

# 蚕豆纳豆发酵工艺优化 及其酶学性质

张杰<sup>1,2,3</sup>, 杨希娟<sup>1,2,3,\*</sup>, 党斌<sup>1,2,3</sup>, 张 Wen-刚<sup>1,2,3</sup>

(1. 青海大学农林科学院, 青海西宁 810016;

2. 青海省农林科学院, 青海西宁 810016;

3. 青海省青藏高原农产品加工重点实验室, 青海西宁 810016)

**摘要:**为开发新型蚕豆产品,提高蚕豆附加值研究以蚕豆为原料,通过单因素实验和正交试验优化出蚕豆纳豆的最佳工艺,并对发酵得到的纳豆激酶进行酶学性质研究。结果表明,最佳工艺条件为:蚕豆浸泡 48 h,常压蒸煮 20 min,接种量为 6%,40 ℃下发酵 72 h,此时,纳豆激酶活力值最高为(4860.13 ± 470.02) U·g<sup>-1</sup>,感官评分为(95.67 ± 0.71)分。酶学性质结果表明,该酶在 25~40 ℃具有较好的热稳定性;在 pH6~9 范围内较为稳定,保持相对酶活 89.05%以上;Mg<sup>2+</sup>和 Ca<sup>2+</sup>对纳豆激酶活性具有促进作用,Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>抑制作用明显,Zn<sup>2+</sup>无明显作用。本研究为蚕豆产品的开发及蚕豆纳豆的产业化生产提供参考。

**关键词:**蚕豆,纳豆激酶,工艺优化,酶学性质

## Optimization of Fermentation Process of Natto by Broad Bean and Its Enzymatic Properties

ZHANG Jie<sup>1,2,3</sup>, YANG Xi-juan<sup>1,2,3,\*</sup>, DANG Bin<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Wen-gang<sup>1,2,3</sup>

(1. Academy of Agriculture and Forestry, Qinghai University, Xining 810016, China;

2. Qinghai Academy of Agriculture and Forestry, Xining 810016, China;

3. Tibetan Plateau Key Laboratory of Agric-Product Processing in Qinghai, Xining 810016, China)

**Abstract:** In order to develop new broad bean products and increase the added value of broad bean, this study was based on broad bean as main material. The single-factor experiment and orthogonal experiment were used to optimize the best process of natto by broad bean and then the enzymatic properties of nattokinase were studied. The results showed that the optimal process conditions were as follows: The broad bean were soaked in 48 h and steamed under atmospheric pressure for 20 min, the inoculation of 6% and fermented at 40 ℃ for 72 h. Under these conditions, the enzyme activity reached (4860.13 ± 470.02) U·g<sup>-1</sup>, and the sensory score was (95.67 ± 0.71) points. Enzymatic properties analysis showed that the nattokinase had a better thermal stability at 25 ℃ to 40 ℃. Meanwhile, the nattokinase had good stability at a pH range from 6 to 9, and the relative enzyme activity was kept over 89.05%. The metal ions of Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> had an effect on promoting the activity of nattokinase, and the metal ions of Cu<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> had an obvious effect on inhibiting nattokinase. However, the metal ions of Zn<sup>2+</sup> had no obvious effect. This study could provide a reference for the development of broad bean products and the industrial production of broad bean natto.

**Key words:** broad bean; nattokinase; process optimization; enzymatic properties

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2019)06-0205-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.06.034

引文格式: 张杰, 杨希娟, 党斌, 等. 蚕豆纳豆发酵工艺优化及其酶学性质[J]. 食品工业科技, 2019, 40(6): 205-210.

纳豆(natto)是一种源于日本且历史悠久的传统发酵食品<sup>[1]</sup>,具有多种医疗保健功效<sup>[2]</sup>,其中包括防止骨质疏松、抗致病菌、促凝血、延缓衰老等,受到广大学者的特别重视。纳豆激酶(Nattokinase, NK)作

为纳豆发挥保健功效的主要功能因子,其显著的降血栓功能使其成为当前纳豆研究的热点和焦点。目前已有很多相关报道证实纳豆激酶的功能特性主要表现为溶栓作用<sup>[3-4]</sup>,同时纳豆激酶具备高安全性、

收稿日期: 2018-06-15

作者简介: 张杰(1989-),女,硕士,研究实习员,研究方向: 发酵及生物技术, E-mail: zjzj89zjzj@163.com。

\* 通讯作者: 杨希娟(1980-),女,硕士,副研究员,研究方向: 食品功能化学与营养, E-mail: 156044169@qq.com。

基金项目: 青海省农林科学院创新基金项目(2016-NKY-01);青海省青藏高原农产品加工重点实验室建设项目(2-24);西宁市科技局科技开发项目(2017-k-57)。

