



# 纳豆芽孢杆菌发酵产品研究进展

胡 洋, 邓淑心, 朴春红, 王玉华, 刘俊梅, 于寒松, 代伟长

(吉林农业大学 食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118)

**摘 要:**纳豆是日本的传统食品,由纳豆芽孢杆菌发酵制作而成,其分泌的纳豆激酶具有安全性高、溶栓能力强等特点。近些年来,纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)在食品及农副产物深加工领域应用越来越广泛,生产了多种活性产物并有效地提高了食品的营养特性。纳豆激酶除溶栓外更多最新的功能活性也逐渐被研究者发现,在稳定性及气味改良等方面的改善也有着很大的进步。本文综述了纳豆芽孢杆菌及纳豆激酶的开发及应用现状及存在的瓶颈问题和解决对策等研究进展,以期对纳豆相关食品的开发提供支持。

**关键词:**纳豆芽孢杆菌;纳豆激酶;纳豆;功能活性;食品应用

## Advances in the Development of Products Fermented by *Bacillus natto*

HU Yang, DENG Shu-xin, PIAO Chun-hong, WANG Yu-hua, LIU Jun-mei, YU Han-song, DAI Wei-chang

(Institute of Food Science and Engineering, Jinlin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**Abstract:** Nattokinase, which is produced from the Japanese traditional food natto and fermented by *Bacillus natto*, is characterized by high safety and strong thrombolytic activity. In recent years, *Bacillus natto* has been widely used in the food industry through the extensive processing of agricultural by-products, producing a variety of active substances and effectively improving the nutritional properties of foods. The most recently discovered functional activities, in addition to thrombolysis, have been gradually investigated by researchers. The stability and odour of nattokinase have been greatly improved. This paper reviews the status and issues of the application of *Bacillus natto* and nattokinase and provides a theoretical foundation for developing natto-related foods.

**Keywords:** *Bacillus natto*; Nattokinase; Natto; Functional activity; Food application

黄豆蒸煮后,盖上稻草发酵一段时间,上面就能铺满白色微生物分泌的独特的多糖物质,其味道独特,称为纳豆。早期纳豆作为典型的地方特色的食物,被中国东北地区少数民族和日本人食用。使纳豆发酵的微生物为纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*),属于枯草芽孢杆菌的一个亚种。自 20 世纪人们发现纳豆中的纳豆激酶具有显著的溶栓活性后,纳豆的消费量突飞猛进,特别近几年纳豆在中国的消费水平逐步呈上升趋势,关于纳豆芽孢杆菌和纳豆激酶的研究也越来越多。本文将近几年关于纳豆芽孢杆菌和纳豆激酶相关产品开发的最新研究进展进行总结,找出该领域发展的瓶颈问题并展望未来的研究趋势。

## 1 纳豆芽孢杆菌及纳豆激酶的开发现状

### 1.1 纳豆激酶生产现状

纳豆激酶由于其良好的生理活性,其酶活性及

产量的提高也是目前研究的热点。主要方法集中于菌种筛选、发酵条件优化、基因工程和提取纯化 4 个方面<sup>[1]</sup>。为了适应大批量工业生产纳豆激酶,有学者通过分批补料和改变培养基中葡萄糖与蛋白胨的比例来高细胞密度培养枯草芽孢杆菌,最终得到高酶活的纳豆激酶<sup>[2]</sup>。随着生物技术的发展进步,越来越多的研究者将基因工程技术和培养基的优化相结合用来提高纳豆激酶酶活。赵新宇等<sup>[3]</sup>对产纳豆激酶的地衣芽孢杆菌基因工程菌进行了全合成培养基的发酵优化,显著地提高了纳豆激酶的纯度。张杰等<sup>[4]</sup>将紫外和超声诱导与固态培养基的优化相结合,最终纳豆激酶酶活可高达  $4\,087.83 \pm 93.75\text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。异原表达改善纳豆激酶的性质也逐渐成为一种趋势<sup>[5]</sup>。Weng 等<sup>[6]</sup>将纳豆激酶进行 M222A/I31L 和 T220S/I31L 双位点定点诱变后导入到大肠埃希氏菌中表达,结果纳豆激酶的氧化稳定性和催化活性均有显著的增强。Wei

