

分类号：Q81
密 级：公开

单位代码：10363
学 号：2210530131

纳豆酵素的研制与货架期预测

Development and shelf-life prediction of natto enzyme

学生姓名：_____黄茜琳_____

指导教师：_____刘艳（教授）_____

专 业：_____生物与医药_____

研究方向：_____工业微生物发酵_____

论文答辩日期： 2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确和隐含的内容外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学术论文作者签名：黄莎琳

日期：2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密，在 年解密后使用本版权书

本学位论文属于

不保密

学位论文作者签名：黄茜琳

指导教师签名：刘艳

日期：2024年5月30日

日期：2024年5月30日

纳豆酵素的研制与货架期预测

摘 要

纳豆芽孢杆菌是公认的相对安全的益生菌,可用于固态发酵大豆制得富含纳豆激酶的纳豆产品。纳豆激酶(nattokinase, NK)是一种碱性蛋白酶,具有多种生理功能,是治疗心血管疾病的理想药物。纳豆是预防治疗心血管疾病的功能性食品,因纳豆中纳豆激酶的含量低和特殊的氨味,其市场应用效果并不理想。本文利用常压室温等离子体(ARTP)诱变,结合牛奶平板初筛和紫外分光光度法测定纳豆激酶酶活力,获得一株纳豆激酶含量显著提高的纳豆芽孢杆菌(BSN-2)。以五种不同发酵基质接种纳豆芽孢杆菌,研制出一款口味适宜的纳豆复合酵素。通过单因素试验、响应面优化纳豆复合酵素的发酵工艺,对纳豆酵素的品质进行测定,利用一级方程与 Arrhenius 方程建立动力学方程预测纳豆复合酵素的货架期。主要研究内容和结果如下:

(1) 本文以纳豆芽孢杆菌(BSN-1)为出发菌株,采用 ARTP 诱变,结合牛奶平板初筛和紫外分光光度法检测复筛,发现一株纳豆激酶高产菌株纳豆芽孢杆菌(BSN-2)。该菌株的遗传稳定性较好,纳豆激酶的酶活力为: 119.2 FU/mL, 比诱变前提高 67%。

(2) 纳豆复合酵素的制备以大豆为主,分别辅以五种不同的基质:山楂、陈皮、红枣、茶叶、核桃,接种 BSN-2 发酵制备酵素产品。以纳豆激酶的酶活力和感官评价为主要指标,筛选出最佳发酵基质:核桃浆和豆浆混合物。为优化发酵工艺,在单因素实验中发现,接种

量、发酵时间和发酵温度对纳豆复合酵素的品质影响较高。采用响应面优化纳豆酵素优化工艺，得到最佳发酵的工艺为：核桃浆液比 22.7%、接种量 5.2%、发酵温度为 37.4 °C 和发酵时间 29.6 h，得到综合得分为 91，此发酵工艺条件下纳豆激酶酶活为 226.17 FU/mL，与预测值基本相符。

(3) 对发酵后的纳豆酵素蛋白质含量、多肽、多酚等物质进行测定。纳豆酵素中的蛋白质含量为： 1.89 ± 0.82 mg/mL，多肽含量为 8.34 ± 0.07 mg/mL，多酚含量为 4.58 ± 0.14 mg/mL，DPPH 自由基清除作用为 $24.31 \pm 1.83\%$ 。在纳豆酵素的贮藏过程中，以明显变化的纳豆激酶酶活力为品质指标进行货架期的预测。得到在 25 °C 常温贮藏下的纳豆酵素货架期为：38 天。

关键词：ARTP 诱变，纳豆激酶，纳豆复合酵素，响应面优化，贮藏稳定性

DEVELOPMENT AND SHELF-LIFE PREDICTION OF NATTO ENZYME

ABSTRACT

Bacillus subtilis natto is known as a generally safe probiotic for solid-state fermentation of soybeans to create nattokinase enriched natto products. As an alkaline protease with a variety of physiological roles, nattokinase (NK) is a perfect medication for the management of cardiovascular conditions. Natto is a useful food for the prevention and treatment of cardiovascular illnesses, but its commercial applicability is not optimal due to the low level of nattokinase in natto and the unique ammonia flavor. In this work, we employed atmospheric pressure room temperature plasma (ARTP) mutagenesis in conjunction with primary sieving of milk plates, ultraviolet spectrophotometry, and other techniques to generate a strain of *Bacillus subtilis natto*(BSN-2) with a markedly elevated nattokinase content. Five different fermentation substrates were used to inoculate *Bacillus subtilis natto* to develop a natto complex enzyme with suitable flavor. The fermentation process of natto composite enzyme was optimized by one-way test and response surface, the quality of natto enzyme was determined, and the kinetic equation was established to

predict the shelf-life of natto composite enzyme using the first-degree equation and Arrhenius equation. The main research content and results are as follows:

(1) In this paper, a high nattokinase-producing strain of *Bacillus subtilis natto* (BSN-2) was found by using ARTP mutagenesis with *Bacillus subtilis natto* (BSN-1) as the starting strain, combined with initial screening on milk plate and re-screening with UV spectrophotometric detection. The genetic stability of this strain was good, and the enzyme activity of nattokinase was 119.2 FU/mL, which was 67% higher than that before mutagenesis.

(2) The preparation of natto composite enzyme was based on soybean, supplemented with five different substrates: hawthorn, tangerine peel, red date, tea, walnut, and inoculated with BSN-2 for fermentation to prepare enzyme products. The enzyme activity and sensory evaluation of nattokinase were used as the main indexes to screen out the best fermentation substrate: walnut pulp and soybean pulp mixture. In order to optimize the fermentation process, it was found that the inoculum amount, fermentation time and fermentation temperature had a high influence on the quality of natto complex enzyme in a one-way experiment. Response surface optimization was used to optimize the process of natto enzyme, and the best fermentation process was obtained as follows: walnut pulp liquid ratio of 22.7%, inoculum amount of 5.2%, fermentation temperature of

37.4 °C, and fermentation time of 29.6 h. The comprehensive score was 91, and the enzyme activity of nattokinase under this fermentation process condition was 226.17 FU/mL, which was basically in line with the predicted value.

(3) Protein content, polypeptides and polyphenols of fermented natto enzyme were measured. The protein content of natto enzyme was 1.89 ± 0.82 mg/mL, the polypeptide content was 8.34 ± 0.07 mg/mL, the polyphenol content was 4.58 ± 0.14 mg/mL, and the DPPH free radical scavenging effect was $24.31\pm1.83\%$. During the storage of nattokinase, the significantly changed enzyme activity of nattokinase was used as a quality indicator for the prediction of shelf-life. The shelf-life of nattokinase stored at 25 °C at room temperature was obtained to be 38 days.

KEY WORDS: ARTP mutation, nattokinase, natto complex enzyme, response surface optimization, storage stability

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
第 1 章 绪论	1
1.1 引言.....	1
1.2 纳豆芽孢杆菌的概述.....	1
1.2.1 纳豆菌的起源.....	1
1.2.2 纳豆菌的特点和生理功能.....	1
1.3 纳豆激酶的研究进展.....	2
1.3.1 纳豆激酶的溶栓功效.....	2
1.3.2 纳豆激酶的其他功效.....	3
1.3.3 纳豆激酶的增产	3
1.4 酵素.....	5
1.4.1 酵素概述.....	5
1.4.2 纳豆酵素研究现状.....	5
1.4.3 纳豆酵素产品贮藏稳定性.....	7
1.4.3.1 食品的保质期	7
1.4.3.2 纳豆酵素产品的保质期	7
1.4.4 预测货架期动力学模型的建立.....	8
1.5 研究意义及内容.....	8
1.5.1 研究意义.....	8
1.5.2 研究内容.....	9
第 2 章 基于 ARTP 技术选育纳豆激酶优势菌株.....	10
2.1 实验材料.....	10

2.1.1 菌种.....	10
2.1.2 主要试剂.....	10
2.1.3 主要仪器.....	10
2.1.4 培养基配方.....	11
2.1.5 主要溶液配方.....	11
2.2 实验方法.....	12
2.2.1 生长曲线的测定.....	12
2.2.2 ARTP 诱变.....	12
2.2.3 致死率曲线的测定.....	12
2.2.4 ARTP 诱变的初筛和复筛.....	12
2.2.5 遗传稳定性验证.....	13
2.2.6 纳豆激酶的表达鉴定.....	13
2.3 结果与分析.....	13
2.3.1 生长曲线的测定.....	13
2.3.2 致死率曲线的测定.....	14
2.3.3 ARTP 诱变的初筛和复筛.....	15
2.3.4 纳豆激酶的表达鉴定.....	15
2.3.5 遗传稳定性验证.....	16
2.4 本章小结.....	17
第3章 发酵基质的选择及纳豆复合酵素的发酵工艺优化.....	18
3.1 仪器与实验材料.....	18
3.2 实验方法.....	18
3.2.1 BSN-2 纳豆芽孢杆菌生长曲线的测定	18
3.2.2 纳豆复合酵素加工工艺流程及操作.....	19
3.2.3 pH 值的测定.....	19
3.2.4 发酵基质的选择.....	19
3.2.4.1 感官评价	19
3.2.4.2 纳豆激酶酶活力的测定	20
3.2.5 纳豆复合酵素发酵工艺单因素实验.....	20

3.2.6 纳豆复合酵素发酵工艺响应面优化实验.....	20
3.3 实验结果.....	21
3.3.1 BSN-2 纳豆芽孢杆菌生长曲线	21
3.3.2 发酵底物基质的选择结果分析.....	21
3.3.3 纳豆复合酵素发酵工艺单因素实验.....	23
3.3.3.1 核桃浆液百分比对纳豆酵素品质的影响	23
3.3.3.2 接种量对纳豆酵素品质的影响	24
3.3.3.3 发酵温度对纳豆酵素品质的影响	25
3.3.3.4 发酵时间对纳豆酵素品质的影响	25
3.3.4 纳豆复合酵素发酵工艺响应面优化实验.....	26
3.4 本章小结.....	29
第 4 章 纳豆复合酵素的品质和贮藏稳定性研究.....	31
4.1 引言.....	31
4.2 仪器与实验材料.....	31
4.2.1 实验仪器.....	31
4.2.2 实验材料.....	31
4.3 实验方法.....	32
4.3.1 蛋白质含量测定.....	32
4.3.2 多肽含量测定.....	32
4.3.3 DPPH 自由基清除作用的测定	32
4.3.4 多酚含量的测定.....	32
4.3.5 琼脂糖-纤维蛋白平板的制备	33
4.3.6 贮藏温度的影响.....	33
4.3.7 各指标数值的测定.....	33
4.3.7.1 纳豆激酶酶活力的测定.....	33
4.3.7.2 大肠杆菌和霉菌的测定方法.....	33
4.3.7.3 综合得分.....	33
4.3.7.4 货架期动力学模型的建立	33
4.3.7.5 纳豆复合酵素的货架期预测公式	34

4.4 结果与分析.....	34
4.4.1 纳豆酵素主要成分含量测定.....	34
4.4.2 溶栓作用的研究.....	36
4.4.3 纳豆复合酵素在不同贮藏温度下的品质指标变化.....	36
4.4.4 温度指标变化的货架期动力学模型的建立.....	38
4.4.5 货架期的计算.....	40
4.4.6 纳豆酵素预测货架期动力学模型的验证实验与评价.....	40
4.5 本章小结.....	41
第 5 章 结论与展望.....	42
5.1 结论.....	42
5.2 展望.....	42
参考文献.....	44
攻读学位期间发表的学术论文目录及获奖情况.....	52
致 谢.....	53

第1章 绪论

1.1 引言

随着经济的快速发展,人们生活水平的提高,购买营养保健食品已经成为很多消费者的生活习惯,有助于预防人类面临的诸多重大健康问题。心血管疾病仍旧是威胁世界人民健康的疾病之首,血栓导致的中风、缺血性脑卒中和心肌梗塞等病例也在逐年增加^[1],并呈现低龄化趋势,形势严峻不容忽视。目前市场使用的溶栓类药物大多属于无法直接溶解血栓中的纤维蛋白的纤溶酶原激活型^[1,2]。

纳豆激酶最早发现于发酵后的大豆中,具有溶栓特性,日本学者 Dr. Hiroyuki-Sumi 将其命名为纳豆激酶(NK),它可直接与纤维蛋白交联降解血栓,溶栓功效是尿激酶的 19 倍^[3]。相同剂量下,纳豆激酶不易破坏正常的凝血机制引发出血,具有临床现有溶栓剂所缺少的优点^[1]。除此之外,纳豆中富含其它多种生物活性物质,如超氧化物歧化酶、维生素 K、异黄酮、和 γ -多聚谷氨酸等^[4,5]。虽然纳豆营养丰富,但也有其无法避免的局限性,其固有的气味和口感影响了消费者的食欲^[6]。因此,减少纳豆中的氨腥味,研发获得消费者认可的纳豆保健产品是目前研究的热点。

1.2 纳豆芽孢杆菌的概述

1.2.1 纳豆菌的起源

蒸煮后的黄豆用稻草包裹,在 40 °C 下发酵,可得到表面附着有白色薄膜且拉丝的传统发酵产品,纳豆。在 1905 年,尺村学者将纳豆中可产生纳豆黏液物质的菌,命名为纳豆芽孢杆菌^[7]。在 1921 年,半淘博士成功从纳豆中培养分离出纯种纳豆菌(*Bacillus natto* No.1),实现了纳豆芽孢杆菌的商品化应用^[8]。在益生菌的应用市场中,与纳豆芽孢杆菌有关的产品种类占比较高,广泛应用于食品、饲料和健康保健等行业,具有巨大的潜力和市场前景^[9]。

1.2.2 纳豆菌的特点和生理功能

纳豆芽孢杆菌存在于纳豆等传统发酵食品中,是枯草芽孢杆菌纳豆菌亚种,好氧的革兰阳性菌,菌落多呈圆形,表面粗糙不透明,细胞呈杆状,菌体有鞭毛,可运动,极端条件下产芽孢^[9-11]。纳豆芽孢杆菌和枯草芽孢的鉴定,可取决于菌株生长是否需要生物素,需要生物素才正常生长的为纳豆芽孢杆菌。纳豆芽孢杆

菌的最适生长环境为 37 °C、最适 pH 7.0-7.5，当其处于 5-55 °C 温度时仍可生长繁殖^[12]。孢子型的纳豆菌是具有耐酸、耐热特性的有益菌，因此可抵抗胃酸的强酸条件，同时具有强力的病原菌抑制能力^[13]。综上所述，纳豆芽孢杆菌可作为研发微生态制剂的首选菌株之一。

Bacillus natto 是 *Bacillus subtilis* 中首个实现基因组测序的成员。Kamada 等对纳豆芽孢杆菌 BES-T195 进行基因组测序，获取了高质量的全基因组，并在新基因组中较之前报道存在缺陷的序列，发现了 330 个新基因，包括转座子编码基因和 *B. subtilis* 168 同源基因^[14]。纳豆芽孢杆菌发酵后可获得具有高效溶栓特性的纳豆激酶，许多学者利用基因工程和代谢工程的手段对纳豆芽孢杆菌进行改造，实现纳豆激酶基因的克隆表达，以提高纳豆激酶的含量^[15,16]。韩宇星等利用同源重组技术，敲除纳豆芽孢杆菌中 γ -PGA 合成的关键基因 *pgsB*，降低了发酵液黏度和 γ -PGA 含量，使后续纳豆激酶分离纯化效率提高^[15]。冯浩等人通过同源重组实现了纳豆激酶 *aprN* 基因在乳酸乳球菌中的表达^[16]。

据报道，纳豆芽孢杆菌被用作益生菌已有至少 60 年的历史，1958 年该菌被注册为药用补充剂^[17]。纳豆芽孢杆菌可高产酶(包括多肽、抗生素、细菌素和类细菌素)、分泌抗菌肽、产孢子，由于其易于培养生长和营养利用的多样性，被认为是人类和动物理想的多功能益生菌。黄豆经纳豆菌发酵后的纳豆，可产生多种活性物质如纳豆激酶、 γ -多聚谷氨酸、血管紧张转化肽、皂苷素、异黄酮、维生素 K₂ 及 α -生育酚等^[18,19]。纳豆漫长的食用历史是 *Bacillus natto* 成为益生菌放心使用的佐证。

1.3 纳豆激酶的研究进展

1.3.1 纳豆激酶的溶栓功效

纳豆激酶最早发现于发酵后的纳豆中，是一种碱性丝氨酸蛋白酶，具有良好的溶栓作用。纳豆激酶主要由芽孢杆菌发酵产生，某些海洋生物和假单胞菌等也可经发酵后生成纳豆激酶^[20,21]。心血管疾病依旧是威胁世界人民健康的疾病之首，血栓所导致的中风、缺血性脑卒中和心肌梗塞等病例也在逐年增加^[1]，并呈现低龄化趋势，形势严峻不容忽视。而市场使用的溶栓类药物：尿激酶、链激酶和组织型纤溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, t-PA)等均存在不同的副作用，如尿激酶具有良好的溶栓效果，由于对纤维蛋白无特异性，临床使用时与链激酶

