

# 嗜热链球菌发酵改良纳豆工艺优化

何人可, 宋莲军\*, 黄现青, 闫科润, 黄郑朝, 刘 茜

(河南农业大学食品科学技术学院, 郑州市大豆深加工重点实验室, 河南郑州 450000)

**摘要:**采用嗜热链球菌为改良菌种,通过二次发酵改良纳豆。熟制灭菌后的大豆在纳豆菌接种量2%、发酵温度37℃、发酵时间24h条件下进行一次发酵。以嗜热链球菌的发酵温度、发酵时间、接种量为因素,以感官评分、纳豆激酶酶活为指标,通过单因素和响应面实验,研究嗜热链球菌二次发酵改良纳豆的最佳工艺条件。结果表明:在发酵温度42℃、发酵时间18.6h、接种量1.5%时改良效果最佳,得到的感官评分为8.0分,纳豆激酶酶活为1964U/g。改良效果较好,纳豆臭味下降,纳豆激酶酶活提高。

**关键词:**纳豆,嗜热链球菌,改良,纳豆激酶酶活

## Optimization of Fermentation Process for *Streptococcus thermophilus* Improved Natto

HE Ren-ke, SONG Lian-jun\*, HUANG Xian-qing, YAN Ke-run, HUANG Zheng-chao, LIU Xi

(Zhengzhou City Key Laboratory for Soybean Refined, College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450000, China)

**Abstract:** *Streptococcus thermophilus* was used as a modified strain to improve natto by secondary fermentation. The sterilized soybeans were inoculated with 2% natto inoculum and fermented 24 h at 37 °C. Through single factor and response surface experiments, based on the fermentation temperature, fermentation time and inoculum of *Streptococcus thermophilus*, with sensory score and nattokinase activity as indicators, the most effective conditions for secondary fermentation of *Streptococcus thermophilus* was studied. The results showed that the best improvement was obtained when the fermentation temperature was 42 °C, the fermentation time was 18.6 h, and the inoculum volume was 1.5%. The sensory score was 8.0 score and the nattokinase activity was 1964 U/g. The improvement effect was good, the bad odor of natto decreased, and the activity of nattokinase increased.

**Key words:** natto; *Streptococcus thermophilus*; improved; nattokinase enzyme activity

中图分类号: TS201.4

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2020)06-0161-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.06.027

引文格式: 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.

纳豆是一种具有两千年历史的大豆发酵制品,在日本盛行<sup>[1]</sup>。新鲜的纳豆色泽金黄、口感较湿润,有拉丝,搭配调料食用,有独特风味<sup>[2]</sup>。纳豆是由黄豆接种纳豆芽孢杆菌发酵而成,含有丰富的营养物质<sup>[3]</sup>,具有许多保健功能,如溶血栓、预防高血压、降低胆固醇等<sup>[4-6]</sup>。大豆经发酵后维生素 K<sub>2</sub><sup>[7]</sup>、异黄酮含量有所增加,且提高了大豆异黄酮的生物利用率<sup>[8-9]</sup>。纳豆激酶是纳豆中最典型的生物活性物质,是一种丝氨酸蛋白酶<sup>[10]</sup>,具有溶栓效果,可作用于纤维蛋白原与凝血酶形成的纤维蛋白,溶栓效果显著<sup>[11]</sup>,可用作研发血栓类药物<sup>[12]</sup>。除此之外,纳豆激酶还可以辅助治疗其他心脑血管疾病<sup>[13-14]</sup>。

新鲜纳豆因其独特的氨臭味不能被大多数中国

人所接受<sup>[15]</sup>,所以改良其风味、提高接受度具有重要意义。目前改良纳豆的常见方法有三种,优化发酵菌种、添加发酵底物和改变发酵菌种。Takemura等通过敲除特定基因来培育低臭的纳豆菌种<sup>[16]</sup>。Koguchi等通过实验证明改变底物成分可达到减少不良气味的效果<sup>[17]</sup>。吴雪娇等<sup>[18]</sup>通过添加白糖发酵,添加酸奶后熟改良纳豆风味。付文静<sup>[19]</sup>通过添加花生粕共同发酵来改良纳豆,改善了传统纳豆的口感,提升了纳豆的品质。王丽娜等<sup>[20]</sup>通过添加花生发酵和调味料调制蒜蓉口味的纳豆来提高产品的可接受度。陈思<sup>[21]</sup>用纳豆芽孢杆菌 T 与沼泽红假单胞菌混合发酵对纳豆风味进行改良,改良后纳豆激酶酶活提高且氨含量减少,氨臭味有明显改良。

