



纳豆激酶微生物生产研究进展

高梦迪,苏钱域,李 杰,樊学晶,王朝阳,邓立高,李坚斌

(广西大学 轻工与食品工程学院,广西 南宁 530000)

摘 要:纳豆激酶是一种纤维蛋白降解酶,最初从纳豆芽孢杆菌发酵的蒸煮大豆中分离提取。与现有的纤溶酶相比,纳豆激酶因显示出溶纤活性强、效率高和无副作用的优点而备受关注,但其用量大、产量低、成本高的特点阻碍了其广泛应用,提高纳豆激酶产量和活性一直是推进纳豆激酶发展的重点。本文介绍纳豆激酶高产菌株的来源、常用筛选方法和高产菌株诱变方法,综述了微生物发酵纳豆激酶发酵条件优化、低成本培养原料替代及基因工程等相关研究进展,旨在为高产纳豆激酶的研究提供思路,为纳豆激酶大规模推广应用奠定基础。

关键词:纳豆激酶;菌株筛选;菌株诱变;发酵优化;生产原料;基因工程

Research Progress of Nattokinase Microbial Production

GAO Meng-di, SU Qian-yu, LI Jie, FAN Xue-jing, WANG Zhao-yang, DENG Li-gao, LI Jian-bin

(College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530000, China)

Abstract: Nattokinase is a fibrin degrading enzyme, which was originally isolated and extracted from boiled soybeans fermented by *Bacillus natto*. Compared with the existing fibrinolytic enzymes, nattokinase has attracted much attention because of its strong fibrinolytic activity, high efficiency and no side effects. However, the wide application is hindered by the characteristics of large demand, low output and high cost of nattokinase. Improving the production and activity of nattokinase has always been the focus of promoting the development of nattokinase. This paper introduced the sources, commonly used screening methods and high-yield strain mutagenesis methods of nattokinase, and reviewed the research progress of microbial fermentation nattokinase fermentation conditions optimization, low-cost culture raw material substitution and genetic engineering, aiming to provide ideas for the research of high-yield nattokinase and lay the foundation for the large-scale promotion and application of nattokinase.

Keywords: nattokinase; strain screening; strain mutagenesis; fermentation optimization; raw materials; genetic engineering

纳豆激酶是一种纤维蛋白降解酶,最早是从纳豆中分离提纯获得。纳豆是由纳豆芽孢杆菌发酵被蒸煮大豆而制成的一种豆制品,营养物质十分丰富,具有降血压、降血糖、调节肠道、溶解血栓等多种生物活性^[1]。纳豆激酶属于枯草杆菌蛋白酶家族,分子量大约为 28 kDa,由 275 个氨基酸残基所构成,其成熟肽的氨基酸序列与其他枯草杆菌蛋白酶序列高度同源。纳豆激酶等电点为 8.6 ± 0.3 ,最适温度和 pH 分别为 50 ℃ 和 8.0,在低温中可以保持较高的稳定性,在温度超过 60 ℃ 的环境中会迅速失活^[2]。

纳豆激酶拥有水解纤维蛋白原的活性成分,能够降解血栓^[3-4]。近年来与血栓相关的脑梗死、中风和心肌梗死等疾病严重威胁人类健康^[5],血栓的主要成因是纤维蛋白和血小板形成血凝块,预防和治疗心血管疾病的关键在于降解血凝块^[6]。临床中用于溶解血栓的药物及物质逐渐增多,包括尿激酶、链激酶等。与这些纤溶酶相比,纳豆激酶溶栓

机制较多,能够通过 4 种直接或间接调节机制溶解血栓:直接分解纤维蛋白分子,将其分解为小分子肽和氨基酸;通过刺激血管内皮细胞使其分泌组织型纤维蛋白溶酶原激活物(t-ap);激活尿激酶原激酶转化为尿激酶;使纤维蛋白溶酶原激活物抑制剂(pai-1)降解和失活,达到纤维蛋白水解的目的。纳豆激酶对溶栓的预防及治疗作用十分显著。此外,相较于其他纤溶酶,纳豆激酶无过敏反应及副作用,成本较低,半衰期更长,更容易被人体吸收,且对人体作用持续时间较长^[7]。纳豆激酶以其食物来源和较强的纤溶活性为基础,作为一种功能性食品添加剂,具有食品安全、成本低和效果持久的优点,将纳豆激酶添加在食品中,通过食用可降低人体中血液和血浆的粘度,达到预防和治疗血栓性疾病的目的。

各种临床和流行病学证据都支持纳豆激酶的抗炎作用,从膳食中摄取的纳豆可有效减低慢性炎症疾病(包括关节炎、糖尿病、慢性阻塞性肺病等)

收稿日期:2022-06-16

基金项目:国家自然科学基金(20864001,31160326);广西研究生教育创新计划项目(YCBZ2020018);广西自然科学基金(2022GXNSFAA035578)。

