

双菌混合发酵纳豆工艺优化

Optimization of natto with double-bacteria mixed fermentation

郑丹妮¹王梦颖²胡艺涵¹刘良忠¹ZHENG Dan-ni¹ WANG Meng-ying² HU Yi-han¹ LIU Liang-zhong¹

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023; 2. 武汉食品化妆品检验所, 湖北 武汉 430012)

(1. School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023, China;

2. Wuhan Institute for Food and Cosmetic Control, Wuhan, Hubei 430012, China)

摘要:利用水解圈菌落直径比值(C/H)、菌株生长曲线、发酵纳豆激酶酶活和挥发性盐基氮含量,筛选出两株较优纳豆菌;再以纳豆激酶酶活和挥发性盐基氮含量为指标,对双菌株发酵纳豆工艺条件进行优化。结果表明,双菌株发酵制备纳豆最优工艺条件为菌种比例($m_{N_5} : m_{N_3}$) 4 : 1,接种量 9%,发酵时间 25 h,发酵温度 35 ℃。此条件下制备的纳豆激酶酶活可达 481.84 U/g,与单菌发酵相比提高了 36.8%,挥发性盐基氮含量为 205.21 mg/100 g,与单菌发酵最高值相比降低了 42.3%。

关键词:纳豆;混合发酵;纳豆激酶活力;挥发性盐基氮

Abstract: In order to optimize the processing technology of natto, improve the flavor of the product, and to explore the effect of double-bacteria mixed fermentation on the quality of natto, two better strains were screened through the ratio of the diameter of the hydrolytic colonies (C/H), growth curve of the strains, natto kinase activity and volatile base nitrogen content. The single-factor and orthogonal experiments were used to optimize the process conditions of the two-bacteria fermentation of natto, with natto kinase activity and volatile base nitrogen content as the indicator. The optimal fermentation process of natto with two strains is the ratio of strains ($m_{N_5} : m_{N_3}$) 4 : 1, inoculation volume 9%, fermented for 25 h at 35 ℃. Natto prepared under this fermentation condition has a natto kinase activity of 481.84 U/g, which increased by 36.8% compared with single-bacteria fermentation; the volatile base nitrogen content was 205.21 mg/100 g, which was reduced by 42.3%, compared with the highest value of single fermentation. The results showed that using two strains of *Bacillus natto* to optimize the fermentation process could provide a way to enhance enzyme activity and improve the flavor.

Keywords: natto; mixed fermentation; natto kinase activity; volatile

tile basic nitrogen

纳豆是一种由纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)发酵大豆^[1-2]产生的具有拉丝特性^[3]的发酵食品,起源于中国豆豉,于唐代传到日本后逐渐发展成一种新型发酵食品。作为日本消费量最大的发酵食品,纳豆被认为是日本人长寿的“秘方”^[4]。2002年,卫生部将纳豆芽孢杆菌发酵的纳豆列为普通食品进行管理^[5]。纳豆芽孢杆菌是枯草芽孢杆菌的亚种^[6],其生长代谢过程中能产生抑菌物质^[7],且对高温和酸性胃液有一定耐受能力和稳定性^[8-9]。除含有纳豆激酶外,纳豆还含有许多生理活性物质^[10-12],如异黄酮、超氧化物歧化酶、皂苷素、生育酚、多种维生素等,使纳豆兼具营养性和功能性^[13-15]。1987年,日本学者首次提取出纳豆激酶^[16],该酶具有良好的溶栓能力,能辅助治疗和预防心脑血管疾病^[17]。随着中国社会老龄化的加速,心脑血管疾病逐渐成为高风险疾病,与纳豆激酶相关的保健品和食品成为了近年来的热门研究课题^[18-19]。

目前市场上的商品化纳豆酶活普遍较低^[20],近年来许多研究侧重于单株纳豆芽孢杆菌的筛选和优化。如利用 *gyrA* 基因序列、质谱分析和 PCR 克隆基因结合的方式鉴定菌株,再结合 SDS-PAGE 和纤溶活性测定得到高产纳豆激酶菌株^[21],以超声波、超高压、紫外诱变^[22-23]等方式提高单株纳豆芽孢杆菌的产酶能力,以进一步提高纳豆产品的纳豆激酶活力和综合品质。但是,在纳豆发酵过程中会产生比较明显的氨臭味^[24],其中的挥发性盐基氮与氨臭味大小具有相关性,能反映纳豆的氨臭味大小^[25]。

