

纳豆激酶集成化分离技术

苟金霞¹ 高 栋^{2*}

(1 北方民族大学生命科学与工程学院 银川 750021 2 西北大学现代分离科学研究所陕西省重点实验室 西安 710069)

摘要 综述了纳豆激酶分离纯化技术的研究现状和发展趋势。通过对常规分离技术的分析,重点讨论了集成化分离技术的应用及其优势,包括集成化双水相分配技术、扩张床吸附技术以及耐盐性混合模式吸附技术等分离方法,并指出集成化分离技术在生产纳豆激酶以及其他活性蛋白方面,具有广阔的应用前景。

关键词 纳豆激酶 分离纯化 集成化 耐盐吸附

中图分类号 Q819

1986 年,日本的须见洋行教授考察了 173 种食品,发现纳豆可以溶解血栓。1987 年须见洋行等^[1]从纳豆中分离出了一种丝氨酸蛋白酶,并命名为纳豆激酶(nattokinase, NK),它是在纳豆发酵过程中由纳豆枯草杆菌(*Bacillus subtilis natto*)产生的。研究发现,纳豆激酶具有纤溶活性和溶栓能力,可治疗和预防血栓病,还可刺激内皮细胞产生纤溶酶原激活剂(t-PA),增强溶栓能力^[2]。因此纳豆激酶是一种很有潜力的新型口服溶栓药物。

近年来,纳豆激酶的研究和开发越来越受到众多学者的重视,相应的分离纯化技术也取得了许多进展,对此,国内学者已做了很好的综述^[3]。本文就目前纳豆激酶的常规分离纯化技术进行了分析,并对集成化分离技术进行了系统评述,以体现集成化分离技术在生物分离过程中的优势及潜力。

1 常规分离纯化技术

生物反应的产物一般是由细胞及细胞碎片、游离的胞外代谢产物、胞内代谢产物、残存底物及惰性组分等组成的混合液,“难度大,成本高”是生物分离过程的显著特点。目前对于纳豆激酶的分离纯化研究很多,工艺已较成熟。纳豆激酶是胞外酶,发酵结束时主要存在于发酵液中,所以传统的分离路径为:发酵液离心除菌,硫酸铵盐析或有机溶剂沉淀、离心、层析纯化、脱

盐等步骤,主要差别在于采用的层析的种类、搭配以及操作条件的不同。

1993 年 Fujita 等^[4]首次从固体发酵纳豆中分离纯化了纳豆激酶,本文以 Fujita 的分离工艺为例来说明纳豆激酶的常规分离方法,分离流程见图 1 所示。

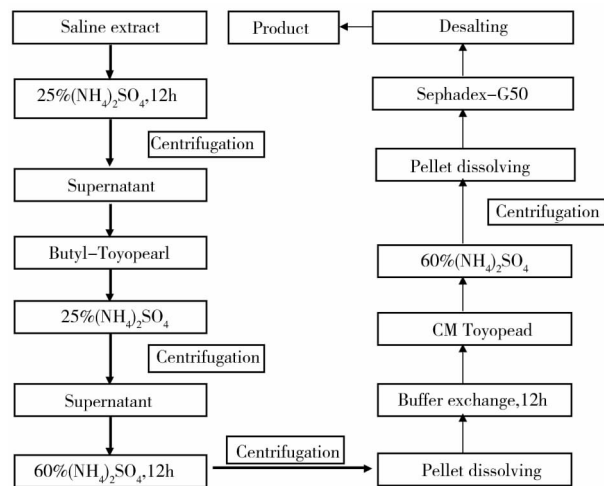


图 1 Fujita 分离纯化纳豆激酶的工艺流程^[4]

Fig. 1 Separation process of nattokinase by Fujita^[4]

图 1 中的流程经过了 4 次盐析, 3 次层析操作。可见, 常规纳豆激酶分离工艺的显著特点是操作步骤多, 时间长。“多步骤”导致的首要问题是产品收率偏低(18% ~ 50%), 其次是能耗、设备投资以及劳力急剧上升, 导致“成本高”。第三个问题是操作时间长, 这对保持生物物质的活性十分不利。这些问题使得生产效率