第一作者:高梦迪(1997—),女,硕士研究生,主要从事微生物学研究。E-mail:13592685885@163.com。

通讯作者:邓立高(1974—),男,硕士,高级工程师,主要从事制糖工程研究。E-mail:Ligao208@163.com。

的流行率及严重程度^[8]。大量研究表明纳豆激酶在改善肥胖相关的氧化应激方面具有有益作用,纳豆激酶可显著恢复肝脏抗氧化酶活性,防止肝脏组织中的脂质过氧化和炎症细胞的浸润,并减少肝脏和肾脏组织中的脂质积累^[9]。纳豆激酶也被认为是抑制血管损伤后内膜增厚的膳食补充剂,一些研究集中于纳豆激酶对增生性玻璃体视网膜疾病的治疗作用^[10]。Kou 等^[11]利用聚唾液酸(PSA)修饰纳豆激酶表面结构产生的复合物NK-PSA和DOX-SAL组合,抗肿瘤疗效分析表明,NK-PSA使抗肿瘤活性增强,这种结合有望成为抗击血栓性肿瘤的有效策略。

因此,纳豆激酶作为微生物酶在临床、制药和食品研发中具有广泛应用潜力^[12],但纳豆激酶生产成本高、产量低、研究起步较晚,并且国民对纳豆激酶的认知度较低,阻碍了纳豆激酶的大规模生产和应用。本文综述了近年通过微生物发酵提高纳豆激酶产量的研究进展,包括从自然界中筛选野生高产菌株,通过物理化学及复合诱变方法提高菌株产酶量、优化发酵培养基及培养环境,利用价格低廉的碳源或者氮源合成培养基及基因工程等方法的应用等方面内容,旨在为纳豆激酶大规模生产提供思路,为纳豆激酶在各领域被开发利用奠定基础,从而提升纳豆激酶被生活化应用的可能性。

1 纳豆激酶生产菌株筛选

1.1 产纳豆激酶菌株

纳豆激酶生产菌株主要从发酵食物中获得,例如中国的传统发酵食品大豆酱豆豉、韩国的发酵食品 Chungkook-Jang、发酵豆浆和牛乳等^[13]。从这些发酵食品中所获得的假单胞菌、海洋生物和芽孢杆菌属被认为是有效的纳豆激酶生产者,其中枯草芽孢杆菌是公认的相对安全的益生菌,通常用作纳豆发酵的发酵菌株。Zhang 等^[14]将从纳豆中分离的菌株(*B. subtilis* JNFE0126)作为生产菌株,其在液体发酵培养中的溶栓活性为 $3\,511\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。姚明静等^[15]从传统的韩国发酵豆浆中分离得到 *B. subtilis* WRL101 和 *B. sp.* DJ-4,将其鉴定为具有强纤溶活性的海洋细菌 *Serratia rubidaea* KUAS001,对其深层发酵强化产酶的工艺参数进行优化,使纤维蛋白溶解酶活性提高至 $394.9\text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[16]。巩涛等^[17]从 4 种不同风味不同产地的纳豆和豆豉食品中分离得到 26 株菌株,筛选得到 2 株纳豆激酶高产菌株。

由于不同研究人员所使用的纳豆激酶活性测定方法不同,导致纳豆激酶活性定义单位不一致,

如 $\text{FU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $\text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $\text{FU}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ 等,因此较难对这些产酶菌株生产纳豆激酶的能力进行比较。此外,从环境中分离得到的野生菌株发酵产生的纳豆激酶的活性较低,生产能力有限。这些因素都制约高效纳豆激酶菌株的大规模应用。

1.2 高产菌株筛选

研究中一般采用诱变技术和抗生素处理菌样,通过初筛、复筛和验证等步骤获得纳豆激酶高产菌株。初筛一般在固体培养基平板上进行,筛选蛋白酶活性较高的菌样,常用的方法包括酪蛋白法、脱脂蛋白平板法等。复筛一般将初筛获得的菌样在固体或者液体培养基中培养,进一步筛选纳豆激酶活性较高的菌株等。纳豆激酶活性的测定方法包括酶联免疫吸附法^[18]、四肽底物法^[19]、纤维蛋白平板法^[20]、紫外分光光度法^[21]和 Folin-酚法^[22]等。酶联免疫吸附法和四肽底物法是较早用于纳豆激酶活性测定的方法,但由于操作复杂、成本高、准确性不高等原因,近年来的研究中几乎不再使用。目前研究使用较多的酶活测定方法为纤维蛋白平板法和紫外分光光度法。

1.2.1 酪蛋白法初筛 酪蛋白法一般应用于纳豆激酶高产菌株的初筛^[23],将菌株进行活化、液培、离心、水浴加热、梯度稀释等一系列处理后,用玻璃棒均匀涂布在酪蛋白培养基上,再置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中约 24 h,估算透明圈与菌落直径的差值,挑选差值最大的菌种并在固体 LB 培养基中进行分离纯化,将纯种菌株放入装有甘油的试管中并在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

酪蛋白法在筛选产纳豆激酶菌株过程中能够选择过滤大部分非蛋白酶菌株,还需要通过复筛获得具有较高纤溶活性的菌株。王晓云等^[24]将诱变后的枯草芽孢杆菌 BC2 的菌悬液均匀涂布于含酪蛋白的平板上,挑选出透明圈与菌落直径差值最大的菌株,经多次重复试验获得突变菌株 B38。钱泽栋等^[25]酪蛋白平板法进行初筛,从日本北海道生产的纳豆食品中筛选到 5 株产纳豆激酶的菌株。薛莹莹等^[26]通过酪蛋白平板法联合抗生素抗性筛选法,从诱变菌株中获得高产纳豆激酶的突变菌株。高宏等^[27]利用酪蛋白初筛培养基筛选诱变菌株,获得了高产菌株 *B. subtilis* XZI125。