收稿日期: 2019-06-24

作者简介: 何人可(1994-),女,硕士研究生,研究方向:大豆加工,E-mail:hrk0804@163.com。

\*通讯作者: 宋莲军(1969-),女,硕士,教授,研究方向:大豆加工,E-mail:slj69@126.com。

基金项目: 河南省产学研合作计划项目(172107000024)。

高沛汝<sup>[22]</sup>利用纳豆芽孢杆菌和酵母菌共同发酵,氨臭味明显降低。本实验拟采取分步发酵的方式改良纳豆,使纳豆芽孢杆菌在前期发酵时充分利用营养物质生成纳豆激酶,在保留其特征性营养物质的前提下改良其风味。

嗜热链球菌是一种常见发酵剂,在人体内可耐胃酸、胆盐,抑制致病菌并产生维生素等生物活性物质。嗜热链球菌常应用于乳制品发酵,大豆肽风味改良等方面,不仅可以产生特殊风味物质,且因其自身缺乏蛋白酶或酶活较弱,可与纳豆菌竞争含氮蛋白质水解产物<sup>[23]</sup>,减少纳豆菌产生不良气味物质含量。本实验拟通过纳豆芽孢杆菌与乳酸菌嗜热链球菌分步发酵来改良纳豆的风味,设置不同的嗜热链球菌发酵的发酵温度、发酵时间、接种量,通过分析其感官评分、纳豆激酶酶活,探索最佳发酵改良纳豆的条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

黄豆(垦丰16号) 郑州种子市场;纳豆芽孢杆菌(BNCC 185324)、嗜热链球菌(BNCC 335885) 北纳创联生物技术有限公司;MRS培养基、MRS肉汤、牛肉膏、蛋白胨 北京奥博星生物技术有限责任公司;琼脂、0.01 mol/L PBS缓冲溶液、纤维蛋白原、凝血酶(1000 U)、尿激酶(1240 IU) Solarbio公司;盐酸(优级纯) 烟台市双双化工有限公司;其他试剂 均为国产分析纯。

Neofuge 1600R台式高速离心机 上海力申科学仪器有限公司;UV2000紫外可见分光光度计 龙尼柯(上海)仪器有限公司;SX-500全自动蒸汽灭菌锅 北京五洲东方科技发展有限公司;SW-CJ超净工作台 上海树立仪器仪表有限公司;BagMixer400拍击式均质器 法国Interscience公司;K1301半自动定氮仪 上海晟声自动化分析仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 纳豆芽孢杆菌发酵大豆 将黄豆清洗后在30℃下浸泡3h至黄豆颗粒充分吸水膨胀,常压蒸煮30min进行灭菌熟制。冷却至30℃进行纳豆芽孢杆菌接种,接种量为2%(菌液浓度为 $10^6$  CFU/g湿基),在37℃下发酵24h。

1.2.2 嗜热链球菌发酵单因素实验 将纳豆芽孢杆菌发酵后的大豆进行嗜热链球菌二次发酵。以嗜热链球菌发酵温度、发酵时间、接种量为3个因素,以纳豆激酶酶活和感官评分为评价指标进行单因素实验。研究发酵时间30h,接种量1.5%时,发酵温度分别为33、36、39、42、45℃时对评价指标的影响;研究发酵温度42℃,接种量1.5%时,发酵时间分别为0、10、20、30、40、50h时对评价指标的影响;研究发酵温度42℃,发酵时间20h时,接种量分别为0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%时对评价指标的影响。实验在无菌操作台中操作,所有样品接触器材均灭菌处理。

1.2.3 嗜热链球菌发酵响应面优化实验 在单因素实验的基础上,采用Box-Behnken设计原理,以发酵

温度(A)、发酵时间(B)、接种量(C)为优化条件,以感官评分、纳豆激酶酶活为响应值,设计3因素3水平响应面优化实验,确定最优嗜热链球菌发酵条件。因素水平见表1。

