高效溶栓酶——纳豆激酶的纯化及酶学性质研究

朱健辉[1] 杜连祥[1*] 路福平[1] 刘晓兰[2] 王 萍[1]

（天津科技大学天津市工业微生物重点实验室 天津 300222）[1]

（齐齐哈尔大学生命学院 齐齐哈尔 161006）[2]

摘要：采用硫酸铵分步盐析，Sepharose CM FF 离子交换层析和 Superdex 75 凝胶色谱，对纳豆激酶发酵液进行分离纯化，得到电泳纯的纳豆激酶。并研究了纳豆激酶的酶学性质，实验结果表明，纳豆激酶的最适作用温度为37℃，温度对酶稳定性影响显著；NK 的最适作用 pH 为7.4，pH6～8 范围内酶活相对稳定；EDTA、pepstatin、aprotinine 和 PMSF 对酶有抑制作用，而 SBTI 和 TPCK 对酶有激活作用，其中以 EDTA 的作用最为明显；Zn^{2+} 对酶活有较大的抑制作用；Al^{3+}、Cu^{2+} 对酶也有一定程度的抑制；Mg^{2+}、Ca^{2+} 是较好的酶活稳定剂和促进剂。

关键词：纳豆激酶，纯化，性质

中图分类号：R284.2 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2654（2006）01-0068-04

Purification and Characterization of a Strong Fibrinolytic Enzyme——Nattokinase

ZHU Jian-Hui[1] DU Lian-Xiang[1*] LU Fu-Ping[1] LIU Xiao-Lan[2] WANG Ping[1]

(*Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin* 300222)[1]

(*College of Biotechnology, Qiqihar University, Qiqihar* 161006)[2]

Abstract: Nattokinase was purified from liquid state culture by concentrated using saturation ammonium sulphate, Sepharose CM FF ion exchange and Superdex 75 gel filtration chromatographies. And the characterization of nattokinase was also studied in the paper. The results showed that the optimum temperature was 37℃, and temperature had great effect on enzyme stability. The optimum pH of NK was pH7.4 and it was stable in range of pH6～8. EDTA, pepstatin, aprotinine, PMSF inhibited the acticity of the enzyme, while SBTI、TPCK activated the enzyme, in addition, EDTA was found to be the best inhibitor for nattokinase. Mg^{2+} and Ca^{2+} could activte enzyme activity, Zn^{2+}, Cu^{2+} and Al^{3+} could inhibate the activity.

Key words: Nattokinase, Purification, Characterization

1987年日本学者须见洋行[1]首先在日本传统食品——纳豆中发现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）。经研究表明，NK 是由纳豆枯草杆菌产生的一种丝氨酸蛋白酶，不但能直接作用于纤维蛋白，而且还可激活体内的纤溶酶原，从而表现出很强的溶血栓作用[2]。另外 NK 还有半衰期长，无毒副作用，成本低，可以口服等优点，能够克服现有的溶栓剂存在的诸多不足，有望成为继尿激酶、链激酶、t-PA 后的新一代溶栓剂[3]。本实验对经液态发酵产生的纳豆激酶进行分离纯化，并研究了 NK 的酶学性质，为进一步开发利用纳豆激酶提供了依据。

* 通讯作者 Tel：022-60270037，E-mail：zjhautumn@163.com

收稿日期：2005-04-12，**修回日期**：2005-05-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1 材料与方法

1.1 菌种

枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）NK-040823 由天津市百德生物工程有限公司提供。

1.2 主要试剂与仪器

血纤维蛋白原购自 Sigma 公司，牛凝血酶购自天津血研所，Sepharose CM FF 及 Superdex 75 层析介质购自 Pharmacia 公司，电泳药品为进口电泳纯，其它药品均为国产分析纯；层析柱，TH-梯度混合器，BSZ-100 自动部分收集器，HL-2 恒流泵均产自上海沪西分析仪器厂；电泳仪产自北京六一仪器厂。

1.3 纳豆激酶活力的测定

采用纤维蛋白平板法进行[3]。

1.4 纳豆激酶的纯化

新鲜的纳豆激酶发酵液 5,000r/min 离心 20min，取上清液缓慢加入硫酸铵分步盐析，沉淀物经透析脱盐并调整离子强度和 pH 后，再依次经 Sepharose CM FF 离子交换层析及 Superdex 75 凝胶层析等步骤进行分离纯化，并做 SDS－PAGE 以检验纯化效果。

