

淡豆豉炮制至“黄衣上遍”过程中 微生物菌群动态变化的初步研究

李刚¹, 龙凯², 苏明声¹, 梁永红¹, 杨安金³, 谢小梅^{1*}

(1. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;

2. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004; 3. 江西中医药大学附属医院, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**初步研究淡豆豉发酵炮制至“黄衣上遍”过程中微生物菌群种类和数量的动态变化,为探讨淡豆豉炮制机制奠定基础。**方法:**参照 2010 年版《中国药典》按本实验室优化的炮制工艺制备淡豆豉(制备工艺见文章中)。取发酵炮制至“黄衣上遍”过程中不同时间点的样品,分别用细菌、霉菌和酵母菌选择性培养基培养并分离纯化,进行菌落计数;同时对分离纯化的微生物用肉眼和镜检观察进行菌种的初步鉴定。**结果:**淡豆豉炮制至“黄衣上遍”过程中,随着炮制时间的延长,细菌、酵母菌、霉菌数量呈现上升趋势,各菌群在发酵前 4 d 均有明显上升,细菌菌落数量由 $1 \times 10^{3.2}$ CFU/mL 增长到 $1 \times 10^{10.6}$ CFU/mL,霉菌菌落数量由 $1 \times 10^{2.1}$ CFU/mL 增长到 $1 \times 10^{9.8}$ CFU/mL,酵母菌菌落数量由 0 增长到 $1 \times 10^{8.8}$ CFU/mL;发酵 4 d 以后,各菌群的数量变化平缓;发酵过程中细菌数量明显高于霉菌和酵母菌,优势细菌主要为革兰阳性杆菌,霉菌主要为曲霉和毛霉,酵母菌主要为子囊菌酵母。**结论:**淡豆豉炮制是多菌种混合发酵的过程,其种类、数量随着发酵时间不同发生了明显变化。

[关键词] 淡豆豉; 发酵炮制; 黄衣上遍; 菌群变化; 形态观察

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0139-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110139

Preliminary Study on Dynamic Change of Microbial Flora in Fermentation Process to ‘Yellow Cladding’ of Sojoe Semen Praeparatum

LI Gang¹, LONG Kai², SU Ming-sheng¹, LIANG Yong-hong¹, YANG An-jin³, XIE Xiao-mei^{1*}

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education of Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 2. College of Pharmacy of Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 3. Affiliated Hospital of Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the dynamic change of microbial flora species and quantity of Sojoe Semen Praeparatum in fermentation processing process to ‘yellow cladding’, in order to lay the foundation of discuss the mechanization of fermentation processing of fermented soybean. **Method:** Based on the 2010 edition of Chinese pharmacopoeia and according to optimized processing technology of own laboratory for Sojoe Semen Praeparatum soybean (processing technology in article), the sample in different processing time of fermentation process to ‘yellow cladding’ were taken, the bacterium, mould and saccharomycetes of selective medium were used to cultivate, separation and purification for colony count. Meanwhile eyes and microscope were used to preliminary evaluation culture. **Result:** The quantity of bacterium, mould and saccharomycetes with the increase of the fermentation time and rised in fermentation process to ‘yellow cladding’ of fermented soybean. Microflora had clear ascendant trend in four days of fermentation, quantity of bacterium from $1 \times 10^{3.2}$ CFU/mL growth to $1 \times 10^{10.6}$

[收稿日期] 20131225 (002)

[基金项目] 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ13615);江西中医药大学校级研究生创新专项项目(JZYC12C02)

[第一作者] 李刚, 硕士研究生, 从事中药药理学研究, E-mail: ligangjeff@sina.com

[通讯作者] * 谢小梅, 教授, 硕士研究生导师, 从事微生物学研究, Tel: 0791-87118707, E-mail: jxxm1964@sina.com

CFU/mL, quantity of mould from $1 \times 10^{2-1}$ CFU/mL growth to $1 \times 10^{9-8}$ CFU/mL, quantity of saccharomycetes from 0 growth to $1 \times 10^{8-8}$ CFU/mL. Four days later, the quantity of microflora change gentle. The quantity of bacterium is more than mould and saccharomycetes in fermentation processing process. Advantage bacteria is gram-positive bacilli. Mould is aspergillus and mucor. Saccharomycetes is ascomycetes. **Conclusion:** Fermented soybean processing can made from fermented multi-bacterium that its kind and quantity with the obvious changes have taken place in different fermentation time.

