

A Preliminary Study on the Chickpea Solid Fermentation for Nattokinase Production

Fuzhong Zhou^{1,2}, Xiaofei Chen¹, Xueyan Wang¹, Meng Ning^{1,2}, Wentao Diao², Zhijin Li¹

¹The Institute of Biology Co., Ltd., Henan Academy of Sciences, Zhengzhou Henan

²Henan Key Laboratory of Microbial Engineering, Zhengzhou Henan

Email: zdsyszfz001@163.com

Received: Apr. 19th, 2017; accepted: May 2nd, 2017; published: May 11th, 2017

Abstract

In this study, fifteen laboratory stored *Bacillus subtilis* strains were tested for their NK activity, and several parameters of the solid fermentation with chickpea (*Cicer arietinum*) media for NK production were optimized. The NK activity was decided with the transparent zones method on the fibrin-thrombin plate. The results showed that the NK secretion ability of strains was different; and the water content, pH value, cultural temperature and cultural duration have obviously influence on NK production. The optimum condition for NK production was 31 °C, pH 7.0, 64% water content and 36 hrs cultural duration and the addition of inorganic salts and surface active agents was helpful for NK production with chickpea media. At the optimum condition, the NK activity of the solid fermentation could reach 6731 FU/g.

Keywords

Chickpea (*Cicer arietinum*), Solid Fermentation, Nattokinase (NK), Strain Screening, Optimization

鹰嘴豆发酵产纳豆激酶的初步研究

周伏忠^{1,2}, 陈晓飞¹, 王雪妍¹, 宁 萌^{1,2}, 刁文涛², 李志金¹

¹河南省科学院生物研究所有限责任公司, 河南 郑州

²河南省微生物工程重点实验室, 河南 郑州

Email: zdsyszfz001@163.com

收稿日期: 2017年4月19日; 录用日期: 2017年5月2日; 发布日期: 2017年5月11日

摘 要

本研究从实验室保存的15株枯草芽孢杆菌中选育出适合鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)发酵生产纳豆激酶

(Nattokinase, NK)的优良菌株,并开展了菌株固体发酵产NK的工艺参数优化研究;NK酶活检测采用血纤维蛋白平板透明圈法。结果发现,培养基含水量、pH值、发酵温度及发酵时间均对鹰嘴豆发酵产生纳豆激酶有较大影响,培养基中添加适量的无机盐和表面活性剂有利于纳豆激酶的产生。在优化条件下(培养基含水量64%,PH7.0,31℃,培养36h),鹰嘴豆固态发酵产纳豆激酶的单位酶活可达到6731FU/g,获得了较高的单位酶活。

关键词

鹰嘴豆, 固态发酵, 纳豆激酶, 菌株, 优化

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

鹰嘴豆(Chickpea, *Cicer arietinum*)耐干旱、耐贫瘠又丰产,是目前世界上栽培面积较广的食用豆类作物之一,产量世界第三,在我国新疆、甘肃、宁夏等地已有2500多年的种植历史;鹰嘴豆不但具有很高的食用价值,而且还具有独特的药用价值;如鹰嘴豆对糖尿病、心脑血管疾病和胃病等疾病的预防和辅助治疗具有明显的效果,是维吾尔族药典传统用药[1][2][3]。

目前我国的鹰嘴豆精深加工水平还比较低,只是简单的磨粉或烘焙。近年来人们对鹰嘴豆蛋白肽的清除自由基、抗氧化、降血压等生理功能进行了研究[4][5][6],而有关鹰嘴豆发酵方面的研究则还比较少。如热夏提·达吾来提、傅樱花等对鹰嘴豆酸奶的发酵条件、商品性能等进行了研究[7][8];王淑兰、孔令明等对鹰嘴豆蛋白饮料的工艺参数等进行了研究[9][10];这些研究对以鹰嘴豆为原料研发发酵饮料的工艺参数、产品性能等方面进行了探索,没有涉及纳豆激酶指标。另一方面,大量研究表明NK作为一种潜在的溶栓制剂,可以微生物发酵生产[11][12][13][14][15],口服有效,受到中外学者和广大群众的普遍认可。卫拯友、魏雪团、肖萍等对鹰嘴豆固体发酵[16][17]、液体发酵[18]制备纳豆激酶(Nattokinase, NK)的产酶条件、酶学性质等方面进行了探索,但所获得的NK单位酶活特别是固体发酵时还比较低,还有必要开展进一步的实验研究。为使鹰嘴豆发酵物料中NK的单位酶活得到进一步提高,本文在前人工作基础上,对发酵鹰嘴豆产NK的菌株和发酵参数开展了研究,并取得了较好的实验结果,现将我们的研究结果报道如下。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 菌株