类似易导致患者全身纤溶,增加出血的风险且效率低^[22]。t-PA 虽可选择性发挥溶栓作用,但其半衰期短且使用时需加大剂量和反复使用,增加治疗成本和出血风险^[22]。与传统溶栓药物比较,纳豆激酶可以直接与纤维蛋白交联降解血栓,相同剂量下,纳豆激酶不易破坏正常的凝血机制引发出血,用药风险较低,并且纳豆激酶可从不同溶栓机制发挥溶栓功效,溶栓效率高是尿激酶的 19 倍,具有目前临床溶栓剂所缺少的优点^[23],是一种潜在的低成本、无副作用的溶栓药物,已被作为功能性食品或膳食补充剂引入消费市场。

1.3.2 纳豆激酶的其他功效

除此之外,纳豆激酶还具有多种药理作用,如改善微循环降血压、抗凝、预防动脉粥样硬化、降脂、抗癌、抑制炎症和氧化应激等^[23-25]。Kim 等^[26]研究发现,增加纳豆激酶补充剂的摄入量可在预防和治疗高血压方面发挥重要作用。Ren^[27]等临床研究表明,口服纳豆激酶是控制动脉粥样硬化程度的有效方法,可能是作为他汀类药物的良好替代品。Zhang 等^[28]研究表明,纳豆激酶可降解内在肿瘤物理微环境的细胞外基质成分的纤连蛋白,抑制癌症相关成纤维细胞的纤维化,进而降低肿瘤硬度,增强实体瘤治疗效果。Liang 等^[29]成功构建具有纳豆激酶表达能力的重组大肠杆菌,发现重组菌中缓解结肠炎小鼠的临床症状和病理异常效果优于原始大肠杆菌。

1.3.3 纳豆激酶的增产

纳豆激酶作为溶栓药物、功能性食品或膳食补充剂使用存在巨大的应用市场,由于其产量低,其防治效果并不明显。纳豆激酶的获取的方式主要通过微生物发酵。近年来研究者集中于利用各种手段提高其产量,主要包括以下几个方面:通过从自然界中筛选高产菌株、传统诱变育种技术筛选高产菌株、针对培养基和发酵条件的优化、基因工程技术和选择低成本发酵原料。

(1) 诱变育种技术

诱变育种是指利用物理或化学等因素诱发生物体内基因突变,并通过一定手段筛选获得目的突变株的技术。紫外诱变是在育种中经常采用且成效显著的一种诱变手段^[30]。常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变是一种高效的微生物诱变方法,利用等离子体中存在的活性粒子轰击于菌体,造成菌体的基因损伤,使微生物产生突变^[31,32]。与传统诱变方法相比,ARTP 易

获取高的诱变突变率, 操作简便和安全系数高等优点^[31,32]。薛健等^[33]将原始菌株制成菌悬液后, 使用 20 W 紫外灯照射 90 s, 采用紫外线诱变的方法, 经初筛和纤维蛋白平板检测, 获得一株纳豆激酶酶活为 498.84 U/mL 的高产菌株, 较原始菌株提高了 6.78%。Wang X 等^[34]采用 ARTP 诱变的方法筛选出两株菌, 突变株的酶活分别提高了 19%和 30%, 经氨基酸序列比对, 发现突变株的几个核苷酸发生改变。Wang YX 等^[35]人利用紫外结合 Co-60- γ 射线筛选获得突变型(JNFE1126)枯草芽孢杆菌株, 突变株的 NK 产量是野生菌株的 2 倍。

(2) 针对培养基和发酵条件的优化

从自然界筛选生产纳豆激酶的菌株产量较低, 因此针对纳豆激酶发酵工艺条件的优化, 在提高 NK 产量、简化操作和降低成本等方面具有重要意义。Mahajan 等^[36]通过优化培养基成分提高纳豆激酶产量, 利用非结构化数学模型, 用于摇瓶分批发酵动力学和发酵罐水平纳豆激酶的动力学, 实现摇瓶中 NK 的产量从 188 ± 2.4 增加至 1190.68 ± 11 U/mL, 发酵罐中 NK 的产量提高到 1932 U/mL, 是摇瓶发酵的 1.6 倍。Ku TW 等^[37]以接种量、葡萄糖浓度和脱脂大豆浓度为 3 个自变量, 纳豆激酶为响应值, 通过响应面优化发现, 当接种量 4.00%、葡萄糖 1.75% 和脱脂大豆 2.93%时, 最大纳豆激酶酶活 13.78 U/mL。

(3) 基因工程技术

随着分子生物技术的发展, 利用基因工程和蛋白质工程, 已成功实现纳豆激酶编码基因 *aprN* 在枯草芽孢杆菌、毕赤酵母、乳酸乳杆菌和大肠杆菌等宿主菌中的克隆表达^[16,38,39], 实现 NK 的增产。Akhilesh Modi 等^[38]人将纳豆激酶基因连接克隆到 pET32a 载体中, 并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中成功表达该蛋白。于晓淼等^[40]使用重叠延伸 PCR 法将 NK 中位于 194 位的 Ser 替换为 Pro, 得到突变体 S194P, 突变株的 NK 酶活力 123.23 IU/mL, 较野生型菌株提高约 18%, 并且突变株的蛋白结构发生改变, 提高了 NK 的热稳定性。Yan 等^[41]在毕赤酵母中实现了纳豆激酶高水平的异源表达, 摇瓶发酵的目标蛋白产量为 320 mg/L, 高密度发酵的目标蛋白产量约为 9.5 g/L, 重组的纳豆激酶具有较高的热稳定性和 pH 值稳定性。

(4) 选择低成本发酵原料

纳豆激酶的应用前景广泛, 需求量较大, 以豆类等作为发酵培养基虽能实现

纳豆激酶的高效生产,但在工业化生产应用时,豆类原料的使用成本较高,因此使用低成本原材料生产纳豆激酶的研究非常必要,有利于解决工业资源的浪费^[42]。Li T 等^[43]人用豆腐废水替代原培养基中的氮源,通过优化培养基和培养参数,将纳豆激酶活力提高了 19.25%,使用 100 L 生物反应器放大实验,相比摇瓶发酵 NK 活力提高了 47.89%,满足低成本发酵的同时,解决了豆腐废水造成的环境污染问题。

1.4 酵素

1.4.1 酵素概述

酵素产品是利用动物、植物和水果等多种生物原料,经过菌体发酵,获得的天然活性物质,能在特定条件下催化生化反应的可食用产品^[44,45]。酵素产品可根据来源,分为动物酵素和植物酵素。动物酵素主要来自动物的消化系统,如鸡蛋白酶、胃蛋白酶等;植物酵素则来自植物的果实、根茎等部位,如木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶等^[46]。根据酵素的化学性质,可分为蛋白酶和碳水化合物酶等,前者可催化蛋白质的水解,如胃蛋白酶、胰蛋白酶等;后者可催化碳水化合物的代谢,如麦芽糖酶等。王贝贝等^[47]以小白杏为主要原料,西瓜、番茄、黄瓜和苹果为辅材,制备小白杏复合果蔬酵素,该酵素 DPPH 自由基的清除率为 $81.9\% \pm 2.13\%$,酵素的色泽淡黄透亮、酸甜适中,具有浓郁果香味。杨彬彦等^[45]以蓝莓为主要原料,接种酵母菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌,以超氧化物歧化酶(SOD)酶活性为评价指标,通过均匀设计试验和响应面试验确定了制备蓝莓酵素的最佳发酵条件,此时蓝莓酵素的 SOD 酶活性为 103.01 U/mL。酵素在食品加工和医药保健等多个领域具有应用潜力,被广泛应用于食品加工、生物技术、医学和农业等方面,发挥着重要作用。

1.4.2 纳豆酵素研究现状

纳豆中含有多种活性物质,具有极高的营养保健功效,但也存在某些缺点。纳豆发酵后会产生氨味等特殊气味,导致其不被消费者喜好,限制了纳豆产品在全球范围内的普及,因此,降低纳豆中特殊氨臭味成为了研究的热点^[6]。目前大多数研究注重于新型纳豆产品的研发,期望在保留纳豆的健康功效的同时,通过创新的加工技术和配方,以满足不同消费者群体对纳豆产品的需求和口味偏好。纳豆产品的多元化,容易为纳豆产品市场带来新的活力。新型纳豆产品的研发主

要分为以下方面：

（1）混菌发酵

选择不同的菌种进行混合发酵，可以充分利用不同菌种的代谢能力，缩短发酵时间，提高发酵效率和优化产品品质，生产出具有不同风味和营养价值的产品^[48,49]。Zhang 等^[50]人从传统发酵纳豆中分离出一株 *Bacillus subtilis* 菌株，制备一款具备溶解血栓功效的发酵乳制品食品，发酵乳的溶栓活性最高为 3511 U/mL。聂萌滋等^[51]人以纳豆芽孢杆菌和马克斯克鲁维酵母混合发酵，以 NK 酶活力及感官评价得分为品质指标，优化纳豆产品的发酵工艺条件，发现马克斯克鲁维酵母和纳豆芽孢杆菌复合发酵可改善纳豆的发酵风味。总之，混菌发酵是一种具有潜力的高效生产技术，可以提高纳豆产品的品质和多样性，为纳豆产业的发展带来积极的影响^[52]。

（2）发酵基质

传统纳豆的制备原料为大豆，不仅成本高，发酵后携带的特殊氨味尤为明显，因此不少研究集中于改变发酵基质或添加其他辅材以开发新型纳豆产品。发酵基质的改变使纳豆产品富含不同种类的营养物质和功能，如维生素、矿物质、膳食纤维及抗氧化性能等^[53,54]。张海粟^[53]以箭筈豌豆为发酵原料，生产纳豆产品，响应面试验确定制备箭筈豌豆纳豆的最佳发酵工艺，当发酵温度为 36.8 °C，接种量为 3.1%，发酵时间为 26.7 h 时，发酵后箭筈豌豆纳豆口感略硬，氨味较小，有独特的香味，纳豆激酶酶活为 314.06 U/mL。石晓丹以市售奶粉和黄豆作为原材料，接种 *Bacillus natto* 菌株制备了新款的纳豆饮料，并对该饮料的发酵工艺和品质进行研究，优化后的饮品风味良好，纳豆激酶酶活高达 205.46 U/mL，黄酮含量达 3.29 mg/mL，多酚 5.45 mg/mL^[54]。综上所述，通过改变纳豆的发酵基质，可为纳豆产品带来多方面的优点，包括口感风味的创新，营养价值的提升和适用人群的扩大等方面的优势，有助于推动纳豆产品的发展和市场普及。

（3）添加调味品

调味品可加入食品或饮料中，用于增加食物口味、改善食物味道或增添食物风味的物质。孙娜^[55]以低温核桃粕和黄豆为主要原料，添加辣椒粉 8.5%、食盐 3.1%、花椒粉 2.4%、茴香粉 0.2%、丁香粉 0.1%和八角粉添加量 0.1%等调味品，使固态纳豆调味品色泽红亮、椒麻鲜香、氨味低，挥发性风味物质丰富。徐昂^[56]

等以纳豆发酵液，蜂蜜为辅料，添加柠檬酸、 β -环糊精等调味品得一款具有纳豆风味的调配饮料，确定最佳配比为：纳豆黏液 1.5%，蜂蜜 20%，柠檬酸 0.15%， β -环糊精 0.08%，研制的产品具有纳豆和蜂蜜风味，酸甜适中，有较好的保健功能以及广阔的市场开发前景。

（4）产品类型

纳豆产品类型丰富多样，主要包括传统纳豆、纳豆冰淇淋、纳豆粉、纳豆饮料和纳豆胶囊等。Li G 等^[57]人的研究通过优化喷雾干燥微胶囊化工艺，成功开发出高活性、高质量且具有较强储存稳定性的纳豆激酶粉末，贮存 30 天后，纳豆激酶粉仍呈白色或淡黄色，有特殊气味但无异味和糊味，为纳豆激酶的进一步工业化和应用提供了坚实的基础。根据任锡雯等^[58]的研究结果，基于新型发酵纳豆，发现添加 1.10 g 橙味果珍粉、滤液稀释 1.50 倍和静置 12.5 min 后的纳豆激酶滤液的调配效果最佳，口感优异，无氨臭味。孙娜等^[59]的研究开发了一种功能性纳豆激酶粗提物泡腾片，以感官评价为考察指标，所制泡腾片片剂表面光滑、口感良好、具有纳豆激酶粗提物独特气味，感官评价分较高纳豆激酶活力为 298.20 ± 1.15 U/g，所有质量指标均符合中国药典规定。

1.4.3 纳豆酵素产品贮藏稳定性

1.4.3.1 食品的保质期

食品的保质期是指在规定储存条件下，食品保持最佳品质和食用安全性的期限^[60]。保质期可通过对食品储存稳定性和加速测试确定，保证了食品在未开封且储存条件正确的情况下，能够保持其原有的色泽、口感、营养价值和微生物安全性。

1.4.3.2 纳豆酵素产品的保质期

酵素的保质期是指酵素在适宜的存储条件下能够保持其特有活性的时间。其保质期取决于其类型、储存条件和生产工艺等因素。纳豆酵素产品评价其品质指标主要包括感官评价、菌落总数和纳豆激酶活力等。感官评价是通过人们的视觉、嗅觉、口味、触觉等对产品进行综合感知和定性定量的评判的过程^[61]。测定食品中的菌落总数是评估食品细菌污染程度的一种重要方法，可有效防止消化道传染病病原菌和食物中毒病原菌的污染，并被广泛用于食品卫生检验和货架期的预测实验^[62,63]。纳豆激酶酶活力是评价纳豆酵素品质变化的重要因素，与感官评价存在

重要关联。

1.4.4 预测货架期动力学模型的建立

食品在不同条件下的储存稳定性和变化规律的研究,可有效延长食品的保质期,确保产品在生产、运输和销售中保持最佳的品质和安全性,因此研究食品的货架期对食品行业发展尤为重要。预测食品货架期动力学模型的建立是一个复杂的过程,需要考虑食品的成分、质地等多种因素。动力学模型拟合被广泛应用于食品贮藏中品质变化和货架期预测,目前大都采用一级动力学模型和 Arrhenius 方程进行品质的分析及货架期的预测^[64,65]。游静等^[65]通过 D-最优混料设计方法和模糊感官评定法对芝麻巧克力棒的配方进行优化,利用 Arrhenius 公式预测出芝麻巧克力棒在常温下的货架期为 256 d,为芝麻巧克力棒的标准化生产提供技术支持。殷献华等^[66]结合食品动力学和 Arrhenius 方程,发现 9 °C 的贮藏温度能很好维持酸乳品质,减缓 pH 值和酸度的变化。一级动力学方程及 Arrhenius 方程如公式 1-1 和 1-2 所示。

$$A = A_0 e^{kt} \quad (1-1)$$

其中 A 是储藏 t 天的对应指标数值; A₀ 是储藏前的初始对应指标值; k 是反应速率常数, t 是储藏时间。

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{R \times T} \quad (1-2)$$

其中 k 和 k₀ 均为常数; E_a 属于活化能(KJ/mol); T 是绝对温度(K); R 属于气体常数为 8.314 J/(mol·K)。

1.5 研究意义及内容

1.5.1 研究意义

随着经济的快速发展,人们生活水平的提高,购买营养保健食品已经成为很多消费者的生活习惯,有助于预防人类面临的诸多重大健康问题。心血管疾病是全球范围导致人类死亡的主要原因之一^[25],因此心血管疾病的预防和治疗对人类健康至关重要。纳豆中的纳豆激酶具有良好的溶栓功效,可以直接与纤维蛋白交联降解血栓,相同剂量下,纳豆激酶不易破坏正常的凝血机制引发出血,用药风险较低且溶栓效率高。纳豆中还具有多种活性物质如 γ-多聚谷氨酸、异黄酮、维生素 K₂ 等,具有极高的营养保健功效,但由于纳豆激酶产量较低、生产成本较高和具有特殊的氨臭味,导致该产品不被消费者广知和喜好,限制纳豆产品在

全球市场范围内的普及。本研究以豆浆和核桃浆发酵基质研发了一种新型纳豆复合酵素，改善纳豆酵素口味的同时，丰富了酵素产品的营养物质和功能，有助于适用人群的扩大，推动纳豆产品的发展和市场普及。

1.5.2 研究内容

(1) 纳豆激酶高产菌株的筛选。以实验室贮藏的纳豆芽孢杆菌为出发菌株，采用 ARTP 诱变，结合脱脂牛奶平板初筛和紫外分光光度法检测酶活复筛，筛选出其中 NK 酶活最高的 *Bacillus natto* 菌株 (BSN-2)，以 BSN-2 作为纳豆酵素的发酵菌株。

(2) 纳豆复合酵素的制备以大豆为主，分别辅以五种不同的基质：山楂、陈皮、红枣、茶叶、核桃，接种 BSN-2 菌株发酵，研究不同发酵基质对纳豆酵素口感和品质的影响。以纳豆激酶的酶活力和感官评价为主要指标，筛选出最佳的发酵基质。其次以纳豆激酶酶活、感官评价和综合得分为指标，核桃浆液百分比、接种量、发酵温度和发酵时间为因素进行单因素实验，采用响应面试验确定制备纳豆复合酵素的最佳发酵工艺条件。

(3) 纳豆酵素的品质测定和货架期预测。对纳豆酵素中蛋白质含量、多肽、多酚等物质进行测定。将一级方程与 Arrhenius 方程结合，以纳豆激酶酶活力和菌落总数指标结合综合得分，预测纳豆复合酵素在不同温度下的货架期。

