纳豆激酶分子结构与潜在应用价值分析

马国兴[1,2]，潘 峰[1,2]，王庆波[1,2]，温春光[1,2]，吴雅清[1,2]，许瑞安[*1,2]
（1. 华侨大学 分子药物研究院，福建 厦门 361021；2. 分子药物教育部工程研究中心，福建 厦门 361021）

摘要：纳豆激酶因具有较强的溶血能力而著称。目前国内外大量研究人员聚焦于纳豆激酶研究，其开发利用已经获得了长足发展，但同时许多问题与不足也随之暴露出来。一方面是对纳豆激酶的开发利用大多局限于溶栓活性的利用与开发，低估了纳豆激酶应有的整体价值；其次是针对该酶开发和利用的方法过于传统，尚未形成组学大数据和生物信息学技术相结合的探索思维。因此，需要利用更为开阔的研究思路和开发手段来实现纳豆激酶开发利用的最大化。作者从纳豆激酶分子水平和家族分类层次上系统地阐述该酶分子特征，同时对纳豆激酶家族蛋白酶的应用现状进行分析，并对纳豆激酶研发前景进行了展望。

关键词：纳豆激酶；保守区域；枯草芽孢杆菌蛋白酶；Peptidase-S8-subtilian-subset 蛋白酶家族
中图分类号：Q 815　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2016)04—0342—08

A Review on the Molecular Structure of Nattokinase and Its Potential Application

MA Guoxing[1,2]，*PAN Feng*[1,2]，*WANG Qingbo*[1,2]，*WEN Chunguang*[1,2]，*WU Yaqing*[1,2]，*XU Ruian*[*1,2]
（1. Institute of Molecular Medicine，Huaqiao University，Xiamen 361021，China；2. Engineering Research Center of Molecular Medicine，Ministry of Education，Xiamen 361021，China）

Abstract：Nattokinase (NK) is well known for its strong thrombolytic property. However, methods for exploring the enzyme are still traditional and its value is thus underestimated. In this review, the structure and the classification for NK were summarized. Based on the applications of NK family proteases, the potential utilizations of NK were predicted.

Keywords: Nattokinase(NK)，conserved domains，subtilisin proteinase，Peptidase-S8-family-subtilian-subset- superfamily

纳豆激酶(Nattokinase，NK) 最早是由日本学者Sumi 等[1]从一种发酵食品纳豆中分离得到的，他们通过纤维平板实验发现 NK 具有优异的溶解纤维平板活性而名声大噪，NK 也经常被称为纤溶酶(fibrinolysin)。纳豆是日本的一种传统大豆发酵食品，因此 NK 被人们喜闻乐道。随后，Sumi 等又发起了对 NK 分子特性的探究，深入研究发现 NK 是由纳豆发酵中枯草芽孢杆菌分泌的一类丝氨酸蛋白酶(Serine protease)。NK 的分子结构、分类和发掘利用广泛引起国内外其他研究人员关注，经过多年

收稿日期：2015-07-08
基金项目：国家自然科学基金项目(81271692)；国家 863 计划项目(2012AA020810)。
作者简介：马国兴(1987—)，男，河北唐山人，生物化工博士研究生，主要从事生物化工与基因工程药物，生物信息学等研究。E-mail：mgxtongchi@163.com
*** 通信作者**：许瑞安(1948—)，男，福建泉州人，教授，主要从事微生物学、生物化学与分子生物学、海洋生物资源与环境、基因药物等研究。E-mail：hmmedu@hqu.edu.cn

的大量研究已经基本摸清了 NK 的分子特性,生物信息学分析发现 NK 属于枯草杆菌蛋白(Subtilisin)超家族,并且与 Subtilisin E 十分接近都属于 Peptidase-S8-subtilian-subset 家族。该家族蛋白酶在精细化工,医药和食品行业均表现出非常高的开发利用价值。同时对 NK 生物信息学分析必将为进一步开发利用 NK 提供更大的空间。