1.2.2 纤维蛋白平板法复筛 纤维蛋白法一般应用于纳豆激酶高产菌株复筛^[28],用接种环或牙签挑取在酪蛋白培养基中挑选出的纯化菌株,点种在纤维蛋白平板上,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养,估算透明圈与菌落直径差值,分离纯化差值最大的菌株,放置在装有甘油的试管中并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。钱

泽栋等^[25]利用纤维蛋白法复筛获得1株高产纳豆激酶的菌株。

1.2.3 纤维蛋白平板法测定酶活 纤维蛋白平板法测定酶活主要是以尿激酶活性测定方法为基础,并根据纳豆激酶的特征加以改进而建立的酶活测定方法^[20],利用纤维蛋白平板和尿激酶绘制标准曲线,以标准曲线为参考计算纳豆激酶活性。王玉雪等^[29]将挑选出的菌株进行发酵,离心获得上清液并加入打孔的纤维蛋白平板中培养,测量透明圈直径并与尿激酶标准曲线对比得到发酵液的实际酶活。李宝库^[30]采用纤维蛋白原平板法进行复筛,进一步确定产纤溶酶菌株发酵产酶活性高低,并确定目的菌株 HF1、HF3。薛健等^[31]利用纤维蛋白平板法测定初筛菌株的纳豆激酶活性,最终筛选出高产纳豆激酶的菌株。张杰等^[32]利用超声波和紫外线诱变处理菌株,再利用纤维蛋白平板法测定突变菌株的酶活,选育出优势菌株 BSCZ-4。宋文超^[22]对纳豆芽孢杆菌 BSN-3 菌体进行紫外诱变,采用脱脂牛奶平板法初筛,采用 Folin-酚法测定酶活进行复筛,然后采用纤维蛋白平板法进一步筛选出1株高产稳定的产纳豆激酶菌株 A10-5。

纤维蛋白平板法虽操作简单、反应直观,但纤维蛋白原、凝血酶及尿激酶较贵,使得测定成本较高,而且纤维蛋白平板上的透明圈测定具有主观性,反应时间、温度以及批次等存在误差,因此纳豆激酶活性测定结果存在准确性低、重复性较差等缺点。

1.2.4 紫外分光光度法测定酶活 紫外分光光度法是根据样液 275 nm 处的吸光度计算纳豆激酶酶活的方法^[21]。高泽鑫^[33]将筛选出的15株高产纳豆激酶菌株再通过紫外分光光度法进行精确测定,获得各菌株产生的纳豆激酶酶活。王昶^[34]通过利用紫外分光光度法,测定菌株发酵的产酶活性作为指标,诱变育种获得纤溶酶高产菌株,以及突变菌株的最佳发酵条件。

利用紫外分光光度法测定纳豆激酶酶活所得数据较稳定、操作简单且重复性强,但目前在测定过程中所使用的纤维蛋白原和凝血酶价位较高,导致利用紫外分光光度法测定纳豆激酶活性的成本偏高。

2 菌株诱变技术

2.1 物理诱变

2.1.1 紫外诱变 传统诱变技术是大多数微生物育种方法中提高菌株性能的重要途径。紫外线辐射是一种重要的物理诱变方法,是筛选优良芽孢杆

菌菌株的有效手段。其作用机理是紫外线辐射能量使菌株 DNA 分子嘧啶之间形成二聚体,导致碱基配对异常、细胞发生突变或死亡^[35]。

Ethiraj 等^[36-37]研究表明,紫外线辐射 40 s 使突变菌株的酶活性相比于野生型菌株($2\,770\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$)增至 $3\,234.9\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。王晓云等^[24]对枯草芽孢杆菌 BC2 进行6次紫外线诱变,筛选出蛋白酶活高达 $86.82\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的突变菌株,酶活是初始菌株 BC2 的 3.14 倍。钱泽栋等^[25]将原始菌株 XD2 制成菌悬液,放置在紫外灯下辐照诱变 150 s,突变菌株致死率达到 84.09%,筛选出发酵后纳豆激酶活性较高且稳定性较强的菌株,酶活性最高达 $1\,137.15\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,比未诱变的菌株发酵后的酶活性提高了 15%。紫外线辐照诱变菌株能够在一定程度上提高纳豆激酶活性,但紫外诱变需要防止光复活现象,操作过程需要避光。

2.1.2 等离子体诱变 等离子体诱变技术在近年来的工业微生物育种领域发挥着重要的作用,诱变过程在常温常压下进行,等离子体中的活性粒子使细胞中的多个双链 DNA 位点发生改变,导致菌株基因序列改变^[38-39]。薛莹莹等^[26]采用纤维蛋白平板法判定纳豆激酶活力,采用常压室温等离子体诱变系统(ARTP)对枯草芽孢杆菌 XZ1125 进行诱变,联合抗生素进行筛选,得到3株产纳豆激酶活性相对较高的菌株 A27、Ar41 和 Ac35,发酵后的纳豆激酶活性分别比未诱变菌株($2\,490\text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$)提高了 23.0%、25.1% 和 26.5%。等离子体诱变在正常环境中即可进行,操作比较简单,具有高度的可操作性,相比于紫外线和化学诱变,引起的 DNA 损伤程度更高^[40]。

