

# 豆豉生产中高大毛霉和纳豆芽孢杆菌 HT8 共发酵条件研究\*

方雅洁, 和七一, 陈治霖, 陈斌

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆高校生物活性物质工程研究中心 活性物质生物技术教育部工程研究中心, 重庆 401331)

**摘要:**通过实验室人工模拟条件,以豆豉感官、生长和纳豆激酶活性作为评判标准,首先采用单因素实验探索了豆豉生产中高大毛霉和纳豆芽孢杆菌 HT8 共发酵的接种量、菌种比例、接种时间和发酵温度 4 个单因素的最佳条件,然后通过正交实验探索了这 4 个因素的联合最佳条件。结果表明,高大毛霉和纳豆芽孢杆菌共发酵的最佳接种量为 4%,菌种比例为 10:1,培养温度为 25℃,发酵时间为 56 h;在此条件下毛霉生长繁茂,豉香浓郁,且纳豆激酶活力达 1 092.71 IU·mL<sup>-1</sup>。高大毛霉和纳豆芽孢杆菌 HT8 混合发酵在保持豆豉原有风味的同时丰富了发酵产生的蛋白酶系,使之具有纳豆激酶活性,为新型保健食品的开发提供了新思路。

**关键词:**豆豉生产;纳豆芽孢杆菌 HT8;高大毛霉;共发酵;纳豆激酶

**中图分类号:**Q503;Q556

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-6693(2015)04-0131-05

豆豉,始创于中国,在古代被称为幽菽,也被称为为大苦、荫豉、嗜<sup>[1]</sup>,富含丰富的蛋白质和人体所需维生素及氨基酸,营养价值高。豆豉食药两用<sup>[2]</sup>,不仅是大众消费的豆制品,也是一味中药,有开胃增食、消食化滞、发汗解表、除烦平喘、驱风散寒之功效<sup>[3]</sup>。近些年的研究发现,豆豉还具有抗癌、抗菌、抗氧化、降血压、降血糖、抗衰老痴呆症等生理功能特性<sup>[4]</sup>。因此,豆豉对国内饮食文化和医疗保健品的开发都发挥了重大作用<sup>[5]</sup>,并日益引起国内外消费者及食品、医学界甚至工业界的广泛关注。

中国豆豉按使用的微生物不同,大致可分为 3 个大类:传统毛霉型发酵豆豉、曲霉发酵豆豉及细菌型发酵豆豉。目前中国广泛食用的豆豉常用毛霉进行发酵,毛霉发酵生产的豆豉具有霉系丰富,水解蛋白质无苦味等优点,发酵中还能产生出一些烃、醇、酯、酸等芳香物质,因而具有浓郁的醇香和酯香<sup>[6]</sup>。纳豆是日本传统的大豆发酵食品,由纳豆芽孢杆菌在一定温度、湿度下发酵蒸煮大豆制备而成<sup>[7]</sup>。研究表明,纳豆激酶能够有效地清除人体血液内的血栓<sup>[8]</sup>,防止心脑血管堵塞<sup>[9]</sup>,具有降血压<sup>[10]</sup>、抗菌等作用;还可预防骨质疏松、提高蛋白质的消化率、抗氧化等<sup>[7]</sup>。但是,纳豆在发酵过程中会产生氨臭味及黏丝,让人难以接受。本研究拟将高大毛霉与纳豆芽孢杆菌共发酵制备豆豉,一方面避免了由单菌发酵或传统自然发酵而来的豆豉所存在的风味单一、营养物质不全等问题;另一方面则改善了纳豆芽孢杆菌单独发酵影响风味的缺点,同时使豆豉具有更多医疗保健功能。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌种 纳豆芽孢杆菌 HT8 由重庆高校生物活性物质工程研究中心分离筛选,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物菌种保藏管理中心,保藏编号为 CGMCC 7168。高大毛霉由重庆市忠县忠州腐乳酿造有限公司提供。

