

文章编号:1674-2869(2018)06-0619-08

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

田莉,卢轶男,朱建,张佑红*

武汉工程大学环境生态与生物工程学院,湖北 武汉 430205

摘要:采用实验室前期构建的能够高产纳豆激酶的枯草芽孢杆菌基因工程菌株,对其液体发酵条件进行优化。通过单因素实验和响应面 Box-Behnken 模型优化液体发酵培养参数,五因素三水平的响应面分析表明最佳发酵培养条件为:蛋白胨 26.05 g/L,葡萄糖 29.29 g/L, MgSO_4 1.5 g/L, CaCl_2 0.74 g/L, NaCl 10 g/L, pH 9.0,接种量 3%。在最优发酵培养条件下,纳豆激酶最高酶活达到 2 186.17 IU/mL,比优化前提高了 269%,这表明响应面法优化枯草芽孢杆菌工程菌能够明显的提高纳豆激酶活性,为该菌株规模化生产纳豆激酶提供了基础应用参考。

关键词:纳豆激酶;酶活;枯草芽孢杆菌;发酵优化

中图分类号:Q939.97 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2018.06.007

Optimization of Fermentation Conditions for Nattokinase Production by Genetically Engineered *Bacillus Subtilis* Using Response Surface Methodology

TIAN Li, LU Yinan, ZHU Jian, ZHANG Youhong*

School of Environmental Ecology and Bioengineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China

Abstract: A strain of *Bacillus subtilis* genetically engineered with high yield of nattokinase was previously prepared. Its liquid fermentation conditions were optimized by single factor experiment and response surface methodology (RSM) Box-Behnken model in the present work. The results of five-factor and three-level response surface analysis show that the optimal fermentation conditions are obtained at peptone of 26.05 g/L, glucose of 29.29 g/L, MgSO_4 of 1.5 g/L, CaCl_2 of 0.74 g/L, NaCl of 10 g/L, pH of 9.0, and inoculation amount of 3%, the highest enzyme activity of nattokinase reaches 2 186.17 IU/mL, 269% higher than the one before optimization. It indicates that response surface methodology can effectively improve the activity of nattokinase, which provides a basic application reference for the production of nattokinase.

Keywords: Nattokinase; enzyme activity; *Bacillus subtilis*; fermentation optimization

血栓相关的心血管疾病严重威胁着人类的健康,世界上每年都有1 700万人死于这些疾病。不溶性纤维蛋白的堆积是形成血栓的主要原因,且会进一步导致各种心血管疾病的并发症,因此预防和治疗心血管疾病的关键是降解不溶性纤维蛋白。目前治疗心血管疾病的临床药物主要有尿激

酶、链激酶、纤溶酶原激活剂等^[1]。纳豆激酶(nattokinase, NK)来源于日本的传统食物纳豆,是一种丝氨酸蛋白酶,对溶解纤维蛋白有显著的作用,相比其他治疗血栓的临床药物,NK具有半衰期长,无副作用,价格低廉的优点^[2]。

NK在pH 6-12表现出高活性且稳定,不仅可

收稿日期:2018-07-08

作者简介:田莉,硕士研究生。E-mail:m18221931064@163.com

*通讯作者:张佑红,博士,教授。E-mail:youthong@aliyun.com

引文格式: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):619-626.

以直接溶解纤维蛋白,而且可以促进细胞释放组织型纤溶酶原激活剂;NK还能催化尿激酶原从肝脏释放,从而激活循环中的纤溶酶原^[3];此外NK还可以降低血浆中的纤维蛋白原、凝血因子 VII 和凝血因子 VIII^[4-5]。NK作为潜在的新一代治疗心血管疾病的临床药物,具有安全、高效、经济等特点^[6-7],另外NK保健品也相继出现在国内市场,NK未来的应用前景十分广阔。

目前,NK多通过从纳豆食品中筛选出的纳豆芽孢杆菌发酵生产^[8-9]。野生菌株合成NK的途径复杂,且杂蛋白较多,导致后期分离纯化的过程复杂,较难分离出高纯度成品^[10]。本实验室前期构建了一株能够高效表达NK的以枯草芽孢杆菌WB800N为宿主细胞的基因工程菌株。本研究以该菌株为出发菌株,利用响应面 Box-Behnken 模型对液体发酵条件进行优化,提高纳豆激酶的酶活力。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种 枯草芽孢杆菌工程菌(PHT43-WB800N)为本实验室构建保藏菌株,可重组高效表达NK酶。

