文章编号:1674-2869(2025)01-0053-06

响应面法优化纳豆激酶肠溶胶囊的制备工艺

李迪文,洪辅安,库晨锋,胡 闽,张佑红*
武汉工程大学环境生态与生物工程学院,湖北 武汉 430205

摘 要:通过响应面法优化纳豆激酶肠溶胶囊的制备工艺以提高胶囊的包埋率,并在人工胃肠液中验证纳豆激酶胶溶肠囊对纳豆激酶的保护作用。探讨了海藻酸钠浓度、羧甲基纤维素钠浓度和氯化钙浓度对纳豆激酶肠溶胶囊包埋率的影响。在单因素实验的基础上,进行响应面优化,得到的最优制备条件为:海藻酸钠36.43 g/L、羧甲基纤维素钠3.15 g/L、氯化钙7.69 g/L,包埋率为87.55%。将制得的纳豆激酶肠溶胶囊依次放于人工胃液和人工肠液中在37 ℃、180 r/min条件下分别处理2和3 h,同时将纳豆激酶裸酶放于人工胃液中相同条件下处理2 h作为对比。纳豆激酶肠溶胶囊在肠液中酶活为20.35 FU/mL,而裸酶酶活仅为1.36 FU/mL。模拟胃肠液实验结果表明制得的纳豆激酶肠溶胶囊具备显著的抵御胃酸的保护作用,为纳豆激酶的保健药品开发提供了理论依据和工艺参数。

关键词:纳豆激酶;海藻酸钠;肠溶胶囊;响应面法
中图分类号:Q939.97 **文献标识码**:A **DOI**:10.19843/j.cnki.CN42-1779/TQ.202303007

Optimization of preparation process of nattokinase enteric-coated capsules by response surface methodology

LI Diwen, *HONG Fu'an*, *KU Chenfeng*, *HU Min*, *ZHANG Youhong**
School of Environmental Ecology and Biological Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China

Abstract: The preparation process of nattokinase enteric-coated capsules was optimized using response surface methodology to improve the encapsulation efficiency of the capsules, and the protective effect of nattokinase enteric-coated capsules on nattokinase was verified in artificial gastrointestinal fluid. The effects of sodium alginate concentration, sodium carboxymethylcellulose concentration and calcium chloride concentration on the encapsulation rate of nattokinase enteric-coated capsules were investigated. Based on the single-factor experiment, response surface optimization was performed, and the optimal preparation conditions were determied as follows: sodium alginate 36.43 g/L, sodium carboxymethylcellulose 3.15 g/L, calcium chloride 7.69 g/L, achieving an encapsulation rate of 87.55%. The prepared nattokinase enteric-coated capsules were successively placed in artificial gastric juice and artificial intestinal juice and treated at 37 ℃ and 180 r/min for 2 and 3 h, respectively. Meanwhile, the nattokinase in its free form was placed in artificial gastric juice under the same conditions for 2 h as a control. The enzyme activity of the nattokinase enteric-coated capsules in the intestinal juice was 20.35 FU/mL, while that of the free enzyme was only 1.36 FU/mL. The results of simulated gastrointestinal fluid experiments showed that the produced nattokinase enteric-coated capsules possessed significant protective effect against gastric acid, providing a theoretical basis and process parameters for the development of nattokinase-based health products.

Keywords: nattokinase; sodium alginate; enteric-coated capsules; response surface methodology

收稿日期:2023-03-06

作者简介:李迪文,硕士研究生。Email:lidiwen827@163.com
***通信作者**:张佑红,博士,教授。Email:youhong@aliyun.com

引文格式:李迪文,洪辅安,库晨锋,等. 响应面法优化纳豆激酶肠溶胶囊的制备工艺[J]. 武汉工程大学学报,2025,47(1):53-58.

