

反胶团萃取分离纯化纳豆激酶

刘俊果 邢建民 畅天狮 刘会洲 *

(河北科技大学生物科学与工程学院, 石家庄 050018; 生化工程国家重点实验室, 中国科学院过程工程研究所
分离科学与工程实验室, 北京 100080. * 联系人, E-mail: hzliu@home.ipe.ac.cn)

摘要 纳豆激酶是一种新型溶栓药物, 它和 Subtilisin Carlsberg 为同源蛋白. 以 Subtilisin Carlsberg 为模拟蛋白, 以 AOT/isooctane 反胶团体系为有机相, 研究了各种萃取条件和反萃取条件对 Subtilisin Carlsberg 萃取过程的影响. 在对模拟体系研究的基础上, 利用 AOT/isooctane 反胶团体系从发酵液中分离纯化纳豆激酶. 结果表明, 纳豆激酶的萃取行为和 Subtilisin Carlsberg 非常类似, 以目标蛋白的同源蛋白作为模拟蛋白研究萃取规律是合理可行的. 纳豆激酶经过一次萃取循环, 蛋白质回收率约为 33.25%, 酶活力回收率达到 80.2%, 纯化因子约为 2.5 左右.

关键词 反胶团萃取 纳豆激酶 Subtilisin Carlsberg 蛋白质分离纯化

纳豆激酶是日本学者 Sumi 等人从日本传统的大豆发酵食品纳豆(natto)中发现的. 药理学研究表明, 纳豆激酶具有在体内作用时间长、无抗原性、既可静脉注射又可口服给药、既可预防又可治疗血栓、不易引起出血、价格低等优点, 因而是极具开发价值的溶栓药物^[1~5].

有关纳豆激酶分离纯化的研究报道, 绝大部分采用的是传统的蛋白质分离纯化手段, 交替使用沉淀、盐析、离心、过滤和色谱等技术, 逐步除去杂质, 虽然可以获得色谱纯的产品, 但是纯化步骤多, 时间长(以天计), 过程的总产率较低(18%~50%), 这些步骤多为间歇操作, 生产效率难以提高, 选择性低, 从而造成纳豆激酶的分离纯化的成本很高^[5~7].

反胶团是针对生物活性蛋白质提出的一种液液萃取体系. 同传统的蛋白质分离纯化手段相比, 它具有分离步骤少、易于放大、高选择性、低成本的特点. 从 20 世纪 70 年代末反胶团概念的提出到现在, 它一直是生化工程领域的研究热点, 积累了大量的应用基础研究文献^[8]. 在研究利用反胶团从实际复杂体系(如发酵液中)分离纯化目标蛋白时, 如果直接从复杂体系入手, 盲目性很强, 很难对萃取过程或出现的问题进行准确的分析和判断. 而从模拟体系入手, 在研究清楚萃取过程的主要规律后, 再进行复杂体系的研究, 是一种事半功倍的研究思路.

在生物化学领域, 将在不同生物体中行使相同或相似功能的蛋白质称为同源蛋白质, 例如各种脊椎动物的氧转运蛋白——血红蛋白. 同源蛋白质的氨基酸序列具有明显的相似性, 一般具有相同长度的

多肽链, 关键位置(如活性中心等)的氨基酸残基都是一样的, 空间结构也类似. 应该可以推断, 以同源蛋白作为目标蛋白的模拟蛋白是科学的、合理的. 纳豆激酶(Nattokinase)是一种枯草杆菌蛋白酶, 一种丝氨酸蛋白酶. 纳豆激酶是一单链多肽, 其分子量约为 27 kD, 等电点为 8.6^[1]. Subtilisin Carlsberg 与纳豆激酶为同源蛋白, 同源性达到 72%. 二者结构相似, 分子量相等, 等电点接近^[1,9]. 因此, 本文选择 Subtilisin Carlsberg 为纳豆激酶的模拟蛋白, 研究其反胶团萃取的过程, 并在此基础上研究了从实际发酵液中用反胶团法分离纯化纳豆激酶.

1 材料与方法

1.1 酶与试剂

Subtilisin Carlsberg 和 AOT(顺-2-乙基己基磺酸钠)购自 Sigma 公司, 其他试剂购自北京化学试剂公司, 均为分析纯.

1.2 菌种与培养

Bacillus Natto NLSSE 甘油芽孢菌种, 由中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室提供, -25℃ 保存.