1 纳豆激酶分子结构

1.1 一级结构

1982 年 Nakamura[2]等通过 *E.coli* 宿主-载体系统中克隆出 NK 基因—aprN,并利用鸟枪法测定了包括调控序列在内的 1 473 bp 的完整基因序列,使利用生物信息学研究 NK 基因成为可能。NK 基因的起始密码子为 GTG,随后的 1 143 bp 序列是由编码信号肽、前导区域、成熟肽组成的 381 个的氨基酸阅读框架[3]。结构基因是 TAA、TAA、TAG 连续 3 个终止密码子,该基因终止是以非依赖 ρ 因子终止方式,在密码子之后一段回文序列可形成茎环结构辅助转录终止。起始密码子的上游-17 bp 处为核糖体结合起点 AAAGGAG 序列,SD 序列上游是 GC 含量低于 28%的转录调控区域[4]。成熟纳豆激酶由长为 275 个氨基酸的单链多肽折叠而成。通过 SDS-PAG 凝胶电泳和蛋白序列预测分析 NK 相对分子质量约为 28 000[4-5],与 Sumi 等用 Sephadex G-100 柱凝胶过滤法测得结果存在一些差异。未经修饰的 NK 是包含 381 个氨基酸残基的蛋白前体。蛋白前体分为 3 部分:其中从 N 端第 1-29 个氨基酸残基形成信号肽,第 30~106 个氨基酸残基形成前导区域也称前导肽(pro-peptide)。NK 信号肽包含一个带 3 个正电荷的亲水 N 端以及一段不带电荷的疏水残基序列,使得 NK 正常分泌到胞外,其切割位点位于 Ala-Glu-Ala 保守序列之后。去掉信号肽的部分(含前导肽和成熟区域)为纳豆激酶酶原(pro-nattokinase,pro-NK),该区域对重组 NK 意义重大。加工修饰后会切掉 N 端 106 个氨基酸基的前导肽,剩余的 275 个氨基酸残基折叠成具有活性的成熟NK。

1.2 保守结构域

NK 具有非常保守的结构域(conserve domains),这对 NK 的分类具有重要意义,根据保守区域分析 NK 属于枯草杆菌蛋白酶(Subtilisin)超家族的一类(Peptidases-S8-Sub-tilisin-subset),与该家族蛋白酶类似,成熟 NK 的活性部位存在保守性,在 Asp32、His64 和 Ser221 表现出保守性,底物结合部位保守位点位于 Ser125、Leu126、Gly127 处,氧离子穴是 Asn155[2,6],这些位点均存在进化保守性,可以作为该家族蛋白酶身份识别位点。NK 与该家族一些蛋白酶一级结构存在高度相似性,NK 与枯草芽孢杆菌 168(B.subtilis 168)产生的枯草杆菌蛋白酶 E(Subtilisin E)基因序列存在 13 个碱基不同,在肽链序列组成上仅存在 2 个氨基酸残基的差异,序列同源性高达 99.5%。相应的,NK 与枯草杆菌解淀芽孢杆菌变种(B.subtilis var. amylosacchariticus)产生的枯草杆菌蛋白酶(subtilisin amylosacchariticus)在核酸序列和肽链序列上仅有 27 个核苷酸和 4 个氨基酸的差异,成熟肽链序列同源性为 99.3%。此外,NK 与解淀粉芽孢柑橘(Bacillus amyloliquefaciens)产生的枯草杆菌蛋白酶 Bpn′(Subtilisin Bpn′)和地衣芽孢杆菌(Bacillus hcheniiformis)产生的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg(Subtilisin Carlsberg)的肽链序列同源性也高达 86%和 72%之多,并且催化中心不变。保守区域和序列信息为 NK 分类提供提供重要依据。

1.3 高级结构

一些研究发现 NK 在结构上与其家族蛋白酶存在差异,这也是 NK 被看作成单独的一种蛋白酶重要依据。随着生物信息学深入研究发现 NK 与 Subtilisin E 的一级结构具有高度相似性,尤其是存在差异的突变位点的氨基酸对蛋白酶的结构活性基本不会产生什么影响[7]。因此可以推断 NK 与其他的枯草芽孢杆菌的蛋白折叠与结构相似性极高。Subtilisin E 的结构和机理研究比较清楚,其蛋白结构与折叠方式作为 NK 蛋白结构研究具有非常重要的参考价值[8]。与其他的 subtilisins 类似,具有高级结构的 NK 是由一条长的氨基酸序列折叠形成,并且不需要二硫键辅助折叠[2],成熟区域的 NK 形成特定的空间结构域,包含催化三联体(Asp32,His64,Ser221)和富氧离子穴(N155)[9-10],保守结构位点都位于两个 α 螺旋和 7 个 β 折叠链形成的口袋结构域中。NK 的结晶呈针状结晶,X 射线晶体衍射分析 NK 属于 C2 分子空间群属,单晶格参数 a,b,c 分别为 7.43,4.99,5.63 nm[11]。第一个模拟 NK 的 3D 结构[7] 是由中国武汉大学病毒学重点实验室使用 MODELLER 和 PROCHECK 模拟程序模拟完成。这

有助于我们更形象的了解 NK 结构，空间结构显示保守区域位点能够在碱性环境中稳定的存在于富氧离子穴中。NK 是一种钙离子结合蛋白，预测纳豆激酶蛋白高级结构至少结合两个钙离子才能得以维持或者辅助 NK 形成特有的结构。subtilisin E 存在一个与稳定相关的高亲和钙离子结合位点，其他钙离子结合位点则均表现出与折叠相关[12]。钙离子与氨基酸残基共同维持 NK 催化活性中心结构的准确性。目前对 NK 的高级结构研究还不是很透彻，但可以确定的是 NK 的高级结构与其他家族蛋白酶存在差异，并且活性中心保守，从结构角度可以说明了 NK 家族蛋白酶多样性的可能。