1.1.2 主要试剂 尿激酶(1 240 IU/支,北京中科质检生物技术有限公司);纤维蛋白原和凝血酶(上海源叶生物科技有限公司);IPTG来源于Bio Basic Inc;胰蛋白胨粉和酵母提取物粉(英国Oxoid公司);氯霉素(上海生工生物工程有限公司);大豆蛋白胨、蛋白胨、葡萄糖、蔗糖、淀粉、纤维素、柠檬酸钠、谷氨酸钠、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、 NaNO_3 等(国药集团化学试剂有限公司)。

1.1.3 培养基

LB固体培养基:胰蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、NaCl 10 g/L、琼脂粉 3%、pH 7.2~7.4。

种子培养基:胰蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、NaCl 10 g/L、pH 7.2~7.4。

发酵培养基:蛋白胨 20 g/L、葡萄糖 20 g/L、 K_2HPO_4 1.5 g/L、 KH_2PO_4 1.5 g/L、 MgSO_4 0.5 g/L、 CaCl_2 0.5 g/L、NaCl 10 g/L、谷氨酸钠 10 g/L、柠檬酸钠 20 g/L、pH 7.2~7.4。

1.2 实验方法

1.2.1 种子培养 用接种环取少量甘油菌株至LB(含 Cm^s 抗生素)平板上划线,37℃过夜培养。挑取单菌落接种于LB液体培养基(含 Cm^s 抗生素),37℃,200 r/min,摇瓶培养12 h,活化菌种。按2%

的接种量接种于LB液体培养基(含 Cm^s 抗生素),37℃,200 r/min,摇瓶培养8 h,即为发酵种子液。

1.2.2 发酵条件 取2%接种量的种子液接种至250 mL锥形瓶(内含50 mL液体发酵培养基且含有 Cm^s 抗生素)中,37℃,200 r/min,摇瓶培养至OD值达到0.6时,加入1 mmol/L IPTG诱导剂诱导表达6 h。

1.2.3 单因素实验 在发酵培养基的基础上,通过单因素实验来考察碳源、氮源种类和质量浓度、谷氨酸钠质量浓度、柠檬酸钠质量浓度、金属盐离子质量浓度、接种量和pH等因素对NK酶活力的影响。其中碳源:葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、木糖、甘油、乳糖、纤维素、可溶性淀粉,质量浓度均为20 g/L;氮源:大豆蛋白胨,蛋白胨,胰蛋白胨,酵母粉, NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、 NaNO_3 ,质量浓度均为20 g/L。氮源、碳源、谷氨酸钠、柠檬酸钠、NaCl浓度梯度设为0 g/L、10 g/L、20 g/L、30 g/L、40 g/L、50 g/L、60 g/L、70 g/L; MgSO_4 、 CaCl_2 、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 质量浓度梯度设为0 g/L、0.5 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L、2.0 g/L。接种量分别为:1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%;pH分别取值:5、6、7、8、9、10。

1.2.4 Box-Behnken实验设计和响应面分析 在单因素实验的基础上,利用软件Design-Expert8.0.6中的Box-Behnken模块对发酵培养基中的碳源、氮源、 MgSO_4 、 CaCl_2 和pH五因素三水平进行实验设计安排,并对实验结果进行响应面分析,从而确定最优发酵条件。

1.2.5 酶活检测 本研究采用纤维蛋白平板法检测NK酶活性^[11],实验中所需要的尿激酶溶液、凝血酶溶液、琼脂糖溶液和纤维蛋白原溶液均为10 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.5)配制。向50 mL锥形瓶中加入5 mL琼脂糖溶液(10 g/L)、5 mL纤维蛋白原溶液(2.2 g/L)和100 μL (10 IU)凝血酶,混匀,及时倒入洁净干燥的培养皿中,室温放置1 h,待纤维蛋白凝块形成后打孔备用。稀释8个不同浓度的尿激酶标准品溶液,绘制纳豆激酶标准曲线,其具体实验操作见参考文献^[12]。取1 mL发酵液,8 000 r/min,离心2 min,向纤维蛋白平板中加入4 μL 上清液,37℃,孵育18 h,测量溶纤透明圈的直径,根据透明圈面积,在标准曲线上得到对应的NK酶的酶活力大小。