种子制备: 按 5% 的接种量接种于装有 20 mL 种子培养基(葡萄糖 10 g/L, 酵母 10 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L)的 100 mL 三角瓶中, 37℃, 170 r/min 摇床培养 12 h 后($A_{660\text{ nm}}$ 约为 7~8), 0~4℃ 冷藏, 备用.

发酵培养: 按接种量 5% 接种于装液量为 20 mL 的 100 mL 三角瓶中, 培养基组成为 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$

1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, 大豆蛋白胨 8 g/L, 麦芽糖 20 g/L, 酵母浸膏 10 g/L. 37 °C, 170 r/min摇床培养 48 h后, 5000 r/min, 10 min离心, 上清液冻藏备用.

1.3 萃取和反萃实验

萃取和反萃实验在 50 mL 具塞三角瓶中进行, 萃取水相和有机相体积分别为 5 mL. 萃取实验中, 50 mmol/L AOT-异辛烷反胶团溶液作为有机相, 含有 1.0 mg/mL Subtilisin Carlsberg, 20 mmol/L pH 3.0~7.0 醋酸或 TRIS-HCl 缓冲液, 0.1 mol/L NaCl 的水溶液作为萃取水相. 在摇床上以 240 r/min 的速度振荡, 温度控制在 20 °C. 将混合液以 4000 r/min 的速度离心 5 min, 获得分相. 对照实验以不含蛋白质的水相同时进行.

取负载有机相同反萃水相等体积混合, 在摇床上以 240 r/min 的速度振荡, 然后将混合液中以 4000 r/min 的速度离心 5 min, 获得分相. 实际体系的研究采用发酵液为前萃水相, 其余条件同上.

1.4 蛋白质含量分析

初始水相和有机相的蛋白浓度采用Perkin-Elmer紫外可见分光光度计(Lambda Bio40)测定 280 nm 的光密度来确定. 如果负载有机相浑浊, 则样品和对照均采用双波长测定法, 即同时测定 280 nm 和 350 nm 的吸光度, 二者的差值作为蛋白质的紫外吸收. 反萃取水相的蛋白质浓度采用考马斯亮蓝法测定^[10]. 两种测蛋白的方法均以牛血清白蛋白为标准蛋白.

1.5 酶活力测定

Subtilisin Carlsberg 的活力测定采用酪蛋白水解法. 取 5 mL 用 25 mmol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲液溶解的 0.5% 的酪蛋白溶液, 加入 1 mL 适当稀释的酶液, 于 37 °C 反应 15 min, 加入 2 mL 0.4% 三氯乙酸终止反应. 对照实验先加入三氯乙酸再加入酶液. 离心, 测定上清液 280 nm 的吸光度, 计算酶活力. 一个酶活力单位定义为 37 °C, 1 min 内水解酪蛋白产生 280 nm 的吸光度增加值相当于 1 μg 酪氨酸所需要的酶量. 纳豆激酶的活力测定方法与前者类似, 底物溶液改为纤维蛋白溶液, 三氯乙酸溶液的浓度改为 0.11 mol/L, 且含有 0.22 mol/L 醋酸钠和 0.33 mol/L 冰醋酸.

2 结果与讨论

2.1 AOT/异辛烷反胶团体系萃取 Subtilisin Carlsberg

(1) pH 对萃取过程的影响. 萃取水相的 pH 影响

蛋白质的净电荷, 进而影响蛋白质和表面活性剂之间的静电相互作用^[8]. 萃取水相的 pH 对于 Subtilisin Carlsberg 萃取率的影响示于图 1. 由图 1 可以看出, 随 pH 的升高, 萃取率直线下降. Subtilisin Carlsberg 的等电点为 9.4^[9], pH 由 5 升高到 8 的过程中, 其净正电荷越来越少, 而 AOT 分子带负电荷, 所以二者之间的静电相互作用越来越小. 这可以认为是导致萃取率下降的原因. 初步可以判定萃取的主要驱动力是静电相互作用.

