

PB试验结合BBD响应面法优化纳豆 γ -聚谷氨酸发酵条件

严德林, 黄雷, 邱婧, 陈世浪, 梅芷晴, 张凯旋, 杨存义, 高向阳

Optimization of the Fermentation Conditions of Poly- γ -Glutamic Acid from Natto by PB Experiment Combined with BBD Response Surface Method

YAN Delin, HUANG Lei, QIU Jing, CHEN Shilang, MEI Zhiqing, ZHANG Kaixuan, YANG Cunyi, and GAO Xiangyang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023030338>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

γ -聚谷氨酸生产菌株的鉴定及发酵培养基优化

Identification and Optimization of Fermentational Condition of γ -Polyglutamic Acid Producing Strain

食品工业科技. 2020, 41(20): 64-71 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.20.011>

解淀粉芽孢杆菌fmbj37产 γ -聚谷氨酸发酵培养基的优化

Optimization of Fermentation Medium for *Bacillus amyloliquefaciens* fmbj37 to Produce Poly γ -Glutamic Acid

食品工业科技. 2019, 40(20): 160-166 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.20.026>

暹罗芽孢杆菌LW-1产 γ -聚谷氨酸发酵培养基的优化

Optimization of Fermentation Medium for γ -Polyglutamic Acid Production by *Bacillus siamense* LW-1

食品工业科技. 2021, 42(16): 163-170 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110269>

添加氧载体对 γ -多聚谷氨酸发酵的影响

Effect on Poly- γ -Glutamic Acid Fermentation by Addition of Oxygen-Vectors

食品工业科技. 2019, 40(1): 127-130,142 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.01.024>

黄水基质微生物发酵合成 γ -聚谷氨酸培养基及条件优化

Culture Medium and Condition Optimization of γ -Polyglutamic Acid Synthesized by Microbial Fermentation Using Yellow Water

食品工业科技. 2021, 42(11): 106-115 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020080014>

鹰嘴豆纳豆液态发酵高产蛋白酶的培养基及发酵条件优化

Optimization of submerged fermentation medium and condition of chickpea natto

食品工业科技. 2018, 39(7): 115-121 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.07.022>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

严德林, 黄雷, 邱婧, 等. PB 试验结合 BBD 响应面法优化纳豆 γ -聚谷氨酸发酵条件 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(1): 208–215. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030338

YAN Delin, HUANG Lei, QIU Jing, et al. Optimization of the Fermentation Conditions of Poly- γ -Glutamic Acid from Natto by PB Experiment Combined with BBD Response Surface Method [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(1): 208–215. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030338

· 工艺技术 ·

PB 试验结合 BBD 响应面法优化纳豆 γ -聚谷氨酸发酵条件

严德林¹, 黄雷¹, 邱婧², 陈世浪¹, 梅芷晴¹, 张凯旋¹, 杨存义³, 高向阳^{1,*}

(1. 华南农业大学食品学院广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642;

2. 华南农业大学广州都柏林国际生命科学与技术学院, 广东广州 510642;

3. 华南农业大学农学院广东省分子育种重点实验室, 广东广州 510642)

摘要: 为探究发酵纳豆 γ -聚谷氨酸 (poly- γ -glutamic acid, γ -PGA) 产量和感官品质的最佳发酵条件, 本实验以纳豆发酵后的 γ -PGA 产量和感官评价的综合评分为指标, 利用单因素实验、Plackett-Burman 试验设计、最陡爬坡试验和 Box-Behnken 响应面法优化纳豆发酵工艺。确定纳豆的最佳发酵条件为: 大豆浸泡 pH7.2, 发酵温度 37.10 °C, 发酵时间 24.20 h, 接种量 4.00%, 装瓶量 19.90%, 在此优化条件下, γ -PGA 产量达 3.65 mg/g, 感官评分为 31.67, 综合评分为 10.04, 实验结果与模型预测值无显著性差异, 稳定可靠。

关键词: 纳豆, γ -聚谷氨酸, 感官评价, Plackett-Burman 试验设计, Box-Behnken 响应面法

中图分类号: TS201.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)01-0208-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030338

本文网刊:



Optimization of the Fermentation Conditions of Poly- γ -Glutamic Acid from Natto by PB Experiment Combined with BBD Response Surface Method

YAN Delin¹, HUANG Lei¹, QIU Jing², CHEN Shilang¹, MEI Zhiqing¹, ZHANG Kaixuan¹,
YANG Cunyi³, GAO Xiangyang^{1,*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Guangzhou Dublin International College of Life Sciences and Technology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Molecular Plant Breeding, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to explore the optimal fermentation conditions for the poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) production and sensory quality of fermented natto, the comprehensive score of γ -PGA production and sensory evaluation after natto fermentation was used as an index to optimize the natto fermentation process by single factor test, Plackett-Burman test design, steepest climbing test and Box-Behnken response surface method. The optimum fermentation conditions of natto were determined as follows: Soybean soaking pH7.2, fermentation temperature 37.10 °C, fermentation time 24.20 h, inoculation amount 4.00%, bottling amount 19.90%. Under the optimized conditions, the production of γ -PGA was 3.65 mg/g, the sensory score was 31.67, and the comprehensive score was 10.04. There was no significant difference

收稿日期: 2023-03-30

基金项目: 广东重要农作物功能基因挖掘与应用 (2022SDZG05)。

作者简介: 严德林 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 发酵与功能食品化学, E-mail: 794165898@qq.com。

* 通信作者: 高向阳 (1966-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 发酵与功能食品化学, E-mail: gaoliangyang@scau.edu.cn。

between the experimental results and the model prediction values, which was stable and reliable.

