, 延展性宽度在 5mm	3.11×10^8	8-1
	1 株芽孢杆菌	白色、平铺的颗粒感菌苔, 延展性 10~12 mm	2.33×10^7	8-2
9	1 株芽孢杆菌	白膜、黏性菌苔, 边缘雪花状, 直径 5~8 mm	4.03×10^9	9-1
	1 株小球菌	透明、圆菌苔, 直径 1~2 mm, 双联球菌	1.10×10^5	9-2
10	1 株芽孢杆菌	不黏的平铺菌苔, 延展性 8~10 mm	2.89×10^9	10-1
	1 株霉菌	菌苔圆, 绒毛状白色菌丝	1.78×10^5	10-2
11	1 株芽孢杆菌	白色膜、褶皱、有黏性的菌苔, 延展性较小	4.37×10^8	11
12	1 株无芽孢杆菌	白色、透明、褶皱有黏性的菌苔, 短棒状杆菌, 延展性较小	2.00×10^9	12
	1 株长杆菌	透明、凸起, 菌苔有硬壳, 难挑取	3.63×10^8	13-1
13	1 株霉菌	黑色菌丝, 菌丝头部有黑色孢子产生	2.11×10^4	13-2
	1 株芽孢杆菌	白色、凸起褶皱, 延展性 5~10 mm	6.67×10^8	14-1
14	1 株霉菌	表面为青绿色孢子, 底部显黑色	3.22×10^4	14-2
	1 株芽孢杆菌	透明、凸起、黏性、褶皱菌苔, 延展性小, 短棒状杆菌	6.11×10^9	15-1
15	1 株芽孢杆菌	淡白色、颗粒感平铺菌苔, 延展性号, 长芽孢杆菌	1.22×10^4	15-2
	1 株酵母	白色、凸起菌苔, 有黏性, 显微镜观察为椭圆形, 体积大于芽孢杆菌	6.21×10^3	15-3
16	1 株杆菌	有一定黏性, 菌苔表面有水球, 易刮取	2.67×10^8	15-4
	1 株芽孢杆菌	白色、颗粒感、雪花状菌苔延展, 杆菌较多	1.00×10^6	16-1
17	1 株芽孢杆菌	透明、拉丝、黏、凸起菌苔, 芽孢较多	5.51×10^9	16-2
	1 株芽孢杆菌	表面褶皱, 拉丝, 黏, 菌苔厚, 芽孢杆菌	1.33×10^9	17-1
18	1 株芽孢杆菌	菌苔表面有硬颗粒, 内部不黏, 不拉丝。底部反面分泌黄褐色素	5.11×10^7	17-2
	1 株霉菌	圆菌苔, 长白色绒状菌丝, 逐步变黄, 最后产黑色孢子	7.82×10^2	17-3
19	1 株芽孢杆菌	透明、褶皱、有黏性的菌苔, 延展性较小; 菌株为棒状, 芽孢	1.33×10^9	18-1
	1 株酵母菌	白色, 凸起、褶皱、有黏性。菌株明显比细菌大, 型状椭圆, 无规则	6.51×10^3	18-2
20	1 株芽孢杆菌	菌苔有不规则颗粒凸起, 不易挑取, 菌苔底部产黄褐色素	1.00×10^8	18-3
	1 株杆菌	透明、凸起、褶皱菌苔, 延展性直径 2~4 mm; 芽孢和杆菌共存	2.00×10^9	19-1
19	1 株杆菌	白色, 菌苔面平, 微颗粒感, 延展性直径 8~12 mm; 芽孢多	2.25×10^8	19-2
	1 株真菌	白色菌丝, 毛绒状, 逐步变黄绿色, 产孢子	1.22×10^3	19-3
20	纳豆芽孢杆菌	菌苔褶皱, 黏性拉丝, 白色或透明, 菌苔延展性约 3~5 mm; 短棒状杆菌或芽孢	3.10×10^9	20

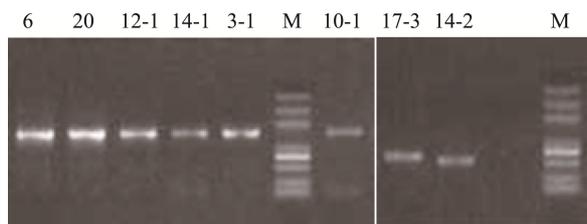
2.3 微生物的基因测序结果

从筛选得到的菌株中,进行了初步的纤溶酶活性测试,取其中 13 株活性较高的细菌、1 株菌苔特殊的细菌和 6 株霉菌进行了基因检测。细菌的引物采用 27F 和 1492R,真菌的引物采用 TSI 和 TS4。具体片段大小和序列见表 3,部分菌株 PCR 扩增后的琼脂糖凝胶电泳图谱如图 1, Blast 结果见表 4。