低成本、经口服后能够迅速入血<sup>[5]</sup>及在胃肠中具有良好稳定性等优点<sup>[6-9]</sup>,因而纳豆激酶作为新一代的溶栓药物<sup>[10-11]</sup>具有广阔的开发前景。

蚕豆俗称胡豆、南豆、罗汉豆、佛豆、川豆、寒豆和利马豆等<sup>[12]</sup>,蚕豆营养丰富,其淀粉及蛋白质含量高、脂肪含量低,是一种粮食、蔬菜和饲肥兼用的作物<sup>[13-14]</sup>。与传统发酵纳豆的原料黄豆相比,蚕豆含有丰富的淀粉、脂肪含量低,更利于纳豆枯草芽孢杆菌的生物利用,无需外加碳源物质就能达到高效发酵,同时改善其原有的风味和口感。目前,有少量学者以芸豆<sup>[15]</sup>、红豆<sup>[16-17]</sup>、黑豆<sup>[18-19]</sup>和鹰嘴豆<sup>[20-21]</sup>作为纳豆发酵主要原料开发新型保健产品,其纳豆激酶活力及口感均得到一定程度的改善。李宏梁等<sup>[15]</sup>以芸豆为原材料,研究芸豆纳豆最佳发酵工艺条件,结果表明,芸豆用3倍的水浸泡10 h,加入0.5% NaCl,蒸汽灭菌锅内121 ℃下蒸煮35 min,冷却至45 ℃以下进行接种,接种量为9%,37 ℃下发酵20 h,温度4 ℃下老化24 h,其感官评定值达到9.6分。王琳等人以红豆为原料,应用响应面法优化红豆纳豆的发酵工艺。结果表明,红豆纳豆最佳发酵条件为接种量6%、接种种龄18 h、发酵时间21.5 h,在此发酵工艺条件下,感官评分为97.7分,纳豆激酶酶活力为1140 U/g<sup>[17]</sup>。而以蚕豆为材料发酵纳豆的相关研究报道甚少,至今未见蚕豆在纳豆食品领域中的应用。另外,当前蚕豆的主要加工方式多以油炸蚕豆的休闲食品为主,其加工水平低,产品花样少,产品档次低,其价值没有得到合理的开发与利用。

因此,本研究旨在创新蚕豆纳豆发酵工艺,开发新型纳豆产品,解决蚕豆产品加工单一难题,提高纳豆激酶活力,同时探明蚕豆发酵产纳豆激酶的酶学特性,为后续蚕豆—纳豆激酶产品进一步加工及利用奠定基础,指导蚕豆健康消费方面具有重要的意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

青海GF47蚕豆 绿子叶、干蚕豆,储存期1年,由青海作物育种栽培研究所蚕豆研究室提供;纳豆枯草芽孢杆菌BSCZ-4 实验室诱变保存菌株<sup>[9]</sup>;尿激酶(5 KU) 购自北京雅安达生物技术有限公司;凝血酶(1000 U/支)、牛纤维蛋白原 购自Sigma公司;其余试剂 均为分析纯。菌种培养基:液体培养基 蛋白胨5.0 g,牛肉膏3.0 g,NaCl 5.0 g,蒸馏水1.0 L,pH7.0。

101A-2ET电热鼓风干燥箱 上海实验室仪器厂有限公司;LRH-150生化培养箱 上海齐欣科学仪器有限公司;BCD-649WE冰箱 轻道海尔股份有限公司;SW-CJ-2D型(实用垂直新颖)双人净化工作台 苏州净化设备有限公司;KG-SX-500电热手提高压消毒器 KAGOSHIMA SEISAKUSYO IMC;AL204电子天秤 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;PHS-3C型pH计 上海仪电科学仪器有限公司;DL-5M低俗冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;BDP-207C超低有机物型纯水机 南

京权申生物科技有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 种子液的制备 参照文献<sup>[22-23]</sup>的方法,用接种环挑取BSCZ-4斜面菌种两环,接种于装有100 mL液体种子培养基的250 mL三角瓶中,37 ℃、150 r/min摇床培养15 h。

