

纳豆激酶分离纯化技术的研究进展

阳承利 邢建民 刘俊果 刘先桥 刘会洲

(中国科学院过程工程研究所分离科学与工程实验室, 生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要:对纳豆激酶的生产 and 分离纯化技术进行了综述, 重点讨论了柱层析、发酵与泡载分离耦合和膨胀床吸附等分离方法, 提出了将反胶团和磁性高分子微球等新型分离技术应用于纳豆激酶的分离以提高其纯度和产率, 指出了纳豆激酶有望开发成一种新一代理想的溶栓剂, 具有广阔的应用前景。

关键词:纳豆激酶; 分离纯化; 反胶团; 磁性高分子微球

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2004)02-0023-03

Progress in separation and purification technology of *nattokinase*

YANG Cheng-li, XING Jian-min, LIU Jun-guo, LIU Xian-qiao, LIU Hui-zhou

(Laboratory of Separation Science and Engineering, State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The research on production and separation and purification of *nattokinase* were reviewed. Column chromatography, coupling between fermentation and foam separation, and expand bed adsorption were discussed. New separation technologies such as reversed micelles and magnetic polymer microspheres for application in *nattokinase* were put forward in order to improve its purity and yield. It was pointed out that *nattokinase* would be developed a new and ideal thrombolytic agents with extensive application prospects.

Key words: *nattokinase*; separation and purification; reversed micelle; magnetic polymer microsphere

1987 年日本学者 H Sumi 等从日本传统的大豆发酵食品——纳豆 (*natto*) 中发现了一种具有高效溶栓活性的酶, 并将其命名为纳豆激酶 (*nattokinase*, 简称 NK)^[1]。人体内的血栓常引发脉管堵塞、脑血栓中风、急性心肌梗塞等严重的心血管疾病, 尤其对老年人的身体健康造成很大的危害, 全世界有血栓患者 1 500 万人, 潜在的溶栓剂市场有 20 亿美元^[2]。但当前的溶栓剂, 如尿激酶 (SK) 和链激酶 (UK) 作为第一代溶栓剂, 缺乏纤维蛋白选择性, 副作用大; 如第二代溶栓剂重组组织型纤溶酶原激活剂, 存在价格高等缺点, 因此它们难以成为适用的大众药品。而纳豆激酶具有溶栓能力强、无任何毒副作用、成本低、可由细菌发酵生产等优点^[3], 具有极为诱人的市场前景。近年来, 对纳豆激酶的研究和开发越来越受到众多科研工作者的重视, 取得了许多新进展, 笔者对纳豆激酶的发酵生产和分离纯化技术的研究进行了全面的综述。

1 纳豆激酶的发酵生产

最初获得的纳豆激酶都是从传统固态发酵食品

纳豆中分离提取的^[4]。由于固态发酵在染菌、散热等问题一直未能得到很好的解决^[5], 很难满足有严格要求的药品尤其是生物制品的生产要求, 因此研究者以液态发酵生产纳豆激酶为主。日本专利^[6]公开了 *Bacillus natto* 生产纳豆激酶的工艺条件, 在 43~45℃ 条件下培养 40 h 得到了酶活为 8 U/mL 的精制纳豆激酶。而日本专利^[7]公开了碳源、温度等因素对纳豆激酶产率的影响, 在葡萄糖、果糖、甘油、木糖和麦芽糖等 5 种碳源中, 2% 麦芽糖的效果最好, 在 30℃ 振荡培养 94 h 后, 纳豆激酶的酶活为 16.4 U/mL; 在 28.5℃ 下发酵 90 h, 纳豆激酶产率最高, 可达 19 U/mL; 超过 28.5℃ 时, 纳豆激酶产率下降; 在 32℃ 以上时很难在培养液中检测到纳豆激酶的存在。美国专利^[8]公开了以 10 L Henneberg 培养液在 43~45℃ 条件下振荡培养 45 h, 培养液中纳豆激酶的酶活为 8.7 U/mL。