2 结果与讨论

2.1 尿激酶标准曲线

由图1可知,NK标准曲线线性关系为 $Y=2.373\ 55X-107.619\ 52$, $R^2=0.998$ 。根据测量纤维

平板上透明圈的直径,计算出透明圈面积,再利用NK标准曲线线性关系,则可以计算出发酵液纤溶酶活力。

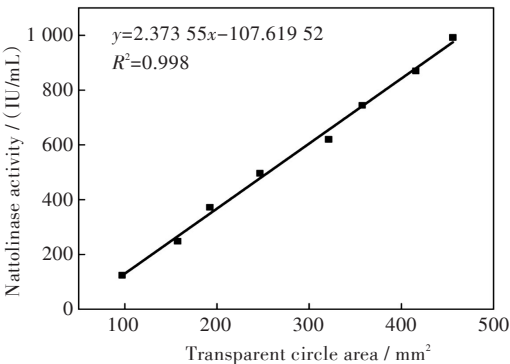


图1 NK标准曲线

Fig. 1 Nattokinase standard curve

2.2 单因素实验结果

2.2.1 不同碳源和氮源对NK酶活性的影响 如图2(a)所示,有机氮源与无机氮源相比,有机氮源能明显提高NK酶活力。其中以蛋白胨为氮源时,NK酶活力最高达到1 340.92 IU/mL;其次是以酵母粉为氮源时,NK酶活达到1 175.43 IU/mL;无机氮源(NH₄)₂SO₄相比其他无机氮源表现出较高酶活;这是因为NK酶是一种丝氨酸蛋白酶,其酶活可能需要蛋白质或蛋白质水解产物的参与^[13]。因此选蛋白胨为该工程菌株的最佳氮源,这与之前的文献报道一致^[14]。由图2(b)可知,不同碳源表现出的酶活差别不大,其中以葡萄糖为碳源时,NK酶活最高达到1 330.29 IU/mL;其次是以可溶性淀粉为碳源时,其NK酶活为1 157.75 IU/mL;乳糖被吸收利用的效果低于其他碳源。因此选葡萄糖是该菌株的最佳碳源,此前也有相同报道^[15-17]。

2.2.2 不同浓度碳源和氮源浓度对NK酶活的影响 有文献^[18]报道,谷氨酸钠是NK酶表达的显著影响因子,谷氨酸钠能够促进NK酶活力;柠檬酸钠是三羧酸循环的重要中间代谢产物,能促进谷氨酸的合成,从而能提高NK酶的活力。因此本研究研究了不同质量浓度谷氨酸钠和柠檬酸钠对NK酶活的影响。图3(a)显示,不同质量浓度的谷氨酸钠和柠檬酸钠对NK酶活性影响不大,这说明不同菌株间的合成调控机制不一样,对酶活影响的因素有差异。当不添加蛋白胨时,NK酶活力极低;随着蛋白胨质量浓度的增加,NK酶活力逐渐增加,当蛋白胨质量浓度为20 g/L时,NK酶活达到最大值1 320.64 IU/mL;当蛋白质量浓度大于40 g/L时,NK酶活明显下降;因此初步选择蛋白胨适宜质量浓度为20 g/L。不添加葡萄糖时,NK有少量