本研究选用菌株为实验室分离保存的16株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株。

2.1.2. 培养基

1) LB培养基: NaCl 1.0 g、蛋白胨 1.0 g、酵母粉 0.5 g、琼脂 1.5 g、蒸馏水 100 mL, pH值自然, 121℃高压蒸汽灭菌 25 min。

2) 发酵培养基: 选取市售不同品种的鹰嘴豆, 去杂, 称重, 浸泡过夜, 滤去水分, 根据各实验的具

体要求进行处理, 121℃高压蒸汽灭菌 25 min。

2.1.3. 试剂

纤维蛋白原(Fibrinogen), 凝血酶(Thrombin, 690BP/支), 尿激酶(Urokinase), 购自中国药品生物制品检定所; 琼脂糖、NaCl、蛋白胨, 酵母粉; 其它试剂均为国产分析纯。

2.2. 方法

2.2.1. 种子液制备

将菌株活化、转接至斜面培养基, 37℃培养 24 h。用接种环取 1 环接入 LB 培养基中, 37℃、150 rpm/min 培养过夜。

2.2.2. 菌株筛选及其发酵

菌种筛选时选用市场上常见的 3 个鹰嘴豆品种(大粒白色、大粒褐色和小粒白色品种)制作鹰嘴豆培养基, 以较全面地考察菌株对鹰嘴豆培养基的适应能力和稳定性等; 发酵实验每个三角瓶中装培养基质量为 50 克; 液体种子接种量为 4%, 培养 48 h, 其他参数根据实验要求进行单因子或多因子设定(如不同菌株、不同培养时间、温度、pH 值、培养基含水量的多因子实验, 以及无机盐和表面活性剂多因子实验等, 具体参数详见各实验组)。

2.2.3. 干燥

将发酵好的物料取出, 盛放在培养皿中, 40℃干燥箱干燥, 干燥后粉碎备用。

2.2.4. 纳豆激酶酶(NK)活测定

1) 纳豆激酶的浸提 取 NK 发酵干粉 0.5 g, 加入到 10 mL 离心管中, 用 5 mL 0.9%NaCl 溶解、混匀后放入 4℃冰箱浸提 4 h 以上。浸提结束后 5500 rpm/min 离心 10 min, 移取上清液至干净离心管中 4℃临时保存, 备用。

2) 血纤维平板的制备 取 1 支纤维蛋白原(88 mg), 加入 24.4 ml 0.01M PBS (pH7.4)溶液溶解; 凝血酶用灭过菌的 0.9% NaCl 溶液溶解至 100 BP/ml 终浓度; 1%琼脂糖用 0.01M PBS (pH7.4)配置; 首先取 7.5 ml 1%琼脂糖于无菌小瓶中, 50℃保温 10 min 后, 加 225 μ l 100 BP/ml 凝血酶, 混匀保温 10 min; 取纤维蛋白原溶液 7.5 ml, 缓慢加入琼脂糖(含凝血酶)溶液中并不停摇动; 将混匀的溶液倒入灭菌平板中, 冷却备用。

3) 标准曲线的绘制 首先绘制标准曲线, 取尿激酶标准品用无菌生理盐水稀释成 20, 40, 60, 80 和 100 FU/ml。分别取 10 μ L 点样于融化琼脂糖平板, 于 37℃保温 18 h 后, 测定血纤维蛋白平板上溶解圈的直径, 取两次试验的平均直径计算溶解圈面积。以酶活力(FU/ml)为横坐标, 溶解圈面积为纵坐标, 得到尿激酶标准曲线, 标准曲线的回归方程为 $y = 1.935x + 53.505$, 相关系数 $R^2 = 0.9908$ 。

4) 酶活测定 取离心后的上清液 1 ml 于 1.5 ml 离心管中, 再次离心后取 10 μ L 点样于打好孔的新配制血纤维平板上, 置于 37℃倒置培养 18 h。测定透明圈的大小, 计算透明圈面积, 从绘制的标准曲线中求得相应的酶活性。