研究拟从分离纯化保藏的纳豆芽孢杆菌中进一步筛选出纳豆激酶活力较高的 2 株纳豆菌,采用双菌发酵制备纳豆,以纳豆激酶酶活和挥发性盐基氮含量为评价指标,对双菌株发酵纳豆工艺条件进行优化,以期提高纳豆激酶酶活的同时降低纳豆中令人不喜的氨臭味,获得品

作者简介:郑丹妮,女,武汉轻工大学在读硕士研究生。

通信作者:刘良忠(1963—),男,武汉轻工大学教授,硕士生导师,博士。E-mail:liu2022888@163.com

收稿日期:2020-05-27

质优良的纳豆产品。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

纳豆芽孢杆菌 N_1 、 N_2 、 N_3 、 N_4 、 N_5 、 N_6 : 实验室分离纯化^[26]后筛选保藏;

非转基因黄豆: 市售;

蛋白胨、酵母提取物、琼脂、牛肉膏、福林酚: 生化试剂, 国药集团化学试剂有限公司;

氢氧化钠、氯化钠、碳酸钠、三氯乙酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、可溶性淀粉: 分析纯, 上海展云化工有限公司;

酪氨酸: 分析标准品, 上海源叶生物科技有限公司;

酪蛋白: 生化试剂, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

淀粉培养基: 牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1%, 氯化钠 0.5%, 可溶性淀粉 2%, 琼脂 2%, 121 °C 灭菌 20 min;

LB 液体培养基: 酵母提取物 0.5%、蛋白胨 1%、氯化钠 1%, 121 °C 灭菌 20 min;

LB 固体培养基: 酵母提取物 0.5%、蛋白胨 1%、氯化钠 1%、琼脂 1.5%, 121 °C 灭菌 20 min;

酪蛋白培养基: A 液(牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1%, 氯化钠 0.5%, 琼脂 2%), 121 °C 灭菌 20 min; B 液(干酪素 2%), 115 °C 灭菌 20 min, 使用前 A、B 液混合。

1.2 主要仪器与设备

多功能台式离心机: Frontier5000 小型, 奥豪斯国际贸易(上海)有限公司;

紫外—可见分光光度计: Evolution220 型, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司;

恒温培养箱: DNP-9052 型, 上海精宏试验设备有限公司;

立式压力蒸汽灭菌器: BXM-30R 型, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;

落地式恒温振荡器: LHZ-111 型, 上海精宏试验设备有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 纳豆芽孢杆菌产酶能力筛选 使用保存菌株 N_1 、 N_2 、 N_3 、 N_4 、 N_5 、 N_6 划线纯化 3 次后, 挑取单菌落接种至 LB 液体培养基, 37 °C、180 r/min 摇床培养 24 h 活化 2 次, 将第 3 代培养液作为发酵种子液。将种子液稀释至合适浓度梯度取 0.1 mL 涂布于淀粉培养基和酪蛋白培养基, 37 °C 培养 24 h。记录水解圈直径与菌落直径比值 (C/H), 3 次平行。

1.3.2 纳豆芽孢杆菌生长曲线绘制 将活化的种子液接种至液体 LB 培养基, 37 °C、170 r/min 振荡培养, 每隔 3 h 取样, 稀释后使用 10 mm 比色皿测 $OD_{660\text{ nm}}$ 值^[27], 无

菌 LB 液体培养基为空白对照。以时间为横坐标, $OD_{660\text{ nm}}$ 值为纵坐标绘制生长曲线。

1.3.3 纳豆制备 挑选无虫洞、无裂纹、表面完整、无异色的饱满黄豆粒, 洗净, 按料液比 ($m_{\text{纳豆}} : m_{\text{蒸馏水}}$) 1 : 4 (g/mL) 加入蒸馏水浸泡 24 h, 沥干, 121 °C 灭菌 20 min。37 °C、180 r/min 摇床培养 24 h 活化种子液两代, 待黄豆冷却后, 按比例加入活化种子液, 充分搅匀后置于恒温培养箱发酵一定时间, 再于 4 °C 冰箱中后熟 24 h 上述操作均在无菌条件下进行。