测序结果显示,具有纤溶酶活性的豆豉样本中丰度最高的细菌均为枯草芽孢杆菌,推测对应菌株具有分泌纤溶酶(同纳豆激酶)的生理功能;地衣芽孢杆菌的菌苔直径比枯草菌小,并且难挑取,菌苔底部产黄褐色色素,外观差异明显;在豆豉的样本中筛选的真菌有黄曲霉分离菌株、交链孢霉、黑曲霉和桔青霉。样本中霉菌发酵的太和豆豉,从中分离得到了米曲霉菌株,中药淡豆豉的“黄衣上遍”过程也是米曲霉发酵。米曲霉是中国传统酿造食品酱、酱油和腐乳等的主要菌种,可以分泌淀粉酶和脂肪酶等水解酶^[14]。米曲霉被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)和世界卫生组织列为食品级安全菌株(generally recognized as safe, GRAS)^[15],

表 3 引物信息表
Table 3 Primer information table

检测片段	引物名称	引物序列	片段大小 /bp
细菌 16S	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500
	1492R	TACGGCTACCTGTACGACTT	
真菌 18S	TS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	400~800
	TS4	TCCTCCGCTATTGATATGC	



注: M 从上到下依次为 5000、3000、2000、1000、750、500、250、100 bp。

图 1 部分菌株 PCR 扩增后的琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig.1 Agarose gel electrophoresis patterns of PCR amplification products of some strains

表 4 菌株测序在 Blast 结果
Table 4 Blast results of strain sequencing

菌株编号	类型	最高得分	总分	序列匹配度 /%	E 值	比对一致度 /%	序列号
1-1	枯草芽孢杆菌 KF24	2525	22674	100	0	100	CP126097.1
2-2	黄曲霉分离株 BSU-12	1046	1046	100	0	100	OQ438649.1
3-1	枯草芽孢杆菌 KF24	2449	22020	100	0	100	CP126097.1
4-1	枯草芽孢杆菌 1017105	2499	24963	100	0	100	CP121266.1
5-2	枯草芽孢杆菌 FA6	2521	20085	100	0	100	CP033198.1
6	枯草芽孢杆菌 LUB32	2449	2449	100	0	100	OR030442.1
8-1	枯草芽孢杆菌 KF24	2649	23787	100	0	100	CP126097.1
10-1	枯草芽孢杆菌亚种 str.168	2564	25537	100	0	100	CP053102.1
10-2	总状毛霉 C	1046	1046	100	0	100	MN315398099.1
11	枯草芽孢杆菌 DSM10	2475	24651	100	0	100	CP120681.1
12-1	枯草芽孢杆菌 1017105	2449	24464	100	0	100	CP121266.1
13-1	地衣芽孢杆菌 FA6	2521	20085	100	0	100	CP033198.1
13-2	黑曲霉 CBS513	1027	1027	100	0	100	MN39524627.1
14-1	枯草芽孢杆菌 KF24	2475	22225	100	0	100	CP126097.1
14-2	桔青霉 yx-001	1027	1027	100	0	100	MN826202.1
16-2	枯草芽孢杆菌 DSM1090	2649	26386	100	0	100	CP120622.1
17-3	交链孢霉分离株 HN3-1-3	1031	1031	100	0	100	OQ693917.1
19-1	枯草芽孢杆菌 NCIB3610	2571	25694	100	0	100	CP094361.1
19-3	黄曲霉分离株 S-324	1046	1046	100	0	100	OQ422947.1
20	枯草芽孢杆菌 ID-A05	2571	25572	100	0	100	CP066380.1

2006 年日本酿造学会认定为米曲霉是日本的“国菌”^[16]。样本中筛得的黑曲霉、交链孢霉和桔青霉属于伴随微生物,不是豆豉发酵的必须微生物。黑曲霉的糖化酶活性高,多用于淀粉原料的发酵,同时也有蛋白酶活性,是自然发酵制品中的常见菌株之一^[17]。由菌株鉴定结果可知,大多的细菌型豆豉,其发酵过程中会有伴生真菌的干扰和参与。豆豉发酵过程中影响其食品安全性的真菌有:(1)黄曲霉毒素问题。黄曲霉与米曲霉同属曲霉属黄绿组,在形态学和基因组学上高度相似,能否产黄曲霉毒素是区别的关键^[18];(2)伴生真菌分泌毒素。有的黑曲霉或者青霉菌株产赭曲霉毒素^[19]。