收稿日期:2018-12-11

基金项目:吉林省科技厅中青年科技创新人才及团队项目(20160519013JH);国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04);吉林省教育厅(JJKH20170302KJ);长春市科技局地院合作项目(17DY013);吉林农业大学创新训练项目(201710193045)。

第一作者简介:胡洋(1992-),男,硕士,主要从事长白山野生植物资源开发与利用。E-mail: huyang20501@163.com。

通讯作者:朴春红(1972-),女,博士,教授,主要从事生物反应器与功能性食品研究。E-mail: piaochunhong9111@163.com。

等<sup>[7]</sup>通过对地衣芽孢杆菌 WX-02 的信号肽优化,提供了一种商业水平的高酶活性纳豆激酶工程菌。有些研究者还通过可食性植物大量生产口服性纳豆激酶<sup>[8]</sup>。韩岚等<sup>[9]</sup>根据植物偏爱密码子设计合成了纳豆激酶基 sNK,并插入番茄内含子中以达到损失表达的目的。

除大豆外,木豆、红豆、鹰嘴豆、蚕豆等<sup>[10-13]</sup>也可作为培养基生产纳豆激酶。同时农副产物用于生产纳豆激酶提高其附加值的研究也越来越广泛,尤其是粮食与油脂副产物作为培养基应用最为广泛。苏敏等<sup>[14]</sup>利用豆渣进行低成本生产纳豆激酶,通过响应面法优化出最优发酵条件为发酵温度 36℃,发酵时间 36 h,接种量 80 mL·kg<sup>-1</sup>,酶活可高达 1 751.28 U·g<sup>-1</sup>(湿豆渣),可达到商品酶标准。廖杰琼等<sup>[15]</sup>用菜籽粕进行固态发酵优化产纳豆激酶,酶活也达到了 6 031.33 IU·g<sup>-1</sup>。果蔬副产物也同样被应用在纳豆激酶的生产中,仓义鹏等<sup>[16]</sup>用苹果渣进行固态发酵获得了有较高酶活的产品,有明显的经济优势。Wang 等<sup>[17]</sup>通过以水产副产物—虾壳为氮源进行发酵生产纳豆激酶,并进行了盐析、透析、层析柱三步纯化,最终比酶活提高了 515 倍。此外纳豆激酶酶活单位也越趋近于标准化,在 2010 年日本提出了国际通用的标准含量标识 FU 的酶活单位,也大大促进了纳豆激酶作为功能性产品的开发。

1.2 纳豆芽孢杆菌及纳豆激酶在食品中的应用现状

现今纳豆芽孢杆菌及纳豆激酶在食品中的应用越来越普遍。在豆制品加工方面,祁勇刚等<sup>[18]</sup>通过单因素试验和正交试验优化生产出的纳豆腐乳具有白腐乳的滋味和香味,同时纳豆激酶酶活达到 2 712 FU·g<sup>-1</sup>,大大提高了腐乳的营养价值。李梦丹等<sup>[19]</sup>研发了油茶籽粕纳豆酱,对农副产物的利用起到了较好的促进作用。一些功能性食品的开发中纳豆芽孢杆菌的应用呈逐渐上升趋势。张扬等<sup>[20]</sup>将阿胶与纳豆相结合,使得纳豆分泌的酶对阿胶进行适当水解,促进了人体的营养吸收。富集  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的发芽大豆进行纳豆芽孢杆菌发酵也可以生产出高  $\gamma$ -氨基丁酸和高纳豆激酶含量的咀嚼片<sup>[21]</sup>。Kang 等<sup>[22]</sup>将红参与纳豆激酶结合饲养患有高胆固醇的雄兔,最终发现其肝胆固醇和胆固醇酯转移蛋白活性水平明显降低,证明其是一种有效降低胆固醇的功能性食品。在可食性淀粉酶方面,也有人利用纳豆枯草芽孢杆菌 CCT7712 来生产微生物源的左旋聚糖<sup>[23]</sup>。