1.3.4 酪氨酸标准曲线制作 采用紫外—可见分光光度法。以吸光度为纵坐标, 酪氨酸浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得曲线方程 $y = 0.0103x - 0.0038$, $R^2 = 0.9999$ 。计算 $OD_{680\text{ nm}}$ 值为 1 时的酪氨酸量 (μg), 即为吸光常数 K , $K = 97$, 在 95~100 内, 试验数据合理。

1.3.5 纳豆浸提液制备 称取适量纳豆按料液比 ($m_{\text{纳豆}} : m_{\text{蒸馏水}}$) 1 : 20 (g/mL) 加入 PBS 缓冲液 (pH 7.5), 4 °C 下浸提 24 h, 双层纱布过滤, 4 °C、5 000 r/min 离心 20 min, 上清液用于酶活分析。

1.3.6 纳豆激酶酶活测定 采用福林酚法^[28]测定酶活, 每组重复 3 次。按式(1)计算酶活。

$$X = \frac{A \times V \times n}{t \times m}, \quad (1)$$

式中:

X ——样品的酶活力, U/g;

A ——对应标曲所得样品最终稀释液的酶活, U/mL;

t ——反应时间, 10 min;

m ——纳豆样品质量, g;

V ——显色反应体积, 4 mL;

n ——稀释倍数。

1.3.7 挥发性盐基氮含量 (TVB-N 值) 的测定 采用半微量定氮法。

1.3.8 双菌发酵纳豆单因素试验

(1) 菌株质量比对发酵纳豆品质的影响: 黄豆蒸煮灭菌冷却后, 接入 6% 种子液, 种子液中两种菌株质量比 ($m_{N_5} : m_{N_3}$) 分别为 10 : 1, 5 : 1, 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3, 1 : 5, 1 : 10, 37 °C 发酵 24 h, 再放入 4 °C 冰箱后熟 24 h, 考察种子液中两种菌株质量比 ($m_{N_5} : m_{N_3}$) 对纳豆激酶酶活和 TVB-N 值的影响。

(2) 种子液接种量对发酵纳豆品质的影响: 黄豆蒸煮灭菌冷却后, 分别接入 2%, 4%, 6%, 8%, 10% 种子液, 种子液中两种菌株质量比 ($m_{N_5} : m_{N_3}$) 为 1 : 1, 37 °C 发酵 24 h, 再放入 4 °C 冰箱后熟 24 h, 考察种子液接种量对纳豆激酶酶活和 TVB-N 值的影响。

(3) 发酵时间对发酵纳豆品质的影响: 黄豆蒸煮灭菌冷却后, 接入 6% 种子液, 种子液中两种菌株质量比

($m_{N_5} : m_{N_3}$) 为 1 : 1, 37 °C 下分别发酵 20, 22, 24, 26, 28 h, 再放入 4 °C 冰箱后熟 24 h, 考察发酵时间对纳豆激酶酶活和 TVB-N 值的影响。

(4) 发酵温度对发酵纳豆品质的影响: 黄豆蒸煮灭菌冷却后, 接入 6% 种子液, 种子液中两种菌株质量比 ($m_{N_5} : m_{N_3}$) 为 1 : 1, 分别于 33, 35, 37, 39, 41 °C 下发酵 24 h, 再放入 4 °C 冰箱后熟 24 h, 考察发酵温度对纳豆激酶酶活和 TVB-N 值的影响。

1.3.9 正交优化试验 根据单因素试验结果选取因素水平, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以纳豆激酶酶活为主要指标, 辅测 TVB-N 值, 优化双菌株发酵纳豆试验。

1.4 数据统计分析

使用 SPSS 软件进行数据分析, 使用 Origin 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 产酶能力筛选

由表 1 可知, 各菌株生长过程中的产酶能力存在差异, 淀粉培养基的 C/H 值为 1~2, 且最高值为 (1.75 ± 0.09), 最低值为 (1.35 ± 0.14), 说明产淀粉酶能力差异不显著。酪蛋白培养基的 C/H 值差距较大, 且最高值为 (5.64 ± 0.10), 最低值为 (2.81 ± 0.07), 说明产蛋白酶能力差异显著, 其中产酶能力较高的菌株为 N_2 、 N_3 、 N_4 、 N_5 。