2.1.3 离子束注入诱变 离子束生物技术是近年来发展起来的新兴技术,离子注入诱变已成功应用于作物和微生物育种^[41]。当低能离子束注入机体后,生物体内的能量会沉淀下来,染色体会易位、重复、缺失及倒置,导致突变,生物体内的物质也会沉淀下来,某些 DNA 分子被其他物质取代或补充,阻碍修复。高宏等^[27]用离子束诱变枯草芽孢杆菌 XZ3,筛选出的菌株发酵产生的纤溶酶活性提高 160%,达到 $1\,230.45\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2 化学诱变

化学诱变是常用的诱变手段,是通过利用化学诱变剂自身分子结构的不稳定性对生物体进行诱变。在化学诱变中常用的诱变剂是烷基化剂,烷化剂的种类比较多,常见的有亚硝基胍、硫酸二乙酯等,这类诱变剂主要影响 DNA 复制过程,使碱基产生错配、缺失或者移码等^[42]。臧学丽^[43]使用亚硝

基胍对产纳豆激酶枯草芽孢杆菌进行诱变,诱变后的菌株产酶活性达到 $4\ 100\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$,发酵产酶量提高 122.2%。牛春华等^[44]采用亚硝基胍(NTG)和硫酸二乙酯(DES)诱变枯草芽孢杆菌 JAASB,获得 7 株蛋白酶分泌能力提高且遗传稳定性较好的菌株。虽然化学诱变剂的毒性较小,但诱变剂产生的正突变率低^[45]。

2.3 复合诱变

复合诱变也是诱变菌株常用的手段,紫外诱变、等离子体诱变常与其他物理或化学诱变复合使用^[39]。复合诱变通过复合理化因素诱发突变的效果优于单因素诱变。王玉雪等^[29]对 JNFE1126 菌株进行紫外线和⁶⁰Co- γ 射线联合诱变,筛选出纳豆激酶细胞产量显著提高的突变菌株,并检验了其第 5 代和第 10 代摇瓶发酵的遗传稳定性。卞承荫等^[46]利用紫外诱变与甲基磺酸乙酯(EMS)复合诱变方法对豆豉中挑选出的枯草芽孢杆菌菌株进行诱变,诱变菌株发酵后纳豆激酶酶活力达到 $16\ 351\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。杨子琼等^[47]采用甲基磺酸乙酯和紫外复合诱变的方法对芽孢杆菌 XD2 进行诱变筛选,获得一株纳豆激酶高产稳产菌株 YC4。复合诱变通常是通过物理诱变与化学诱变复合或者利用某种单一诱变方式多次作用于野生菌株,与单一诱变相比,复合诱变所产生的突变频率较高。

此外,利用一种方法进行多次诱变也往往可以产生更好的诱变效果。

3 发酵条件优化

3.1 培养基优化

纳豆杆菌发酵纳豆激酶培养基组分通常由碳源、氮源、金属离子、无机盐等组成,利用响应面以及正交试验方法优化发酵培养基是提高发酵产物性能最基础的手段。Deepak 等^[48]通过使用响应面法优化培养基中葡萄糖、蛋白胍、氯化钙和硫酸镁含量,使纳豆激酶活性增加到 $3\ 194.25\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。田莉等^[49]采用单因素试验和响应面方法优化得出液体培养基的最佳配比,蛋白胍 $26.05\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、葡萄糖 $29.29\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4\ 1.5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{CaCl}_2\ 0.74\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{NaCl}\ 10\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、接种量 3%,pH9.0,使纳豆激酶活性高达 $2\ 186.17\ \text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$,比优化前提高了 269%。庞远祥等^[50]从自然发酵作用大酱中筛选获得 1 株高产纳豆激酶菌种 SH21,同时使用响应面优选方法优化发酵条件,pH6.0、接种量 3%、发酵温度 $38\ ^\circ\text{C}$ 。纳豆激酶活力值从最初的 $166.99\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 上升到 $204.52\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。培养基优化过程操作比较简单,并能使纳豆激酶产量明显提高。

3.2 培养环境优化

除了合适的培养基外,产品的形成环境条件也是发酵成功的条件之一。纳豆激酶发酵环境一般包括 4 个因素:发酵温度、发酵时间、发酵初始 pH 和菌种密度(即接种量)^[51],此外,振荡速度、发酵培养基装瓶量^[52-53]、网孔粒径、液固比和珠固比^[51,54]等也是环境优化经常考虑的条件。研究表明发酵环境的优化能够明显提高纳豆激酶的产量。满丽莉等^[52]研究了 5 个单因素变量温度、初始 pH 值、接种量、装液量和摇床转速对枯草芽孢杆菌 MX-6 发酵产纳豆激酶活性的影响,并采用响应面法优化发酵条件,发酵温度 $36.69\ ^\circ\text{C}$,初始 pH6.94,接种量 3.03%,装液量 $48.77\ \text{mL}$,振荡速度 $170.05\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,纳豆激酶透明圈直径达到 $20.71\ \text{mm}$,与初始菌株相比增加了 35.54%。