1.4 前导肽

NK 基因成熟区与信号肽之间存在一段 231bp 序列，可表达包含 77 个氨基酸残基在内前导肽。该前导肽区域广泛存在于 Subtilisin 家族蛋白酶的 N 端，非常有意思的是这一段氨基酸残基的功能类似于分子伴侣功能(molecular chaperones)。它能辅助蛋白正确折叠功能，并且辅助折叠过程中不需要 ATP 提供能量，因此该段区域也被称为分子内伴侣(Intramolecular Chaperone)[13]。研究发现前导肽伴随着整个蛋白的折叠过程，并且前导肽对辅助折叠的蛋白还表现出蛋白酶抑制活性，最终该前导肽也像分子伴侣那样经过自身的剪切被去掉，从而最后形成具有活性的蛋白酶，整个 pro-subtilisin 激活过程可分为 3 个步骤：(1) subtilisin 结构域折叠，(2)前导肽辅助 subtilisin 自动折叠，(3) subtilisin 的激活伴随着前导肽切割[14]。整个的折叠过程如图 1 所示。

没有前导肽的成熟区折叠形成一个不具活性的形式的熔融球状体结构[15]。在研究 sbutilisin E 中发现该区域不仅在辅助折叠过程，而且具有对变性蛋白具有很好的复性效果[13]。前导肽与枯草杆菌蛋白酶成熟活性具有密切的关系[14,16]，如果该区域发生突变对蛋白的正确折叠会带来毁灭性的影响[17-18]。对前导肽的一些区域进行突变研究，发现许多氨基酸突变位置都对前导肽功能有很大影响，这也说明前导肽对蛋白酶的正确折叠具有至关重要的作用。多数 NK 编码框中都有前导肽序列，最近也一直争论重组的 NK 是否将前导肽与成熟区共表达的问题，但是随着对前导肽的深入了解，成熟肽与前导肽共表达的方法更可取。此外，已在枯草杆菌和链激酶中发现一些 NK 同源基因。

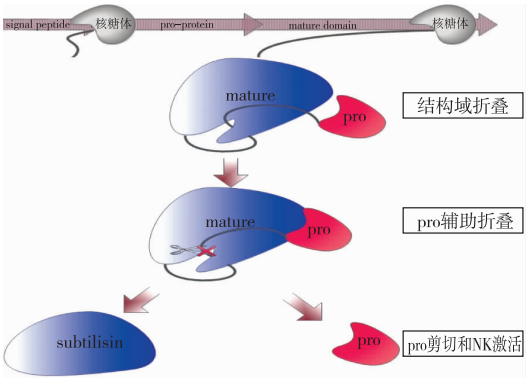


图 1 NK 正确折叠机制

Fig. 1 Folding mechanism of NK

2 纳豆激酶家族

2.1 家族分类

早在 1967 年 Markland 和 Smith 等就对枯草芽孢杆菌中提取的 Subtilisin 进行了氨基酸测序[19]，此后，根据序列的保守区域分析该种 Subtilisin 与 NK 是同一家族的蛋白酶。近年来通过对 NK 的分子生物学特性的研究也表明其与大多数 Subtilisin 具有许多类似的性质，例如，NK 在核苷酸序列及氨基酸组成上具有高度同源性，结构和性质上也表现出 Subtilisin 相似的特征。近年研究发现具有 NK 溶栓特性的酶不仅仅来源于纳豆发酵菌，海洋中的一些枯草芽孢杆菌也存在大量的溶栓活性酶[20]。

NK 与常见的 Subtilisin BPN'、Subtilisin Carlsberg、Subtilisin E 和 Subtilisin Savinase 丝氨酸蛋白酶相比较，序列惊人的相似，同源性分别为 84.9%、67.8%、98.9%和 62.92%[7]。其中 Subtilisin E 与纳豆激酶最为相近，序列相似度达到 98.9%，保守结构域完全一致，并且高级结构也达到 99%的相似度。因此，NK 分类可以划分到微生物丝氨酸蛋白酶超家族 Peptidases-S8-Subtilisin-subset 家族中，其 NCBI 分类：cd07477。NK 与家族分类关系(如图 2)。

该家族含有许多种 subtilisins，如 TK-subtilisin，Subtilisin Carlsberg，Subtilisin E 和 subtilisins BPN'等。其中有一些研究比较透彻的蛋白酶，如 Subtilisin BPN'，Subtilisin Carlsberg 等。Subtilisin BPN'早在 1965 年[21]就被发现并报道，通过氨基酸测序发现 Subtilisin BPN' 与 Subtilisin Carlsberg 中存在 83 个氨基酸的差异[22]。Subtilisin BPN'很早就被广泛地应用到工业领域，例如在洗涤剂行业[23]。此家族中还一些极具工业开发利用价值