本文通过上述研究探索，开发了一种新型纳豆复合酵素产品，在提高纳豆激酶酶活力的同时，改善纳豆产品中特有的氨臭味问题。有利于研发出营养丰富且产氨量较少，符合国人口味的纳豆产品。

第2章 基于 ARTP 技术选育纳豆激酶优势菌株

纳豆激酶具有多种活性物质，但其产量低，防治效果并不明显。因此，纳豆激酶活力的高低对于纳豆市场的广泛应用至关重要。ARTP 诱变是一种高效的微生物诱变方法，利用等离子体中存在的活性粒子轰击菌体，造成菌体的基因损伤，使微生物产生突变^[31]。与传统诱变方法相比，ARTP 易获取高的诱变突变率，操作简便和安全系数高等优点。本章以实验室贮藏的纳豆芽孢杆菌 BSN-1 为出发菌株，采用 ARTP 诱变，结合牛奶平板初筛和紫外分光光度法检测复筛，从中选择纳豆激酶产量最高的纳豆芽孢杆菌 BSN-2，作为后续实验的菌种。

2.1 实验材料

2.1.1 菌种

纳豆芽孢杆菌为本实验保存菌株。

2.1.2 主要试剂

表 2-1 主要实验试剂
Table 2-1 Main experimental reagents

药品名称	型号	生产厂家
胰蛋白胨	BR	上海生工生物
酵母提取物	BR	上海生工生物
NaCl、甘油	AR	国药集团化学试剂
琼脂粉、牛肉膏	BR	国药集团化学试剂
凝血酶	BR	麦克林
纤维蛋白原	BR	翌圣生物
三氯乙酸	AR	国药集团化学试剂
考马斯亮蓝 G-250	BR	国药集团化学试剂

2.1.3 主要仪器

表 2-2 主要实验仪器
Table 2-2 Main experimental instruments

主要仪器名称	型号	生产厂家
--------	----	------

电子天平	TLE104E	梅特勒-托利多仪器
数显磁力搅拌器	SCI-PB	上海科雅生物科技
实验室 pH 计	BPH-600/610CK	贝尔分析仪器
ARTP 诱变	ARTP-IIS	源清天木生物科技
双人单面净化工作台	SW—CJ—2FD	苏州净化设备
立式振荡培养摇床	THZ-98AB	上海一恒科学仪器
离心机	Microfuge 20	贝克曼库尔特仪器
紫外分光光度计	UV-5500PC	上海元析仪器

2.1.4 培养基配方

LB 固体培养基 (g/L): NaCl 10、酵母粉 10、琼脂 20、胰蛋白胨 10, pH 调至 7.0-7.2。

种子培养基 (g/L): LB 固体培养基不添加琼脂。

脱脂牛奶培养基 (g/L): 牛肉膏 3、蛋白胨 10、NaCl 5、脱脂奶粉 10-12、pH 7.2。

发酵培养基 (g/L): 大豆蛋白胨 50、胰蛋白胨 20、酵母提取物 20、甘油 50、 K_2HPO_4 3.86、 KH_2PO_4 1.62、 $CaCl_2$ 0.2、 $MgCl_2$ 0.3, pH 调至 7.0, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

2.1.5 主要溶液配方

磷酸盐缓冲液: NaH_2PO_4 0.2 g、 Na_2HPO_4 、NaCl 8.5 g, 加蒸馏水定容 1 L, pH 调节至 7.4。

0.15%纤维蛋白原溶液: 取 450 mg 纤维蛋白原, 溶于 300 mL 磷酸盐缓冲液, 37 °C 孵育 20 min。

6 M 三氯乙酸: 取 5 g 三氯乙酸, 定容 5 mL, 置于避光 4 °C 下保存。

尿素和硫脲混合液: 称取 96 g 尿素和 30 g 硫脲, 加水定容 200 mL, 常温保存。

30%聚丙烯酰胺溶液: 准确称取 58 g 丙烯酰胺, 2 g N,N'-亚甲叉双丙烯酰胺, 加水定容 200 mL 备用。

5×电泳缓冲液: 称取 15.1 g Tris, 72 g 甘氨酸, 5 g SDS, 加水定容 1 L 备用。

考马斯亮蓝 G-250 染色液: 称取 1 g 的考马斯亮蓝 G-250, 加入 250 mL 异

丙醇，100 mL 冰乙酸，加水定容 1 L 抽滤后备用。

脱色液：取 50 mL 乙醇，100 mL 冰醋酸，加水定容 1 L 备用。

2.2 实验方法

2.2.1 生长曲线的测定

挑取固体培养基上的单菌落接种于 50 mL 的种子培养基中，置于摇床 37 °C 220 rpm 培养，每 2 h 取样，适当稀释后，使 OD₆₀₀ 读数在 0.6-0.8 之间，每组实验做 3 次平行。以时间 (h) 为横轴，OD₆₀₀ 值为纵轴绘制菌体的生长曲线。

2.2.2 ARTP 诱变^[67]

取 BSN-1 菌种活化涂布于 LB 固体培养基，挑单菌落至 50 mL 的种子培养基，37 °C，220 rpm 培养 12 h，到达生长对数期。取上述菌液 1 mL，4 °C，5000 r/min 离心 5 min，弃去培养基。使用无菌生理盐水 (0.9% NaCl) 洗涤菌体 2 次。最后加入 1 mL 无菌生理盐水制成菌悬液。

取 10 μL 的菌悬液均匀涂布于无菌小铁片上，载台下放置 EP 管，内装 990 μL 无菌生理盐水，置 ARTP 工作台内分别诱变处理 0、30、50、70、90、110 s。避光置于冰箱 2 h。在无光条件下，把经诱变的菌悬液按系列梯度稀释后，涂布在固体平板上，37 °C 倒置培养 12 h，每组梯度需重复 3 次。

2.2.3 致死率曲线的测定

选择 2.2.2 中平板菌落数目在 30-300 之间计数，获得不同诱变时间下对应的菌落数目，以诱变时间为 0 s 的菌悬液的平板菌落数作为对照，以对照平板与诱变平板上菌落的差值除以对照平板的菌落数目，可计算出诱变的致死率，结合正突变率可以确定最佳诱变时间^[68]。

2.2.4 ARTP 诱变的初筛和复筛

初筛：将 ARTP 诱变处理后的菌悬液适当稀释后涂布于脱脂牛奶平板上进行初筛。纳豆激酶为碱性蛋白酶，可分解牛奶平板中的酪蛋白形成透明圈，由产生的透明圈大小可判断蛋白酶活力的强弱。

将筛选出的产生透明圈较大的菌株，挑单菌落至种子培养基活化，接种于发酵培养基中，37 °C，220 rpm，发酵 24 h，取发酵液离心 (4 °C, 10000 r/min, 5 min) 后，得粗酶液，采用紫外分光光度法测定纳豆激酶活力^[69]：反应在 37 °C 下进行，空管内加 1.4 mL Tris-HCl 和 0.4 mL 纤维蛋白原，反应 5 min。加入 0.1 mL

凝血酶，反应 10 min 形成人工血栓。加入 100 μ L 样品溶解血栓反应 60 min。最后滴加 2 mL 三氯乙酸反应 20 min 终止。反应液离心后取上清液测 OD₂₇₅ 吸光度。酶活定义：每 min 在 OD₂₇₅ 时吸光值增加 0.01 所需的 NK 酶量定义为 1 个单位的纤维蛋白降解酶活力。

2.2.5 遗传稳定性验证

根据相关报道可知，诱变后的菌株经过连续传代后可能存在遗传不稳定情况^[70]。将通过 ARTP 诱变，并经历初筛和复筛筛选出的 BSN-2 菌株划线传代，在发酵培养基中发酵培养后，测定纳豆激酶酶活，验证 BSN-2 菌株的遗传稳定性。

2.2.6 纳豆激酶的表达鉴定

取离心后 0.9 mL 的上清液，加入 0.1 mL 的 6 M 三氯乙酸，混匀后 4 °C 过夜放置。继续离心弃上清，使用 0.5 mL 无水乙醇洗涤菌体，上述步骤重复进行 3 次^[71]。晾干后，加入 0.1 mL 的尿素和硫脲混合液和 5 $\times$ 的电泳上样缓冲液，沸水浴 10 min，可-20 °C 过夜放置备用^[71]。按表 2-3 方法制胶后，取-20 °C 冰箱中样品 10 μ L 上样，先使用 80 V 的电压电泳，当条带进入浓缩胶和分离胶界面时，电压调为 120 V，当条带抵达底部约 1 cm 时，停止电泳。

表 2-3 SDS-PAGE 制胶体系
Table 2-3 SDS-PAGE system for making gels

	12%分离胶（15 mL）	5%浓缩胶 6（mL）
dd H ₂ O	4.9 mL	4.05mL
30%丙烯酰胺溶液	6.0 mL	1 mL
Tris-HCl	pH 8.8 buffer 3.8 mL	pH 6.8 buffer 0.75 mL
10% SDS	0.15 mL	0.06 mL
10%过硫酸铵	0.15 mL	0.06 mL
TEMED	0.006 mL	0.006 mL

2.3 结果与分析

2.3.1 生长曲线的测定

由生长曲线图 2-1 可知，菌株的迟缓期较短，菌体在 6 h-14 h 进入对数生长期，此期间菌株生长代谢旺盛，适应力强，处于染色体时期的菌体更容易经诱变后产生突变，获得较高突变率^[72]。在 14 h-22 h 菌体处于稳定期，而在生长 22 h

后，菌体进入衰亡期。因此选择培养 12 h 后的菌液进行 ARTP 诱变处理。

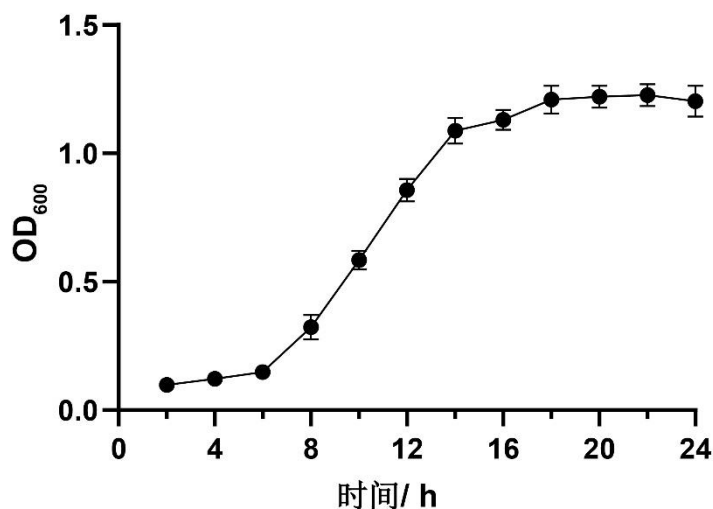


图 2-1 纳豆芽孢杆菌 BSN-1 的生长曲线

Figure 2-1 Growth curve of *Bacillus subtilis natto* BSN-1

2.3.2 致死率曲线的测定

经不同诱变时间处理的菌株 BSN-1 菌悬液梯度稀释，将稀释后的菌悬液涂布于 LB 固体平板上，37 °C 培养 12 h，统计菌落数目，菌落数目在 30-300 之间视为有效计数^[34]。根据图 2-2 结果可知，纳豆芽孢杆菌的致死率随诱变时间的增加而升高，当菌株的致死率值在 80-90% 左右时，正突变率较高^[68]。诱变时间为 90 s 时致死率在 85.63%，因此选择 90 s 为诱变处理时间。

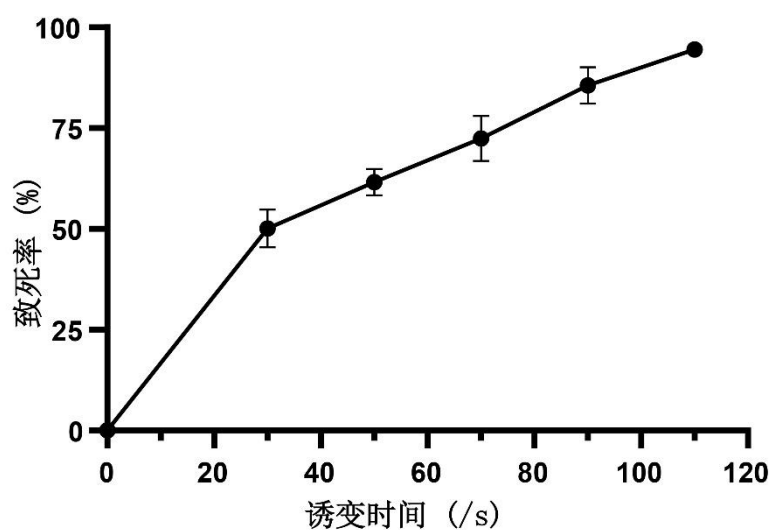


图 2-2 BSN-1 菌株诱变处理后的致死率曲线

Figure 2-2 Lethal chlorine curves after mutagenic treatment with strain BSN-1

2.3.3 ARTP 诱变的初筛和复筛

将 ARTP 诱变处理后的菌悬液适当稀释后涂布于牛奶脱脂牛奶平板上进行初筛。经过多批实验筛选,根据突变菌株与原始菌株在牛奶平板上透明圈的大小,如图 2-3 所示,筛选得到的 2 株透明圈较大的纳豆芽孢杆菌。将筛选得到 2 株菌株通过种子培养基活化后,接入发酵培养基,37 °C 发酵 24 h 后,测定纳豆激酶酶活力大小进行复筛,不同菌株的纳豆激酶酶活力大小见表 2-4,筛选到两株菌株的酶活分别为 119.2 ± 2.62 FU/mL 和 100.17 ± 2.99 FU/mL 的正突变株,前者菌株酶活与原始菌株 BSN-1 的 71 FU/mL 相比,纳豆激酶产量提高了约 67%,将纳豆激酶酶活力最高的菌株命名为 BSN-2。

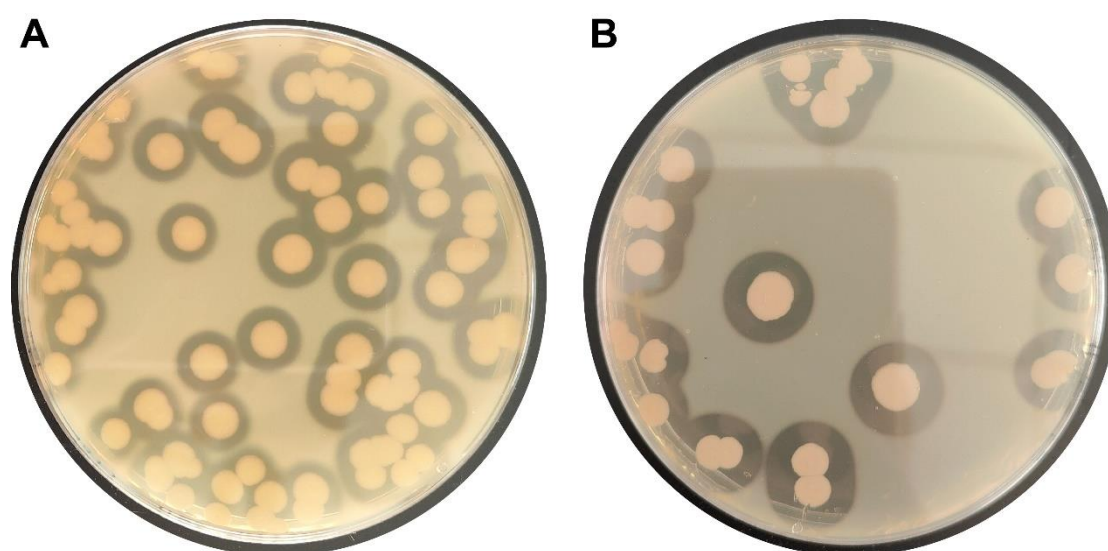


图 2-3 初筛透明圈大小 (A-原始菌株, B-诱变菌株)

Figure 2-3 Initial sieve transparent circle size (A- original strain, B- mutagenic strain)

表 2-4 原始菌株和诱变菌株的 NK 酶活

Table 2-4 NK enzyme activities of the original and mutant strains

	BSN-1	BSN-2	BSN-3
纳豆激酶酶活 (FU/mL)	71 ± 3.61	119.2 ± 2.62	100.17 ± 2.99

2.3.4 纳豆激酶的表达鉴定

如图 2-4 所示,1 和 2 泳道分别显示原始了菌株 BSN-1 和高产诱变菌株 BSN-2 发酵上清液的 SDS-PAGE 胶图。SDS-PAGE 显示两菌株生产的纳豆激酶的分子

量约为 28 kDa，与纳豆激酶理论的分子量 27 kDa 相符，并且诱变菌株 BSN-2 在约 28 kDa 条带处的宽度高于原始菌株 BSN-1，与紫外分光光度法测定纳豆激酶酶活力结果相一致。

