

# 纳豆激酶生产菌株选育及其发酵培养基优化

文雯<sup>1,2</sup>, 胡海峰<sup>3</sup>

(1. 杨凌职业技术学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 中国药科大学, 江苏 南京 211100; 3. 国药集团健康产业研究院, 上海 201203)

**摘要:**以实验室保藏的纳豆芽孢杆菌 SIPI-W-N5 为出发菌株, 通过紫外诱变和 DES 诱变, 获得了突变株 SIPI-W-N5-16, 采用响应面优化试验对其发酵培养基进行优化。结果表明, 突变株 SIPI-W-N5-16 较出发菌株产纳豆激酶活力提高了 149.24%, 并确定了该突变株最佳摇瓶发酵配方, 采用该发酵培养基发酵突变株 SIPI-W-N5-16, 其产纳豆激酶活力较优化前提高了 104%。

**关键词:** 纳豆激酶; 发酵; 菌株选育; 工艺优化; 响应面试验

**中图分类号:** TQ925 **文献标识码:** A **文章编号:** 0488-5368(2025)02-0009-08

## Breeding of Nattokinase-Producing Strains and Optimization of Fermentation Medium

WEN Wen<sup>1,2</sup>, HU Haifeng<sup>3</sup>

(1. Yangling Vocational & Technical College, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 211100, China; 3. Sinopharm Health Industry Institute Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

**Abstract:** Using a *Bacillus subtilis* SIPI-W-N5 strain preserved under laboratory conditions as the starting strain, a mutant strain SIPI-W-N5-16 was obtained through ultraviolet (UV) and diethyl sulfate (DES) mutagenesis. Response surface methodology (RSM) experiments were conducted to optimize the fermentation medium for the mutant strain. The results showed that the nattokinase activity of SIPI-W-N5-16 was 149.24% higher than that of the original strain. The optimal fermentation medium for shake flask cultivation of the mutant strain was determined. Fermentation of SIPI-W-N5-16 with the optimized medium led to a 104% enhancement in nattokinase activity compared to pre-optimization conditions.

**Key words:** Nattokinase; Fermentation; Strain breeding; Process optimization; Response surface methodology

近年来,我国心血管疾病的发病率和死亡率均不断增高,其中,血栓是引起脑卒中和冠心病的重要诱因<sup>[1]</sup>。目前临床上使用广泛的溶栓药如尿激酶、链激酶等价格高昂、不良反应严重<sup>[2]</sup>。纳豆激酶(Nattokinase, NK)是一种由日本心脑血管专家须见洋行教授从农产品纳豆的发酵产物中发现的

一种具有超强溶栓能力的碱性丝氨酸蛋白酶<sup>[3-5]</sup>。纳豆激酶的主要优势体现在安全性高,不易引起出血等不良反应,在体内作用时间长,既可制成注射剂又可制成口服制剂等<sup>[6-10]</sup>。纳豆激酶主要通过固体发酵和液体发酵两种方式制备,与固体发酵相比,液体发酵可控性更强,产率高,后处理简单,是

收稿日期:2024-07-19 修回日期:2024-08-20

基金项目:陕西省重点研发计划项目(2023-YBKY-249);陕西省教育厅青年创新团队建设项目(21JY143);杨凌职业技术学院2023年校内科研基金项目(DT2023-001)。

第一作者简介:文雯(1991-),女,讲师,硕士研究生,主要从事微生物药物研究与开发。

通信作者:胡海峰。

目前生产纳豆激酶的主要方式<sup>[6]</sup>,而液体发酵制备纳豆激酶的关键取决于发酵用菌株和发酵工艺参数两个方面。该研究以实验室保藏的纳豆芽孢杆菌 SIPI-W-N5 为出发菌株,通过物理诱变和化学诱变的方式对出发菌株进行诱变育种,进一步获得高产纳豆激酶的发酵菌株,最后通过响应面优化试验对发酵培养基进行优化,得到该突变株纳豆激酶发酵的最佳培养基组成。

