

# 纳豆激酶的纯化及性质研究

吕莹 张露 冯雷 李虹 郭家荣

(中国食品发酵工业研究院 北京 100027)

**摘要** 从固态发酵培养的纳豆中提取纳豆激酶,采用盐析、疏水层析、离子交换层析等方法,对提取液进行纳豆激酶的分离纯化。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定,活性酶蛋白为单一组分,并测得其分子质量为 28ku。纳豆激酶在 pH5.0~10.0 4~37℃ 范围内具有较好的稳定性,其纤溶活性可被 0.1mmol/L 的 PMSF 完全抑制。体外溶栓实验表明,纳豆激酶为纤溶酶而不是纤溶酶原激活剂。

**关键词** 纳豆激酶 枯草芽孢杆菌 纯化 性质

纳豆激酶(nattokinase, NK)是由枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)产生的一种具有强烈溶栓功能的酶,本质上是一种碱性丝氨酸蛋白酶。1987年,由日本的须见洋行<sup>[1]</sup>等首先发现纳豆中存在该酶。它具有安全性好,作用迅速,成本低,有望成为继尿激酶、链激酶、重组组织型纤溶酶原激活剂(t-pA)后的新一代溶栓剂<sup>[2]</sup>。本实验室筛出一株产纳豆激酶活力较高的枯草芽孢杆菌,经固态发酵后对所得到的纳豆激酶进行纯化,并对其性质进行了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及培养基

枯草芽孢杆菌,由实验室筛选。

发酵培养基:浸泡、蒸煮后的大豆。

### 1.2 试剂

丙烯酰胺购自 Sigma 公司;甲叉双丙烯酰胺购自 Fluka 公司;蛋白质分子量标准为上海东风化学试剂厂产品;PMSF(苯甲基磺酰氟)购自北京欣经科生物有限公司;牛血纤维蛋白原、凝血酶、尿激酶(标准品),中国药品生物制品鉴定所产品。蛋白质电泳系统购自北京市六一仪器厂。

### 1.3 蛋白质的含量测定

采用 Bradford<sup>[3]</sup>法,以牛血清白蛋白为标准蛋白。

### 1.4 酶纤溶活性的测定

参照 Astrup<sup>[4]</sup>方法。制备纤维蛋白平板,用微量加样器注射样品(10 μL)于平板中,于 37℃ 恒温箱内放置 17 h,测溶圈的垂直直径。以尿激酶标准品作标准曲线。加热纤维蛋白平板的制作<sup>[5]</sup>按上述方法制得的平板于 85℃ 温箱中加热 1 h,冷凝后即成不含纤维蛋白溶酶原活性的平板。

### 1.5 电泳分析

酶的纯度用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定<sup>[6]</sup>;分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 3%,考马斯亮蓝 R-250 染色。

## 2 实验结果

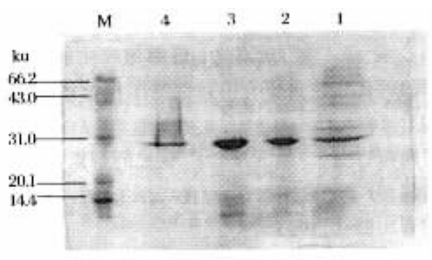
### 2.1 纳豆激酶的分离纯化

采用盐析、疏水层析、离子交换层析等方法对纳豆激酶进行纯化,得到白色的纳豆激酶粉末。SDS-PAGE 显示活性成分为单一区带(图 1)。利用该纯化流程,从 180 g 湿纳豆中可得 4.7 mg 活性蛋白,每毫克蛋白活力达 5663.3 U/mL,纯度提高 5.8 倍,回收率为 45.2% (见表 1)。

### 2.2 纳豆激酶的性质

#### 2.2.1 分子质量

在分离胶浓度为 12% 的 SDS-PAGE 中,无



M-分子量标准;1-粗酶液;2-盐析;  
3-阴离子交换层析;4-阳离子交换层析

图 1 纯化过程中 SDS-PAGE  
凝胶电泳图

表 1 纳豆激酶的分离纯化

步 骤	总蛋白 /mg	总活力 /U	比活力 /U·mg <sup>-1</sup>	回收率 /%	纯化 倍数
粗酶液	60.8	58 880	968.4	100.0	1.0
疏水层析	25.4	55 500	2185.0	94.3	2.3
盐析	18.0	47 813	2656.3	81.2	2.7
阴离子交换层析	10.2	41 616	4080.0	70.7	4.2
阳离子交换层析	4.7	26 618	5663.3	45.2	5.8

论有无还原剂  $\beta$ -巯基乙醇,纳豆激酶均呈现一条区带,说明纳豆激酶为单亚基蛋白质,计算其分子质量为 28 ku(如图 2)。

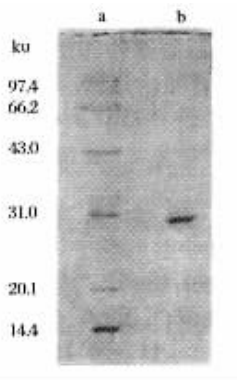


图 2 纳豆激酶的 SDS-PAGE

a- 分子质量标准; b- 纯化的纳豆激酶

### 2.2.2 pH 稳定性

室温下 1 h,NK 在 pH5.0~11.0 范围内稳定,pH 4.0 时残余活力为 25%。室温下 24 h,NK 在 pH5.0~10.0 范围内稳定,pH 11.0 时残余活力不足 5%。最适 pH 为 9.0(活力达 116%,以 pH 7.4 为 100%)。

