文章编号:1674-2869(2024)05-0527-07

纳豆激酶研究进展

屈家亮[1],柳惠平[2],张佑红[*1]
1. 武汉工程大学环境生态与生物工程学院,湖北 武汉 430205;
2. 武汉工程大学光信息与能源学院和数理学院,湖北 武汉 430205

摘 要:纳豆激酶(NK)主要是由枯草芽孢杆菌代谢产生的一种碱性丝氨酸蛋白酶,具有很好的溶栓效应,有望成为新一代溶栓药物。首先从NK的基因组成及信号肽、前导肽和成熟肽的结构和功能等方面阐述了对NK的分子生物学研究。其次从酶的温度、pH、离子影响和最适底物类型等酶学性质对NK的特性进行了总结。再者对NK的三级结构及催化位点进行了分析,以位于活性中心的催化三联体(Asp32,His64,Ser221)为例探讨了NK与底物结合及催化的机制。再根据已有的文献报道,从NK的菌种改造、分离纯化及NK不同方式制备的剂型等方面介绍了国内外目前的研究现状。最后,在菌种改造和分离纯化等研究方向上对NK的未来研究进行了分析和展望,如可以使用基因编辑技术对菌种的代谢通路进行改造,达到提高产量的目的;采用分子印迹技术纯化NK。

关键词:纳豆激酶;溶栓;理化特性;进展
中图分类号:TS201 **文献标识码**:A **DOI**:10.19843/j.cnki.CN42-1779/TQ.202402008

Review on nattokinase research

***QU Jialiang*[1],*LIU Huiping*[2],*ZHANG Youhong*[*1]**
1. School of Environmental Ecology and Biological Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China;
2. School of Optical Information and Energy Engineering, School of Mathematics and Physics, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China

Abstract: Nattokinase is a type of alkaline serine protease primarily produced by the metabolism of Bacillus subtilis. It exhibits excellent thrombolytic effects and holds promise as a new generation of thrombolytic drugs. We start by explaining the molecular biology of nattokinase, including its gene composition, signal peptide, leader peptide, and the structure and function of the mature peptide. Then, we summarize the enzymatic properties of nattokinase, such as temperature, pH, ionic effects, and the best substrate type. Moreover, we analyze the tertiary structure and catalytic sites of nattokinase, and take the catalytic triad (Asp32, His64, Ser221) in the active center as an example to study the mechanism of nattokinase-substrate binding and catalysis. In addition, based on the existing literature, we give an overview of the current global research situation of nattokinase, including strain modification, isolation, purification, and formulation of various preparations. Finally, in the context of strain modification, isolation and purification, we make an analysis and prediction of the future research direction of nattokinase. For example, using gene editing techniques to engineer the metabolic pathways of the strain may increase the yield; using molecular imprinting technology for purification of nattokinase has great potential.

Keywords: nattokinase; thrombolysis; physicochemical properties; review

收稿日期:2024-02-27
基金项目:武汉工程大学第十四届研究生教育创新基金(CX2022555)
作者简介:屈家亮,硕士研究生,Email:1015097037@qq.com
***通信作者**:张佑红,博士,教授。 Email:youhong@aliyun.com
引文格式:屈家亮,柳惠平,张佑红.纳豆激酶研究进展[J].武汉工程大学学报,2024,46(5):527-533.