1.2.2 蚕豆纳豆发酵工艺流程 蚕豆→挑选→清洗→常温浸泡→沥干→常压蒸煮→冷却→接种→发酵→后熟→成品

挑选、清洗:选用蚕豆饱满、去除残豆、杂豆、泥土,清洗后用纱布沥干;后熟:将发酵后的蚕豆纳豆放置于4 ℃冰箱,放置24 h。

1.2.3 粗酶液的制备 参照张杰等<sup>[24]</sup>的方法。将发酵后的蚕豆纳豆按1:2(g/g)加入生理盐水,4 ℃下浸提24 h。并在4500 r·min<sup>-1</sup>条件下离心20 min,上清液即为纳豆激酶粗酶液。

1.2.4 纳豆激酶酶活力值测定 采用琼脂糖-纤维蛋白平板法<sup>[25]</sup>,并结合文献<sup>[9]</sup>的方法测定酶活力值。得到尿激酶标准曲线为: $y = 0.003x + 0.3937$ ,相关系数 $R^2 = 0.9976$ 。式中:y为溶解圈面积,x为酶活力值。

1.2.5 蚕豆纳豆发酵工艺单因素实验 取GF47蚕豆,在浸泡时间为48 h、常压蒸煮20 min、接种量8%、37 ℃下培养60 h的恒定条件下,分别考察接种量(2%、4%、6%、8%、10%)、浸泡时间(18、24、30、36、42、48 h)、蒸煮时间(10、15、20、25、30 min)、发酵温度(31、34、37、40、43 ℃)、发酵时间(24、36、48、60、72 h)对蚕豆纳豆发酵工艺的影响。

1.2.6 正交试验 根据单因素试验结果,以感官评分及纳豆激酶酶活力为指标,采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验法对固态发酵条件中接种量、蒸煮时间、发酵温度、发酵时间4个影响因素进行优化,因素水平表如表1所示。

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	试验因素			
	A 接种量 (%)	B 蒸煮时间 (min)	C 发酵温度 (℃)	D 发酵时间 (h)
1	4	15	37	48
2	6	20	40	60
3	8	25	43	72

1.2.7 感官评定 采用评分法进行感官评定,以发酵得到的蚕豆纳豆产品的拉丝情况、气味、颜色和口感为评定指标,组织10名(5男5女)经过基础培训的人员对蚕豆纳豆产品进行评分,取平均值,评分标准见表2。

1.2.8 蚕豆纳豆激酶酶学性质研究

1.2.8.1 热稳定性 将制备得到的粗酶液置于不同温度(25、30、40、50、60、70 ℃)的水浴中,在此条件下保温3 h,以25 ℃保温3 h的酶活力为100%,测定并计算其相对酶活<sup>[26]</sup>。

1.2.8.2 保温时间稳定性 将制备得到的粗酶液在

表2 纳豆感官评分标准  
Table 2 Sensory evaluation standard of natto

分数(分)	拉丝	气味	颜色	口感
21~25	均匀细长黏丝	无氨味、有纳豆特殊香味	鲜亮、有光泽	口感酥软、湿润
16~20	较多的黏细丝	有稍许氨味	色暗、有光泽	较酥软、湿润
11~15	很多黏细丝	有氨味	暗黄色	较酥软、较湿润
6~10	粗状的黏丝	氨味重	褐色	较酥软、较干
0~5	结块状黏丝	有强烈的氨味	暗褐色	不酥软、较干

40 °C 的水浴中保温不同时间 (30、60、90、120、150、180 min), 以最高的酶活力为相对酶活 100%, 测定并计算出其相对酶活<sup>[26]</sup>。

1.2.8.3 pH 稳定性 将粗酶液加入到等体积不同 pH(4、5、6、7、8、9、10、11) 的缓冲液中, 并在室温下孵育 24 h, 以其中最高酶活力时为 100%, 测定并计算出其相对酶活<sup>[26]</sup>。

1.2.8.4 金属离子稳定性 将 900 μL 粗酶液分别与 50 mmol/L 的 Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 溶液 100 和 20 μL 混合, 加蒸馏水补充至 1 mL, 即配成含金属离子 5 和 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的酶液。将配制好的酶液置于 37 °C 下孵育 18 h, 以无金属离子的纳豆激酶酶活为 100%, 测定得到相对酶活<sup>[26]</sup>。

### 1.3 数据统计分析

所有实验均重复 3 次。数据用 DPS 6.5 进行方差分析和多重比较, 以  $p < 0.05$  为显著性检验标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果分析