如上所述, 虽然各学者对纳豆激酶的发酵条件进行了广泛的研究, 但所得纳豆激酶的酶活都较低。进入 20 世纪 90 年代后, 纳豆激酶的研究和开发在中国也进入了一个新的高潮。

收稿日期: 2003-09-18; 修回日期: 2004-01-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2002AA302211) 及国家杰出青年基金 (29925617) 资助项目

作者简介: 阳承利 (1976-), 男, 博士生; 刘会洲 (1962-), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事分离科学与工程方面的研究, 通讯联系人, 010-62555005, hzliu@home.ipe.ac.cn。

谢秋玲等^[9]对纳豆激酶液态发酵条件进行了优化,其最高产酶量可达到 78.7 U/mL,同时还发现纳豆激酶的发酶菌种在混合碳源中没有二次生长现象,对木糖和葡萄糖的吸收是同时的,且互不干扰,葡萄糖对木糖的吸收利用没有分解代谢阻遏。罗立新等^[10]在大肠杆菌中表达纳豆激酶,表达的纳豆激酶占菌体蛋白的 12% 左右,液体发酵后纳豆激酶产量可达 120 U/mL。韩润林对枯草杆菌酶液态发酵进行了研究,指出在培养基中添加环状腺嘌呤核苷酸(cAMP)能够提高纳豆激酶的产量^[11]。并在 10 L 自控搅拌式反应器上对枯草杆菌发酵生产纳豆激酶的动力学进行了研究,建立了恒溶氧分批培养条件下细胞生长、还原糖消耗及纳豆激酶积累的动力学模型^[12]。纳豆激酶发酵生产动力学模型的建立,为纳豆激酶扩大生产提供了理论依据。

2 纳豆激酶的分离纯化

目前,纳豆激酶的分离纯化工艺常采用传统的蛋白质纯化方法,如有机溶剂沉淀、盐析、离心、凝胶色谱柱脱盐脱色纯化等方法。

2.1 柱层析分离纯化方法

柱层析分离纯化方法是一种分离纯化蛋白质最常用的方法,因为纳豆激酶是由 275 个氨基酸残基组成的一条单链多肽,是一种丝氨酸蛋白酶^[13],因此采用柱层析分离纯化方法分离纳豆激酶具有一定的优势,受到了许多研究者的重视。付利等^[14]采用过滤、离心、盐析对纳豆激酶的粗酶液提取后,用 Sephadex G-100 柱层析对其分离,收集的峰馏分浓缩,再用 Sephadex G-200 柱层析进一步分离纯化,最终得到的单一吸收峰经渗析后,冷冻干燥,制成纳豆激酶干粉。

日本专利^[7]公开了采用硫酸铵沉淀发酵液中的杂蛋白后,直接上丁基琼脂糖凝胶柱,收集的活性部分用 G-25 脱盐后再上 Sephacryl S-200 分子筛柱,得到收率为 50% 的纳豆激酶纯品。而美国专利^[8]公开了 2 种纳豆激酶分离纯化工艺:①在发酵液中加入等量无水乙醇,弃沉淀,在上清液中再加入一定量乙醇使其质量分数达到 75%,离心、收集沉淀,然后将沉淀溶解于磷酸缓冲液中,再上丁基琼脂糖凝胶疏水层析柱,收集洗脱出的活性部分;将该部分液体脱盐、浓缩后过阴离子交换柱(Mono-Q),洗脱液再上烷基琼脂糖凝胶柱,得到收率为 22.0% 的纯纳豆激酶;②以上述从丁基琼脂糖凝胶洗脱出的活性部分为原料,上阳离子交换树脂柱(S-Sepharose Fast

Flow),洗脱出的活性部分再上 Sephacryl S200 分子筛柱,收集到收率为 18.0% 的纳豆激酶纯品。上述 2 种工艺分离出的纳豆激酶的纯度能达到要求,但工艺复杂,且收率相当低。