1.1.2 培养基及药品 黄豆购于重庆市大学城农贸市场。PDA 培养基、LB 培养基配制分别参照文献<sup>[11]</sup>和<sup>[12]</sup>;麸皮培养基配制参考文献<sup>[13]</sup>,具体做法为:在 300 mL 三角瓶中加入 10 g 麸皮和 1 g 豆粉,然后加入 11 g 水,混合均匀,瓶口塞棉塞并包扎防潮纸,121℃灭菌 40 min,取出摇动。

1.1.3 仪器设备 ZHJH-C1112C 超净工作台、ZHWHY-200B 恒温培养振荡器、ZFD-全自动新型鼓风干燥箱、ZSD-1160 全自动新型生化培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司);GI54DWS 自动压力蒸汽灭菌锅(致微(厦

\* 收稿日期:2014-09-10

网络出版时间:2015-3-24 13:53

资助项目:重庆市科技攻关重点项目(No. CSTC2012GG-YYJSB80002)

作者简介:方雅洁,女,研究方向为昆虫分子生物学;E-mail: wyyxfyj@163.com;通信作者:陈斌,教授,E-mail: binchen@cqnu.edu.cn

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.n.20150324.1353.033.html>

门)仪器有限公司);SL-II 数控层析冷柜(北京松源华兴科技发展有限公司);Sigma -3K15 高速冷冻离心机(德国 Sigma 实验室离心机股份有限公司);QHX-250 人工气候箱(常州朗越仪器制造有限公司);PL303 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 菌种的制备 菌种的活化:将斜面保藏的高大毛霉菌种于无菌操作下接种到 PDA 斜面培养基,于恒温培养箱 18 ℃ 培养 72 h,于 4 ℃ 冰箱中保存备用<sup>[14]</sup>。吸取 100 μL 保藏纳豆芽孢杆菌菌种到 10 mL LB 培养基中,37 ℃,160 r·min<sup>-1</sup> 培养 18 h,于 4 ℃ 冰箱中保存备用。毛霉菌孢子液的制备:将活化的高大毛霉斜面菌种加入适量的无菌生理盐水,用移液枪吸取适量菌液,接种于麸皮培养基中,18 ℃ 下培养 96 h,至三角瓶内长满菌丝和灰色孢子后取出备用。在培养好的种曲培养瓶中加入 500 mL 灭菌生理盐水充分摇匀,双层纱布过滤;滤渣再加入 500 mL 灭菌生理盐水洗涤 1 次,过滤。两次滤液混合制成孢子悬液。将此孢子悬浮液置于 4 ℃ 冰箱中,保存备用。

1.2.2 黄豆的处理 称取一定量的黄豆,洗净,沥干,黄豆与清水按 1:3 的比例混合,在 30 ℃ 浸泡 3 h,沥干,0.1 MPa,121 ℃ 蒸煮 30 min<sup>[13]</sup>,使其中的营养物质渗出,有利于微生物的分解利用。

1.2.3 不同接种量对纳豆芽孢杆菌和巨大毛霉共发酵的影响 湿度控制在 90%~95%,根据单因素实验法,在 25 ℃ 下,把巨大毛霉与纳豆芽孢杆菌以 1:1 的菌种比例并分别按 2%,4%,6%,8%,10% 的接种量培养 48 h,以确定最佳接种量。

1.2.4 不同菌种比例对纳豆芽孢杆菌和巨大毛霉共发酵的影响 湿度控制在 90%~95%,在 25 ℃ 下,混合菌液按 4% 的接种量、巨大毛霉与纳豆芽孢杆菌分别按 50:1,10:1,1:1,1:10,1:50 的菌种比例培养 48 h,以确定最佳菌种比例。

1.2.5 不同培养温度对纳豆芽孢杆菌和巨大毛霉共发酵的影响 湿度控制在 90%~95%,混合菌接种量为 4%,巨大毛霉与纳豆芽孢杆菌菌种比例为 1:1,培养温度分别为 15,20,25,30 ℃,培养 48 h,以确定最佳培养温度。

1.2.6 不同发酵时间对纳豆芽孢杆菌和巨大毛霉共发酵的影响 湿度控制在 90%~95%,混合菌接种量为 4%,巨大毛霉和纳豆芽孢杆菌菌种比例为 1:1,培养温度为 25 ℃,培养时间分别为 16,24,32,40,48,56,64,72 h,以确定最佳发酵时间。