Key words: natto; γ -PGA; sensory evaluation; Plackett-Burman experiment design; Box-Behnken response surface methodology

纳豆由大豆蒸煮后接种纳豆芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* natto)发酵而成,起源于日本,日本人食用纳豆的历史已长达两千多年^[1-3]。纳豆含有丰富的功能物质,如纳豆激酶、维生素 K₂ 等,具有预防心血管疾病、预防骨质疏松、降血糖、降低血压和抗氧化等保健功能^[4-9]。目前,对纳豆的功能物质研究主要集中在纳豆激酶和维生素 K₂,对其他功能物质报道较少。 γ -聚谷氨酸(poly- γ -glutamic acid, γ -PGA)是纳豆发酵过程产生的一种重要的活性物质,具有抗肥胖、促进钙吸收等功能^[10-12]。 γ -PGA 也是纳豆黏液的主要成分^[13-14]。优质的纳豆黏液呈白色,味道清淡或微酸,质地柔软粘稠,拉丝长,这也是评判优质纳豆的重要标准^[15-17]。

γ -PGA 是由 D/L 谷氨酸单体或两个对映体通过 α -氨基和 γ -羧酸基之间的酰胺键连接在一起的阴离子多肽,其聚合度在 1000~15000 之间,分子量越高,黏度越高^[18-19]。 γ -PGA 具有良好的水溶性,并且能完全被生物降解,对人体和环境无毒害无污染,在食品、农业、化妆品和医药等方面具有广泛的应用^[20-24]。合成 γ -PGA 的方法主要有化学合成、肽合成、生物转化和微生物发酵^[25]。微生物发酵法生产 γ -PGA 具有效率高、环境污染小、反应条件温和等优点^[26]。

目前,微生物发酵产 γ -PGA 多数采用液态发酵,缺乏对纳豆食品发酵产 γ -PGA 条件优化的相关研究。本实验采用纳豆芽孢杆菌发酵纳豆,利用 Plackett-Burman 试验设计结合 Box-Behnken 响应面法,以 γ -PGA 产生量和纳豆感官品质的加权综合评分为指标,对纳豆发酵条件进行优化。确定了纳豆 γ -PGA 的最佳发酵条件,推动了高产 γ -PGA 纳豆的市场发展。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* natto) 本实验室保藏;巴西 10 号、巴西 13 号、华夏 3 号、粤小黄 1 号、粤小黄 2 号、粤小黄 3 号 6 种品种大豆 华南农业大学农学院大豆分子设计育种实验室提供;氯化钠 天津市大茂化学试剂厂;牛肉膏 广州环凯微生物科技有限公司;蛋白胨、琼脂粉 北京奥博星生物技术有限公司; γ -聚谷氨酸标准品 南京赛泰斯生物科技有限公司;十六烷基三甲基溴化铵(CTAB) 上海麦克林生化科技有限公司;氢氧化钠 天津福晨化学试剂有限公司;盐酸 广州化学试剂厂;无水乙醇 国药集团化学试剂有限公司。

HZS-H 水浴振荡器 哈尔滨东联电子技术开发有限公司;HYL-C3 组合式摇床 山东博科科学仪器有限公司;SW-CJ-2F 洁净工作台 苏静集团苏州安

泰空气技术有限公司;YX-24HDD 手提式压力蒸汽灭菌器 江阴滨江医疗设备有限公司;HC-3018 高速离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司;UV-1750 紫外可见分光光度计 日本岛津公司;BCD-215YD 冰箱 青岛海尔股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的配制 斜面培养基:牛肉膏 0.5%,蛋白胨 1%,氯化钠 0.9%,琼脂 1.5%,pH7.2;种子培养基:牛肉膏 0.5%,蛋白胨 1%,氯化钠 0.9%,pH7.2。上述所有培养基于 121 °C 下灭菌 30 min 后冷却待用。

1.2.2 纳豆芽孢杆菌的活化和培养 将纳豆芽孢杆菌接种于 LB 斜面固体培养基上,37 °C 活化 24 h,活化 2 次。将平板上的纳豆芽孢杆菌接种到液体培养基中,在 37 °C 恒温水浴中 180 r/min 摇瓶培养 24 h,随后 5000 r/min 离心 10 min,再加入无菌水,形成 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液,作为种子液保存。

1.2.3 纳豆发酵产 γ -PGA 的工艺流程

1.2.3.1 纳豆发酵 对大豆进行挑选、清洗,随后用干净自来水常温浸泡 18 h。将浸泡好的大豆沥干,于常压、121 °C 下蒸煮 30 min,自然冷却至 37 °C 左右进行接种(接种后需要搅拌均匀大豆和种子液),发酵。发酵完成后放于 4 °C 冰箱下进行后熟 24 h^[27-28]。

1.2.3.2 γ -PGA 的初步纯化 称取 1 g 纳豆于离心管中,加入 10 mL 蒸馏水,8000 r/min 离心 15 min,除去菌体,取上清液,加入 3 倍体积的无水乙醇,在 4 °C 下静置过夜后,8000 r/min 离心 15 min,取沉淀,加入与上清液体积相等的蒸馏水溶解,随后稀释 20 倍后进行测定。

1.2.4 单因素实验 通过不同品种大豆发酵纳豆,根据发酵结果取最优大豆进行后续发酵工艺实验。在大豆浸泡 pH7.0、接种量 4%、装瓶量 15%、发酵温度 37 °C 和发酵时间 24 h 的固定条件下,分别考察大豆浸泡 pH(6.6、6.8、7.0、7.2、7.4)、接种量(1%、2%、4%、6%、8%)、装瓶量(5%、10%、15%、20%、25%)、发酵温度(33、35、37、39、41 °C)和发酵时间(18、21、24、27、30 h)对纳豆发酵工艺的影响。每个因素进行 3 次平行实验,记录平均值。

1.2.5 Plackett-Burman 试验设计 Plackett-Burman (PB)是一种 2 水平的试验方法,可以用较少的实验从众多影响因素中快速筛选出显著影响因素^[29]。根据前期单因素预实验结果,对大豆浸泡 pH、接种量、装瓶量、发酵温度、发酵时间 5 个因素进行考察。每个因素选取高(1)和低(-1)两个水平,设置 3 个虚拟列。设计 N=12 的 PB 试验(表 1)。

表1 Plackett-Burman 试验设计因素水平
Table 1 Plackett-Burman experimental design factor level

因素	水平	
	-1	1
A 大豆浸泡pH	7	7.4
B 接种量(%)	3	6
C 装瓶量(%)	15	25
D 发酵温度(℃)	35	39
E 发酵时间(h)	21	27

1.2.6 最陡爬坡试验 响应面拟合方程只有在接近最优值(综合得分最高)的区域才能完全模拟真实情况。因此,需要通过最陡爬坡试验逼近最优值区域,进行有效的响应面分析。根据 PB 试验结果,得到对综合得分影响最明显的 3 个因素,并根据其正负效应设计步长和变化方向。估计值为正则为正效应,反之则为负效应,快速达到最优响应区域^[30]。

1.2.7 Box-Behnken 响应面试验 根据 PB 试验和最陡爬坡试验分析结果确定的 3 个因素,以综合评分为响应值,对每个因素的 3 个水平进行(-1、0、+1)编码。每个试验点平行 3 次。呈现正效应的因素采用高水平,呈现负效应的因素采用低水平。Box-Behnken 试验设计(BBD)的因素及水平见表 2。