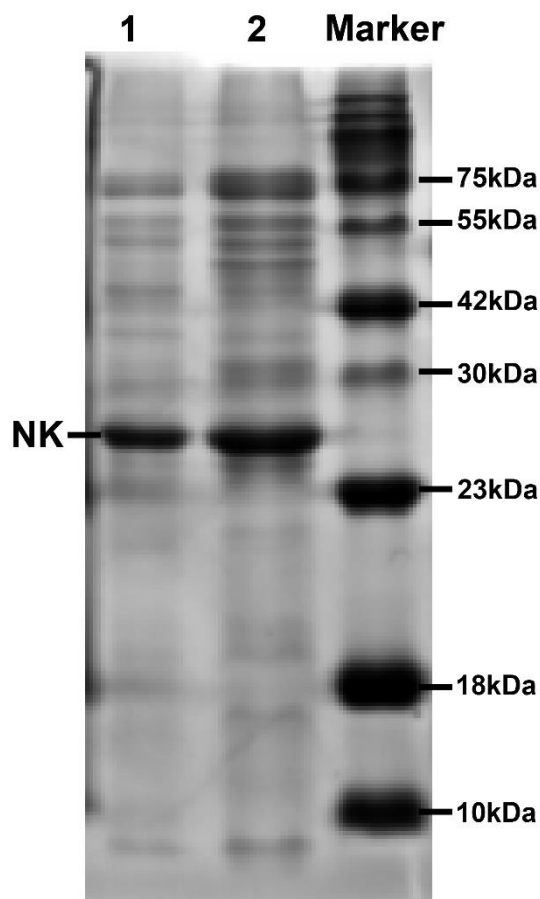


图 2-4 原始菌株 BSN-1 和高产诱变菌株 BSN-2 的 SDS-PAGE 胶图

Figure 2-4 SDS-PAGE gel plots of the original strain BSN-1 and the highly productive mutagenic strain BSN-2

2.3.5 遗传稳定性验证

将筛选得到的 BSN-2 高产菌株连续培养 5 代，接种于发酵培养基中发酵培养后，测定纳豆激酶酶活力。如图 2-5 所示，传代 5 代的 BSN-2 菌株，纳豆激酶酶活力大小基本在 111.6 FU/mL-121.8 FU/mL 之间，说明 BSN-2 菌株的遗传稳定性较好，可作为生产菌株，从而保证生产过程中的连续性和稳定性。

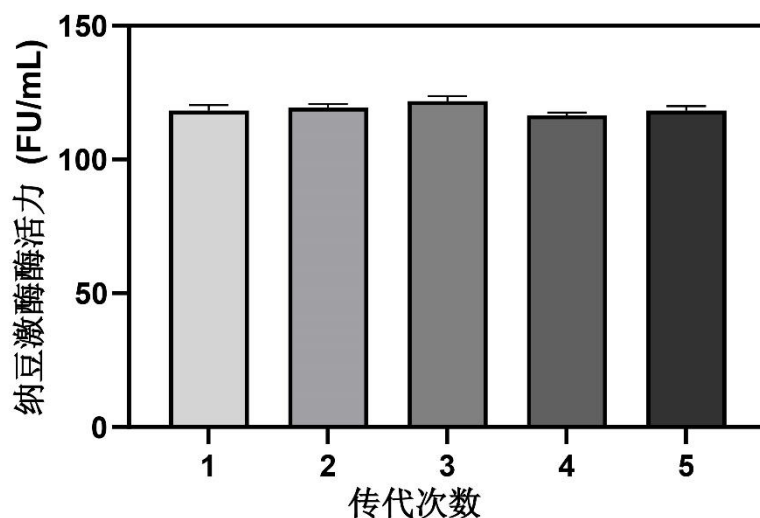


图 2-5 突变株 BSN-2 的遗传稳定性
Figure 2-5 Genetic stability of mutant BSN-2

2.4 本章小结

以实验室贮藏的纳豆芽孢杆菌 BSN-1 为出发菌株, 采用 ARTP 诱变, 利用牛奶平板, 根据透明圈的大小初筛, 采用紫外分光光度法测定纳豆激酶活力高低进行复筛, 筛选出一株纳豆激酶产量最高的纳豆芽孢杆菌 (BSN-2), 为 119.2 ± 2.62 FU/mL, 较 BSN-1 菌株的 NK 酶活力提高 67%。原始菌株 BSN-1 和诱变菌株 BSN-2 的发酵上清液 SDS-PAGE 胶图显示, 诱变菌株 BSN-2 在约 28 kDa 条带处的宽度高于原始菌株 BSN-1, 与紫外分光光度法测定纳豆激酶活力结果相一致, 可以判定本次筛菌结果的可靠性。五次连续传代结果, 表明 BSN-2 菌株的遗传稳定性较好。

第3章 发酵基质的选择及纳豆复合酵素的发酵工艺优化

纳豆中含有多种活性物质，具有极高的营养保健功效，但也存在某些缺点。纳豆发酵后会产生氨味等特殊气味，导致其不被消费者喜好，限制了纳豆产品在全球范围内的普及^[73]，因此降低纳豆中特殊氨臭味成为了目前研究的热点。新型纳豆产品的研发，应在保留纳豆的健康功效的同时，创新加工技术和配方，满足不同消费者群体的需求和口味偏好。

发酵基质的改变或辅料的添加在改善纳豆氨腥味的同时，可赋予纳豆产品富含不同功能的营养物质。本章以纳豆激酶酶活和感官评价为品质指标，从不同发酵基质中确定最佳的纳豆酵素发酵基质。利用单因素实验和响应面优化纳豆酵素发酵工艺，有利于纳豆产品的多元化，为纳豆产品市场带来新的活力。

3.1 仪器与实验材料

表 3-1 仪器与实验材料
Table 3-1 Instruments and laboratory materials

仪器与材料	厂家
粉碎机	万科仪器（常州）有限公司
山楂	同芙参茸制品有限公司
橙皮	同芙参茸制品有限公司
红枣	同芙参茸制品有限公司
普洱茶	云南茗重茶叶有限公司
核桃仁	河北鼎辉食品有限公司
黄豆	涑水县金谷粮油食品有限公司

注：其他药品如 2.1.2 所示

3.2 实验方法

3.2.1 BSN-2 纳豆芽孢杆菌生长曲线的测定

参考 2.2.1 生长曲线的测定。

3.2.2 纳豆复合酵素加工工艺流程及操作

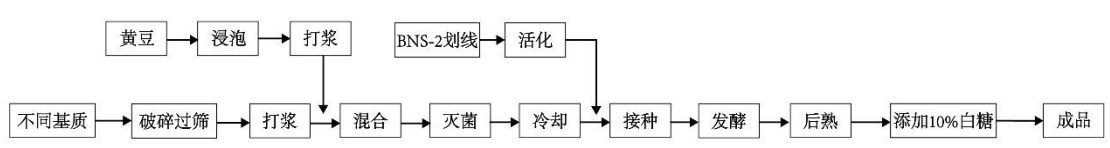


图 3-1 纳豆复合酵素加工工艺流程

Figure 3-1 Natto Complex Enzyme Processing Flow

挑取 100 g 无虫害的完整黄豆于清水洗净后，置于清水浸泡 12 h，加入 900 mL ddH₂O，打浆液备用。使用粉碎机分别将山楂、橙皮、红枣、茶叶和核桃(五种不同基质)等辅材粉碎，山楂、橙皮和茶叶 100 目过筛，红枣和核桃 40 目过筛，过筛后辅材：水=1:15，打浆过筛备用。分别按豆浆：辅材浆液=3:2，每瓶分装 100 mL，作为发酵培养基，115 °C灭菌 15 min，冷却后备用。

取第二章筛选到的诱变菌株 BSN-2 涂布于 LB 固体培养基上，挑单菌落至液体培养基活化 12 h，按 3%的接种量接种于发酵培养基，37 °C静置发酵 24 h。发酵完成可置于 4 °C冰箱后熟 12 h。

3.2.3 pH 值的测定

使用台式酸度计测定 pH 值，使用前需使用标准缓冲液进行校准。

3.2.4 发酵基质的选择

3.2.4.1 感官评价

由 9 位与食品专业相关的人员组成，从组织状态、气味、色泽和口感等四个方面对复合酵素进行评分。具体感官评价的标准见表 3-2（总分 100 分）。

表 3-2 纳豆酵素感官评价的标准

Table 3-2 Sensory Evaluation Criteria for Complex Natto Enzyme

分类	标准	分数
组织状态 (满分 25)	液体均匀细腻，无杂质	20~25
	液体均匀较细腻，无杂质	15~20
	液体均匀较细腻，有杂质	10~15
	液体不均匀，微有杂质	5~10
	液体不均匀，有明显杂质	<5
色泽 (满分 25)	色泽鲜亮	20~25
	色泽较鲜亮	15~20
	色泽不均匀	10~15

气味 (满分 25)	色泽暗淡	5~10
	无光泽, 色泽暗淡	<5
	无氨味, 有香味	20~25
	无氨味, 较香	15~20
	稍有氨味	10~15
	氨味重	5~10
口感 (满分 25)	有强烈氨味	<5
	酸、甜	20~25
	稍有酸、甜	15~20
	稍苦	10~15
	较苦	5~10
	苦涩	<5

其中综合评价参考孙娜^[74]的综合评价法, 综合评价=0.5×(纳豆激酶酶活力和纳豆激酶酶活力最大值的比值×100+感官评分)

3.2.4.2 纳豆激酶酶活力的测定

参考 2.2.4 复筛的方法。

3.2.5 纳豆复合酵素发酵工艺单因素实验

根据综合评价得分, 选择适宜的纳豆酵素发酵基质, 开发一款口味适宜的纳豆酵素产品。以发酵基质豆浆和核桃浆液比例=1:1、接种量 3%、发酵温度 37℃和发酵时间 48 h 作为初始发酵条件, 分别研究核桃浆液: 豆浆百分比(10%、20%、30%、40%、50%)、接种量(1%、3%、5%、7%、9%)、发酵温度(31℃、33℃、35℃、37℃、39℃)和发酵时间(12 h、24 h、36 h、48 h、56 h)各因素对纳豆复合酵素品质的影响, 每组实验重复三次。

3.2.6 纳豆复合酵素发酵工艺响应面优化实验

按照单因素实验的结果, 对黄豆与核桃浆液百分比(A)、接种量(B)、发酵温度(C)和发酵时间(D)四个因素为自变量, 综合得分(Y)为响应值, 设计合理高低水平表, 如表所示(表 3-3)。

表 3-3 响应面因素水平表

Table 3-3 Response surface factors and levels

水平	因素			
	A (浆液百分比) /%	B (接种量) /%	C (发酵温度) /°C	D (发酵时间) /h
-1	10	3	35	12
0	20	5	37	24
1	30	7	39	36

3.3 实验结果

3.3.1 BSN-2 菌株的生长曲线

已知, 菌株的生长曲线分为四个阶段, 迟缓期、对数生长期、稳定期和衰亡期。菌株 BSN-2 的生长曲线, 如图 3-2 所示, 该菌的生长曲线的走势基本符合细菌生长规律。在 0-6 h 时, BSN-2 菌株处于迟缓期, 菌液较澄清, 细菌进入新的培养基环境后, 需对环境进行适应, 迟缓期细菌生长微弱。随后在 6 h-14 h 进入对数生长期, 此期间菌株生长旺盛, 适应力强, 因此培养时间 12 h 的菌液适宜接种发酵。在 14 h-22 h 菌体处于稳定期, 此期间因摇瓶中营养物质损耗过高, 菌体的生长繁殖受限, 此期细菌增殖数与死亡数渐趋平衡^[75]。而在生长 22 h 后, 菌体的生理代谢活动趋于停滞, 进入衰亡期。

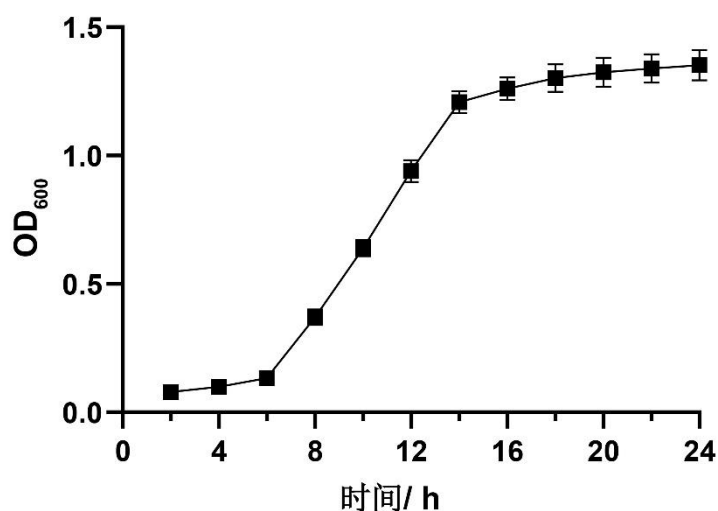


图 3-2 纳豆芽孢杆菌 BSN-2 的生长曲线

Figure 3-2 Growth curve of *Bacillus subtilis natto* BSN-2

3.3.2 发酵底物基质的选择结果分析

五种不同辅料与豆浆浆液分别混合作为发酵底物, 发酵过程中的 pH 值变化如图 3-3 所示, 五种不同发酵基质的纳豆酵素品质变化如图 3-4 所示。

以山楂为辅材的发酵培养基, 在培养 0 h-6 h 和 18 h-24 h 时, pH 出现下降,

培养基中未检测出纳豆激酶，感官评分和综合得分均较低。纳豆激酶未检出，可能是因为以山楂为基质的培养基初始 pH=4.83 过低，不适宜菌体生长发育。菌液长期处于低 pH 状态，影响纳豆激酶的合成和分泌。

以陈皮为辅材的发酵培养基，在培养 24 h 以内，pH 值保持下降趋势，纳豆激酶酶活力为 142.78 FU/mL，感官评分 59 和综合得分 79。以陈皮为基质的发酵液，异味不显著，但口感不佳。在培养期间 pH 值出现下降，可能是因为培养基中的蛋白质被菌体利用降解转化为各种 α -酮酸等，导致 pH 的下降^[76]。

以红枣为辅材的发酵培养基，在培养 0 h-6 h 和 18 h-24 h 时，pH 出现下降，纳豆激酶酶活力为 128.89 FU/mL，感官评分 75 和综合得分 77。该发酵液异味轻带有红枣香气，口感佳，但其纳豆激酶含量不高，以红枣为基质的糖分含量高，可能抑制了菌株中纳豆激酶的合成。

以茶叶为辅材的发酵培养基，在培养 0 h-12 h 和 18 h-24 h 时，pH 出现下降，在培养 12 h-18 h 时，pH 值出现上升，纳豆激酶酶活力为 163.89 FU/mL，感官评分 50 和综合得分 75。该发酵液的纳豆激酶含量最高，茶叶中含有丰富的氨基酸和蛋白质，有助于菌株的生长代谢。发酵期间 pH 值升高，该期间，菌体需要更多的必需蛋白质来维持生长代谢，氨基被释放，新形成的 α -酮酸被用来合成蛋白质，导致 pH 值升高^[76]。但该发酵液的口感苦涩，因此感官评分较低。

以核桃为辅材的发酵培养基，在培养 0 h-6 h 和 18 h-24 h 时，pH 出现下降，在培养 6 h-18 h 时，pH 值出现上升，纳豆激酶酶活力为 147.78 FU/mL，发酵液带有核桃的坚果香，氨臭味较低，因此感官评分 72 和综合得分 83 较高。

综上所述，结合感官评分和综合评分，选择以核桃和豆浆混合液为发酵培养基作为后续实验。

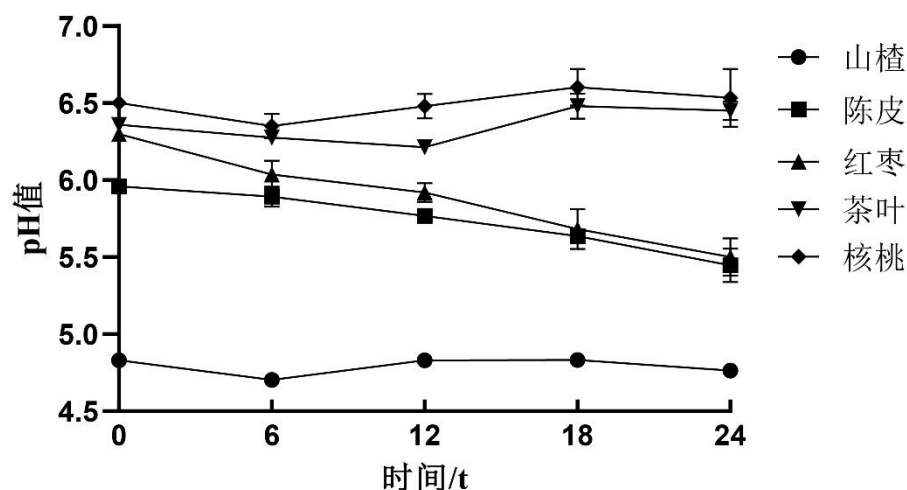


图 3-3 五种发酵基质发酵中 pH 值的变化

Figure 3-3 Changes in pH values during fermentation of five fermentation substrates