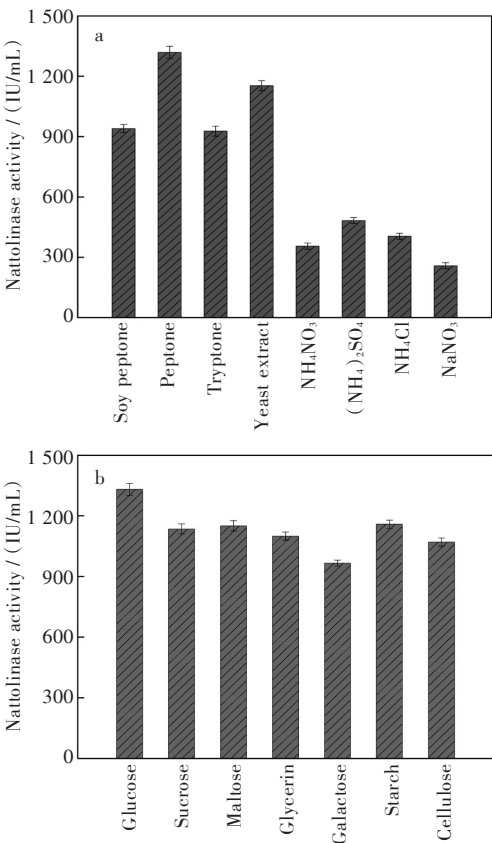


图2 对NK酶活性的影响:(a)氮源,(b)碳源

Fig. 2 Effects on nattokinase activity: (a) nitrogen source, (b) carbon source

活性,此时谷氨酸钠和柠檬酸钠可以充当碳源;当葡萄糖质量浓度为20 g/L时,NK酶活性达到最大值;因此葡萄糖质量浓度为20 g/L是最佳碳源浓度。

2.2.3 不同金属盐离子浓度对NK酶活性的影响 如图3(b)所示,当NaCl质量浓度为10 g/L时,NK表现出最高活性;随着NaCl质量浓度的增加,NK酶活呈下降趋势;当NaCl质量浓度接近40 g/L时,NK酶活下降显著;因此最佳NaCl质量浓度为10 g/L。不同质量浓度K₂HPO₄和KH₂PO₄对NK酶活性影响不大,MgSO₄和CaCl₂对NK酶活性影响显著。当MgSO₄质量浓度由0 g/L增加至1 g/L时,NK酶活呈明显上升趋势,随着MgSO₄质量浓度继续增加时,NK酶活开始逐渐下降;当CaCl₂质量浓度由0 g/L~0.5 g/L时,NK酶活呈明显上升趋势,随着CaCl₂质量浓度继续增加时,NK酶活开始呈下降趋势;因此最佳MgSO₄质量浓度为1 g/L,最佳CaCl₂质量浓度为0.5 g/L。

2.2.4 不同pH和接种量对NK酶活的影响 如图4(a)所示,pH值对NK酶活影响略大,当pH值为6~9时,NK表现出高活性,差异不明显;其中当pH为7.0时,NK酶活性相对较高;在强酸性条件,NK酶表现出低活性,这是因为在酸性条件下,纳

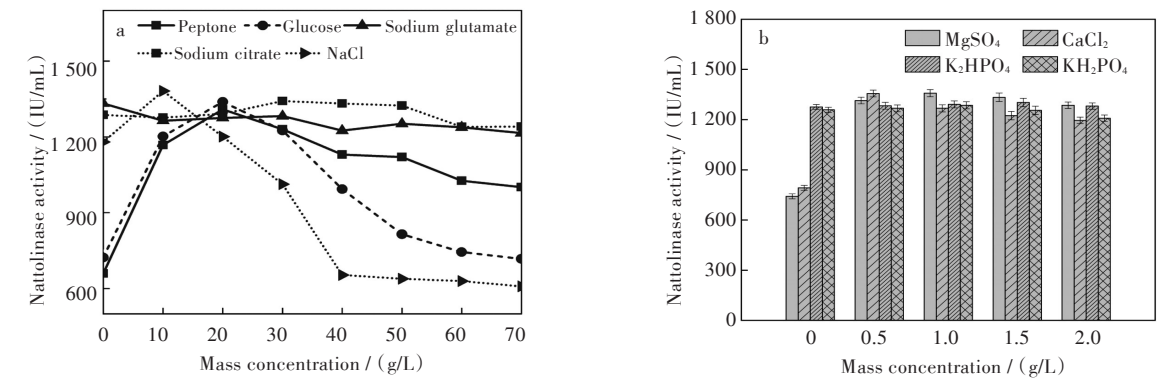


图 3 对NK 酶活的影响:(a)碳源和氮源质量浓度,(b)金属盐离子质量浓度

Fig. 3 Effects on nattokinase activity : (a) carbon and nitrogen source mass concentration , (b) ion salts mass concentration