2.2 菌株的生长曲线

由图 1 可知, N_2 、 N_3 、 N_4 、 N_5 4 株菌株各生长阶段较为接近。菌株 N_6 的指数生长期较其他菌株更早结束, 12 h 后就进入了生长稳定期; 菌株 N_1 的指数生长期较其他菌株更为平缓; 菌株 N_3 和 N_5 的生长活性较其他菌株更优。

2.3 纳豆芽孢杆菌的筛选

由图 2 可知, 菌株 N_1 、 N_2 、 N_6 发酵纳豆中的纳豆激酶酶活较低, 均未超过 100 U/g, 菌株 N_3 发酵纳豆中的纳豆激酶酶活为 (218.48 ± 16.47) U/g, 菌株 N_5 发酵纳豆中的纳豆激酶酶活为 (352.25 ± 15.30) U/g, 二者的酶活明显较其他菌株更高。

表 1 产酶能力筛选结果

Table 1 Screening results of enzyme production capacity

菌种编号	C/H 值	
	淀粉培养基	酪蛋白培养基
N_1	1.35 ± 0.14	2.81 ± 0.07
N_2	1.52 ± 0.07	4.25 ± 0.09
N_3	1.63 ± 0.08	4.96 ± 0.13
N_4	1.40 ± 0.12	3.83 ± 0.11
N_5	1.75 ± 0.09	5.64 ± 0.10
N_6	1.38 ± 0.09	3.26 ± 0.10

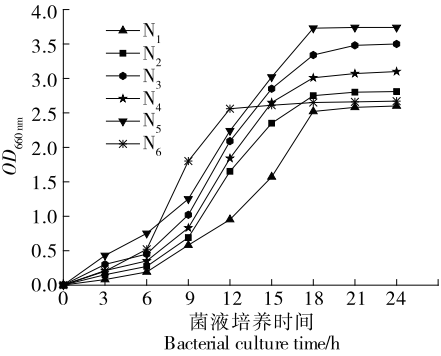
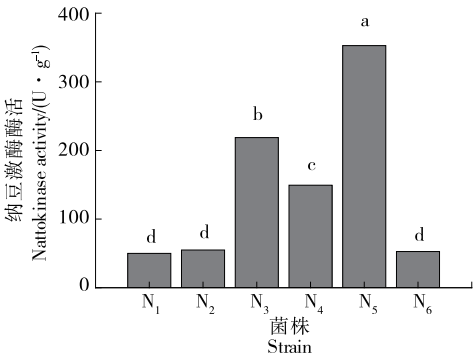


图 1 6 株菌株的 24 h 生长曲线图

Figure 1 Growth curve of 6 strains within 24 hours

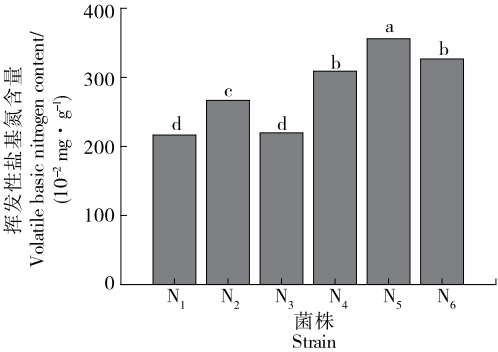


字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 2 不同菌株发酵对纳豆激酶活力的影响

Figure 2 Effect of different strains on nattokinase activity

由图 3 可知, 菌株 N_5 发酵制备纳豆的 TVB-N 值最高, 达 (355.43 ± 17.00) mg/100 g; 菌株 N_1 和 N_6 发酵制备纳豆的 TVB-N 值较低, 分别为 (216.21 ± 11.79), (219.40 ± 4.92) mg/100 g, 二者无显著性差异。考虑在提高酶活的情况下降低 TVB-N 值, 菌株 N_5 的 TVB-N 值最高, 但其酶活也最高, 菌株 N_3 的 TVB-N 值较低且酶活较高, 因此选取菌株 N_3 和 N_5 进行后续混合发酵生产纳豆试验, 以探索双菌株发酵对纳豆发酵的影响。