表1 Box-Behnken响应曲面实验设计因素和水平表

水平	因素		
	A 发酵温度 (℃)	B 发酵时间 (h)	C 接种量 (%)
-1	39	10	1.0
0	42	20	1.5
1	45	30	2.0

1.2.4 建立感官评分模糊数学模型 根据样品色泽、气味、滋味进行感官评分,感官评分标准如表2所示。参考文献[24-25],建立模糊数学模型。将感官评分得分建立模糊矩阵 $R_{ij}$ 。

$$R_{ij} = \begin{pmatrix} r_{11} & r_{12} & r_{13} \\ r_{21} & r_{22} & r_{23} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ r_{i1} & r_{i2} & r_{i3} \end{pmatrix}$$

式中: $i=1,2,3,\dots$ (样品编号); $j=1,2,3$ 分别代表样品色泽、气味、滋味的得分。

设质量因素权重为 $X$ ,采用强制决定法确定各质量因素的权重,确定权重集为 $X$ 。

$$X = [0.3 \quad 0.4 \quad 0.3]^T$$

即产品质量特性中色泽占30%,气味占40%,滋味占30%。样品模糊数学感官评分集 $Y = R \times X$ 。第 $i$ 组样品的评价结果为 $Y_i = R_i \times X$ 。

1.2.5 纳豆激酶酶活测定和感官评价 纳豆激酶酶活的测定:参考付文静<sup>[19]</sup>改良的分光光度计法;感官评价:选取河南农业大学食品学院10名研究生根据样品色泽、气味、滋味进行感官评分,感官评分标准如表2所示。结果由1.2.4中所建模型进行计算,得到综合评分。

1.2.6 改良前后纳豆营养成分变化 通过测定纳豆水分含量(采用李君<sup>[26]</sup>的干燥箱测定法)、粗脂肪(采用GB 5009.6-2016第一法测定)、粗蛋白(采用GB 5009.5-2016第一法测定)、氨基酸态氮含量(采用甲醛滴定法)、纳豆激酶酶活(参考付文静<sup>[19]</sup>改良的分光光度计法)和异黄酮含量(采用紫外分光光度计法<sup>[27]</sup>)来评价改良前后纳豆的营养变化。

### 1.3 数据统计分析

所有测定重复3次取平均值;实验数据采用SPSS 20.0、Origin 8.0和Design Expert 10.0软件处理分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵温度对纳豆激酶酶活和纳豆感官评分的影响

由图1可知,纳豆激酶酶活随着温度的增加呈先增加后降低的趋势,在42℃时达到最大值,纳豆激酶酶活为 $(1248 \pm 91)$  U/g。发酵温度为45℃时,

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

项目	标准	得分(分)
色泽	色泽为金黄色,颗粒饱满、湿润有光泽	7~10
	色泽为土黄色,有部分褶皱无光泽	4~6
	色泽为黄褐色或发黑、颗粒褶皱、干燥无光泽	0~3
气味	有纳豆特殊豆香味,无氨臭味或少许氨臭味	7~10
	有明显氨臭味	4~6
	有特别浓郁的刺鼻氨臭味	0~3
滋味	口感较湿润,无明显后苦味	7~10
	口感较干涩,有明显后苦味	4~6
	口感较硬且干涩,有强烈苦味	0~3

由于温度过高抑制菌种的生长及代谢,所以纳豆激酶酶活下降;随着温度的增加,感官评分先增加后降低,39 与 42 °C 的感官评分没有显著差异,但在 42 °C 时感官评分最高,为(8.1 ± 0.6) 分。综上,选 42 °C 为后续研究参数。