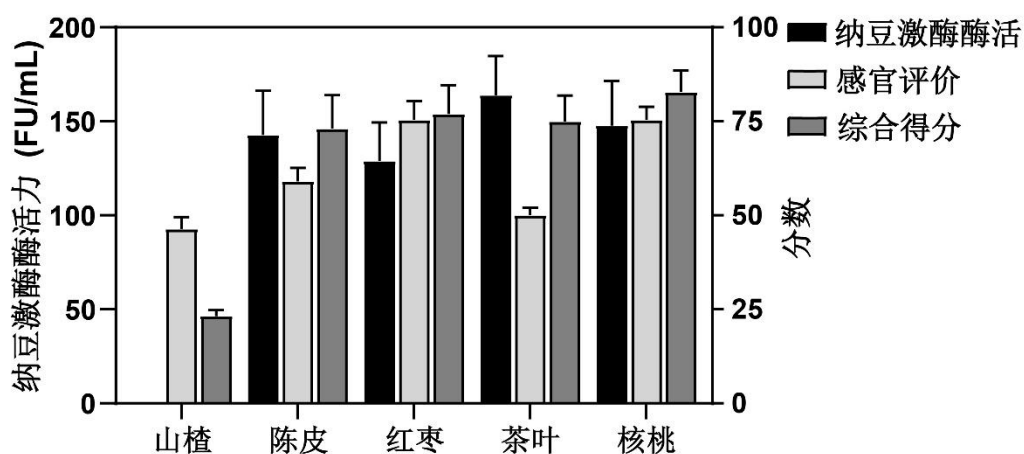


图 3-4 五种不同发酵基质对纳豆复合酵素品质的影响

Figure 3-4 Effect of five different fermentation substrates on the quality of natto complex enzymes

3.3.3 纳豆复合酵素发酵工艺单因素实验

3.3.3.1 核桃浆液百分比对纳豆酵素品质的影响

如图 3-5 所示,随着核桃浆液百分比的增加,纳豆酵素品质的综合得分呈现先上升后下降的趋势。当核桃浆液比为 20%时,纳豆激酶酶活力最高 176.67 FU/mL,综合得分为最高值 89.6。可能是由于随着核桃浆液比的增加,发酵液中脂肪含量增加,蛋白质含量比例降低,不利于纳豆激酶的合成。并且核桃自身的坚果味,改善了纳豆独有的氨腥味,从而提高纳豆酵素的品质。综上所述,核桃

浆液百分比选择 20%。

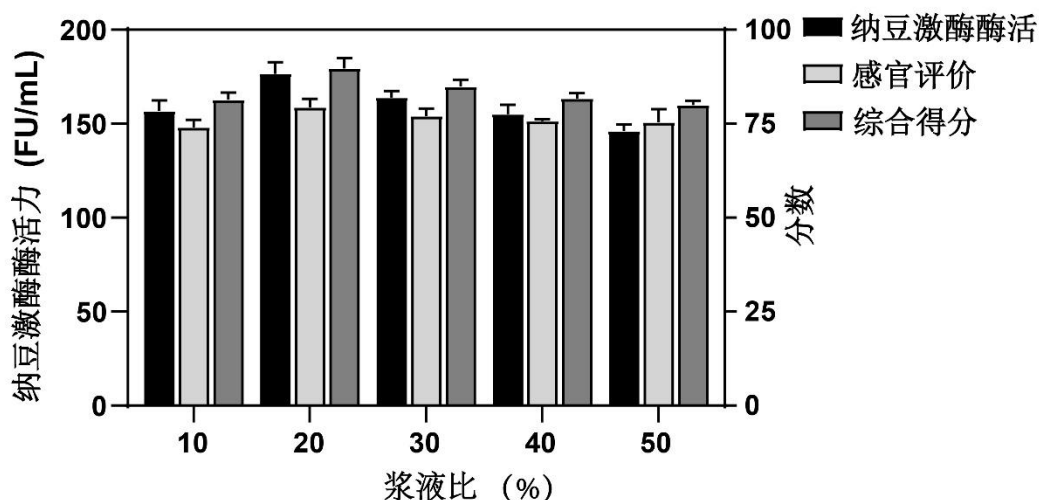


图 3-5 核桃浆液百分比对纳豆酵素品质的影响

Figure 3-5 Effect of percentage of walnut pulp on the quality of natto enzymes

3.3.3.2 接种量对纳豆酵素品质的影响

如图 3-6 所示,随着接种量的增加,纳豆酵素品质的综合得分整体呈现先上升后下降的趋势。当接种量为 5%时,纳豆激酶酶活力最高 218.06 FU/mL,综合得分最高值为 88。当接种量过低时,菌体生长缓慢,纳豆激酶合成量少,发酵液拉丝程度低,感官评价和综合得分较低,分别为 72.7 和 65.4。当接种量在 5%-9%时,菌体繁殖快,培养基中的营养物质被迅速消耗,综合得分下降。因此,最适接种量选择为 5%。

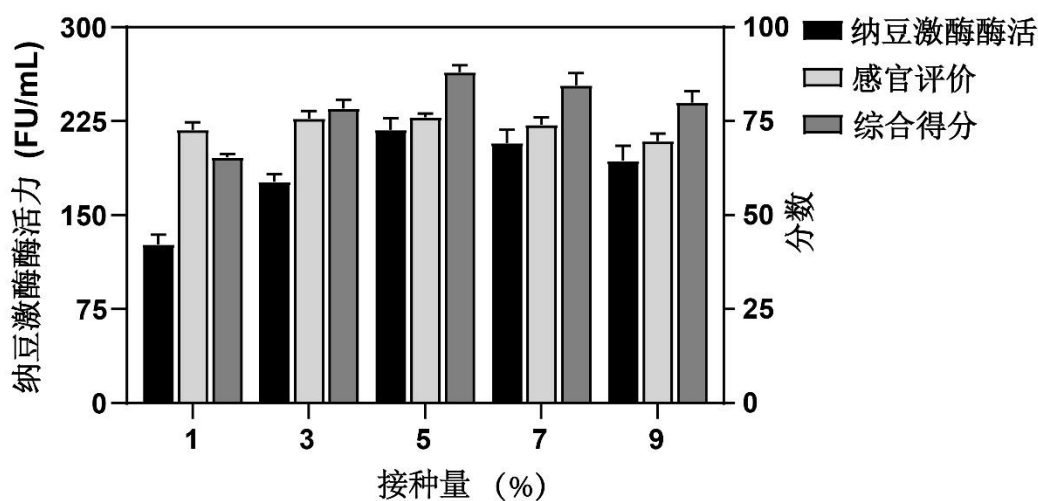


图 3-6 接种量对纳豆酵素品质的影响

Figure 3-6 Effect of inoculation amount on the quality of natto enzyme

3.3.3.3 发酵温度对纳豆酵素品质的影响

如图 3-7 所示,随着发酵温度的增加,纳豆酵素品质的综合得分整体呈现先上升后下降的趋势。当发酵温度为 37 °C 时,纳豆激酶酶活力最高 218.06 FU/mL,综合得分最高值为 88。当发酵温度低于 37 °C 时,纳豆激酶的酶活力有所下降。当发酵温度高于 37 °C 时,菌体生长受到抑制,产物积累受限,纳豆激酶酶活力降低。因此,最适发酵温度选择 37 °C。

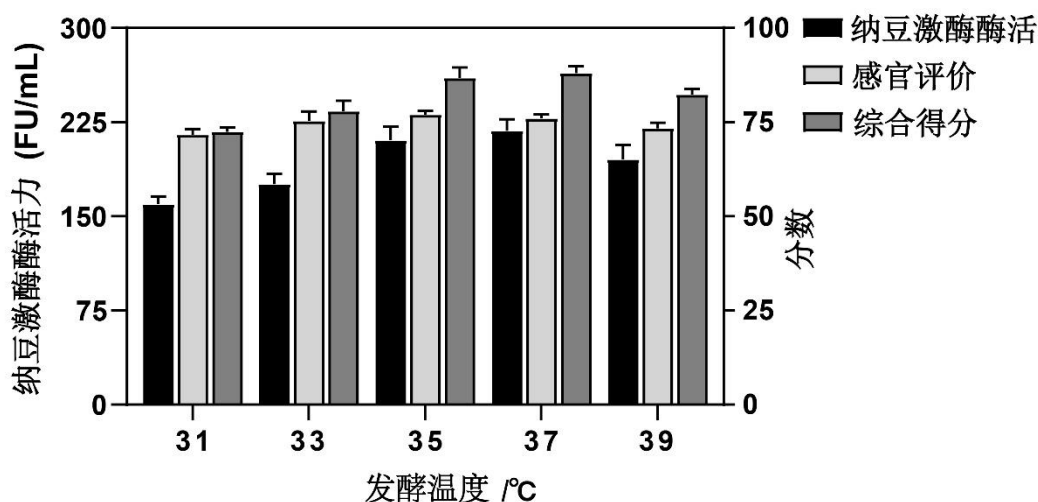


图 3-7 发酵温度对纳豆酵素品质的影响

Figure 3-7 Effect of fermentation temperature on the quality of natto enzyme

3.3.3.4 发酵时间对纳豆酵素品质的影响

如图 3-8 所示,随着发酵时间的增加,纳豆酵素品质的综合得分整体呈现先上升后下降的趋势。当发酵时间为 24 h 时,纳豆激酶酶活力达到最大值 219.72 FU/mL,综合得分最高值为 87.7。当发酵时间低于 24 h 时,纳豆激酶的酶活力有所下降,可能是因为发酵时间过短,纳豆激酶未有效积累。当发酵时间超过 24 h 时,后期营养物资缺乏,纳豆激酶可能被菌株作为营养物资消耗利用。因此,最适发酵时间选择 24 h。

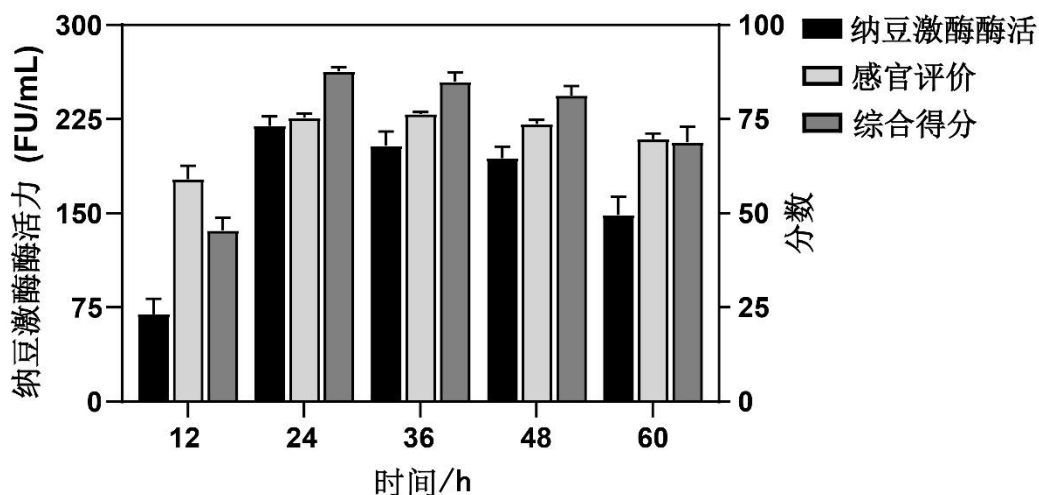


图 3-8 发酵时间对纳豆酵素品质的影响

Figure 3-8 Effect of fermentation time on the quality of natto enzyme

3.3.4 纳豆复合酵素发酵工艺响应面优化实验

按照单因素实验的结果，以核桃浆液比 (A)、接种量 (B) 和发酵温度 (C) 及发酵时间 (D) 四个因素为自变量，综合得分 (Y) 为响应值，Box-Behnken 优化试验结果 (表 3-4)。方差分析结果 (表 3-5)。

对 Box-Behnken 试验结果进行响应面分析，得到综合得分 (Y) 对核桃浆液比 (A)、接种量 (B)、发酵温度 (C) 及发酵时间 (D) 的多元二次回归方程：

$$Y=2.83A+3.75B+0.33C+18.42D-3.00AB+0.000AC+1AD-0.50BC-0.75BD+3.00CD-5.42A^2-11.30B^2-4.18C^2-20.55D^2+87.60。$$

从表 3-4 结果，回归模型极显著 ($P<0.0001$)，失拟项 ($P=0.1246>0.05$) 不显著，模型有较好的试验稳定性。一次性 A、B、D 和交互项 AB、CD 的 Prob>F 值小于 0.01，达到极显著水平。校正后的决定系数 $R^2_{Adj}=0.9870$ ， $R^2_{Pred}=0.9653$ ，两者差值小于 0.2，说明模型有充分的准确性和通用性，能充分说明工艺过程。

由响应面曲面图可知 (图 3-9)，核桃浆液比和接种量 (AB) 交互项和发酵温度和发酵时间 (CD) 交互项的交互作用更显著。利用回归模型，预测的最佳发酵条件为：核桃浆液比=22.731、接种量=5.218 和发酵温度=37.403 和发酵时间=29.614，预测综合得分最高为 92.532。在预测优化条件下，为方便操作，发酵工艺调整为：核桃浆液比=22.7、接种量=5.2 和发酵温度=37.4 和发酵时间=29.6，得到综合得分为 91，此时纳豆激酶酶活 226.17 FU/mL，与预测值基本相符。

表 3-4 培养条件优化 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 3-4 Optimization of cultivation conditions using Box-Behnken experimental design and results

实验号	A (核桃浆液百分比) /%	B (接种量) /%	C (发酵温度) /°C	D (发酵时间) /h	综合得分
1	-1	0	-1	0	78
2	0	0	0	0	88
3	-1	0	1	0	77
4	1	0	0	-1	43
5	1	-1	0	0	75
6	0	0	0	0	86
7	0	0	0	0	87
8	0	-1	-1	0	66
9	-1	-1	0	0	60
10	0	1	0	1	78
11	-1	1	0	0	73
12	0	0	1	-1	43
13	0	-1	1	0	68
14	0	0	-1	-1	47
15	-1	0	0	-1	40
16	1	0	-1	0	81
17	0	0	0	0	89
18	1	0	0	1	83
19	0	0	-1	1	77
20	0	0	0	0	88
21	0	0	1	1	85
22	1	0	1	0	80
23	1	1	0	0	76
24	0	1	1	0	75
25	0	1	0	-1	43

26	0	-1	0	1	72
27	0	1	-1	0	75
28	-1	0	0	1	76
29	0	-1	0	-1	34

表 3-5 回归模型的方差分析

Table 3-5 Variance analysis of regression model

来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
模型	7531.72	14	537.98	152.31	<0.0001	极显著
A	96.33	1	96.33	27.27	0.0001	
B	168.75	1	168.75	47.78	<0.0001	
C	1.33	1	1.33	0.38	0.5488	
D	4070.08	1	4070.08	1152.30	<0.0001	
AB	36.00	1	36.00	10.19	0.0065	
AC	0.000	1	0.000	0.000	1.0000	
AD	4.00	1	4.00	1.13	0.3053	
BC	1.00	1	1.00	0.28	0.6030	
BD	2.25	1	2.25	0.64	0.4381	
CD	36.00	1	36.00	10.19	0.0065	
A2	190.90	1	190.90	54.05	<0.0001	
B2	828.26	1	828.26	234.49	<0.0001	
C2	113.06	1	113.06	32.01	<0.0001	
D2	2739.26	1	2739.26	775.52	<0.0001	
残差	49.45	14	3.53			
失拟项	44.25	10	4.42	3.40	0.1246	不显著
纯误差	5.20	4	1.30			
总回归	7581.17	28				
$R^2=0.9935$ $R^2_{Adj}=0.9870$						

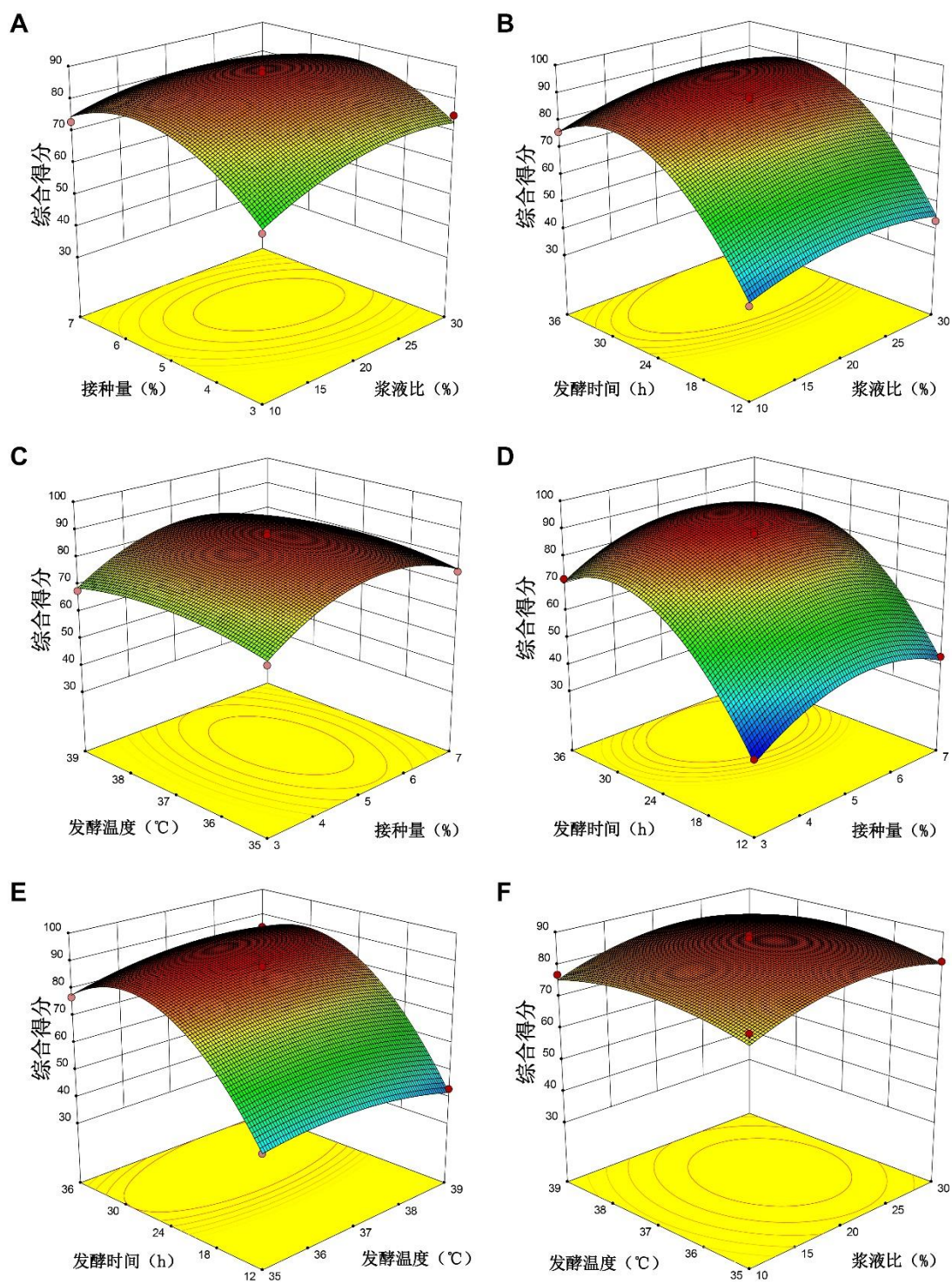


图 3-9 各因素交互作用的响应面曲面图

Figure 3-9 Response surface plot of interaction effects between various factors

(A): $R1=f(A, B)$; (B): $R1=f(A, D)$; (C): $R1=f(B, C)$; (D): $R1=f(B, D)$; (E): $R1=f(C, D)$; (F): $R1=f(A, C)$