### 2.2.3 热稳定性

NK 经 60℃、2 h 的加热即完全丧失活性,

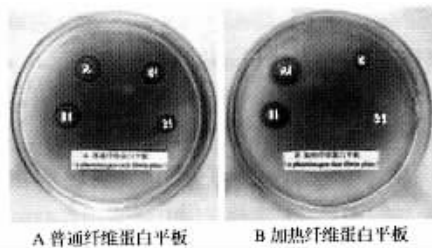
50℃下放置 7 h 残余活力为 18%,37℃下放置 48 h 后仍保持约 78% 的活性,4℃放置 6 个月、室温放置 1 个星期未见活性明显下降,说明 NK 具有较好的热稳定性。但液态酶在 -20℃放置 3 个月活性损失 90%, -80℃冷冻 2.5h 活力下降约 30%。

### 2.2.4 抑制剂

NK 的纤溶活性可被 0.1mmol/L 的 PMSF 完全抑制,1mmol/L 的 EDTA 和 2% SDS 对 NK 活性无任何抑制作用。

### 2.2.5 体外纤溶性质

由于市售的纤维蛋白原试剂中往往混有少量的纤溶酶原,因此无法断定纳豆激酶的作用是直接溶栓,还是间接激活纤溶酶再作用。实验中将配好的平板经 85℃,1 h 加热,破坏纤维蛋白平板中混杂的纤溶酶原,结果尿激酶本身不形成溶圈,而与纤溶酶原混合后则出现纤溶活性。与之不同的是,NK 在加热平板上仍形成溶圈,而与纤溶酶原混合后纤溶活性并未提高。在未加热平板上,加入纤溶酶原的 NK 与不加入纤溶酶原的 NK 溶圈相同,而加入纤溶酶原的尿激酶与不加纤溶酶原的尿激酶溶栓活性相比有所提高。由以上 2 个实验结果说明,NK 是一种纤溶酶,而不是纤溶酶原激活剂(如图 3)。



1-纳豆激酶(100 U/mL); 2-纳豆激酶(100 U/mL)和纤溶酶原(13 U/mL) 3-尿激酶(60 U/mL)和纤溶酶原(13 U/mL); 4-尿激酶(60 U/mL)

图 3 含有纤溶酶原活性的平板和不含纤溶酶原活性的平板上纳豆激酶的活性

## 3 讨 论

实验中发现,NK 为一种具有直接溶栓功能的纤溶酶,与参考文献[1]中报道的结果一致。另外,体外溶栓实验中,NK 在加热平板上显示

的溶栓活性比未加热平板的活性高。分析原因是加热后改变了不溶性纤维蛋白原的结构,使点入的样品更易于渗透,形成的溶圈比未加热平板的溶圈大且模糊。

### 参 考 文 献

- 1 Simi 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: 1110 ~ 1111
- 2 陈志文, 徐尔尼, 肖美燕. 纳豆激酶的研究进展 [J]. *食品科技*, 2002 (2): 66 ~ 68
- 3 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Am Biochem*, 1976, 72: 1105 ~ 1112
- 4 Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1952, 40: 346 ~ 351
- 5 王 骏, 王 敏, 王以光. 链霉菌产生的新型纤溶酶的纯化和性质研究 [J]. *生物工程学报*, 1999, 15(2): 147 ~ 152
- 6 萨姆布鲁克丁, 弗里齐 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著, 金冬雁译. *分子克隆实验指南(第二版)* [M]. 北京: 高等教育出版社, 1993
- 7 Pekka Mmantsala, Howard Zalkin. Extracellular and membrane-bound proteases from *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1980, 141(2): 493 ~ 501
- 8 Mitsugu Fujita, Keiichi Nomura, Kyongsu Hong et al. Purification and characterization of strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993, 197(3): 1340 ~ 1347
- 9 Wonkeuk Kim, Keehyun Choi, Yongtaek Kim et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 2482 ~ 2488

## Purification and Characterization of Nattokinase from *Bacillus subtilis*

Lü Ying    Zhang Lu    Feng Lei    Li Hong    Guo Jiarong

(China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing, 100027)

**ABSTRACT** A nattokinase extracted from natto was purified by ammonium sulfate fraction precipitation, hydrophobic interaction column and ion exchange column. The molecular weight of this enzyme was 28 ku by SDS-PAGE. The fibrinolytic activity of NK is stable at pH 5.0 ~ 10.0 and 4 ~ 37°C. The activity can be entirely inhibited by 0.1 mmol/L PMSF. The fibrinolytic experiment in vitro indicated that nattokinase is a fibrinolytic enzyme instead of a plasminogen activator.

**Key words** nattokinase, *Bacillus subtilis*, purification, characterization



### 保健品必须达到 GMP 认证

从 2003 年 10 月 10 日起,国家食品药品监督管理局完成了与卫生部的交接,正式开展保健食品的审批工作。根据规定,今后保健品产品要做人体实验,必须通过严格的实验过程,才有可能发放产品批号。2004 年 3 月底前,没达到 GMP 认证的保健品业不允许生产销售保健品。在保健品实施“放心工程”的过程中,从注册、GMP 认证、市场监管、标准认证、直销管理等诸多环节还将出台一系列新政策。