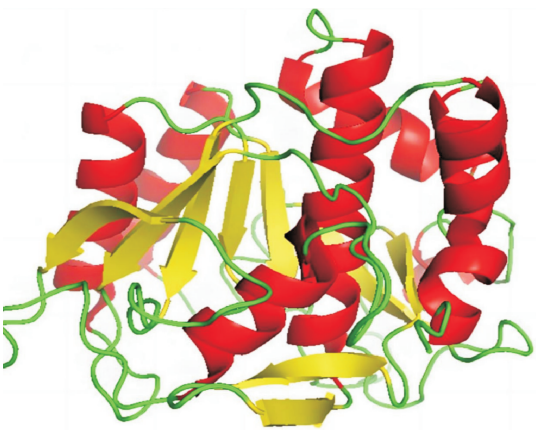
长期来看，心脑血管疾病（cerebrovascular disease，CVD）始终是对人类健康造成严重威胁的关键原因之一，在肿瘤之后排名第二，成为当前发病率较高的疾病。据《中国心脑血管健康与疾病》的数据显示，截至2021年，我国心脑血管疾病现存患者3.3亿[1]。目前用于防治心脑血管疾病的药物很少并且部分药物还存在许多不良反应，很难满足人们对于心脑血管疾病的药物需求。纳豆是一种发酵食品，主要由枯草芽孢杆菌在一定温度条件下发酵黄豆制成。自秦汉以来便开始制作，在我国已有两千多年历史。多项研究数据表明经常摄入纳豆有利于降低心脑血管的发病率，而其中最主要的“功臣”便是纳豆激酶（Nattpkinase，NK）[2]。在20世纪70~80年代，日本科学家须见洋行[3]首先勘破了纳豆溶栓的奥妙，并将这种具有强纤溶酶活性的物质命名为Nattokinase（NK），即纳豆激酶。之后许多国内外学者便对NK进行了大量的研究，NK除了具有溶栓性能外，还能够有效降低血脂、预防动脉粥样硬化[4]、抗高血压[5]、改善视网膜[6]等。NK的高安全性、经济性以及作用的持久性，都为其在近期溶栓领域的研究中赢得了广泛关注和活跃探讨[7]。

1 NK介绍

1.1 NK分子生物学简介

NK是一种碱性丝氨酸蛋白酶，分子量约为27.7 kDa，并且分子结构中不含半胱氨酸及二硫键[8]。NK由aprN基因编码，具有1 146 bp的开放阅读框，以GTG为起始密码子。NK肽链主要由信号肽（pre）、前导肽（pro）、成熟肽（NK）3部分组成[9]，其中信号肽含有29个氨基酸，主要负责引导NK分泌到胞外。前导肽由77个氨基酸组成，是一种分子内伴侣[10]，帮助肽链正确折叠[11]。NK的折叠过程主要分为四步[12]：（1）前导肽自身折叠，形成具有一定空间结构的多肽。（2）前导肽的具有不同保守特性的3个氨基酸残基（Ile11，Ile30，Gly34）与成熟肽的2个氨基酸残基（Trp106，Trp113）发生作用，介导成熟肽正确折叠。（3）正确折叠后的成熟肽水解成熟肽与前导肽间的肽键，促使前导肽脱落。前导肽在脱落后被蛋白水解酶降解。（4）在信号肽的指引下，成熟肽被释放到细胞外，并且伴随着信号肽的水解。成熟肽含有275个氨基酸，是NK主要组成部分，也是能够催化溶解血栓的关键因素。

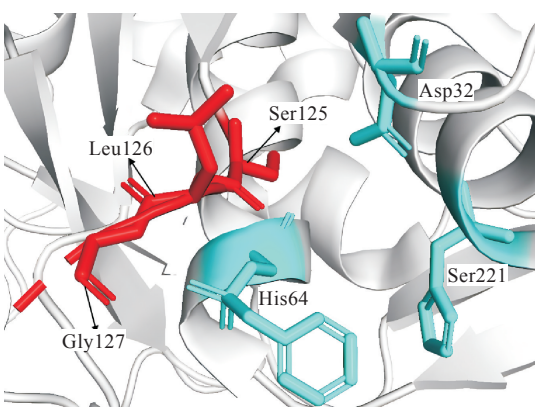
NK的成熟肽呈现为白色或淡黄色的一条单链多肽，在280 nm处有吸收峰[13]。2010年，Yanagisawa等[14]采用凝胶过滤层析法从枯草芽孢杆菌中纯化得到了NK，后用X光衍射，了解了NK的三维结构，如图1所示，NK的成熟肽主要由9个α-螺旋和9个β-折叠反向组装形成，存在两个Ca^{2+}结合位点；7个α-螺旋位于同一表面，2个β-折叠位于C末端结构域中，其余7个β-折叠位于结构域中心。研究表明，NK的活性催化中心由一组特定的催化三联体（Asp32，His64，Ser221）组成，NK与底物的结合的关键位点由3个保守的氨基酸（Ser125，Leu126，Gly127））组成[15]，如图2所示。



