

层析法分离纳豆激酶的研究

刘柳, 郭勇

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: 选高产酶的纳豆杆菌发酵, 发酵液离心除菌后加入饱和度为 30% 硫酸铵去杂, 然后加入 65% 的硫酸铵析出纳豆激酶粗提物, 然后将粗提物分别过阴阳离子交换柱和疏水层析柱进行提纯酶。比较其提纯倍数和回收率, 得出较好得分纯化方案为: 样品依次经过 DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子层析、CM-Sephrose Fast Flow 阳离子层析和 Penpyl-Sephrose Cl-4B 疏水层析柱, 纳豆激酶最终纯化倍数达到 32.2, 回收率为 13.2%。

关键词: 纳豆激酶, 层析, 分离

中图分类号: Q814.1; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)01-0017-03

Separation and Purification of Nattokinase with Chromatography

LIU Liu, GUO Yong

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to obtain high purity nattokinase from the fermentative broth of *Bacillus subtilis*, some separation and purification techniques were explored. The optimized separation and purification process includes the following steps: first removing cells by centrifugation, then removing the impurity protein by 30% ammonium sulfate, precipitating the crude extracts of nattokinase by 65% ammonium sulfate and finally purifying the crude extracts by DEAE-Sephrose fast flow ion-exchange chromatography, CM-Sephrose fast flow ion exchange chromatography and Phenyl-Sephrose Fast Flow chromatography, respectively. Besides, the fibrinolytic activity of the nattokinase was measured by means of fibrin plate method. The purification factor and activity recovery of the nattokinase are 32.2% and 13.2%, respectively. The above-mentioned processes can serve as an efficient way to prepare pure nattokinase with high yield especially for lab scale.

Key words: Nattokinase; Chromatography; Purification

1987 年, 日本学者须建洋行经过对上百种食物的筛选, 首次发现日本传统的大豆发酵食品——纳豆中含有溶解血纤维蛋白的成分, 并将其命名为纳豆激酶(nattokinase, NK)。并应用于狗的模型实验及健康人群的体内研究, 证明其除了具有显著的溶栓作用外, 还具有促进静脉内皮细胞产生纤维蛋白溶酶原激活剂的能力, 从而间接地表现其溶栓活性^[1]。与传统的溶栓剂相比, NK 具有不易引起出血、无抗原性、半衰期长、安全无毒且成本低廉和能口服吸收溶栓等优点, 因而具有广阔的开发前景, 可能成为新一代的溶栓药物^[2]。本研究旨在从筛选的高产酶的纳豆杆菌出发, 发酵液用硫酸铵盐析法得到纳豆激酶粗酶, 比较阴阳离子交换层析和疏水层析方法^[3], 得出最优化的分离纯化途径, 最终得到较为理想的纯化效果。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

收稿日期: 2006-09-15

作者简介: 刘柳, 硕士研究生, 研究方向为酶工程

高产酶的纳豆杆菌由本实验室提供; 纤维蛋白原、人凝血酶、尿激酶购自中国药品生物制品检定所; DEAE-Sephrose Fast Flow、CM-Sephrose Fast Flow、Penpyl-Sephrose Cl-4B 均购自 Amersham Bioscience; 其它均为国产分析纯。

考马斯亮蓝: 称取 100mg 考马斯亮蓝 G-250, 溶于 50ml 90% 乙醇中, 加入 85% (W/V) 的磷酸 100ml, 最后用蒸馏水定容到 1000ml。过滤去滤液。4℃ 保存备用^[3]。

40mmol/L pH 7.8 巴比妥钠缓冲液: 准确称取巴比妥钠 4.1236g, 用双蒸水溶解并定容至 500ml, 用浓盐酸调整 pH 至 7.8^[4]。

1.2 方法

1.2.1 溶栓酶活力的测定: 纤维蛋白平板法

参照并改良 Astrup 法^[5]制备双层纤维蛋白平板, 下层为 2.5% 的琼脂。上层为一支纤维蛋白原先溶于 3ml、37℃ 无菌水中, 再溶于 20ml 已灭菌的巴比妥钠缓冲液中; 另取 0.6g 琼脂糖溶于 40ml 巴比妥钠缓冲液中灭菌冷却至 60℃, 二者迅速混匀, 加入人凝血酶

300 μ L(20IU/ml), 摇匀倒入 4 个 9mm 已凝固的琼脂平板上层, 将尿激酶标准品 (20,40,60,80,100,120,140,160IU/ml) 各 7 μ L 点样于新配制的纤维蛋白平板上, 放置 10min, 移入 37 $^{\circ}$ C 培养箱, 保温 17h 后取出。测定溶圈的垂直直径, 并以垂直直径乘积为横坐标, 标准酶活力为纵坐标作图^[6]。根据标准曲线计算样品活力。

1.2.2 蛋白质含量的测定

Bradford 法^[7]。以牛血清白蛋白为标准。

1.3 纳豆激酶的制备

1.3.1 摇瓶种子培养

1.3.1.1 培养基(%): LB 培养基。

1.3.1.2 方法: 在 100ml 三角烧瓶中, 分装 20ml 培养基, 高压灭菌(121 $^{\circ}$ C, 15min)。接种一环斜面保藏的菌种, 150r/min, 35 $^{\circ}$ C, 摇床振荡培养 20 h。

