

# Methods for Assay of Nattokinase Activity and the Dosage of Dietary

Yanchun Liu, Lingyun Cai, Xiuling Wang, Shijuan Dou\*

College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding Hebei  
Email: dsj75@126.com

Received: Mar. 17<sup>th</sup>, 2020; accepted: Apr. 2<sup>nd</sup>, 2020; published: Apr. 9<sup>th</sup>, 2020

---

## Abstract

Natto, which is a must-have food in Japan, has a long history and a unique flavor. Natto has various functions, among which the thrombolytic effect of nattokinase has attracted much attention. A lot of methods have been used to assay the activity of nattokinase. The article summarizes five main methods, including fibrin plate method, fibrin degradation method, casein degradation method, synthetic substrate method and enzyme-linked immunoassay. At present, fibrin plate method and fibrin degradation method are being used commonly. By comparing different methods for assaying nattokinase activity, we hope that the assay method can be unified and a uniform standard for dietary dosage of natto produced by different companies can be put forward.

## Keywords

Natto, Nattokinase, Methods of Nattokinase Activity, Dosage of Dietary

---

## 纳豆激酶活性测定方法和膳食用量

刘艳春, 蔡凌云, 王秀伶, 窦世娟\*

河北农业大学, 生命科学学院, 河北 保定  
Email: dsj75@126.com

收稿日期: 2020年3月17日; 录用日期: 2020年4月2日; 发布日期: 2020年4月9日

---

## 摘要

纳豆历史悠久, 风味独特, 在日本已成餐桌必备食品。纳豆有多种功能, 其中人们关注最多的是纳豆激酶的溶栓效果。纳豆激酶活性测定方法多样, 本文总结了主要的五种测定方法: 纤维蛋白平板法、纤维

\*通讯作者。

蛋白分解法、酪蛋白分解法、合成基质法和酶联免疫法,目前以纤维蛋白平板法和纤维蛋白分解法应用较为普遍。本文对纳豆激酶活性测定方法进行分析,以期统一纳豆激酶测定方法,并为不同厂家纳豆膳食食用量提供统一标准。

## 关键词

纳豆, 纳豆激酶, 活性测定方法, 膳食食用量

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

发酵豆制品最早起源于我国,其中豆豉制作历史可追溯到先秦时期。唐朝初期,鉴真东渡时将豆豉传至日本,因此纳豆在日本又被称为“日本豆豉”。大豆发酵品在日本不断进行工艺改良,后来出现了一种叫纳豆(Natto)的大豆发酵品。纳豆风味独特,具有很多功能性物质,如纳豆激酶、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶、大豆异黄酮、血管紧张素转化酶抑制剂和小分子多肽等,具有溶解血栓凝块、降血压、抗氧化以及促进胃肠道健康等多种功能[1] [2] [3]。随着全球人口老龄化问题的加剧,提高老年人的健康水平,增强其幸福指数,预防人类第一大杀手—心脑血管疾病显得尤为重要。世界卫生组织公布的资料显示,日本人的平均寿命 84 岁,中国平均寿命目前只有 76 岁。在 55~64 岁的男性中,日本心脑血管疾病发病率仅为 0.4%,而中国为 30%。在日本几乎 90%的人群每天都在食用纳豆,因此,有学者认为,日本心脑血管疾病发病率低与日本国民长期食用传统发酵食品纳豆有很大关系。

纳豆激酶(Nattokinase, NK, E.C.3.4.21.62)是由纳豆菌(*Bacillus subtilis natto*)生产的一种蛋白质。1987年日本学者 Sumi 从纳豆中分离提取和纯化出一种具有纤溶活性的蛋白激酶,称为纳豆激酶,由 275 个氨基酸组成,分子量 27.7 kD [4],1992 年 Ichishima E.实验室获得该基因序列[5]。纳豆激酶是一种丝氨酸蛋白酶[6],与其他溶栓试剂相比,如尿激酶,组织纤溶酶原激活剂(Tissue-type plasminogen activator, t-PA)和链激酶,纳豆激酶在预防和延长疗效方面具有优势,并且胃肠道副作用少,稳定性好[7]。纳豆激酶对氧化损伤介导的动脉血栓和炎症引起的静脉血栓均有良好的作用。纳豆激酶只溶解血栓的主体物质纤维蛋白,不水解血浆纤维蛋白原,因此,不会出现传统溶栓药引发出血的危险,这一点是临床溶栓药剂所普遍缺失的[8]。