2.1.1 接种量对蚕豆纳豆发酵工艺的影响 由图 1 可知, 随着接种量的增加, 纳豆激酶活力及感官评分均呈现先增大后减小的趋势, 当接种量 < 4% 时, 纳豆激酶酶活力及感官评分均相对较低, 这主要是由于接种量小, 使得接入的纳豆枯草芽孢杆菌菌数少, 生长缓慢、发酵迟缓, 从而导致蚕豆纳豆粘度较低、拉丝较少, 纳豆外观无色泽, 咀嚼香味不浓郁, 产酶活力低; 而当接种量 > 8% 时, 菌株生长过快, 且菌株之间相互影响, 加之蚕豆表面产生粘稠物质阻碍菌株供养, 此时不利于菌株的生长和发酵, 致使产酶活力降低<sup>[9]</sup>、发酵物相互黏连成块、感官较差。综上所述

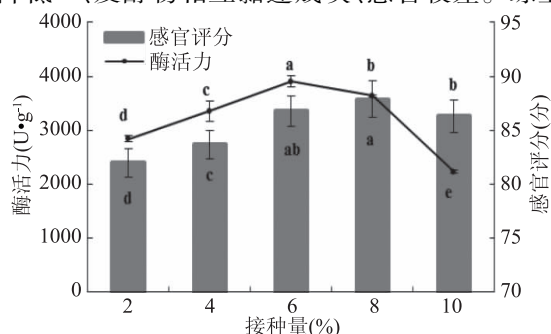


图1 接种量对蚕豆纳豆发酵工艺的影响  
Fig.1 Effects of inoculum on fermentation process of natto by broad bean

注: 图中小写字母不同表示同一指标差异显著 ( $p < 0.05$ ), 图 2~图 8 同。

述, 选择 4%、6% 和 8% 的接种量作为下一步正交试验的 3 个水平。

2.1.2 浸泡时间对蚕豆纳豆发酵工艺的影响 蚕豆的浸泡时间对整个发酵过程有着重要的影响, 由图 2 可知, 随着浸泡时间的增长, 纳豆激酶活力值及感官评分呈现逐渐增大的趋势, 48 h 后趋于稳定。当浸泡时间为 48 h 时, 此时酶活力最大, 为  $(3400.52 \pm 124.54) U \cdot g^{-1}$ , 感官评分为  $(85.22 \pm 0.83)$  分。这是由于当蚕豆浸泡时间过短, 其籽粒过硬, 致使蚕豆纳豆口感较差、不酥软, 同时由于水分不充足, 对于纳豆枯草芽孢杆菌的发酵产生一定抑制<sup>[15]</sup>, 酶活较低; 当浸泡 48 h 后, 蚕豆达到充分浸泡, 继续浸泡产酶活力及感官评分趋于稳定。由多重比较分析结果可知, 浸泡时间达 48 h 后酶活力无显著差异, 据此确定出正交试验中浸泡时间为 48 h。

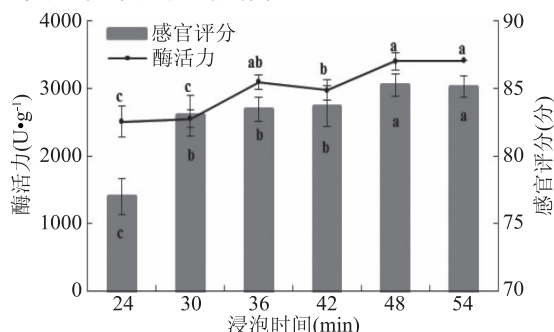


图2 浸泡时间对蚕豆纳豆发酵工艺的影响  
Fig.2 Effects of soaking time on fermentation process of natto by broad bean

2.1.3 蒸煮时间对蚕豆纳豆发酵工艺的影响 蒸煮时间对蚕豆纳豆发酵工艺的影响如图 3 所示, 随着蒸煮时间的增加, 蚕豆籽粒由硬变软, 其纳豆激酶活力及感官评分呈现先增大后减小的趋势, 当蒸煮时间为 20 min 时发酵所得的纳豆激酶酶活力值最高, 为  $(3382.14 \pm 375.363) U \cdot g^{-1}$ , 此时感官品质相对较高, 其感官评分达到  $(85.96 \pm 1.59)$  分。而当蒸煮时间过长, 其营养物质损失较多, 发酵产物较少, 结合多重比较的结果, 选择 15、20 和 25 min 为正交试验水平。