1.3 纳豆芽孢杆菌在其它营养性物质生产中的应用

在纳豆芽孢杆菌的发酵或基因工程技术改良过程中,不仅会产生纳豆激酶,还会产生一些其它重要的功能性活性物质,也会明显地改善食品的营养特性。Park 等<sup>[24]</sup>通过枯草芽孢杆菌和植物乳酸杆菌对南瓜进行两步发酵, $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)含量明显提高。同样,Zhang 等<sup>[25]</sup>将不同的乳酸菌与纳豆芽孢杆菌组合固态发酵全组分大豆,大豆的游离氨基酸的含量都大大提高,同时小分子大豆肽比例也有所提高。令狐青青等<sup>[26]</sup>在料液比 1:1.2 (m/V)、发酵 pH8.8 和加糖量 3.13% 的条件下液态发酵鲑鱼碎肉,必需氨基酸总量达到 149.320 mg·g<sup>-1</sup>。MnQuitin 7(MK-7)是维生素 K 的有效营养补充剂,而纳豆芽孢杆菌静态发酵是生产 MK-7 的常用方法<sup>[27]</sup>。基因工程技术也是提高纳豆芽孢杆菌在食品中应用价值的有效方法,Zhang 等<sup>[28]</sup>运用 PCR 融合技术将玉米胚乳蛋白中蛋氨酸基因(玉米醇溶蛋白)与辣椒花药的赖氨酸基因(CFLR)导入纳豆芽孢杆菌中,并能稳定表达,大大提高了食品的营养。抗氧化性作为当今功能性食品研究的热点,纳豆芽孢杆菌发酵也会产生一些抗氧化肽类物质,并具有较好的抗氧化活性。韦涛等<sup>[29]</sup>用纳豆芽孢杆菌固态发酵小米糠所产生的抗氧化肽清除 DPPH 自由基 IC<sub>50</sub>能达到 0.12 mg·mL<sup>-1</sup>。纳豆芽孢杆菌发酵液富含抗氧化肽,Sato 等<sup>[30]</sup>用 LC/MS/MS 方法分离出 Lys-Leu 和 Leu-Arg 两种肽,并证明其对二肽酰多肽酶 IV(DPPIV)有抑制作用。

2 纳豆芽孢杆菌发酵产品的功效研究

纳豆激酶的安全性研究表明其在生理功效领域具有广阔的开发前景。Lampe 等<sup>[31]</sup>对啮齿动物和人类志愿者持续供给了纳豆激酶产品 NSK-SD,并进行了几项 GLP-兼容测试,结果证明纳豆激酶并无致突变和非致裂作用。此外,为了防止在注射纳豆激酶改善血栓的过程中出血的风险,有学者制备了纳豆激酶-牛乳脱氧胆酸酯(NK-TUDCA)复合物,具有较低毒性,对纳豆激酶的安全使用提供了进一步的依据<sup>[32]</sup>。

纳豆激酶具有安全性高、成本低、生产工艺简单、口服有效期和体内半衰期长等特点,是非常有前景的新一代溶栓性药物<sup>[33]</sup>,目前已经明确纳豆激酶在人体血液中存在<sup>[34]</sup>。心血管疾病(CVD)是世界上主要的死亡原因之一,在控制和管理心血管疾病死亡率方面,纳豆激酶具有优越的纤溶酶原激活物活性,通过有限的蛋白水解直接消化纤维蛋白,

预防和治疗多种心血管疾病。此外,除纳豆激酶外 更多的产品也被开发,更多新的功效也被人们所研

表 1 纳豆激酶的功效研究  
Table 1 Research on the functional activity of nattokinase

应用领域 Application field	功能活性 Functional activity	试验结果 Result
心血管疾病 Cardiovascular diseases	降血压	用纳豆芽孢杆菌发酵木豆具有抗氧化、血管紧张素转换酶抑制活性及抗高血压的作用 <sup>[35]</sup> 。自发性高血压大鼠 (SHR) 和 Wistar-Kyoto (WKY) 大鼠用富含 GABA 和纳豆激酶的饲料饲养后,血压显著降低 <sup>[36]</sup> 。
	抗动脉粥样硬化	纳豆激酶对颈总动脉中膜厚度 (CCA-IMT) 的干预试验结果显示纳豆激酶能显著改善动脉粥样硬化,其效果与辛伐他汀相当 <sup>[37]</sup> 。
	降血脂	纳豆激酶冻干粉按高、中、低剂量组干预高脂饲料诱导的大鼠,其总胆固醇 (TC) 和甘油三脂 (TG) 水平都显著降低 <sup>[38]</sup> 。
其它疾病 Other diseases	治疗哮喘	将鼻息肉组织与纳豆激酶 (10 ~ 1 000 FU·mL <sup>-1</sup> ) 在 37℃ 条件下孵育 24 h 后,鼻腔分泌物和痰液黏度明显降低 <sup>[39]</sup> 。
	生殖系统的恢复	用黑大豆纳豆提取物灌胃的高胆固醇血症雄鼠,其睾丸激素水平提高,精子的密度和活力增加,有利于雄鼠的生殖健康 <sup>[40]</sup> 。
	促进纤溶和抗凝	双盲、安慰剂对照的交叉纳豆激酶干预研究表明,单剂量纳豆激酶给药可以同时通过多种途径促进纤溶和抗凝 <sup>[41]</sup> 。