难以提高,从而造成纳豆激酶分离纯化的成本很高^[4,5]。为此,很多学者尝试了很多不同的分离纯化技术^[3,5-8],并取得了较好的结果。比如韩润林等^[6]采用发酵与泡载分离耦合的方法,使纳豆激酶得到初步纯化,再经超滤脱盐,脱盐液依次经 CM-52 柱层析和 Sephadex G-75 柱层析,分离得到了比活为 9800IU/mg 蛋白的纳豆激酶,回收率为 85.5%。刘俊果等^[7,8]则采用反胶团萃取技术对分离纳豆激酶进行了研究,该技术分离步骤少、选择性高、成本低,从发酵液中萃取纯化纳豆激酶,经过一次萃取循环,蛋白质回收率为 33.25%,酶活性回收率为 80%,但其实验的规模很小。

2 集成化分离纯化技术

从发展趋势来看,生物分离技术研究的目的是要缩短整个下游过程的流程和提高单元操作的效率。分离技术的高效集成化则使生物分离过程出现一个质的转变^[9],其含义在于利用已有的和新近开发的生物分离技术,将下游过程中的有关单元进行有效组合(集成),或者把两种以上的分离技术合成为一种更有效的分离技术,达到提高产品收率、降低过程能耗和增加生产效益的目标。集成化分离技术在纳豆激酶的分离纯化方面已有应用,并高度体现了过程集成化的优势。

2.1 双水相亲和分配技术

亲和层析法的优点是选择性高、分离步骤少,但发酵液必须经过一系列的前处理才可以上样,而双水相分配技术则可以直接处理液固混合物,所以若将二者结合起来,就可形成处理量大、效率高、选择性强的双水相亲和分配组合技术。陆瑾等^[10]对聚乙二醇 4000 (PEG4000) 的羟基进行活化,以亚氨基二乙酸 (IDA) 为螯合剂,制取含有 Cu^{2+} 的金属螯合亲和配基 PEG-IDA- $\text{Cu}(\text{II})$,并以 PEG 和羟丙基淀粉 (PES) 形成双水相,用于直接处理含纳豆激酶的发酵液,如图 2 所示,经过两次分配分离流程后,纳豆激酶的总收率为 81%,纯化因子达到 3.52。

为了实现成相聚合物的有效循环利用,Lu 等^[11]采用 EOPO4000(环氧乙烷与环氧丙烷共聚物,一种温敏型聚合物)替代 PEG 作为成相组分,如图 3 所示,一次分相后,分出富含 EOPO 的上相进行温度诱导可实现二次分相分离,目标物转移进入水相,回收富含 EOPO 相便可循环使用。通过从发酵液中分离纳豆激酶的实验表明,总纯化因子为 2.5,收率为 83%,EOPO 和 EOPO-IDA 的最终收率达到 75%。

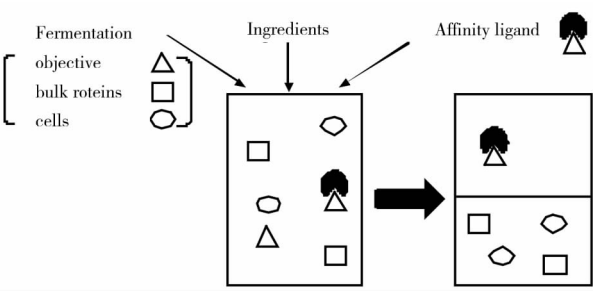


图 2 双水相亲和分配技术分离纯化纳豆激酶过程示意图^[10]

Fig.2 Scheme of process design of immobilized metal ions affinity partition in aqueous two-phase systems^[10] (ATPS)

虽然双水相亲和分配技术的纯化倍数较低,但回收率相对较高,关键的是该技术可以实现常规分离流程中发酵液离心、硫酸铵或乙醇沉淀以及层析等步骤的高效集成,从而缩短了分离时间、步骤,提高了分离效率。该法的缺点是 Cu^{2+} 容易脱落,对人体形成危害,如若采用 Ca^{2+} 等离子或其他亲和配基(如对氨基苯甲脒等),效果或许会更好。

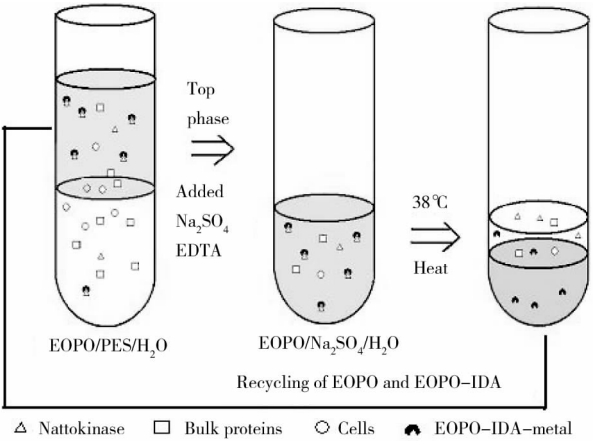


图 3 温度诱导双水相金属螯合亲和分离纳豆激酶过程示意图^[11]