1.2.7 巨大毛霉和纳豆芽孢杆菌共发酵豆豉的最佳条件的确定 以单因素实验为基础,设计  $L_9(3^4)$  正交实验(表 1),以期获得巨大毛霉和纳豆芽孢杆菌共发酵的最佳工艺条件。

1.2.8 粗酶液制备及测定 将已发酵的豆豉在 4 ℃ 冰箱中用磷酸缓冲液按 1:2 的比例浸提 2 h,碾碎,15 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 15 min,提取上清液,测定其中纳豆激酶活性,并对豆豉进行感官评价,初步确定最佳发酵条件。纳豆激酶活力测定方法为纤维蛋白平板法<sup>[15]</sup>,并稍作改进,具体方法为:取尿激酶标准品适量,用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 的磷酸缓冲液(pH 值为 7.5)将尿激酶标准品稀释为 50,100,200,300,400,500,600,700,800,900,1 000 IU·mL<sup>-1</sup> 共 11 个含量梯度,将这 11 个含量梯度的尿激酶溶液和豆豉粗酶液用 10 μL 移液枪注入平板孔内,每孔 10 μL,37 ℃ 孵育 10 h,用游标卡尺测量每个溶圈的直径,计算出溶圈的面积,以尿激酶活力为纵坐标,溶圈面积为横坐标,绘制标准曲线。根据样品溶圈面积在标准曲线上找出相对应的尿激酶的活力单位数;感官评价标准参考文献[16],具体为表 2 所示。

表 1 正交试验因素水平表

水平	因素			
	接种量	菌种比例(巨大毛霉:纳豆芽孢杆菌)	培养温度/℃	培养时间/h
1	2%	10:1	20	40
2	4%	1:1	25	48
3	6%	1:10	30	56

表 2 I 型感官评价标准

指标	评分标准
色泽	黄褐色(15~20)、深黄褐色或浅黄褐色(11~14)、黑褐色(0~10)
豉香	浓郁(16~20)、中等(11~15)、豉味淡或有异味(0~10)
氨味	轻(16~20)、中等(11~15)、重(0~10)
酱香	浓郁(16~20)、中等(11~15)、轻(0~10)
质地	适中(15~20)、硬或软(10~14)

表 3 两个菌种不同总体接种量的豆豉发酵情况及纳豆激酶活性

接种量	感官评价						纳豆激酶活性/(IU·mL <sup>-1</sup> )
	色泽	豉香	氨味	酱香	质地	综合评分	
2%	19	16	20	17	14	86	304.93
4%	20	18	20	20	18	96	953.56
6%	18	19	18	20	18	93	710.84
8%	15	17	17	18	13	80	569.72
10%	14	15	15	16	10	70	346.72

## 2 结果与分析

### 2.1 不同接种量的影响

纳豆芽孢杆菌 HT8 和高大毛霉按 1 : 1 的菌种比例接种于豆豉上,在 25 °C 下培养 48 h,考察不同接种量的豆豉发酵情况;通过 I 型感官评价对豆豉进行评分,并测定各接种量下豆豉的纳豆激酶活性。从表 3 可见,随着接种量的增加,豆豉的感官效果和纳豆激酶活性都呈现出先增强后减弱的趋势,且都在接种量为 4% 时达到最大值,故最佳接种量为 4%。

### 2.2 不同菌种比例的影响

纳豆芽孢杆菌 HT8 和高大毛霉按 4% 的总体接种量、不同接种比例接种于豆豉上,25 °C 下培养 48 h,通过 I 型感官评价对豆豉进行评分,并测定各菌种比例下的豆豉的纳豆激酶活性。表 4 显示,随着高大毛霉与纳豆芽孢杆菌接种比例的变化,豆豉的感官效果随着纳豆芽孢杆菌含量的增加呈现出先增强再减弱的趋势,在菌种比例为 1 : 1 时达到最佳;而纳豆激酶活性随着纳豆芽孢杆菌含量的增加逐渐升高。综合来看,高大毛霉与纳豆芽孢杆菌的接种比例在 1 : 1 时为最佳。