注：红色为α-螺旋，黄色为β-折叠。

图1 NK结构图

Fig. 1 Structure of nattokinase



注：红色为结合位点结构，青色为催化位点结构。

图2 NK结合位点及催化位点结构

Fig. 2 Structure of binding site and catalytic site of nattokinase

1.2 NK的理化性质

NK等电点为8.6±0.3，在pH 6~12范围内稳定，当pH低于5时，酶活性迅速下降，其最适pH为7。在温度低于40 ℃时，酶活相对稳定；但当温度超过50 ℃时，活性开始逐渐降低；若温度超过60 ℃时，酶因蛋白质变性而活性严重降低，最适反应温度

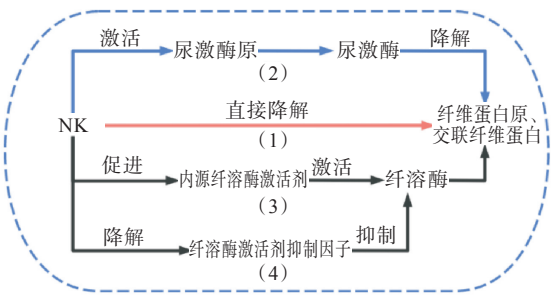
为37 ℃。NK在重复冷冻和解冻过程中几乎不受损，五次冻融循环后的活性仍能维持在95%以上。因此NK应长期保存于低于40 ℃的弱碱性环境中。有研究表明，不同浓度、不同种类的金属离子对NK的活性会产生影响，如Mg^{2+}、Ca^{2+}、Na^{+}能够明显增强酶的活性；反之，Fe^{2+}、Zn^{2+}、Cu^{2+}、Ba^{2+}、Al^{3+}、Mn^{2+}对NK的活性有不同的抑制作用[16]；另外，K^{+}在低浓度时不会明显影响NK的活性，但高浓度则会抑制其活性[17]。

NK也同其他酶一样，具有底物特异性。Sumi等[18]通过比较NK对纤溶酶底物、尿激酶底物、弹性蛋白酶底物、凝血酶底物、激肽释放酶底物等水解活性，发现了NK的最适底物为纤溶酶底物（H-D-Val-Lys-PNA）。对凝血酶底物和激肽释放酶底物也有一定活性，而对尿激酶底物和弹性蛋白酶底物则无明显活性。以氧化型胰岛素B链为作用底物，研究NK的酶切特性，发现其有严格的识别位点及限制性酶切位点，首选酶切位点Leu15-Tyr16，其次在Ser9-His10，在Gln4-His5及His5-Leu6亦有微弱的水解活性[19-20]，这表明NK有特异的水解蛋白的氨基酸作用和识别位点。

2.3　NK的催化及溶栓机理

目前，位于NK催化位点的催化三联体的作用机理尚不完全清晰，但是NK属于枯草芽孢杆菌蛋白酶的一种，其结构与枯草芽孢杆菌蛋白酶的三维结构相似，推测NK的催化机制与枯草芽孢杆菌蛋白酶的催化机制相似。催化机制主要包括[21-22]：（1）底物与NK的活性中心的结合位点相结合，使得NK的构象发生微调；催化三联体的His64残基的环氮原子接收Ser221的羟基质子，增强了Ser221的亲核能力，并攻击底物肽键的羟基碳，形成了带有四面体结构的过渡态中间产物；（2）Asp32的羧基带负电荷进而稳固His64的质子化状态；（3）His64将质子转移给新生成的氨基，通过酰化反应生成并释放第一种产物，同时产生了酰基酶的共价复合物；（4）水分子攻击共价酰基酶复合物形成另一种四面体的中间体，同时，His64将质子转移回Ser221，导致过渡态分解并释放出第二种产物，由此脱酰化反应完成。