## 1 材料与设备

### 1.1 菌株来源

来自实验室保藏的纳豆芽孢杆菌 SIPI-W-N5。

### 1.2 初始发酵培养基

液体发酵培养基(g/L):可溶性淀粉 10,大豆蛋白胨 5,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 4,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5。

### 1.3 培养条件

接种量 1% 装至 50/250 mL 三角瓶中,30 °C 250 r/min 摇床上振荡培养 3 d。

### 1.4 主要试剂与仪器

奶粉(光明乳业有限公司);牛血清纤维蛋白原(上海宝曼);琼脂糖(西格玛奥德里奇有限公司);凝血酶、上海源叶(上海源叶);玉米浆液化液、鹰嘴豆豆浆(自制);诱变箱(自制);生化培养箱(LRH-250,上海一恒);摇床(ZHWY-2102,上海智城)。

## 2 方法

### 2.1 诱变与筛选

2.1.1 产蛋白酶活力及产纳豆激酶活力筛选模型建立 初筛模型:由于纳豆激酶是一种蛋白酶,因而在诱变过程中采用酪蛋白平板法对诱变菌株产蛋白酶活力进行初步筛选<sup>[11]</sup>。

复筛模型:采用琼脂糖-纤维蛋白平板法<sup>[12]</sup>,对初筛得到的突变株产纳豆激酶活力进行测定,最终筛选出高产诱变菌株。用无菌生理盐水将尿激酶标准品分别配制成 62.5 U/mL、125 U/mL、250 U/mL、400 U/mL、500 U/mL 5 个浓度,每个浓度取 20 μL 采用纸片法在琼脂糖-纤维蛋白平板上点样。每个浓度做 3 个平行,37 °C 孵育 18 h。孵育结束后测定溶解圈直径,并计算直径平均值和对应溶解圈面积。以溶解圈面积(mm<sup>2</sup>)为横坐标,纳豆激酶酶活(U/mL)为纵坐标,制作尿激酶标准曲线

并拟合标准曲线的回归方程。根据实验结果得到标准曲线的线性回归方程为  $y = 2.591x - 1176$ , R<sup>2</sup> 值为 0.978,说明纳豆激酶酶活与溶解圈面积呈良好的线性关系。

2.1.2 菌株诱变 采用物理诱变(UV)和化学诱变(DES)对出发菌株纳豆芽孢杆菌 SIPI-W-N5 进行菌种选育,通过如下计算公式计算正突变率和致死率,进而确定诱变条件。

致死率(%) =

$$\frac{\text{对照组平板上的菌落数} - \text{相同稀释倍数平板上的诱变菌落数}}{\text{对照组平板上的菌落数}} \times 100$$

正突变率(%) =

$$\frac{\text{蛋白酶水解圈直径大于对照菌株蛋白酶水解圈直径的突变株数目}}{\text{所挑选突变株的总数目}} \times 100$$

UV 诱变:吸取 9 mL 培养 20 h 的菌液在 15 W 紫外灯下进行诱变处理后,稀释涂布于酪蛋白平板上,待菌落 37 °C 下培养成熟后,计算正突变率(%)和致死率(%)。

DES 诱变:2%硫酸二乙酯溶液诱变处理,稀释涂布于酪蛋白平板,待菌落 37 °C 下培养成熟后,计算正突变率(%)和致死率(%)。

联合诱变:同时采用 UV 诱变和 DES 诱变。

### 2.2 纳豆激酶发酵培养基优化

2.2.1 单因素优化 发酵过程中代谢产物受不同营养成分的影响是显著的<sup>[13,14]</sup>。该研究对发酵培养基中的碳源、氮源、微量元素等营养成分进行考察,并对各营养成分的含量进行优化。

#### 2.2.2 响应面优化试验

##### (1) Plackett-Burman 试验设计

根据 2.3 实验结果,选取对纳豆激酶发酵产量有较大影响的 8 个因素,每个因素选取 2 个水平,试验选用 N=12 的 PB 设计,预留 3 个虚变量用以估计误差,响应值为纳豆激酶水解圈直径(cm),平行对照三组。

