

# 好食脉孢霉纤溶酶的纯化及体外纤溶活性研究

邓永平<sup>1,2</sup>,车 鑫<sup>1</sup>,艾瑞波<sup>1</sup>,刘晓兰<sup>1,2\*</sup>,郭建华<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>齐齐哈尔大学 食品与生物工程学院; <sup>2</sup>黑龙江省玉米深加工理论与技术重点实验室,齐齐哈尔 161006

**摘要:**从公认安全真菌好食脉孢霉(*Neospora sitophila*)代谢产物中纯化了一种纤溶酶,纯化倍数为86.6倍,比活力为519.59 U/mg。该酶由两个分子量分别为30.0 kDa和15.5 kDa的亚基构成,是一种丝氨酸蛋白酶,能依次水解人血纤维蛋白原的A $\alpha$ 、B $\beta$ 和 $\gamma$ 链,具有直接水解纤维蛋白以及激活纤溶酶原的双重功能。该酶不水解人血清白蛋白。结果表明,好食脉孢霉纤溶酶可能在治疗血栓中具有潜在的应用价值。

**关键词:**好食脉孢霉;纤溶酶;纯化;体外纤溶活性

中图分类号:Q814.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)11-1937-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.11.018

## Study on purification and *in vitro* fibrinolytic activity of fibrinolytic enzyme from *Neospora sitophila*

DENG Yong-ping<sup>1,2</sup>, CHE Xin<sup>1</sup>, AI Rui-bo<sup>1</sup>, LIU Xiao-lan<sup>1,2\*</sup>, GUO Jian-hua<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>College of Food and Biotechnology, Qiqihar University;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Corn Deep Processing Theory and Technology, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China

**Abstract:** A fibrinolytic enzyme had been purified from the GRAS (generally recognized as safe) fungus, *Neospora sitophila*. The purification fold of fibrinolytic enzyme was 86.6, and the specific activity was 519.59 U/mg. The enzyme, a serine protease, is composed of two subunits with relative molecular weights of 30.0 kDa and 15.5 kDa respectively. It can hydrolyze the A $\alpha$ , B $\beta$  and  $\gamma$  chains of human fibrinogen in turn. It has the dual functions of directly hydrolyzing fibrin and activating plasminogen. The enzyme can not hydrolyze human serum albumin. These results suggest that fibrinolytic enzyme from *Neospora sitophila* may have potential applications in treating thrombosis.

**Key words:** *Neospora sitophila*; fibrinolytic enzyme; purification; *in vitro* fibrinolytic activity

血栓栓塞性疾病严重危害人类生命和健康,溶栓疗法是主要的临床治疗手段<sup>[1]</sup>。目前临床使用的链激酶、尿激酶等药物虽然具有显著的溶栓疗效,但是半衰期短、副作用较大<sup>[2]</sup>。研究表明,纳豆激酶、蚓激酶等纤溶酶能够直接作用于血栓成分-血纤维蛋白,可以迅速、完全的溶解血纤维蛋白,且不会增加内出血等风险<sup>[3]</sup>。因此,从植物、动物和微生物中寻找纤溶活力更高、专一性更强、成本更低的纤溶酶成为目前的研究热点<sup>[4-6]</sup>。微生物生长周期短、代谢产物多样、易于大规模培养,是开发新型纤溶酶的主要来源。目前,已从枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)<sup>[6]</sup>、假单胞菌(*Pseudomonas*)<sup>[7]</sup>、短炭角菌(*Xylaria curta*)<sup>[8]</sup>、曲霉菌(*Aspergillus*)<sup>[9,10]</sup>、蛹虫草(*Cordyceps militaris*)<sup>[11]</sup>等微生物中获得了纤溶酶。

纤溶酶作为功能食品或药品原料,其来源的安全性至关重要。来源于安全性细菌(如枯草芽孢杆菌)的纤溶酶,如纳豆激酶等已有大量的报道<sup>[6,12]</sup>。但是,来源于安全性霉菌的纤溶酶还很少见。好食脉孢霉是FDA组织认证的安全性(GRAS)真菌,在印度尼西亚、巴西和婆罗洲生活的居民食用好食脉孢霉发酵食品已有悠久历史<sup>[13,14]</sup>。本文使用的好食脉孢霉分离自发酵豆制品,前期研究中发现在其固体发酵豆渣基质的胞外代谢产物中含有较高活力的纤溶酶,与现有一些报道相比,好食脉孢霉产纤溶酶周期较短,酶活力较高,生产成本较低,具有开发为溶栓药物的潜力<sup>[9-11]</sup>。酶的分离纯化和功能性质

收稿日期:2020-06-08 接受日期:2020-09-18

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31301414);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目“粮头食尾”专项(LTSW201740)

\*通信作者 Tel:86-452-2742731;E-mail:913913\_monkey@163.com

研究是合理开发纤溶酶的基础,本文介绍了好食脉孢霉纤溶酶的分离纯化方法和体外纤溶活性,希望通过本文的研究可以为该纤溶酶在溶栓药物研制中的应用提供部分依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

好食脉孢霉(*Neurospora sitophila*),分离自发酵豆制品,保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心,保藏号CGMCC No. 1836。

### 1.2 仪器和试剂

#### 1.2.1 主要实验仪器

层析柱26/20、层析柱26/40(GE Life Sciences);Millipore抽滤装置(Millipore);CF15RXII高速冷冻离心机(Hitachi);AKTAPrime Plus蛋白纯化系统(GE Life Sciences)。

#### 1.2.2 主要实验试剂

人血纤维蛋白原、十二烷基硫酸钠、琼脂糖、牛纤维蛋白原、尿激酶、凝胶过滤低分子量标准品(Sigma公司);凝血酶(天津血液制品研究所);Octyl Sepharose FF、Sephadex G-25、CM-Sepharose HP、SP-Sepharose HP(GE Life Sciences);十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)低分子量标准蛋白、大豆胰蛋白酶抑制剂(SBTI)、N-甲苯磺酰基-L-苯丙氨酸氯甲基酮(TPCK)、苯基甲烷磺酰氟(PMSF)、抑肽酶(aprotinin)、胃蛋白酶抑制剂(pepsatin)和赖氨酸(生工生物工程(上海)股份有限公司);其余试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

### 1.3 好食脉孢霉纤溶酶粗酶液的制备

固体发酵:培养基由豆渣和麸皮组成,比例为4:1,添加麸皮量7% (V/W)的CaCl<sub>2</sub>溶液(浓度为0.75%, W/V)和FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O溶液(浓度为0.045%, W/V),料水比例为1:4,pH自然。采用规格为30 cm×20 cm×3.5 cm的浅盘进行发酵,接种量为2×10<sup>4</sup>个孢子/克干基,28℃恒温培养48 h。

粗酶液的制备:利用生理盐水浸提发酵产物2 h,在4℃、6 000 rpm离心15 min后收集上清液,通过40%~80% (W/V)饱和度的硫酸铵分级盐析后,在4℃、10 000 rpm离心20 min分离沉淀,经0.02 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)复溶沉淀后得到粗酶液。

### 1.4 纤溶酶的分离纯化

#### 1.4.1 Octyl-Sepharose FF 疏水相互作用层析

将粗酶液的硫酸铵饱和度调至40% (W/V)进行疏水相互作用层析。平衡缓冲液:含40% (W/V)饱和度硫酸铵的0.02 mol/L pH7.4 PBS;洗脱缓冲液:依次为含40%、20%、0% (W/V)饱和度硫酸铵的平衡液;流速:2.0 mL/min;上样量:50 mL;蛋白质浓度:5.23 mg/mL;洗脱方式:步阶式洗脱。收集纤溶活性组分进行下一步分离。

#### 1.4.2 Sephadex G-25 凝胶过滤层析

利用 Sephadex G-25 凝胶过滤层析对 Octyl-Sepharose FF 收集的活性组分脱盐和更换缓冲液。蛋白浓度:0.272 mg/mL;洗脱缓冲液:0.02 mol/L pH6.0 PBS;流速:2.0 mL/min;上样量:35 mL。收集纤溶活性组分进行下一步层析。

#### 1.4.3 CM-Sepharose FF 弱阳离子交换层析

利用 CM-Sepharose FF 弱阳离子交换层析进一步纯化纤溶活性组分。平衡缓冲液:0.02 mol/L pH6.0 PBS;洗脱液:含0.5 mol/L NaCl的平衡缓冲液。上样量:55 mL;蛋白浓度:0.252 mg/mL;流速:2.0 mL/min。收集纤溶活性组分进行下一步层析。

#### 1.4.4 SP-Sepharose HP 强阳离子交换层析

利用 Sephadex G-25 凝胶过滤层析对经 CM-Sepharose FF 弱阳离子交换层析纯化的纤溶酶组分进行脱盐和更换缓冲液,收集活性组分进行 SP-Sepharose HP 强阳离子交换层析。平衡缓冲液:0.02 mol/L pH6.0 PBS;洗脱液:含0.5 mol/L NaCl的平衡缓冲液。上样量:50 mL;蛋白浓度:0.09 mg/mL;流速:2.0 mL/min。收集纤溶活性组分。