NK除了具备直接溶栓的能力之外，还能起到间接的溶栓作用。其溶解血栓的作用主要涉及4个层面[23]：（1）NK直接与血栓中的交联纤维蛋白结合，使得纤维蛋白溶解，并将其降解为小肽或氨基酸；（2）NK可激活尿激酶原激活剂，从而促使尿激酶原转化为尿激酶，发挥间接溶栓作用[24]；（3）NK可以促进血管内皮分泌组织型纤溶酶原激活剂（t-PA），其作用是激活纤溶蛋白酶，从而起到了溶栓效果[25]；（4）NK可以降解纤溶酶原激活剂抑制因子1（PAI-1），使PAI-1失活，增强t-PA的活性，从而发挥溶栓作用[26-28]，如图3所示。



注：（1）NK直接溶栓途径，（2）NK激活尿激酶溶栓途径，（3）NK促进分泌纤溶酶激活剂的溶栓途径，（4）NK降解抑制因子的溶栓途径。

图3　NK溶栓机制

Fig. 3　Thrombolytic mechanism of NK

2　NK研究近况

2.1　NK菌种改良研究进展

自1987年NK被发现以来，众多国内外学界人士持续不断地对其深入研究，目的是让它成为一种能预防及治疗心脑血管问题的健康食品。由于NK多采用生物发酵方式，故对NK发酵的菌种进行驯化和改良的研究便显得极为重要。

目前，国内外在菌种研究上，多采用诱变和基因工程等改良方式。对于NK菌株的诱变研究，国内取得了突破性进展。例如国内的杨子琼等[29]采用甲基磺酸乙酯和紫外复合诱变实验，将菌株产生的酶活提升了2.42倍。巩涛等[30]通过氯化锂-紫外和亚硝基胍（NTG）进行复合诱变，使得NK酶活相较于野生型也提高了1.93倍。Wang等[31]还采用了60Co-γ射线与紫外的复合诱变的方式，将NK野生菌的酶活提升了2倍以上。

除了诱变方式改良NK菌种外，基因工程、蛋白质工程等手段也是改良菌种的另一种好方式。目前已经对NK在生物合成上的分子生物学研究已经十分透彻，这也使得对NK菌株的基因工程改造更加多样化。在提高酶活工程改造的研究上，Cai等[32]学者运用定向进化的方法，对编码NK成熟肽的DNA家族进行改造，得到了16氨基酸取代的理想工程菌，相较于野生菌酶活提升2.3倍。还有Cai等[33]首次将NK与地衣芽孢杆菌进行了异源重组，同时对vpr信号肽的功能进行了研究，发现了vpr信号肽能够使得NK高效分泌表达。通过

菌株工程改造等手段，不仅提高酶活，还能够改变NK的一部分酶学性质。刘中美等[34]通过定点突变构建的突变体P14L和N76D具有更高的热稳定性。刘朔等[35]对NK的成熟肽基因NKD和NKB进行体外诱变处理，并实现其在毕赤酵母中的表达，经序列比对发现，突变体D36G热稳定性提高了20%，比活力提高了16.6%。

2.2 NK分离纯化研究进展

诱变及基因工程改造技术大大提高了NK的生产，NK的高效分离纯化就变为了下一步的技术挑战。目前市面上常用的分离方法主要包括柱层析、三相分离等方式。凝胶过滤层析由于其操作条件温和，不需使用有机溶剂等优点，常被用作蛋白分离的首选技术。例如王刚等[36]采用凝胶柱层析方式纯化NK，使得纯化倍数提升至19倍，但因葡聚糖凝胶主要是依分子量的不同作为分离依据，分辨率不高，并且对流速的需求十分严格，最终导致了酶活回收率只有42.1%；史延茂等[37]采用CM-52阳离子交换树脂对NK发酵液进行离子交换层析，得到的纯化倍数达到了31.2倍，但是其工序过于复杂，要经过盐析和脱色等步骤处理，这也使得酶活损失了许多，最终得到回收率只有48.51%；李睿等[38]以Phenyl Sepharose作为柱填料对NK进行疏水层析，但蛋白的疏水层析分离并不具备特异性，一些杂蛋白也能够与疏水培基结合，影响了分离效果，使得纯化因子只有17.9，但是其操作工序简洁，仅使用了高浓度的磷酸盐缓冲液，这也使得酶活回收率稍微提升，达到了56.51%。除了柱层析方法之外，三相分离技术（three-phase partitioning，TPP）也是一种很好的蛋白质分离手段[39]，三相分离法是在蛋白质中加入盐和有机溶剂，待静置后形成三相混合物的一种分离手段[40]。Garg等[41]就采用此项技术对NK进行分离纯化，最终使得纯化倍数达到5.6倍，但是在TPP体系中，部分变性失活的NK在有机溶剂和水环境的共同作用下，酶的构象发生变化并且重新折叠，使得这部分失活的NK能够复性、恢复活力，这也使得酶活回收率超过100%，达到了129.5%。

除了上述的常用蛋白质分离手段外，对于NK的分离纯化还存在一些特殊的分离技术。例如利用AOT/isooctane反胶团体系对NK进行的反胶束萃取技术[42]，其原理是利用带负电的AOT的亲水磺酸基团与带正电的NK通过静电引力相互吸引并结合，最终将NK萃取出来并且包埋在AOT/异辛烷的反胶团中，达到分离的效果，这种分离式通过静电引力来实现的，不存在特异性识别，这也导致这种方式的纯化因子只有2.5，但也得益于AOT/异辛烷形成的反胶团的稳定性，使得NK的活性能够得到很大程度保护，最终得到的酶活回收率能够达到80%；还有将Streamline SP装入XK16柱对NK进行的膨胀床离子交换吸附的分离纯化方式[43]，这种方式虽然也是通过离子交换吸附的方式来分离NK，但是通过采用膨胀床的方式，在加入粗发酵液后，颗粒填料由于浮力上升从而使膨胀床体积发生变化，此时大型的菌体等杂质无法被吸附，则会通过颗粒间隙先流出，NK由于其分子量小并且带电性，则会被吸附在填充料内。这种采用膨胀床的方式能够将NK发酵液的除菌过程和NK的分离纯化同时进行，非常的省时省力。由于其离子吸附并无特异性，这也导致最终的纯化因子只有8.2，但也由于其操作过程的简洁性，使得酶活回收率达到95%。再有采用了一种以对氨基苯甲脒为配体构建的磁响应微球来实现对发酵液中NK的有效分离和提纯的方法[44]，该方法以磁性赤铁矿纳米颗粒为基础，借助羟亚胺的交联功能，将精氨酸固定在纳米颗粒的表层，进而得到了磁性纳米颗粒（magnetic nanoparticles，MNPS），这种微球表面的精氨酸胍基能与NK特异性相互作用，使NK可被磁性微球表面捕获，从而实现NK的分离和纯化目的。由于这种吸附分离式具有一定特异性的，因此即使在NK含量很少的时候，也能够达到很好的分离效果。其纯化因子达到了8.7，并且其回收率也超过85%。

在如今学科多向交融的时代，NK的分离纯化也有了新的技术-分子印迹法。分子印迹聚合物（molecular imprinted polymer，MIP）是一种通过与特定目标分子结合来产生分子识别位点，旨在获得对该特定目标分子具有高选择性的稳健的聚合物材料[45]。原本这技术主要应用于非生物的小分子物质，但随着对分子印迹深入研究，现如今已可以将其成功应用于生物大分子。张勋力等[46]以二氧化硅为内壳层，用魔芋葡甘聚糖凝胶作为外壳层，成功制备出了能够分离NK的表面分子印迹聚合物，这一研究为后续分子印迹在NK分离上的应用提供了技术参考。

2.3 NK剂型制备研究

NK是一种碱性丝氨酸蛋白酶，在如今的市场上大多作为保健品，服用方式多为吞服，需要经过pH为0.9左右的胃酸环境。倘若不对NK进行包

装直接服用，则会在胃酸中迅速失活，因此制备抗胃酸、生物利用度高的NK剂型则成为NK能否产业化的另一个至关重要的因素。

现如今所采用的剂型制备技术大多是将NK进行包埋，制备成微胶囊，包裹并在胃酸环境下保护NK，在到达肠道后裂解释放NK，从而达到将NK以最大酶活送入人体的目的。马晓文团队[47]以异丁烯酸一丙烯酸乙酯共聚物EudragitL100-55作为包衣材料，采用超临界CO_2流体技术制备出了NK包衣微丸。这些微粒在模拟胃酸条件中保持2 h，其间酶的活性仅减少了9.7%，在肠道里能有效释放出75%的成分。邓柳艳团队[48]以聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物作为壁材，制备出了NK的微胶囊，在胃酸环境下2 h，保留了60%的酶活。张佑红等[49]采用海藻酸钠作为壁材，制备出了NK缓释肠溶胶囊，包埋率达到87.55%，且在肠道释放率也能达到88%以上。