##### (2) 最陡爬坡试验

通过 Plackett-Burman 试验结果筛选出最主要影响纳豆激酶产量的因素,根据试验数据拟合的一次多项式能有效确定最陡爬坡方向,由此逼近最大响应区域。

##### (3) Box-Behnken 试验

根据 PB 试验和最陡爬坡试验确定的试验因素和水平,进行三因素三水平的响应面试验,通过 Design Expert 8.0 对实验数据进行分析。

### 3 结果与分析

#### 3.1 菌种选育

##### 3.1.1 UV 和 DES 诱变条件筛选 以 SIPI-W-N5

表 1 不同诱变条件的致死率和正突变率对比

UV 处理 时间/s	致死率 /%	正突变率 /%	DES 处理 时间/min	致死率 /%	正突变 率/%	联合诱变处 理时间/min	致死率 /%	正突变率 /%
60	7.27	1.90	0	0	0	0	0	0
120	18.18	13.33	20	8.51	4.65	5	40.96	11.63
180	29.09	17.84	40	51.06	30.43	15	65.91	32.81
360	60.00	27.27	60	76.59	27.27	25	82.45	39.96
480	72.72	20.00	80	95.74	0	35	90.91	21.96
600	98.91	0	100	100	0	45	100	0

由此可见,UV 处理 360 s 或 DES 处理 40 min, 亦或是联合诱变处理 25 min,致死率都较高且正突变率相对最高,该诱变条件下具备较好的筛选效率。

##### 3.1.2 诱变选育改造 根据 3.1.1 中得到的最佳

菌株作为出发菌株,分别对比不同处理时间的 UV、DES 以及两者联合的诱变方式所得致死率与正突变率,结果如表 1 所示。

诱变条件,对出发菌株 SIPI-W-N5 进行育种,经过多轮诱变筛选,挑选不同单菌落通过酪蛋白平板进行产蛋白酶能力筛选,最终得到产蛋白酶活力最佳的 SIPI-W-ZW16,对其进行自然分离得到 SIPI-W-N5-16,其诱变谱系如图 1 所示。

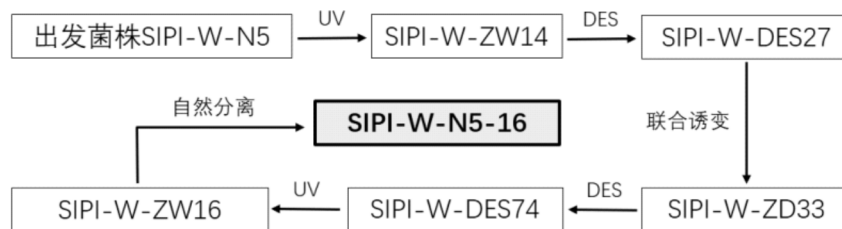


图 1 诱变谱系图

通过摇瓶发酵检测其产纳豆激酶活力,结果如表 2 所示,可以看出突变株 SIPI-W-N5-16 产纳豆激酶酶活为  $251.31 \pm 2.47$  U/mL,较出发菌株 SIPI-W-N5 提高了 149.24%

表 2 高产突变株复筛

高产菌株	纳豆激酶酶活 (U/mL)
SIPI-W-N5 (出发菌株)	$100.83 \pm 2.62$
SIPI-W-N5-16	$251.31 \pm 2.47$

#### 3.2 发酵培养基的优化

##### 3.2.1 单因素优化试验,各因素影响水平如下。

(1)碳源对发酵水平的影响 碳源是培养基的主要营养成分之一,由于不同微生物所含的碳源分解酶并不完全一样,因此它们对各种碳源的利用

能力也不完全相同。选取 1% 不同碳源,以 1% 可溶性淀粉为对照,其他发酵成分保持不变,由图 2 可知最优碳源为可溶性淀粉与麦芽糊精组成的复合碳源,通过进一步的含量优化可知 1.5% 可溶性淀粉+1% 麦芽糊精为最佳配比。

(2)氮源对发酵水平的影响 选取 0.5% 的不同氮源,以 0.5% 的大豆蛋白胨作为对照,其他发酵成分保持不变,由图 3 可知最优氮源为大豆蛋白胨与酪蛋白组成的复合氮源,通过进一步的含量优化可知 1.5% 的大豆蛋白胨+1% 的酪蛋白为最佳配比。