### 1.5 纤溶酶纯度及分子量的鉴定

利用 SDS-PAGE 检验纤溶酶的纯度,分离胶浓度为12% (W/V)。采用 SDS-PAGE 和凝胶过滤法鉴定纤溶酶的分子量。凝胶过滤色谱柱为 Superdex75 16/60 预装柱,洗脱液:含0.3 mol/L 的NaCl的0.02 mol/L pH7.4 PBS;流速:0.5 mL/min。分离标准品后绘制标准曲线,得到方程:y = -0.406 8x + 14.95(y代表分子量对数,x代表洗脱体积),R<sup>2</sup> = 0.9884。

### 1.6 纤溶酶的体外纤溶活性研究

#### 1.6.1 各种蛋白酶抑制剂对纤溶酶活力的影响

将1 mmol/L的抑肽素(pepsatin)、乙二胺四乙酸(EDTA)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、抑肽酶(aprotinin)、甲苯磺酰氨基苯乙基氯甲基酮(TPCK)、大豆

胰蛋白酶抑制剂(SBTI)、Lys 溶液与纤溶酶等体积混合,其中 EDTA、PMSF、aprotinin、SBTI 和 Lys 用双蒸水配制,pepstatin 用甲醇配制(已做实验证明甲醇对酶活有轻微抑制作用),TPCK 用 DMSO 配制(已做实验证明 DMSO 对酶活无影响),37 °C 分别水浴 15 min 和 30 min,以双蒸水和甲醇(是 pepstatin 的对照)作为对照,测残余酶活。

### 1.6.2 纤溶酶对人血纤维蛋白原的降解

根据 Liu 等的方法检测纤溶酶对人血纤维蛋白原的降解情况,略有改进<sup>[8]</sup>。SDS-PAGE 分离胶浓度 12% (W/V),将 2% (W/V) 人血纤维蛋白原(溶于 0.05 mol/L pH 7.6 Tris-HCl 缓冲液)200 μL 与 20 μL 2.7 mg/mL 的酶液(7.625 U/mL)混匀,在 37 °C 保温 5 min、45 min、1 h、2 h、6 h、9 h 和 24 h 后进行 SDS-PAGE,以还原的人血纤维蛋白原作对照,确定纤溶酶对人血纤维蛋白原各亚基的降解情况。

### 1.6.3 纤溶酶激活纤溶酶原的分析

通过血纤维蛋白平板法研究纯化的纤溶酶降解血纤维蛋白的方式<sup>[11]</sup>。将血纤维蛋白平板在 85 °C 加热 30 min,得到无纤溶酶原平板,以未经处理的平板为对照,将纤溶酶液点加至两种平板上,在 37 °C 保温 2、4、6、9、12 h 后测定溶圈面积,计算纤溶活力。

### 1.6.4 纤溶酶对人血清白蛋白的降解

采用 SDS-PAGE 检测纤溶酶对人血清白蛋白的降解情况,分离胶浓度 12% (W/V)。将 200 μL 2% (W/V) 的人血清白蛋白(溶于 0.05 mol/L pH 7.6 Tris-HCl 缓冲液)与 20 μL 2.7 mg/mL 的酶液(7.625 U/mL)混匀,在 37 °C 分别保温 30 min、2 h、6 h 和 12 h,定时取样进行 SDS-PAGE,以还原的人血清白蛋白为对照,确定纤溶酶对人血清白蛋白的降解情况。

## 1.7 纤溶酶活力的测定

纤溶酶活力的测定采用血纤维蛋白平板法<sup>[11]</sup>。血纤维蛋白平板制备方法(以配制 10 个平板为例):将 0.25 g 琼脂糖溶于 50 mL 生理盐水,置于 45 °C 水浴中保温 30 min 后加 200 U 的凝血酶混匀;0.2 g 牛血纤维蛋白原溶于巴比妥钠-盐酸缓冲液(pH 7.8),置 45 °C 水浴中保温 5 min。分别取 5 mL 凝血酶溶液和 5 mL 牛血纤维蛋白原溶液迅速混合倒平板,冷却后 4 °C 保存备用。纤溶酶活力测定:将 10 μL 样品溶液点加在血纤蛋白平板表面,37 °C 保温 6 h。使用尿激酶作为标准,通过测量平板表面的透明区域面积定量酶的活性。