2.4 筛选菌株的发酵豆子样本的特点和纤溶酶活性测试结果

采用筛选的枯草芽孢杆菌复制纳豆的发酵过程,得到发酵大豆品,对其外观、嗅味、拉丝状态与纳豆进行了对比,其结果如表 5。采用纤维平板法测试了发酵产物的纤溶酶(纳豆激酶)活性,其结果见图 2。

采用从传统豆豉中筛得的枯草芽孢杆菌,与纳豆同样工艺发酵大豆,结果显示其发酵产物外观大多显黄褐色,有黏性、拉丝状态,有的嗅味与纳豆极度相似。本研究一直进行纳豆的发酵研究,对比了国内外纳豆芽孢杆菌的纤溶酶活性,发现鲜纳豆的纤溶酶活性大约在 8000~10000 U/g 之间。本研究筛得菌株的纤溶酶活性个别高于纳豆芽孢杆菌,比如 8-1 菌株;有几株与之持平,比如 12、19 菌株;还有几株稍低于纳豆芽孢杆菌,比如 1-1、4-1、13-1 和 14-1 菌株。比对菌株的基因检测结果,显示高纤溶

酶活性的菌株均为枯草芽孢杆菌,发酵产物的黏性与纤溶酶活性呈正相关性。很多中国地域性细菌型豆豉制作过程类似纳豆,只是发酵方法和工艺会稍微有些区别,但是整体工艺遵从如下步骤:蒸熟泡胀的大豆原料,在恒温或者一定湿度环境中,发酵 1~3 d,生成具有臭味和拉丝黏性的发酵豆^[20],然后再添加盐、辣椒或者香料等,附加形状加工、晾晒或炒制等干燥方法。日本的纳豆采用了简单而精细的发酵方法:菌株明确采用纳豆芽孢杆菌,归于枯草芽孢杆菌亚属;发酵温度 30~37 °C,湿度 ≥ 85%;发酵周期 24~30 h^[21]。没有地域性差别,工艺流程明晰,产品外观和质量标准易控。

2.5 筛选菌株的葡萄糖苷酶活性检测结果

以对硝基苯酚浓度(X)为横坐标,吸光度值(Y)为纵坐标,绘制对硝基苯酚标准曲线见图 3,6 株霉菌的 72 h 发酵液中含有的 β-GC 活性如图 4。如图 3 所示,对硝基苯酚标准回归方程为 $Y=0.009X-0.0003$,相关系数 r^2 为 0.9967,表明 P-NP 在浓度范围 5~100 nmol/L 呈良好的线性关系;如图 4 所示,筛选的霉菌菌株,在 PDA 培养基中液体培养后,其发酵液中均具有 β-GC 活性。其中黄曲霉属的 19-3 和 2-2 酶活性较高,14-2 的桔青霉低于 200 U/mL。豆豉样本中筛选的细菌大多为枯草芽孢杆菌,对比的检测发现:在 PB 培养基中进行液体培养后,其发酵液中均无 β-GC 活性。所以豆豉发酵过程中,大豆中的黄酮分解为苷元成分是由霉菌参与的,枯草芽孢杆菌类不分解黄酮苷,而是主要分泌蛋白酶,生成小分子蛋白和多肽。这也是两种高丰度菌群在豆豉发酵过程中的主要生物作用和分解功能。

表 5 筛选的枯草芽孢杆菌发酵大豆产物的对比
Table 5 Comparison of screened *Bacillus subtilis* fermented soybean products