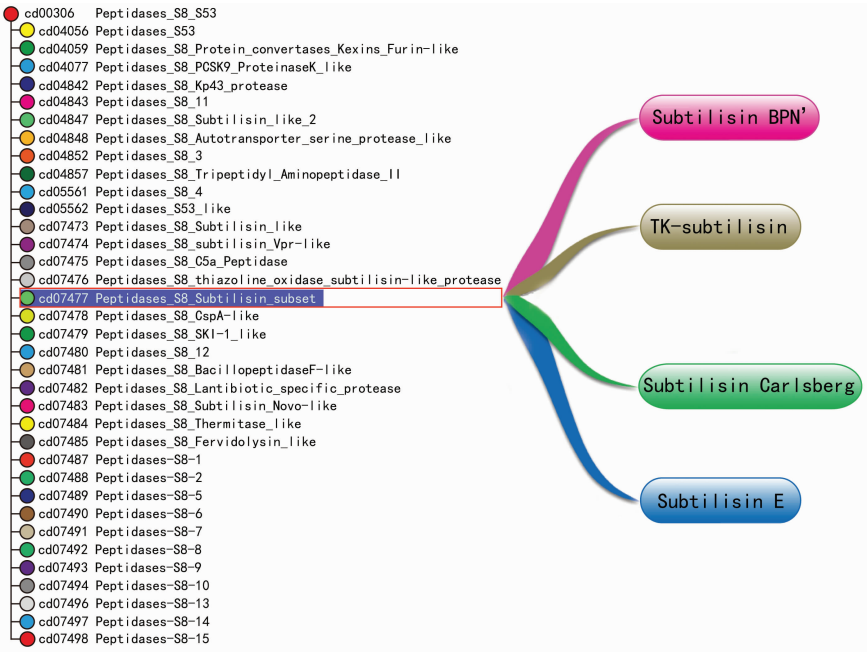


图 2　NK 家族蛋白酶(cd07477)分类关系简图

Fig. 2　A taxonomic chart of the NK proteinase family(cd07477)

的蛋白酶,例如 TK-subtilisin,该酶是从一些极端环境微生物中发现的,具有非常强的热稳定性等特点[24],更适应工业生产粗泛环境。药用研究价值最相关的是 Subtilisin E,它与 NK 结构和活性相似。这些家族蛋白酶开发利用对 NK 开发具有非常重要的参考价值,近 10 年来 NK 除溶栓以外,已逐渐被应用到其他应用领域(见表 1)。

表 1　近 10 年来年对 NK 非溶栓活性功能开发利用状况

Table 1　Development and utilization of NK in the past decade for the non-fibrinolytic properties

研究人员	研究领域	参考文献
Kim; Yang; Fujita; DeDea; Suwanmanon	调节血压	[25][30][31][32][35]
Takano	临床治疗	[26]
Hsu; Chen;Fadl; Ahmed	临床治疗	[27][37][39][40]
Wang; Borah	工业垃圾处理	[28][36][42]
Wang; Upadhyay; Minn; Lim	工业添加剂	[29][33][34][41]
Nguyen	洗涤剂	[38]

2.2　多样性分析

随着微生物基因组学研究不断推进和功能蛋白的深入挖掘,发现该蛋白家族存在分布广,性质多样,结构多样等特点,而且均为枯草杆菌样蛋白酶,说明该家族蛋白酶可能在枯草杆菌属基因组中十分丰富,此外,常见的芽孢杆菌属(Bacillus)的基因组也普遍存在该家族蛋白酶基因,例如目前发现的地衣芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、缓慢芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌和南极嗜冷芽孢杆菌等[43]。最近随着越来越多的微生物基因组的测序分析完成,发现该家族蛋白酶不仅仅存在于芽孢杆菌属,在多种细菌,放线菌,真菌中亦有存在,表明该家族酶分布极为广泛。

结构和性质多样性主要是指蛋白分子结构多样性从而体现的性质多样,例如序列长度、蛋白晶体结构等信息。该蛋白家族除了保守区域以外,也发现存在一些其他的氨基酸残基表达序列,这可能为酶分子结构和酶学性质的改变提供了一些线索。首先,酶的相对分子质量有变化,基因组中的一些蛋白酶的预测相对分子质量已经远远超过常见 28 000。该家族蛋白酶结构也存在多样性,其中发现的同种 TK-subtilisin 就存在 4 种不同的晶体结构,发现有 7 个可能与钙离子结合区域的不同,造成结构产生差异[12,15]。其次就是酶学性质的改变,例如嗜碱,耐高盐,耐高温,耐低温等,同时还有一些表现出一定的表面活性剂耐受能力[44]。这说明该蛋白酶家族并非是特别严紧的特异性蛋白酶,也说明长期进化可能是该酶家族出现多样性结果重要因素。