(2) 离子强度对萃取过程的影响. 萃取水相的离子强度对于 Subtilisin Carlsberg 萃取率的影响示于图 2. 由图 2 可以看出, 随离子强度的升高, 萃取率下降. 水相离子强度的增加, 会降低蛋白质分子与反胶团内表面之间的静电相互作用; 减少表面活性剂极性端

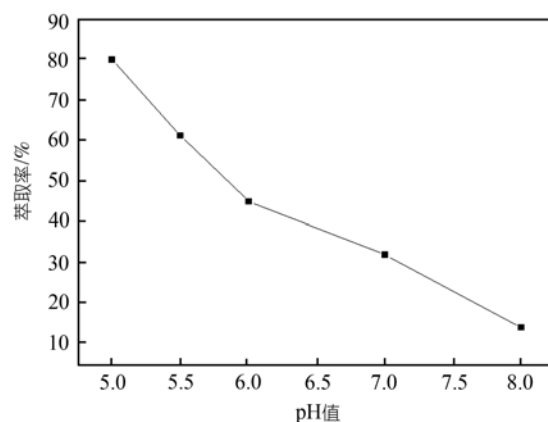


图1 萃取水相 pH 对 Subtilisin Carlsberg 萃取率的影响
萃取条件: 0.1 mol/L NaCl, 蛋白浓度 1 mg/mL, 50 mmol/L AOT, 240 r/min, 2 min, 20 °C

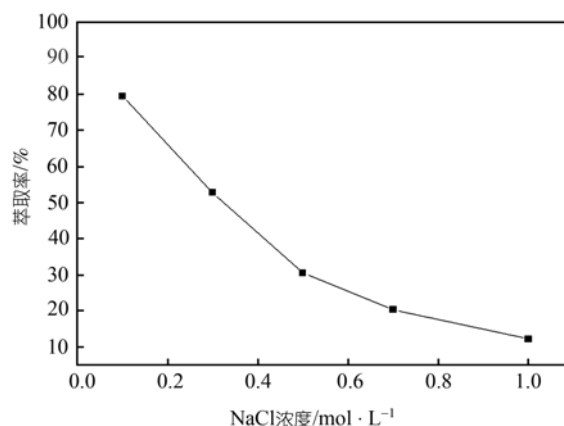


图2 NaCl 浓度对 Subtilisin Carlsberg 萃取率的影响
萃取条件: pH 5, 20 mmol/L 醋酸盐缓冲溶液, 蛋白浓度 1 mg/mL, 50 mmol/L AOT, 240 r/min, 2 min, 20 °C

的静电斥力, 导致高离子强度下反胶团变小, 蛋白质进入反胶团的空间位阻增大. 因而萃取率下降^[8]. 图 2 的结果进一步证明, Subtilisin Carlsberg 进入反胶团的主要驱动力为静电相互作用.

根据对萃取过程的研究与分析, 认为静电相互作用是萃取的主要驱动力, 因此在研究反萃取过程时, 首先进行了通过升高反萃液的 pH 和离子强度来减弱静电相互作用, 进而强化反萃取过程的尝试. 反萃取条件为 pH 8.0, 1 mol/L KCl 时, 反萃取率几乎为零. 而在 pH 8.0 萃取率仅为 14%, 说明静电相互作用已经大大减弱, 反萃取率接近零的原因可能是由于界面传质阻力很大, 反萃取速度过慢所致. KCl 浓度升高到 2 mol/L, 反萃取率仍然几乎为零. KCl 浓度升高到 3 mol/L, 反萃取率有所提高, 但小于 10%. 这些试验结果证明通过升高反萃液的 pH 和离子强度, 不能使 Subtilisin Carlsberg 获得有效的反萃取.

(3) CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)的添加对反萃取过程的影响. Jarudilokkul 等^[11]曾报道向负载蛋白质的 AOT 反胶团相中添加带有相反电荷的表面活性剂, 带有相反电荷的两种表面活性剂形成离子对, 从而破坏反胶团的结构, 强化反萃取过程, 而且对蛋白质如溶菌酶、核糖核酸酶 A 和细胞色素 C 的生物活性没有显著影响. CTAB 的亲水头基带正电荷, 与 AOT 恰好相反, 研究了向负载 Subtilisin Carlsberg 的 AOT 反胶团相中添加 CTAB 对于反萃取过程的影响, 结果示于图 3. 由图 3 可以看出, 随 CTAB 浓度的增加, 反萃取率上升, 当 CTAB 的浓度达到 50~60 mmol/L