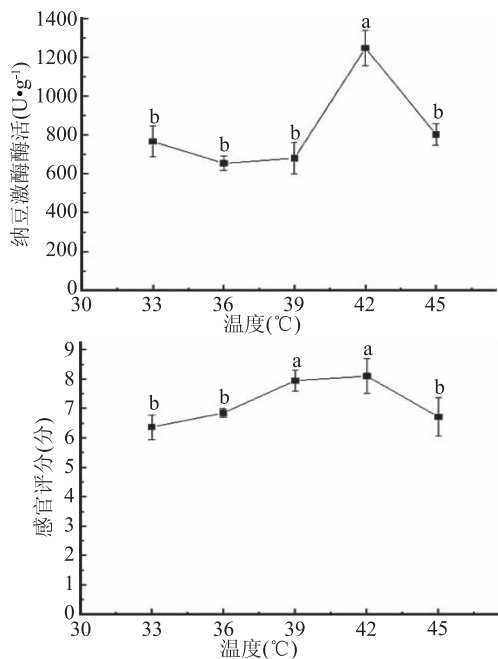


图1 发酵温度对纳豆激酶酶活和纳豆感官评分的影响

Fig.1 Effect of fermentation temperature

on nattokinase enzyme activity and sensory scores

注:图中不同小写字母表示具有显著性差异  $P < 0.05$ ; 相同字母表示不具有显著性差异  $P > 0.05$ ;图2、图3同。

## 2.2 发酵时间对纳豆感官评分和纳豆激酶酶活的影响

由图2可知,随着发酵时间的增长,纳豆激酶酶活先增加后降低。在20 h时达到最高值,纳豆激酶酶活为(1790 ± 128) U/g。在20 h之后,纳豆激酶酶活整体呈降低趋势,这是由于嗜热链球菌与纳豆芽孢杆菌竞争发酵底物,且纳豆芽孢杆菌发酵时间过长,进入衰亡期;随着发酵时间的增长,感官评分先

增加后降低。在10~30 h范围内,感官评分无显著性差异,但在20 h时达到最高分,感官评分为(7.6 ± 0.2) 分。综上,选20 h为后续研究参数。

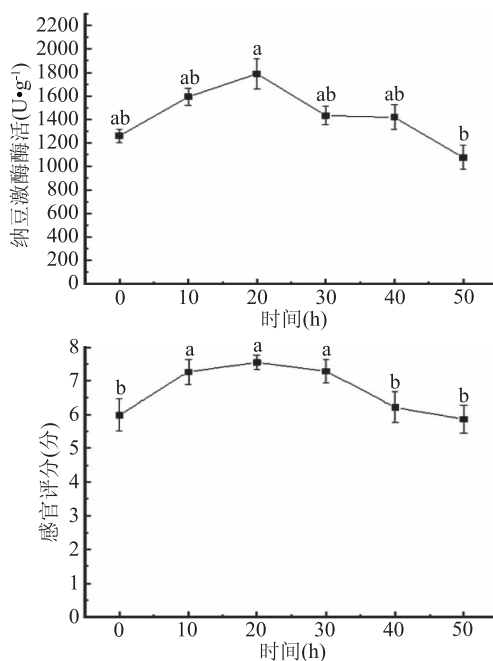


图2 发酵时间对纳豆激酶酶活和感官评分的影响

Fig.2 Effect of fermentation time

on nattokinase enzyme activity and sensory scores

## 2.3 接种量对纳豆感官评分和纳豆激酶酶活的影响

由图3可知,随着接种量的增加,纳豆激酶酶活先增加后降低。在1.5%时达到最大值,纳豆激酶酶活为(1914 ± 69) U/g。而接种量大于1.5%时,纳豆激酶酶活会下降,且接种量为2.5%时的纳豆激酶酶活低于改良前的,这是因为嗜热链球菌接种量过高,