菌株编号	菌株的种子液显微镜观察	外观	颜色	拉丝状态	嗅味
1-1	短小杆菌,极少芽孢	豆子表面有菌膜	黄色	有黏性,有拉丝	发酵豆味道
3-1	分散杆菌,无芽孢	豆子表面有菌膜	黄白色	微黏性,拉丝少	发酵豆味道
4-1	分散的杆菌,无芽孢	黄白色膜覆盖	黄褐色	黏性大,拉丝	纳豆特殊味道
5-2	短小的杆菌	黄白色膜覆盖	黄褐色	微黏性,拉丝少	发酵豆味道
8-1	发丝状长链杆菌,无芽孢	黄褐色菌膜覆盖	黄褐色	黏性大,拉丝多	浓郁的纳豆特殊味道
10-1	短小芽孢杆菌	豆子表面光滑	黄色	不拉丝,不黏	发酵味道
11	短小杆菌,极少芽孢	豆子表面有膜	黄色	无黏性,光滑	发酵味道
12-1	分散杆菌,有些在分裂过程,呈手榴弹型	黄白色膜覆盖	黄褐色	黏性大,拉丝	有纳豆特殊味道
13-1	分散杆菌	黄白色膜覆盖	黄褐色	黏性大,拉丝	有纳豆特殊味道
14-1	短小杆菌,有个别鼓包	黄白色膜覆盖	黄褐色	黏性大,拉丝	纳豆特殊味道
15-1	细长杆菌,无芽孢	表面有褶皱	黄色	稍有黏度,不拉丝	发酵豆味
16-2	散装杆菌,个别芽孢	豆子表面光滑	黄色	有黏度,拉丝	发酵豆味
19-1	短小的杆菌,个别弯曲	表面有皱	黄褐色	黏性大,拉丝	微臭的纳豆特殊味道
20	发丝状长链杆菌,无芽孢	黄白色皱覆盖	黄褐色	黏性大,拉丝	微臭的纳豆特殊味道

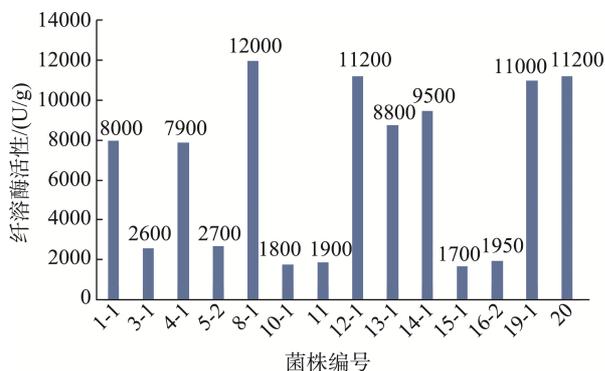


图 2 不同菌株发酵产物的纤溶酶活性

Fig.2 Plasmin activity of fermentation products of different strains

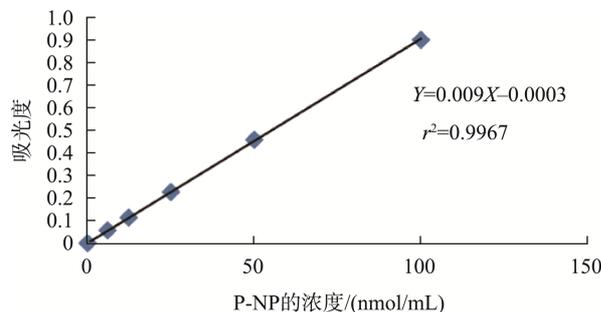


图 3 P-NP 浓度与吸光度关系曲线

Fig.3 Relationship between P-NP concentration and absorbance

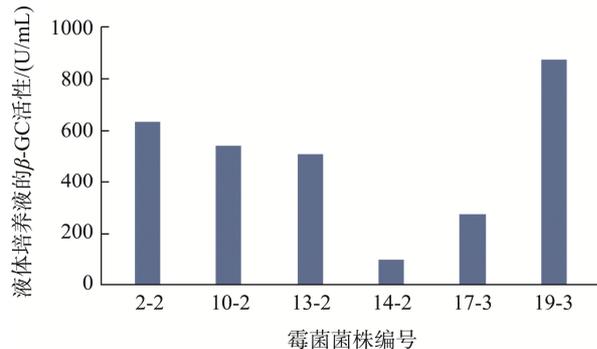


图 4 筛选的霉菌株发酵培养液的 β-GC 活性

Fig.4 β-GC activity of fermentation culture broth of selected mold strains

3 结论与讨论

豆豉样本中留存丰度最高的是枯草芽孢杆菌,这与徐菁雯等^[22]的枯草芽孢杆菌是豆豉核心细菌的检测结果相同;除了枯草芽孢杆菌等细菌,豆豉样本中留存最多的霉菌是米曲霉,归黄曲霉属,不产黄曲霉毒素,中药淡豆豉的“黄衣上遍”即是指米曲霉发酵;豆豉样本中的其他伴随、共存微生物如酵母和乳杆菌等,相对丰度较低;个别样本中或者农家自制豆豉中含有少量污染微生物,如大肠杆菌和球菌等。以枯草芽孢杆菌为核心菌株的细菌型豆豉,发酵过程多采用稻草或袋子包裹,湿度大、温度高、发酵