3.4 本章小结

五种不同辅材基质：山楂、橙皮、红枣、茶叶和核桃，分别与豆浆混合用于

纳豆酵素发酵基质。本章以纳豆激酶酶活和感官评价为主要评价标准，确定最佳酵素发酵基质：核桃豆浆。以核桃浆液百分比、接种量、发酵温度和发酵时间四个因素进行单因素试验。以综合得分为响应值，利用响应面优化确定了最佳发酵工艺为：核桃浆液比=22.731、接种量=5.218 和发酵温度=37.403 和发酵时间=29.614，预测综合得分最高为 92.532。为验证预测优化条件下的纳豆酵素实际品质，为方便操作，将发酵工艺调整为：核桃浆液比 22.7%、接种量 5.2%、发酵温度为 37.4 °C和发酵时间 29.6 h，得到综合得分为 91，此发酵工艺条件下纳豆激酶酶活为 226.17 FU/mL，与预测值基本相符。

第4章 纳豆复合酵素的品质和贮藏稳定性研究

4.1 引言

酵素产品是利用动物、植物和水果等多种生物原料,经过菌体发酵制得的含有特定生物活性成分的产品,含有多种活性物质、生物酶及益生菌,具有较高营养和经济价值^[45,77]。酵素中的营养含量和活性成分是评价产品品质的关键指标。酵素的保质期是指酵素在适宜的存储条件下能够保持其特有活性的时间,酵素的货架期时长不仅影响产品的质量,还与消费者的身体健康相关。因此本章对发酵后的纳豆酵素蛋白质含量、多肽、多酚等品质进行测定。采取一级动力学方程与 Arrhenius 方程结合,以菌落总数和 NK 酶活为评价指标结合综合得分,预测纳豆复合酵素在不同储藏温度条件下的货架期。

4.2 仪器与实验材料

4.2.1 实验仪器

表 4-1 主要实验仪器

Table 4-1 Main experimental instruments

主要仪器名称	型号	生产厂家
酶标仪	1510	赛默飞世尔科技有限公司
真空冷冻干燥机	FD-1A-50	博医康仪器有限公司

4.2.2 实验材料

表 4-2 主要实验药品

Table 4-2 Main experimental drugs

试剂名称	型号	生产产家
牛血清蛋白	BR	默克
碳酸钠	AR	国药集团
DPPH(2,2-联苯基-1-苦基肼基)、无水乙醇	AR	默克
福林酚	BR	上海源叶
纳豆激酶标准品	BR	山东众诚生物

4.3 实验方法

4.3.1 蛋白质含量测定^[54]

蛋白质含量采用考马斯亮蓝法测定，配制一系列梯度浓度的牛血清蛋白标准液后，在棕色管内添加 5 mL 的考马斯亮蓝摇匀，在 25 °C 水浴锅中反应 5 min，测 OD_{595} 处吸光值，每组实验平行三次，得标准曲线。将发酵后的纳豆酵素真空冷冻干燥后，溶解稀释后，测得 OD_{595} 吸光度代入标曲，可得样品中蛋白质的浓度。

4.3.2 多肽含量的测定^[78]

配制一系列浓度梯度的 1 mL 牛血清蛋白标准液，与 4 mL 的双缩脲溶液反应混匀，测 OD_{540} 的吸光值，每组实验重复三次，绘制牛血清蛋白的标准曲线。将发酵后的纳豆酵素真空冷冻干燥，溶解稀释后，加入 2 mL 待测样和 2 mL 20% 的三氯乙酸充分反应，离心后取 1 mL 上清液，按标准液反应步骤反应，测 OD_{540} 吸光度，代入标曲中计算出发酵液的多肽浓度。

4.3.3 DPPH 自由基清除能力的测定^[77]

在棕色容量瓶内加入 2 mL 的待测样品和等体积的，放置于 25 °C 反应 0.5 h，测 OD_{517} 的吸光值 A_1 ；在棕色容量瓶内加入 2 mL 的待测样品与等体积无水乙醇，放置于 25 °C 反应 0.5 h，测 OD_{517} 的吸光值 A_2 ；在棕色容量瓶内加入 2 mL 的无水乙醇与等体积 DPPH 溶液，放置于 25 °C 反应 0.5 h，测 OD_{517} 的吸光值 A_0 。空白对照使用 ddH₂O，每组重复 3 次。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad (4-1)$$

其中 A_1 是 DPPH 溶液和样品液的吸光度； A_2 是样品液与无水乙醇溶液的吸光度； A_0 为 2 mL 的 DPPH 溶液和无水乙醇混合溶液的吸光度。

4.3.4 多酚含量的测定^[79]

精密称取没食子酸 0.2 g，用水定容 200 mL，所得溶液即为标准品母液。在棕色容量瓶内，分别添加 0.0 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL 和 1.0 mL 母液，定容到 10 mL，配制系列梯度标准溶液。分别取 200 μ L 不同浓度的标准液与 1 mL 福林酚试剂，混匀充分反应 5 min，再与 3 mL 的 7.5% 碳酸钠溶液避光

静置反应 60 min, 测 OD_{765} 的吸光度, 同样每组重复三次, 绘制没食子酸标准曲线。按上述方法对样品进行测定, 将样品 OD_{765} 的吸光值代入标曲, 得样品中多酚含量。

4.3.5 琼脂糖-纤维蛋白平板的制备

使用生理盐水溶解纳豆激酶标准品, 配制不同浓度的 NK 标准溶液。以 1%-2% 的琼脂糖作为固体支持, 冷却至 50 °C 左右, 和 1 mL 的 20 U/mL 凝血酶和 10 mL 的 0.15% 纤维蛋白原相互混合制成人工血栓平板, 取 20 μ L 的 NK 标准溶液样品点于平板上, 37 °C 恒温孵育 12 h, 观察透明圈的大小^[80]。

4.3.6 贮藏温度的影响

杀菌后的纳豆酵素分别置于 4、25、37 °C 的恒温培养箱, 每隔 2 d 取样测定其纳豆激酶酶活力、菌落总数和综合得分的变化, 共贮藏 32 d。

4.3.7 各指标数值的测定

4.3.7.1 纳豆激酶酶活力的测定

参考 2.2.4。

4.3.7.2 大肠杆菌和霉菌的测定方法

大肠杆菌计数参考 GB 4789.3-2016 测定^[81]。霉菌和酵母菌计数参考 GB 4789.15-2016 测定^[74]。

4.3.7.3 综合得分

参考 3.2.4.1。

4.3.7.4 货架期动力学模型的建立

动力学模型被广泛应用于食品贮藏中品质变化和货架期的, 目前大都采用一级动力学模型和 Arrhenius 方程进行品质的分析及货架期的预测, 本研究主要参考白琳等人的研究方法^[62]。一级动力学模型公式 4-2 和 Arrhenius 方程公式 4-3, 如下所示

$$A = A_0 e^{kt} \quad (4-2)$$

其中 A 是储藏 t 天的对应指标数值; A_0 是储藏前的初始对应指标值; k 是反应速率常数, t 是储藏时间。

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{R \times T} \quad (4-3)$$

4.3.7.5 纳豆复合酵素的货架期预测公式

当已知储藏 t 天的储藏温度和对应的品质指标时，根据公式 4-2、4-3 能够得到产品货架期预测公式，如下公式所示（4-4）。

$$SL = \frac{\ln A - \ln A_0}{k_0 \times e^{-\frac{Ea}{RT}}} \quad (4-4)$$

其中 SL 表示货架期的天数 d 。

4.4 结果与分析

4.4.1 纳豆酵素主要成分含量测定

有关发酵前后酵素中品质，如蛋白质浓度和多肽成分的测量使用牛血清蛋白为参考标准。以蛋白质的浓度测量绘制的牛血清蛋白标准曲线如图 4-1 所示，回归方程： $y=0.6289x-0.006$ ， $R^2=0.9979$ ，线性关系较好。

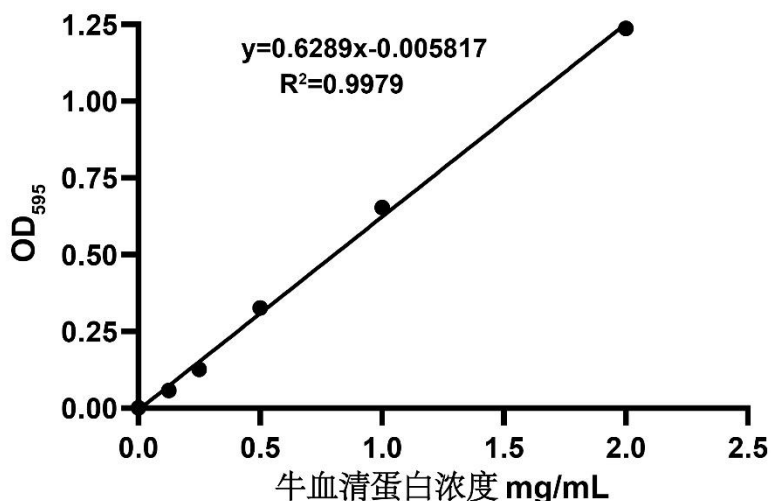


图 4-1 蛋白质浓度测量的牛血清蛋白标曲

Figure 4-1 Protein concentration measurement's standard curve of bovine serum albumin

关于多肽含量的测量有关的牛血清蛋白标准曲线，如图4-2所示，回归方程是： $y=0.047x+0.005$ ， $R^2=0.9983$ ，具有线性关系较好。

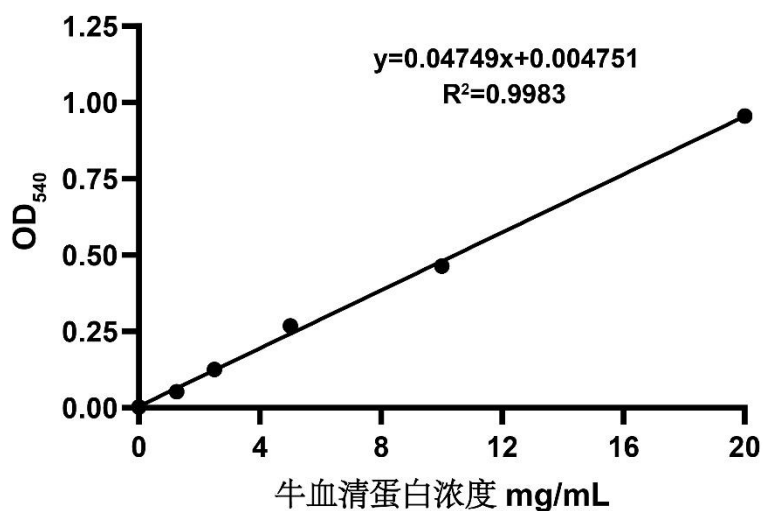


图 4-2 多肽含量测定中牛血清蛋白标曲

Figure 4-2 Bovine serum albumin standard curve in peptide content determination

关于多酚浓度的测量有关的没食子酸标准曲线，如图4-3所示，曲线回归方程是： $y=5.677x+0.058$ ， $R^2=0.9995$ ，线性关系良好。

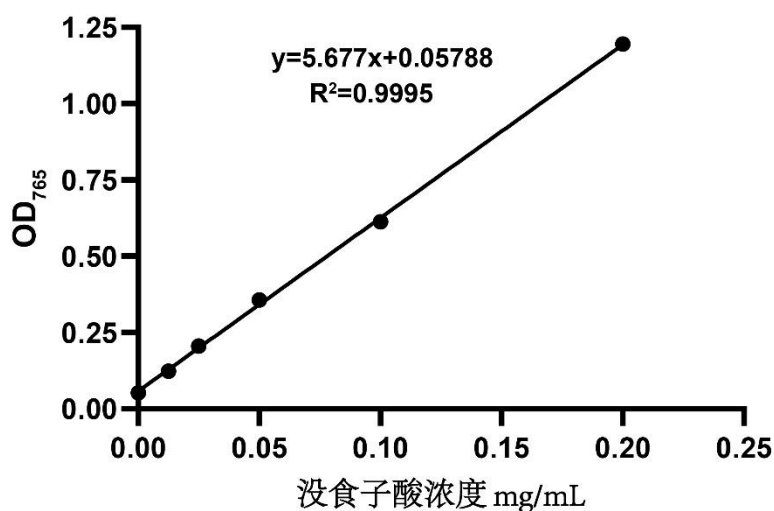


图 4-3 没食子酸的标准曲线

Figure 4-3 Gallic acid standard curve

纳豆酵素发酵前后各成分含量变化如下表 4-5。在表 4-5 中，发酵液的可溶性蛋白含量相比未发酵前有所降低，为 1.89 ± 0.82 mg/mL。多肽含量有所上升，为 8.34 ± 0.07 mg/mL，这是合理的，在发酵阶段，需要大量的蛋白质用于菌株的生长、蛋白酶和 NK 合成，其中蛋白酶可将蛋白质水解合成肽类和氨基酸^[76]。发酵后的多酚含量为 4.58 ± 0.14 mg/mL，DPPH 自由基清除能力上升不明显，为 24.31 ± 1.83 %。

表 4-5 纳豆酵素发酵前后主要成分含量变化

Table 4-5 Changes in Main Components Before and After Natto Enzyme Fermentation

	可溶性蛋白 (mg/mL)	多肽 (mg/mL)	多酚 (mg/mL)	DPPH 自由基清除能力 (%)
发酵前	9.12±1.05	3.96±0.11	2.65±0.08	23.52±0.67
发酵后	1.89±0.82	8.34±0.07	4.58±0.14	24.31±1.83

4.4.2 溶栓作用研究

由于国内尚未制定有关于纳豆酵素产品纳豆激酶含量下限的明确规定,使用不同浓度的 NK 标准品形成的透明圈大小,判断其溶栓能力。图 4-4 结果显示当纳豆激酶的浓度为 50 FU/mL 时, NK 的透明圈较小,溶栓能力较差,因此以 50 FU/mL 的 NK 浓度作为纳豆酵素产品的下限。

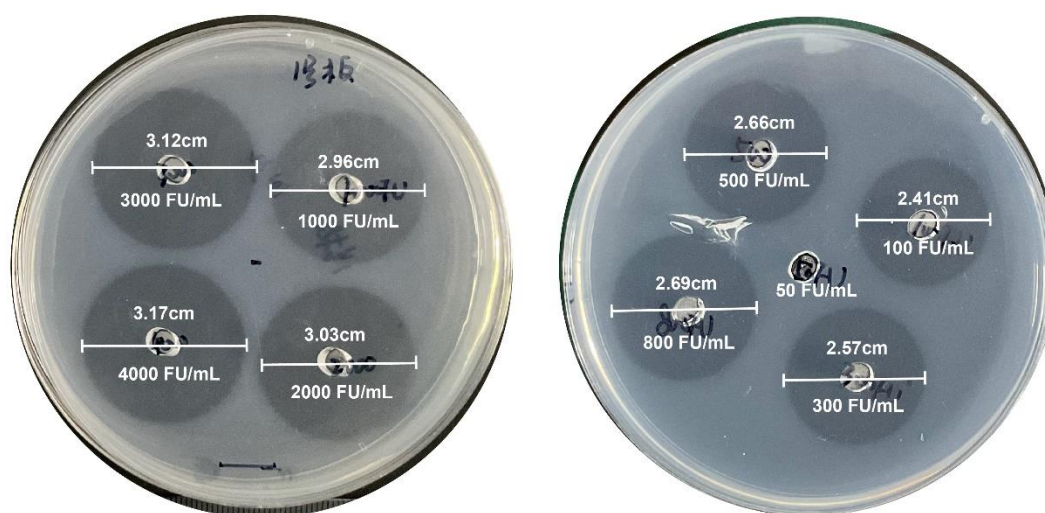


图 4-4 不同浓度 NK 标准品形成的透明圈大小

Figure 4-4 Size of transparent circles formed by different concentrations of NK standards