(3)微量元素对发酵水平的影响 微量元素在菌体生长繁殖和代谢活动中的生理功能是多方面的,可作为酶的组成部分,也是代谢途径中许多重要酶的激活剂,还参与细胞膜通透性的调节等。

本实验考察了含量为 0.05% 的不同金属离子对发酵的影响,以不添加任何微量元素为对照组,由图 4 可知,当向发酵培养基中加入  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  时能够明

显促进纳豆激酶的生成。通过进一步含量优化可知当向培养基中加入 0.1% 的  $\text{Ca}^{2+}$  和 0.3% 的  $\text{Mg}^{2+}$  时,发酵效果最佳。

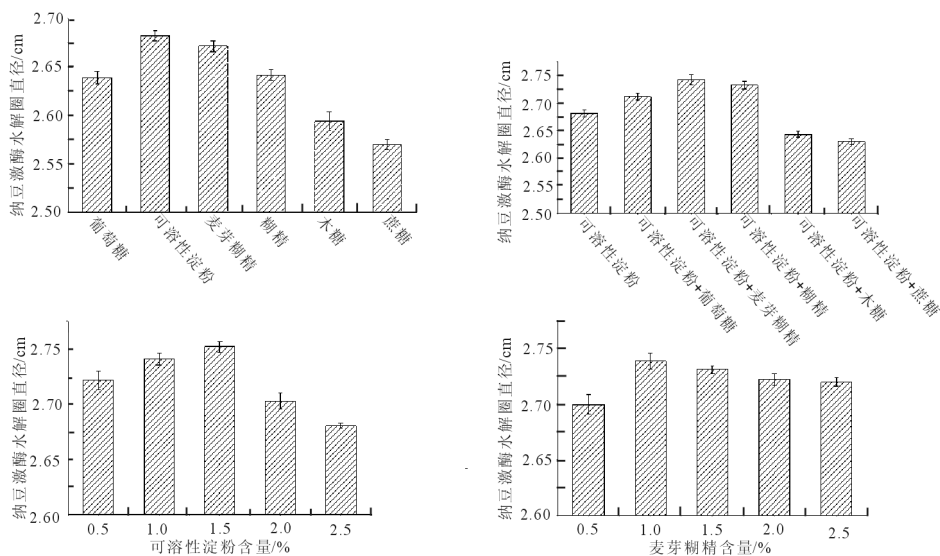


图 2 碳源对纳豆激酶酶活的影响

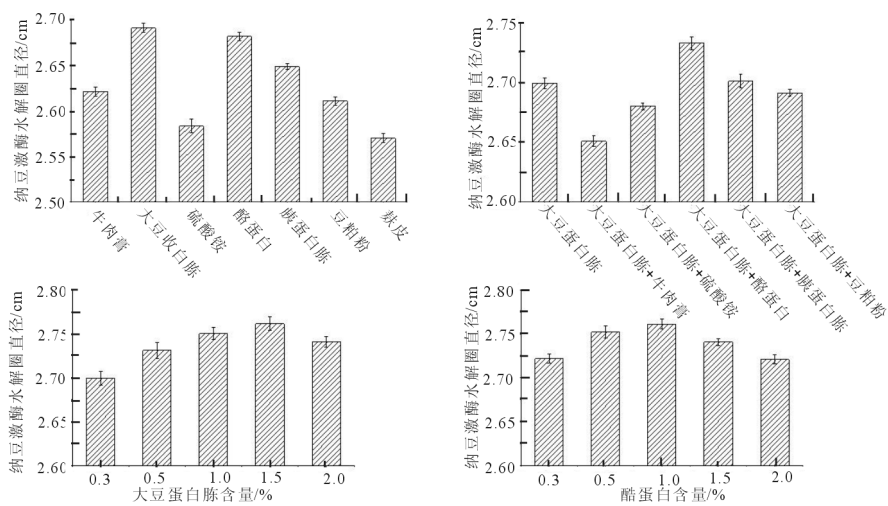


图 3 氮源对纳豆激酶酶活的影响

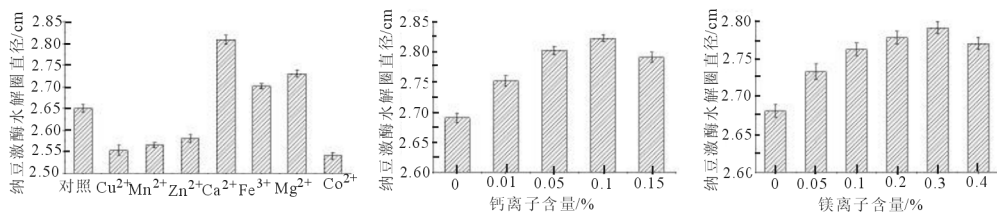


图 4 微量元素对纳豆激酶酶活的影响

3.2.2 响应面优化试验

## (1) Plackett-Burman 试验

根据单因素试验优化结果并结合相关文献调研,Plackett-Burman 试验选取大豆蛋白胨、酪蛋白、可溶性淀粉、麦芽糊精、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CaCl_2$ 、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、 $KH_2PO_4$  共 8 种培养基成分,进行 12 次试验,平行对照 3 组,其中 3 个虚变量用以估计误差,响应值为纳豆激酶水解圈直径(cm),编号  $X_1-X_{11}$ ,分别用“-1,1”表示,“1”代表高水平,“-1”代表低水平。试验过程及结果见表 3~5。

表 3 Plackett-Burman 试验设计因素水平及编码

	因素	水平	
		-1	1
$X_1$	大豆蛋白胨/%	1	5
$X_2$	酪蛋白/%	0.5	5
$X_3$	可溶性淀粉/%	1	3
$X_4$	麦芽糊精/%	1	3
$X_5$	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ /%	0.1	0.3
$X_6$	$CaCl_2$ /%	0.01	0.1
$X_7$	$KH_2PO_4$ /%	0.1	0.3
$X_8$	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ /%	0.2	0.6
$X_9$	空白 1	-1	1
$X_{10}$	空白 2	-1	1
$X_{11}$	空白 3	-1	1

表 4 Plackett-Burman 试验及结果

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	$X_9$	$X_{10}$	$X_{11}$	直径/cm
1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	2.83
2	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	2.88
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2.73