1.3.2 发酵培养

1.3.2.1 发酵培养基: 可溶性淀粉 1%, 大豆蛋白胨 1%, K₂HPO₄ 0.4%, NaH₂PO₄ 0.4%, MgSO₄ 0.075%, CaCl₂ 0.02%; pH 7.0~7.2。

1.3.2.2 方法: 在 500ml 三角烧瓶中, 分装 200ml 培养基, 高压灭菌(121 $^{\circ}$ C, 15min)。接种量 3%, 150r/min, 35 $^{\circ}$ C, 摇床振荡培养 72h。

1.4 纳豆激酶的分离纯化

1.4.1 硫酸铵分段盐析

发酵液于 4 $^{\circ}$ C 下, 10000 \times g 离心 10min, 获得发酵上清液。分别取 10ml 发酵上清液加入不同量的固体硫酸铵达到不同的饱和度, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜后, 12000 \times g 离心 20min。离心所得沉淀分别用 10mL 0.04mol/L pH 7.8 巴比妥钠-HCl 缓冲液溶解。分别测定盐析上清液和沉淀溶解液的纤溶活性。如图 1 所示。

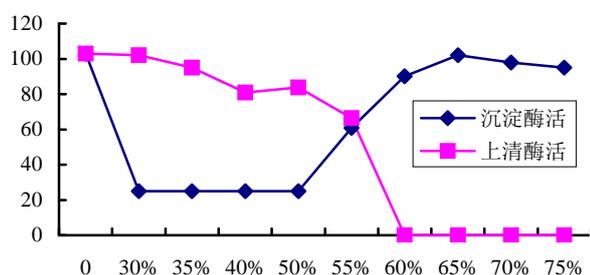


图 1 不同硫酸铵饱和度下发酵液酶活

故选择两步盐析方法, 第一步加饱和度 30% 的硫酸铵, 4 $^{\circ}$ C 静置 5h, 离心取上清; 第二步继续加硫酸铵至饱和度为 65%, 4 $^{\circ}$ C 静置过夜, 离心取沉淀用 10mL 0.04mol/L pH7.8 巴比妥钠-HCl 缓冲液溶解。

1.4.2 DEAE-Sepharose Fast Flow 层析^[8]

DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱

(16 \times 300mm) 用 20mmol/L Tris-HCl, pH 9.0 缓冲液平衡, 流速为 1.5ml/min。上样后先用平衡缓冲液洗脱未吸附蛋白, 洗至基线后, 再用不同 NaCl 浓度的 20mmol/L Tris-HCl, pH 9.0 缓冲液梯度洗脱。收集活性部分, 超滤浓缩。

1.4.3 CM-Sepharose Fast Flow 层析^[8]

CM-Sepharose Fast Flow 阳离子交换柱(16 \times 300 mm)用 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6 缓冲液平衡。上样后先用平衡缓冲液洗脱未吸附蛋白, 洗至基线后再用不同 NaCl 浓度的 20mmol/L Tris-HCl, pH 7.6 缓冲液梯度洗脱, 流速 1.5ml/min。收集活性部分, 超滤浓缩。

1.4.4 Penpyl-Sepharose Cl-4B 层析

Penpyl-Sepharose Cl-4B 疏水层析柱 (10 \times 300mm) 用 20mmol/L Tris-HCl、1mol/L (NH₄)₂SO₄, pH 8.0 缓冲液平衡。样品溶液中先加硫酸铵至浓度为 1mol/L, 上样后先用平衡缓冲液洗脱未吸附蛋白, 洗至基线后, 再分别用含 0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0mol/L 的(NH₄)₂SO₄ 的 20mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液梯度洗脱, 流速为 2ml/min。收集活性部分, 超滤浓缩。