2.1.4 发酵温度对蚕豆纳豆发酵工艺的影响 微生物在发酵产酶过程中, 适宜的发酵温度是保证酶活力的主要因素之一。由图 4 可知, 随着发酵温度的增高, 纳豆激酶酶活力及感官评分呈现先增大后减小的趋势, 当发酵温度为 37 °C 时, 所得纳豆激酶酶活力最大, 为  $(3907.64 \pm 102.85) U \cdot g^{-1}$ 。感官评价结果表明, 当温度 37~43 °C, 发酵产物色泽鲜亮、口感

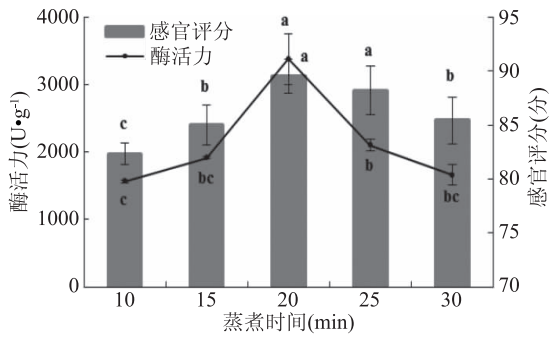


图3 蒸煮时间对蚕豆纳豆发酵工艺的影响

Fig.3 Effects of cooking time on fermentation process of natto by broad bean

酥软、感官评分较高,此温度范围为纳豆枯草芽孢杆菌最适温度范围,且此范围内纳豆激酶酶活力也高于其他水平,因此综合考虑,选择 37、40、43 °C 为正交试验水平。

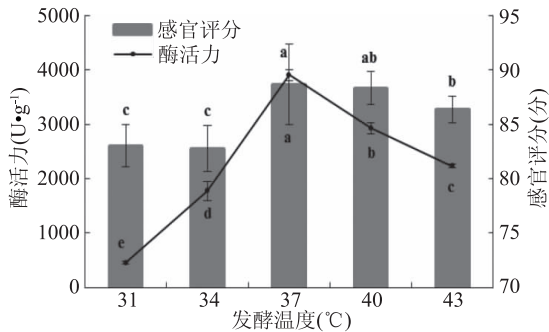


图4 发酵温度对蚕豆纳豆发酵工艺的影响

Fig.4 Effects of fermentation temperature on fermentation process of natto by broad bean

2.1.5 发酵时间对蚕豆纳豆发酵工艺的影响 发酵时间对蚕豆纳豆发酵工艺的影响如图 5 所示,随着

发酵时间的增加,纳豆激酶活力值及感官评分呈现先上升后下降的趋势。在发酵温度为 60 h 时,纳豆激酶活力达到最大值,为  $(3851.14 \pm 228.66) \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ,此时感官评分为  $(88.78 \pm 3.07)$  分。随着发酵时间的延长,感官评价得分基本趋于稳定。而当进一步增加发酵时长时,纳豆激酶的活力值又略微下降。这主要是由于发酵时间过短,蚕豆纳豆口感不软糯,纳豆激酶活力低,其保健功效不理想,而发酵时间过长,纳豆的氨味较为浓郁,影响其风味。鉴于此,选择发酵 48、60、72 h 作为正交试验的 3 个水平。

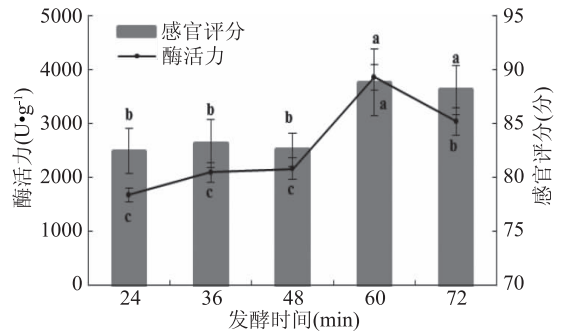


图5 发酵时间对蚕豆纳豆发酵工艺的影响

Fig.5 Effects of fermentation time on fermentation process of natto by broad bean

## 2.2 正交试验

2.2.1 正交试验结果分析 在单因素实验基础上选择接种量、蒸煮时间、发酵温度、发酵时间作为试验四因素,按  $L_9(3^4)$  正交表进行试验,确定最优发酵工艺参数。正交试验结果及分析见表 3、表 4。

由正交试验结果和方差分析表 4 可知,接种量(A)、蒸煮时间(B)、发酵温度(C)、发酵时间(D)对蚕豆纳豆发酵工艺的影响均达到极显著水平 ( $p < 0.01$ ),其中蒸煮时间对蚕豆纳豆发酵工艺的影响最