4	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	2.70
5	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	2.72
6	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	2.84
7	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	2.62
8	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	2.75
9	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	2.83
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	2.64
11	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	2.83
12	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	2.67

表 5 偏回归系数及影响因子的显著性分析

因素	平方和	标准误差	系数估计值	F 值	P 值	重要性排序
Model	0.079	7.454E-003	2.75	29.48	0.000 2	
F- $X_6$	0.056	7.454E-003	0.068	84.05	<0.000 1	1
C- $X_3$	8.533E-003	7.454E-003	-0.023	12.80	0.009 0	2
E- $X_5$	7.500E-003	7.454E-003	0.025	11.25	0.012 2	3
A- $X_1$	6.533E-003	7.454E-003	-0.023	9.80	0.016 6	4

由表 5 可以看出, $P=0.000 2<0.05$ ,说明该模型在整个被研究的整个回归区域拟合度很好。6 个考察因素中排在前 3 位的依次是  $CaCl_2$ 、可溶性淀粉、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 。这三个因素对纳豆激酶产量影响较大,其中无水氯化钙和七水硫酸镁对产量的影响是正效应,可溶性淀粉对产量的影响是负效应。

## (2) 最陡爬坡试验

通过 Plackett-Burman 试验结果筛选出最主要影响纳豆激酶产量的 3 个因素是  $CaCl_2$ 、可溶性淀粉、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 。各个因素变化的步长根据因素效应值大小和正负来确定。每组做三个平行。试验设计及结果见表 6。

表 6 最陡爬坡试验设计及结果

组别	CaCl <sub>2</sub> /%	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O/%	可溶性淀粉/%	纳豆激酶水解圈直径/cm
1	0	0.1	3	2.76
2	0.025	0.2	2.5	2.81
3	0.05	0.3	2	2.85
4	0.075	0.4	1.5	2.89
5	0.1	0.5	1	2.87
6	0.125	0.6	0.5	2.86