纳豆激酶作为功效成分已于 2014 年获得国家级批准(2015 纳豆与纳豆激酶发展论坛新闻发布会),纳豆激酶在中国发展前景广阔。我国一直缺乏纳豆激酶相关生产规范,在功能检测与溶栓效果上缺少统一标准,导致产业鱼龙混杂、良莠不齐。因此,开发纳豆激酶相关产品,并对产品中纳豆激酶活性进行测定具有非常重要的现实意义。本文对各种纳豆激酶测定方法进行了总结和比较,以期获得最佳和统一的纳豆激酶测定方法,为不同产品膳食食用量提供依据。

## 2. 纳豆激酶测定方法

### 2.1. 纤维蛋白平板法

纤维蛋白平板法根据 1952 年 Astrup 建立的方法改进而来[9],主要原理是以琼脂糖作为相应的骨架,加入相应浓度的凝血酶和纤维蛋白原,二者相互作用,从而在琼脂糖平板上形成人工血栓。纳豆激酶能将

人纤维蛋白降解为可溶性的纤维蛋白片段,因此便会有溶解圈出现,根据溶解圈的直径,推测纳豆激酶活力强弱。具体方法如下:10 mL 琼脂糖溶液(1%)和10 mL 牛纤维蛋白原溶液(1.8 mg/mL, 50mM Tris-HCl 缓冲液)分别在60°C下培养;10 U 凝血酶加入琼脂糖溶液混合;然后再和纤维蛋白原混合;在室温下放置2小时,形成纤维蛋白凝块;纤维蛋白板上打孔,每孔加酶液40  $\mu$ L,置于37°C下4小时以检测激酶的纤溶活性[10]。该方法直观简便,可同时测定多个样品,但受时间、温度以及产品纯度影响较大,检测误差大,灵敏度低,适合定性试验。另外,纤维蛋白原和凝血酶价格高导致检测成本难以降低。该方法还可以以尿激酶为标准曲线,通过测定纤维蛋白板透明圈的直径,定量分析纤维蛋白溶解活性,比活力单位 U/mg [11]。

## 2.2. 纤维蛋白分解法

采用日本纳豆激酶协会描述的方法测定纤维蛋白溶解活性。将1.4 mL Tris-HCl (0.05 mol/L, pH 8.0)和0.4 mL 纤维蛋白原溶液(0.72%)在37°C水浴中预培养5 min;添加0.1 ml 凝血酶溶液(20 U/mL);10分钟后添加0.1 mL 稀释样品;在37°C下培养60 min;最后,添加2 ml 三氯乙酸溶液(0.2 mol/L),在37°C下培养20分钟以停止反应;对照为37°C培养60 min后,将含有纳豆激酶的稀释样品和三氯乙酸溶液加入纤维蛋白底物溶液中;12,000 rpm,室温离心10 min,将上清液转移到微型试管中,读取并记录275 nm处上清液的吸光度。酶的活力单位FU (Fibrin degradation unit)每分钟OD<sub>275 nm</sub>值增加0.01个单位为一个酶的活力单位[10]。该方法为纳豆激酶的天然基质,适合定量试验,且数据稳定,重复性好;缺点是测定时间长,成本高。

## 2.3. 酪蛋白分解法

根据Folin-酚测定法,定量检测样品中纤溶酶活性。蛋白酶水解酪蛋白产生酪氨酸,在碱性条件下,酪氨酸与Folin-酚试剂反应生成蓝色物质,于680 nm处比色测定光吸收值,计算酶活力。具体方法如下:0.5%酪蛋白2 ml (35°C预热5 min),粗酶液1 mL,35°C反应10 min (严格控制时间),3 mL 10% TCA 终止反应,放置15 min,过滤,加0.55 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 mL, Folin-酚1 mL, 35°C水浴15 min, 680 nm比色[12]。酶的活力单位CU (Casein degradation unit)规定为酶在温度35°C、pH7.5时,单位时间、单位体积产物生成的量为一个活力单位。优点:简单易行,可同时测多个样品,成本低;缺点:该方法测定的是所有蛋白酶的活性,无法单独测出纳豆激酶活性,且需严格控制酶解时间。

## 2.4. 合成基质法

“纳豆之父”一须见洋行博士(Dr. Hiroyuki Sumi)一直致力于纳豆研究工作,根据纳豆激酶的特性,提出合成基质反应法(国际单位是IU)。这个方法不但结果稳定、测定时间短,更重要的是它可以区分出真正的纳豆激酶与其他类似的酵素。日本已经采用了该分析方法,在美国、台湾等地区,越来越多的业内人士也开始使用IU这一标准(<http://zl.39.net/a/100707/1378854.html>)。