1.5 纳豆激酶性质的研究

研究温度、pH、金属离子及酶抑制剂对 NK 稳定性的影响[4]。

2 结果与讨论

2.1 纳豆激酶的纯化

纳豆激酶发酵液经 40%～65% 硫酸铵分步盐析，Sepharose CM FF 离子交换层析，Superdex 75 凝胶色谱后，得到一个与酶活峰完全重合的蛋白峰，收集酶活峰各管，透析除盐后做 SDS－PAGE 分析，得到单一的蛋白带（见图 1，1 为凝胶层析后收集的样品，2 为标准蛋白）。由此可见，以上提纯步骤可使 NK 达到电泳纯，是十分有效的纯化工艺路线。利用此工艺，纳豆激酶的纯度提高了 35.5 倍，回收率为 60.7%（见表 1）。

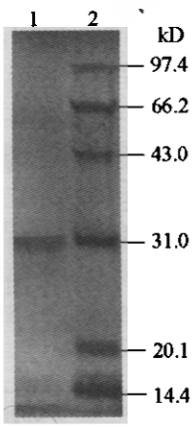


图 1 SDS-PAGE 图

表 1 纳豆激酶纯化表

步骤	总蛋白（mg）	总活力（U）	比 活（U/mg）	回收率（%）	纯化倍数
发酵液	199	174400	876.4	100	1.0
盐 析	28.42	172000	6053	98.6	6.9
离子交换层析	6.84	134160	19625	76.9	22.4
凝 胶层 析	3.41	105986	31086	60.7	35.5

2.2 纳豆激酶酶学性质的研究

2.2.1 最适作用温度的确定：将提纯的纳豆激酶液（浓度 0.02mg/mL）10μL 点在血纤维蛋白平板上后，分别置平板于不同温度下保温 18h，测定酶活力。结果如图 2 所

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

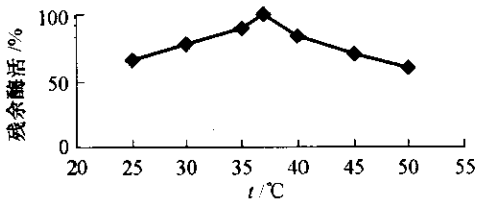


图 2　纳豆激酶的最适作用温度

示。由图 2 可知，纳豆激酶的最适作用温度为 37℃。

2.2.2　温度对酶稳定性的影响：将冻干的酶粉溶于 0.02mol/L 缓冲液中配制酶液，分别于不同温度条件下放置 6h，每隔 1h 取样测定残余酶活。结果如图 3 所示。由图 3 可知，温度对酶稳定性有很大的影响，在 30℃ ~ 60℃ 范围内，残余酶活随着保温温度的升高和保温时间的延长而迅速降低，且温度越高，降速越快，30℃保温 6h 残余 50% 的酶活，而在 60℃保温 1h 酶活就全部丧失。

2.2.3　最适作用 pH 的确定：配制不同 pH 值的缓冲溶液[5]，并以其代替巴比妥钠-盐酸缓冲溶液，制备血纤维蛋白平板。将纳豆激酶纯品 10μL（浓度 0.02mg/mL）点在不同 pH 值的血纤维蛋白平板上，测定纤溶酶活力。结果如图 4 所示。由图 4 可知，纳豆激酶的最适作用 pH 为 7.4。

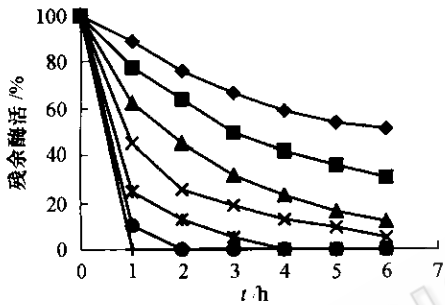
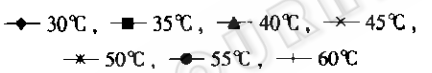