纳豆激酶是纳豆在发酵过程中由纳豆芽孢杆菌产生的一种具有强力纤溶活性的碱性丝氨酸蛋白酶[1]。纳豆激酶的主要作用是溶解血栓[2],且溶血栓活性是纤溶酶的4倍[3]。纳豆激酶还具有保护肝脏和神经[4-6]、促进口腔黏膜炎的愈合[7]、治疗高血压、减少水肿、预防骨质疏松和避免脑出血等多种功效[8-9]。

纳豆激酶等电点为8.6、在pH小于5或者大于10时,会迅速失活[10]。牛血清蛋白、蛋白胨、明胶、甘油、丙二醇和海藻酸钠等能显著提高纳豆激酶的稳定性[11-13]。将纳豆激酶做成合适的剂型,能够提高纳豆激酶的稳定性和利用率[14-16]。微胶囊是一种容器,这种容器可以是中空的,也可以有填充物质在其中[17]。采用海藻酸钠胶囊包埋可以显著提高耐酸性,可以起到保护活性物质以及缓释作用。因此,为了提高纳豆激酶的利用率,采用海藻酸钠包埋纳豆激酶制成肠溶胶囊,使其能顺利到达小肠被吸收。本实验室筛选出了高产菌株发酵生产纳豆激酶[18-19]。本研究通过响应面法优化了制备纳豆激酶肠溶胶囊的条件。

1 实验部分

1.1 材料与设备

纳豆激酶,为本实验室筛选出的枯草芽孢杆菌*YC4*发酵制得[20]。海藻酸钠(sodium alginate,SA)、羧甲基纤维素钠(caboxymethylcellulose sodium,CMC-Na)、氯化钙($CaCl_2$)、胃蛋白酶、胰蛋白酶,购于国药集团化学试剂有限公司;牛血清纤维蛋白原、凝血酶,购于上海源叶生物科技有限公司。紫外分光光度计UV-1800,苏州岛津仪器有限公司。

1.2 纳豆激酶肠溶胶囊的最佳制备工艺

配制20 mL的SA和CMC-Na溶液,加热搅拌至溶解,冷却至室温后加入纳豆激酶发酵上清液10 mL,搅拌至混合均匀。配制20 mL $CaCl_2$溶液于锥形瓶中,放于磁力搅拌器上缓慢搅拌。用注射器将纳豆激酶SA混合溶液逐滴滴入$CaCl_2$溶液中。滴入完毕后,静置0.5 h使胶囊固化,然后筛出微胶囊用超纯水冲洗几遍,即得到纳豆激酶肠溶胶囊。

1.3 纳豆激酶酶活(FU)测定

采用紫外分光光度计法测纳豆激酶酶活,具体操作按照《广东省食品安全地方标准》中关于纳豆粉的附录A《纳豆激酶测定方法-紫外分光光度法》进行。

1.4 包埋率计算

胶囊制备过程中,一部分纳豆激酶被包埋进胶囊,另一部分纳豆激酶溶解在$CaCl_2$溶液中。通过测定原酶液和$CaCl_2$溶液中的纳豆激酶酶活即可计算出包埋率,计算公式如下:

$$\text{包埋率}(\%) = 1 - \frac{\text{CaCl}_2\text{溶液中的纳豆激酶酶活(FU)}}{\text{纳豆激酶原酶液酶活(FU)}} \times 100\%$$

1.5 纳豆激酶肠溶胶囊制备的单因素实验

纳豆激酶肠溶胶囊制备的单因素实验设计如表1所示。

表1 纳豆激酶肠溶胶囊制备的单因素实验设计

Tab.1 Single factor experimental design for preparation of nattokinase enteric capsules g/L

方法	SA质量浓度	CMC-Na质量浓度	$CaCl_2$质量浓度
SA单因素实验	10、20、30、40、50	3	8
CMC-Na单因素实验	30	1、2、3、4、5	8
$CaCl_2$单因素实验	30	3	2、5、8、11、14

1.6 纳豆激酶肠溶胶囊制备的响应面实验

在单因素实验的基础上,进行响应面实验,选取SA质量浓度(A)、CMC-Na质量浓度(B)、$CaCl_2$质量浓度(C)3个因素为自变量,每个因素设置3个水平,以纳豆激酶肠溶胶囊的包埋率为响应值,按照Design Expert 11软件中的Box-Behnken进行响应面实验。响应面试验因素与水平如表2所示。