### 2.4.1. 四肽底物法

四肽底物法是根据胰凝乳蛋白酶测定方法改进而来[13]。在溶液中加入琥珀酰丙氨酰丙氨酰脯氨酰苯丙氨酰对硝基苯胺(N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanilide)作为底物,加入酶液,于37°C水浴孵育1 min,测定单位时间内410 nm处光吸收的变化。酶活力单位的定义为1 min内水解该四肽底物生成1  $\mu$ mol 硝基苯胺的酶量为1 IU。优点:方法简便、灵敏度高,可迅速测定酶的活性;缺点:测得的蛋白酶活性并不能完全表示其纤溶活性。

### 2.4.2. 三肽底物法

纳豆激酶对纤溶酶最适底物 H-D-Val-Leu-Lys-pNA(S-2251)也有较强的分解能力;对

H-D-Phe-Pip-Arg-pNA、H-D-Val-Leu-Arg-pNA 和 H-D-Pro-Phe-Arg-pNA 有较低的分解能力；而对尿激酶底物 pyro-Glu-Gly-Arg-pNA 和弹性蛋白酶底物 pyro-Glu-Pro-Val-pNA 没有表现出反应能力[4]。

#### 2.4.3. TAME 底物法

纳豆激酶对精氨酸羧端肽有较强的切割作用，可选择对甲基苯磺酰-L-精氨酸甲酯(N $\alpha$ -P-Tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride, TAME)为底物测定酶活性。在 37℃ 纳豆激酶将底物切割成对甲基苯磺酰-L-精氨酸和甲醇，高锰酸钾将甲醇氧化成甲醛，甲醛再与变色酸在沸水浴中发生显色反应，生成蓝紫色复合物，此复合物颜色稳定，在 574 nm 处有最大吸收。TAME 底物法是一种操作简便快速，检测灵敏度高的活性分析法，适合作为纳豆激酶分离纯化等过程的常规检测手段[14][15][16]。

#### 2.5. 酶联免疫法

将鼠源抗纳豆激酶的单克隆抗体与纳豆激酶发生特异结合，然后再与连有过氧化物酶(标志酶)的兔源多克隆抗体结合，形成一种类似三明治的结构，通过过氧化物酶的反应测定纳豆激酶的活性，该方法检测灵敏度高达 0.1 ng/mL。纳豆激酶与枯草芽孢杆菌蛋白酶 BPN' 和 Carlsberg 的交叉试验，以及 ELISA 与纤溶活性相关性分析，证实纳豆激酶是纳豆中唯一一种纤溶酶。该方法的优点：该法具有极高的特异性，抗干扰性及特异性强[17]；缺点：测定过程中需要升高温度，易使纳豆激酶活性降低。另外，操作成本高，难度大，实际应用受到限制。

总之，纳豆具有多种保健功能，目前市场上主要有四种商品：鲜食纳豆、纳豆胶囊、纳豆复配胶囊和纳豆激酶。为准确掌握不同厂家纳豆以及不同纳豆产品中纳豆激酶活性强弱，本文总结了主要五种纳豆激酶活性的测定方法，对其测定用成本、测定时间和纳豆激酶的专一性等各有优缺点方面进行了阐述和比较，以期对不同产品中纳豆激酶的活性进行横向比较，用于指导不同产品的膳食用量。目前，使用普遍的是纤维蛋白平板法和纤维蛋白降解法。基于国际普遍通用的纤维蛋白降解法标准，纳豆激酶活性以 FU 计量，每日的建议摄取最为 2000 FU/日，如果作为治疗用途，每日建议用量为 4000~8000 FU/日[8][18]。目前，市面上贩售纳豆产品含有的纳豆激酶活性数值参差不齐，例如日本盒装 50 g 的纳豆平均含有 1400 FU/盒，活性较高的产品大约含有 2000 FU/盒(数据来自日本纳豆激酶协会，网址 [http://j-nattokinase.org/cn/jnka\\_nattou\\_01.html](http://j-nattokinase.org/cn/jnka_nattou_01.html))。纳豆激酶胶囊更是因为提纯程度不同而导致含有的活性单位差异很大，300 FU/粒、2000 FU/粒、4000 FU/粒，甚至 10000 FU/粒不等。因此，如能统一纳豆激酶检测方法和检测标准，便可根据不同治疗目的(如日常保健或辅助治疗)，根据不同纳豆产品显示的纳豆激酶含量确定每日使用量。随着纳豆行业在我国的不断兴起，应不断规范纳豆生产和消费标准，让纳豆产品为提高国民身体素质和生活质量提供有力保障。