Fujita 等^[15]用生理盐水从纳豆的发酵液中提取纳豆激酶粗酶,硫酸铵沉淀杂蛋白,离心除去杂质,上清液经疏水色谱柱(butyl-toyopearl)吸附、阳离子交换柱(CM-toyopearl)和分子筛层析(Sephadex G-50)分离后得到电泳纯的纳豆激酶。杨志兴等^[16]对 *Bacillus Subtilis* HW-12 分泌的溶栓酶进行了分离纯化,先用生理盐水从固态发酵产物中提取溶栓酶,再用乙醇对离心后的上清液进行分级沉淀,经 Sephadex G-100 和 Sephacryl S-200 两次分子筛层析后得到电泳纯的纳豆激酶。阎家麒等^[17]以发酵大豆(豆豉)为原料,先用硫酸铵盐析,采用 Sephadex G-100 和 Sephadex G-200 色谱分离纯化出一种活性强的纤溶酶,其酶活为 310 U/mL。Liu 等^[18]从枯草杆菌的发酵液中经超滤、Sephacryl S-100 凝胶过滤、S-Sepharose 离子交换等多步纯化,所得纳豆激酶的酶活为 120 U/mL。Peng 等^[19]从大豆发酵食品中,经离心,加入 30%~60% 硫酸铵饱和溶液沉淀后得上清液,先用 CM-Sepharose FF 和 DEAE-Sepharose FF 柱层析,经苯基琼脂糖凝胶 6-FF 疏水性柱收集到其活性组分,再用 Sephadex G-50 凝胶过滤,得到了酶活为 130 U/mL 的纳豆激酶。

如上所述,传统柱层析分离方法在纳豆激酶分离纯化中虽然得到了广泛应用,但是其收率低,且工艺复杂,造成分离成本高,很难进行扩大生产,探讨适合于纳豆激酶分离纯化的新方法是当前研究的热点。

2.2 发酵与泡载分离耦合方法

发酵与泡载分离耦合方法是生化分离工程中的研究热点之一,其方法是在发酵过程中,利用泡沫分离法对蛋白酶进行富集分离,达到发酵与分离相耦合,可以解除终产物的反馈抑制作用,缩短生产周期,提高酶活。韩润林等^[20]采用发酵与泡载分离耦合方法对纳豆激酶进行了研究,酶的产率比简单分批发酵提高了 30%。然后再经超滤、离子交换(CM-52)和凝胶过滤(Sephadex G-50)三步分离,得到了电泳纯的纳豆激酶。

2.3 膨胀床吸附分离方法

膨胀床吸附分离方法是一种新型的分离纯化蛋白质方法,其基本方法是根据静电吸附作用的原理,将带有相反电荷的蛋白酶吸附在离子交换柱上。该

分离方法避免了柱层析分离过程中卷入复杂的纯化步骤而导致纳豆激酶失活的缺点,具有快速分离纯化的优点。Hu等^[21]从枯草杆菌的发酵液中经离心得上清液,将粗酶溶液的pH值调节低于其等电点,采用Streamline SP和Streamline SPXL离子交换柱,直接从上清液中吸附分离出纳豆激酶,然后进行清洗解吸,得到比较纯的纳豆激酶,整个分离过程缩短为8~10h。

2.4 纳豆激酶生产分离的中试工艺

随着纳豆激酶实验室分离纯化方法日益成熟,纳豆激酶的大批量生产也提到了新的日程。刘宇峰等^[22]进行了纳豆激酶生产分离工艺的中试实验,分离提纯并制备纳豆激酶制剂。纳豆激酶的提取分离工艺为:纳豆—提取—高速离心除杂—浓缩—除菌—醇沉—真空干燥—粉碎—灌胶囊—装箱—胶囊成品。

3 展望

目前纳豆激酶的生产分离工艺存在周期长、步骤多、收率低等缺陷,难以满足人们对新一代溶栓剂纳豆激酶的要求。随着分离科学技术的不断发展,新型分离技术在生物产品分离纯化中的应用已日益广泛,为了获得高纯度、高产率的纳豆激酶,采用新型分离技术分离纳豆激酶已势在必行。因此,笔者认为以下几种新型分离技术是纳豆激酶分离纯化的发展方向。