Fig.3 Scheme of bioseparation process with temperature-induced phase separation^[11]

2.2 扩张床吸附技术

扩张床吸附技术(EBA)是一项在产物捕获阶段实现了过程集成的生物分离技术,集固液分离、浓缩和初期纯化于一个单元操作之中,能直接从含有固体颗粒的发酵液、细胞培养液或匀浆液中捕获目标产物,从而减少了操作步骤,降低了分离过程的复杂程度,提高了

分离效率和产品的收率。图 4 给出了生物工程产品下游分离过程的一般处理流程,以及 EBA 的分离流程,图中明显体现了 EBA 在下游分离过程中的集成化作用。

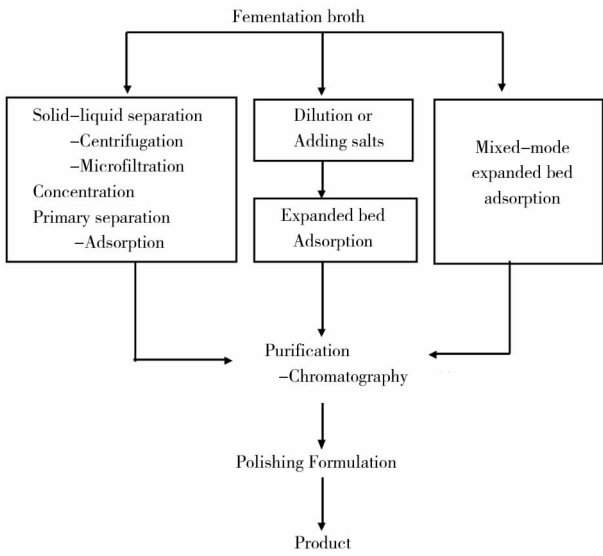


图 4 扩张床吸附技术在下游分离过程中集成化示意图

Fig.4 Process integration of expanded bed adsorption in downstream processing

胡洪波等^[12]采用了离子交换型扩张床吸附剂对发酵液中的纳豆激酶进行了分离纯化,并与传统分离工艺进行了比较。结果表明,对传统分离方法来说,从发酵液的预处理到离子交换层析一共需要离心去除菌体、有机溶剂沉淀、离心收集沉淀、溶解沉淀、离心收集上清液和离子交换层析 6 步操作,而且处理过程中涉及到高速冷冻离心设备的使用和大量乙醇的使用,设备占用多,药品的消耗也大。若利用扩张床吸附技术,则只需要 2 步操作。与传统方法相比,用扩张床分离纯化纳豆激酶,操作步骤从 6 步减少为 2 步,操作时间缩短了 8~10h,回收率提高了约 50%,这充分体现了分离过程集成化的优势。

2.3 耐盐性混合模式扩张床吸附技术

扩张床吸附技术的分离对象是含有固体颗粒的发酵液、细胞培养液或匀浆液等复杂的粗料液,其离子强度一般为 10~30mS/cm。此时,若采用离子交换型扩张床吸附技术,由于离子强度过高,所以必须对粗料液进行一定比例的稀释,这样一来,既增加了过程处理量和操作时间,又使得目标物的吸附效率降低^[13];而若采用疏水型扩张床吸附技术时,该离子强度则又太低,所

以需要添加适当的盐,以提高离子强度,促进吸附^[14],这样既增加了原料盐的消耗,增加成本,又增重了后处理的负担,如图 4 所示。对于此现象,耐盐性混合模式扩张床吸附技术则体现出了明显的优势。耐盐性混合模式扩张床吸附技术首次由 Burton 于 1997 年提出^[15],该技术的吸附剂同时结合有离子交换配基和疏水配基,在低盐浓度下,配基上的带电基团通过静电作用吸附目标蛋白,盐浓度提高后,疏水基团则提供疏水作用来吸附蛋白质,从而表现出了明显的耐盐吸附(salt-independent adsorption)的特性。