周期短,更适于枯草芽孢杆菌的生长繁殖,即使自然环境中的霉菌(米曲霉、毛霉等)同时参与发酵,由于通气量不足和湿度过大,使得霉菌在豆豉样本中也只是留存菌株,丰度较低;与之相反的是,霉菌型豆豉制备过程中,有的在熟化的大豆原料中添加面粉、藕粉等辅料,采用薄的、铺展的模式,提升了发酵过程的通氧量,利于霉菌生长。在此过程中由于温度和湿度稍低,枯草芽孢杆菌的繁殖速度只是相对低于细菌型豆豉,但是其丰度仍然较高,这与霉菌型豆豉样本的筛选结果显示一致。相比而言,霉菌型豆豉比细菌型豆豉的发酵方法更严苛,在发酵前期需要抑制细菌的过度繁殖,否则会发臭甚至失败,类似《齐民要术》中所述“节伤热,臭烂如泥,猪狗亦不食”^[23]。霉菌型豆豉的后发酵过程多样化,比如有高温密闭瓮中或者“七蒸七晒”^[24]。从细菌型豆豉分离的枯草芽孢杆菌与纳豆芽孢杆菌极度同源,其发酵产物与纳豆的外观、嗅味完全一致,甚至有些菌株分泌的纳豆激酶(纤溶酶)活性高于纳豆芽孢杆菌,从基因和发酵产物两个方面证明了日本纳豆与中国细菌型豆豉的具有同源性。筛得的枯草芽孢杆菌不分泌β-GC,而霉菌大多具有β-GC活性,使大豆原料中的黄酮苷分解为黄酮苷元,这是霉菌型豆豉的特征性产物,比如中药淡豆豉是以大豆苷元和染料木素为质量检测指标的^[25],同时可以推测细菌型豆豉和纳豆的黄酮苷元成分要低于霉菌型豆豉。