3 纳豆激酶家族蛋白酶应用价值分析

3.1 皮革行业中的应用

脱毛技术是皮革工业生产中的一个重要环节，是否有效的使用脱毛剂对皮革的生产质量至关重要，碱性丝氨酸蛋白酶(Alkaline Serine Protease) 溶解毛羽是一种行之有效的脱毛方法，与传统的皮革脱毛方法相比酶法脱毛不仅可以保护和软化皮革并且环保高效[45]。皮革脱毛技术可选的酶种类比较多，放线菌、细菌、霉菌中均存在脱毛相关蛋白酶[46]。NK 家族蛋白酶可以破坏毛发毛根固着结缔组织让毛发松动并脱落，是一种高效脱毛蛋白酶，因此也被应用到皮革脱毛技术中。Bassem 等[47]从短芽孢杆菌 US575 菌株(Brevibacillus brevis US575) 中分离得到的 29 000 角蛋白酶(Peptidases-S8-Subtilisin-subset) 对鸡、山羊、兔子、牛、绵羊毛皮均具有良好的脱毛效果。目前，国内也展开了脱毛相关蛋白基因的克隆表达研究，如黄庆等 [48] 等短小芽孢杆菌(Bacillus pumilus) 发现的脱毛蛋白酶也是 NK 蛋白酶家族的一员。肖怀秋等[49]从芽孢杆菌 BX24 中获得一种中性蛋白酶，并对酶的性质进行了一系列研究。此外，毛羽处理与环境保护有关，酶法处理毛羽条件温和且不易引起环境污染[50]。因此，表明该家族蛋白酶不仅具有较好的皮革工业应用价值，还具有一定的环境垃圾处理功能[51]，但目前仍缺乏 NK 在皮革行业脱毛工艺应用的相关研究。

3.2 洗涤剂行业中的应用

洗涤剂添加酶是一个研究热点，由于目前市场上流行的洗涤剂仍存在诸多缺点，例如不同的表面活性剂的物理作用，无法同时胜任多种顽固污渍的处理。蛋白酶能将一些不易溶于水的大分子蛋白类污渍酶解成易溶于水的或易被表面活性剂乳化、增溶的小分子片段。同时，将蛋白质大分子所黏附或包裹的污垢颗粒快速释放，从而实现快速去污。当前市场上的许多洗涤剂产品都是通过添加蛋白酶来达到去蛋白质除污渍的目的，但存在洗涤剂中表面活性剂导致酶失活现象[52]。鹿桂乾等研究发现在 9 种液体洗涤剂添加表面活性剂中，只有 AEO7 和 AEO9 两种对酶的活性影响相对较小[53]，并且洗涤环境相对比较粗放，所以对于洗涤剂添加用酶要求很高，一种对表面活性剂和洗涤环境具有很强耐受性的酶是作为洗涤剂添加酶的必要前提。

Anissa 等在芽孢杆菌 A21 (Bacillus mojavensis A21) 中发现 BM1 和 BM2 两种碱性蛋白酶均具有很好的表面活性剂耐受能力，其中 BM1 通关过保守区域分析属于 NK 蛋白酶家族，相对分子质量大约 29 000，试验中表现出很好的表面活性剂耐受和环境适应能力。日前发现血红蛋白降解菌短小芽孢杆菌 NJM4 菌株(Bacillus pumilus NJM4) 对顽固性污渍(血液污渍)具有很强的分解能力[54]，可以对蛋白污渍有很好去除效果。NK 家族蛋白酶基因广泛存在于微生物基因组中，因此使用基因组学筛选具有洗涤剂应用价值的基因是一种快速高效的办法。这些具有工业应用价值的功能基因可以建立基因文库，并且此家族蛋白酶的基因已经被申请为洗涤剂添加剂专利[55]。