表3 正交试验结果及分析

Table 3 Results and analysis of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	酶活力 ( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ )	感官评分 (分)
1	1	1	1	1	$3640.20 \pm 85.73$	$90.44 \pm 1.33$
2	1	2	2	2	$4290.16 \pm 36.35$	$92.56 \pm 1.24$
3	1	3	3	3	$3225.22 \pm 201.65$	$90.11 \pm 0.78$
4	2	1	2	3	$4486.05 \pm 297.31$	$95.33 \pm 1.22$
5	2	2	3	1	$4377.75 \pm 145.12$	$94.44 \pm 1.01$
6	2	3	1	2	$2425.82 \pm 72.85$	$87.11 \pm 1.27$
7	3	1	3	2	$3227.47 \pm 139.08$	$89.89 \pm 2.03$
8	3	2	1	3	$3616.73 \pm 271.41$	$90.33 \pm 3.39$
9	3	3	2	1	$2696.02 \pm 30.07$	$87.44 \pm 1.33$
酶活力值	$k_1$	3718	3784	3228	3571	
	$k_2$	3763	4095	3824	3314	
	$k_3$	3180	2782	3610	3776	
	R	583	1313	596	462	
感官评分	$k_1$	91.04	91.89	89.30	90.78	
	$k_2$	92.30	92.44	91.78	89.85	
	$k_3$	89.22	88.22	91.48	91.93	
	R	3.07	4.22	2.48	2.07	

表4 正交试验方差分析表

Table 4 Variance analysis of orthogonal test

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
酶活力					
A	1263940	2	631970	22.44	**
B	5646898	2	2823449	98.48	**
C	1095849	2	547925	19.11	**
D	641712	2	320856	11.19	**
感官评分					
A	128.96	2	64.48	22.81	**
B	284.22	2	142.11	50.27	**
C	99.19	2	49.59	17.54	**
D	58.30	2	29.15	10.31	**

注: \*\* 表示差异极显著 ( $p < 0.01$ )。

大,为决定性因素。蚕豆纳豆发酵工艺的最优组合为  $A_2B_2C_2D_3$ ,即接种量为6%,蒸煮时间为20 min,发酵温度为40℃,发酵时间为72 h。

2.2.2 验证试验结果分析 根据正交试验结果其最优组合为  $A_2B_2C_2D_3$ ,进行多次重复性 ( $n = 3$ ) 验证性试验,测得纳豆激酶活力值为  $(4860.13 \pm 470.02) U \cdot g^{-1}$ ,感官评分为  $(95.67 \pm 0.71)$  分,与传统黄豆采用相同菌株发酵纳豆激酶<sup>[24]</sup>相比极显著 ( $p < 0.01$ ) 提高,所得到的正交试验结果准确合理,具有一定的应用价值。

### 2.3 蚕豆纳豆激酶学性质结果分析

2.3.1 热稳定性分析 由图6可知,蚕豆固态发酵产生的纳豆激酶在高温下不稳定,当温度高于50℃时,该酶活性下降迅速且差异显著;当温度升至70℃时,该酶相对酶活仅为19.41%;而当温度较低,在25~40℃时,酶活损失较小且差异不显著,40℃时相对酶活达到90.05%以上。这可能是由于当温度过高时,纳豆激酶结构受到破坏,致使酶失活<sup>[27]</sup>。因此,在后续纳豆激酶的储存和加工利用上,应控制温度40℃以下,减少其纳豆激酶的损失。

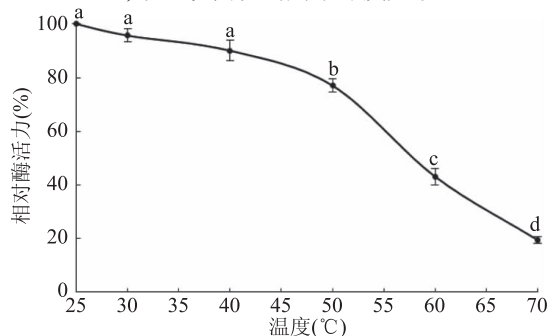


图6 温度对纳豆激酶活力的影响

Fig.6 Effects of temperature on nattokinase activity

2.3.2 保温稳定性分析 由图7可知,在40℃下随着保温时间的延长纳豆激酶的酶活力值逐渐降低,但整体下降趋势较为平缓,当保温时间达到90 min时,随着时间的延长,纳豆激酶酶活力值趋于稳定,此时相对酶活达到84.09%。根据多重比较的结果可知,保温时间60 min后对纳豆激酶活力无显著影响,纳豆激酶较为稳定。