表2 Box-Behnken 试验因素与水平
Table 2 Factors and levels of Box-Behnken test

因素	水平		
	-1	0	1
A装瓶量(%)	18	20	22
B发酵温度(℃)	36	37	38
C发酵时间(h)	23	24	25

1.2.8 γ -PGA 测定 本文参考 Yan 等^[31]的方法进行发酵纳豆 γ -PGA 测定。

1.2.8.1 γ -PGA 标准溶液的配制 精确称取一定量的 γ -聚谷氨酸标准品,用蒸馏水溶解,稀释至含量为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 γ -PGA 标准液。精密量取 10、20、30、40、50 mL 上述溶液,分别置于 1~5 号容量瓶中,用蒸馏水定容至 100 mL,摇匀,得到 10~50 $\mu\text{g/mL}$ 的 γ -PGA 标准液,待检测。

1.2.8.2 CTAB 溶液的配制 配制 2% NaOH 溶液,并以此为溶剂,加入 CTAB,搅拌溶解,配制成 5 g/L 的 CTAB 试液。

1.2.8.3 CTAB 比浊法 取 2 mL 待测液于试管中,

准确加入 2 mL CTAB 试液,轻微振荡,静置 3 min,将反应液倒入比色皿中,以蒸馏水和 CTAB 试液混合作为空白,测定在波长 224 nm 下的吸光值。以 γ -PGA 标准品浓度为横坐标,224 nm 处的吸光值为纵坐标,得到 γ -PGA 标准曲线的线性方程为 $Y=0.0216X+0.0734$, $R^2=0.9913$ 。将所测得的样品吸光值代入标准曲线,并根据下式(1)计算 γ -PGA 含量:

$$\gamma\text{-PGA}(\text{mg/g}) = \frac{\text{稀释液浓度}(\mu\text{g/mL}) \times \text{稀释倍数} \times 10^3}{\text{纳豆质量浓度}(\text{g/mL})} \quad \text{式(1)}$$

1.2.9 感官评价方法 由经过专业培训的人员组成评价小组(5 男 5 女)对纳豆的色泽、气味、滋味和拉丝进行评分,分值范围为 0~10 分^[32]。纳豆感官评分标准见表 3。

1.2.10 综合评分的计算方法 以 γ -PGA 产量和感官评价的综合评分为指标进行分析^[33],如下式(2):

$$\text{综合评分} = 0.5 \times \left(\frac{\gamma\text{-PGA产量}(\text{mg/g})}{\text{不同纳豆}\gamma\text{-PGA产量最大值}(\text{mg/g})} + \frac{\text{感官总分}}{\text{不同纳豆感官总分最大值}} \right) \times 10 \quad \text{式(2)}$$

1.3 数据处理

每个样品重复测定 3 次,利用 Desgin-Expert 8.06 软件对试验结果进行分析,优化各因素最优条件并根据预测结果进行验证。采用 SPSS 16.0 对数据进行显著性和误差分析,采用 Origin 2018 作图。

2 结果与分析

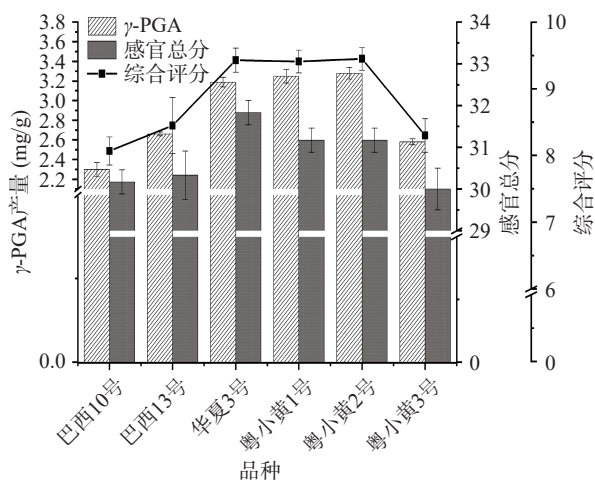
2.1 单因素优化发酵条件

2.1.1 不同大豆品种筛选 在一定发酵条件下,测定巴西 10 号、巴西 13 号、华夏 3 号、粤小黄 1 号、粤小黄 2 号、粤小黄 3 号 6 种品种纳豆的感官总分及 γ -PGA 含量,计算综合评分。由图 1 可知,6 种品种大豆发酵纳豆产 γ -PGA 及其感官品质有一定的差异。整体上看,华夏大豆和粤小黄大豆发酵纳豆 γ -PGA 产生量及其感官品质高于巴西大豆发酵纳豆,且 γ -PGA 产生量和纳豆感官品质呈一定的正比关系。粤小黄 2 号纳豆 γ -PGA 产生量和综合评分最高,分别达到 3.28 mg/g 和 9.45,华夏 3 号感官总分最高为 31.83。巴西 10 号纳豆 γ -PGA 产生量和综合评分最低,分别为 2.30 mg/g 和 8.07,粤小黄 3 号感官总分最低为 30.00。根据以上结果,选用 γ -PGA 产生量和综合评分最高的粤小黄 2 号进行后续的发酵实验。

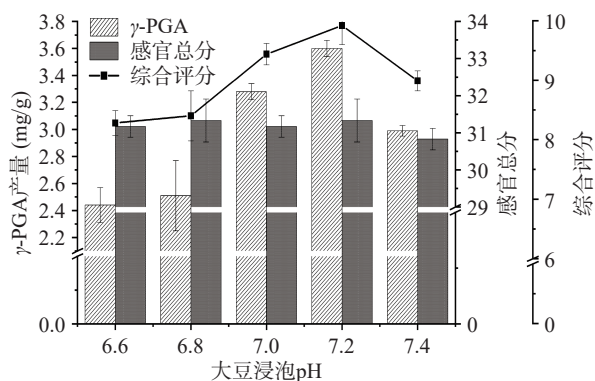
2.1.2 不同大豆浸泡 pH 对纳豆发酵产 γ -PGA 的影响 测定大豆浸泡 pH6.6、6.8、7.0、7.2、7.4 的粤小

表3 纳豆感官评价表
Table 3 Natto sensory evaluation table

分数	色泽(0~10分)	气味(0~10分)	滋味(0~10分)	拉丝(0~10分)
10	豆粒呈金黄色,表皮富有光泽	氨味较轻,有纳豆独特的香气	软糯,湿滑,无后苦味	黏性强,拉丝长
8	豆粒呈暗黄色,表皮有光泽	有少许氨味,有纳豆香气	较软糯,较湿润,无后苦味	黏性较强,拉丝较长
6	豆粒呈暗黄色,表皮无光泽	氨味稍重,有较淡的纳豆香气	较软糯,较湿润,后苦味较轻	黏性一般,拉丝一般
4	豆粒呈茶褐色,表皮无光泽	氨味较重,几乎没有纳豆香气	较软糯,较干燥,苦味较重	黏性较差,拉丝较短
2	豆粒呈暗褐色,表皮无光泽	强烈氨臭味,无纳豆香气	较硬,干燥,苦味重	几乎无黏性,拉丝短