3.3 医药行中的应用

NK 作为辅助溶栓的保健品药物，已在欧美和日本盛行 20 多年，在心脑血管疾病治疗方面前景看好。不仅如此，NK 家族蛋白酶在抗菌、抗线虫、防止骨疏、阿尔茨海默病治疗和临床手术中同样存在不可估量的潜在应用价值。该家族蛋白酶能溶解菌体，具有广谱抗菌活性[56]。相关 NK 重组研究过程中 NK 表现出非常强的宿主菌毒性，重组工程菌株发酵过程常出现由 NK 溶菌活性所导致的菌体裂解现象，说明该家族蛋白酶具有非常好的溶菌抗菌价值。Antal 等克隆得到的 megA 巨大芽孢杆菌抗菌肽基因中也含有 NK 家族蛋白酶保守区域阅读框。推测巨大芽孢杆菌抗菌肽的抗菌功能与 substllin 溶菌能力具有密切关系。Niu 等从芽孢杆菌 B16 (*Bacillus sp.* B16) 分离的 NK 家族丝氨酸蛋白酶具有很好的线虫溶解活性，可以作为一种很好的线虫治疗药物，在线虫抑制碱性蛋白酶药学领域具有巨大的应用价值。该家族蛋白酶在医学领域也有非常大的开发利用价值，Takano 等 [26] 把纳豆激酶(substilin NAT) 应用到玻璃体切割手术中，最近研究发现纳豆激酶对淀粉样蛋白具有很好的溶解活性，说明有纳豆激酶可能对阿尔茨海默病也具有潜在医疗价值[27]。

3.4 食品和饲料行业的应用

蛋白酶具有分解大分子蛋白形成多肽，从而提高食品或饲料营养的作用。NK 本身的抗血栓和调节血脂的功效良好，因此豆豉和纳豆均可作为非常好的保健功能性食品[5]。利用蛋白酶水解能力可显

著提高食品营养吸收,1999 年 Gesualdo 等利用地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)产生的 Subtilisin Carlsberg 蛋白酶水解大西洋鲱鱼(*Clupea harengus*),从而提高营养价值。蛋白酶在饲料行业的应用也是倾向于蛋白酶对大分子蛋白的降解能力,提高家畜对饲料的利用率。NK 蛋白酶家族具有活性高和种类多样等特点,因此非常适合饲料行业高蛋白含量的豆粕和玉米饼的处理,可作为一种很好的饲料添加剂。

4 结语和展望

随着组学大数据时代的到来和生物信息学的发展,NK 的分子相关信息逐渐被一一解释。从分子角度出发,可以把 NK 定义为 Peptidases-S8-Subtilisin-subset 家族的一员,由于该蛋白酶家族具有分布广、结构多样和性质多变等特点,因此该家族具有非常广泛的开发和利用价值,例如医药、精细化工、食品和饲料等行业。但是,大量针对 NK 的研究还是局限和停留在基因发掘和血栓治疗上,受最近的一些研究启发,发现以目前研究方法思路远远无法实现 NK 价值开发和利用的最大化。目前,借助生物信息学技术从基因组寻找到更多更适合血栓治疗的基因已经成为可能,生物信息对功能基因发掘和利用都具有非常重要的意义。借鉴 NK 家族蛋白酶的相关性质和功能来挖掘 NK 工业和医学的潜在价值是一种非常好的手段。

参考文献:

[1] 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):1110-1111.

[2] 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.

[3] Jain,S.C.,et al.,The crystal structure of an autoprocessed Ser221Cys-subtilisin E-propeptide complex at 2.0 Å resolution[J]. **Journal of Molecular Biology**,1998,284(1):137-144.

[4] 江晓,董明盛,江汉湖. 一种食源性纤溶酶(纳豆激酶)酶学性质的研究[J]. 中国酿造,2002,21(1):23-25.
JIANG Xiao,DONG Mingsheng,JIANG Hanhu. Study on enzyme property of Nattokinase- a kind of food fibronolytic enzyme [J]. **China Brewing**,2002,21(1):23-25.(in Chinese)

[5] Fujita M,Nomura K,Hong K,et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme(nattokinase) in the vegetable cheese natto,a popular soybean fermented food in Japan [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,1993,197(3):1340-1347.

[6] Bryan P N. Protein engineering of subtilisin [J]. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**,2000,1543(2):203-222.

[7] Zheng Z,Zuo Z,Liu Z,et al. Construction of a 3D model of nattokinase,a novel fibrinolytic enzyme from Bacillus natto:A novel nucleophilic catalytic mechanism for nattokinase[J]. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**,2005,23(4):373-380.

[8] Yanagisawa Y,Chatake T,Naito S,et al. X-ray structure determination and deuteration of nattokinase [J]. **Journal of Synchrotron Radiation**,2013,20(6):0-0.

[9] Carter P,Wells J A. Dissecting the catalytic triad of a serine protease[J]. **Nature**,1988,332(6164):564-568.

[10] Bryan P,Pantoliano M W,Quill S G,et al. Site-directed mutagenesis and the role of the oxyanion hole in subtilisin [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,1986,83(11):3743-3745.

[11] 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:Structural Biology and Crystallization Communications**,2010,66(12):1670-1673.

[12] Uehara R,Angkawidjaja C,Koga Y,et al. Formation of the high-affinity calcium binding site in Pro-subtilisin E with the insertion sequence IS1 of Pro-Tk-subtilisin[J]. **Biochemistry**,2013,52(50):9080-9088.

[13] Li Y,Hu Z,Jordan F,et al. Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants[J]. **Journal of Biological Chemistry**,1995,270(42):25127-25132.