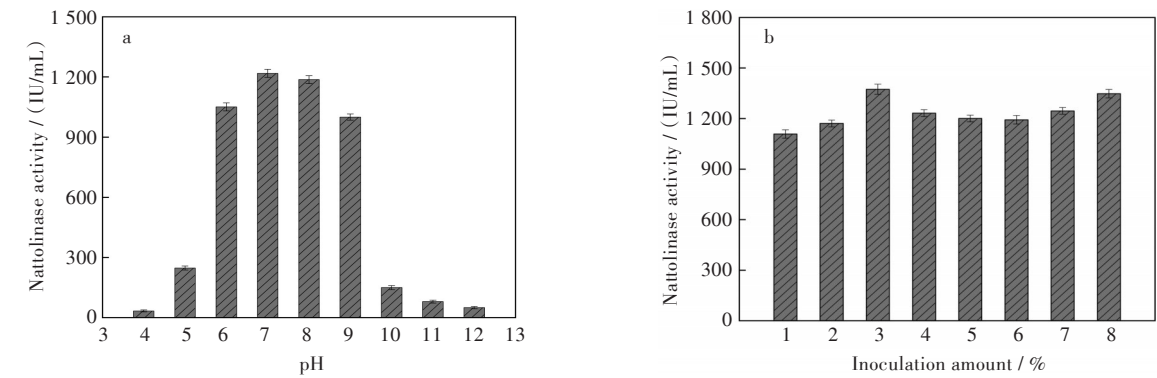


图 4 (a)不同 pH 值和(b)接种量对NK 酶活的影响

Fig. 4 Effect of (a) pH and (b) inoculation amount on nattokinase activity

豆激酶缺乏功能和结构的稳定性^[19]。图4(b)中,接种量对NK 酶活性影响不明显,当接种量为3%时,NK 酶活力略高。

2.3 响应面法优化发酵条件结果分析

2.3.1 响应面实验因素水平设计 以蛋白胨(A)、葡萄糖(B)、MgSO₄(C)、CaCl₂(D)、pH(E)为自变量,以透明圈直径为响应面值,进行五因素三水平响应面实验,实验因素水平见表1,五因素三水平响应面实验设计及实验结果见表2。

表 1 响应面因素水平表

Tab. 1 Factors and levels in response surface analysis

变量	实验因素水平		
	-1	0	1
A(Peptide) / g / L	0	15	30
B(Glucose) / g / L	0	15	30
C(MgSO ₄) / g / L	0	0.75	1.5
D(CaCl ₂) / g / L	0	0.5	1
E(pH)	6	7.5	9

2.3.2 模型建立及显著性分析 利用软件 Design-Expert8.0.6 中的 Box-Behnken 模块对表 2 进行多元回归拟合分析,得到透明圈直径(Y)二次多元回归模型方程:

$$Y=26.21+3.34A+2B+4.25C-0.590+0.94E-0.62AB+1.11AC-0.13AD-0.56AE+0.89BC+0.45BD+2.36BE+0.68CD+0.48CE+1.36DE-2.21A^2-2.63B^2-2.85C^2-1.89D^2-0.91E^2$$

回归方程决定系数 R²=0.914 7, 信噪比 RSN=13.754。由表 3 可知,模型 F 值为 13.41, P<0.000 1, 显著性显示为极为显著,表明回归方程的拟合度和可信度较高,可用此模型对实验结果进行分析。

由表 3 可知,蛋白胨(A)、葡萄糖(B)和 MgSO₄(C) 方差分析表中 P<0.000 1, 说明 A,B,C 对 NK 酶活影响是极为显著的;交叉项 BE 对酶活的影响显著;其他交叉项对酶活影响不显著;平方项 A², B², C², D² 对酶活影响极为显著。