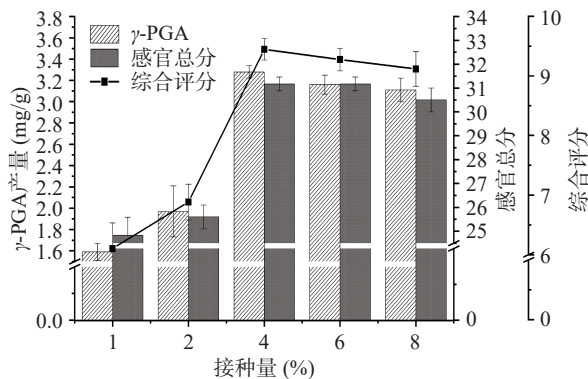
图1 不同大豆品种发酵纳豆产 γ -PGA 的差异Fig.1 The difference of γ -PGA produced by fermented natto from different soybean varieties

黄 2 号纳豆的感官总分及 γ -PGA 含量, 计算综合评分, 大豆浸泡 pH 对纳豆品质的影响如图 2 所示。由图 2 可知, 随着浸泡 pH 的增大, γ -PGA 产生量及综合评分呈现出先上升后下降的趋势, 当浸泡 pH 达到 7.2 时, γ -PGA 产生量及综合评分达到最大值, 之后开始降低。可能是因为 pH 过高或者过低, 不利于菌株生长繁殖, 最终形成芽孢, 停止产 γ -PGA^[34]。但是纳豆的感官总分几乎保持不变, 说明此 pH 区间对纳豆感官品质的影响不大。因此, 纳豆发酵产 γ -PGA 的大豆最佳 pH 为 7.2。

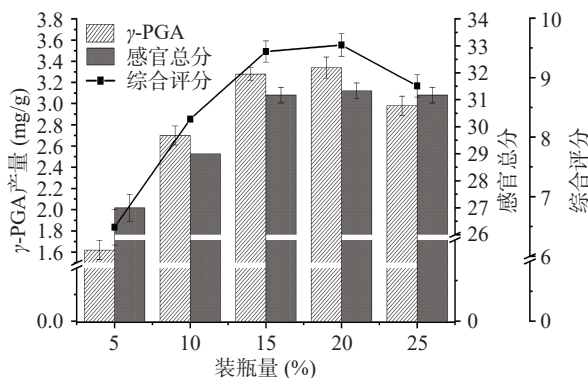
图2 不同大豆浸泡 pH 对纳豆发酵产 γ -PGA 的影响Fig.2 Effects of different soybean soaking pH values on the production of γ -PGA by natto fermentation

2.1.3 不同接种量对纳豆发酵产 γ -PGA 的影响 测定接种量为 1%、2%、4%、6%、8% 的粤小黄 2 号纳豆的感官总分及 γ -PGA 含量, 计算综合评分。接种量对纳豆品质的影响如图 3 所示, 由图 3 可得, 随着接种量的增大, 纳豆 γ -PGA 产生量、感官总分和综合评分呈现出先急速上升后缓慢下降的趋势。当接种量小于 4% 时, 三个评价指标均处于低水平。这是因为当接种量较低时, 纳豆芽孢杆菌不能将纳豆充分发酵, 但当接种量达 4% 时, 纳豆芽孢杆菌能最大程度地利用大豆中的营养物质, 使 γ -PGA 产生量、感官总分和综合评分达到最佳。当接种量大于 4% 时,

三个评价指标缓慢下降。可能是菌量过多, 形成竞争。也可能是由于营养物质的减少与其代谢产物的增加抑制了发酵过程, 导致纳豆 γ -PGA 产生量变少, 感官总分和综合评分降低^[3]。因此, 纳豆发酵产 γ -PGA 的最佳接种量为 4%。

图3 不同接种量对纳豆发酵产 γ -PGA 的影响Fig.3 Effects of different inoculations on production of γ -PGA by natto fermentation

2.1.4 不同装瓶量对纳豆发酵产 γ -PGA 的影响 测定装瓶量为 5%、10%、15%、20%、25% 的粤小黄 2 号纳豆的感官总分及 γ -PGA 含量, 计算综合评分, 装瓶量对纳豆品质的影响如图 4 所示。由图 4 可得, 随着装瓶量的增大, 纳豆 γ -PGA 产生量、感官总分和综合评分呈现出先急速上升后下降的趋势。当装瓶量为 20% 时, 纳豆 γ -PGA 产生量、感官总分和综合评分最高, 这与周雪琴等^[34]、Yang 等^[35]的研究结果一致。这可能是因为装瓶量过少时, 营养物质缺乏, 不足以支撑菌株的生长繁殖, 最终形成芽孢, 停止产 γ -PGA; 当装瓶量过多时, 会导致营养物质不能被最大利用, 发酵不完全, 感官品质不够好。因此, 纳豆发酵产 γ -PGA 的最佳装瓶量为 20%。

图4 不同装瓶量对纳豆发酵产 γ -PGA 的影响Fig.4 Effects of different bottling quantities on production of γ -PGA by natto fermentation

2.1.5 不同发酵温度对纳豆发酵产 γ -PGA 的影响 温度是影响微生物生长与代谢的重要原因。测定发酵温度为 33、35、37、39、41 °C 的粤小黄 2 号纳豆的感官总分及 γ -PGA 含量, 计算综合评分。发酵温度对纳豆品质的影响如图 5 所示, 由图 5 可知, 随着

发酵温度的增大, 纳豆 γ -PGA 产生量、感官总分和综合评分呈现出先急速上升后缓慢下降的趋势。当发酵温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 时, 纳豆 γ -PGA 产生量、感官总分和综合评分最高, 这与 Feng 等^[36]的研究结果相近。温度过高或过低不仅对菌株的正常生长有影响, 而且发生反应所需要的酶在高温下失活, 在低温下活性受到较大的抑制, 从而导致 γ -PGA 的产量降低, 发酵不完全, 感官品质变差^[26]。因此, 纳豆发酵产 γ -PGA 的最佳发酵温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。