表2 响应面试验因素与水平

Tab. 2 Factors and levels in response surface experiments g/L

水平	因素		
	A(SA)	B(CMC-Na)	C($CaCl_2$)
−1	20	2	5
0	30	3	8
1	40	4	11

1.7 模拟胃肠道实验

将制得的纳豆激酶肠溶胶囊放于人工胃液中37 ℃、180 r/min处理2 h,将胶囊滤出用超纯水冲洗3遍,再放入人工肠液中37 ℃、180 r/min处理3 h,测量人工肠液中的酶活。同时将纳豆激酶原液放于人工胃液中37 ℃、180 r/min处理2 h,测量人工胃液中的酶活。

2　结果与讨论

2.1　纳豆激酶酶活（FU）测定标准曲线的绘制

利用紫外分光光度法测纳豆激酶酶活，结果如图1所示。

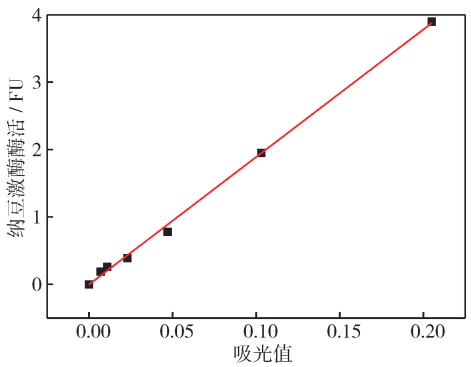

图1　纳豆激酶酶活标准曲线

Fig.1　Standard curve of Nattokinase enzyme activity

由图1可知，纳豆激酶酶活与吸光度的标准回归方程为：y=18.937x−0.004 2，其中 R^2=0.998 3。表明吸光度在0.0~0.2的范围内，紫外分光光度法测纳豆激酶酶活的线性关系良好。

2.2　单因素实验结果

2.2.1　SA浓度对包埋率的影响　由图2可知，SA质量浓度在10~50 g/L的范围内，纳豆激酶肠溶胶囊的包埋率呈先上升后下降的趋势。在SA质量浓度为30 g/L时，纳豆激酶肠溶胶囊的包埋率达到最高，为86.04%。

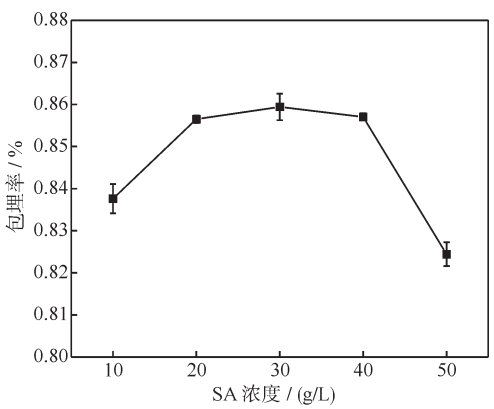

图2　SA浓度对包埋率的影响

Fig. 2　Effect of SA mass concentration on embedding rate

2.2.2　CMC-Na浓度对包埋率的影响　由图3可知，CMC-Na质量浓度在1~5 g/L的范围内，纳豆激酶肠溶胶囊的包埋率呈先上升后下降的趋势。在CMC-Na质量浓度为3 g/L时，纳豆激酶肠溶胶囊的包埋率达到最高，为86.20%。

2.2.3　$CaCl_2$浓度对包埋率的影响　由图4可知，$CaCl_2$质量浓度在2~14 g/L的范围内，纳豆激酶肠溶胶囊的包埋率先略微下降再增高，质量浓度为8 g/L时，纳豆激酶肠溶胶囊的包埋率达到最高，为86.063%，然后随质量浓度增大，包埋率下降。当$CaCl_2$质量浓度低于2 g/L时，纳豆激酶肠溶胶囊不成型，变成一整块，导致包埋率偏高。所以最佳$CaCl_2$质量浓度选择为8 g/L。