豆豉是中国的传统发酵食品,历史的悠久、人群的迁移和民族的融合使之具有地域性特点,自然发酵环境的变化更进一步加强了风味和成分的差别。虽然经典特色产品需要传承,但是也要重视原技术的问题和缺陷,比如自然环境菌株带来的食品安全风险,细菌型豆豉中有人发现了变形杆菌和不动杆菌等致病菌^[26],中药淡豆豉也多次检出金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌^[27]。纳豆和丹贝是两种具有世界声誉的发酵豆制品,分别是纳豆芽孢杆菌和少孢根霉菌的纯种发酵物^[28],其发酵成分的变化、菌株的生长状态均有精确的质量标准和鉴别方法,利于产品的质量控制和健康应用,分别成为具有溶解血栓和补充多肽维生素的健康食品^[29-30]。建议针对中国的豆豉,先筛选特征性的高质量菌株,建立不同类别豆豉的发酵菌种库,进行生物保存和菌种保护;再采用纯菌株培养,结合生物工程学优化豆豉的发酵水平。建立微生物明晰、质量指标精确的豆豉发酵工艺,开发高质量发酵豆制品食品或者中药产品,使豆豉走向世界的营养健康领域。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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质量的影响[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
- [3] 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.
- [4] 李梦茹, 杨文清, 李西西, 等. 丹贝酱的抗氧化活性及风味成分分析[J]. *中国调味品*, 2023, 48(4): 15-19.
LI MR, YANG WQ, LI XX, *et al.* Analysis of antioxidant activity and flavor components of tempeh paste [J]. *China Cond*, 2023, 48(4): 15-19.
- [5] 钟荣荣, 王奕博, 范亚楠, 等. 淡豆豉发酵过程中影响因素研究[J]. *中成药*, 2024, 46(3): 1041-1045.
ZHONG RR, WANG YB, FAN YN, *et al.* Study on the influencing factors in the fermentation process of *Semen Sojae Praeparatum* [J]. *Chin Tradit Patent Med*, 2024, 46(3): 1041-1045.
- [6] 董超, 孙劲冲, 李若楠, 等. 豆豉与淡豆豉的成分测试及微生物菌群分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(11): 154-163.
DONG C, SUN JC, LI RN, *et al.* Ingredient test and microbial flora analysis of the fermented soya bean and *Sojae Semen Praeparatum* [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(11): 154-163.
- [7] 梁明院. 唐大和上东征传校注[M]. 扬州: 广陵书社, 2010.
LIANG MY. The correct-annotation of Tang Dynasty Monk's eastern expedition [M]. Yangzhou: Guangling Book Publishing House, 2010.
- [8] 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.
- [9] 黑龙江省科学院应用微生物研究所. 发酵大豆-纳豆及其成分的保健功能[M]. 哈尔滨: 黑龙江人民出版社, 2005.
Institute of Applied Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences. Health benefits of fermented soybeans-Natto and its components [M]. Harbin: Heilongjiang People's Publishing House, 2005.
- [10] 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.
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.
- [11] AKBULUT AC, PAVLIC A, PETSOPHONSAKUL P, *et al.* Vitamin K2 needs an RDI separate from vitamin K1 [J]. *Nutrients*, 2020, 12(6): 1852.
- [12] 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.
- [13] NAM YD, YI SH, LIM SI. Bacterial Diver City of cheonggukjang, a traditional Korean fermented food, analyzed by barcoded pyrosequencing [J]. *Food Control*, 2012, 28: 135-142.
- [14] SHIN D, JEONG D. Korean traditional fermented soybean products [J]. *Ethn Foodas*, 2015, 2: 2-7.
- [15] EIJI ICHISHIMA. The most important microorganism *Aspergillus oryzae* for production of Japanese traditional foods [J]. *J Brew Soc Japan*, 2018, 113(10): 613-618.
- [16] JORGENSEN TR. Identification and toxigenic potential of the industrially important fungi, *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* [J]. *J Food Prot*, 2007, 70(12): 2916-2934.
- [17] 梁琦. 加味半夏曲的发酵工艺, 优势菌种分离、鉴定及纯种发酵研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019.
LIANG Q. Fermentation process of flavored *Pinellia koji*, isolation and identification of dominant strains and research on pure fermentation [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2019.
- [18] 刘震营, 张永清. 中药材黄曲霉毒素污染与防控[J]. *山东中医药大学学报*, 2021, 45(4): 547-553.
LIU ZY, ZHANG YQ. Aflatoxin contamination and prevention and control of Chinese medicinal materials [J]. *J Shandong Univ Tradit Chin Med*, 2021, 45(4): 547-553.
- [19] 杨美华. 中药中真菌及真菌毒素污染研究与对策[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2020.
YANG MH. Research and countermeasures on fungal and mycotoxin contamination in traditional Chinese medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2020.
- [20] 王浩宇. 细菌型豆豉的发酵工艺优化及风味品质形成研究[D]. 重庆: 西南大学, 2022.
WANG HY. Research on fermentation process optimization and flavor quality formation of bacterial tempeh [D]. Chongqing: Southwest University, 2022.
- [21] 许梦粤, 余金毅, 李慧, 等. 不同品种纳豆的多种功能活性成分比较[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(13): 140-149.
XU MY, YU JY, LI H, *et al.* Comparison of multiple functional active ingredients of different varieties of natto [J]. *Food Ind Sci Technol*, 2024, 45(13): 140-149.
- [22] 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.
- [23] 贾思懿. 齐民要术[M]. 北京: 中华书局出版社, 2015.
JIA SX. *Qimin Yaoshu* [M]. Beijing: Zhonghua Book Company Publishing House, 2015.
- [24] 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.
- [25] 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 [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
- [26] 于士军, 江隆, 柴新义, 等. 几种传统发酵豆豉细菌多样性分析[J]. 安庆师范大学学报, 2022(28): 78-84.
- YU SJ, JIANG L, CHAI XY, *et al.* Analysis of bacterial diversity of several traditional fermented tempeh [J]. J Anqing Norm Univ, 2022(28): 78-84.
- [27] 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.
- [28] AMADEUS DA, LORRAINE C, FLORENTINUS GW, *et al.* Tempeh: A semicentennial review on its health benefits, fermentation, safety, processing, sustainability, and affordability [J]. Comp Rev Food Sci Food Saf, 2021, 20(2): 1717-1767.
- [29] 陈杰鹏, 徐峰. 纳豆激酶生物活性及其应用研究[M]. 北京: 北京大学出版社, 2017.
- CHEN JP, XU F. Research on the biological activity and application of natto kinase [M]. Beijing: Peking University Press, 2017.
- [30] SAMURAILATPAM S, AMIT KR. Production of bioactivepeptides during soybean fermentation and their potentialhealth benefits [J]. Trends Food Sci Technol, 2016(10): 1-10.

(责任编辑: 蔡世佳 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