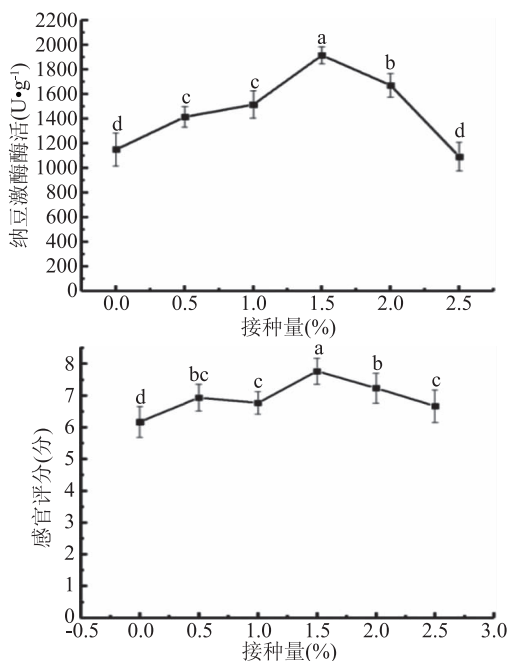


图3 接种量对纳豆激酶酶活的影响

Fig.3 Effect of inoculation on nattokinase enzyme activity and sensory scores

产酸增加,pH降低,影响纳豆芽孢杆菌的发酵,并且降低纳豆激酶的活力,造成纳豆激酶酶活下降;随着接种量的增加,感官评分整体呈增加趋势,在1.5%时感官评分最高,为(7.8±0.4)分。综上,选择1.5%为后续研究参数。

## 2.4 响应面优化实验结果与分析

2.4.1 实验设计及结果 响应面实验设计及结果见表3。

表3 Box-Behnken 实验设计与结果

Table 3 Response variable Box-Behnken design

实验号	A	B	C	Y 感官评分 (分)	Z 纳豆激酶酶活 (U/g)
1	-1	-1	0	6.5	710
2	0	-1	-1	7.2	1041
3	0	-1	1	7.2	1302
4	1	-1	0	7.3	1246
5	-1	0	-1	7.7	1413
6	-1	0	1	7.4	1439
7	0	0	0	7.7	1839
8	0	0	0	7.9	1860
9	0	0	0	8.0	1734
10	0	0	0	8.2	2212
11	0	0	0	8.2	2347
12	1	0	-1	7.2	1205
13	1	0	1	6.9	1215
14	-1	1	0	5.9	546
15	0	1	-1	6.4	820
16	0	1	1	6.2	702
17	1	1	0	3.9	577

2.4.2 以感官评分为响应指标的响应面结果分析 利用 Design-Expert 10.0 对感官评分(Y)与各因素进行多元回归分析,同时拟合得二次回归方程:

$$Y = -162.83 + 7.61A + 1.45B - 0.90C - 0.02AB -$$

$$0.01BC - 0.09A^2 - 0.01B^2 + 0.30C^2$$

以感官评分为响应值的响应面二次回归模型方差分析结果见表4。

由表4可知,模型  $P < 0.01$ , 该实验模型极显著,失拟项  $P > 0.05$ , 失拟项不显著,表明该模型正确。决定系数  $R^2$  等于 0.9552, 说明该模型拟合程度良好。调整系数  $R_{Adj}^2$  为 0.8976, 说明建立的该模型能解释 89.76% 响应值的变化。分析表明模型与实验拟合度较好,可用于分析和预测。

3D 响应面图可直观反映出因素之间的交互作用。由图4可知,等高线呈椭圆形且曲线密集,表明发酵温度与发酵时间的交互作用对感官评分的影响显著。

2.4.3 以纳豆激酶酶活为响应指标的响应面结果分析 利用 Design-Expert 10.0 纳豆激酶酶活(Z)与各因素进行多元回归分析,同时拟合得二次回归方程:

$$Z = -93437.53 + 4185.99A + 500.58B + 3439.15C - 4.21AB - 2.67AC - 18.95BC - 48.72A^2 - 7.9B^2 - 967.8C^2$$

以纳豆激酶酶活为响应值的响应面二次回归模型方差分析结果见表5。

由表5可知,模型  $P < 0.01$ , 该实验模型极显著,失拟项  $P > 0.05$ , 失拟项不显著,表明该模型正确。决定系数  $R^2$  等于 0.9162, 调整系数  $R_{Adj}^2$  为 0.8084, 说明建立的该模型能解释 80.84% 响应值的变化。分析表明模型与实验拟合度较好,可用于分析和预测。

由图5可知,接种量、发酵温度与发酵时间的交互作用均不显著。

2.4.4 响应面优化结果及验证实验 通过响应面优化实验分析,嗜热链球菌发酵最佳参数为:发酵温度 42℃,发酵时间 18.6 h,接种量 1.5%。预测结果感官评分 8.1 分,纳豆激酶酶活 2014 U/g。在此条件下进行 3 次验证实验。实验结果表明,改良后的纳豆呈鲜黄色,饱满有光泽,有豆香味及些许氨臭味,无明显后苦味。感官评分(8.0±0.037)分,纳豆激酶酶活(1964±83) U/g,均与预测值无显著性差异( $P >$