3. 结果与分析

3.1. 鹰嘴豆发酵产 NK 适宜菌株的筛选

3.1.1. 初筛结果

见表 1。

Table 1. The comparison of NK activity (Fibrin-thrombin Unit/gram, FU/g) between different *Bacillus subtilis* strains during solid fermentation with Chickpea(*Cicer arietinum*) media**表 1.** 不同菌株发酵鹰嘴豆产 NK 的比较(FU/g)

菌株 (<i>Bacillus subtilis</i>)	鹰嘴豆品种 1	鹰嘴豆品种 2	鹰嘴豆品种 3
T ₃₋₂	227.2	723.5	470.7
T _{d-1}	3211.9	4053.1	5299.5
T _{d-2}	3025.3	3522.6	4378.2
T _{x-2}	4173.3	3553.8	4653.3
L ₁	4173.3	4308.4	3777.8
L ₂₋₁	4059.8	3617.3	2911.7
Sh ₂	530.2	970.3	1184.7
G ₂	1812.3	948.6	1514.1
L ₃₋₁	3777.8	3509.6	3875.3
Z ₂	2707.6	2178.6	2911.7
D ₅₆₋₃	3396.9	3649.2	4604.4
D ₂₋₃	1538.4	953.8	1244.4
R ₁	3260.8	3120.7	3668.4
R ₃	2804.7	2676.6	2815.5
Sh ₇₋₁	725.6	996.6	2314.2

由表 1、图 1 可知, 不同菌株发酵鹰嘴豆产 NK 的表现差异很大, 鹰嘴豆品种对 NK 的分泌表达也有一定的影响。其中 T_{x-2}、L₁、L₂₋₁、T_{d-1}、D₅₆₋₃ 等菌株发酵鹰嘴豆(3 个品种综合评估)分泌纳豆激酶的能力较强; 菌株 L₃₋₁、R₁、R₃、T_{d-2}、Z₂ 次之; 菌株 T₃₋₂、Sh₂、G₂、Sh₇₋₁、D₂₋₁、D₂₋₃ 较差。

3.1.2. 复筛结果

将在初筛时产 NK 能力较强的菌株 T_{x-2}、D₅₆₋₃、T_{d-1}、L₁ 等进行进一步发酵培养和重复筛选, 实验结果如下。

由表 2 可见, 菌株 L₁、T_{x-2} 在鹰嘴豆培养基上产纳豆激酶能力较强和较为稳定, 其中菌株 L₁ 的酶活较高。综合初筛和复筛结果, 选用菌株 L₁ 开展下面的实验研究。

3.2. 培养时间对鹰嘴豆发酵产 NK 的影响

鹰嘴豆培养基含水量 64%, pH7.0, 31℃ 培养, 于 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、84 h、96 h、108 h、120 h 取样, 其他实验条件和方法如上所述, 酶活测定结果如下(表 3)。

由上表 3 可知, 发酵培养 36h 时 NK 活性达到最高; 进一步延长培养时间, NK 活性没有提高, 而且呈缓慢下降趋势; 因此, 鹰嘴豆发酵产 NK 的最佳发酵时间为 36 h。

3.3. 培养温度对鹰嘴豆发酵产 NK 的影响

准确称量湿鹰嘴豆 50 克, 121℃, 25 min 灭菌后接入培养 24 h 的 L₁ 菌液 2 ml, 分别放在即 25℃、28℃、31℃、34℃、37℃、40℃ 培养箱中培养 48 h, 培养结束后 40℃ 干燥、粉碎、进行酶活测定, 结果如下(表 4)。

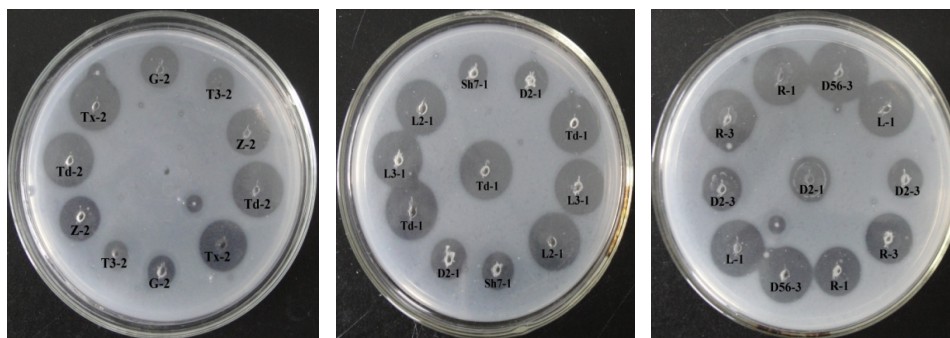


Figure 1. The comparison of NK activity between different *Bacillus subtilis* strains during solid fermentation with Chickpea(*Cicer arietinum*) media (In this figure, the T_{d-1} , L_{-1} etc. were equivalent to numbers of different strains this experiment used, the same below)