由上述结果可知,从第二组开始,酶活力明显增加,第四组达到峰值,第五组开始下降,这表明第二组和第五组是发酵培养基最佳组合,故选择响应面优化试验中心点是 0+4。

### (3) Box-Behnken 试验

根据最陡爬坡试验结果,选 0+4 作为响应面试验设计为零水平,以 CaCl<sub>2</sub>、可溶性淀粉、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 3 个重要因素为自变量,每组做三个平行,各因素编码水平及试验结果如表 7~9

所示。

表 7 试验因素与水平的设计

因素	水平		
	-1	0	1
X <sub>1</sub> 可溶性淀粉/%	1	1.5	2
X <sub>2</sub> MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O/%	0.3	0.4	0.5
X <sub>3</sub> CaCl <sub>2</sub> /%	0.05	0.075	0.1

表 8 Box-Behnken 试验设计及结果

序号	可溶性淀粉	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	CaCl <sub>2</sub>	纳豆激酶水解圈直径/cm
1	1.50	0.50	0.05	2.84
2	1.50	0.40	0.08	2.88
3	1.50	0.40	0.08	2.89
4	1.00	0.50	0.08	2.84
5	1.00	0.40	0.05	2.85
6	2.00	0.30	0.08	2.84
7	1.50	0.40	0.08	2.86
8	1.50	0.50	0.10	2.88
9	1.50	0.30	0.05	2.85
10	2.00	0.40	0.05	2.83
11	1.50	0.40	0.08	2.88
12	1.00	0.30	0.08	2.84
13	2.00	0.50	0.08	2.85
14	1.50	0.40	0.08	2.89
15	2.00	0.40	0.10	2.90
16	1.50	0.30	0.10	2.85
17	1.00	0.40	0.10	2.84

由表 9 可知,Prob>F = 0.008 4,小于 0.05,显著;Lackof Fit = 0.768 1,大于 0.05,不显著;R<sup>2</sup> = 0.901 8,这表明 90.18%的试验结果可以用该模型解释,模型具有显著性,在考察浓度范围内能较好的表征纳豆激酶产量的变化。各因子对纳豆激酶酶活的影响程度依次为:无水氯化钙>可溶性淀

粉>七水硫酸镁。根据 Design-expert 7.1.3 分析软件得到以下回归方程。

$$Y = 2.61375 + 0.0975X_1 + 1.1625X_2 - 2X_3 + 0.05X_1X_2 + 1.6X_1X_3 + 4X_2X_3 - 0.075X_{12} - 1.875X_{22} - 10X_{32}$$

表9 回归分析结果

因素	自由度	平方和	均方	F 统计量	Prob>F 值
Model	9	7.119E-003	7.910E-004	7.14	0.008 4
A-X <sub>1</sub>	1	3.125E-004	3.125E-004	2.82	0.136 8
B-X <sub>2</sub>	1	1.125E-004	1.125E-004	1.02	0.347 0
C-X <sub>3</sub>	1	1.250E-003	1.250E-003	11.29	0.012 1
AB	1	2.500E-005	2.500E-005	0.23	0.649 1
AC	1	1.600E-003	1.600E-003	14.45	0.005 7
BC	1	4.000E-003	4.000E-003	3.61	0.099 1
A2	1	1.480E-003	1.480E-003	13.37	0.008 1
B2	1	1.480E-003	1.480E-003	13.37	0.008 1
C2	1	1.645E-004	1.645E-004	1.49	0.262 4
Lack of Fit	3	1.750E-004	5.833E-005	0.39	0.768 1