表4 方差分析结果

Table 4 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	17.27	9	1.92	16.59	0.0006 **
A	0.61	1	0.61	5.23	0.0561
B	4.21	1	4.21	36.34	0.0005 **
C	0.080	1	0.080	0.69	0.4331
AB	1.96	1	1.96	16.94	0.0045 **
AC	$3.55 \times 10^{15}$	1	$3.55 \times 10^{15}$	$3.07 \times 10^{14}$	1.0000
BC	0.010	1	0.010	0.086	0.7773
A <sup>2</sup>	2.53	1	2.53	21.86	0.0023 **
B <sup>2</sup>	7.39	1	7.39	63.88	<0.0001 **
C <sup>2</sup>	0.024	1	0.024	0.20	0.6647
回归	0.81	7	0.12		
失拟项	0.63	3	0.21	4.67	0.0854
纯误差	0.18	4	0.045		
总回归	18.08	16			

注:“\*”表示差异显著( $P < 0.05$ );“\*\*”表示差异极显著( $P < 0.01$ );表5同。

表5 方差分析结果  
Table 5 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	$4.458 \times 10^6$	9	$4.953 \times 10^5$	8.50	0.0050 **
A	2278.12	1	2278.12	0.039	0.8489
B	$3.420 \times 10^5$	1	$3.420 \times 10^5$	5.87	0.0459 *
C	4005.13	1	4005.13	0.069	0.8007
AB	63756.25	1	63756.25	1.09	0.3303
AC	64.00	1	64.00	$1.099 \times 10^{-3}$	0.9745
BC	35910.25	1	35910.25	0.62	0.4581
A <sup>2</sup>	$8.094 \times 10^5$	1	$8.094 \times 10^5$	13.89	0.0074 **
B <sup>2</sup>	$2.629 \times 10^6$	1	$2.629 \times 10^6$	45.13	0.0003 **
C <sup>2</sup>	$2.465 \times 10^5$	1	$2.465 \times 10^5$	4.23	0.0787
回归	$4.078 \times 10^5$	7	58259.49		
失拟项	$1.262 \times 10^5$	3	42066.42	0.60	0.6495
纯误差	$2.816 \times 10^5$	4	70404.30		
总回归	$4.865 \times 10^6$	16			

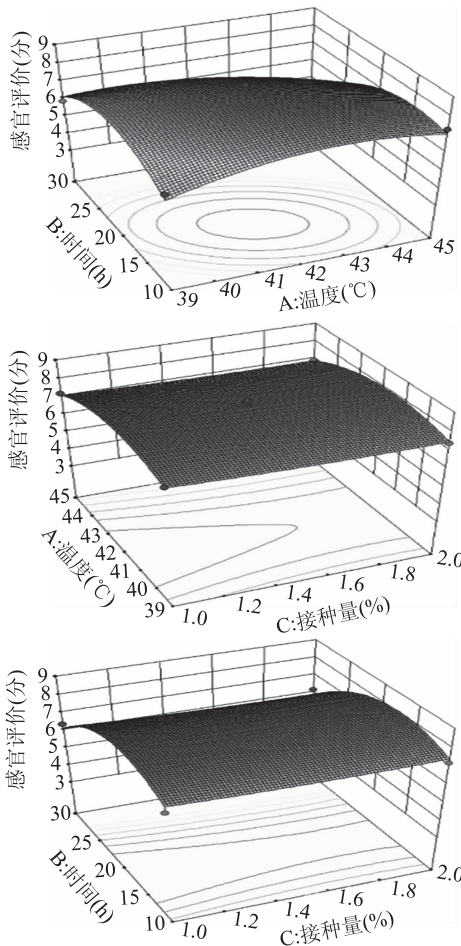


图4 发酵参数交互作用对感官评分的影响  
Fig.4 Effect of interaction of fermentation parameters on sensory scores