表2 Box-Behnken试验设计及结果
Tab. 2 Design and results of Box-Behnken experiments

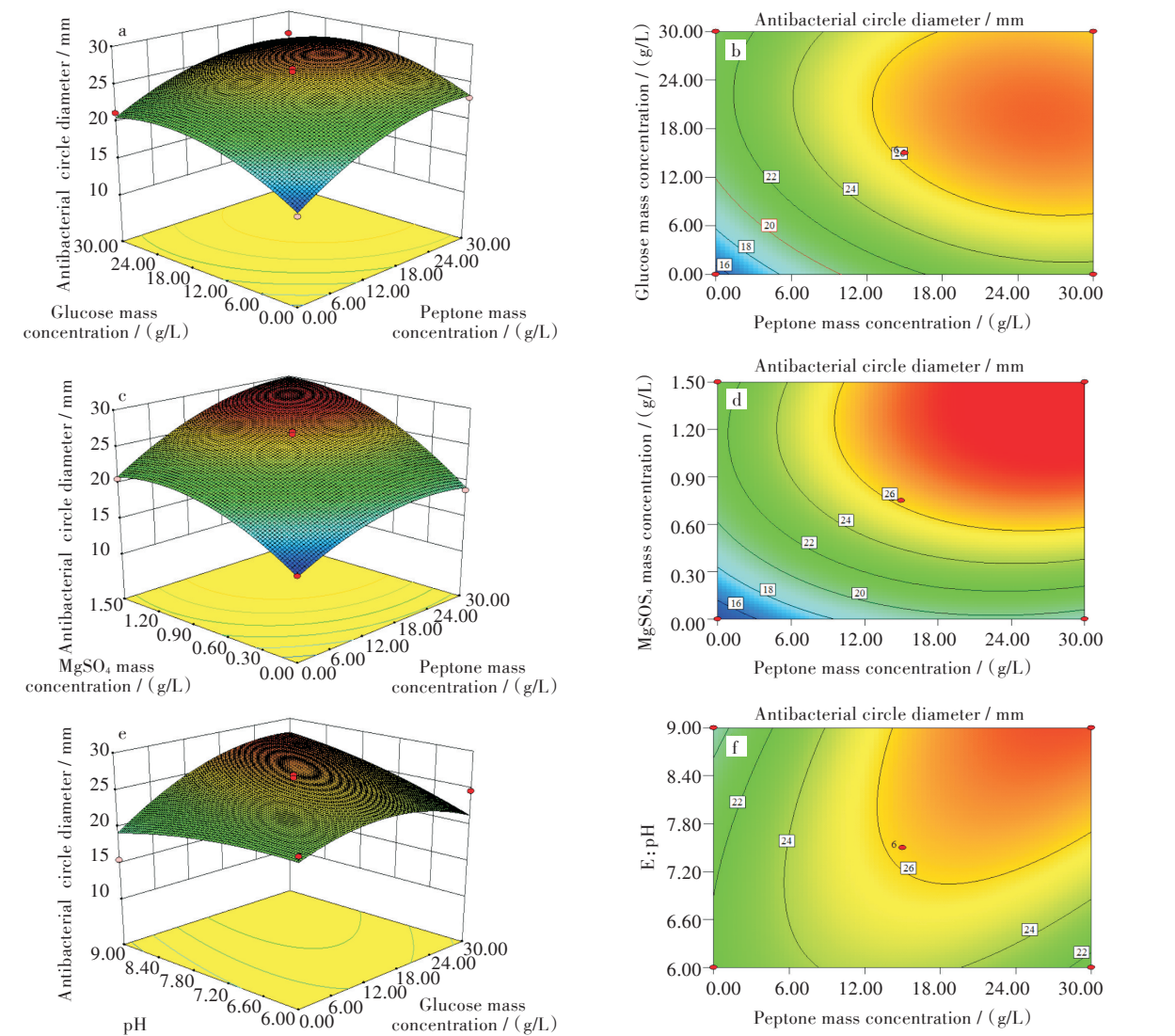
试验号	蛋白胨质量浓度(A)/ (g/L)	葡萄糖质量浓度(B)/ (g/L)	MgSO ₄ 质量浓度(C)/ (g/L)	CaCl ₂ 质量浓度(D)/ (g/L)	pH(E)	透明圈直径/mm
1	0	-1	0	0	-1	22.78
2	-1	-1	0	0	0	14.93
3	1	0	-1	0	0	18.73
4	0	0	1	-1	0	26.00
5	-1	1	0	0	0	21.23
6	0	0	1	0	-1	25.69
7	0	0	0	0	0	25.83
8	0	0	0	1	-1	19.73
9	0	-1	-1	0	0	15.79
10	0	0	0	0	0	26.02
11	0	0	-1	0	1	18.07
12	0	1	0	-1	0	22.92
13	0	0	-1	0	-1	17.54
14	0	-1	0	1	0	19.86
15	0	0	1	0	1	28.16
16	1	0	0	-1	0	26.33
17	0	0	1	1	0	25.9
18	0	0	0	0	0	26.14
19	-1	0	-1	0	0	14.78
20	1	1	0	0	0	26.79
21	0	1	0	1	0	22.33
22	0	0	0	-1	-1	21.23
23	0	0	0	0	0	26.54
24	1	-1	0	0	0	22.96
25	0	0	0	1	1	27.71
26	1	0	0	0	1	28.77
27	-1	0	0	0	1	21.98
28	0	-1	0	0	1	15.5
29	1	0	0	0	-1	26.55
30	0	1	-1	0	0	16.81
31	0	0	0	0	0	25.78
32	-1	0	0	1	0	17.49
33	0	0	0	-1	1	23.77
34	0	0	-1	-1	0	19.35
35	-1	0	0	0	-1	17.54
36	1	0	0	1	0	23.05
37	-1	0	1	0	0	20.6
38	0	-1	1	0	0	22.82
39	0	1	1	0	0	27.41
40	0	0	0	0	0	26.96
41	-1	0	0	-1	0	20.23
42	0	1	0	0	1	26.79
43	0	1	0	0	-1	24.65
44	0	-1	0	-1	0	22.26
45	1	0	1	0	0	28.98
46	0	0	-1	1	0	16.53