4.4.3 纳豆复合酵素在不同贮藏温度下的品质指标变化

采用巴斯德消毒法对纳豆复合酵素杀菌处理后,放置于 0、25 和 37 °C 下贮藏 32 天分别检测纳豆复合酵素中纳豆激酶酶活、菌落总数和综合得分的变化,具体变化见表 4-6、4-7、4-8。

感官评价在有关新品的研发、食品质量评价、市场预测和产品评优等过程得到普遍化应用^[82,83]。从三个表中的数据可知,不同贮藏温度下,温度越高,纳豆

复合酶素的综合得分随贮藏时间的增加而下降。在 4℃贮藏条件下,酶素的综合得分随贮藏时长的递增,从 88 分下落至 80 分。在 25℃贮藏条件下,酶素的综合得分随时间的递增,从 88 分降低至 77 分。在 37℃贮藏条件下,复合酶素的综合得分最低降至 72 分。

食品中的菌落总数测定,是评定整个食品被细菌污染的程度,可严格防止消化道传染病病原菌和食物中毒病原菌污染,是食品卫生检验普遍采用的方法^[84]。从三个表中的数据可知,在 0℃贮藏条件下,纳豆酶素中未检出微生物存在。在 25℃贮藏条件下,培养 28 d 和 32 d 时检出微生物菌落总数为 2 CFU/mL。在 37℃贮藏条件下,从培养 28 d 开始检出微生物菌落数,但总数均小于微生物上限值 100 CFU/mL,因此,在贮藏过程中微生物对产品品质的影响不显著。

纳豆激酶酶活的高低是影响纳豆酶素品质的重要因素。从三个表中的数据可知,不同贮藏温度下,温度越高,随贮藏时间的增加,纳豆激酶活力下降速度越快。在 4℃贮藏条件下,纳豆激酶活力从 164.38 ± 0.30 下降至 122.26 ± 0.33 FU/mL。在 25℃贮藏条件下,纳豆激酶活力从 164.38 ± 0.30 下降至 101.83 ± 0.36 FU/mL。在 37℃贮藏条件下,复合酶素的纳豆激酶活力从 164.38 ± 0.30 下降至 88 ± 0.39 FU/mL。由于纳豆激酶活力在贮藏过程中的变化显著,可作为预测纳豆复合酶素货架期的品质指标。

表 4-6 在 4℃贮藏下纳豆复合酶素的各指标的变化

Table 4-6 Changes in various indicators of nattokinase complex enzyme under storage at 4℃

时间 /d	纳豆激酶酶活力 (FU/mL)	菌落总数 (CFU/mL)	综合得分 (%)
0	164.38 ± 0.30	0	88
2	163.37 ± 0.24	0	88
4	160 ± 0.28	0	88
6	155.7 ± 0.20	0	87
8	150.85 ± 0.26	0	86
10	144.63 ± 0.18	0	84
12	139.28 ± 0.15	0	83
14	132.81 ± 0.45	0	82
16	122.26 ± 0.33	0	80

表 4-7 在 25 °C 贮藏下纳豆复合酵素的各指标的变化

Table 4-7 Changes in various indicators of natto kinase complex enzyme under storage at 25 °C

时间 /d	纳豆激酶酶活力 (FU/mL)	菌落总数 (CFU/mL)	综合得分 (%)
0	164.38±0.30	0	88
2	160.85±0.26	0	88
4	155.7±0.13	0	87
6	145.15±0.74	0	85
8	137.13±0.55	0	84
10	128.68±0.11	0	82
12	120.35±0.17	0	81
14	110.12±0.50	<2	79
16	101.83±0.36	<2	77

表 4-8 在 37 °C 贮藏下纳豆复合酵素的各指标的变化

Table 4-8 Changes in various indicators of natto kinase complex enzyme under storage at 37 °C

时间 /d	纳豆激酶酶活力 (FU/mL)	菌落总数 (CFU/mL)	综合得分 (%)
0	164.38±0.30	0	88
2	154.88±0.38	0	86
4	147±0.23	0	85
6	139.53±0.18	0	83
8	131.28±0.45	0	82
10	122.02±0.26	0	80
12	110.22±0.18	0	78
14	98.13±0.30	<3	75
16	88±0.39	<3	72

4.4.4 温度指标变化的货架期动力学模型的建立

如图 4-5 分别展示在 4、25、37 °C 下贮藏时，纳豆激酶酶活随贮藏天数的变

化过程。不同贮藏温度下，温度越高，随贮藏时间的增加，纳豆激酶活力下降速度越快。

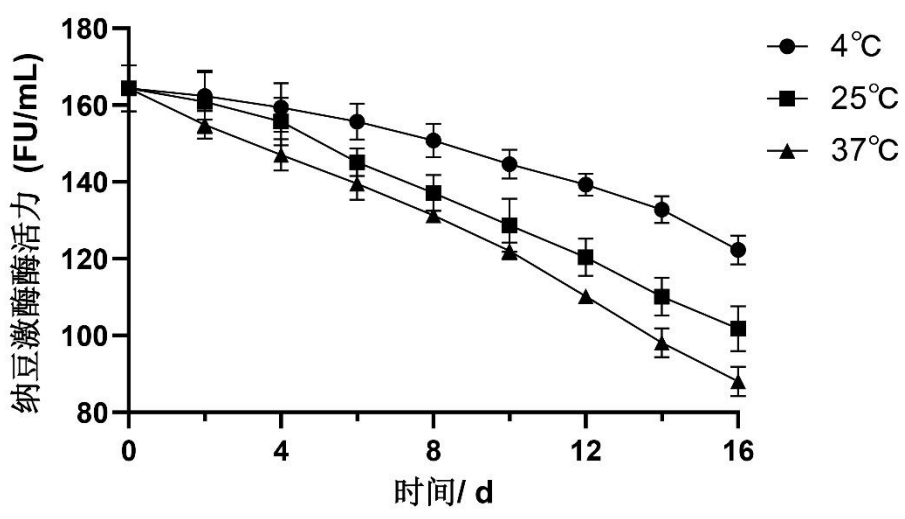


图 4-5 温度对纳豆复合酵素纳豆激酶活力的影响

Figure 4-5 Temperature effect on the activity of nattokinase enzyme in natto composite

在表 4-9 中，以贮藏天数为 x 横坐标，lny（y=纳豆激酶活力）为纵坐标作图，根据不同温度所得的 3 项回归方程的 R² 分别 0.9437、0.9787、0.9721，数值均大于 0.94，该方程可以适用于在不同储存温度下 NK 酶活指标随储存天数变化情况的模拟。

表 4-9 4 °C、25 °C和 37 °C下不同指标随储存天数变化的回归方程和常数

Table 4-9 Regression equations and constants describing the changes in different indicators with storage days at 4 °C, 25 °C and 37 °C

品质指标	储存绝对 温度/K	回归方程	反应速率参 数 k	回归系数 R ²
纳豆激酶 活力	277	y=164.1e ^{-0.018x}	-0.018	0.9437
	298	y=164.35e ^{-0.031x}	-0.031	0.9787
	310	y=164.7e ^{-0.038x}	-0.038	0.9721
微生物	277	-----	-----	-----
	298	-----	-----	-----
	310	-----	-----	-----

所得回归方程的斜率分别为 4 °C、25 °C和 37 °C下对应的常数 k 值，通过计算可以求得 lnk 值。参考公式 4-3 代入，以 1000/T（T 值分别为 277、298 和 310）为自变量，上述得到的 lnk 值为因变量，可以得到在不同储存温度条件下纳豆酵

素的 Arrhenius 方程。

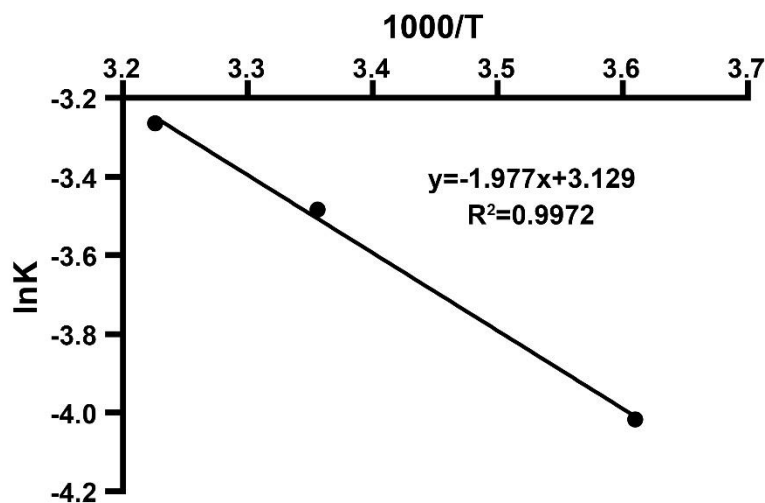


图 4-6 随储藏温度变化纳豆酵素中纳豆激酶酶活的 Arrhenius 方程

Figure 4-6 Arrhenius equation for the enzyme activity of nattokinase in natto with changing storage temperature

根据图 4-6 的线性回归方程，斜率为 $-E_a/R$ （ R 为气体常数），截距为 $\ln k_0$ ， $R^2=0.9973$ ，可得出以纳豆激酶活力为品质的 E_a 及 k_0 值，具体可见表 4-10。

表 4-10 以纳豆激酶的酶活力为评价指标 Arrhenius 方程

Table 4-10 Nattokinase enzyme activity as the evaluation indicator in the Arrhenius equation

评价指标	线性回归方程	回归系数 R^2	E_a (KJ/mol)	k_0
纳豆激酶活力	$y=-1.9774x+3.1291$	0.9973	16.43	22.8534

4.4.5 货架期的计算

由求出的参数 E_a 和 k_0 数值，根据预测货架期的公式 4-4，从而计算求得以纳豆激酶酶活为指标时不同储藏温度下的货架期：公式 4-5，进一步算出在常温储藏时纳豆酵素的货架期为 38 d。

$$SL_{NK} = \frac{\ln A - \ln A_0}{22.8534 \times e^{-\frac{16.43}{8.31T}}} \quad (4-5)$$

4.4.6 纳豆酵素预测货架期动力学模型的验证实验与评价

为验证所构建的纳豆激酶预测货架期动力学模型的准确性，我们将纳豆酵素分别储存在 8 °C 和 30 °C，以纳豆激酶酶活为品质指标，验证该模型的准确性，结果如表 4-11 所示，可以发现，当存储温度为 8 °C 和 30 °C 时，对于纳豆酵素的贮藏时效，预测值和实测值的相差天数在 5 天以内，存储天数相对误差较小。可

以表明纳豆激酶酶活构建的货架期预测公式有着较高的可靠性和精准度。

表 4-11 纳豆酵素贮藏货架期的预测天数和实际测定天数

Table 4-11 The predicted shelf life and the actual shelf life of natto enzyme during storage

评价指标	存储温度/°C	预测天数值/d	实测天数值/d	天数相对误差 /%
纳豆激酶活力	8	59.25	54	8.86
	30	35.61	37	3.90

4.5 本章小结

本章对发酵后的纳豆酵素蛋白质含量、多肽、多酚等品质进行测定，采取一级动力学方程与 Arrhenius 方程互相结合，以菌落总数目和 NK 酶活为评价指标结合综合得分，预测纳豆复合酵素在不同储藏温度条件下的货架期。纳豆酵素中的蛋白质含量为：1.89±0.82 mg/mL，较发酵前下降。多肽含量为 8.34±0.07 mg/mL，较发酵前含量升高。发酵后的多酚含量为 4.58±0.14 mg/mL，其中 DPPH 自由基清除作用为 24.31±1.83 %。

以纳豆激酶酶活力为品质指标，得到的货架期为公式 4-5：

$$SL_{NK} = \frac{\ln A - \ln A_0}{22.8534 \times e^{-\frac{16.43}{8.31T}}} \quad (4-5)$$

代入公式 4-5，计算得到在 25 °C 储藏时纳豆酵素的货架期为 38 d。当储藏温度为 8 °C 和 30 °C 时，纳豆酵素的储藏时效的预测值和实测值的相差天数在 5 天以内，相对误差较小。可以表明以纳豆激酶酶活构建的货架期预测公式有着较高的可靠性和精准度。

第5章 结论与展望

5.1 结论

(1) 本研究以实验室贮藏的纳豆芽孢杆菌为出发菌株，采用 ARTP 诱变，结合牛奶平板初筛和紫外分光光度法检测复筛，从中选择纳豆激酶产量最高的纳豆芽孢杆菌 (BSN-2)，NK 酶活：119.2 FU/mL，作为后续纳豆酵素研制的发酵菌种。

(2) 对发酵基质的选择及纳豆复合酵素的发酵工艺优化进行研究。以大豆豆浆为主，分别辅以五种不同的发酵基质：山楂、陈皮、红枣、茶叶、核桃，接种 BSN-2 菌株发酵，以纳豆激酶的酶活力和感官评价为主要指标，筛选出最佳发酵基质：核桃浆与豆浆。以核桃浆液百分比、接种量、发酵温度和发酵时间为因素进行单因素实验。根据单因素的结果，以感官评分为响应值，通过响应面优化实验和验证确定最佳发酵工艺为：核桃浆液比 22.7%、接种量 5.2%、发酵温度为 37.4 °C 和发酵时间 29.6 h，得到综合得分为 91，此发酵工艺条件下纳豆激酶酶活为 226.17 FU/mL，与预测值基本相符。

(3) 纳豆酵素的品质测定和货架期预测。纳豆酵素中的蛋白质含量为：1.89±0.82 mg/mL，较发酵前下降，多肽含量为 8.34±0.07 mg/mL，较发酵前含量升高。发酵后的多酚含量为 4.58±0.14 mg/mL，DPPH 自由基清除作用为 24.31±1.83 %。微生物在纳豆酵素的储藏中并非货架期的预测主要影响因素。而随储藏温度变化明显的纳豆激酶酶活则可作为评价指标，用于酵素产品的货架期预测。得到以纳豆激酶酶活力为品质指标的货架期预测公式 4-5：

$$SL_{NK} = \frac{\ln A - \ln A_0}{22.8534 \times e^{-\frac{16.43}{8.31T}}} \quad (4-5)$$

得到 25 °C 储藏时纳豆酵素的货架期为 38 d。当储藏温度为 8 °C 和 30 °C 时，纳豆酵素的储藏时效的预测值和实测值的相差天数在 5 天以内，相对误差较小。可以表明以纳豆激酶酶活构建的货架期预测公式有着较高的可靠性和精准度。

5.2 展望

(1) 本研究虽研究了不同发酵基质对纳豆酵素品质的影响，但采用的是单

菌发酵，可考虑复合菌株，对纳豆酵素代谢物和酵素品质的影响。

（2）为深入探究复合酵素在体内的溶栓能力和抗氧化作用等生理功能，可建立动物实验模型。方便准确评估复合酵素在实际生理条件下的作用效果，为其在临床治疗和保健中的应用提供科学依据。

参考文献

- [1] 洪辅安. 纳豆激酶的安全性与药效学研究[D]. 武汉工程大学, 2023.
- [2] 焦洁, 霍烽. 源于枯草杆菌溶栓酶的研究进展[J]. 现代农业, 2003(4): 43-45.
- [3] 刘梦璐, 李宁, 高学秀, 等. 新型溶栓制剂——纳豆激酶的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(11): 277-284.
- [4] 卓怡云. 纳豆激酶对大鼠酒精性肝损伤改善作用的初步研究[D]. 青岛大学, 2020.
- [5] Cai D, Zhu C, Chen S. Microbial production of nattokinase: current progress, challenge and prospect[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(5): 84.
- [6] 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.
- [7] 王旭冰, 娄永江. 纳豆芽孢杆菌的开发与利用[J]. 中国调味品, 2010, 35(4): 28-31+34.
- [8] Hosoi T, Ametani A, Kiuchi K, et al. Improved growth and viability of lactobacilli in the presence of *Bacillus subtilis* (*natto*), catalase, or subtilisin[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2000, 46(10): 892-897.
- [9] 李锴骁, 李帅彪, 杨婉秋, 等. 纳豆芽孢杆菌的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(Z3): 3131-3139.
- [10] Ju S, Cao Z, Wong C, et al. Isolation and Optimal Fermentation Condition of the *Bacillus subtilis* Subsp. *natto* Strain WTC016 for Nattokinase Production[J]. Fermentation, 2019, 5(4): 92.
- [11] Hu Y, Yu D, Wang Z, et al. Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* DC27 screened from Douchi, a traditional Chinese fermented soybean food[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 9235.
- [12] 吉美萍, 肖志婷, 那日, 等. 纳豆芽孢杆菌的相关研究进展[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2016, 44(5): 83-93.
- [13] 万禹. 益生菌和腐植酸钠混合发酵复合制剂—腐微特[J]. 畜牧兽医科技信息,