[**Key words**] Sojoe Semen Praeparatum; fermentation processing; yellow cladding; microflora changes; morphologic observation

淡豆豉是我国特有的经固态发酵制备的中药之一,以黑色种皮品系大豆为主要原料,桑叶、青蒿等药材配以其中进行发酵加工而成。为历版《中国药典》的收录品种。临床功效主治:解表、除烦、宣发郁热。用于感冒、寒热头痛,烦躁胸闷,虚烦不眠等^[1]。2010年版《中国药典》收录的淡豆豉制法为:大豆水浸→蒸制→药渣覆盖→闷使发酵→黄衣上遍→洗净→再闷→再蒸。淡豆豉的发酵炮制是自然发酵过程,并经历了较长的发酵时间,最终炮制成的淡豆豉拥有其特有的性、味和功能正是发酵过程中复杂的微生物群落的动态变化以及在微生物酶作用下发生生物转化产生了丰富的化学物质所致。迄今对淡豆豉发酵炮制过程中起关键作用的微生物学研究极少,查阅文献仅有 3 篇文章涉及参与淡豆豉发酵的菌种分离鉴定^[2-4]。由于淡豆豉的炮制过程是自然发酵,自然环境中的微生物种类繁多,而地区环境及气候的改变也会引起菌群的变化,导致参与淡豆豉发酵炮制过程的微生物菌群也有所差异,因此市场上销售的淡豆豉发酵程度不一,成品质量差而不稳、伪劣混杂等,根本达不到用药功效,直接影响临床用药的安全性和有效性。本课题组应江西中医药大学姚荷生研究室门诊部要求,自行研制的淡豆豉,近 3 年来一直为其提供质优、稳定的产品用于临床,疗效明显。本课题组前期参照 2010 年版《中国药典》^[5]确定了优化的发酵工艺并制备了质量好且稳定的淡豆豉(另文发表),因此本实验仅对淡豆豉发酵炮制至“黄衣上遍”过程中不同时间点的微生物菌群种类和数量的动态变化进行初步研究,意在分离鉴定淡豆豉炮制过程中的优势菌群,以便从微生物学角度更好地优化淡豆豉炮制工艺,为探讨淡豆豉发酵炮制机制以及质量标准的建立奠定基础。

1 材料

1.1 药材 黑大豆,桑叶(Folium Mori),青蒿(Herba Artemisiae Annuae)均购自安国冷背药材有限公司,由江西中医药大学附属医院杨安金主任中

药师鉴定,硫酸链霉素(南昌大学第二附属医院)。
1.2 仪器 MJ-150I 霉菌培养箱(上海一恒科技有限公司),DHG-9070 电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司),LRH-150 生化培养箱(上海一恒科技有限公司),MILLI-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。
1.3 培养基 脑心浸液肉汤培养基(20130909),酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(20130906),马铃薯葡萄糖琼脂培养基(20130807)均购自青岛海博生物技术有限公司。

1.4 培养基的配制^[6]

1.4.1 脑心浸液肉汤培养基(用于细菌的培养) 蛋白胨 10 g,脱水小牛脑浸粉 12.5 g,脱水牛心浸粉 5 g,氯化钠 5 g,葡萄糖 2 g,磷酸氢二钠 2.5 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1 000 mL,pH(7.4 ± 0.2),121 °C 高压灭菌 30 min。

1.4.2 酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(用于霉菌的培养) 葡萄糖 20 g,蛋白胨 20 g,酵母膏 10 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL。121 °C 高压灭菌 30 min,链霉素 40 mg(用时现加)。

1.4.3 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(用于酵母菌的培养) 马铃薯(去皮)200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1 000 mL。121 °C 高压灭菌 30 min,链霉素 40 mg(用时现加)。

2 方法

2.1 淡豆豉的制备 本实验室参照 2010 年版《中国药典》确定了优化的发酵炮制工艺并制备了质量好且稳定的淡豆豉。取桑叶 90 g,青蒿 100 g,分次加入约生药量的 18 倍水煎煮 3 次,每次 1 h,滤过,合并 3 次提取液,浓缩至约为 1 000 mL,将洗净的大豆 1 000 g 拌入药液中,药液吸尽后,豆粒充分饱胀为度。将豆粒置于蒸锅内,隔水蒸 1.5 h,取出,摊凉,置竹编中,用煎煮过的桑叶、青蒿渣覆盖,放入温度为(30 ± 2) °C 的培养箱内,进行自然发酵,定时翻动,使之发酵均匀,发酵 6 ~ 8 d 至“黄衣上遍”时终止发酵,取出(此过程为“黄衣上遍”阶段)。除去药渣,

洗去黄衣,置容器内(30 ± 2) °C再闷12~15 d,再闷期间每3 d倒出,翻动,稍晾干。至充分发酵,香气溢出时取出,略蒸,干燥,即为淡豆豉成品。

2.2 淡豆豉发酵炮制过程中不同时间点的取样与保存 本次实验仅对淡豆豉发酵炮制至“黄衣上遍”过程中的微生物学进行初步研究。药汁浸泡蒸煮后的大豆置适当容器内,“闷使发酵至黄衣上遍时”,此阶段每24 h取样1次;样品置于收集袋内后尽快置于4 °C冰箱保存,并于3 d内对其进行活菌计数,采样过程无菌操作。