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

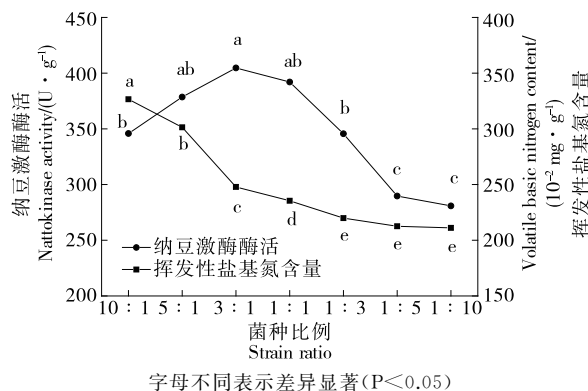
图 3 不同菌株发酵对 TVB-N 值的影响

Figure 3 Effects of different strains on the content of volatile base nitrogen

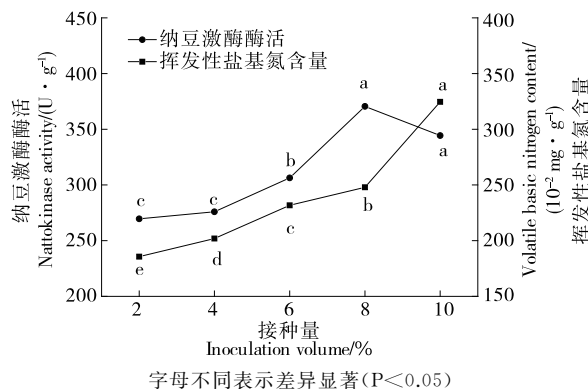
2.4 单因素试验

2.4.1 菌株质量比 由图 4 可知,当菌株质量比($m_{N_5} : m_{N_3}$)为 3 : 1 时,纳豆激酶酶活达最高(404.40 ± 14.32) U/g,相比 N_5 单菌发酵提高了 14.8%。当菌株质量比($m_{N_5} : m_{N_3}$)为 1 : 5, 1 : 10 时,纳豆激酶酶活较低,可能是因为菌株 N_5 在混合发酵中起主要作用,菌株 N_3 在一定比例范围内起协同菌株 N_5 发酵的作用。TVB-N 值随菌株 N_3 比例的增加而降低,最后趋于稳定,相比菌株质量($m_{N_5} : m_{N_3}$)比 10 : 1 和 5 : 1,当菌株质量比($m_{N_5} : m_{N_3}$)为 3 : 1 时,TVB-N 值有较大幅度降低。说明菌株质量比对纳豆激酶酶活和 TVB-N 值的影响非常显著($P < 0.01$)。

2.4.2 接种量 由图 5 可知,纳豆激酶酶活随接种量的增加先升高后降低,接种量为 8% 时达到峰值[(370.28 ± 11.49) U/g]。这可能是因为接种量较低时,菌种生长状态不统一,导致发酵不充分;而超过最高值后,菌液易沉积在底部,且菌体快速发酵后,衰老期的菌体及其代谢产物堆积,阻碍了后续的发酵,影响了纳豆激酶的生成。TVB-N 值随接种量的增加逐渐升高,且在接种量为 10%



字母不同表示差异显著($P < 0.05$)
图 4 菌株质量比对发酵纳豆品质的影响
Figure 4 Effects of different strain ratios on nattokinase activity

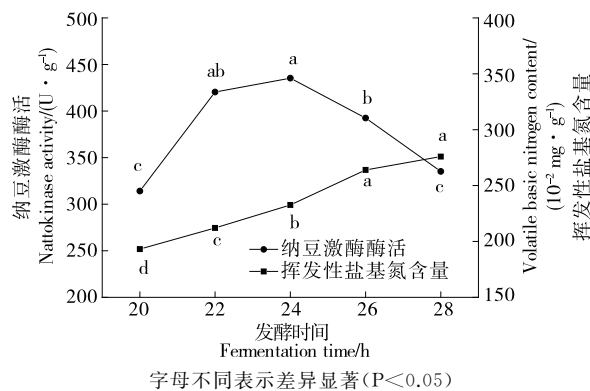


字母不同表示差异显著($P < 0.05$)
图 5 接种量对发酵纳豆品质的影响
Figure 5 Effect of inoculation volume on nattokinase activity