3 纳豆芽孢杆菌发酵产品瓶颈及解决方法

在纳豆芽孢杆菌及纳豆激酶应用的过程中存在着众多优势的同时也存在着一些问题,主要集中于纳豆中含有较多胺类物质<sup>[42]</sup>,会产生一些不良气味,让人较为难以接受。此外纳豆激酶对温度、pH 较为敏感,以致其被口服至人体后稳定性差、易失活,大大限制了其在食品中的应用。

3.1 纳豆芽孢杆菌发酵产品风味

在纳豆发酵过程中,主要有亚精胺、精胺、腐胺和酪胺 4 种胺类物质产生<sup>[43]</sup>。也有学者通过气相色谱 - 色谱 - 质谱联用仪 (GC-MS/O) 从纳豆中分离提取鉴定出 22 种关键香气化合物成分,其中吡嗪类化合物也起到了主要风味作用<sup>[44]</sup>。在生活中人们通常用调味品来掩盖纳豆的味道,有研究者也通过添加辣椒、茴香、糖等调味品进行风味优化和调制得到营养和味道俱佳的纳豆食品如麻辣纳豆<sup>[45]</sup>、甜咸口味的纳豆<sup>[46]</sup>。在利用纳豆芽孢杆菌发酵生产食品方面,通过改变发酵基质的碳源也是有效改善风味的一种方法。邓永建等<sup>[47]</sup>改变不同碳源和其添加量也能明显去除纳豆腐乳的氨臭味。此外,通过混菌发酵也可以提高食品风味,王瑞珍等<sup>[48]</sup>将纳豆芽孢杆菌分别和戴尔凯氏有孢圆酵母 (*Torulaspora delbrueckii*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 两种菌联合发酵冷榨核桃粕,挥发性盐基氮均减少 80% 以上。

3.2 纳豆激酶酶活的稳定性及保藏

纳豆激酶作为一种具有良好安全性的溶栓性功能补充剂,具有广泛的应用前景。但是在维持纳豆激酶酶活的稳定性方面,仍是纳豆激酶在食品领域应用中存在的瓶颈问题。纳豆激酶与纳米材料复合是现今常用的保藏酶活的方法。Zhang 等<sup>[49]</sup>制备了不同臂数的聚乙二醇 - 聚谷氨酸多肽树突状分子 ( $x$ -PEG (G3)<sub>x</sub>,  $x = 2, 4, 6, 8$ ) 与纳豆激酶聚合生产纳米复合材料,并通过紫外 - 可见吸收光谱、荧光光谱、圆二色性光谱和 zeta 电位测量对纳豆激酶酶活性进行了评价,结果显示  $x$ -PEG (G3)<sub>x</sub>/NK 纳米复合材料具有较好的溶栓性,保持了良好的酶活性。还有学者用聚乳酸 - 共聚乙醇酸 (PLGA) 将纳豆激酶和 Tet1 肽相结合包埋,能够下调淀粉样蛋白的聚集并显示出抗纤溶活性,对酶活无任何影响<sup>[50]</sup>。利用发散 - 收敛法合成的聚赖氨酸树突状分子 (PLLD) 也可以作为一种蛋白质药物的理想载体。其中带正电荷的 NK/PLLD 纳米复合材料可以通过静电相互作用穿透带负电荷的血栓,当 NK/PLLD 摩尔比为 1:30 时,相对酶活性达到 117%,在不同的温度和 pH 条件下也比游离 NK 的酶活要稳定<sup>[51]</sup>。固定化技术也是一种保持纳豆激酶活性的常用技术,Guo 等<sup>[52]</sup>利用磁性纳豆芽孢杆菌固定化技术发酵银杏种子,固定化微生物的活性均为 80%,有效的保持了纤维蛋白溶解活性。Deepak 等<sup>[53]</sup>将纳豆激酶在聚羟基丁酸 (PHB) 纳米颗粒上固定化,也增加了纳豆激酶的稳定性,延长了其保