2.3 微生物培养和菌落计数 将不同炮制时间点的样本1.0 g研磨好,置于灭菌的小锥形瓶中,加入9 mL无菌生理盐水包扎好,摇匀。吸取1 mL样液置于9 mL无菌水中,依次进行梯度稀释,将梯度稀释为 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} CFU/mL,然后根据每个取样时间点被检测的菌落数量变化情况选择合适的3个稀释梯度,用移液枪吸取100 μ L注入已倒好的培养基平板,均匀涂布,每个稀释度做3个平板。细菌置于温度为37 °C培养箱中培养1~2 d,酵母菌和霉菌置于25 °C培养箱中培养3~5 d,对细菌、霉菌和酵母菌进行菌落计数(每1 mL原菌液活菌数=同一稀释度3个平皿菌落平均数 \times 稀释倍数 \times 10)。

2.4 微生物的纯化及保存 挑取平板上不同的单一菌落划线分离、培养,将纯化后的单一菌落挑出放置于无菌EP管中保存于4 °C冰箱。并尽快对其进行菌种的初步鉴定。

2.5 优势菌种的初步鉴定 将上述保存的已纯化的微生物分别活化、培养,并分别进行菌落的肉眼形态观察和镜检观察(霉菌主要观察孢子的形态特征以及繁殖方式、酵母菌主要观察其形态特征以及芽殖方式),细菌行常规革兰染色镜检。

3 结果

3.1 淡豆豉炮制过程中的“黄衣上遍” 淡豆豉发酵炮制至第2天时,豆粒表面开始长出菌丝,第4天时,菌丝布满豆粒表面,黄衣开始出现,发酵至第6天时,黄衣上遍豆粒表面。

3.2 淡豆豉发酵炮制至“黄衣上遍”过程中各菌群菌落数量的变化情况 从表1可知,细菌、霉菌和酵母菌的菌落数量随着发酵时间的延长而呈现上升趋势;细菌菌落数在发酵第4天时达到了 $1 \times 10^{10.6}$ CFU/mL,霉菌菌落数达到了 $1 \times 10^{9.8}$ CFU/mL,酵母菌菌落数达到了 $1 \times 10^{8.8}$ CFU/mL;4 d后各菌群的

菌落数量变化趋势减小,到第6天时,细菌菌落数下降到 $1 \times 10^{10.1}$ CFU/mL,霉菌菌落数基本无变化为 $1 \times 10^{9.9}$ CFU/mL,酵母菌菌落数为 $1 \times 10^{9.4}$ CFU/mL。发酵过程中细菌数量明显多于霉菌和酵母菌,发酵后期酵母菌数量逐渐降低并低于细菌和霉菌。可见淡豆豉的发酵炮制过程是微生物菌群数量的动态变化过程。

表1 不同发酵炮制时间点各菌群的菌落数量 CFU/mL

发酵时间/d	细菌	霉菌	酵母菌
0	$1 \times 10^{3.2}$	$1 \times 10^{2.1}$	0
1	$1 \times 10^{6.7}$	$1 \times 10^{4.3}$	$1 \times 10^{5.8}$
2	$1 \times 10^{8.7}$	$1 \times 10^{5.6}$	1×10^6
3	$1 \times 10^{9.2}$	$1 \times 10^{8.2}$	$1 \times 10^{8.4}$
4	$1 \times 10^{10.6}$	$1 \times 10^{9.8}$	$1 \times 10^{8.8}$
5	$1 \times 10^{11.9}$	$1 \times 10^{9.4}$	$1 \times 10^{8.9}$
6	$1 \times 10^{10.1}$	$1 \times 10^{9.9}$	$1 \times 10^{9.4}$

3.3 淡豆豉发酵炮制至“黄衣上遍”过程中优势细菌——细菌的菌落形态及革兰染色 发酵至“黄衣上遍”过程中,出现了多种不同形态的细菌菌落见图1。我们挑选出10种优势细菌菌落并进行革兰染色初步鉴定,结果显示优势细菌主要为革兰阳性杆菌。见表2。