图 3　温度对酶稳定性的影响



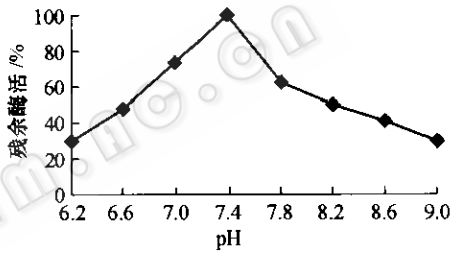


图 4　纳豆激酶的最适作用 pH

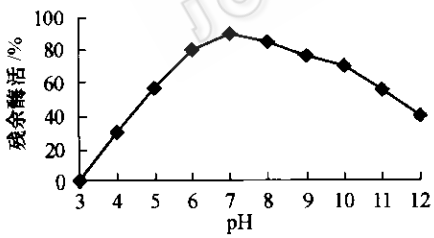


图 5　pH 对酶稳定性的影响

2.2.4　pH 值对酶稳定性的影响：分别用不同 pH 的缓冲液[5]配制酶液，置于室温下放置 24h 后测定残余酶活。结果如图 5 所示。由图 5 可知，NK 在 pH7 稳定性最高，24h 残余酶活高于 90%，在 pH6 ~ 8 范围内，24h 残余酶活不低于 80%，也比较稳定，而在 pH <6 和 pH >8 情况下，酶活迅速降低，且在酸性条件下降速更快。

2.2.5　金属离子对酶稳定性的影响：配制含不同金属离子种类和浓度的酶溶液，室温下放置 18h 后测定残余酶活力，并与不加金属离子的酶溶液对比，计算相对酶活力。结果如表 2 所示。

表 2　金属离子对酶稳定性的影响

金属离子	离子浓度（mol/L）	相对酶活（%）	金属离子	离子浓度（mol/L）	相对酶活（%）
对照	0	100	对照	0	100
Mg^{2+}	0.001	100	Zn^{2+}	0.001	38
	0.005	102		0.005	30
	0.010	104		0.010	26

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

续表 2

K^+	0.001	90	Cu^{2+}	0.001	70
	0.005	86		0.005	68
	0.01	82		0.01	60
Ca^{2+}	0.001	106	Al^{3+}	0.001	62
	0.005	119		0.005	55
	0.010	135		0.010	50

由表 2 可知，Zn^{2+} 加入后出现了沉淀，对酶活有较大的抑制作用；Al^{3+}、Cu^{2+} 对酶也有一定程度的抑制；K^+ 影响不大；Mg^{2+}、Ca^{2+} 是较好的酶活稳定剂和促进剂。

2.2.6 蛋白酶抑制剂对酶稳定性的影响：配制不同种类、不同浓度的蛋白酶抑制剂的溶液，分别与等体积的酶液混合均匀，37℃保温 30min，测残余酶活。结果如表 3 所示。

表 3 蛋白酶抑制剂对纳豆激酶活力的影响

蛋白酶抑制剂	浓度（$\times 10^{-3}$mol/L）	残余酶活（%）	蛋白酶抑制剂	浓度（$\times 10^{-3}$mol/L）	残余酶活（%）
EDTA	对照	100	Aprotinine	对照	100
	1.0	96.24		0.05	100
	2.5	45.37		0.10	96.24
	5.0	23.39		1.0	62.69
	10.0	4.16		2.00	32.10
Pepstatin	对照	100	SBTI	对照	100
	0.5	100		0.1	100
	1.0	100		0.2	100
	2.5	68.90		0.4	112.32
	5.0	37.21		0.8	121.56
PMSF	对照	100	TPCK	对照	100
	1.0	20.52		0.1	100
	2.5	20.52		0.2	108.2
	5.0	20.52		0.5	126.2
	10.0	20.52			

由表 3 可知，EDTA、pepstatin、aprotinine 和 PMSF 4 种蛋白酶抑制剂对 NK 均有不同程度的抑制作用，在实验浓度范围内，前 3 者对 NK 的抑制作用随着浓度的增加而增加，其中以 EDTA 对 NK 的抑制作用最强，PMSF 对 NK 的抑制作用不随浓度变化而改变，而是一直维持较强的抑制作用；SBTI 和 TPCK 对 NK 不但没有抑制作用，反而使酶活力增加，可能该物质对 NK 有一定的激活作用。

参考文献

[1] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, *et al*. Experientia, 1987, **43**: 1110～1111.
[2] 黄志立，罗立新，杨汝德，等. 生命的化学，2002，**2**：82～83.
[3] 陈志文，徐尔尼，肖美燕. 食品科技，2002，**2**：66～68.
[4] 江 晓，董明盛，江汉湖. 中国酿造，2002，**1**：23～25.
[5] 李建武等合编. 生物化学实验原理和方法. 北京：北京大学出版社，1994. 405～409.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn