

Biolog 技术监测淡豆豉发酵炮制过程中微生物种类动态变化

朱海针¹, 龙凯², 梁永红¹, 苏明声¹, 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)

[摘要] **目的:**监测淡豆豉发酵炮制过程中微生物种类动态变化,为揭示淡豆豉炮制机制提供参考。**方法:**采用 Biolog 微生物自动鉴定系统对从不同发酵时间点淡豆豉样品中分离出的优势细菌、酵母菌和霉菌进行鉴定。**结果:**在整个发酵炮制过程中,枯草芽孢杆菌为主要优势细菌。发酵第3天优势细菌以枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌为主,优势霉菌为黄曲霉、寄生曲霉,优势酵母菌是汉氏德巴利氏酵母。发酵第6天细菌种类增多,出现了枯草芽孢杆菌、松鼠葡萄球菌、抗辐射不动杆菌、铅黄肠球菌,霉菌为寄生曲霉,酵母菌为汉氏德巴利氏酵母、瘦果红酵母和白吉利丝孢酵母 A。“再闷”3 d 优势细菌为枯草芽孢杆菌、赫氏埃希菌,优势霉菌为黑曲霉,优势酵母菌为瘦果红酵母。“再闷”15 d 优势细菌为枯草芽孢杆菌和产酸克雷伯菌,未见霉菌出现,酵母菌以海隐球酵母和罗伦隐球酵母占优势。**结论:**淡豆豉发酵炮制过程中出现了微生物菌群此消彼长的动态变化,枯草芽孢杆菌作为优势菌种始终参与。

[关键词] 淡豆豉; Biolog 技术; 优势细菌; 优势霉菌; 优势酵母菌

[中图分类号] R283.4;R943.1;R284.1;R372 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0014-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015170014

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150713.1504.010.html>

[网络出版时间] 2015-07-13 15:04

Dynamic Change Monitoring of Microbe Species in Fermentation Process of Sojoe Semen Praeparatum by Biolog Microbial Identification System ZHU Hai-zhen¹, LONG Kai², LIANG Yong-hong¹, SU Ming-sheng¹, XIE Xiao-mei^{1*} (1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 2. College of Pharmacy, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To reveal processing mechanism of Sojoe Semen Praeparatum by monitoring dynamic change of microbe species in its fermentation process. **Method:** Biolog microbial identification system was used to identify dominant bacteria, moulds and yeasts, which isolated from Sojoe Semen Praeparatum at different fermentation time points of fermentation process. **Result:** *Bacillus subtilis* was dominant bacterium in the whole fermentation process. Dominant microorganisms were *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *Debaryomyces hansenii* C in the 3 th day of fermentation. Dominant microorganisms were *B. subtilis*, *Staphylococcus sciuri*, *Acinetobacter radioresistens*, *Enterococcus casseliflavus*, *A. parasiticus*, *D. hansenii* C, *Rhodotorula acheniorum* and *Trichosporon beigelii* A in the 6th day of fermentation. Dominant microorganisms were *B. subtilis*, *Escherichia hermannii*, *A. niger* and *R. acheniorum* in the 3 th day of 'secondary fermentation'. Dominant microorganisms were *B. subtilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Cryptococcus marinus* and *C. laurentii*, no mould appeared in the 15th day of 'secondary fermentation'. **Conclusion:** Dynamic changes of microbial flora occurs in the whole fermentation process. *B. subtilis* is dominant bacterium in the whole process.

[收稿日期] 20141219(020)

[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(JZYC14C02);江西省研究生创新专项(YC2014-S282);江西中医药大学校级研究生创新专项(JZYC14A03)

[第一作者] 朱海针,在读硕士,从事微生物学研究,Tel:13170916841,E-mail:704672457@qq.com

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

[Key words] Sojæ Semen Praeparatum; Biolog technology; dominant bacteria; dominant moulds; dominant yeasts

淡豆豉以黑大豆为主要原料,配以桑叶、青蒿等辅料,经发酵炮制而成。其应用历史悠久,具有解表、除烦、宣发郁热之功效^[1],收载于历版《中国药典》。淡豆豉经自然发酵炮制而成,发酵时间较长,整个发酵炮制过程出现了微生物此生彼长的现象,得到的淡豆豉气香,味微甘,表面黑色,皱缩,质柔软,断面棕黑色。研究表明发酵炮制会使黑大豆中主要活性成分大豆异黄酮由结合型的糖苷转化为生理活性更强的游离型苷元。推测发酵炮制过程中微生物及其产生酶的作用使淡豆豉形成了特有的性味和功能。

微生物是淡豆豉发酵炮制的核心,但迄今对其研究甚少,仅少数文献涉及炮制过程中微生物的分离和鉴定^[2]。前期已优化淡豆豉的炮制工艺^[3],规范化的淡豆豉炮制工艺包括蒸煮、“黄衣上遍”、“再闷”等环节。在此基础上,本实验应用 Biolog 微生物自动鉴定系统在种的水平上监测淡豆豉发酵炮制过程中微生物种类动态变化,为探讨淡豆豉发酵炮制机制提供参考。

1 材料

GEN III OmniLog 型全自动微生物鉴定系统,BUG 培养基,BUY 培养基,IF-A 接种液,IF-B 接种液,GEN III 板,YT 鉴定板,FF 鉴定板均购自美国 Biolog 公司;MJ-150I 型霉菌培养箱(上海一恒科技有限公司),DHG-9070 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司),Milli-Q 型超纯水仪(美国 Millipore 公司),琼脂(北京索莱宝科技有限公司,批号 707C038),麦芽提取物(英国 Oxoid),水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

淡豆豉(自制,经江西中医药大学范崔生教授鉴定为豆科植物大豆 *Glycine max* 的成熟种子的发酵加工品),从不同发酵炮制时间的样品中分离出了细菌、霉菌、酵母菌,并尽可能多挑出形态不同菌落,取菌落、菌株形态相似且出现频率多的微生物作为优势菌种进行纯化^[4],4℃保存备用。挑选的菌种见表1。

2 方法与结果

2.1 培养基配制

2.1.1 BUG 培养基 称取 BUG 培养基 57 g,加水定容至 1 L,加热溶解,用 NaOH 和浓 HCl 调 pH 7.2(25℃),121℃高压灭菌 20 min,冷却,倒平板备用。

表1 淡豆豉不同发酵时间点样品中分离纯化的菌株

Table 1 Dominant microorganisms isolated from Sojæ Semen Praeparatum at different fermentation time points

发酵时间/d	细菌	霉菌	酵母菌
0	X1	无	-
3	X2, X3	M1, M2	J1
6	X1, X4, X5, X6, X7	M3	J2, J3, J4, J5
“再闷”3	X1, X8	M4	J6
“再闷”15	X1, X9	-	J7, J8

2.1.2 BUY 培养基 称取 BUY 培养基 60 g,加水定容至 1 L,加热溶解,用 NaOH 和浓 HCl 调 pH 5.6(25℃),121℃高压灭菌 20 min,冷却,倒平板备用。

2.1.3 2% 麦芽汁琼脂培养基 称取牛津麦芽汁提取物 20 g 和琼脂 18 g 置于容器中,加水至 1 L,煮沸溶解,冷却后用 NaOH 和浓 HCl 调 pH 5.5(25℃),121℃高压灭菌 20 min^[5]。

2.2 接种液配制 量取水 1 L,加热至沸腾,加入吉冷胶 2.5 g 和聚山梨酯 40 0.3 g,搅拌至完全溶解后分装,高压灭菌,即得 FF-IF 接种液^[5]。细菌用 Biolog 专用的 IF-A,IF-B 接种液;酵母菌用无菌水作为接种液;霉菌使用 FF-IF 接种液。

2.3 富集培养 在超净工作台内,将细菌接种至 BUG 培养基,酵母菌接种至 BUY 培养基,霉菌接种至 2% 麦芽汁琼脂培养基培养 1~2 代。细菌在 37℃ 恒温培养 12~24 h,酵母菌在 26℃ 培养 2~3 d,霉菌在 26℃ 培养 3~5 d,直到长出孢子。

2.4 配制菌悬液 打开浊度计,分别用细菌、酵母菌、霉菌标准比浊管校准浊度。将空白接种管插入浊度计,调整浊度计使透光率达 100%。用无菌棉签将细菌挑到 IF-A 接种液中配成透光率 95% 的菌悬液,将酵母菌挑到无菌水中配成透光率 47% 的菌悬液,将霉菌孢子加到 FF-IF 接种液中配成 75% 的菌悬液。

2.5 接种至鉴定板 将 GEN III, YT, FF 鉴定板从冰箱取出,于室温平衡。制备好浊度的菌悬液倒入 V 型加样槽,使用八通道加样器将细菌悬液接种至 GEN III 板,酵母菌接至 YT 板,霉菌接至 FF 板,接种量均为 100 μL。

2.6 培养读数 将已加样的 GEN III 板在 OmniLog 型全自动微生物鉴定系统上培养,设置系统在 33℃

下 22 h 内连续读数;YT 板,FF 板放置 26 ℃ 培养箱, YT 板培养 72 h, FF 板培养 120 h, 每 24 h 在 Microstation 主机读数,一旦获得了鉴定结果,就不需要再读板。

2.7 微生物鉴定 试验结果主要有 3 个参数,即相似性、位距和可能性。相似性表示测试结果与数据库相应数据条的相似程度,位距表示测试结果与数据库相应数据条的距离。根据培养时间的不同,达到可靠鉴定结果所要求的相似性和位距值不同,系统会自动分析得出种名。

2.7.1 优势细菌 结果见表 2。优势细菌分别为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*), 松鼠葡萄球菌 (*Staphylococcus sciuri*), 抗辐射不动杆菌 (*Acinetobacter radioresistens*), 铅黄肠球菌 (*Enterococcus casseliflavus*), 赫氏埃希菌 (*Escherichia hermannii*) 和产酸克雷伯菌 (*Klebsiella oxytoca*)。

表 2 淡豆豉发酵炮制过程中优势细菌鉴定

Table 2 Dominant bacteria identification in fermentation process of Sojoe Semen Praeparatum

代码	相似性	位距	可能性	菌种
X1	0.646	5.164	0.758	<i>Bacillus subtilis</i>
X2	0.533	4.658	0.790	<i>B. subtilis</i>
X3	0.511	4.830	0.766	<i>B. amyloliquefaciens</i>
X4	0.773	3.053	0.773	<i>Staphylococcus sciuri</i>
X5	0.502	4.061	0.706	<i>B. subtilis</i>
X6	0.598	3.939	0.823	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
X7	0.579	2.888	0.729	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
X8	0.806	2.663	0.994	<i>Escherichia hermannii</i>
X9	0.671	4.490	0.974	<i>Klebsiella oxytoca</i>

2.7.2 优势霉菌 霉菌鉴定结果见表 3。与系统提供的数据库图片比对一致,优势霉菌分别为寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*), 黄曲霉 (*A. flavus*), 黑曲霉 (*A. niger*)。

表 3 淡豆豉发酵炮制过程中优势霉菌鉴定

Table 3 Dominant moulds identification in fermentation process of Sojoe Semen Praeparatum

代码	相似性	位距	可能性	菌种
M1	0.709	4.316	0.991	<i>Aspergillus parasiticus</i>
M2	0.764	3.370	0.985	<i>A. flavus</i>
M3	0.828	2.518	0.995	<i>A. parasiticus</i>
M4	0.798	2.821	0.989	<i>A. niger</i>

2.7.3 优势酵母菌 对于 YT 鉴定板,培养 24 h

后,只有当相似度指数 > 0.75,鉴定结果才能被接受;而培养 48 h 或 72 h 后,当相似度指数 > 0.5 时,鉴定结果才能被接受。结果见表 4。优势酵母菌分别为汉氏德巴利氏酵母 (*Debaryomyces hansenii* C), 瘦果红酵母 (*Rhodotorula acheniorum*), 白吉利丝孢酵母 A (*Trichosporon beigeli* A), 海隐球酵母 (*Cryptococcus marinus*), 罗伦隐球酵母 (*C. laurentii*)。

表 4 淡豆豉发酵炮制过程中优势酵母菌鉴定

Table 4 Dominant yeasts identification in fermentation process of Sojoe Semen Praeparatum

代码	相似性	位距	可能性	菌种
J1	0.548	6.182	0.911	<i>Debaryomyces hansenii</i> C
J2	0.552	7.041	0.999	<i>Rhodotorula acheniorum</i>
J3	0.506	4.901	0.745	<i>Trichosporon beigeli</i> A
J4	0.525	6.793	0.927	<i>R. acheniorum</i>
J5	0.637	3.212	0.899	<i>D. hansenii</i> C
J6	0.812	2.817	1.000	<i>R. acheniorum</i>
J7	0.594	4.976	0.881	<i>Cryptococcus marinus</i>
J8	0.753	3.253	0.961	<i>C. laurentii</i>

3 讨论

Biolog 微平板由对照孔和 95 孔不同单一碳源孔组成,以纯培养微生物的“代谢指纹”图谱为基础,与计算机的数值分类和聚类分析相结合,根据已有的菌种库资料,获得微生物的分类鉴定。与以往偏重于表型特征的传统微生物鉴定方法相比,该技术具有快速、简便、测试程序标准化等优点^[6]。

本文研究结果表明不同发酵炮制时间点出现的优势微生物种类不同,枯草芽孢杆菌在发酵前就存在,可能由环境中带入,并作为优势菌种在淡豆豉发酵炮制过程中始终参与,而且是“再闷”过程后残余的主要菌种之一。

枯草芽孢杆菌在生长过程中大量消耗游离氧,可能对“再闷”环节的厌氧环境形成有利;与解淀粉芽孢杆菌产生的豆豉纤溶酶具有显著的溶栓作用。枯草芽孢杆菌与黑曲霉为目前已确定的淡豆豉发酵菌种^[2],汉氏德巴利氏、海隐球酵母、罗伦隐球酵母发酵过程中会产生酒精,可能与淡豆豉香味有关。微生物在淡豆豉发酵炮制过程中所产生的多种酶类有利于发酵体系中大豆、桑叶、青蒿所含多种大分子物质的降解。尽管益生微生物在淡豆豉发酵过程中占据了优势地位,但一些有害微生物也存在于发酵过程中,如黄曲霉、寄生曲霉,在自然条

件下极易被污染或带入。而松鼠葡萄球菌、抗辐射不动杆菌、赫氏埃希菌、铅黄肠球菌、瘦果红酵母、白吉利丝孢酵母 A 等未见其在发酵中作用的相关报道。

淡豆豉炮制经自然发酵而成,参与发酵的微生物种类极其复杂。本文采用 Biolog 技术进行优势菌种鉴定,均从种的水平上鉴定出结果。但该技术也存在一定局限性,其适用于一定温度(26, 33 ℃)和普通有氧条件下对可培养菌种的鉴定,对于淡豆豉炮制过程中存在的耐热菌、厌氧菌、不可培养菌等难以鉴定。本文探索了淡豆豉炮制过程中菌群种类的动态变化,但仍需结合变性梯度凝胶电泳、逆转录-聚合酶链反应等技术全面分析淡豆豉发酵体系中微生物菌群种类和数量的变化情况,同时对优势菌种在淡豆豉炮制中的作用有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:308.
- [2] 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):51,57.
- [3] 李刚,梁永红,龙凯,等. 再闷过程影响淡豆豉炮制工艺研究[J]. 中草药,2014,45(8):1083-1088.
- [4] 李刚,龙凯,苏明声,等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(11):139-142.
- [5] 张朝正,郭兰珍,黎明,等. Biolog 微生物鉴定系统中接种液的替代[J]. 生物技术通讯,2009,20(6):836-838.
- [6] 陈晓斌,张炳欣,楼兵干,等. BIOLOG 系统鉴定黄瓜根围促生菌的初步研究[J]. 微生物学通报,2000,27(6):403-407.

[责任编辑 刘德文]

《中国实验方剂学杂志》声明

本刊近期发现有某些网站使用类似本刊网站的域名,冒用本刊名义,骗取审稿费及版面费。

现本刊郑重声明:①本刊不会以任何名义收取任何审稿费。

②<http://www.syfxzz.com> 为本刊唯一域名。

对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不正当行为,本刊将通过法律程序进行维权。