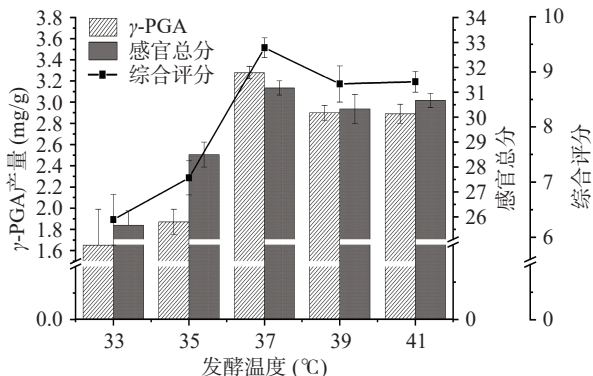


图5 不同发酵温度对纳豆发酵产 γ -PGA 的影响

Fig.5 Effects of different fermentation temperatures on γ -PGA production by natto fermentation

2.1.6 不同发酵时间对纳豆发酵产 γ -PGA 的影响
测定发酵时间为 18、21、24、27、30 h 的粤小黄 2 号纳豆的感官总分及 γ -PGA 含量, 计算综合评分。发酵时间对纳豆品质的影响如图 6 所示, 由图 6 可知, 随着发酵时间的延长, 纳豆 γ -PGA 产生量、感官总分和综合评分迅速增长, 当发酵时间达 24 h 时, 三个评价指标达到最大, 这与陈乐乐等^[3]、Yang 等^[35]的研究结果一致。之后 γ -PGA 产生量、感官总分和综合评分随时间的增加趋于平稳或缓慢降低。发酵时间的长短对菌株的繁殖及成品纳豆的性质都会有一定影响。发酵初期, 纳豆菌代谢加快产物积累, γ -PGA 产生量、感官总分升高; 随着发酵时间到一定的范围, 纳豆菌代谢下降, 逐渐不转化剩余的营养物质, 故 γ -PGA 产生量、感官总分趋于平稳或者缓慢降低^[37]。

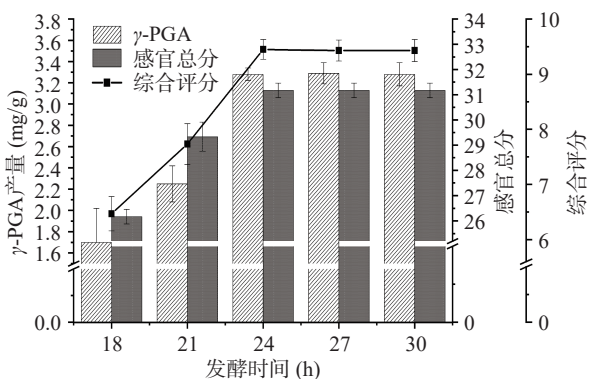


图6 不同发酵时间对纳豆发酵产 γ -PGA 的影响

Fig.6 Effects of different fermentation time on the production of γ -PGA by natto fermentation

因此, 纳豆发酵产 γ -PGA 的最佳发酵时间为 24 h。

2.2 Plackett-Burman 试验

纳豆发酵产 γ -PGA 综合评分的 Plackett-Burman 试验结果及方差分析见表 4、表 5。利用 Design Expert 8.0.6 软件, 以综合评分 Y 为响应值, 得到回归方程为 $Y=7.81-0.018A-0.017B-0.050C+0.66D+0.33E$, $R^2=0.9987$ 。表明该回归方程模型的拟合度良好, 回归方程具有代表性。其中 $R^2_{\text{adj}}=0.9976$, 表明模型适用于 99.76% 的效应值。表 5 方差分析结果显示, 发酵温度(D)、发酵时间(E)、装瓶量(C)的结果对综合分数(Y)有较显著影响($P<0.01$), 各因素影响的大小为 $D>E>C$, 其他 2 个因素影响不显著, 故取发酵温度、发酵时间和装瓶量这三个因素进行后续爬坡试验。

表4 Plackett-Burman 试验设计与结果
Table 4 Plackett-Burman test design and results

试验号	标准序	A	B	C	D	E	γ -PGA产量 (mg/g)	感官 总分	综合 评分
1	9	1	1	-1	1	1	2.98	29.50	8.78
2	4	-1	1	1	-1	1	2.50	25.17	7.43
3	11	1	-1	1	1	-1	2.78	27.17	8.12
4	7	-1	1	-1	1	1	3.01	29.83	8.86
5	6	-1	-1	1	-1	1	2.54	25.17	8.48
6	8	-1	-1	-1	1	-1	2.82	27.50	8.24
7	5	1	-1	-1	-1	1	2.56	25.50	7.56
8	3	1	1	-1	-1	-1	2.25	23.83	6.87
9	10	1	1	1	-1	-1	2.22	23.17	6.72
10	2	-1	1	1	1	-1	2.77	27.17	8.11
11	1	1	-1	1	1	1	2.97	29.17	8.71
12	12	-1	-1	-1	-1	-1	2.26	23.67	6.86

表5 Plackett-Burman 试验设计方差分析

Table 5 Analysis of variance for Plackett-Burman trial design

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性	影响 顺序
模型	6.51	5	1.30	900.79	<0.0001	***	
A	4.033E-003	1	4.003E-003	2.79	0.1458		4
B	3.333E-003	1	3.333E-003	2.31	0.1795		5
C	0.030	1	0.030	20.77	0.0039	**	3
D	5.20	1	5.20	3600.58	<0.0001	***	1
E	1.27	1	1.27	877.50	<0.0001	***	2
残差	8.667E-003	6	1.444E-003				
总离差	6.51	11					
$R^2=0.9987$; $R^2_{\text{adj}}=0.9976$; $R^2_{\text{Pred}}=0.9947$; C.V.%=0.49							

注: “*”表示显著水平($P<0.05$), “**”表示较显著水平($P<0.01$), “***”表示极显著水平($P<0.001$); 表8同。

2.3 最陡爬坡试验结果

从表 6 中可以看出, 随着装瓶量、发酵温度、发酵时间这三个重要因素的趋势性变化, 纳豆 γ -PGA 产生量、感官总分和综合评分呈先上升后下降的趋势, 并且在第 3 组实验的条件下, 三个指标达到最高。因此, 以该试验组为下一步响应面的中心试验点, 进行响应面试验。

2.4 响应面分析结果

纳豆发酵产 γ -PGA 综合评分的响应面分析试验

表 6 最陡爬坡试验设计及结果
Table 6 Test design and results of steepest climb

序号	装瓶量 (%)	发酵温度 (°C)	发酵时间 (h)	γ -PGA产量 (mg/g)	感官总分	综合评分
1	16	35	22	2.25	23.83	6.87
2	18	36	23	3.21	30.33	9.23
3	20	37	24	3.63	32.00	10.07
4	22	38	25	3.19	30.67	9.26
5	24	39	26	3.10	30.33	9.06