除了制备微胶囊的方法外，也还有许许多多的NK剂型的研究。例如Wang等[50]将含有NK的水相滴入含有乳化剂的油相，从而形成的NK双乳化油滴，其包埋率也达到了86.80%。Dong等[51]采用薄膜法将NK包封于植物甾醇脂质体内，也达到了66.25%的包埋率。杨超等[52]采用了直接压片法，将NK和一系列骨架材料一同制成了NK缓释片。

当然除了上述的口服剂型外，还有研究人员另辟蹊径，将NK制备成了注射剂型。Feng等[53]就以NK为阳离子部分，以牛黄熊去胆酸（TUDCA）作为阴离子部分，制备出了NK-TUDCA复合物，从而达到了降低注射NK毒性的目的。

3　展　望

NK具备强溶栓能力，并且其安全性高、口服注射均有很好的效果，是一种新型的具有很大潜在开发价值的溶栓药物。但是目前NK在医药和食品领域内仍存在许多问题。

首先，NK作为一种蛋白酶，对其结构与功能之间的关系这一部分的研究尚未透彻，目前为止的相关研究也很少。但随着人工智能AI的发展，未来利用智能AI等软件来模拟、分析NK的相关结构域等流程将指日可待。其次，对于NK上下游工艺的优化还有许多提升空间，例如可以通过对发酵菌种的宏基因组或者代谢通路进行分析，利用基因编辑技术增大产酶的代谢通路，从而提升酶活；也可以利用PyMol等蛋白分析软件对NK的蛋白的空间结构进行定点的突变或改造，从而提高酶的稳定；可以在发酵中通过调控补料方式及物料流加速度等因素，从而减小NK发酵液中的氨臭味带来的影响；还可以通过分子印迹或陶瓷膜等分离手段，在纯化NK的同时还可以除去具有凝血功能的维生素K2。除此之外，研发出生物利用度更高、半衰期更长的NK相关剂型也是NK工业化生产的一大技术难点。

参考文献

[1] 《中国心血管健康与疾病报告2021》编写组.《中国心血管健康与疾病报告2021》要点解读[J].中国心血管杂志，2022，27(4)：305-318.

[2] HONGJIE C，MCGOWAN E，REN N，et al. Nattokinase：a promising alternative in prevention and treatment of cardiovascular diseases[C]. Apsa-ascept Joint Scientific Meeting. 2018.

[3] SUMI H，HAMADA H，TSUSHIMA H，et al. A novel fibrinolytic enzyme（nattokinase）in the vegetable cheese Natto；a typical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. Experientia，1987，43(10)：1110.

[4] 孟繁宇，薛菲，施慧.纳豆激酶对动脉粥样硬化模型大鼠血脂及血液流变学影响[J].中国实验诊断学，2013，17(9)：1567-1569.

[5] GITTE S J，MIKI L，ERO M P，et al. Consumption of nattokinase is associated with reduced blood pressure and von willebrand factor，a cardiovascular risk marker：results from a randomized，double-blind，placebo-controlled，multicenter North American clinical trial[J]. Integrated Blood Pressure Control，2016，9：95-104.

[6] 占慧琴，袁志兰，杨翎，等.纳豆激酶对视网膜中央静脉阻塞动物模型中闪光视网膜电图的影响[J].南京医科大学学报(自然科学版)，2010，30(7)：974-976.

[7] 高泽鑫，何腊平，刘亚兵，等.纳豆激酶的研究进展与展望[J].中国酿造，2017，36(8)：11-15.