(1) 磁性高分子微球分离方法

磁性高分子微球是20世纪70年代末发展起来的一种新型生物分离技术^[23]。由于它是由磁性的内核和核外包裹的高分子外壳两部分组成,高分子外壳的功能基因多样性决定了磁性高分子微球可与各种生物活性物质偶联,在外加磁场的作用下,磁性高分子微球可定向移动,从而达到快速分离的目的。纳豆激酶是一种活性蛋白酶,以对氨基苯甲脒等活性物质为配体与磁性高分子微球表面的功能基因偶联,在外加磁场作用下,可以选择性地分离纳豆激酶,经过清洗、解析,可以快速地分离高纯度的纳豆激酶。

(2) 反胶团萃取分离方法

反胶团是针对生物活性蛋白质提出的一种液液萃取体系^[24],同传统的蛋白质分离纯化方法相比,它具有分离步骤少、高选择性、低成本的特点。纳豆激酶分子小,空间位阻小,易于进入反胶团,同时它

是一种碱性蛋白酶,其活性在pH=7~11范围较稳定。以纳豆激酶的氨基酸类酶活抑制剂作为亲和配基,利用亲和反胶团萃取来增加萃取的选择性,可方便地分离纳豆激酶,以提高其分离纯度。

参考文献

- [1] Sumi H, Hamada H, Tsshima H. [J]. *Experimentia*, 1987, 43(10): 1110-1111.
- [2] Datar R V, Cartwright T, Rosen C G. [J]. *Biotechnology*, 1993, 11(3): 349.
- [3] Fujita M, Hong K, Iro Y. [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 1995, 18(9): 1194-1196.
- [4] 木内幹, 铃木莫也. [J]. *食品の科学*, 1991, 33(6): 85.
- [5] 孙涛. 丝状微生物的固态发酵[D]. 北京: 中国科学院化工冶金研究所, 1998. 10-15.
- [6] 森本规义. 新規な糖溶酵素およびその取得法[P]. JP特开昭61-162184, 1986-07-22.
- [7] 株式会社ジャパンエナジー. 糖溶活性を持つ蛋白質の製造法[P]. JP特开平6-153977, 1994-06-03.
- [8] Nakanishi K, Nomura K, Tajima K, et al. Fibrinolytic protein and production method thereof [P]. US 5750650, 1998-05-12.
- [9] 谢秋玲, 郭勇, 林剑. [J]. *微生物学通报*, 2001, 28(4): 9-12.
- [10] 罗立新, 黄志立, 杨汝德. [J]. *微生物学通报*, 2002, 29(3): 62-66.
- [11] 韩润林, 张小勇, 张建安, 等. [J]. *化工学报*, 2000, 51(增刊): 268-271.
- [12] 韩润林, 陈洪章, 李佐虎. [J]. *过程工程学报*, 2002, 2(1): 55-57.
- [13] Sumi H, Nakagama N, Mihara H. [J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 1993, 69(6): 1267.
- [14] 付利, 杨志兴. [J]. *生物工程进展*, 1995, 15(5): 46-49.
- [15] Fujita M, Nomura K, Hong K. [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993, 197(30): 1340-1347.
- [16] 杨志兴, 张淑梅, 张云湖, 等. [J]. *药物生物技术*, 1996, 3(3): 133-136.
- [17] 阎家麒, 童岩, 藏莹安. [J]. *药物生物技术*, 2000, 7(3): 149-152.
- [18] Liu B Y, Song H Y. [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2002, 34(3): 338-340.
- [19] Peng Y, Huang Q, Zhang R H. [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 134(1): 45-52.
- [20] 韩润林, 张小勇, 张建安, 等. [J]. *中国生化药物杂志*, 2000, 21(5): 221-224.
- [21] Hu H B, Yao S J, Mei L H. [J]. *Biotechnology Letters*, 2000, 22(17): 1383-1387.
- [22] 刘宇峰, 王金英, 王占斌, 等. [J]. *生物技术*, 2000, 10(2): 48-49.
- [23] Dauer R R, Dunlop E H. [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1991, 37(11): 1021-1028.
- [24] Leser E M, Wei G, Luisi P L, et al. [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1986, 135(2): 629-635. ■