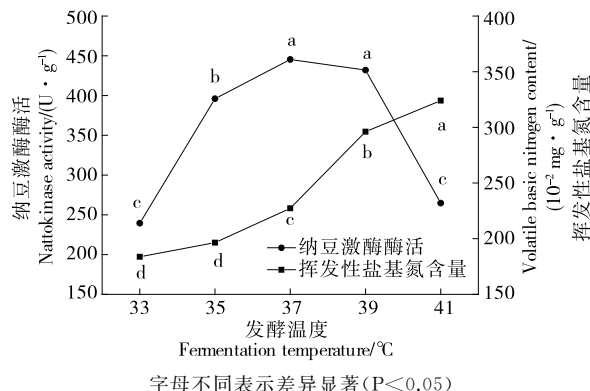
时有较大幅度的升高。说明接种量对纳豆激酶酶活和 TVB-N 值的影响非常显著($P < 0.01$)。

2.4.3 发酵时间 由图 6 可知,纳豆激酶酶活随发酵时间的增加先升高后降低,发酵 24 h 时达最高值[(435.02 ± 18.66) U/g]。当发酵时间为 20 h 时,纳豆激酶酶活较低,可能是部分纳豆菌发酵不完全,相关物质的生成和酶促反应仍在进行;继续延长发酵时间,部分纳豆菌进入衰老期,代谢产物增多,生长环境逐渐不利于正常代谢,酶促反应逐渐减慢或终止。TVB-N 值随发酵时间的增加逐渐升高,且在 26, 28 h 时差异不显著。说明发酵时间对纳豆激酶酶活和 TVB-N 值的影响非常显著($P < 0.01$)。

2.4.4 发酵温度 由图 7 可知,纳豆激酶酶活随发酵温度的升高先升高后降低,发酵温度为 37 °C 时达最高值[(445.02 ± 14.71) U/g]。这可能是升高温度能一定程度上促进纳豆菌的生长,各种代谢速率都有所提高,产酶能力也随之提高。温度过高,部分酶可能失活或活性大幅下降,因此酶促反应速率降低;高温也可能导致生长过快,代谢产物快速堆积影响纳豆激酶合成并降低酶活。TVB-N 值随发酵温度的升高而升高,且在 39 °C 时有较大



字母不同表示差异显著($P < 0.05$)
图 6 发酵时间对发酵纳豆品质的影响
Figure 6 Effect of fermentation time on nattokinase activity



字母不同表示差异显著($P < 0.05$)
图 7 发酵温度对发酵纳豆品质的影响
Figure 7 Effect of fermentation temperature on nattokinase activity

幅度的升高。说明发酵温度对纳豆激酶酶活的影响非常显著($P < 0.01$)。

2.5 正交试验

在单因素试验基础上,选取菌株质量比($m_{N_5} : m_{N_3}$)、接种量、发酵时间、发酵温度为变量,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,试验因素水平见表 2,正交试验结果与分析见表 3。

由表 3 可知,各因素对纳豆激酶酶活的影响程度大小为 $A > C > D > B$,最高纳豆激酶酶活的试验方案为 $A_1B_1C_3D_1$;对挥发性盐基氮含量的影响程度大小为 $D > C > B > A$,最低 TVB-N 值的试验方案为 $A_2B_3C_1D_1$ 。

由表 4 可知,菌株质量比对纳豆激酶酶活的影响极显著($P < 0.01$),发酵时间和发酵温度对纳豆激酶酶活的影响显著($P < 0.05$),而接种量对纳豆激酶酶活的影响不显著。接种

量、发酵时间和发酵温度对 TVB-N 值的影响极显著($P < 0.01$),菌株质量比对 TVB-N 值的影响显著($P < 0.05$)。

综合考虑两个指标及各因素的影响显著性,总结出较合适的试验因素组合为 $A_1B_3C_3D_1$,即菌株质量比($m_{N_5} : m_{N_3}$) $4 : 1$,接种量 9% ,发酵时间 25 h ,发酵温度 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 。在此条件下,进行 3 次验证实验,所得产品纳豆激酶酶活为 $(481.84 \pm 19.65)\text{ U/g}$,TVB-N 值为 $(205.21 \pm$