2.3.3 pH 稳定性分析 由图8可知,在pH6~9时,

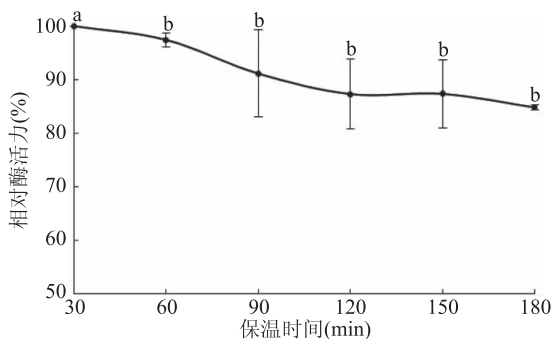


图7 保温时间对纳豆激酶活力的影响

Fig.7 Effects of incubation time on nattokinase activity

蚕豆固态发酵产生的纳豆激酶活性相对比较稳定,其相对酶活在89.05%~100%之间。而当pH低于6时,纳豆激酶损失严重,pH为4时,其相对酶活仅为28.11%;而当pH高于9时,纳豆激酶活力值迅速下降。结果说明纳豆激酶耐受pH具有选择性,因此在后续加工、储存时,选择pH6~9有助于保持纳豆激酶活力。

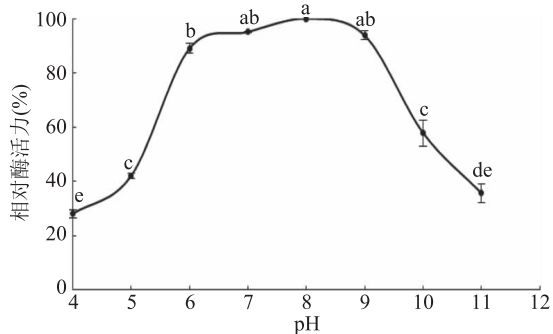


图8 pH对纳豆激酶活力的影响

Fig.8 Effects of pH on nattokinase activity

2.3.4 金属离子稳定性分析 由表5可知,当金属离子浓度为  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  对蚕豆发酵得到的纳豆激酶活力具有促进作用;而当金属浓度增加至  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  对纳豆激酶活力促进增强。另外,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  对纳豆激酶活力具有抑制作用,随着金属离子浓度的增加抑制作用增强;  $\text{Zn}^{2+}$  对纳豆激酶活性的影响无明显作用。因此,在实际生产加工中,添加  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  可增强纳豆激酶的稳定性的,降低纳豆激酶活力的损失。

表5 金属离子对纳豆激酶活力的影响

Table 5 Effects of metal ions on nattokinase activity

金属离子	相对酶活(%)	
	离子浓度 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	离子浓度 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
对照	100	100
$\text{Cu}^{2+}$	$97.25 \pm 3.90$	$65.11 \pm 1.42$
$\text{Mg}^{2+}$	$108.38 \pm 4.06$	$110.06 \pm 1.24$
$\text{Fe}^{3+}$	$78.69 \pm 1.58$	$63.06 \pm 1.35$
$\text{Ca}^{2+}$	$108.26 \pm 1.30$	$119.11 \pm 1.53$
$\text{Zn}^{2+}$	$88.06 \pm 1.30$	$89.23 \pm 1.30$

### 3 结论

本试验对蚕豆固态发酵产纳豆激酶工艺进行优

化,得到最佳提取工艺为蚕豆浸泡时间为48 h,蒸煮时间为20 min,接种量为6%,发酵温度为40℃,发酵时间为72 h,在此条件下,纳豆激酶活力达到最高,为 $4860.13 \pm 470.02 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ,感官评分为 $95.67 \pm 0.71$ 分。该酶在25~40℃具有较好的热稳定性;pH在6~9范围内其酶较为稳定,保持相对酶活89.05%以上; $\text{Mg}^{2+}$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 对纳豆激酶活性具有促进作用, $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 抑制作用明显, $\text{Zn}^{2+}$ 无明显作用。本研究为推广蚕豆资源的利用,增加纳豆新品种,开拓市场,提高其综合加工利用率和附加值提供了重要的途径。

### 参考文献

[1] Xu J P, Du M, Yang X L, et al. Thrombolytic effects *in vivo* of nattokinase in a carrageenan-induced rat model of thrombosis [J]. *Acta Haematologica*, 2014, 132(2): 247-253.

[2] Sumi H, Hamada H, Tsushima H. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto; atypical and popular soy-bean food in the Japanese diet [J]. *Experientia*, 1987, 43(10): 1110-1111.