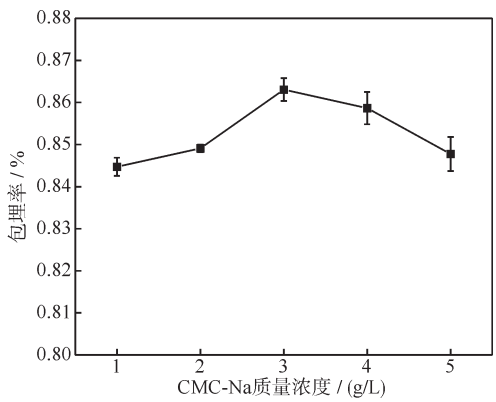

图3　CMC-Na质量浓度对包埋率的影响

Fig. 3　Effect of CMC-Na mass concentration on embedding rate

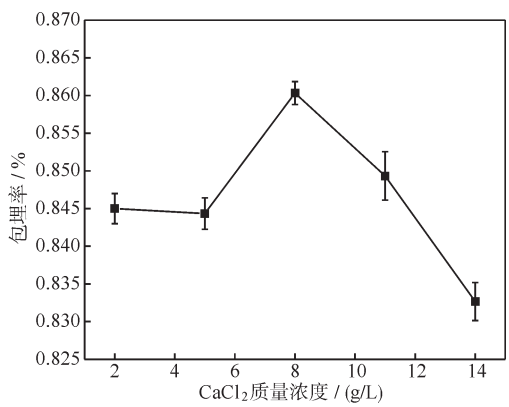

图4　$CaCl_2$浓度对包埋率的影响

Fig. 4　Effect of $CaCl_2$ mass concentration on embedding rate

2.3　响应面实验结果

2.3.1　Box-Behnken中心组合实验方案实验及结果　根据Box-Behnken中心组合实验方案设计条件进行实验，测定不同条件下纳豆激酶肠溶胶囊的包埋率，实验设计及结果如表3。

2.3.2　回归模型方差分析　以纳豆激酶肠溶胶囊的包埋率为指标，利用Design-Expert 11软件对表3中的实验结果进行分析，得到纳豆激酶肠溶胶囊包埋率的回归方程式为：

包埋率=87.22+0.92A+0.19B−0.17C−0.04AB−0.04AC−0.023BC−2.68A^2−0.58B^2−0.92C^2。

表3 响应面实验及结果

Tab. 3 Response surface experiments and results

序号	A(SA)/(g/L)	B(CMC-Na)/(g/L)	C($CaCl_2$)/(g/L)	包埋率/%
1	20	2	8	82.82
2	20	4	8	83.23
3	20	3	5	82.85
4	20	3	11	82.58
5	30	2	5	85.64
6	30	4	5	86.13
7	30	2	11	85.37
8	30	4	11	85.77
9	30	3	8	87.36
10	30	3	8	86.94
11	30	3	8	87.42
12	30	3	8	87.05
13	30	3	8	87.34
14	40	2	8	84.78
15	40	4	8	85.03
16	40	3	5	84.74
17	40	3	11	84.32

对回归方程进行方差分析,结果如表4。从表4可知,模型的显著性极高,其中一次项A、B、C,二次项A^2、B^2、C^2影响显著,其他项影响不显著。可以看出,SA的质量浓度对纳豆激酶肠溶胶囊包埋率的影响最大,CMC-Na质量浓度的影响次之,$CaCl_2$浓度的影响最小。响应面模型P值小于0.001,表现为极显著,同时失拟项P值为0.974 3,表现为不显著,说明模型有着较好的稳定性。模型的相关系数R^2为0.995 8,说明模型与实际实验的拟合度好,校正后的决定系数R^2_{Adj}为0.990 3,与R^2接近,说明模型有很好的准确性和通用性。因此,这个模型可以用来预测纳豆激酶肠溶胶囊制备的最佳条件。

2.3.3 响应面交互作用分析 在回归模型方差分析的基础上,利用Design-Expert 11软件绘制各交互项的响应面图和等高线图,可直观地看出各因素对纳豆激酶肠溶胶囊包埋率的影响,见图5。