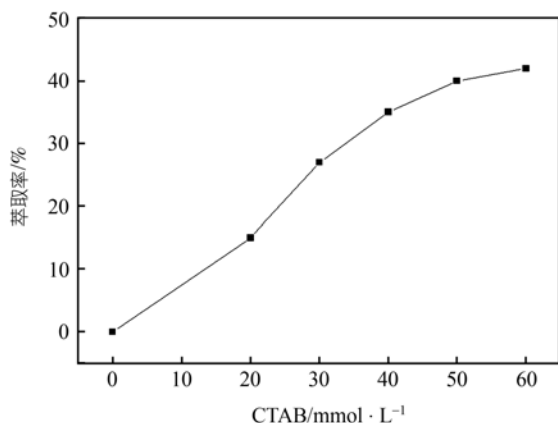


图 3 添加 CTAB 对 Subtilisin Carlsberg 反萃取率的影响
萃取条件: pH 5, 20 mmol/L 醋酸盐缓冲溶液, 蛋白浓度 1 mg/mL, 0.1 mol/L NaCl, 50 mmol/L AOT, 240 r/min, 2 min, 25 °C. 反萃取条件: 1 mol/L KCl, pH 8.0 20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, 240 r/min, 5 min, 35 °C

时, 反萃取率达到最高, 大约在 42% 左右. 结果表明, 添加 CTAB 可以强化 Subtilisin Carlsberg 的反萃取过程, 但是反萃取率最高也只能达到 42%, 很难令人满意.

(4) 异丙醇的添加对反萃取过程的影响. Carlson 和 Nagarajan 曾经报道向反萃取水相中添加 10% 到 15% 异丙醇, 可以显著提高蛋白质的反萃取速率, 使猪胃蛋白酶的反萃取率接近 100%, 使牛凝乳酶的反萃取率提高到 70%^[12]. 因此研究了向反萃取水相中添加 10%, 15% 的异丙醇对 Subtilisin Carlsberg 反萃取过程的影响, 结果示于图 4. 由图 4 可以看出, 异丙醇的添加极大地提高了反萃取率, 且水相异丙醇浓度为 20% 时, 反萃取率和酶活力回收率都明显比异丙醇浓度为 15% 时高. 随反萃取时间的延长, 反萃取率逐渐升高, 大约在 20 min 左右达到平衡. 但是反萃取时间过长, 使酶活回收率下降. 异丙醇浓度为 20%, 反萃时间为 10 min 时, 酶活力回收率最高, 接近 100%.

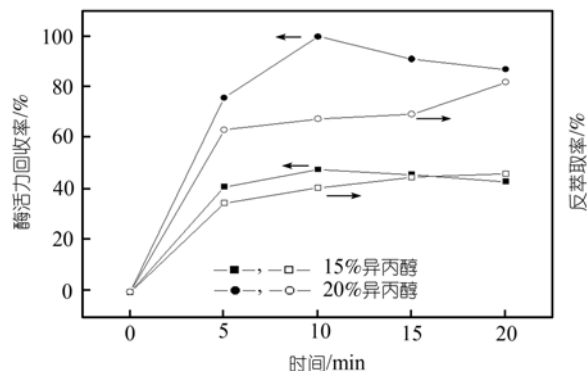


图 4 反萃取时间对 Subtilisin Carlsberg 反萃取率的影响
萃取条件: pH 5, 20 mmol/L 醋酸盐缓冲溶液, 蛋白浓度 1 mg/mL, 0.1 mol/L NaCl, 50 mmol/L AOT, 240 r/min, 2 min, 25 °C. 反萃取条件: 1 mol/L KCl, pH 8.0, 20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, 240 r/min, 35 °C

Hong 和 Kuboi^[13]报道向反胶团溶液中添加少量的短链醇类会影响胶团之间的相互作用, 羟基强化胶团之间的相互作用, 而疏水碳链则抑制胶团之间的作用. 短链醇对反萃取有利, 而长链醇对萃取有利. 添加异丙醇导致胶团之间的相互作用增加, 以及 AOT 分子的重排, 从而促使 Subtilisin Carlsberg 从反胶团相进入水相.

Subtilisin Carlsberg 与纳豆激酶为同源蛋白, 同源性达到 72%. 二者结构相似、分子量相等、等电点接近^[1,9]. 二者的萃取行为也极有可能是类似的. 在

研究 Subtilisin Carlsberg 萃取和反萃取行为的基础上, 我们研究了从实际发酵液中反胶团法分离纯化纳豆激酶的过程.