表 2 正交试验因素和水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiment				
水平	$A\ m_{N_5} : m_{N_3}$	B 接种量/ $\%$	C 发酵时间/h	D 发酵温度/ $^\circ\text{C}$
1	$4 : 1$	7	23	35
2	$3 : 1$	8	24	37
3	$2 : 1$	9	25	39

表 3 正交试验结果与分析

Table 3 Orthogonal test results and analysis

试验号	A	B	C	D	纳豆激酶酶活/ ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	TVB-N 值/ ($10^{-2}\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	1	1	1	1	462.69	227.34
2	1	2	2	2	445.10	266.60
3	1	3	3	3	457.71	290.71
4	2	1	2	3	424.55	328.44
5	2	2	3	1	473.48	203.86
6	2	3	1	2	446.39	204.06
7	3	1	3	2	449.36	265.85
8	3	2	1	3	389.14	287.15
9	3	3	2	1	415.82	242.11
纳豆激酶酶活	k_1	455.16	445.53	432.74	450.66	
	k_2	448.14	435.90	428.49	446.95	
	k_3	418.11	439.97	460.18	423.80	
	R	37.06	9.63	31.69	26.86	
	k_1	261.55	273.88	239.52	224.44	
TVB-N 值	k_2	245.45	252.54	279.05	245.50	
	k_3	265.04	245.63	253.47	302.10	
	R	19.59	28.25	39.54	77.66	

表 4 各因素对双菌株发酵产纳品质的方差分析

Table 4 Variance analysis of the effects of various factors on the activity of nattokinase produced by two strains

来源	平方和		自由度	均方		F 值		P 值	
	酶活	TVB-N 值		酶活	TVB-N 值	酶活	TVB-N 值	酶活	TVB-N 值
模型	11 022.20	28 094.00	8	1 377.77	3 511.75	6.293 15	28.821 90	0.006	0.000
A	4 649.22	1 309.80	2	2 324.61	654.90	10.618 00	5.374 95	0.004	0.029
B	280.24	2 602.34	2	140.12	1 301.17	0.640 01	10.679 10	0.550	0.004
C	3 550.78	4 824.13	2	1 775.39	2 412.07	8.109 34	19.796 50	0.010	0.001
D	2 541.91	19 357.70	2	1 270.96	9 678.86	5.805 27	79.437 20	0.024	0.000
误差	1 970.38	1 096.59	9	218.93	121.84				

10.68) mg/100 g。与单菌株 N_5 发酵产纳豆相比,双菌发酵的酶活提高了 36.8%,TVB-N 值降低了 42.3%,与单菌株 N_3 发酵相比,酶活有所提高,但 TVB-N 值几乎持平,说明菌株 N_5 和 N_3 共同发酵作用下,纳豆的品质得到了提升。

3 结论

通过筛选出产酶活性较高且活力较好的 2 株纳豆芽孢杆菌,采用双菌株共同发酵生产纳豆,并对其发酵条件进行优化。结果表明,发酵纳豆的最适工艺条件为菌株质量比($m_{N_5} : m_{N_3}$)4 : 1,接种量 9%,发酵时间 25 h,发酵温度 35 °C。此条件下发酵的纳豆挥发性盐基氮含量为 205.21 mg/100 g,与单菌发酵最高值相比降低了 42.3%,纳豆激酶酶活为 481.84 U/g,与单菌发酵最高酶活相比提高了 36.8%。TVB-N 值仍存在继续降低的可能性,针对这一问题,后续可添加多种食品发酵常用菌,如酵母、毛霉菌等进行两种以上菌株混合发酵,更高质量地优化纳豆发酵工艺。