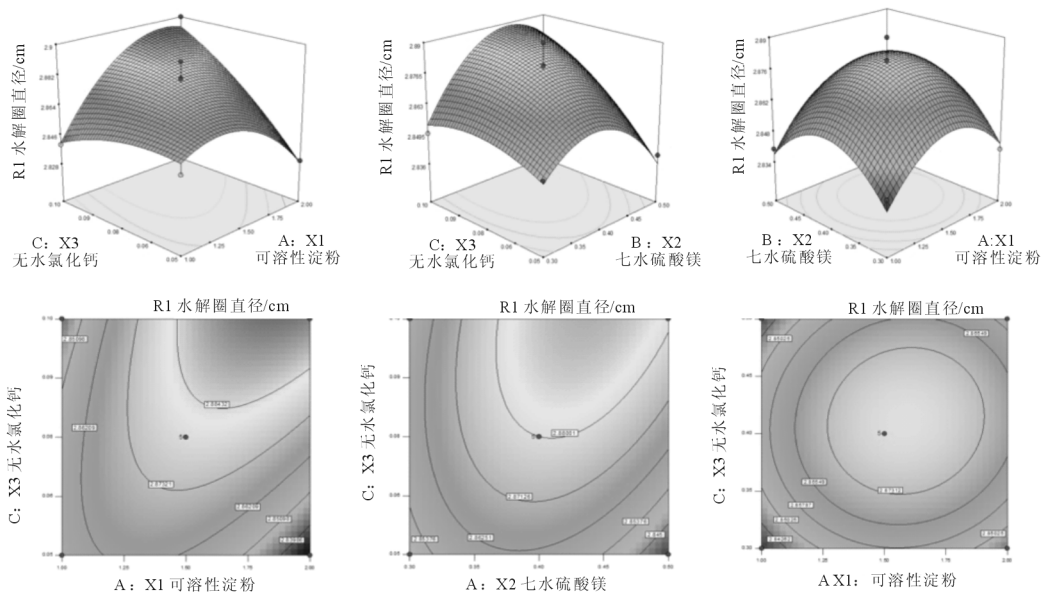


图5 各因素交互作用对纳豆激酶酶活的影响

利用 Design Expert 8.0 分析软件做出各因素交互作用对纳豆激酶酶活影响的响应曲面和等高线分析图,见图 5,可知模型存在极大值,其中无水氯化钙与其他因素交互作用较为显著。对上述模型求导,得出该模型的最大值。结果显示,当大豆蛋白胨 1%、酪蛋白 0.5%、可溶性淀粉 1.86%、麦芽糊精 1%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.44%、 $CaCl_2$  0.1%、 $KH_2PO_4$  0.1%、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  0.6%时,对应的纳豆激酶水解圈直径(Y 值)为 2.90 cm,约纳豆激酶 535.40 U/mL。

#### (4) 验证试验

通过响应面优化试验,确定了纳豆激酶最佳摇瓶发酵条件,为了检验模型的准确性,对最佳发酵条件进行验证。

由图 6 可知,在最佳发酵条件下纳豆激酶的活性达到 549.72 U/mL,与理论预测值 535.40 U/mL

相对误差小于 5%,说明模型预测与实际试验较符合。相较于初始工艺纳豆激酶活性提高了 104%。

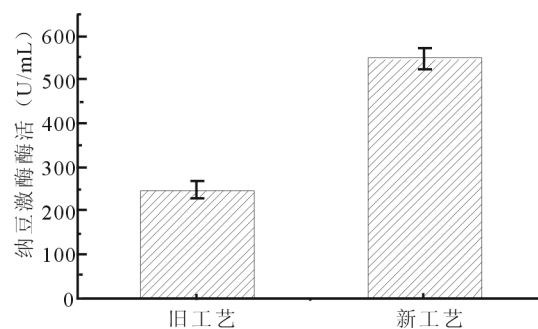


图6 新旧工艺纳豆激酶产量比较

## 4 讨论与结论

纳豆激酶作为有望被开发的新一代使用方便、安全的溶栓药物其工业化量产是亟需解决的痛点,因此培育出能够高产纳豆激酶的生产菌株至关重要

要。该研究通过对出发菌株 SIPI-W-N5 进行不断地紫外诱变和化学诱变,在大规模菌种选育后获得一株具有正突变效应的发酵菌株 SIPI-W-N5-16,相较于出发菌株其产纳豆激酶活力提高了 149.24%。由此可见,实验室在前期自然选育的 SIPI-W-N5 菌株基础上,采用物理诱变、化学诱变以及两者联用的方式借助射线、化学物质等不断刺激野生型菌株,采用蛋白酶初筛方法大量筛选,最终是可以明显提高菌株突变几率,但是要控制好射线或者化学物质的诱变剂量,剂量过低易导致正突变率低下,剂量过高易导致死亡率过高。同时,在紫外诱变时注意光修复对诱变的影响,因此每轮紫外诱变结束以后需进行暗培养操作。