表2 优势细菌菌落的肉眼观察以及革兰染色

菌落编号	菌落/mm	形状	颜色	边缘	表面	革兰染色
1	2	圆形	乳白	规则整齐	光滑湿润	阳性杆菌
2	4	圆形	微黄	波形	光滑湿润	阳性杆菌
3	5	中心折皱	白色	齿状	干燥粗糙	阳性杆菌
4	2	圆形	白色	较厚	中间凸起	阳性杆菌
5	3	圆形	乳白	波形	光滑整齐	阳性杆菌
6	3	圆形	微黄	波形	光滑整齐	阳性球菌
7	5	中间凸起	白色	不规则	干燥粗糙	阳性杆菌
8	4	平坦	微白透明	不规则	光滑湿润	阳性杆菌
9	1	低凸	白色	较厚	波形	阴性杆菌
10	4	不规则	微白	光滑整齐	平整湿润	阳性杆菌

3.4 淡豆豉发酵炮制至“黄衣上遍”过程中优势霉菌的菌落形态及镜检 发酵至“黄衣上遍”过程中出现了不同形态的霉菌菌落,挑选出了10种在此发酵阶段处于优势的菌落进行光学显微镜观察。分离的典型霉菌菌落形态见图2,孢子及菌丝显微观察结果见图3,表明参与此阶段发酵的霉菌主要是曲霉和毛霉属真菌。



图 1 37 °C 培养 24 h 后部分优势细菌菌落



图 2 25 °C 培养 3~5 d 后的部分优势霉菌菌落



图 3 霉菌镜检(×100)

3.5 淡豆豉发酵炮制至“黄衣上遍”过程中优势酵母菌的菌落形态及镜检 发酵至“黄衣上遍”阶段出现了不同形态的酵母菌菌落,挑选出了 10 种在此发酵阶段处于优势的菌落进行显微镜观察。分离的典型酵母菌落形态见图 4,结果显示参与此阶段发酵过程的酵母菌主要是子囊菌酵母。



图 4 25 °C 培养 3~5 d 后的部分优势酵母菌菌落

4 讨论

已有研究表明,淡豆豉中主要活性成分为大豆异黄酮,含有 12 种异黄酮类组分,分为游离型的苷元和结合型的糖苷两类异黄酮类物质,其中游离型

苷元较之结合型糖苷具有更强的生物活性^[7]。淡豆豉炮制过程化学成分的变化总体上主要是由苷向苷元转化的过程,可能是发酵过程中微生物产生 β -葡萄糖苷酶使大豆异黄酮糖苷转化为游离苷元^[8]。然而迄今对淡豆豉发酵炮制过程中起关键作用的微生物学研究极少。本实验室参照 2010 年版《中国药典》确定了优化的发酵工艺并制备了质量好且稳定的淡豆豉,鉴于淡豆豉炮制过程的复杂性,本次实验仅对淡豆豉发酵炮制至“黄衣上遍”过程中的微生物学进行了初步研究。

结果表明,淡豆豉发酵炮制至“黄衣上遍”过程中,微生物种类和数量丰富,细菌、酵母菌、霉菌数量随着发酵时间的延长而呈上升趋势;各菌群的菌落数在发酵前 4 d 均有明显上升的趋势,发酵 4 d 以后,各菌群的数量变化平缓;发酵过程中细菌数量明显高于霉菌和酵母菌;发酵过程中优势细菌主要为革兰阳性杆菌,霉菌主要为曲霉和毛霉,酵母菌主要为子囊菌酵母。本实验仅对淡豆豉发酵炮制至“黄衣上遍”阶段的微生物学做了初步分析,对于复杂而丰富的微生物菌群种类和数量的准确鉴定及整个发酵炮制过程中微生物及其产生的酶以及酶与化学成分之间的动态变化有待于本实验室进一步研究。

[参考文献]

- [1] 李娜,黄庆柏. 淡豆豉中的异黄酮成分及药理作用与临床应用[J]. 中国现代中药,2008,10(7):18.
- [2] 李华,冯凤琴,沈立荣,等. 淡豆豉优势菌株的鉴定及其对大豆蛋白质的分解作用[J]. 食品与发酵工业,2011,37(1):1.
- [3] 汪孟娟,熊顺强,陈廷涛,等. PCR-DGGE 监测豆豉制曲过程中菌群的动态变化[J]. 南昌大学学报:理科版,2010,34(6):571.
- [4] 蔡琨,田维毅,韩洁,等. 中药淡豆豉高效发酵菌株的筛选[J]. 内蒙古中医药,2010,29(24):51.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,2010:308.
- [6] 姚万春,唐玉明,任道群,等. 白酒曲药微生物分离培养基的选择研究[J]. 酿酒,2011,38(3):39.
- [7] 刘清,徐风华,李永生. 优化 HPLC 法测定淡豆豉中大豆异黄酮的含量[J]. 中华中医药学刊,2012,30(1):182.
- [8] 高荣海,张春红,赵秀红,等. 大豆异黄酮研究进展[J]. 粮食与油脂,2009,23(5):1.

[责任编辑 聂淑琴]