4 发酵培养基原料替代

纳豆激酶的应用前景广泛,需求量较大,目前研究中对于生产包括纳豆激酶在内的纤溶酶的低成本原材料的探索非常有限。Sahoo 等^[55]研究以高营养含量的工业废弃物奶酪乳清代替发酵培养基中的碳源,生产低成本发酵培养基。在枯草芽孢杆菌的生长和纳豆激酶的发酵生产中,在培养基中添加适当的氮源,最终得到成本较低的富含奶酪乳清培养基,与普通培养基相比成本降低了 55%~60%。Wang 等^[56]发酵培养基以虾壳废物为唯一碳/氮源。Pan 等^[57]以海洋枯草芽孢杆菌(*B. subtilis* d21-8)发酵,优化获得了豆粕 $23.2\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、木薯淀粉 $24.1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{CaCl}_2\ 1.6\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的低成本培养基。Anusree 等^[58]优化了发酵过程中工艺参数和营养来源的浓度,如麦芽糖(1.5% W:V)、酵母提取物(1.5% W:V)、 NaCl (1.5% W:V)和脱脂奶粉(0.15% W:V),使纤维蛋白溶解酶活性增强至 $394.9\ \text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。纳豆激酶生产原料成本降低是纳豆激酶应用研究的重要基础,为纳豆激酶在临床以及生物技术中的应用奠定基础。

5 基因工程技术应用

近年来,分子生物学技术发展迅速,在枯草芽孢杆菌发酵过程中,基因工程技术也常用来改变菌株的基因片段,以获得高产纳豆激酶菌株。韩宇星等^[59]研究表明敲除纳豆杆菌中合成 *g*-PGA 的关键基因 *pgsB* 能够提高纳豆激酶的分离纯化效率。李佳增等^[60]以毕赤酵母 X33 为真核表达宿主,以质粒 *a*-A-NKt 为模板,构建双启动子表达载体,使纳豆激酶蛋白酶的表达量明显提高,酶活性显著提高。赵

菌等^[61]通过改变纳豆激酶表面的氨基酸,使纳豆激酶表面的天冬氨酸、谷氨酰胺两种氨基酸分别突变为天冬氨酸、谷氨酸,提高了纳豆激酶的活性和稳定性。筛选得到的 Q59E 突变菌株的纳豆激酶活性比野生型明显增加。此外,也可通过枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、毕赤酵母等菌株实现纳豆激酶的高效表达,使表达过程和转运成分工程化,以提高纳豆激酶产量。因此,通过基因工程技术改变菌株的遗传信息,提高菌株产纳豆激酶的活性,是比较有效的研究策略。

6 前景与展望

纳豆激酶的应用越来越广泛,利用微生物生产纳豆激酶的主要优点是在使用廉价的培养基上,在较短的时间内获得较高的产率。纳豆激酶具有抗炎、抗血栓、抗肿瘤功能,有望作为功能性的添加剂。目前医药形式主要为肠溶性微胶囊以及压片。

然而,纳豆激酶的应用也具有一定的局限性,其稳定性很容易受温度、pH 值、金属离子、小分子化合物和有机物的影响,提高纳豆激酶的稳定性能够为纳豆激酶的应用提供支持。此外,在从发酵液中提取和纯化纳豆激酶的过程中,回收效率低、纯度低的特点也限制了纳豆激酶的工业化生产,而制药工业不久也将需要超高纯度的纳豆激酶,在未来的研究中,还需要开发下游分离纯化技术,以提高纳豆激酶的纯化率、活性和稳定性。相比于国外技术,我国对于纳豆激酶研究不够成熟、发展较慢的特点一直制约其在日常生活中的广泛应用,而提高纳豆激酶产量能从本质上促进纳豆激酶的深入研究及产业化应用。

参考文献

[1] 杨艳莉, 吴雪玲, 余知和. 纳豆及纳豆芽孢杆菌研究进展 [J]. 中国调味品, 2022, 47(5): 201-205. (YANG Y Y, WU X L, YU Z H. Research progress of natto and *Bacillus natto* [J]. China Condiment, 2022, 47(5): 201-205.)

[2] 赵茜. 纳豆激酶热稳定性及 pH 稳定性的改造研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2018. (ZHAO H. Study on modification of thermal stability and pH stability of nattokinase [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.)

[3] 杨敏. 纳豆激酶粗提液抗血栓降血脂及抗氧化作用的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013. (YANG M. Study on the antithrombotic, hypolipidemic and antioxidative effects of nattokinase crude extract [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013.)

[4] 毛娜娜. 纳豆激酶抗血栓作用机制的实验研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2008. (MAO N N. Experimental study on the antithrombotic mechanism of nattokinase [D]. Suzhou: Suzhou

University, 2008.)

[5] 闫泉香, 冯利, 徐峰, 等. 纳豆激酶的溶栓作用及其机制研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(24): 7. (YAN Q X, FENG L, XU F, et al. Study on the thrombolytic effect of nattokinase and its mechanism [J]. Technology for the Food Industry, 2021, 42(24): 7.)

[6] 张海粟, 王家林, 于江森. 纳豆激酶的研究及展望 [J]. 食品与发酵科技, 2019, 55(4): 5. (ZHANG H S, WANG J L, YU J M. Research and prospect of nattokinase [J]. Food and Fermentation Technology, 2019, 55(4): 5.)

[7] WU H, WANG Y, ZHANG Y P, et al. Breaking the vicious loop between inflammation, oxidative stress and coagulation, a novel anti-thrombus insight of nattokinase by inhibiting LPS-induced inflammation and oxidative stress [J]. Redox Biology, 2020, 32: 101500.