纳豆激酶是纳豆芽孢杆菌的初级代谢产物,主要是在纳豆芽孢杆菌前中期生长繁殖过程中大量产生,因此对发酵培养基成分具有一定要求。该研究以突变菌 SIPI-W-N5-16 作为发酵纳豆激酶的目标菌,对其发酵培养基进行优化,通过单因素试验和响应面试验优化得到最佳摇瓶发酵条件,在此条件下纳豆激酶的活力相较于初始工艺纳豆激酶活性提高了 104%。由此可见,复合碳、氮源以及钙、镁离子对发酵菌株 SIPI-W-N5-16 产纳豆激酶影响较大。在发酵过程一方面需避免使用具有阻遏作用的碳、氮源从而克服初级代谢产物分解代谢阻遏,另一方面使用复合碳、氮源相互协同可为发酵菌株提供更加丰富的碳、氮源种类并降低底物抑制作用,调节菌株代谢途径。与此同时,微量元素钙、镁离子作为产物的组成部分或者调节代谢反应,能够显著提高纳豆激酶酶活。本文在纳豆激酶生产菌株选育和发酵培养基成分方面的研究为纳豆激酶进一步量产奠定了菌种和发酵培养基的研究基础。

#### 参 考 文 献:

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2022 概要[J]. 中国循环杂志, 2023, 38(6):583-612.
- [2] Flemmig M, Melzig M F. Serine-proteases as plasminogen activators in terms of fibrinolysis[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2012, 64(8):1 025-1 039.
- [3] 文雯, 周博, 胡莉娟. 发酵法生产纳豆激酶的研究进展[J]. 农产品加工, 2019, 482(12):81-83.
- [4] Chen H, McGowan E M, Ren N, *et al.* Nattokinase: A Promising Alternative in Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases[J]. Biomarker Insights, 2018(13):91 884 950.
- [5] Ju S, Cao Z, Wong C, *et al.* Isolation and Optimal Fermentation Condition of the *Bacillus subtilis* Subsp. *natto* Strain WTC016 for Nattokinase Production[J]. Fermentation, 2019, 5(4).
- [6] 刘梦璐, 李宁, 高学秀, 等. 新型溶栓制剂——纳豆激酶的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(11):277-284.
- [7] Yoo H J, Kim M, Kim M, *et al.* The effects of nattokinase supplementation on collagen - epinephrine closure time, prothrombin time and activated partial thromboplastin time in nondiabetic and hypercholesterolemic subjects[J]. Food & Function, 2019, 10(5):2 888-2 893.
- [8] 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):93-97.
- [9] Bhatt P C, Pathak S, Kumar V, *et al.* Attenuation of neurobehavioral and neurochemical abnormalities in animal model of cognitive deficits of Alzheimer's disease by fermented soybean nanonutraceutical[J]. Inflammopharmacology, 2018, 26(1):105-118.
- [10] Man L, Xiang D, Zhang C. Strain Screening from Traditional Fermented Soybean Foods and Induction of Nattokinase Production in *Bacillus subtilis* MX-6[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2019, 11(1):283-294.
- [11] 贾仲昕. 高产蛋白酶芽孢杆菌菌株的筛选和关键酶基因的比较基因组学分析[D]. 保定:河北农业大学, 2022.
- [12] Astrup T, Müllertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1952, 40(2):346-351.
- [13] Kennedy M, Krouse D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1999, 23(6):456-475.
- [14] Schwientek P, Wendler S, Neshat A, *et al.* Comparative RNA-sequencing of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110 cultivated in different growth media[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 167(2):166-177.