表 3 响应面二次回归方程模型方差分析结果
Tab. 3 ANOVA for Response Surface Quadratic Model Analysis of variance table

来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
Model	714.49	20	35.72	13.41	< 0.000 1	***
<i>A</i> -Peptone	178.09	1	178.09	66.85	< 0.000 1	***
<i>B</i> -Glucose	64.12	1	64.12	24.07	< 0.000 1	***
<i>C</i> -MgSO ₄	288.66	1	288.66	108.36	< 0.000 1	***
<i>D</i> -CaCl ₂	5.63	1	5.63	2.11	0.158 5	
<i>E</i> -PH	14.14	1	14.14	5.31	0.029 8	
<i>AB</i>	1.53	1	1.53	0.57	0.456 3	
<i>AC</i>	4.91	1	4.91	1.84	0.186 9	
<i>AD</i>	0.073	1	0.073	0.027	0.869 9	
<i>AE</i>	1.23	1	1.23	0.46	0.502 7	
<i>BC</i>	3.19	1	3.19	1.20	0.284 5	
<i>BD</i>	0.82	1	0.82	0.31	0.584 2	
<i>BE</i>	22.18	1	22.18	8.33	0.007 9	**
<i>CD</i>	1.85	1	1.85	0.69	0.412 6	
<i>CE</i>	0.94	1	0.94	0.35	0.557 6	
<i>DE</i>	7.40	1	7.40	2.78	0.108 1	
<i>A</i> ²	42.45	1	42.45	15.93	0.000 5	**
<i>B</i> ²	60.42	1	60.42	22.68	< 0.000 1	***
<i>C</i> ²	71.07	1	71.07	26.68	< 0.000 1	***
<i>D</i> ²	31.27	1	31.27	11.74	0.002 1	**
<i>E</i> ²	7.26	1	7.26	2.73	0.111 3	
Residual	66.60	25	2.66			
Lack of Fit	65.56	20	3.28	15.73	0.303 1	
Pure Error	1.04	5	0.21			
Cor Total	781.09	45				

2.3.3 响应面分析 图 5 为响应面分析曲面图和等高线图,反应了五因素之间的相互交叉作用对酶活的影响。根据模型求响应面的极值点,最佳发酵条件为:蛋白胨 26.05 g/L,葡萄糖 29.29 g/L, MgSO₄ 1.5 g/L, CaCl₂ 0.74 g/L, pH 9.0, NK 酶最高

酶活为 2 246.33 IU/mL。以最佳发酵条件进行实验验证,重复实验 3 次,取 NK 酶活平均值为 2 186.17 IU/mL,与预测值接近,表明该模型是可行的,具有一定的实践价值。



注:(a)(c)(e)响应面图,(b)(d)(f)等高线图

图5 各因素间相互作用对纳豆激酶酶活影响:(a)(b)蛋白胨质量浓度和葡萄糖质量浓度相互作用,(c)(d)蛋白胨质量浓度和MgSO₄质量浓度相互作用,(e)(f)葡萄糖质量浓度和pH相互作用

Fig. 5 Response surface plots and contour line showing the interaction between each factor and nattokinase activity: (a)(b) effects of petone and glucose mass concentration interaction on nattokinase activity, (c)(d) effects of petone and MgSO₄ mass concentration interaction on nattokinase activity, (e)(f) effects of glucose mass concentration and pH interaction on nattokinase activity

3 结 语

本次研究对影响枯草芽孢杆菌基因工程菌株产纳豆激酶的发酵培养参数进行了初步探讨。通过单因素实验和响应面 Box-Behnken 模型优化液体发酵培养参数,其中有机氮源的利用率明显高于无机氮源,这可能是因为 NK 酶活需要蛋白质或蛋白质水解产物的参与;不同碳源对酶活影响不大,从经济角度来考虑可以选择可溶性淀粉作为碳源;金属离子 K⁺ 和 PO₄³⁻ 对 NK 活性影响不明显,而 Mg²⁺ 和 Ca²⁺ 对 NK 活性影响显著;该菌株在 pH