#### 基金项目

河北省现代农业产业技术体系大豆产后服务与加工资助项目(326-0702-JSNTKSF)。

#### 参考文献

- [1] Fujita, M., Ohnishi, K., Takaoka, S., Ogasawara, K., Fukuyama, R. and Nakamuta, H. (2011) Antihypertensive Effects of Continuous Oral Administration of Nattokinase and Its Fragments in Spontaneously Hypertensive Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **34**, 1696-1701. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.1696>
- [2] Liu, J., Chang, S.K. and Wiesenborn, D. (2005) Antioxidant Properties of Soybean Isoflavone Extract and Tofu *in Vitro* and *in Vivo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 2333-2340. <https://doi.org/10.1021/jf048552e>
- [3] Nagata, C., Wada, K., Tamura, T., Konishi, K., Goto, Y., Koda, S., Kawachi, T., Tsuji, M. and Nakamura, K. (2017) Dietary Soy and Natto Intake and Cardiovascular Disease Mortality in Japanese Adults: The Takayama Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, **105**, 426-431. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.137281>

- [4] Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H. (1987) A Novel Fibrinolytic Enzyme (Nattokinase) in the Vegetable Cheese Natto; A Typical and Popular Soybean Food in The Japanese Diet. *Experientia*, **43**, 1110-1111. <https://doi.org/10.1007/BF01956052>
- [5] Nakamura, T., Yamagata, Y. and Ichishima, E. (1992) Nucleotide Sequence of the Subtilisin NAT Gene, *AprN*, of *Bacillus Subtilis* (Natto). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **56**, 1869-1871. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.1869>
- [6] Fujita, M., Nomura, K., Hong, K., Ito, Y., Asada, A. and Nishimuro, S. (1993) Purification and Characterization of a Strong Fibrinolytic Enzyme (Nattokinase) in the Vegetable Cheese Natto, a Popular Soybean Fermented Food in Japan. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **197**, 1340-1347. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2624>
- [7] Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K. and Hiratani, H. (1990) Enhancement of the Fibrinolytic Activity in Plasma by Oral Administration of Nattokinase. *Acta Haematologica*, **84**, 139-143. <https://doi.org/10.1159/000205051>
- [8] Weng, Y., Yao, J., Sparks, S. and Wang, KY. (2017) Nattokinase: An Oral Antithrombotic Agent for The Prevention of Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**, 523-535. <https://doi.org/10.3390/ijms18030523>
- [9] Astrup, T. and Müllertz, S. (1952) The Fibrin Plate Method for Estimating Fibrinolytic Activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **40**, 346-351. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(52\)90121-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(52)90121-5)
- [10] Liu, Z., Zheng, W., Ge, C., Cui, W., Zhou, L. and Zhou, Z. (2019) High-Level Extracellular Production of Recombinant Nattokinase in *Bacillus Subtilis* WB800 by Multiple Tandem Promoters. *BMC Microbiology*, **19**, 89-102. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1461-3>
- [11] Weng, M., Zheng, Z., Bao, W., Cai, Y., Yin, Y. and Zou, G. (2009) Enhancement of Oxidative Stability of The Subtilisin Nattokinase by Site-Directed Mutagenesis Expressed in *Escherichia Coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1794**, 1566-1572. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.07.007>
- [12] 赵亮杰. 植物内生菌发酵大豆的工艺及发酵大豆体外评价体系的建立[D]: [硕士学位论文]. 保定: 河北农业大学, 2017.
- [13] DelMar, EG., Largman, C., Brodrick, JW. and Geokas, MC. (1979) A Sensitive New Substrate for Chymotrypsin. *Analytical Biochemistry*, **99**, 316-320. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(79\)80013-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(79)80013-5)
- [14] Kjeldgaard, N.O. and Ploug, J. (1957) Urokinase an Activator of Plasminogen from Human Urine II. Mechanism of Plasminogen Activation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **24**, 283-289. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(57\)90195-6](https://doi.org/10.1016/0006-3002(57)90195-6)
- [15] 熊迎新, 尹宗宁, 杨超, 孟延发. 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.
- [16] 杨明俊, 杨晓彤, 冯慧琴, 糜可, 杨庆尧. 两种纳豆激酶活性测定方法对比以及相关分析[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(2): 137-141.
- [17] Yuki, Y., Nakagawa, T., Fujita, M., Asada, A., Nakanishi, K. and Kato, K. (1994) A Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Nattokinase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **58**, 366-370. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.366>
- [18] 陈丽娟, 沙长青, 奚新伟, 刘宇峰, 王佳龙. 国外纳豆激酶的开发现状[J]. 生物技术, 2003, 13(3): 44-45.