由图5可以看出,SA方向上响应曲面较陡,等高线密集,说明SA的质量浓度对包埋率的影响较为显著,CMC-Na和$CaCl_2$的质量浓度对应的坡度较平缓,表明这两个因素对纳豆激酶肠溶胶囊包埋率的影响较不显著。

2.3.4 响应面优化条件验证实验 利用Design-Expert 11软件推算出的最优制备条件为:SA质量浓度36.43 g/L、CMC-Na质量浓度3.15 g/L、$CaCl_2$质量浓度7.69 g/L,预计包埋率87.63%。用最优制备条件进行3次重复实验,包埋率的平均值为87.55%,与预测值基本相符,表明该制备条件可靠。

2.4 模拟胃肠道实验

如图6所示,用最优制备条件制得的纳豆激酶肠溶胶囊经过2 h人工胃液和3 h的人工肠液处理后,在肠液中检测到的酶活为20.35 FU/mL。而在

表4 回归模型方差分析

Tab. 4 Regression model analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	44.91	9	4.99	183.42	< 0.001	***
A-SA	6.83	1	6.83	250.9	< 0.001	***
B-CMC-Na	0.300	1	0.300	11.04	0.013	**
C-$CaCl_2$	0.218	1	0.218	8.01	0.025	**
AB	0.006	1	0.006	0.235 2	0.643	
AC	0.006	1	0.006	0.206 7	0.663	
BC	0.002	1	0.002	0.074 4	0.793	
A^2	30.26	1	30.26	1 112.34	< 0.001	***
B^2	1.4	1	1.4	51.34	0.002	**
C^2	3.55	1	3.55	130.56	< 0.001	***
残差	0.191	7	0.027			
失拟项	0.009	3	0.003	0.067 5	0.974 3	
纯误差	0.181	4	0.045			
总变异	45.1	16				
R^2					0.995 8	
R^2_{Adj}					0.990 3	
R^2_{Pre}					0.990 5	

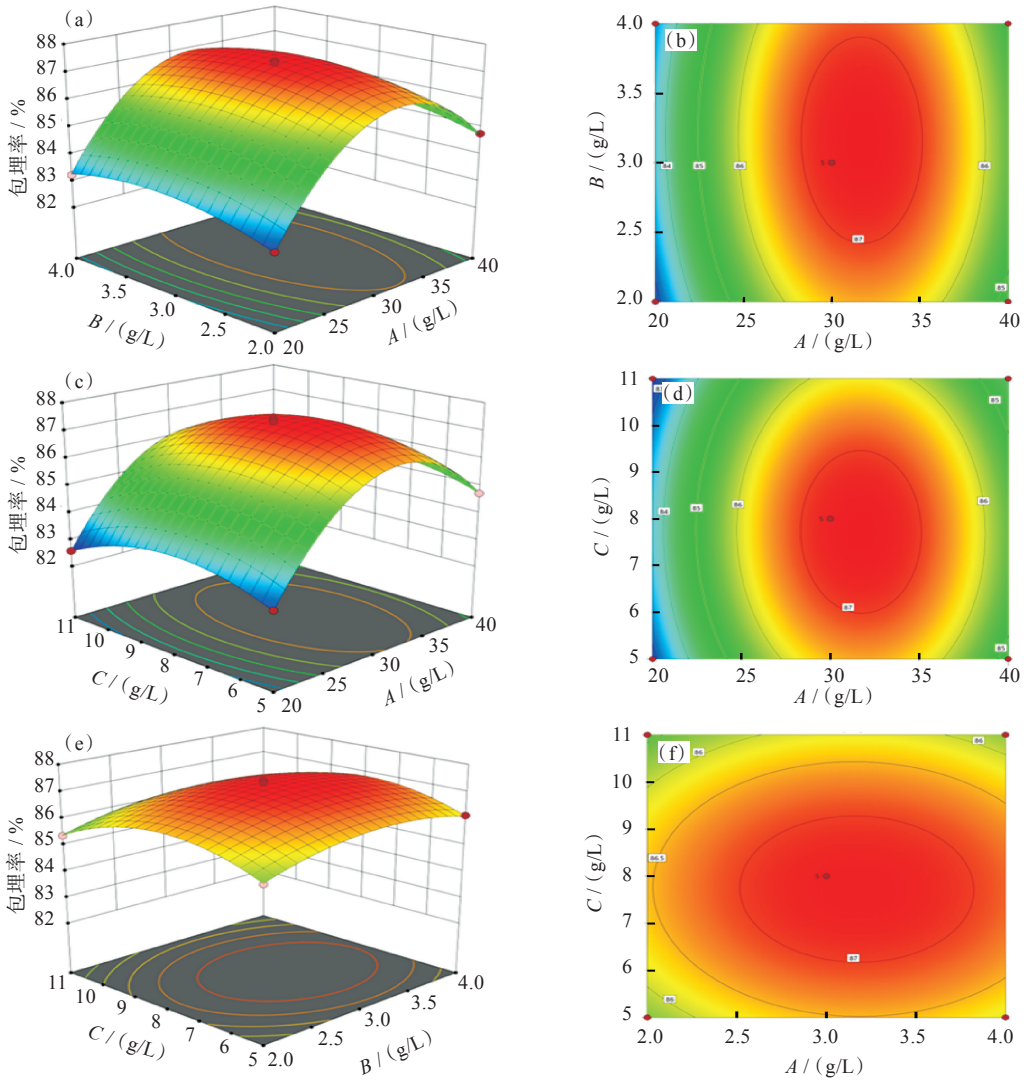

图 5　各因素对包埋率影响的响应面图及等高线图：(a,b)海藻酸钠质量浓度和羧甲基纤维素钠质量浓度交互作用，(c,d)海藻酸钠质量浓度和氯化钙质量浓度交互作用，(e,f)羧甲基纤维素钠质量浓度和氯化钙质量浓度交互作用

Fig. 5　Response surface plots and contour plots of the effect of each factor on embedding rate: (a,b) interaction of sodium alginate mass concentration and sodium carboxymethylcellulose mass concentration, (c,d) interaction of sodium alginate mass concentration and calcium chloride mass concentration, (e,f) interaction of sodium carboxymethylcellulose mass concentration and calcium chloride mass concentration

同样的条件下，纳豆激酶裸酶经过 2 h 人工胃液处理，酶活仅剩 1.36 FU/mL。这表明制得的纳豆激酶肠溶胶囊具备显著的抵御胃酸的保护作用，同时能够在肠液中得以释放，发挥功效。

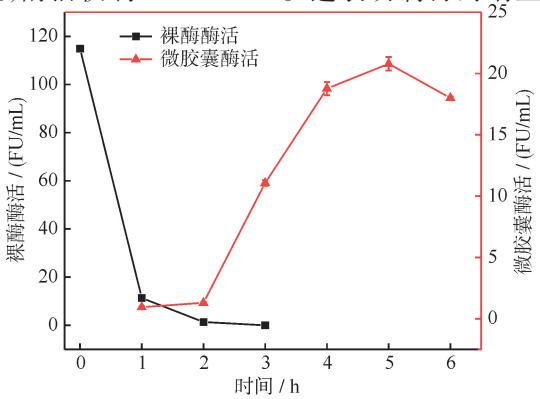

图 6　模拟胃肠道实验

Fig. 6　Simulation of gastrointestinal tract experiments

3　结　论

本实验用响应面法对纳豆激酶微胶囊的制备条件进行优化，确定最优制备条件为：SA 质量浓度 36.43 g/L、CMC-Na 质量浓度 3.15 g/L、$CaCl_2$ 质量浓度 7.69 g/L，预计包埋率 87.63%。用最优条件进行验证实验，得到的包埋率的平均值为 87.55%，与预测值基本相符，表明该制备条件可靠。纳豆激酶肠溶胶囊经过 2 h 人工胃液和 3 h 的人工肠液处理后，在肠液中检测到的酶活为 20.35 FU/mL。而在同样条件下，纳豆激酶裸酶经 2 h 人工胃液处

理，酶活仅剩1.36 FU/mL。实验表明纳豆激酶肠溶胶囊具有显著的耐酸性，能有效地保护纳豆激酶通过酸性环境，为纳豆激酶的保健药品开发提供了理论依据和工艺参数。

参考文献

[1] WENG Y Q, YAO J, SPARKS S, et al. Nattokinase: an oral antithrombotic agent for the prevention of cardiovascular disease [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(3): 523.