[14] Shinde U,Li Y,Chatterjee S,et al. Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,1993,90(15):6924-6928.

[15] Tanaka S,Matsumura H,Koga Y,et al. Four new crystal structures of Tk-subtilisin in unautoprocessed,autoprocessed and mature

forms:insight into structural changes during maturation[J]. **Journal of Molecular Biology**,2007,372(4):1055-1069.
[16] Siezen R J,de Vos W M,Leunissen J A M,et al. Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases,the family of subtilisin-like serine proteinases[J]. **Protein Engineering**,1991,4(7):719-737.
[17] Kojima S,Iwahara A,Hisano Y,et al. Effects of hydrophobic amino acid substitution in Pleurotus ostreatus proteinase A inhibitor 1 on its structure and functions as protease inhibitor and intramolecular chaperone [J]. **Protein Engineering Design and Selection**,2007,20(5):211-217.
[18] Kojima S,Minagawa T,Miura K. The propeptide of subtilisin BPN'as a temporary inhibitor and effect of an amino acid replacement on its inhibitory activity[J]. **FEBS Letters**,1997,411(1):128-132
[19] Markland F S,Smith E L. Subtilisin BPN'VII. Isolation of cyanogen bromide peptides and the complete amino acid sequence [J]. **Journal of Biological Chemistry**,1967,242(22):5198-5211.
[20] Agrebi R,Haddar A,Hmidet N,et al. BSF1 fibrinolytic enzyme from a marine bacterium Bacillus subtilis A26:Purification, biochemical and molecular characterization[J]. **Process Biochemistry**,2009,44(11):1252-1259.
[21] Matsubara H,Kasper C B,Brown D M,et al. Subtilisin BPN'I. Physical properties and amino acid composition [J]. **Journal of Biological Chemistry**,1965,240(3):1125-1130.
[22] Smith E L,Markland F S,Kasper C B,et al. The complete amino acid sequence of two types of subtilisin,BPN' and Carlsberg[J]. **Journal of Biological Chemistry**,1966,241(24):5974-5976.
[23] Maurer K H. Detergent proteases[J]. **Current opinion in Biotechnology**,2004,15(4):330-334.
[24] Uehara R,Tanaka S,Takano K,et al. Requirement of insertion sequence IS1 for thermal adaptation of Pro-Tk-subtilisin from hyperthermophilic archaeon[J]. **Extremophiles**,2012,16(6):841-851.
[25] Kim J Y,Gum S N,Paik J K,et al. Effects of nattokinase on blood pressure:a randomized,controlled trial [J]. **Hypertension Research**,2008,31(8):1583-1588.
[26] Takano A,Hirata A,Ogasawara K,et al. Posterior vitreous detachment induced by nattokinase (subtilisin NAT):a novel enzyme for pharmacologic vitreolysis[J]. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**,2006,47(5):2075-2079.
[27] Hsu R L,Lee K T,Wang J H,et al. Amyloid-degrading ability of nattokinase from Bacillus subtilis natto [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2008,57(2):503-508.
[28] 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.
[29] Wang S L,Yeh P Y. Purification and characterization of a chitosanase from a nattokinase producing strain Bacillus subtilis TKU007[J]. **Process Biochemistry**,2008,43(2):132-138.
[30] Yang N C,Chou C W,Chen C Y,et al. Combined nattokinase with red yeast rice but not nattokinase alone has potent effects on blood lipids in human subjects with hyperlipidemia[J]. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**,2009,18(3):310.
[31] 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 and Pharmaceutical Bulletin**,2011,34(11):1696-1701.
[32] DeDea L. The antiplatelet effects of aspirin;nattokinase as a blood thinner [J]. **Journal of the American Academy of Physician Assistants**,2010,23(12):13.
[33] Upadhyay V K,Kelly A L,McSweeney P L H. Use of nattokinase,a subtilisin-like serine proteinase,to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening[J]. **Le Lait**,2006,86(3):227-240.
[34] Minn M,Sinha S K. The lubrication of poly (etheretherketone) by an aqueous solution of nattokinase [J]. **Wear**,2012,296(1):528-535.
[35] Suwanmanon,K. and P.-C. Hsieh,Effect of γ -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.
[36] Wang S L,Wu Y Y,Liang 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.
[37] Chen R P Y,Lee K T. Nattokinase for degrading and reducing amyloid fibrils—associated with alzheimer's disease,prion diseases and other amyloidoses:U.S. Patent 8,137,666[P]. 2012-3-20
[38] Nguyen T T,Quyen T D,Le H T. Cloning and enhancing production of a detergent-and organic-solvent-resistant nattokinase from Bacillus subtilis VTCC-DVN-12-01 by using an eight-protease-gene-deficient Bacillus subtilis WB800 [J]. **Microbial Cell**

Factories,2013,12(1):79.