### 2.3 不同培养温度的影响

纳豆芽孢杆菌 HT8 和高大毛霉混合液按 4% 总体接种量,1 : 1 的菌种比例接种豆豉,在不同培养温度发酵豆豉,通过 I 型感官评价对豆豉进行评分,并测定各培养温度下的豆豉的纳豆激酶活性。结果显示,豆豉的感官效果随着培养温度的升高呈现出先增强再减弱的趋势,在 25 °C 时达到最佳,而纳豆激酶活性呈现出逐渐增强的趋势(表 5)。综合来看,最佳培养温度为 25 °C。

### 2.4 不同发酵时间的影响

纳豆芽孢杆菌 HT8 和高大毛霉混合液按 4% 接种量、1 : 1 的菌种比例、25 °C 培养温度在不同的发酵时间条件下发酵豆豉,通过 I 型感官评价对豆豉进行评分,并测定各发酵时间下的豆豉的纳豆激酶活性。由表 6 可知,随着发酵时间的增加,豆豉的感官效果及纳豆激酶活性都呈现出先增强后减弱的趋势,在 48 h 达到最佳,故豆豉的最佳发酵时间为 48 h。

### 2.5 正交实验

在四因素对豆豉发酵情况及产纳豆激酶活性的影响中,影响豆豉风味的主要因素由高到低排序为培养温度(C)、菌种比例(D)、发酵时间(B)、接种量(A)。从感官角度来看较优发酵条件为  $A_1B_1C_1D_1$ 、 $A_2B_1C_2D_3$ 、 $A_2B_3C_1D_2$ 、 $A_3B_2C_1D_3$ 。在较优发酵条件下,以纳豆激酶活性为评价指标,则可知最优发酵条件为  $A_2B_1C_2D_3$ ,即接种量 4%、菌种比例 10 : 1、培养温度 25 °C、发酵时间 56 h 为最佳条件,此条件下纳豆激酶活性达  $1\ 092.71\ \text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (表 7)。

表 4 两个菌种不同接种比例下豆豉发酵情况及纳豆激酶活性

菌种比例 (高大毛霉: 纳豆芽孢 杆菌 HT8)	感官评价						纳豆激 酶活性/ (IU · mL <sup>-1</sup> )
	色泽	豉香	氨味	酱香	质地	综合评分	
50 : 1	20	16	20	14	14	84	359.62
10 : 1	20	18	20	15	17	90	600.40
1 : 1	20	20	20	18	20	98	968.67
1 : 10	18	19	17	20	19	93	1 003.67
1 : 50	13	15	12	19	15	74	1 094.03

表 5 不同培养温度下的豆豉发酵情况及纳豆激酶活性

培养温 度/°C	感官评价						纳豆激 酶活性/ (IU · mL <sup>-1</sup> )
	色泽	豉香	氨味	酱香	质地	综合评分	
15	20	15	20	14	15	84	47.80
20	20	18	20	16	16	90	47.80
25	20	20	19	20	18	97	952.18
30	15	18	14	15	13	75	1 065.13

表 6 不同接种比例下豆豉发酵情况及纳豆激酶活性

发酵时 间/h	感官评价						纳豆激 酶活性/ (IU · mL <sup>-1</sup> )
	色泽	豉香	氨味	酱香	质地	综合评分	
16	18	12	20	12	11	73	431.79
24	20	14	20	14	13	81	762.60
32	20	15	20	16	15	86	875.42
40	20	18	20	19	19	96	933.98
48	20	20	19	20	20	99	989.67
56	19	20	19	20	20	98	908.75
64	18	17	16	17	16	84	881.13
72	16	15	14	15	13	73	948.16