结果见表 7, 回归模型的方差分析见表 8。利用 Design Expert 8.0.6 软件对表 7 中综合评分数据进行二次多元回归拟合, 回归方程如下: $Y_{\text{综合评分}}=10.04-0.029A+0.065B+0.096C+5.000E-003AB-7.500E-003AC+0.010BC-0.27A^2-0.60B^2-0.25C^2$ 。

表 7 Box-Behnken 试验设计及结果
Table 7 Box-Behnken test design and results

试验号	标准序	A	B	C	γ -PGA产量 (mg/g)	感官总分	综合评分
1	13	-1	-1	0	3.26	28.83	9.13
2	14	1	-1	0	3.29	29.00	9.06
3	17	-1	1	0	3.25	30.00	9.28
4	10	1	1	0	3.25	30.33	9.23
5	7	-1	0	-1	3.31	31.00	9.51
6	8	1	0	-1	3.34	31.00	9.47
7	11	-1	0	1	3.34	31.17	9.60
8	6	1	0	1	3.37	31.33	9.53
9	12	0	-1	-1	3.26	28.50	9.00
10	3	0	1	-1	3.24	29.17	9.08
11	4	0	-1	1	3.28	31.17	9.29
12	15	0	1	1	3.25	31.17	9.41
13	9	0	0	0	3.61	31.67	9.99
14	5	0	0	0	3.63	32.00	10.07
15	2	0	0	0	3.68	31.67	10.08
16	16	0	0	0	3.65	31.83	10.07
17	1	0	0	0	3.65	31.33	9.99

由表 8 可知, 综合评分模型的 F 值为 47.09, $P<0.0001$, 说明模型均高度显著, 模型成立。失拟项为 4.14, $P>0.05$ 不显著, 说明未知因素对实验的影响小。该模型 R^2 为 0.9838, R^2_{adj} 为 0.9629, 即表明该模型可以解释 96.29% 的纳豆发酵综合评分的变化, 仅有大概 3.71% 变化不能被预测。模型与实际实验的拟合程度好, 可用于分析与预测各因素对纳豆发酵产 γ -PGA 综合评分的影响。由表 8 可知, 方程中一

表 8 Box-Behnken 试验回归模型及方差分析
Table 8 Box-Behnken test regression model and variance analysis

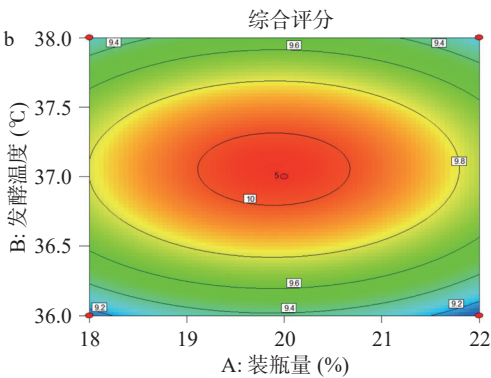
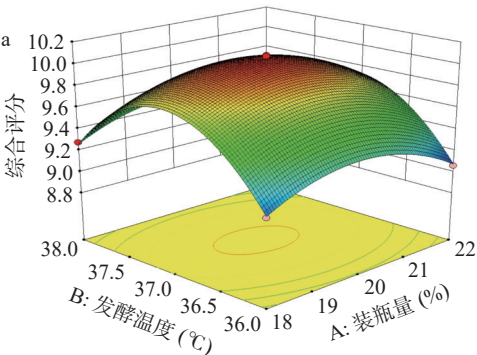
方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性	影响顺序
模型项	2.36	9	0.26	47.09	<0.0001	***	
A	6.612E-003	1	6.612E-003	1.19	0.3115		6
B	0.034	1	0.034	6.08	0.0431	*	5
C	0.074	1	0.074	13.33	0.0082	**	4
AB	1.000E-004	1	1.000E-004	0.018	0.8972		9
AC	2.250E-004	1	2.250E-004	0.040	0.8463		8
BC	4.000E-004	1	4.000E-004	0.072	0.7962		7
A ²	0.30	1	0.30	53.30	0.0002	***	2
B ²	1.50	1	1.50	270.69	<0.0001	***	1
C ²	0.25	1	0.25	45.57	0.0003	***	3
误差	0.039	7	5.558E-003				
失拟项	0.029	3	9.808E-003	4.14	0.1018	不显著	
纯误差	9.480E-003	4	2.370E-003				
总离差	2.39	16					
$R^2=0.9838, R^2_{\text{adj}}=0.9629, R^2_{\text{pred}}=0.7972, \text{C.V.}\%=0.78$							

次项 B 对纳豆发酵产 γ -PGA 的综合评分影响显著 ($P<0.05$), 而一次项 C 对纳豆发酵产 γ -PGA 的综合评分影响较显著 ($P<0.01$), 二次项 A²、B²、C² 的影响极显著 ($P<0.001$), 说明各因素对纳豆发酵产 γ -PGA 综合评分的影响呈二次关系, 而非简单的线性关系。由 F 值检验可知各因素对综合评分影响的大小顺序为: C>B>A, 即发酵时间>发酵温度>装瓶量。

2.5 响应面因素间的交互作用分析

为了更直观地观察 3 因素之间的交互作用, 确定综合评分最高点。根据上述回归方程和回归模型方差分析表, 利用 Design-expert 软件绘制响应面分析图及其等高线图(图 7)。每个响应面代表在保持一个变量的最优条件下, 其他两个自变量之间的交互作用对纳豆发酵产 γ -PGA 综合评分的影响。

从图 7 的响应面分析图可以看出, 在一个变量确定的情况下, 其他两个因素对综合评分的影响基本呈抛物线状, 且存在极大值点, 变化趋势为先增大后减小。响应面越陡, 等高线的疏密度分布越不均匀, 说明交互作用越大。图 7 的(a)、(c)图中曲面相对较为陡峭, (b)、(d)图中等高线的疏密度分布较不均匀、呈近似马鞍形^[38], 说明装瓶量与发酵温度、装瓶