[3] Fujita M, Hong K, Ito Y, et al. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 1995, 18(10): 1387-1391.

[4] 平谷一, 中西晃一郎, 须见洋行. 血栓溶解剂: 日本, 89180834[P].

[5] Essam K. Fibrinolytic bacterial enzymes with thrombolytic Activity [M]. *Springer Briefs in Microbiology*, 2012: 35-43.

[6] 王常苏, 孙晓彤, 余洁, 等. 纳豆激酶高活性菌株 BN-05 鉴定及发酵工艺优化 [J]. *中国酿造*, 2014, 33(1): 91-95.

[7] Ero M P, Ng C M, Mihsilovski T, et al. A pilot study on the serum pharmacokinetics of nattokinase in humans following a single, oral, daily dose [J]. *Alternative Therapies Health Medicine*, 2013, 19(3): 16-19.

[8] 马国兴, 潘峰, 王庆波, 等. 纳豆激酶分子结构与潜在应用价值分析 [J]. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(4): 342-349.

[9] 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.

[10] Chandrasekaran S D, Vaithilingam M, Shanker R, et al. Exploring the *in vitro* thrombolytic activity of nattokinase from a new strain *Pseudomonas aeruginosa* CMSS [J]. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2015, 8(10): 1-8.

[11] Wu C, Gao C M, Lv S Y, et al. Construction of polylysine dendrimer nanocomposites carrying nattokinase and their application in thrombolysis [J]. *Journal of Biomedical Materials*

Research Part A, 2017, 106(2): 440-449.

[12] 兰佳佳, 杨希娟, 王生君. 蚕豆加工利用综述 [J]. *青海农林科技*, 2017(4): 46-49.

[13] 张华龙, 王明成, 陈定国. 蚕豆菜肥两用种植模式初探及发展对策 [J]. *湖北农业科学*, 2017, 56(19): 3619-3620, 3757.

[14] Siah S, Konczk I, Wood J A, et al. Effects of roasting on phenolic composition and *in vitro* antioxidant capacity of Australian grown gaba beans (*Vicia faba* L.) [J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2014, 69(1): 85-91.

[15] 李宏梁, 赵倩楠. 芸豆纳豆发酵工艺条件的研究 [J]. *中国调味品*, 2014, 39(3): 46-49.

[16] Lin N N, Lee Y F, Chi Y J, et al. *Bacillus subtilis*-fermented red bean (red bean natto) reduces hyperlipidemia levels in hamsters fed an atherogenic diet [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2017, 41(1): 1-11.

[17] 王琳, 高辰哲, 刘丹怡, 等. 响应面法优化红豆纳豆的发酵工艺 [J]. *中国酿造*, 2018(1): 190-194.

[18] Ma Y Y, Liu Q B, Yang H W, et al. Study on the improvement of natto-production process [J]. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2015, 7(9): 704-708.

[19] Shih M C, Yang K T, Su S Y, et al. Optimization process of roasted broken black soybean natto using response surface methodology [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2013, 37(5): 474-482.

[20] 金爽, 谭金燕, 白秀云, 等. 固载纳豆菌发酵鹰嘴豆产品的感官评价 [J]. *粮油食品科技*, 2016, 24(4): 86-89.

[21] 金爽, 谭金燕, 白秀云, 等. 响应面法优化固载纳豆菌发酵鹰嘴豆工艺 [J]. *食品与发酵科技*, 2016, 52(3): 28-32.

[22] 张杰, 葛武鹏, 杨希娟, 等. 纳豆微胶囊的制备及其稳定性 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(22): 157-162.

[23] 陈应运, 魏玉西, 苏东海, 等. 纳豆菌液态发酵蛤蚧制备 ACE 抑制肽的工艺研究 [J]. *核农学报*, 2016, 30(11): 2189-2195.

[24] 张杰, 葛武鹏, 张静, 等. 高产纳豆激酶的枯草芽孢杆菌优选及发酵工艺条件优化 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36(8): 202-205, 209.

[25] Astrup T, Muller S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity [J]. *Archives Biochemistry Biophysics*, 1995, 40: 346-351.

[26] Yang Y G. Study on the enzymatic properties of nattokinase [C]. // 5th International Conference on Information Engineering for Mechanics and Materials, 2015.

[27] 齐少卿, 李晨, 卢海强, 等. 保加利亚乳杆菌异源表达纳豆激酶的性质研究 [J]. *中国食品学报*, 2017, 17(4): 51-57.

一套《食品工业科技》在手，  
纵观食品工业发展全貌