藏时间。此外还有些新技术也逐渐应用在纳豆激酶的活性稳定及保藏方面。Wang等<sup>[54]</sup>制备了纳豆激酶自双乳化给药系统,对油相、内水相和乳化剂的种类和浓度进行了筛选,并能达到有效保护胃环境中的纳豆激酶活性的目的。Garg等<sup>[55]</sup>采用三相分配法(TPP)纯化得到较高的纳豆激酶活性回收率,采用不同赋形剂冷冻干燥,最终表明叔丁醇冷冻干燥对纳豆激酶二级结构无影响,干燥时间短,能够有较好的酶活保藏稳定性。Kapoor等<sup>[56]</sup>运用超高压均质技术将发酵大豆粉与表面活性剂相结合并利用自顶向下技术制备了纳米悬浮液,模型组大鼠口服纳米混悬液后,凝血酶原时间和活化部分凝血活酶时间显著延长,这为非水溶性食品成分的利用和大豆营养食品的开发提供了新途径。还有学者将纳豆激酶和纳米银(AgNPs)相结合制成了双功能涂层,这种双功能涂层既能有较强的溶栓性又具有很强的抗菌性,同时纳米银的吸附提高了纳豆激酶的热稳定性和溶栓性<sup>[57]</sup>。

4 结论与展望

综上所述,纳豆芽孢杆菌与纳豆激酶越来越多的新功效逐渐被研究者所发现并引起了业界的关注。同时纳米包埋技术的运用大大提升了纳豆激酶的酶活稳定性和保藏的持久性,利用副产物发酵生产纳豆激酶的方法也越来越普遍,纳豆芽孢杆菌的发酵产物不再仅仅局限在纳豆激酶,抗氧化肽等功能性成份及维生素营养补充剂的产品开发也越来越被重视。但是由于纳豆激酶的价格昂贵,且纳豆食品感官特性上的特殊性,纳豆芽孢杆菌相关产品走进食品领域仍具有一定差距。相信随着“国家营养计划2017-2030”的发布<sup>[58]</sup>,纳豆芽孢杆菌为核心的食物营养健康产业必定迎来新的天地。

参考文献

[1] Cai D, Zhu C, Chen S. Microbial production of nattokinase: Current progress, challenge and prospect[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 33(5): 84.

[2] Kwon E Y, Kim K M, Kim M K, et al. Production of nattokinase by high cell density fed-batch culture of *Bacillus subtilis*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2011, 34(7): 789-793.

[3] 赵新宇, 陈杨阳, 陈敬帮, 等. 高产纳豆激酶地衣芽孢杆菌工程菌全合成培养基优化[J]. 食品科学, 2016, 37(7): 140-145. (Zhao X Y, Chen Y Y, Chen J B, et al. Optimization of synthetic complete medium for enhanced nattokinase production by genetically engineered *Bacillus licheniformis*[J]. Food Science, 2016, 37(7): 140-145.)

[4] 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. (Zhang J, Ge W

P, Chen Y, et al. Strain improvement of *Bacillus subtilis* for enhanced production of nattokinase and optimization of solid-state fermentation conditions [J]. Food Science, 2016, 37(3): 151-156.)

[5] Selarajan E, Bhatnagar N. Nattokinase: An updated critical review on challenges and perspectives [J]. Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry, 2017, 15(2): 128-135.

[6] Weng M, Deng X, Bao W, et al. Improving the activity of the subtilisin nattokinase by site-directed mutagenesis and molecular dynamics simulation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 465(3): 580-586.

[7] 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, 2014, 42(2): 287-295.

[8] 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.

[9] 韩岚, 王欢, 王佳琪, 等. 密码子优化的纳豆激酶基因在番茄果实中的瞬时表达[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2016, 47(1): 73-79. (Han F, Wang H, Wang J Q, et al. Transient expression of codon optimized nattokinase genes in tomato fruit[J]. Journal of Inner Mongolia University (Natural Science Edition), 2016, 47(1): 73-79.)