[8] CAO Z H, GREEN-JOHNSON J M, BUCKLEY N D, et al. Bioactivity of soy-based fermented foods: A review [J]. Biotechnology Advances, 2018, 37(1): 223-238.

[9] LEE J Y, ARAVINTHAN A, PARK Y S, et al. Supplementation of a fermented soybean extract reduces body mass and prevents obesity in high fat diet-induced C57BL/6J obese mice [J]. Preventive Nutrition & Food Science, 2016, 21(3): 187-196.

[10] SUZUKI Y, KONDO K, MATSUMOTO Y, et al. Dietary supplementation of fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery [J]. Life Sciences, 2003, 73(10): 1289-1298.

[11] KOU Y, FENG R, CHEN J, et al. Development of a nattokinase-polysialic acid complex for advanced tumor treatment [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 145: 105241.

[12] VACHHER M, SEN A, KAPILA R, et al. Microbial therapeutic enzymes: A promising area of biopharmaceuticals [J]. Current Research in Biotechnology, 2021: 67-68.)

[13] CAI D B, ZHU C J, CHEN S W. Microbial production of nattokinase: Current progress, challenge and prospect [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2017, 33(5): 84.

[14] ZHANG X, TONG Y J, WANG J, et al. Screening of a *Bacillus subtilis* strain producing both nattokinase and milk-clotting enzyme and its application in fermented milk with thrombolytic activity [J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(9): 9437-9449.

[15] 姚明静, 杨杨, 范婧, 等. 纳豆激酶的微生物生产及其生理功能的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 435-444. (YAO M J, YANG Y, FAN J, et al. Research progress on microbial production and physiological functions of nattokinase [J]. Technology for the Food Industry, 2022, 43(14): 435-444.)

[16] ANUSREE M, SWAPNA K, AGUILAR C N, et al. Optimization of process parameters for the enhanced production of fibrinolytic enzyme by a newly isolated marine bacterium [J]. Bioresource Technology Reports, 2020, 11(17): 100436.

[17] 巩涛, 魏传军, 安明理, 等. 1 株纳豆激酶高产菌株的分离·筛选与复合诱变研究 [J]. 安徽农业科学, 2021, 49(15): 159-161, 175. (GONG T, WEI C J, AN M L, et al. Isolation, screening and compound mutagenesis of a nattokinase producing

strain[J]. *Anhui Agricultural Sciences*, 2021, 49(15): 159-161, 175.)

[18] 张劲康, 卢静. 酶联免疫吸附测定技术在食品安全检测中的应用[J]. *中国标准化*, 2009(5): 73-74. (ZHANG S K, LU J. Application of enzyme linked immunosorbent assay in food safety detection [J]. *China Standardization*, 2009(5): 73-74.)

[19] 杨明俊, 杨晓彤, 冯慧琴, 等. 两种纳豆激酶活性测定方法对比及相关性分析[J]. *食品研究与开发*, 2008(2): 5. (YANG M J, YANG X T, FENG H Q, et al. Comparison of two nattokinase activity assays and correlation analysis [J]. *Food Research and Development*, 2008(2): 5.)

[20] 吴锦源, 林咏珊, 高向阳, 等. 不同品种大豆发酵纳豆的功能活性差异及相关性分析[J]. *食品科技*, 2021, 46(12): 173-178. (WU J Y, LIN Y S, GAO X Y, et al. Differences in functional activity and correlation of fermented natto of different varieties of soybean [J]. *Food Technology*, 2021, 46(12): 173-178.)

[21] CHO Y H, SONG J Y, KIM K M, et al. Production of nattokinase by batch and fed-batch culture of *Bacillus subtilis* [J]. *New Biotechnology*, 2010, 27(4): 341-346.

[22] 宋文超. 高产纳豆激酶菌株筛选和纳豆激酶分离纯化及药效学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013. (SONG W C. Screening of high-yield nattokinase producing strains, purification and pharmacodynamics of nattokinase [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013.)

[23] 满丽莉, 向殿军. 枯草芽孢杆菌 MX-6 产纳豆激酶特性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(6): 6. (MAN L L, XIANG D J. Analysis of the characteristics of *Bacillus subtilis* MX-6 nattokinase [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2019, 45(6): 6.)

[24] 王晓云, 王慧, 赵燕, 等. 紫外诱变选育高活性蛋白酶枯草芽孢杆菌及其降解饲料能力评价[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(6): 7. (WANG X Y, WANG H, ZHAO Y, et al. Evaluation of highly active protease *Bacillus subtilis* and its ability to degrade feed in ultraviolet mutagenesis [J]. *Chinese Fishery Sciences*, 2016, 23(6): 7.)

[25] 钱泽栋. 纳豆激酶高产菌诱变选育及发酵工艺优化[D]. 武汉: 武汉工程大学, 2018. (QIAN Z D. Nattokinase high-yielding bacteria mutagenesis breeding and fermentation process optimization[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2018.)

[26] 薛莹莹, 林福兴, 别小妹, 等. ARTP 诱变联合抗生素抗性选育纳豆激酶高产菌株[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(23): 5. (XUE Y Y, LIN F X, BIE X M, et al. ARTP mutagenesis combined with antibiotic resistance to breed high-yielding nattokinase strains[J]. *Technology for the Food Industry*, 2019, 40(23): 5.)