2 结果与讨论

2.1 纳豆激酶的发酵

ZN-4 经碳源、氮源、碳氮比、无机盐离子、接种量、发酵温度、装液量等条件优化, 酶活达 2198 IU/ml。

2.2 纳豆激酶的分离纯化

2.2.1 DEAE-Sepharose Fast Flow 层析

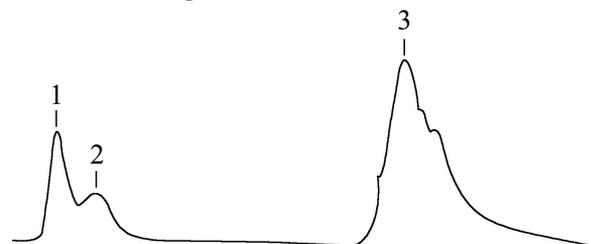


图 2 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析

图 2 中 3 为活性峰, 收集后测得提纯倍数和回收率分别为 16.9 和 66.7%。

2.2.2 CM-Sepharose Fast Flow 层析

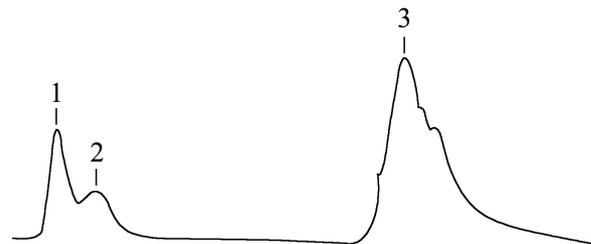


图 3 CM-Sepharose Fast Flow 阳离子交换层析

图 3 中 2 为活性峰, 收集后测得提纯倍数和回收率分别为 17.2 和 48.3%。

2.2.3 Penpyl-Sepharose Cl-4B 层析



图 4 Penpyl-Sepharose Cl-4B 疏水层析

图 4 中 2 为活性峰, 测得提纯倍数和回收率分别为 16.4 和 27.1%。

2.2.4 优化的分离纯化步骤

三个柱子的提纯倍数都在 16~17 左右, 差别不大, 但是回收率疏水层析要远远小于阴阳离子交换层析, 为了最终能得到较高的回收率, 故选定柱层析方案为: 样品依次经过阴、阳离子交换柱和疏水层析柱。

将阴离子交换层析后的活性样品收集, 经超滤和真空浓缩后上样到阳离子交换柱, 得层析图谱如图 5。

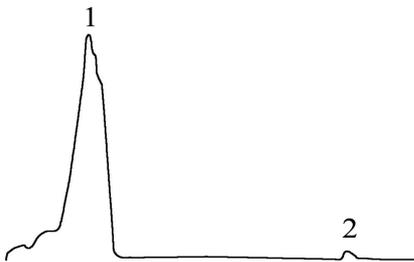


图 5 CM-Sepharose Fast Flow 阳离子交换层析

图 5 中 1 为活性峰, 经真空浓缩后, 加硫酸铵至浓度为 1mol/L, 上样到疏水层析柱。如图 6。

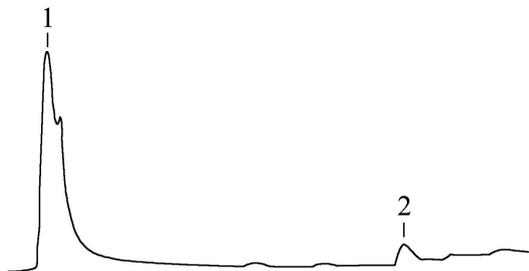


图 6 Penpyl-Sepharose Cl-4B 疏水层析

图 6 中纤溶活性集中在第 1 峰中, 收集活性峰, 充分透析后冷冻干燥。

表 1 为纳豆激酶的分离结果, 从表 1 知利用上述流程分离纯化的纳豆激酶最终纯化倍数达到 32.2, 回收率为 13.2%。

4 展望

发酵液经硫酸铵分级沉淀、透析、阴阳离子交换层析和疏水层析最终得到了较纯的纳豆激酶, 整个分离纯化过程还存在步骤繁琐, 时间长等缺陷, 另实验室尚不能保证所有步骤均在 4℃进行, 故回收率比较低。为解决这些不足, 笔者实验室计划在系统研究纳豆激酶的生化性质和酶学性质的基础上, 进一步探索亲和层析在纳豆激酶分离纯化中的应用, 以期在尽可能低的成本下, 达到最佳的分离纯化效果。

表 1 纳豆激酶的分离结果

| 步骤 | 总活力 /U | 总蛋白 /mg | 比活 /U·mg ⁻¹ | 纯化倍数 /x-fold | 回收率/% |
|-------------|---------|---------|------------------------|--------------|-------|
| 发酵上清液 | 1010179 | 102 | 9895 | 1 | 100 |
| 硫酸铵分段盐析 | 868958 | 12 | 67785 | 6.8 | 86 |
| DEAE 层析 | 472566 | 2.8 | 167934 | 16.9 | 46.8 |
| CM 层析 | 194169 | 0.8 | 251548 | 25.4 | 19.2 |
| Phenyl 疏水层析 | 134221 | 0.4 | 319166 | 32.2 | 13.2 |

参考文献

- [1] 陈丽鹃, 沙长青, 奚新伟等. 国外纳豆激酶的开发现状[J]. 生物技术, 2003: 13(3), 44-45.
- [2] 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.
- [3] 吕莹, 张露, 冯雷等. 纳豆激酶的纯化及性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2004(3): 122-124.
- [4] Fujitani M, Nomura L, Hong L. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan[J]. *Biochem Biop Hys Res Commun*, 1993, 197(3):1340-1347.
- [5] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plat method for determination fibrinolytic activity [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1952, 40:436.
- [6] 王萍, 陈钧. 纳豆激酶纤溶酶活性研究 [J]. 江西农业大学学报, 2004,26(3):431.
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(3): 248-254
- [8] MEI Le-he, HU Sheng, et al. Screening of *Bacillus subtilis* natto from traditional Japanese food Natto and separation of nattokinase [J]. *J Chem Eng of Chinese Univ*, 2005,19(4): 518-522.