[10] 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 & Emerging Technologies, 2015, 31: 160-169.

[11] Jhan J K, Chang W F, Wang P M, et al. Production of fermented red beans with multiple bioactivities using co-cultures of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*[J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 63(2): 1281-1287.

[12] 卓晓沁, 赵慧莹, 何国庆. 鹰嘴纳豆液态发酵高产蛋白酶的培养基及发酵条件优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 115-121. (Zhuo X Q, Zhao H Y, He G Q. Optimization of submerged fermentation medium and condition of chickpea natto[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(7): 115-121.)

[13] 涂彩虹, 张驰松, 刘一静, 等. 纳豆激酶产生菌的筛选及其在蚕豆发酵的应用[J]. 食品科技, 2017, 42(11): 18-21. (Tu C H, Zhang C S, Liu Y J, et al. Screening of natto kinase producing bacteria and fermentation of broad bean[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(11): 18-21.)

[14] 苏敏, 于洪良, 王尚, 等. 低成本生产纳豆激酶工艺初探[J]. 食品工业, 2017, 38(10): 48-52. (Su M, Yu H L, Wang S, et al. Primary study on low-cost production of nattokinase[J]. The Food Industry, 2017, 38(10): 48-52.)

[15] 廖杰琼, 陈力力, 杨伊磊, 等. 菜籽粕固态发酵产纳豆激酶条件的优化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2015, 41(3): 281-285. (Liao J Q, Chen L L, Yang Y L, et al. Optimization on the fermentation conditions from solid-state rapeseed meal for natto-kinase production [J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2015, 41(3): 281-285.)

[16] 仓义鹏, 张宏志, 董明盛. 苹果渣固态发酵产纳豆激酶的工艺优化[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 181-185. (Cang Y P,