参考文献

- [1] YOSHIKAWA Y, CHEN Peng-yin, ZHANG Bo, et al. Evaluation of seed chemical quality traits and sensory properties of natto soybean[J]. Food Chemistry, 2014, 153: 186-192.
- [2] 刘彦敏, 沈璐, 王康, 等. 传统大豆发酵食品中纳豆芽孢杆菌的分离及纳豆发酵[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 208-214.
- [3] 宋军霞. 常见豆类制备纳豆的品质比较[J]. 大豆科学, 2017, 36(2): 309-314.
- [4] 南芝润, 侯磊, 任莹, 等. 纳豆及其产物的研究与应用[J]. 山西农业科学, 2017, 45(10): 1 721-1 724, 1 736.
- [5] 王建. 纳豆激酶的发酵、纯化条件的优化及开发应用[D]. 西安: 陕西科技大学, 2012: 1.
- [6] 胡洋, 邓淑心, 朴春红, 等. 纳豆芽孢杆菌发酵产品研究进展[J]. 大豆科学, 2019, 38(3): 485-490.
- [7] 沈跃丽, 陈蕊, 张莉, 等. 枯草芽孢杆菌生产抗菌物质的食品级发酵培养基优化[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 168-173.
- [8] 张琪, 朱丹, 牛广财, 等. 纳豆芽孢杆菌发酵黑豆豉的前发酵工艺优化[J]. 食品与机械, 2019, 35(10): 179-183.
- [9] LAMPE B J, ENGLISH J C. Toxicological assessment of nattokinase derived from *Bacillus subtilis* var. natto[J]. Food and Chemical Toxicology, 2016, 88: 87-99.
- [10] 李大鹏. 纳豆加工工艺研究[J]. 中国食物与营养, 2014, 20(3): 55-57.
- [11] 何人可, 宋莲军, 黄现青, 等. 嗜热链球菌发酵改良纳豆工艺优化[J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 161-166.
- [12] 高瑞萍, 刘辉, 刘嘉, 等. 纳豆的研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2011, 47(1): 23-26.
- [13] KUBO Y, ROONEY A P, TSUKAKOSHI Y, et al. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to natto (fermented soybean) production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(18): 6 463-6 469.
- [14] 彭亮, 覃光球. 纳豆的特异性保健功效因子研究进展[J]. 中国食物与营养, 2013, 19(10): 65-69.
- [15] 付文静, 王家林, 张杰. 中国纳豆生产工艺的研究现状及展望[J]. 食品工业, 2018, 39(3): 230-233.
- [16] SUMI H, HAMADA H, TSUSHIMA H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. Experientia, 1987, 43(10): 1 110.
- [17] KUROSAWA Y, NIRENGI S, HOMMA T, et al. A single-dose of oral nattokinase potentiates thrombolysis and anti-coagulation profiles[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 1-7.
- [18] MURAKAMI K, YAMANAKA N, OHNISHI K, et al. Inhibition of angiotensin I converting enzyme by subtilisin NAT (nattokinase) in natto, a Japanese traditional fermented food[J]. Food & Function, 2012, 3(6): 674-678.
- [19] LIU Jun-guo, XING Jian-min, CHANG Tian-shi, et al. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods[J]. Process Biochemistry, 2004, 40(8): 2 757-2 762.
- [20] 刘梦洁, 陈守文, 魏雪团. 纳豆激酶高产菌的快速筛选及其发酵纳豆特性[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 131-135.
- [21] 王雪妍, 孙玉飞, 冯菲, 等. 一株高产纳豆激酶菌株的鉴定与分析[J]. 生物技术通报, 2016, 32(1): 187-194.
- [22] 张杰, 葛武鹏, 陈瑛, 等. 纳豆激酶高产菌株的选育及固态发酵技术[J]. 食品科学, 2016, 37(3): 151-156.
- [23] 卓晓沁. 鹰嘴豆纳豆发酵菌种诱变及发酵条件优化[D]. 杭州: 浙江大学, 2018: 20-31.
- [24] 张树明, 唐伟林. 降低纳豆氨味研究进展[J]. 黑龙江中医药, 2016, 45(5): 75-76.
- [25] 孙军德, 陈思, 杨璐, 等. 双菌株混合发酵纳豆的条件优化[J]. 沈阳农业大学学报, 2016, 47(1): 35-40.
- [26] 王欢, 李宏梁, 杜磊, 等. 纳豆菌的分离、筛选、鉴定及发酵特性对比研究[J]. 中国调味品, 2018, 43(11): 1-5.
- [27] 陈思. 双菌混合发酵纳豆的初步研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016: 15-18.
- [28] 关志伟. 枯草芽孢杆菌发酵产纳豆激酶的研究[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2007: 11.