2.2 从发酵液中萃取纳豆激酶

(1) 发酵液的 pH 对萃取过程的影响. 用 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 溶液调节发酵液的 pH, 并研究其对萃取过程的影响, 结果示于图 5. 由图 5 可以看出, 随发酵液的 pH 升高, 蛋白质回收率显著下降. 该规律和 Subtilisin Carlsberg 相类似, 说明纳豆激酶萃取的主要驱动力也是静电相互作用. 蛋白质的回收率在 pH 5 达到最大值, 但是酶活力的回收率在 pH 6~6.5 之间达到最大值. 纳豆激酶在 pH 7~8 范围内稳定, 酸性和碱性条件都会使其酶活力损失. 在 pH 5 时, 尽管蛋白质回收率很高, 酶活力回收率很低, 原因是纳豆激酶在酸性条件下活力下降. 在 pH 高于 8 时, 蛋白质回收率的下降和纳豆激酶在碱性条件的活力损失是酶活力急剧下降的原因.

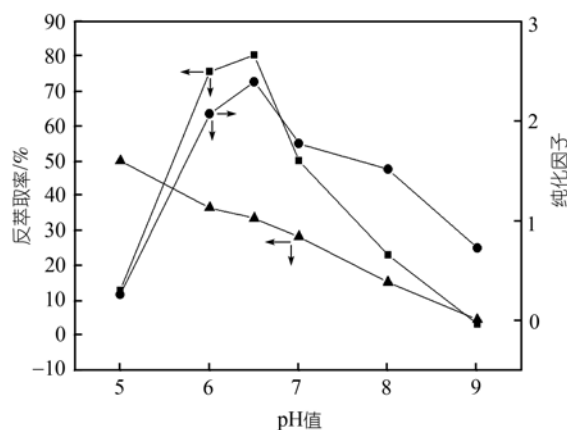


图5 发酵液的 pH 对纳豆激酶萃取过程的影响

■, 酶活力回收率; ▲, 蛋白质回收率; ●, 纯化因子. 萃取条件: 50 mmol/L AOT, 8 min. 反萃取条件: pH 8, 20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, 1 mol/L KCl, 20%(体积分数)异丙醇, 10 min

纳豆激酶萃取的主要驱动力是带正电荷的纳豆激酶和带负电荷的 AOT 亲水磺酸基团之间的静电引力作用, 因此探讨纳豆激酶的反萃取过程时, 首先也想通过提高离子强度和静电斥力下的 pH 值来强化蛋白质的反萃取. 遗憾的是, 当离子强度从 0.5 mol/L 升高到 2.5 mol/L KCl, pH 由 8 升高到 12 时, 纳豆激酶的反萃取率仍然很低, 蛋白质回收率在 5% 以内, 酶活回收率几乎等于零. 纳豆激酶和 Subtilisin Carlsberg 为同源蛋白, 其萃取的主要驱动力和萃取行为

相类似, 其反萃取行为也极有可能类似, 因此研究添加异丙醇对纳豆激酶反萃取过程的影响.

(2) 异丙醇的添加对纳豆激酶反萃取过程的影响. 图 6 表示添加异丙醇对纳豆激酶萃取过程的影响. 随异丙醇浓度的增加, 蛋白质和酶活力回收率同步增加, 异丙醇浓度大于 15% 后, 二者保持基本稳定, 蛋白质回收率达到 33.25%, 酶活力回收率达到 80.2%, 纯化因子一直比较稳定, 大约为 2.5 左右. 结果表明, 添加异丙醇显著提高了纳豆激酶的反萃取率.

比较 AOT/异辛烷反胶团萃取模拟蛋白 Subtilisin Carlsberg 和从实际发酵液中萃取纳豆激酶的过程, 可以发现两个同源蛋白质的萃取行为有很多相似之处, 二者的萃取驱动力是一样的, 均为静电相互作用, 萃取水相的 pH 升高, 二者的萃取率都下降; 提高反萃取水相的 pH 和离子强度使已萃取的两种同源蛋白质都很难反萃取出来, 而添加异丙醇可以大大强化二者的反萃取过程, 而且酶活力没有明显损失. 也就是说 Subtilisin Carlsberg 和纳豆激酶的萃取行为基本是一样的.