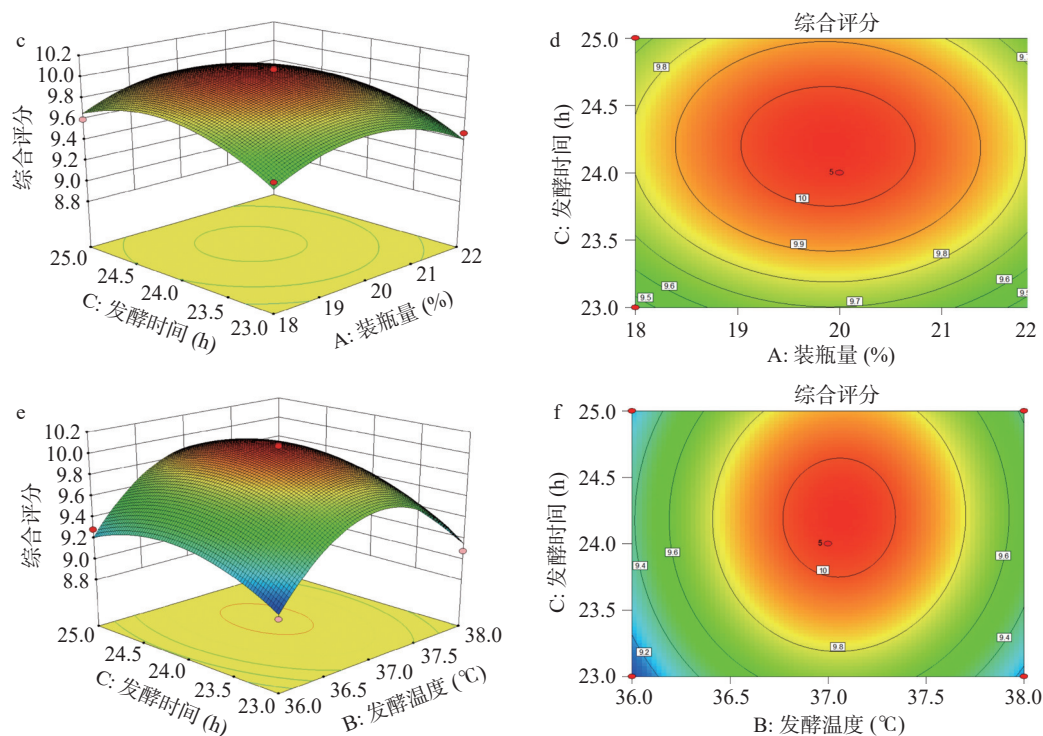


图7 两两因素交互作用对综合评分影响的响应面和等高线图

Fig.7 Response surface and contour map of the interaction of pairwise factors on the comprehensive score

量与发酵时间均有一定交互作用,对综合评分有一定的影响,但不显著,与表8中的 P 值相对应($P>0.05$)。图7的(e)图虽然曲面相对较为陡峭,但是其等高线(f)图近似圆形,说明发酵温度与发酵时间的交互作用不显著,这与回归模型中的方差分析结果一致。

2.6 验证实验

回归模型预测的纳豆发酵产 γ -PGA最优发酵条件及综合评分为:装瓶量19.89%,发酵温度37.06℃,发酵时间24.20 h,综合评分为10.05。根据实际情况,将发酵条件修正为装瓶量19.90%、发酵温度37.10℃、发酵时间24.20 h,进行3次平行发酵验证实验。结果得出, γ -PGA产量为3.65 mg/g,感官总评分为31.67分,综合评分为10.04分。实际值与预测值无显著性差异($P>0.05$),说明得到的最优发酵条件参数可靠,模型得到的实验结果具有较强的实际意义。

3 结论

以 γ -PGA产生量和纳豆感官总分综合评分为依据,对纳豆发酵产 γ -PGA进行工艺优化。结果表明:在大豆浸泡pH、接种量、装瓶量、发酵温度和发酵时间单因素优化实验的基础上,采用Plackett-Burman试验设计方法筛选出对综合评分影响最大的3个因素是装瓶量、发酵温度和发酵时间。通过最陡爬坡试验选取接近综合得分最高的3个重要水平,最后通过Box-Behnken响应面试验设计,得到纳豆发酵产 γ -PGA的最优实际发酵条件:装瓶量19.90%、发酵温度37.10℃、发酵时间24.20 h,此时,综合评分为10.05。最终验证实验的综合评分为

10.04,与预测值相差不大。这说明模型得到的预测结果稳定可靠,能够指导实际生产应用。

参考文献

- [1] TERADA A, YAMAMOTO M, YOSHIMURA E. Effect of the fermented soybean product "natto" on the composition and metabolic activity of the human fecal flora[J]. *Japanese Journal of Food Microbiology*, 1999, 16(4): 221-230.
- [2] 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. [HE R K, SONG L J, HUANG X Q, et al. Optimization of fermentation process for streptococcus thermophilus improved natto[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(6): 161-166.]
- [3] 陈乐乐, 吴隽恺, 王乙伊, 等. 超甜玉米对高蛋白纳豆加工工艺及风味的影响[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(6): 275-282. [CHEN L L, WU J K, WANG Y Y, et al. Effect of super sweet corn on the processing and flavour of high protein natto[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(6): 275-282.]
- [4] LEE B H, LAI Y S, WU S C. Antioxidation, angiotensin converting enzyme inhibition activity, nattokinase, and antihypertension of *Bacillus subtilis* (natto)-fermented pigeon pea[J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2015, 23(4): 750-757.
- [5] ZHOU L Q, HAO N, LI X T, et al. Nattokinase mitigated dextran sulfate sodium-induced chronic colitis by regulating microbiota and suppressing tryptophan metabolism via inhibiting ido-1[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 75: 1-13.
- [6] ZHANG X S, SUN X, LI W J, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activities of soy protein isolate fermented with *Bacillus subtilis* natto[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 58(8): 3199-3204.
- [7] NAGATA C, WADA K, TAMURA T, et al. Dietary soy and natto intake and cardiovascular disease mortality in Japanese adults: The takayama study[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2017, 105(2): 426-431.
- [8] NOZUE M, SHIMAZU T, SASAZUKI S, et al. Fermented soy product intake is inversely associated with the development of high