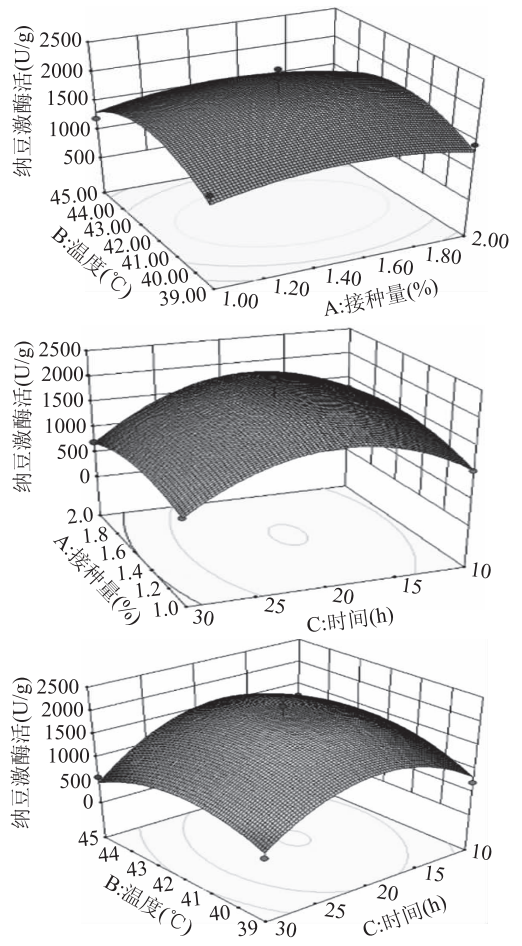


图5 发酵参数交互作用对纳豆激酶酶活的影响  
Fig.5 Effect of interaction of fermentation parameters on nattokinase activity

0.05), 从而也证明了响应面法优化发酵工艺的有效性。

### 2.5 改良前后营养成分变化结果

由表6知,与普通纳豆相比,改良后纳豆水分含量没有明显变化;粗脂肪、粗蛋白和氨基酸态氮含量

降低,这由于嗜热链球菌的代谢作用使得脂肪、蛋白质和氨基酸被进一步分解。

改良后纳豆激酶酶活增加,异黄酮含量明显升高,这可能是由于嗜热链球菌二次发酵过程中,分解了更多可利用作用底物供纳豆菌生物反应。改良后

表6 纳豆改良前后营养成分变化结果

Table 6 Changes in nutrient composition before and after natto improvement

指标	未改良	改良后
水分含量(%)	53.45 ± 0.18 <sup>a</sup>	53.57 ± 0.21 <sup>a</sup>
粗脂肪(g/100 g)	6.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.6 ± 0.9 <sup>a</sup>
粗蛋白(g/100 g)	18.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	16.0 ± 0.8 <sup>b</sup>
氨基酸态氮(g/100 mL)	0.39 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.01 <sup>b</sup>
纳豆激酶酶活(U/g)	1050 ± 53 <sup>b</sup>	1964 ± 83 <sup>a</sup>
异黄酮(mg/g)	0.729 ± 0.202 <sup>b</sup>	1.40 ± 0.016 <sup>a</sup>

注:同列均值无不同上标字母者表示不存在差异显著( $P > 0.05$ );同列均值有不同上标字母者表示差异显著( $P < 0.05$ )。

的纳豆不仅风味上更易被人们所接受,且主要活性物质纳豆激酶酶活也提升了87.0%。

### 3 结论

实验证明,嗜热链球菌发酵改良纳豆的最佳工艺条件为发酵温度42℃,发酵时间18.6 h,接种量1.5%,此条件下纳豆感官评分为8.0,纳豆激酶酶活为1964 U/g。改良后纳豆粗脂肪、粗蛋白、氨基酸态氮含量下降,生物活性物质纳豆激酶酶活增加87.0%,异黄酮含量增加92.0%为(1.40 ± 0.016) mg/g。改良后纳豆感官上更易为人们所接受,生物活性物质也有所提高,改良效果较好。