Lu 等^[16]采用了 Upfront Chromatography A/S 公司的 Fastline PRO 混合模式扩张床吸附剂对纳豆激酶的分离纯化进行了研究。纳豆激酶发酵液的离子强度为 10mS/cm,而 Fastline PRO 在 3~33mS/cm 的离子强度范围内都保持有较好的吸附容量,所以发酵液未经任何处理直接上样,就可以实现吸附剂对目标蛋白的捕获。当改变体系的 pH 值,使得纳豆激酶带有与吸附剂相同的负电荷,通过静电排斥力就可以实现洗脱,最终的纯化因子达到 12.3。另外由于细胞也带有负电荷,所以并不影响床层扩张时的稳定性。Lu 的例子更充分地说明了耐盐性混合模式扩张床吸附技术在生物分离纯化过程中的集成化作用。

3 展望

纳豆激酶作为一种新型的溶栓剂,具有直接降解血栓和激活人体产生纤溶酶原激活剂的双重功能,而且可口服,无抗原性,安全可靠,可大规模生产。这些优点使得人们对纳豆激酶的需求快速增长,如何经济高效地从粗料液中捕获纳豆激酶,是实现大规模生产中的关键因素。表 1 对本文中所提到的各种分离纯化方法做了比较。

表 1 常规工艺与集成化工艺分离纳豆激酶的比较

Table 1 Comparison of the purification process of nattokinase by conventional method and integration method

	常规方法	双水相分配技术	扩张床吸附技术	耐盐性混合模式扩张床吸附技术
操作时间	>36h	6h	3h	2h
纯化倍数	8~10	3.52	8.2	12.3
回收率	50%	81%	90%~95%	47.3%
工艺复杂性	繁琐	简单	简单	简单

如表 1 所示,常规分离纯化技术,操作步骤多、周期长、收率低,由于这些不足使得纳豆激酶的生产成

本大幅度增加,这难以满足人们对新一代溶栓剂纳豆激酶的要求。缩短整个分离流程的步骤和提高单元操作的效率,是有效的途径之一。集成化分离技术在这一方面已体现出了明显的优势:其中,双水相分配技术可明显缩短操作步骤,而且回收率较高,但该技术目前只适合于实验室规模。温度诱导相分离以及结合磁场作用、超声波作用等,可进一步改善成相聚合物回收困难、相分离时间长、易乳化等问题;另外,加强系统工程的研究,完成从单一工艺的开发到系统模型的建立,从规模化流程的设计到工程设备的构建等方面的工作,可为双水相分配技术的进一步完善并走向生产规模化奠定基础;扩张床吸附技术,尤其是耐盐性混合模式扩张床吸附技术,则更体现出集成化分离的优势,通过一步操作即可实现目标产物的粗分离,大大减少了处理步骤,提高了分离效率。目前,GE Healthcare, Pall, Upfront Chromatography A/S, BioRad 等公司都相应开发了各种配基结构的混合模式吸附剂,国内外学者对于该技术也都做了很好的综述^[13,17,18],然而,这种新型的分离技术目前还不成熟,尚未被大规模应用,对于分离机理、控制因素、模型化等方面的研究也还处于初步摸索阶段。比如耐盐性混合模式吸附技术(表1),还存在着回收率偏低的问题,加强对耐盐性吸附机理及其影响因素等方面的研究,是解决该问题的关键所在。事实上,耐盐吸附和回收率是一对矛盾,实现耐盐吸附需要一定的配基密度,但若密度过高,则对活性蛋白的洗脱造成困难,使得回收率偏低,所以,合适的配基密度是耐盐吸附技术的关键之一。另外,混合模式配基中静电基团和疏水基团的比例、相对位置以及其他作用力(比如氢键作用力)的引入等对于耐盐吸附及回收率来说都显得非常重要,所以筛选合适化学结构的配基,并引入计算机分子模拟、分子对接等手段,将有助于这方面工作的突破。

虽然集成化分离技术还存在着诸多问题,但应该看到,研制和发展集成化分离技术是改进和优化生物分离过程的重要手段之一,继续研究集成化分离技术,特别是对于吸附机理、影响因素及模型化等方面的基础研究,将体现出其更大的现实作用及可观的发展潜力。