- blood pressure: The Japan public health center-based prospective study[J]. *Journal of Nutrition*, 2017, 147(1): 1749–1756.
- [9] 姚芳, 褚洁明, 殷晨瑶, 等. 纳豆发酵猪肉脯的工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(21): 231–240. [YAO F, CHU J M, YIN C Y, et al. Processing optimization of fermented dried meat slice with natto[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(21): 231–240.]
- [10] YOSHIOKA K, SEKINE M, OTOBE K. Physical properties of viscous materials in natto prepared at various fermentation temperatures[J]. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 2007, 54(10): 452–455.
- [11] RATHA P, JHON D Y. Factors increasing poly- γ -glutamic acid content of cheongguk-jang fermented by *Bacillus subtilis* 168[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2019, 28(1): 103–110.
- [12] NGUYEN S, INAOKA T, KIMURA K. Poly- γ -glutamic acid production by *Bacillus subtilis* (natto) under high salt conditions[J]. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 2018, 52(3): 249–253.
- [13] HO G H, HO T I, HSIEH K H, et al. Gamma-polyglutamic acid produced by *Bacillus subtilis* (natto): Structural characteristics, chemical properties and biological functionalities[J]. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2006, 53(6): 1363–1384.
- [14] ARAKI R, YAMADA T, MARUO K, et al. Gamma-polyglutamic acid-rich natto suppresses postprandial blood glucose response in the early phase after meals: A randomized crossover study[J]. *Nutrients*, 2020, 12(8): 2374.
- [15] YOSHIKAWA Y, CHEN P, ZHANG B, et al. Evaluation of seed chemical quality traits and sensory properties of natto soybean[J]. *Food Chemistry*, 2014, 153: 186–192.
- [16] CAO L, KOU F, ZHANG M C, et al. Effect of exogenous melatonin on the quality of soybean and natto products under drought stress[J]. *Journal of Chemistry*, 2021, 8847698.
- [17] WEI Q, CHANG S K C. Characteristics of fermented natto products as affected by soybean cultivars[J]. *Journal of Food Processing Preservation*, 2004, 28(4): 251–273.
- [18] YONG X, RAZA W, YU G, et al. Optimization of the production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus amyloliquefaciens* C1 in solid-state fermentation using dairy manure compost and monosodium glutamate production residues as basic substrates[J]. *Biore-source Technology*, 2011, 102(16): 7548–7554.
- [19] LI D F, HOU L Z, GAO Y X, et al. Recent advances in microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: A review[J]. *Foods*, 2022, 11(5): 739.
- [20] 张二伟, 刘宁, 吴涛, 等. γ -PGA 的基本特性, 生产方法及相关应用[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(16): 138–124. [ZHANG E W, LIU N, WU T, et al. Traits, production and application of poly- γ -glutamic acid[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(16): 138–124.]
- [21] 彭敏, 张迎庆, 王婷, 等. 聚谷氨酸对食品的功能性影响研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(7): 138–143. [PENG M, ZHANG Y Q, WANG T, et al. Research progress of polyglutamic acid on functional foods[J]. *China Food Additives*, 2021, 32(7): 138–143.]
- [22] LEE C Y, KUO M I. Effect of γ -polyglutamate on the rheological properties and microstructure of tofu[J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(5): 1034–1040.
- [23] XIE X H, WU X Y, SHEN Y, et al. Effect of poly- γ -glutamic acid on hydration and structure of wheat gluten[J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85: 3214–3219.
- [24] LIANG H F, CHEN C T, CHEN S C, et al. Paclitaxel-loaded poly (γ -glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(9): 2051–2059.
- [25] LUO Z T, GUO Y, LIU J D, et al. Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: Current progress, challenges, and future perspectives[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 134.
- [26] 李晨霞, 梁晶, 孙丽慧. 一株产 γ -PGA 的芽孢杆菌的分离鉴定及发酵条件的优化[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(19): 101–108. [LI C X, LIANG J, SUN L H. Isolation and identification of a strain of bacillus producing γ -PGA and its fermentation conditions optimization[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(19): 101–108.]
- [27] HU Y J, GE C R, YUAN W, et al. Characterization of fermented black soybean natto inoculated with *Bacillus natto* during fermentation[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(7): 1194–1202.
- [28] AFZAAL M, SAEED F, ISLAM F, et al. Nutritional health perspective of natto: A critical review[J]. *Biochemistry Research International*. 2022, 5863887.
- [29] World Health Organization. Global initiative on diet, physical activity and health: Report of WHO Science Group [R]. Geneva: WHO, 2013.
- [30] 张必松, 陈宇航, 张璐, 等. 一株 γ -聚谷氨酸高产菌株的筛选鉴定及发酵培养基优化[J]. *常熟理工学院学报(自然科学版)*, 2022, 36(5): 91–98. [ZHANG B S, CHEN Y H, ZHANG L, et al. Screening and identification of a poly- γ -glutamic acid high yielding strain and fermentation medium optimization[J]. *Journal of Changshu Institute of Technology (Natural Sciences)*, 2022, 36(5): 91–98.]
- [31] YAN D L, LIN Y S, QIU J, et al. Correlation analysis between soluble sugars of soybean and mucus drawing length of fermented natto[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 42: e91522.
- [32] 林咏珊, 高向阳, 程甲, 等. 不同蛋白含量大豆籽粒发酵纳豆的品质差异及相关性分析[J]. *食品与机械*, 2020, 36(7): 6–10. [LIN Y S, GAO X Y, CHEN J, et al. Quality differences and correlation analysis of natto fermented from soybean seeds with different protein content[J]. *Food Machinery*, 2020, 36(7): 6–10.]
- [33] 付文静, 王家林, 张杰. 赤小豆纳豆发酵工艺的研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(2): 109–113. [FU W J, WANG J L, ZHANG J. The study on the fermentation process of phaseolus angularis natto[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(2): 109–113.]
- [34] 周雪琴, 刘良忠. 枯草芽孢杆菌筛选及其产纳豆激酶的液态发酵条件优化[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(7): 163–169. [ZHOU X Q, LIU L Z. Screening of *Bacillus subtilis* and optimization of liquid fermentation conditions for nattokinase production[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(7): 163–169.]
- [35] YANG Y, LAN G Q, TIAN X Y, et al. Effect of fermentation parameters on natto and its thrombolytic property[J]. *Foods*, 2021, 10(11): 1–18.
- [36] FENG C, JIN S, LUO M, et al. Optimization of production parameters for preparation of natto-pigeon pea with immobilized *Bacillus natto* and sensory evaluations of the product[J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2015, 31: 160–169.
- [37] 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. [ZHANG H S, WANG J L. Fermentation process of common vetch natto[J]. *Journal of Qingdao University of Science and Technology(Natural Sciences)*, 2021, 42(6): 52–58.]
- [38] 张文, 张树清, 马晓彤, 等. 纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)发酵生产 γ -聚谷氨酸过程中培养基组分的优化[J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(11): 44–50. [ZHANG W, ZHANG S Q, MA X T, et al. Optimization of medium components for production of poly- γ -glutamic acid by fermentation of *Bacillus natto*[J]. *China Biotechnology*, 2013, 33(11): 44–50.]