图 1. 不同菌株发酵鹰嘴豆产纳豆激酶的比较(图 1 中的 T_{d-1} 、 L_{-1} 等符号对应表 1 中及正文中的不同菌株的编号)

Table 2. The secondary screening result for NK activity of different strains with chickpea media

表 2. 不同菌株复筛结果

菌株	T_{x-2}	T_{d-1}	D_{56-3}	L_{-1}
NK 活性(FU/g)	4006.76	3777.80	1489.89	5748.62

Table 3. The influence of cultural durations on the NK activity with chickpea medium

表 3. 培养时间对 NK 酶活性的影响

培养时间(h)	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
酶活(FU/g)	0	2800.5	5192.8	5031.8	4717.4	4515.4	5112.0	5031.8	4564.0	4873.3

由表 4、图 2 可知, 发酵温度对鹰嘴豆固体发酵产纳豆激酶有一定的影响, 31℃时酶活性最高, 温度过低或过高酶活性均有所下降。因此, 确定最佳发酵温度为 31℃。

3.4. 培养基含水量对鹰嘴豆发酵产 NK 的影响

称取鹰嘴豆和蒸馏水, 配成不同含水量的培养基(55%, 25 g 鹰嘴豆 + 25 ml 水; 64%, 20 g 鹰嘴豆 + 30 ml 水; 73%, 15 g 鹰嘴豆 + 35 ml 水; 82%, 10 g 鹰嘴豆 + 40 ml 水; 91%, 5 g 鹰嘴豆 + 45 ml 水)。4%接种量, 31℃培养; 其他实验步骤和方法如上所述; 酶活测定结果如下(表 5)。

由表 5 可以看出, 发酵培养基含水量为 64%时酶活性最高, 含水量过低或过高酶活性均有所下降。因此, 确定最佳含水量为 64%~65%左右。

3.5. 培养基 pH 对鹰嘴豆发酵产 NK 的影响

用 0.2 mol/L $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 溶液和 0.2 mol/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 溶液调整培养基 pH 值至 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0; 培养基含水量 64%, 31℃培养箱中培养 36 h; 其他步骤和方法同上。结果见表 6。

由上表可知, 培养基 pH 值为 6.0~7.0 时酶活性最高, 可见, 鹰嘴豆发酵产纳豆激酶的适宜培养基 pH 值为 6.0~7.0。

3.6. 添加剂(无机盐及表面活性剂)对鹰嘴豆发酵产 NK 的影响

在鹰嘴豆培养基添加不同组合的无机盐和表面活性剂溶液(表 7), 调整培养基 pH 值至 7.0, 含水量 64%; 31℃培养箱中培养 36 h; 其他步骤和方法同上。实验结果如下(表 8)。

由表 8 可知, 鹰嘴豆发酵培养基添加适量的无机盐和表面活性剂对 NK 的分泌是有利的; 适宜配方

Table 4. The influence of the culture temperatures on the NK activity with chickpea media**表4.** 培养温度对NK酶活性的影响

温度(°C)	25	28	31	34	37	40
酶活(FU/g)	4479.59	4758.70	5484.87	5262.76	4936.44	4618.33

Table 5. The influence of the medium moisture content on the NK activity (Note: The chickpea moisture content were assumed 10%)**表5.** 培养基含水量对NK酶活性的影响

含水量(%)	55	64	73	82	91
酶活(FU/g)	4410.82	5940.05	5189.54	5116.72	4308.44

注：干鹰嘴豆含水量按10%计。

Table 6. The influence of the medium pH values on the NK activity**表6.** 培养基pH值对NK酶活性的影响

pH	5	6	7	8	9
酶活(FU/g)	3973.75	6188.79	6529.56	5522.25	4688.31

Table 7. The experimental combinations design of different inorganic salts and different surfactant (Tween 80) concentrations with chickpea media**表7.** 不同组合的添加剂(无机盐及表面活性剂)的实验设计