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 (10): 1110 ~ 1111

- [2] Sumi H, Hamada H, Nakanishi K, et al. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematologica*, 1990, 84 (3): 139 ~ 143
- [3] 阳承利,邢建民,刘俊果,等. 纳豆激酶分离纯化技术的研究进展. *现代化工*, 2004, 24 (2): 23 ~ 25
- Yang CH L, Xing J M, Liu J G, et al. *Modern Chemical Industry*, 2004, 24 (2): 23 ~ 25
- [4] 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993, 197 (3): 1340 ~ 1347
- [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. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (27): 24690 ~ 24696
- [6] 韩润林,张小勇,张建安,等. 枯草杆菌溶栓酶的分离纯化研究. *中国生化药物杂志*, 2000, 21 (5): 219 ~ 222
- Han R L, Zhang X Y, Zhang J A, et al. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2000, 21 (5): 219 ~ 222
- [7] 刘俊果,邢建民,畅天狮,等. 反胶团萃取分离纯化纳豆激酶. *科学通报*, 2006, 51 (2): 133 ~ 137
- Liu J G, Xing J M, Chang T SH, et al. *Chinese Science Bulletin*, 2006, 51 (2): 133 ~ 137
- [8] Liu J G, Xing J M, Shen R, et al. Reverse micelles extraction of nattokinase from fermentation broth. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 21 (3): 273 ~ 278
- [9] 梅乐和,姚善泾,林东强,等. 生物分离过程研究的新趋势—高效集成化. *化学工程*, 1999, 27 (5): 38 ~ 41
- Mei L H, Yao S J, Lin D Q, et al. *Chemical engineering (China)*, 1999, 27 (5): 38 ~ 41
- [1] 陆瑾,赵珺,林东强,等. 金属螯合双水相亲和分配技术分离纳豆激酶的研究. *高校化学工程学报*, 2004, 18 (4): 465 ~ 470
- Lu J, Zhao J, Lin D Q, et al. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2004, 18 (4): 465 ~ 470
- [11] Lu J, Lin D Q, Yao S J. Preparation and application of novel EPOP-IDA-Metal polymer as recyclable metal affinity ligand in aqueous two-phase systems. *Industrial Engineering Chemical Research*, 2006, 45 (5): 1774 ~ 1779
- [12] 胡洪波,张雪洪,梅乐和,等. 膨胀床离子交换吸附分离纳豆激酶. *化学工程*, 2005, 33 (4): 1 ~ 4
- Hu H B, Zhang X H, Mei L H, et al. *Chemical Engineering (China)*, 2005, 33 (4): 1 ~ 4
- [13] Burton S C, Harding D R K. Salt-independent adsorption

chromatography new broad-spectrum affinity methods for protein capture (review). Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2001, 49: 275 ~ 287

[14] Gooding D L, Schmuck M N, Nowlan M P, et al. Optimization of preparative hydrophobic interaction chromatography purification methods. Journal of Chromatography, 1986, 359: 331 ~ 337

[15] Burton S C, Haggarty N W, Harding D R K. One step purification of chymosin by mixed mode chromatography. Biotechnology Bioengineering, 1997, 56 (1): 45 ~ 55

[16] Lu M H, Lin D Q, Wu Y C, et al. Separation of nattokinase from Bacillus subtilis fermentation broth by expanded bed adsorption with mixed-mode adsorbent. Biotechnology Bioprocess Engineering, 2005, 10 (2): 128 ~ 135

[17] 韩凌,胡洪波,彭华松,等. 非盐依赖层析的研究与应用. 生物化学与生物物理进展,2005,32 (1):86 ~ 90

Han L, Hu H B, Peng H S, et al. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2005, 32 (1): 86 ~ 90

[18] 姚善泾,高栋,林东强. 一种新的生物分离方法——混合模式吸附层析. 化工学报,2007,58 (9):2169 ~ 2177

Yao SH J, Gao D, Lin D Q. Journal of Chemical Industry and Engineering (China), 2007, 58 (9): 2169 ~ 2177

Novel Progress in Separation and Purification Technology of Nattokinase

GOU Jin-xia¹ GAO Dong²

(1 School of Life Sciences and Engineering, North University for Ethics, Yinchuan 750021, China)

(2 Institute of Modern Separation Science, Key Laboratory of Separation Science in Shaanxi Province, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract The progress in separation and purification technology of nattokinase is reviewed. Based on the analyze of normal purification technology, the novel technologies about the integration of bioseparation processes are introduced, such as aqueous two-phase partitioning integrated with affinity ligand, expanded bed adsorption, and mixed-mode adsorption technology. In general, integration of bioseparation processes provides a good way to improve and optimize the whole separation process of nattokinase and other proteins.

Key words Nattokinase Purification Integration Salt-independent adsorption