- 2012(2): 44-45.
- [14] Kamada M, Hase S, Sato K, et al. Whole genome complete resequencing of *Bacillus subtilis natto* by combining long reads with high-quality short reads[J]. PloS One, 2014, 9(10): e109999.
- [15] 韩宇星, 孟凡强, 周立邦, 等. 通过敲除聚谷氨酸合成基因提高纳豆杆菌纳豆激酶的生产效率[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(2): 224-230.
- [16] 冯浩, 余凤云, 单凤娟, 等. 构建食品级表达纳豆激酶的乳酸乳球菌重组菌株[J]. 食品科学, 2012, 33(21): 208-212.
- [17] Ruiz Sella S R B, Bueno T, De Oliveira A A B, et al. *Bacillus subtilis natto* as a potential probiotic in animal nutrition[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2021, 41(3): 355-369.
- [18] Cao Z H, Green Johnson J M, Buckley N D, et al. Bioactivity of soy-based fermented foods: A review[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(1): 223-238.
- [19] Chen X, Lu Y, Zhao A, et al. Quantitative analyses for several nutrients and volatile components during fermentation of soybean by *Bacillus subtilis natto*[J]. Food Chemistry, 2022, 374: 131725.
- [20] Pan S, Chen G, Zeng J, et al. Fibrinolytic enzyme production from low-cost substrates by marine *Bacillus subtilis*: Process optimization and kinetic modeling[J]. Biochemical Engineering Journal, 2019, 141: 268-277.
- [21] Devi C S, Mohanasrinivasan V, Sharma P, et al. Production, Purification and Stability Studies on Nattokinase: A Therapeutic Protein Extracted from Mutant *Pseudomonas aeruginosa* CMSS Isolated from Bovine Milk[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2016, 22(2): 263-269.
- [22] Guo H, Ban Y H, Cha Y, et al. Comparative anti-thrombotic activity and haemorrhagic adverse effect of nattokinase and tissue-type plasminogen activator[J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 28(5): 1535-1542.
- [23] Zhou X, Liu L, Zeng X. Research progress on the utilisation of embedding technology and suitable delivery systems for improving the bioavailability of nattokinase: A review[J]. Food Structure, 2021, 30: 100219.
- [24] Wu H, Zhang Q, Xu P, et al. Nattokinase Promotes Post-stroke Neurogenesis

- and Cognition Recovery via Increasing Circulating Irisin[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2023, 71(30).
- [25] Chen H, McGowan E M, Ren N, et al. Nattokinase: A Promising Alternative in Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases[J]. Biomarker Insights, 2018, 13: 1177271918785130.
- [26] Kim J Y, Gum S N, Paik J K, et al. Effects of nattokinase on blood pressure: a randomized, controlled trial[J]. Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension, 2008, 31(8): 1583-1588.
- [27] Ren N N, Chen H J, Li Y, et al. [A clinical study on the effect of nattokinase on carotid artery atherosclerosis and hyperlipidaemia][J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2017, 97(26): 2038-2042.
- [28] Zhang Y, Pei P, Zhou H, et al. Nattokinase-Mediated Regulation of Tumor Physical Microenvironment to Enhance Chemotherapy, Radiotherapy, and CAR-T Therapy of Solid Tumor[J]. ACS nano, 2023, 17(8): 7475-7486.
- [29] Liang M, Zhang J, Yang Y, et al. Nattokinase enhances the preventive effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2022, 39(1): 8.
- [30] Tuly J A, Ma H, Zabed H M, et al. Harnessing the Keratinolytic Activity of *Bacillus licheniformis* Through Random Mutagenesis Using Ultraviolet and Laser Irradiations[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2022, 194(4): 1546-1565.
- [31] Zhang Q, Miao R, Feng R, et al. Application of Atmospheric and Room-Temperature Plasma (ARTP) to Microbial Breeding[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2023, 45(8): 6466-6484.
- [32] 石洋华. 富含 γ -氨基丁酸梨酒的酿造[D]. 河北科技大学, 2017.
- [33] 薛健, 王欢. 纳豆激酶生产菌的紫外诱变选育[J]. 农业与技术, 2016, 36(21): 4-5+17.
- [34] Wang X, Lu M, Wang S, et al. The atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) method on the dextranase activity and structure[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 70: 284-291.

- [35] Wang Y, Wang J, Zhang X, et al. Genomic and transcriptomic analysis of *Bacillus subtilis* JNFE1126 with higher nattokinase production through ultraviolet combined ^{60}Co - γ ray mutagenesis[J]. LWT, 2021, 147: 111652.
- [36] Mahajan P M, Gokhale S V, Lele S S. Production of nattokinase using *Bacillus natto* NRRL 3666: Media optimization, scale up, and kinetic modeling[J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(6): 1593-1603.
- [37] Ku T W, Tsai R L, Pan T M. A simple and cost-saving approach to optimize the production of subtilisin NAT by submerged cultivation of *Bacillus subtilis natto*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(1): 292-296.
- [38] Modi A, Raval I, Doshi P, et al. Heterologous expression of recombinant nattokinase in *Escherichia coli* BL21(DE3) and media optimization for overproduction of nattokinase using RSM[J]. Protein Expression and Purification, 2023, 203: 106198.
- [39] Cai D, Wei X, Qiu Y, et al. High-level expression of nattokinase in *Bacillus licheniformis* by manipulating signal peptide and signal peptidase[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(3): 704-712.
- [40] 于晓淼, 赵允章, 王锋超, 等. 通过定点突变提高纳豆激酶纤溶活性和热稳定性[J]. 微生物学杂志, 2023, 43(2): 21-27.
- [41] Guangbo Y, Min S, Wei S, et al. Heterologous expression of nattokinase from *B. subtilis natto* using *Pichia pastoris* GS115 and assessment of its thrombolytic activity[J]. BMC biotechnology, 2021, 21(1): 49.
- [42] 邵孟雅, 袁岐山, 杨欣玲, 等. 大豆加工副产物资源化利用研究进展[J]. 中国酿造, 2023, 42(1): 21-26.
- [43] Li T, Zhan C, Guo G, et al. Tofu processing wastewater as a low-cost substrate for high activity nattokinase production using *Bacillus subtilis*[J]. BMC Biotechnology, 2021, 21(1): 57.
- [44] 张文静, 毛咏荷, 李宁, 等. 酸羊乳发酵及其健康功效研究进展[J]. 中国乳品工业, 2024, 52(2): 38-45.
- [45] 杨彬彦, 党娅, 黎坤怡. 蓝莓酵素复合菌种发酵工艺优化及品质分析[J]. 中

- 国酿造, 2023, 42(12): 165-169.
- [46] Magaña Barajas E, Buitimea Cantúa G V, Hernández Morales A, et al. *In vitro* α -amylase and α -glucosidase enzyme inhibition and antioxidant activity by capsaicin and piperine from *Capsicum chinense* and *Piper nigrum* fruits[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2021, 56(3): 282-291.
- [47] 王贝贝, 王欢, 牛希跃, 等. 小白杏复合果蔬酵素发酵工艺及其抗氧化活性研究[J]. 粮食与油脂, 2024, 37(1): 90-93+127.
- [48] 牛刚, 朱仁萍, 陈中爱, 等. 多菌混合发酵豆豉后发酵工艺优化及品质分析[J]. 中国酿造, 2023, 42(11): 176-182.
- [49] Zhai X, Wang X, Wang X, et al. An efficient method using ultrasound to accelerate aging in crabapple (*Malus asiatica*) vinegar produced from fresh fruit and its influencing mechanism investigation[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 72: 105464.
- [50] Zhang X, Tong Y, Wang J, et al. Screening of a *Bacillus subtilis* strain producing both nattokinase and milk-clotting enzyme and its application in fermented milk with thrombolytic activity[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(9): 9437-9449.
- [51] 聂萌滋, 王尚, 朴春红, 等. 马克斯克鲁维酵母对纳豆发酵风味的影响和发酵工艺研究[J]. 大豆科学, 2021, 40(6): 835-843.
- [52] Zhu M X, Chao X, Hao Y P, et al. Lactobacillus fermentation improved the nutrient value and hypoglycemic activity of chickpea milk[J]. Emirates Journal of Food and Agriculture, 2023, 35(3): 242-250.
- [53] 张海粟, 王家林. 箭筈豌豆纳豆的发酵工艺[J]. 青岛科技大学学报(自然科学版), 2021, 42(6): 52-58.
- [54] 石晓丹. 纳豆复合饮料的制备工艺及其品质的研究[D]. 青岛科技大学, 2023.
- [55] 孙娜, 王林林, 朱秀娟, 等. 固态纳豆调味品的制备及其挥发性物质分析[J]. 中国调味品, 2023, 48(8): 143-149.
- [56] 徐昂. 纳豆风味饮料配方研究[J]. 饮料工业, 2023, 26(4): 31-35.
- [57] Li G, Li T, He F, et al. Microencapsulation of nattokinase from fermentation by spray drying: Optimization, comprehensive score, and stability[J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(7): 3906-3916.

- [58] 任锡雯, 宋爽, 韦恃怡, 等. 响应面法优化果味纳豆饮品制备工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(17): 113-119.
- [59] 孙娜, 何九军, 朱秀娟, 等. 纳豆激酶粗提物泡腾片的制备及其质量评价[J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(3): 206-212.
- [60] Turner E R, Luo Y, Buchanan R L. Microgreen nutrition, food safety, and shelf life: A review[J]. Journal of Food Science, 2020, 85(4): 870-882.
- [61] Tano-Debrah K, Saalia F K, Ghosh S, et al. Development and Sensory Shelf-Life Testing of KOKO Plus: A Food Supplement for Improving the Nutritional Profiles of Traditional Complementary Foods[J]. Food and Nutrition Bulletin, 2019, 40(3): 340-356.
- [62] 瞿洋, 索玉娟, 蔡祥, 等. 基于挥发性盐基氮快速预测冷鲜鸡货架期[J]. 食品工业科技, 2021, 42(16): 311-316.
- [63] Ran M, He L, Li C, et al. Quality Changes and Shelf-Life Prediction of Cooked Cured Ham Stored at Different Temperatures[J]. Journal of Food Protection, 2021, 84(7): 1252-1264.
- [64] Chen Q, Li J, Yang H, et al. A dynamic shelf-life prediction method considering actual uncertainty: Application to fresh fruits in long-term cold storage[J]. Journal of Food Engineering, 2023, 349: 111471.
- [65] 游静, 黄纪念, 孙强, 等. 芝麻巧克力棒的配方优化及货架期预测[J]. 食品工业, 2024, 45(2): 50-57.
- [66] 殷献华, 殷诚, 孟晶晶, 等. 不同贮藏温度下酸乳品质变化及货架期预测[J]. 乳业科学与技术, 2023, 46(5): 38-42.
- [67] Liu K, Fang H, Cui F, et al. ARTP mutation and adaptive laboratory evolution improve probiotic performance of *Bacillus coagulans*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(14): 6363-6373.
- [68] 王玉雪. 高产纳豆激酶枯草芽孢杆菌的诱变选育及组学分析[D]. 江南大学, 2022.
- [69] Wei X, Zhou Y, Chen J, et al. Efficient expression of nattokinase in *Bacillus licheniformis*: host strain construction and signal peptide optimization[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(2): 287-295.

- [70] Zhang X, Zhang X-F, Li H-P, et al. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(12): 5387-5396.
- [71] 蔡冬波. 信号肽对地衣芽胞杆菌中纳豆激酶分泌的影响[D]. 华中农业大学, 2023.
- [72] 高荣, 郑志国, 鲍时翔, 等. 产褐藻胶裂解酶菌株筛选与高产酶菌株的 ARTP 诱变选育[J]. *中国酿造*, 2022, 41(8): 64-69.
- [73] Tsumura Y, Ohyane A, Yamashita K, et al. Which characteristic of Natto: appearance, odor, or taste most affects preference for Natto[J]. *Journal of Physiological Anthropology*, 2012, 31(1): 13.
- [74] 孙娜, 朱秀娟, 何九军, 等. 核桃粕纳豆发酵工艺优化及其品质分析[J]. *中国酿造*, 2023, 42(9): 156-162.
- [75] 缪文玉, 杨金梅, 宋露露, 等. 火麻油对幽门螺杆菌抑菌活性及作用研究[J]. *食品与发酵科技*, 2023, 59(5): 23-27.
- [76] Liu D, Han Z, Hu Z, et al. Comparative analysis of the transcriptome of *Bacillus subtilis natto* incubated in different substrates for nattokinase production[J]. *Process Biochemistry*, 2023, 129: 30-43.
- [77] 白琳, 买买提依明茹先古丽, 丁帅杰, 等. 蓝莓酵素中复合菌种添加比例的确定及发酵工艺优化[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(5): 91-99+37.
- [78] Shang H M, Zhou H Z, Yang J Y, et al. In vitro and in vivo antioxidant activities of inulin[J]. *PloS One*, 2018, 13(2): e0192273.
- [79] 张静雯. 组合菌发酵过程中产生的微生物酵素及其生物活性研究[D]. 武汉轻工大学, 2016.
- [80] Li Y, Chen L, Tang X, et al. Combined Computer-Aided Predictors to Improve the Thermostability of Nattokinase[J]. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2023, 12(16): 3045.
- [81] Vrhovsek U, Masuero D, Palmieri L, et al. Identification and quantification of flavonol glycosides in cultivated blueberry cultivars[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2012, 25(1): 9-16.

- [82] 卿明义, 林琳, 钟璇, 等. 预包装螺蛳粉感官评价体系的建立研究[J]. 食品与发酵科技, 2024, 60(1): 76-81.
- [83] 朱玲凤, 谢秋涛, 袁洪燕, 等. 发芽糙米红豆饮品研制[J]. 食品工业, 2024, 45(2): 1-4.
- [84] 周晓, 尹含靓, 谭益升, 等. 肉枣加工过程中细菌群落消长规律[J]. 食品与机械, 2023, 39(12): 109-116.

攻读学位期间发表的学术论文目录

1. 黄茜琳, 黄俊宝, 高旭丽, 罗雅妮, 陶伟, 郭明雨, 刘永圆, 吴超, 吴晶, 刘艳, 《*aprN* 的 N 端编码序列改造促进纳豆激酶的高效表达》。食品与发酵工业, 网络首发。
2. 黄茜琳, 黄俊宝, 高旭丽, 罗雅妮, 陶伟, 郭明雨, 刘永圆, 吴晶, 吴超, 薛正莲, 陈宇, 刘艳, 《基于 RNA-seq 分析 *bdhA* 敲除对枯草芽孢杆菌产纳豆激酶和 MK-7 的影响》。微生物学报, 网络首发。
3. 黄俊宝, 黄茜琳, 陈宇, 高旭丽, 罗雅妮, 陶伟, 郭明雨, 刘永圆, 吴晶, 刘艳, 《*menD* 表达强度对枯草芽孢杆菌中维生素 K2 产量的影响》。食品与发酵工业, 网络首发。
4. 黄俊宝, 黄茜琳, 陈宇, 高旭丽, 罗雅妮, 陶伟, 刘永圆, 郭明雨, 吴晶, 刘艳, 《*PhrG-RapG-DegU* 群体感应调控枯草芽孢杆菌中甲萘醌-7 的合成》。食品与生物技术学报, 已录用。

致 谢

日月不肯迟，四时相催迫，硕士三年似终止于转瞬。读研之始，起于迷茫，遂随波逐流。三年学涯，悲欢交加，亦收获颇多。清晰的记得 22 年四、五月份数次实验失败的疲惫和悲愤；记得深夜归寝路上陪我消遣玩耍的猫咪：小胖、斗鸡眼、秋月、佐佐和地超们，以及无论春夏秋冬都在深夜里数次为我开门的宿管阿姨；记得刘艳老师、薛正莲老师、李松老师、魏胜华老师们和实验室同伴们，在我遇见实验和写作问题时的无私帮助和指导。一路走来，遇见的诸位都是我的幸运。

自愧于自己从来不是一个努力的人。研一时期奔波于教室、食堂与宿舍之间，实验室属于我的身影属实较少，虽未付出时间在实验室中，但似乎也未曾在外尽兴玩乐。研二时期，实验开始走上正轨，在此期间，感谢黄俊宝同学和吴晶同学在实验过程中为我提供的指导和帮助。感谢我的高旭丽和罗雅妮师妹们，给我带来的帮助和欢乐。遇见张文芳是我的幸运，是室友也是同事，我们结伴相随良久。参天之本，必有其根；怀山之水，必有其源。我很幸运，得遇良师，作为一名性情散漫的摆烂人士，我深知严格管理的实验课题组其实并不合适自身，长期处于压力管控中，也许会取得相应的研究成果，但于我而言苦不堪言。感谢刘艳老师为我提供的研究方向，并得以在相对自由的实验环境中不断探索和尝试，培养自己独立思考和自主研究的能力，让我有勇气摆脱相对怯懦的自己。研三期间，基本忙于论文写作，在此期间，尤记得处于百忙之中的刘艳老师，在元宵节夜晚依旧帮我修改小论文，每次的小论文返修老师都会帮忙参与修改，小论文的接收，归功于刘艳老师的指导及修改，很庆幸遇见如此认真负责的优秀导师。

感谢我的家人们，在我读研路上的支持和鼓励。感谢母亲为缓解焦虑的自己，给我做的手工包包和编织的红色锦鲤。读研之路，属实幸运，收获了太多的善意和爱意，然而林无静树，川无停流，祝福诸位都能努力成为更好的自己。