### 3 结论

豆豉是中国传统的发酵食品,所具有的食药两用性广为人知。然而当前中国豆豉多为传统的自然发酵或单菌发酵,难以满足广大消费者对食品营养保健等方面的需求。目前有关豆豉多菌发酵的报道还较少,本研究以黄豆为原料,利用高大毛霉和 HT8 纳豆芽孢杆菌在人工气候箱中共发酵。对发酵过程中影响两种菌的各种因素分别进行了探究,并通过正交实验确定了最佳发酵工艺条件:高大毛霉与纳豆芽孢杆菌 HT8 共发酵的最佳接种量为 4%,菌种比例为 10:1,培养温度为 25℃,发酵时间为 56 h。在此条件下毛霉生长繁茂,豉香浓郁,且纳豆激酶活力达 1 092.71 IU·mL<sup>-1</sup>。由此可见,高大毛霉和纳豆芽孢杆菌 HT8 混合发酵,既保持了豆豉原有风味,同时丰富了发酵产生的蛋白酶系,使之具有了纳豆激酶活性,这为新型保健食品的开发提供了新思路。

表 7 正交实验结果分析表

试验号	接种量(A)	菌种比例(B)	培养温度(C)	发酵时间(D)	综合评分	纳豆激酶活性/(IU·mL <sup>-1</sup> )
1	1	1	1	1	94	52.70
2	1	2	2	2	86	1 115.26
3	1	3	3	3	80	1 152.38
4	2	1	2	3	94	1092.71
5	2	2	3	1	83	1 222.21
6	2	3	1	2	92	436.34
7	3	1	3	2	87	52.70
8	3	2	1	3	96	470.56
9	3	3	2	1	78	1 182.74
综合评分	K1	260	275	282	255	
	K2	269	265	258	265	
	K3	270	250	250	270	
	R	10	25	32	15	
纳豆激酶活性	K1	2 320.34	1 198.11	959.60	2 457.65	
	K2	2 751.26	2 808.03	3 390.71	1 604.30	
	K3	1 706.00	2 771.46	2 427.29	2 715.65	
	R	1 045.26	1 609.92	2 431.11	1 111.35	

### 参考文献:

- [1] 杨坚. 我国古代豆豉的加工研究[J]. 古今农业, 1999(1): 80-86.  
Yang J. The study on the processing of Douchi in the ancient China[J]. Ancient and Modern Agriculture, 1999(1):80-86.
- [2] 孙成行, 牟光庆, 孙园. 豆豉混合菌种制曲工艺的研究[J]. 中国调味品, 2007, 37(3): 43-46.  
Sun C X, Mou G Q, Sun Y. Douchi mixed strain starter-making technology research[J]. China Condiment, 2007, 37(3):43-46.
- [3] 穆慧林, 李里特. 豆豉的保健功能及开发价值[J]. 农产品加工·学刊, 2008(11): 30-32.  
Mu H L, Li L T. Health function and developing value of lobster sauce[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2008(11): 30-32.
- [4] Esaki H, Onozaki H, Kawakishi S, et al. Antioxidant activity and isolation from soybeans fermented with *Aspergillus spp*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(6):2020-2024.
- [5] 周玉兰, 陈延祯. 毛霉豆豉生产工艺过程及营养价值分析[J]. 中国调味品, 2009, 34(5): 89-91.  
Zhou Y L, Chen Y Z. Analyses on production engineering and nutrition of mucor-fermented soybeans[J]. China Condiment, 2009, 34(5): 89-91.
- [6] 刘达玉, 冯洽平, 吴士业. 毛霉豆豉产业化工艺及营养价值的研究[J]. 中国调味品, 2003, 13(7): 6-9.  
Liu D Y, Feng Z P, Wu S Y. Studies on industrialization technology and nutrition of mucor-fermented soybeans[J]. Chinese Condiment, 2003, 13(7): 6-9.
- [7] 王发祥, 钟青萍, 钟士清. 纳豆菌的研究和应用[J]. 广州食品工业科技, 2003, 19(77): 93-95.  
Wang F X, Zhong Q P, Zhong S Q. Research and application advances in *Bacillus natto*[J]. Guangzhou Food Science and Technology, 2003, 19(77): 93-95.
- [8] 郭颖, 孔繁东, 祖国仁, 等. 纳豆激酶溶栓功效及开发应用前景[J]. 食品工业科技, 2007, 28(3): 225-228.  
Guo Y, Kong F S, Zhong G R, et al. Nattokinase thrombolysis effect and the development and application prospect [J]. Science and Technology of Food Industry, 2007, 28(3): 225-228.
- [9] 陆兆新. 纳豆的保健功能[J]. 中国食物与营养, 2000(2): 30.  
Lu Z X. The health care function of natto[J]. Food and Nutrition in China, 2000(2): 30.
- [10] 张晓敏, 徐宝才. 纳豆——一种值得开发的功能性食品[J]. 中国食品添加剂, 2007(2): 187-192.  
Zhang X M, Xu B C. Natto—a promising functional food [J]. China Food Additives, 2007(2): 187-192.