添加剂种类及水平	MgSO ₄ (A)	CaCl ₂ (B)	K ₂ HPO ₄ + KH ₂ PO ₄ (C)	Tween80 (D)
1	0.02%	0.02%	0.2% + 0.1%	0
2	0.04%	0.04%	0.4% + 0.2%	0.05%
3	0.06%	0.06%	0.6% + 0.3%	0.1%
实验编号	A	B	C	D
I	1	1	1	1
II	1	2	2	2
III	1	3	3	3
IV	2	1	2	3
V	2	2	3	1
VI	2	3	1	2
VII	3	1	3	2
VIII	3	2	1	3
IX	3	3	2	1

Table 8. The influence of additive groups (inorganic salts and surfactant Tween80) on the NK activity with chickpea media**表8.** 添加剂(无机盐及表面活性剂)对NK酶活性的影响

实验编号	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
酶活(FU/g)	6036.72	6330.52	5129.07	4829.49	6134.02	4139.83	6330.52	6731.14	5373.36

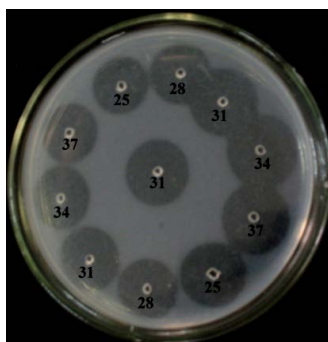


Figure 2. The influence of the culture temperatures on the NK activity during solid fermentation with chickpea medium (In this figure, the 25, 28, 31, 34, 37 were consistent one-to-one the culture temperatures 25°C - 37°C)

图 2. 培养温度对鹰嘴豆发酵产纳豆激酶的影响(图 2 中的 25、28、31、34、37 对应表 3 中的培养温度 25°C~37°C)

为 $A_3B_2C_1D_3$, 即 0.06% $MgSO_4$ 、0.04% $CaCl_2$ 、0.2% K_2HPO_4 、0.1% KH_2PO_4 和 0.1% Tween80。在此组合下, 鹰嘴豆发酵产 NK 的单位酶活可达 6731 FU/g。

4. 讨论和结论

自 1987 年日本学者须见洋行从 200 余种食物中发现纳豆具有溶栓作用并从中分离纯化到具有强烈溶栓功能的 NK(纳豆激酶)以来, 近年来科技工作者对纳豆激酶的性质、溶栓机理、吸收方式、以及基因改造、发酵技术等方面进行了大量研究, 证明了纳豆激酶是一种有益微生物生命活动过程中产生的丝氨酸蛋白酶; 可以口服使用, 在人体内半衰期时间达 8 小时以上, 对血管栓斑中的纤维蛋白有选择性溶解效果, 能温和持续地提高血液的纤溶活性, 不易引起出血, 安全系数高, 可以发酵生产, 非常适合用于溶栓保健制剂的研发。

目前, 利用鹰嘴豆发酵产 NK 的研究还比较少; 其中 2009 年卫拯友等用纳豆枯草杆菌(*Bacillus subtilus* Natto)固体发酵鹰嘴豆获得 915 FU/g 的 NK 单位酶活; Xu et al. (2011)用解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)固体发酵方法鹰嘴豆获得 356.25 FU/g 的 NK 酶活单位; 2014 年肖萍等以鹰嘴豆培养基和枯草芽孢杆菌(*B. subtilus*)为基础, 对液体发酵产纳豆激酶的实验条件进行了优化研究, 获得 3210 FU/g 的 NK 单位酶活[16] [17] [18]。本研究对鹰嘴豆固体发酵产 NK 的高产菌株和部分发酵参数进行了初步的实验研究; 结果表明, 我实验室选育的枯草芽孢杆菌(*B. subtilus* L^{-1})是适合鹰嘴豆固体发酵产纳豆激酶的优良菌种; 使用 *B. subtilus* L^{-1} 菌株, 在优化培养基(鹰嘴豆添加适量的无机盐 0.06% $MgSO_4$ 、0.04% $CaCl_2$ 、0.2% K_2HPO_4 、0.1% KH_2PO_4 和表面活性剂 0.1% Tween80)和优化培养条件下(温度 31°C, 培养基含水量 65%, 培养基 pH 6.0~7.0, 发酵时间 36h), 鹰嘴豆发酵物料中的 NK 单位酶活可以达到 6731 FU/g, 远高于文献报道的以鹰嘴豆为原料发酵的 NK 单位酶活[18] [19] [20] [21]。本项目研究为以鹰嘴豆为原料生产高活力 NK 提供了科学依据, 为鹰嘴豆的精深加工和转化增殖提供了一种新途径。