6~9 的环境下,生长状态良好且产物 NK 表现出高酶活。本次研究获得了 NK 最优液体发酵条件:蛋白胨 26.05 g/L,葡萄糖 29.29 g/L,MgSO₄ 1.5 g/L,CaCl₂ 0.74 g/L,NaCl 10 g/L,pH 9.0,接种量 3%。在最佳发酵条件下,IPTG 诱导发酵 6 h,NK 获得最高酶活为 2 186.17 IU/mL,比优化前提高了 269%。基因工程菌比野生菌株发酵产物 NK 表现出更高活性,且发酵产物杂蛋白少,为高纯度的 NK 的高纯化奠定了一定的基础,为未来制备预防、治疗血栓等心血管疾病临床药物的开发提供了新思路^[20]。

参考文献:

- [1] WEI X T, ZHOU Y H, CHEN J B, et al. Efficient expression of nattokinase in *Bacillus licheniformis*: host strain construction and signal peptide optimization [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2015, 42 (2) : 287–295.
- [2] CAI D B, ZHU C G, CHEN S W. Microbial production of nattokinase: current progress, challenge and prospect World [J]. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 2017, 33 (5) : 84–89.
- [3] YAMASHITA T, ODA E, GIDDINGSB J C, et al. The effect of dietary *Bacillus natto* productive protein on in vivo endogenous [J]. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 2003, 33 (3) : 138–143.
- [4] CHIEN-HSUN H, MING-CHING S, JEN-SHIU L. Nattokinase decreases plasma levels of fibrinogen, factor VII, and factor VIII in human subjects [J]. *Nutrition Research*, 2009, 29 (3) : 190–196.
- [5] 刘蓓欣, 胡桃红. 血栓性疾病抗栓治疗的研究进展 [J]. *中国临床医生*, 2013, 41 (5) : 1–3.
- [6] ESZTER P, TAMAS A, RALPH E, et al. Effects of nattokinase, a pro-fibrinolytic enzyme, on red blood cell aggregation and whole blood viscosity [J]. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2006, 35 (1/2) : 139–142.
- [7] 高泽鑫, 何腊平, 刘亚兵. 纳豆激酶研究进展与展望 [J]. *中国酿造*, 2017, 36 (8) : 11–15.
- [8] MAHAJAN P, GOKHALE S, LELE S. Production of nattokinase using *Bacillus natto* NRRL 3666: media optimization, scale up, and kinetic modeling [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2010, 19 (6) : 1593–1603.
- [9] FATEMEH D, MANICA N, AYDIN B, et al. Nattokinase: production and application [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98 (22) : 9199–9206.
- [10] 王萍, 陈钧, 杨小明, 等. 纳豆激酶分离纯化及纤溶活性研究 [J]. *食品科学*, 2005, 26 (2) : 59–63.
- [11] 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 (1) : 418–423.
- [12] 熊迎新, 尹宗宁, 杨超, 等. 纳豆激酶活性测定方法的研究 [J]. *药物生物技术*, 2006, 13 (2) : 140–143.
- [13] CHO A Y H, SONG A J Y, KYUNG M K, et al. Production of nattokinase by batch and fed-batch culture of *Bacillus Subtilis* [J]. *New Biotechnology*, 2010, 27 (4) : 341–346.
- [14] DEEPAK V, KALISHWARALAL K, RAMKUMAR-PANDIAN 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.
- [15] FISHER S H, SONENSHEIN A L. Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis* [J]. *Annual Review Microbiology*, 1991, 45 (1) : 107–135.
- [16] 王常苏, 孙晓彤, 余洁, 等. 纳豆激酶高活性菌株 BN-05 鉴定及发酵工艺优化 [J]. *中国酿造*, 2014, 33 (1) : 91–95.
- [17] PRAFULLA M M, SAGAR V G, SMITA S L. Production of nattokinase using *Bacillus natto* NRRL 3666: media optimization, scale up, and kinetic modeling [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2010, 19 (6) : 1593–1603.
- [18] 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.
- [19] 黄妍, 张助力, 张迎庆. 纳豆激酶分离纯化研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43 (12) : 283–288.
- [20] 崔青, 钱炳俊, 姚晓敏, 等. 纳豆激酶基因工程菌的构建及酶活力分析 [J]. *食品科学*, 2017, 38 (14) : 1–8.

本文编辑: 张 瑞