- [11] 钱存柔,黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京:北京大学出版社,2008:70-73.  
Qian C R, Huang Y X. Microbiology experiment course [M]. Beijing: Peking University Press, 2008:70-73.
- [12] 沈萍,陈向东微生物学[M]. 2版. 北京:高等教育出版社, 2006:86.  
Shen P, Chen X D. Microbiology[M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 2006:86.
- [13] 袁小娟. 细菌型豆豉双菌发酵的工艺研究[D]. 重庆:西南大学,2011:8-21.  
Yuan X J. Studies on the fermentation process of bacteria type Douchi by two kinds of microbes [D]. Chongqing: Southwest University, 2011:8-21.
- [14] 王丽,郝友进,何正波,等. 高效溶栓菌株的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. 重庆师范大学学报:自然科学版,2013,30(3):121-126.  
Wang L, Hao Y J, He Z B, et al. Screening and determination of a bacterium strain with high fibrinolytic activities and the optimization of its fermentation conditions [J]. Journal of Chongqing Normal University: Natural Science, 2013, 30(3): 121-126.
- [15] 熊迎新,尹宗宁,杨超,等. 纳豆激酶活性测定方法的研究[J]. 药物生物技术,2006,13(2):140-143.  
Xiong Y X, Yin Z N, Yang C, et al. Research on the method of nattokinase activity detection [J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2006, 13(2): 140-143.
- [16] 贾东旭,吴拥军,李耀中,等. 细菌型豆豉发酵芽孢杆菌的筛选与鉴定[J]. 食品科学,2009,30(5):217-221.  
Jia D X, Wu Y J, Li Y Z, et al. Screening and identification of *Bacillus* for lobster sauce fermentation [J]. Food Science, 2009, 30(5): 217-221.

## Research on Co-fermentation Condition of Two Kinds of Microbes in Douchi Production

FANG Yajie, HE Qiyi, CHEN Zhilin, CHEN Bin

(Engineering Research Center for Bioactive Substance Biotechnology of Ministry of Education,  
Chongqing Engineering Research Center for Bioactive Substances, College of Life Sciences,  
Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

**Abstract:** In the present study, through laboratory simulation of artificial climate with chamber, the best co-fermentation conditions of *Mucor mucedo* and *Bacillus natto* HT8 were investigated in Douchi productive process. The single factor experiment was employed to investigate the best condition of four co-fermentation factors for the co-fermentation, which included total bacteria inoculation quantity, the ratio of the two bacteria inoculation, fermentation time and cultivation temperature. The orthogonal experiment was then used for combined the best condition for the co-fermentation based on the results of single factor experiment. The organoleptic comfort of fermented soy beans, growth of Douchi, and the activity of Nattokinase were used as evaluating indicator. The results showed that the optimal bacteria inoculation quantity is 4%, the best strain ratio between *Mucor mucedo* and *Bacillus natto* HT8 is 10 : 1, the optimal cultivation temperature is 25 °C, and the best fermentation time is 56 hours. Under the combined condition, the *Mucor mucedo* hyphae growth and Douchi natural quality are both excellent, and the Nattokinase activity reached to 1 092.71 IU · mL<sup>-1</sup>. The co-fermentation retained the original flavor of Douchi, and also produced abundant proteases. This method makes the Douchi with nattokinase activity, and provides with new technique for the development of new-type health-caring food.

**Key words:** Douchi production; *Bacillus natto* HT8; *Mucor mucedo*; co-fermentation; nattokinase

(责任编辑 方 兴)