[39] Fadl N N,Ahmed H H,Booles H F,et al. Serrapeptase and nattokinase intervention for relieving Alzheimer's disease pathophysiology in rat model[J]. **Human & Experimental Toxicology**,2013,32(7):721-735.

[40] Hamza,A.,Miracle enzymes serrapeptase and nattokinase mitigate neuroinflammation and apptosis associated with alzheimer's disease in experimental model[J]. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**,2014(3):876-891

[41] Lim D H,Park J K,Kim H S,et al. Effects of feeding nattokinase as natural feed additives on milk production and blood metabolites in lactating dairy cows[J]. **Korean Journal of Organic Agriculture**,2011,19(4):50-56.

[42] Borah D,Shahin L,Sangra A. Production,purification and characterization of nattokinase from bacillus subtilis,isolated from sewage water[J]. **International Journal of Pharmaceutical Archive:IJPAOnline**,2012,1(1).

[43] 王凡强,马美荣,王正祥,等. 枯草杆菌蛋白酶基因工程的研究进展[J]. 生物工程进展,2000,20(2):4-44.
WANG Fanqiang,MA Meirong,WANG Zhengxiang,et al. Advances in gene engineering of Subtilisin [J]. **Progress in Biotechnology**,2000,20(2):41-44.(in Chinese)

[44] Fakhfakh-Zouari N,Hmidet N,Haddar A,et al. A novel serine metallokeratinase from a newly isolated Bacillus pumilus A1 grown on chicken feather meal:biochemical and molecular characterization [J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,2010,162(2):329-344

[45] 陈倩,关泽文,刘彦. 一株蜡状芽孢杆菌产蛋白酶脱毛性能研究[J]. 皮革科学与工程,2013,23(5):10-14.
CHEN Qian,GUAN Zewen,LIU Yan. Study on the unhairing properties of proteinases produced by a *Bacillus cereus*[J]. **Leather Science and Engineering**,2013,23(5):10-14.(in Chinese)

[46] 金宝仲. 几种制革脱毛蛋白酶性能的研究[J]. 皮革科技动态,1977,7(6):3-9.
JING Zhongbao. Several kinds of leather depilation protease performance research [J]. **Leather Technology Dynamic**,1977,7(6):3-9.(in Chinese)

[47] Jaouadi N Z,Rekik H,Badis A,et al. Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from Brevibacillus brevis US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities[J]. **PloS one**,2013,8(10):e76722.

[48] 黄庆,潘皎,彭勇,等. 短小芽孢杆菌(Bacillus pumilus)脱毛蛋白酶基因的克隆与序列分析[J]. 高技术通讯,2004,14(2):31-35.
HUANG Qing,PAN Jiao,PENG Yong,et al. Cloning and seguence analysis of dehairing protease Gene in the Bacillus pumilus UN-31-C-42[J]. **Chinese High Technology Letters**,2004,14(2):31-35.(in Chinese)

[49] 肖怀秋,林亲录,李玉珍,等. 中性蛋白酶芽孢杆菌 BX24 产酶条件及部分酶学性质[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(2):42-56.
XIAO Huaiqiu,LIN Qinlu,LI Yuzhen,et al. Studies on protease production conditions and enzyme characterizations of neutral protease producing strain Bacill us BX24[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2005,24(2):42-56.(in Chinese)

[50] Odetallah N H,Wang J J,Garlich J D,et al. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks [J]. **Poultry Science**,2003,82(4):664-670.

[51] Fakhfakh-Zouari N,Hmidet N,Haddar A,et al. A novel serine metallokeratinase from a newly isolated Bacillus pumilus A1 grown on chicken feather meal:biochemical and molecular characterization [J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,2010,162(2):329-344.

[52] Niehaus F,Gabor E,Wieland S,et al. Enzymes for the laundry industries:tapping the vast metagenomic pool of alkaline proteases [J]. **Microbial Biotechnology**,2011,4(6):767-776.

[53] 鹿桂乾,张利萍. 蛋白酶在液体洗涤剂中的应用研究[J].现代化工,2010,30(2):124-127.
LU Guiqian,ZHANG Liping. Study on application of protease in liquid detergent product [J]. **Modern Chemical Industry**,2010,30(2):124-127.(in Chinese)

[54] Yao D,Qu J,Chang P,et al. Production and characterization of alkaline protease from hemoglobin-degrading Bacillus pumilus NJM4 to produce fermented blood meal[J]. **Journal of Food Science and Technology**,2012,49(5):626-631.

[55] Deng A,Wu J,Zhang Y,et al. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from Bacillus sp. B001[J]. **Bioresource Technology**,2010,101(18):7100-7106.

[56] Kim W,Choi K,Kim Y,et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from Bacillus sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,1996,62(7):2482-2488.