[27] 高宏. 枯草芽孢杆菌纤溶酶高产菌株选育、发酵条件优化及其分离纯化[D]. 南京: 南京农业大学, 2006. (GAO H. *Bacillus subtilis* plasmin high-yield strain selection, fermentation conditions optimization and separation and purification [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2006.)

[28] 薛莹莹. 纳豆激酶高产菌株的选育及其分离纯化的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2019. (XUE Y Y. Study on the selection and purification of nattokinase high-yield strains [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019.)

[29] WANG Y X, WANG J, ZHANG X, et al. Genomic and transcriptomic analysis of *Bacillus subtilis* JNFE1126 with higher nattokinase production through ultraviolet combined 60 Co- γ ray mutagenesis [J]. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 2021, 147: 11652.

[30] 李宝库. 高活性纤溶酶产生菌的筛选及发酵条件优化研究[D]. 保定: 河北大学, 2005. (LI B K. Screening of high activity plasmin producing bacteria and optimization of fermentation conditions [D]. Baoding: Hebei University, 2005.)

[31] 薛健, 王欢. 纳豆激酶生产菌的紫外诱变选育[J]. *农业与技术*, 2016, 36(21): 4-5, 17. (XUE J, WANG H. Breeding of nattokinase producing strain by UV mutagenesis[J]. *Agriculture and Technology*, 2016, 36(21): 4-5, 17.)

[32] 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. Breeding of nattokinase producing strain and solid state fermentation technology[J]. *Food Science*, 2016, 37(3): 151-156.)

[33] 高泽鑫. 高产纳豆激酶菌株的筛选及其酶学稳定性的研究[D]. 贵州: 贵州大学, 2018. (GAO Z X. Screening of high nattokinase producing strain and study on its enzymatic stability [D]. Guizhou: Guizhou University, 2018.)

[34] 王昶. 豆豉纤溶酶高产菌株 XY-1 的诱变育种及产酶条件研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013. (WANG C. Study on mutation breeding and enzyme producing conditions of high fibrinolytic enzyme producing strain XY-1 in Douchi [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2013.)

[35] 谢定刚, 丛丽娜, 李若凡, 等. 原生质体紫外诱变选育高产抗菌肽菌株及其活性物质的研究[J]. *工业微生物*, 2020, 50(1): 7. (XIE D G, CONG L N, LI R F, et al. Study on the selection and breeding of high-yield antimicrobial lipopeptide strains and their active substances by protoplast ultraviolet mutagenesis[J]. *Industrial Microorganisms*, 2020, 50(1): 7.)

[36] ETHIRAJ S, GOPINATH S, RAVI V, et al. Enhancement of serrapeptase hyper producing mutant by combined chemical and UV mutagenesis and its potential for fibrinolytic activity [J]. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2020, 14(2): 1295-1303.

[37] KARAKUS B Z, KORKMAZ I, DEMIRCI K. A combined treatment using ethylmethane sulfonate and ultraviolet light to compare amylase production by three *Bacillus* sp. isolates[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2018, 48(9): 815-822.

[38] MA Y, YANG H, CHEN X, et al. Significantly improving the yield of recombinant proteins in *Bacillus subtilis* by a novel powerful mutagenesis tool (ARTP): Alkaline α -amylase as a case study [J]. *Protein Expression and Purification*, 2015, 114: 82-88.

[39] 耿海波, 郑辉, 张丽媛, 等. 常压室温等离子体诱变选育耐酸酿酒酵母菌株[J]. *中国酿造*, 2022, 41(2): 144-148. (GENG H B, ZHENG H, ZHANG L Y, et al. Breeding of acid tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis[J]. *Chinese Brewing*, 2022, 41(2): 144-148.)