[2] 杨敏，梅余霞，梁运祥.纳豆激酶粗提液抗血栓作用的研究[J].食品科技，2013，38(9)：197-200.

[3] FUJITA M, OHNISHI K, TAKAOKA S, et al. Antihypertensive effects of continuous oral administration of nattokinase and its fragments in spontaneously hypertensive rats [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2011, 34(11): 1696-1701.

[4] MUSTAFA E M M, SOMAYA M Z, HAMED H, et al. Nattokinase attenuates bisphenol A or gamma irradiation-mediated hepatic and neural toxicity by activation of Nrf2 and suppression of inflammatory mediators in rats [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2022, 29(49): 75086-75100.

[5] 屈家亮，柳惠平，张佑红.纳豆激酶研究进展[J].武汉工程大学学报，2024，46(5)：527-533.

[6] MAHAKALAKAR N, MOHARIYA G, TAKSANDE B, et al. Nattokinase as a potential therapeutic agent for preventing blood-brain barrier dysfunction in neurodegenerative disorders[J]. Brain Research, 2024, 1849: 149352.

[7] ZHANG J Y, TANG Y, YUAN T, et al. Nattokinase crude extract enhances oral mucositis healing[J]. BMC Oral Health, 2021, 21(1): 555.

[8] 刁建中，陈桂光，马波，等.纳豆激酶的最新研究进展[J].轻工科技，2012，28(3)：7-8，72.

[9] JI H, YU L, LIU K Y, et al. Mechanisms of nattokinase in protection of cerebral ischemia [J]. European Journal of Pharmacology, 2014, 745: 144-151.

[10] CAI D B, ZHU C J, CHEN S W. Microbial production of nattokinase: current progress, challenge and prospect [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2017, 33(5): 84.

[11] DONG X Y, KONG F P, YUAN G Y, et al. Optimisation of preparation conditions and properties of phytosterol liposome-encapsulating nattokinase[J]. Natural Product Research, 2012, 26(6): 548-556.

[12] 刘兴华，李微微，郝小惠，等.响应面法优化纳豆激酶传递体的制备工艺[J].粮食与油脂，2023，36(2)：116-119，132.

[13] ZHANG S F, LÜ S Y, GAO C M, et al. Multiarm-polyethylene glycol-polyglutamic acid peptide dendrimer: design, synthesis, and dissolving thrombus [J]. Journal of Biomedical Materials Research: Part A, 2018, 106(6): 1687-1696.

[14] LI D F, HU M, HOU L Z, et al. The structural and functional properties of soybean protein-polyglutamic acid complex effected the stability of W/O/W emulsion encapsulated nattokinase [J]. Food Chemistry, 2023, 414: 135724.

[15] 孙建华，曲晓军，王金英等.纳豆激酶微胶囊的研制初探[J].黑龙江科学，2016，7(19)：13-15.

[16] LI G L, LI T, HE F, et al. Microencapsulation of nattokinase from fermentation by spray drying: optimization, comprehensive score, and stability[J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(7): 3906-3916.

[17] KOSSEVA M R, KENNEDY J F. Microencapsulation of food ingredients[J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 50(3): 323.

[18] 钱泽栋，张佑红，卢育兵，等.纳豆菌的分离筛选与鉴定[J].化学与生物工程，2018，35(8)：41-44.

[19] 田莉，卢轶男，张佑红，等.产纳豆激酶的枯草芽孢杆菌基因工程菌发酵条件的响应面优化[J].武汉工程大学学报，2018，40(6)：619-626.

[20] 杨子琼，李迪文，张佑红，等.纳豆激酶高产菌株的复合诱变选育[J].武汉工程大学学报，2022，44(1)：76-80.

本文编辑：张 瑞