基金项目

河南省科技开放合作项目(142106000201, 152106000052); 郑州市科技攻关计划项目(141PPTGG415); 河南省科技攻关计划项目(152102210167)。

参考文献 (References)

- [1] 汪建红, 张婷, 张蔚佼. 鹰嘴豆多糖抗疲劳生物功效及其机制研究[J]. 食品工业, 2009(5): 1-3.
- [2] 陈晓飞, 李锋, 周伏忠, 孙玉飞, 陈国参. 鹰嘴豆分离蛋白的酶解工艺研究[J]. 中国农学通报 2013, 29(33):

400-404.

- [3] 马嫻, 杨瑞征, 孟晓, 包磊. 三种化学法提取鹰嘴豆水不溶性膳食纤维工艺的比较研究[J]. 粮油加工, 2009(2): 81-83.
- [4] Arcan, I. and Yemencioğlu, A. (2007) Antioxidant Activity of Protein Extracts from Heat-Treated or Thermally Processed Chickpeas and White Beans. *Food Chemistry*, **103**, 301-312.
- [5] 张涛, 江波, 沐万孟. 酶法改性对鹰嘴豆分离蛋白功能性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(4): 56-60.
- [6] 阮海英, 张翼麟, 李巨秀. 酶解鹰嘴豆蛋白制备 ACE 抑制肽的研究[J]. 农产品加工, 2012(1): 35-39.
- [7] 热夏提·达吾来提, 傅力, 巴吐尔·阿布都克热木, 等. 鹰嘴豆混合乳乳酸发酵最佳条件的研究[J]. 农产品加工(学刊), 2008(2): 45-47.
- [8] 傅樱花. 鹰嘴豆酸奶的发酵工艺优化[J]. 食品工业, 2012(2): 58-60.
- [9] 王淑兰, 梁绍隆, 庄艳玲. 鹰嘴豆蛋白饮料的研制及豆渣的开发利用[J]. 食品科学, 2002, 23(6): 98-99.
- [10] 孔令明, 李芳, 黄文书, 等. 鹰嘴豆植物蛋白饮料的工艺优化研究[J]. 食品工业, 2008(1): 58-60.
- [11] 周伏忠, 冯菲, 宁萌, 等. 鹰嘴豆浆液蛋白发酵与酶解效果的对比分析[J]. 中国农学通报, 2015, 31(29): 54-58.
- [12] Fujita, M., *et al.* (1993) Purification and Characterization of a Strong Fibrinolytic Enzyme (Nattokinase) in the Vegetable Cheese Natto, a Popular Soybean Fermented Food in Japan. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **197**, 1340-1347.
- [13] 李锋, 程雁, 冯菲, 等. 蛹虫草在河南省的新发现, 鉴定与特性[J]. 河南农业大学学报, 2014, 48(1): 52-57.
- [14] 蔡尤佳, 刘晓兰, 郑喜群, 等. 嗜酸放线菌 701 深层发酵产纤溶酶动力学研究[J]. 齐齐哈尔大学学报, 2012, 28(6): 59-63.
- [15] 周伏忠, 陈晓飞, 陈国参, 等. 纳豆激酶固体发酵的参数优化[J]. 生物技术, 2011, 21(1): 91-93.
- [16] 卫拯友, 吴富强. 鹰嘴豆发酵生产纳豆初探[J]. 陕西农业科学, 2009(6): 64-66.
- [17] Wei, X., Luo, M., Xu, L., *et al.* (2011) Production of Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* by Fermentation of Chickpeas, with the Evaluation of the Anticoagulant and Antioxidant Properties of Chickpeas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 3957-3963.
- [18] 肖萍, 姚四平, 康然, 等. 高产纤溶酶菌株筛选及发酵鹰嘴豆培养基优化[J]. 食品科技, 2014 39(10): 32-38.
- [19] 刘林, 谢和. 高产纤溶酶菌株的诱变育种及产酶条件的响应面法优化[J]. 广东农业科学, 2013(7): 103-107.
- [20] 熊强, 张菲菲, 杨青丽. 纳豆激酶液态发酵条件的研究[J]. 生物加工过程, 2012, 10(4): 26-29.
- [21] 沙维, 刘妍妍, 张丽萍. 发酵罐中生产纳豆激酶的条件与动力学研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(2): 100-104.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjfn@s@hanspub.org