[8] SUZUKI Y，KONDO K，IEHISE J，et al. Dietary supplementation with fermented soybeans suppresses intimal thickening[J]. Nutrition，2003，19(3)：261-264.

[9] NAKAMURA T，YAMAGATA Y，ICHISHIMA E. Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene，aprN，of *Bacillus subtilis*（Natto）[J]. Bioscience，Biotechnology，and Biochemistry，1992，56(11)：1869-1871.

[10] JIA Y，LIU H，BAO W，et al. Functional analysis of propeptide as an intramolecular chaperone for in vivo folding of subtilisin Nattokinase[J]. FEBS

Letters,2010, 584(23): 4789-4796.
[11] 贾焱. 纳豆激酶分子内分子伴侣的研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2013.
[12] URANO T. The profibrinolytic enzyme subtilisin NAT purified from Bacillus subtilis cleaves and inactivates plasminogen activator inhibitor type 1[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(27): 24690-24696.
[13] 于潇潇, 杜慧聪, 商鹤琴, 等. 纳豆激酶活性和稳定性的研究进展[J]. 中国调味品, 2019, 44(7): 160-163.
[14] YANAGISAWA Y, CHATAKE T, CHIBA-KAMOSHIDA K. et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction experiment of Nattokinase from Bacillus subtilis Natto[J]. Acta Crystallographica Section F, 2010, 66(12): 1670-1673.
[15] CARTER P, WELLS J A. Dissecting the catalytic triad of a serine protease[J]. Nature, 1988, 332(7): 564-568.
[16] 杨亚楠, 陈慧洁, 余河水, 等. 纳豆激酶稳定性研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018,20(11):41-44.
[17] 李睿, 阮文辉, 熊晓辉. 纳豆激酶的酶学性质研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2015,36(2): 106-110.
[18] SUMI H. A novel fibrinolytic enzyme in the vegetable Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. Expvrience,1987, 43(20): 1110-1111.
[19] 孙江伟, 王莹莹, 李琳, 等. 纳豆激酶及其药理作用的研究进展[J]. 中国现代医药杂志,2011,13(9): 131-133.
[20] ICHISHIMA E, TAKADA Y, TAIRA K, et al. Specificities of extracellular and ribosomal serine proteinases from *Bacillus Natto*, a food microorganism[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1986, 869(2):178-184.
[21] YIN L J, LIN H H, JIANG S T, et al. Bioproperties of potent Nattokinase from Bacillus subtilis YJ1[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(9): 5737-5742.
[22] 林飞龙, 李泰明. 纳豆激酶及其生物工程研究进展[J]. 生物医学, 2023, 13(2):240-246.
[23] LI Y,CHEN L Q,TANG X Y,et al. Biotechnology, bioengineering and applications of Bacillus Nattokinase[J]. Biomolecules, 2022,12(7):980.
[24] YATAGAI C, MARUYAMA M, KAWAHARA T, et al. Nattokinase-promoted tissue plasminogen activator release from human cells[J]. Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis, 2007,36(5):227-232.
[25] KUNAMNENI A, DURVASULA R. Streptokinase: a drug for thrombolytic therapy: a patent review[J]. Recent Adv Cardiovascular Drug Discovery, 2014, 9(2):106-121.
[26] AMIN K, ZENG X B, YING Y, et al. Effect of pulsed electric fields (PEF) on protease and antioxidant activity of selenium modified fibrinolytic enzyme Nattokinase produced by Bacillus nattocells[J]. International Journal of Biosciences, 2019, 14(5):282-293.
[27] HASSANNEJAD S, RAZEGHIAN E, SHOJAEI N. Relationship between PAI1 promoter 4G/5g polymorphism and stroke[J]. Basic & Clinical Medicine, 2011, 5(17): 18-20.
[28] 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): 340-347.
[29] 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): 76-80.
[30] 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.
[31] WANG Y X, WANG J, ZHANG X A, et al. Genomic and transcriptomic analysis of *Bacillus subtilis* JNFE1126 with higher Nattokinase production through ultraviolet combined Co-60-gamma ray mutagenesis[J]. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 2021, 147(2):111652-111662.
[32] CAI Y J, WEI B, JIANG S J, et al. Directed evolution improves the fibrinolytic activity of Nattokinase from *Bacillus Natto*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2011, 325(2): 155-161.
[33] CAI D B, WEI X T, QIU Y M, et al. High-Level expression of Nattokinase in *Bacillus licheniformis* by manipulating signal peptide and signal peptidase[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(3): 704-712.
[34] 刘中美, 何孝天, 崔文璟, 等. 通过定点突变增强纳豆激酶的热稳定性[J]. 现代食品科技, 2015,31(2): 37-41.
[35] 刘朔, 姜梅, 陈晓红, 等. 纳豆激酶第36位氨基酸突变对其活性及热稳定性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2008(3):130-136.
[36] 王刚, 郭明珠, 陈光. 枯草芽孢杆菌纳豆激酶分离纯化及酶学性质[J]. 食品科学, 2012, 33(15): 231-234.
[37] 史延茂, 马跃华, 杨明, 等. 纳豆激酶分离纯化方法