## 1.8 蛋白质浓度的测定

以牛血清白蛋白为标准蛋白,根据参考文献<sup>[11]</sup>的方法测蛋白质浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 纤溶酶的分离纯化

好食脉孢霉纤溶酶粗酶液经 Octyl-Sepharose FF 疏水相互作用层析分离后得到三个活性组分(图 1),其中活性峰组分 2 的蛋白吸收峰与纤溶活性峰对应,收集峰 2 进行脱盐和更换缓冲液,然后依次经过 CM-Sepharose FF 弱阳离子交换层析(图 2)和 SP-Sepharose HP 强阳离子交换层析(图 3)分离,最终得到单一的色谱洗脱峰,经过上述步骤纯化后,纤溶酶活力回收率为 3.05%,比活力为 519.59 U/mg,纯化倍数为 86.60 倍(表 1)。虽然该分离路线使纤溶酶的纯度得到了较大程度提高,但是与短炭角菌(*Xylaria curta*)<sup>[8]</sup>、拟青霉(*Paecilomyces tenuipes*)<sup>[15]</sup>等真菌纤溶酶的纯化路线相比,活性回收率偏低,因此该路线还有进一步优化的空间。

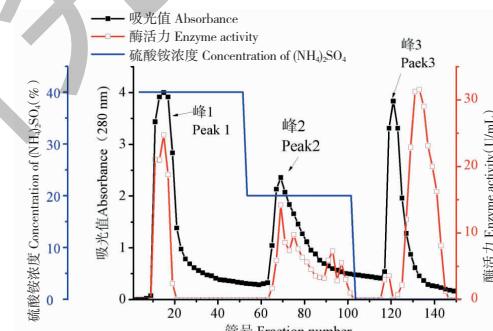


图 1 Octyl-Sepharose FF 疏水相互作用层析洗脱曲线

Fig. 1 Elution profile of Octyl-Sepharose FF hydrophobic interaction chromatography

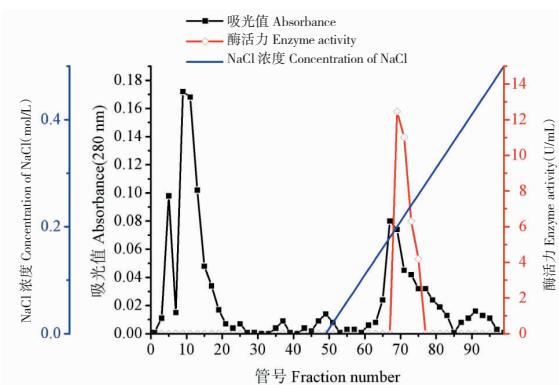


图 2 CM-Sepharose FF 离子交换层析洗脱曲线

Fig. 2 Elution profile of CM-Sepharose FF ion exchange chromatography

表 1 好食脉孢霉纤溶酶纯化步骤总结

Table 1 Summary of purification steps of fibrinolytic enzyme from *Neurospora sitophila*

分离步骤 Purification step	总蛋白 Protein (mg)	总活力 Activity (U)	回收率 Recovery (%)	比活力 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Fold
发酵浸提液 Culture supernatant	7 353.62	44 100.90	100.00	6.00	1.00
硫酸铵盐析 ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) precipitation	978.01	7 952.77	18.03	8.13	1.36
Octyl-Sepharose FF	83.44	4 449.44	10.09	53.31	8.89
CM-Sepharose FF	33.88	3 668.37	8.32	108.28	18.05
SP-Sepharose HP	2.59	1 345.75	3.05	519.59	86.60

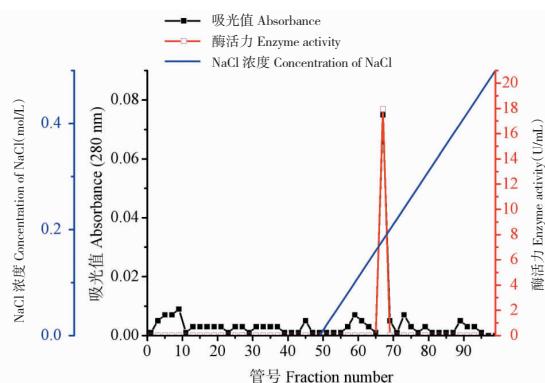


图 3 SP-Sepharose HP 离子交换层析洗脱曲线

Fig. 3 Elution profile of SP-Sepharose  
HP ion exchange chromatography

## 2.2 纤溶酶的纯度鉴定及分子量测定

利用 SDS-PAGE 检验了纯化后纤溶酶的纯度, 结果见图 4。好食脉孢霉纤溶酶经过纯化后在电泳图谱中显示两条带, 推测该酶可能是由两个亚基组成。



图 4 利用 SDS-PAGE 测定纤溶酶分子量

Fig. 4 Determination of the molecular weight of the fibrinolytic enzyme using SDS-PAGE

注: 洁道 1 为纯化后的纤溶酶, 洁道 Marker 是标准分子量标记。

Note: Lane 1: purified enzyme; Lane Marker: molecular mass markers.