[40] ZHANG C, QIN J F, DAI Y W, et al. Atmospheric and room

- temperature plasma (ARTP) mutagenesis enables xylitol overproduction with yeast *Candida tropicalis* [J]. Journal of Biotechnology, 2019, 296: 7-13.
- [41] KHANEGHAH A M, MOOSAVI M H, OLIVEIRA C, et al. Electron beam irradiation to reduce the mycotoxin and microbial contaminations of cereal-based products: An overview [J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 143: 111557.
- [42] 李娟宁, 吕英, 赵桂琴, 等. 化学诱变剂 EMS 和 MNU 对燕麦种子萌发和幼苗生长的影响 [J]. 草原与草坪, 2021, 41(3): 11. (LI J N, LYU Y, ZHAO G Q, et al. Effects of chemical mutagens EMS and MNU on oat seed germination and seedling growth [J]. Prairie and Lawn, 2021, 41(3): 11.)
- [43] 臧学丽. 纳豆激酶生产菌的亚硝基胍诱变 [J]. 中国农业信息, 2016(20): 134. (ZANG X L. Mutagenesis of nattokinase producing strain by nitrosoguanidine [J]. China Agricultural Information, 2016(20): 134.)
- [44] 牛春华, 迟燕平, 高岩, 等. 高产蛋白酶枯草芽孢杆菌 JAASB 的多种诱变选育 [J]. 食品工业, 2013, 34(5): 159-163. (NIU C H, CHI Y P, GAO Y, et al. Multiple mutagenesis breeding of high protease protease *Bacillus subtilis* JAASB [J]. Food Industry, 2013, 34(5): 159-163.)
- [45] 李雪平, 金珂, 张向军. 化学诱变剂诱变植物的研究进展 [J]. 现代农业, 2019(2): 2. (LI X P, JIN K, ZHANG X J. Research progress on chemical mutagens mutagen plants [J]. Modern Agriculture, 2019(2): 2.)
- [46] 卞承荫, 黄舒婷, 潘大仁, 等. 利用紫外线和 EMS 诱变选育高产枯草芽孢杆菌 [J]. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2014, 43(3): 312-315. (BIAN C Y, HUANG S T, PAN D R, et al. High-yielding *Bacillus subtilis* was selected and bred using ultraviolet and EMS mutagenesis [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2014, 43(3): 312-315.)
- [47] 杨子琼, 李迪文, 赵小斌, 等. 纳豆激酶高产菌株的复合诱变选育 [J]. 武汉工程大学学报, 2022, 44(1): 5. (YANG Z Q, LI D W, ZHAO X B, et al. Compound mutagenesis of high-yielding nattokinase strains [J]. Journal of Wuhan Polytechnic University, 2022, 44(1): 5.)
- [48] DEEPAK V, KALISHWARALAL K, RAMKUMARPANDIAN S, et al. Optimization of media composition for nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(17): 8170-8174.
- [49] 田莉, 卢轶男, 朱建, 等. 产纳豆激酶的枯草芽孢杆菌基因工程菌发酵条件的响应面优化 [J]. 武汉工程大学学报, 2018, 40(6): 8. (TIAN L, LU Y N, ZHU J, et al. Optimization of the response surface of nattokinase-producing *Bacillus subtilis* gene-engineered bacteria under fermentation conditions [J]. Journal of Wuhan Polytechnic University, 2018, 40(6): 8.)
- [50] 庞远祥, 谢远红, 金君华, 等. 低嘌呤、高纳豆激酶活性枯草芽孢杆菌 SH21 筛选及发酵条件优化 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(11): 6. (PANG Y X, XIE Y H, JIN J H, et al. Screening and optimization of fermentation conditions for low purine and high nattokinase activity *Bacillus subtilis* SH21 [J]. Food and Fermentation Industry, 2021, 47(11): 6.)
- [51] NGUYEN T, CONG H N. Determination of factors affecting the protease content generated in fermented soybean by *Bacillus subtilis* 1423 [J]. Energy Reports, 2020, 6(S1): 831-836.
- [52] 满丽莉, 向殿军. 响应面法优化枯草芽孢杆菌 MX-6 产纳豆激酶发酵条件 [J]. 食品研究与开发, 2019, 40(21): 6. (MAN L L, XIANG D J. The response surface method optimizes the fermentation conditions of *Bacillus subtilis* MX-6 nattokinase-producing [J]. Food Research and Development, 2019, 40(21): 6.)
- [53] 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-producing [J]. Technology for the Food Industry, 2022, 43(7): 163-169.)
- [54] NA G, SONG X R, PING K, et al. Optimization of fermentation parameters with magnetically immobilized *Bacillus natto* on ginkgo seeds and evaluation of bioactivity and safety [J]. LWT, 2018, 97: 172-179.
- [55] SAHOO A, MAHANTY B, DAVEREY A, et al. Nattokinase production from *Bacillus subtilis* using cheese whey: Effect of nitrogen supplementation and dynamic modelling [J]. Journal of Water Process Engineering, 2020, 38: 101533.
- [56] WANG S L, CHEN H J, LIANG T W, et al. A novel nattokinase produced by *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as substrate [J]. Process Biochemistry, 2009, 44(1): 70-76.
- [57] PAN S H, CHEN G G, ZENG J J, et al. Fibrinolytic enzyme production from low-cost substrates by marine *Bacillus subtilis*: Process optimization and kinetic modeling [J]. Biochemical Engineering Journal, 2019, 141: 268-277.
- [58] ANUSREE M, SWAPNA K, AGUILAR C N, et al. Optimization of process parameters for the enhanced production of fibrinolytic enzyme by a newly isolated marine bacterium [J]. Bioresource Technology Reports, 2020, 11(17): 100436.
- [59] 韩宇星, 孟凡强, 周立邦, 等. 通过敲除聚谷氨酸合成基因提高纳豆杆菌纳豆激酶的生产效率 [J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(2): 224-230. (HAN Y X, MENG F Q, ZHOU L B, et al. The production efficiency of natto bacillus nattokinase was improved by knocking out polyglutamic acid synthesis genes [J]. Food and Fermentation Industry, 2022, 48(2): 224-230.)
- [60] 李佳增. 纳豆激酶毕赤酵母 X33 高效表达双启动子系统构建及发酵条件优化 [D]. 沈阳: 辽宁大学, 2021. (LI J Z. Construction of a highly efficient expression bifoton system for nattokinase Pichia X33 and optimization of fermentation conditions [D]. Shenyang: Liaoning University, 2021.)
- [61] 赵茜, 周丽, 周哲敏. 通过定点突变提高纳豆激酶的酶活及热稳定性 [J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(9): 36-40, 47. (ZHAO H, ZHOU L, ZHOU Z M. The enzymatic activity and thermal stability of nattokinase are improved by site-directed mutations [J]. Food and Fermentation Industry, 2018, 44(9): 36-40, 47.)