- Zhang H Z, Dong S M. Optimization of fermentation conditions for nattokinase production in solid-state fermentation by *Bacillus subtilis* natto using apple pomace as substrate[J]. Food Science, 2010, 31(15):181-185.)
- [17] Wang S L, Wu Y Y, Lian T W. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007 [J]. New Biotechnology, 2011, 28(2): 196-202.
- [18] 祁勇刚, 高冰, 黄菲武, 等. 纳豆腐乳发酵工艺优化[J]. 中国酿造, 2016, 35(8):78-82. (Qi Y G, Gao B, Huang F W, et al. Optimization of fermentation technology for natto sufu[J]. China Brewing, 2016, 35(8):78-82.)
- [19] 李梦丹, 杨伊磊, 陈力力, 等. 油茶籽粕纳豆酱发酵条件的研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(8):22-26. (Li M D, Yang Y L, Chen L L, et al. Research on fermentation conditions of oil-camelia seed cake natto paste [J]. China Brewing, 2016, 35(8): 22-26.)
- [20] 张扬, 周秀玲, 石海英, 等. 阿胶纳豆制作工艺研究[J]. 食品工业, 2015, 36(6):78-81. (Zhang Y, Zhou X L, Shi H Y, et al. The processing method of donkey-hide glue natto [J]. The Food Industry, 2015, 36(6):78-81.)
- [21] 田璐, 杨润强, 沈昌, 等. 富含 GABA 的纳豆咀嚼片生产技术研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(23):162-165, 172. (Tian L, Yang R Q, Shen C, et al. Research of production technology of GABA-riched natto chewable tablet[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(23):162-165, 172.)
- [22] Kang S J, Lim Y, Kim A J. Korean red ginseng combined with nattokinase ameliorates dyslipidemia and the area of aortic plaques in high cholesterol-diet fed rabbits [J]. Food Science and Biotechnology, 2013, 23(1):283-287.
- [23] Mantovan J, Bersaneti G T, Faria-tischer P C S, et al. Use of microbial levan in edible films based on cassava starch [J]. Food Packaging and Shelf Life, 2018, 18:31-36.
- [24] Park E J, Garcia C V, Youn S J, et al. Fortification of  $\gamma$ -aminobutyric acid and bioactive compounds in *Cucurbita moschata* by novel two-step fermentation using *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* [J]. LWT-Food Science and Technology, DOI: 10.1016/j.lwt.2018.07.065.
- [25] Zhang S, Shi Y, Zhang S, et al. Whole soybean as probiotic lactic acid bacteria carrier food in solid-state fermentation [J]. Food Control, 2010, 41:1-6.
- [26] 令狐青青, 张雪, 童晓倩, 等. 纳豆芽孢杆菌 (*Bacillus natto*) 发酵鲑鱼碎肉的工艺优化[J]. 食品科学, 2015, 36(19):148-152. (Linghu Q Q, Zhang X, Tong X Q, et al. Optimization of fermentation conditions of minced squid meat by *Bacillus natto* [J]. Food Science, 2015, 36(19):148-152.)
- [27] Mahdinia E, Demirci A, Berenjian A. Utilization of glucose-based medium and optimization of *Bacillus subtilis* natto growth parameters for vitamin K (menaquinone-7) production in biofilm reactors [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2018, 13: 219-224.
- [28] Zhang S, Luo C C, Wu C C, et al. Construction and expression of methionine-rich and lysine-rich fusion gene in *Bacillus natto* [J]. Journal of Northeast Agricultural University (English Edition), 2015, 22(2):22-28.
- [29] 韦涛, 周启静, 陆兆新, 等. 纳豆芽孢杆菌固态发酵小米糠产抗氧化肽工艺优化[J]. 食品科学, 2017, 38(10):66-73. (Wei T, Zhou Q J, Lu Z X, et al. Optimization of solid state fermentation conditions for production of antioxidant peptides from millet bran by *Bacillus natto* [J]. Food Science, 2017, 38(10):66-73.)
- [30] Sato K, Miyasaka S, Tsuji A, et al. Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) inhibitory activity from natto using DPPIV from *Aspergillus oryzae* [J]. Food Chemistry, 2018, 261:51-56.
- [31] Lampe B J, English J C. Toxicological assessment of nattokinase derived from *Bacillus subtilis* var. natto [J]. Food and Chemical Toxicology, 2016, 88:87-99.
- [32] Feng R, Li J, Chen J, et al. Preparation and toxicity evaluation of a novel nattokinase-tauroursodeoxycholate complex [J]. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018, 13(2):173-182.
- [33] Fujita M, Ohnishi K, Takaoka S, et al. Antihypertensive effects of continuous oral administration of nattokinase and its fragments in spontaneously hypertensive rats [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2018, 34(11):1696-1701.
- [34] Ero M P, Ng C M, Mihailovski T, et al. A pilot study on the serum pharmacokinetics of nattokinase in humans following a single, oral, daily dose [J]. Alternative Therapies in Health and Medicine, 2013, 19(3):16-19.
- [35] 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.
- [36] Suwanmanon K, Hsieh P C. Effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid and nattokinase-enriched fermented beans on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar - Kyoto rats [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2014, 22(4):485-491.
- [37] 任妮娜, 陈鸿杰, 李跃, 等. 纳豆激酶对颈动脉粥样硬化和高血脂患者的疗效观察[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(26):2038-2042. (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]. National Medical Journal of China, 2017, 97(26): 2038-2042.)
- [38] 谢嵩, 于宗琴, 刘秀菊. 纳豆激酶的制备及其降血脂功效研究[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1):17-20. (Xie S, Yu Z Q, Liu X J. Preparation of nattokinase and study on its hypolipidemic effect [J]. Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceuticals, 2015, 35(1):17-20.)
- [39] Takabayashi T, Imoto Y, Sakashita M, et al. Nattokinase, profibrinolytic enzyme, effectively shrinks the nasal polyp tissue and decreases viscosity of mucus [J]. Allergy International, 2017, 66(4):594-602.
- [40] Gofur A, Lestari S R. Effect of black soybean natto extract (*Glycine soja*) on reproduction system of hypercholesterolemia male mice [J]. Asian Pacific Journal of Reproduction, 2016, 5(5): 387-390.
- [41] Kuraosawa Y, Nirengi S, Homma T, et al. A single-dose of oral nattokinase potentiates thrombolysis and anti-coagulation profiles [J]. Scientific Reports, 2015, 5(1):11601.
- [42] Toro-funes N, Bosch-fuste J, Latorre-moratalla M L, et al. Biologically active amines in fermented and non-fermented commercial

soybean products from the Spanish market [J]. Food Chemistry, 2015,173:1119-1124.