### 参考文献

- [1] 王丽娜,付华锋.风味纳豆的研制[J].中国调味品,2014,39(5):94-96.
- [2] 刘琪,陈静,张佩娜,等.不同黄豆自制纳豆与市购纳豆差异性比较分析[J].食品工业科技,2018,39(20):1-5.
- [3] 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.
- [4] 孙婕,刘宁.纳豆的保健功效[J].中国调味品,2007(7):14-16,67.
- [5] Omura K, Hitosugi M, Zhu X, et al. A newly derived protein from *Bacillus subtilis* natto with both antithrombotic and fibrinolytic effects[J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2005, 99(3):247-251.
- [6] Cao Zhen-Hui, Green-Johnson Julia M, Buckley Nicole D, et al. Bioactivity of soy-based fermented foods: A review [J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(1):223-238.
- [7] Mo H, Kariluoto S, Piironen V, et al. Effect of soybean processing on content and bioaccessibility of folate, vitamin B12 and isoflavones in tofu and tempe [J]. Food Chemistry, 2013, 141(3):2418-2425.
- [8] Pyo Y H, Lee T C. The potential antioxidant capacity and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of Monascus-fermented soybean extracts: evaluation of Monascus-fermented soybean extracts as multifunctional food additives [J]. Journal of Food Science, 2007, 72(3):S218-S223.
- [9] Champagne C P, Tompkins T A, Buckley N D, et al. Effect of fermentation by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and

B-vitamin content of a fermented soy beverage [J]. Food Microbiology, 2010, 27(7):968-972.

[10] Fujita M, Nomura K, Hong K, et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 197(3):1340-1347.

[11] Sumi H, Yanagisawa Y, Yatagai C, et al. Natto *Bacillus* as an oral fibrinolytic agent: Nattokinase activity and the ingestion effect of *Bacillus subtilis* natto [J]. Food Science and Technology Research, 2004, 10(1):17-20.

[12] Weng Y, Yao J, Sparks S, et al. Nattokinase. An oral antithrombotic agent for the prevention of cardiovascular disease [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(3):523.

[13] Hsia C H, Shen M C, Lin J S, et al. Nattokinase decreases plasma levels of fibrinogen, factor VII, and factor VIII in human subjects [J]. Nutrition Research, 2009, 29(3):190-196.

[14] 杨溢,王雅南,王雪梅,等.纳豆激酶研究现状及展望[J].现代食品,2018(16):36-38.

[15] 陈文珊,关茵,肖然.辅料对纳豆风味影响的研究[J].中国调味品,2011,36(1):55-57.

[16] Takemura H, Ando N, Tsukamoto Y. Breeding of branched short-chain fatty acids non-producing natto bacteria and its application to production of natto with light smells [J]. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Japan), 2000, 47:773-779.

[17] Koguchi K, Miyama K, Kikuchi K, et al. Breeding of *B. natto* for making low flavornatto (part 2) [J]. Tochigi Syokuhin Kougyou Shidousyo Kennkyuu Houkoku (in Japanese), 1996, 10:1-3.

[18] 吴雪娇,王旭旭,张伟,等.纳豆风味改良技术的研究[J].中国调味品,2018,43(12):94-98.

[19] 付文静.花生粕纳豆生产工艺的研究[D].青岛:青岛科技大学,2018.

[20] 王丽娜,付华峰,张永清,等.花生纳豆的研究及风味改良[J].中国调味品,2014,39(6):9-12,22.

[21] 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.

[22] 高沛汝.高活性纳豆复合菌种固态发酵技术研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2017.

[23] 晁思琪.食品中沙门氏菌和嗜热链球菌检测方法的建立[D].邯郸:河北工程大学,2018.

[24] 张平安,宋莲军,张建威.应用模糊数学综合评判优化大豆改性蛋白饼干工艺[J].江苏农业科学,2011,39(6):449-451.

[25] 高瑞鹤,何俊萍.应用模糊数学法评判韭菜酱的发酵成熟时间[J].中国酿造,2013,32(1):127-130.

[26] 李君,董磊,姜发堂,等.食品中水分含量测定装置的研究现状[J].食品工业科技,2019,40(8):297-303.

[27] 何恩铭,沈瑞池,王伟,等.紫外分光光度法测定豆渣提取物中大豆异黄酮含量的研究[J].大豆科学,2013,32(6):818-820.