的研究［J］. 中国酿造，2010(4)：119-123.
［38］ 李睿，阮文辉. 纳豆激酶NKⅡ分离纯化及其酶促动力学研究［J］. 中国酿造，2016，35（7）：89-92.
［39］ YAN J K，WANG Y Y，WEN Y Q，et al. Three phase partitioning as an elegant and versatile platform applied to nonchromatographic bioseparation processes［J］. Critical Reviews in Food Science & Nutrition，2017，58（14）：2416-2431.
［40］ GAGAOUA M，HAFID K. Three phase partitioning system，an emerging non-chromatographic tool for proteolytic enzymes recovery and purification［J］. Biosensors Journal，2016，5（1）：100134.
［41］ GARG R，THORAT B N. Nattokinase purification by three phase partitioning and impact of t-butanol on freeze drying［J］. Separation & Purification Technology，2014，131：19-26.
［42］ 刘俊果，邢建民，畅天狮，等. 反胶团萃取分离纯化纳豆激酶［J］. 科学通报，2006(2)：133-137.
［43］ 胡洪波，张雪洪，梅乐和，等. 膨胀床离子交换吸附分离纳豆激酶［J］. 化学工程，2005(4)：1-4.
［44］ YANG C L，XING J M，GUAN Y P，et al. Superparamagnetic poly (methyl methacrylate) beads for Nattokinase purification from fermentation broth［J］. Applied Microbiology and Biotechnology，2006，72（3）：616-622.
［45］ SONG R Y，HU X L，QIAN L W，et al. Synthesis of glutathione imprinted polymer particles via controlled living radical precipitation polymerization［J］. Chinese Journal of Polymer Science，2015，33（3）：404-415.
［46］ 张勋力，张迎庆. 纳豆激酶表面分子印迹聚合物及其制备方法和应用：CN201910742958.0［P］. 2024-01-08.
［47］ 马晓文，肖菊香，莫炜，等. 超临界CO_2流体技术制备纳豆激酶肠溶微丸的初探［J］. 药物生物技术，2008，15（3）：199-203.
［48］ 邓柳艳，张建华. 纳豆激酶微胶囊制备及其释放与$CaCo_2$细胞模型吸收的评价［J］. 食品工业科技，2019，40（10）：115-127.
［49］ 张佑红，李迪文. 一种纳豆激酶肠溶胶囊及制备方法：CN202210825719.3［P］. 2023-11-28.
［50］ WANG X N，JIANG S F，WANG X Y，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.
［51］ DONG X Y，KONG F P，YUAN G Y，et al. Optimisation of preparation conditions and properties of phytosterol liposome-encapsulating Nattokinase［J］. Natural Product Research，2012，26（6）：548-556.
［52］ 杨超，尹宗宁，俞功龙，等. 纳豆激酶缓释片的制备及药物释放影响因素的研究［J］. 中国新药杂志，2007，16（7）：547-551.
［53］ FENG R，LI J，CHEN J P，et al. Preparation and toxicity evaluation of a novel Nattokinase-tauroursodeoxycholate complex［J］. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences，2018，13（2）：173-182.

本文编辑：张　瑞