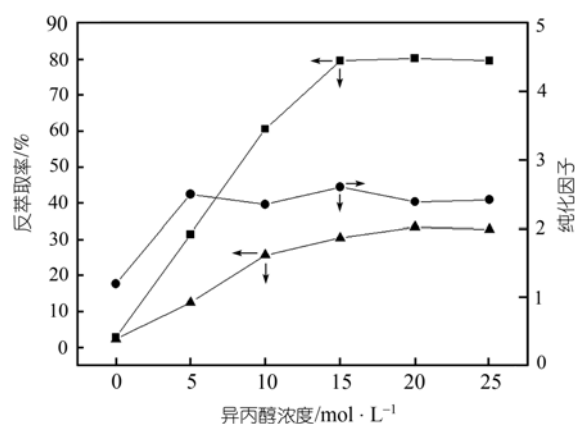


图6 异丙醇浓度对纳豆激酶萃取过程的影响

■, 酶活力回收率; ▲, 蛋白质回收率; ●, 纯化因子. 萃取条件: pH 6.5, 50 mmol/L AOT, 8 min. 反萃取条件: pH 8, 20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, 1 mol/L KCl, 10 min

3 结论

本文研究了同源蛋白质 Subtilisin Carlsberg 和纳豆激酶的反胶团萃取行为. 结果表明, 二者萃取的主要驱动力为静电相互作用, 反萃取水相中加入异丙醇可以强化二者的反萃取行为, 二者的萃取行为是相类似的. 由此可以得出结论, 以目标蛋白的同源蛋白作为模拟蛋白研究萃取规律是合理可行的. 以 AOT/

异辛烷为反胶团相, 从发酵液中萃取纯化纳豆激酶, 经过一次萃取循环, 蛋白质回收率约为 33.25%, 酶活力回收率达到 80%, 纯化因子约为 2.5 左右.

纳豆激酶作为一种溶栓药物, 临床上常采用静脉给药的方法. 对于静脉给药的蛋白药物, 纯度要求是比较高的, 尤其不得含有易引起过敏反应杂蛋白类物质. 因此, 其分离纯化过程的复杂性和成本远高于工业用蛋白质, 如 α -淀粉酶等. 利用反胶团法分离纯化纳豆激酶取得了很好的结果, 但是反胶团法一般可作为初步纯化技术, 如若获得临床上使用的纯品, 仍需要采用其他手段进一步纯化.

致谢 本工作为国家自然科学基金创新研究群体资助项目(批准号: 20221603).

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. *Experientia*, 1987, 43: 1110~1111[DOI]
- 2 Sumi H, Hamada H, Nakanishi K, et al. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol*, 1990, 84: 139~143
- 3 Fujita M, Hong K, Ito Y, et al. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract. *Biol Pharm Bull*, 1995, 18: 1194~1196
- 4 Fujita M, Hong K, Ito Y, et al. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat. *Biol Pharm Bull*, 1995, 18: 1387~1391

- 5 Urano T, Ihara H, Umemura K, et al. The profibrinolytic enzyme Subtilisin NAT purified from *Bacillus subtilis* cleaves and inactivates plasminogen activator inhibitor Type 1. *J Biol Chem*, 2001, 276: 24690~24696[DOI]
- 6 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. *Biochem Bioph Res Co*, 1993, 197: 1340~1347 [DOI]
- 7 Nakanishi K, Nomura K, Tajima K, et al. Fibrinolytic protein and production method thereof. US Patent, 5750650, 1998
- 8 Krishna S H, Srinivas N D, Raghavarao K M, et al. Reverse micelles extraction for downstream processing of protein/enzymes. *Adv Biochem Eng*, 2002, 75: 119~183
- 9 Zacharis E, Halling P J, Rees D G. Volatile buffers can override the "pH memory" of subtilisin catalysis in organic media. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(4): 1201~1205[DOI]
- 10 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248~254
- 11 Jarudilokkul S, Poppenborg L H, Stuckey D C. Backward extraction of reverse micellar encapsulated proteins using a counterionic surfactant. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 62(5): 593~601[DOI]
- 12 Carlson A, Nagarajan R. Release and recovery of porcine pepsin and bovine chymosin from reverse micelles: a new technique based on isopropyl alcohol addition. *Biotechnol Prog*, 1992, 8: 85~90[DOI]
- 13 Hong D P, Kuboi R. Evaluation of the alcohol-mediated interaction between micelles using percolation process of reverse micellar systems. *Biochem Eng J*, 1999, 4: 23~29[DOI]

(2005-05-31 收稿, 2005-10-08 接受)