[43] 高泽鑫,何腊平,刘亚兵,等. 高产纳豆激酶菌株的分离与发酵纳豆过程中生物胺的变化[J]. 食品科学,2018,39(14):185-191. (Gao Z X, He L P, Liu Y B, et al. Screening of a high-yield nattokinase-producing strain and changes of biogenic amines during natto fermentation [J]. Food Science, 2018, 39 (14):185-191. )

[44] Liu Y, Song H, Luo H. Correlation between the key aroma compounds and gDNA copies of *Bacillus* during fermentation and maturation of natto [J]. Food Research International, 2018, 112: 175-183.

[45] 王丽娜,付华峰,张永清,等. 麻辣口味纳豆的研究[J]. 食品工业,2014,35(5):47-50. (Wang L N, Fu H F, Zhang Y Q, et al. Research spicy taste of natto[J]. The Food Industry,2014,35 (5):47-50. )

[46] 甄珍,刘晓兰. 甜味、咸味纳豆制备方法的研究[J]. 中国调味品,2015,40(5):64-67. (Zhen Z, Liu X L. Research on preparation on method of sweet and salty natto [J]. China Brewing, 2015,40(5):64-67. )

[47] 邓永建,刘健,高泽鑫,等. 碳源对纳豆腐乳风味及营养成分的影响[J]. 中国酿造,2016,35(9):51-54. (Deng Y J, Liu J, Gao Z X, et al. Effect of carbon source on flavor and nutrition components of natto sufu [J]. China Brewing, 2016, 35 (9): 51-54. )

[48] 王瑞珍,蔡天娇,徐亚飞,等. 双菌株联合固态发酵冷榨核桃粕提高产品纳豆激酶活性的研究[J]. 食品工业科技,2017,38(16):112-117. (Wang R Z, Cai T J, Xu Y F, et al. Study of improving nattokinase activity through solid-state fermentation of cold-pressing walnut dregs by compound strains [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017,38(16):112-117. )

[49] Zhang S F, Lu S, Gao C, et al. Multiarm-polyethylene glycol-polyglutamic acid peptide dendrimer: Design, synthesis, and dissolving thrombus [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2018, 106(6):1687-1696.

[50] Bhatt P, Verma A, Al-abassi F, et al. Development of surface-engineered PLGA nanoparticulate-delivery system of Tet-1 -conjugated nattokinase enzyme for inhibition of A $\beta$ <sub>40</sub> plaques in Alzheimer's disease [J]. International Journal of Nanomedicine, 2018, 12: 8749-8768.

[51] Wu C, Gao C, Lu S, 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.

[52] Guo N, Song X R, Kou P, et al. Optimization of fermentation parameters with magnetically immobilized *Bacillus natto* on Ginkgo seeds and evaluation of bioactivity and safety [J]. LWT- Food Science and Technology, 2018, 97:172-179.

[53] Deepak V, Ram K P, Kalishwaralal K, et al. Purification, immobilization, and characterization of nattokinase on PHB nanoparticles [J]. Bioresource Technology, 2009,100(24):6644-6646.

[54] Wang X, Jiang S, Wang X, et al. Preparation and evaluation of nattokinase-loaded self-double-emulsifying drug delivery system [J]. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015,10(5):386-395.

[55] Garg R, Thorat B N. Nattokinase purification by three phase partitioning and impact of t-butanol on freeze drying [J]. Separation and Purification Technology,2014,131:19-26.

[56] Kapoor R, Pathak S, Najmi A A K, et al. Processing of soy functional food using high pressure homogenization for improved nutritional and therapeutic benefits [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies,2014,26:490-497.

[57] Wei X, Luo M, Liu H. Preparation of the antithrombotic and antimicrobial coating through layer-by-layer self-assembly of nattokinase-nanosilver complex and polyethylenimine [J]. Colloids and Surfaces B:Biointerfaces,2014,116:418-423.

[58] 刘芳. 提高国民营养健康水平建设健康中国-《国民营养计划(2017-2030)》发布 [J]. 中国食品,2017(15):10-17. (Liu F. Improving national nutrition and health level to build a healthy China- 'National nutrition plan(2017-2030)' released [J]. China food, 2017(15):10-17. )