采用 SDS-PAGE 和凝胶过滤法检测了纤溶酶的分子量。如图 4 所示, 纯化后的纤溶酶样品经 SDS-PAGE 后在电泳图谱中显示有两个组分, 分子量分

别为 30.0 kDa 和 15.5 kDa。经 Superdex 75 凝胶过滤分离后的洗脱体积为 10.19 mL, 经计算分子量约为 49.2 kDa。两种检测方法得到的纤溶酶分子量略有差异, 可能是因为纤溶酶分子形状非球形导致凝胶过滤法测得的分子量偏大, 但是, 根据凝胶过滤法测得的结果可以判断该酶由两个亚基组成。

综合 SDS-PAGE 和凝胶过滤法可确定该纤溶酶由 2 个亚基组成, 分子量分别为 30.0 kDa 和 15.5 kDa。不同微生物来源的纤溶酶分子量跨度较大, 裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) KCTC 6482 纤溶酶的分子量只有 17 kDa<sup>[16]</sup>; 假单胞菌 (*Pseudomonas baetica*) SUHU25 纤溶酶与本文纤溶酶分子量相似, 约为 42 kDa<sup>[7]</sup>; 而分离自绣球菌 (*Sparassis crispera*) Wulf. ex. Fr. 的纤溶酶分子量高达 90 kDa<sup>[17]</sup>。但是, 由两个亚基组成的纤溶酶分子的报道还很少见。

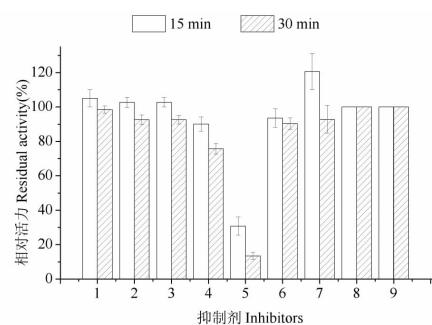


图 5 不同抑制剂对纤溶酶活力的影响

Fig. 5 Effect of different inhibitors on the fibrinolytic activity of purified enzyme from *Neurospora sitophila*

注: 抑制剂 1~9 分别是 EDTA、Lys、TPCK、SBTI、PMSF、aprotinin、pepstatin、双蒸水和甲醇。Note: Inhibitors 1~9 are EDTA, Lys, TPCK, SBTI, PMSF, aprotinin, pepstatin, ddH<sub>2</sub>O and methanol, respectively.

## 2.3 脉孢霉纤溶酶的纤溶性质

### 2.3.1 蛋白酶抑制剂对纤溶酶的影响

将 1 mmol/L 的七种蛋白酶抑制剂与纯化后的纤溶酶共同保存 15 min 和 30 min 后测定纤溶酶活

力,结果见图 5。

如图 5 所示,PMSF 对纤溶酶的活性有显著抑制作用,丝氨酸蛋白酶抑制剂 SBTI、Lys 和胰凝乳蛋白酶抑制剂 TPCK 与酶共存 30 min 时也对酶活力表现出抑制作用,说明好食脉孢霉纤溶酶是一种丝氨酸蛋白酶,有与胰凝乳蛋白酶、丝氨酸蛋白酶相似的活性中心。已见报道的多数纤溶酶都属于丝氨酸蛋白酶,例如米曲霉纤溶酶<sup>[10]</sup>、纳豆激酶<sup>[12]</sup>等。1 mmol/L 的金属蛋白酶抑制剂 EDTA 不抑制纤溶酶活性,说明该酶活性中心不含金属结合位点,这与蛹虫草(*Cordyceps militaris*)<sup>[11]</sup>、海洋链霉菌(*Streptomyces* sp.) MY0504<sup>[18]</sup>的纤溶酶相似,但是与裂褶菌(*Schizophyllum commune*) KCTC 6482<sup>[16]</sup>、特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*)<sup>[19]</sup>产的纤溶酶完全相反。

### 2.3.2 纤溶酶对人血纤维蛋白原的降解

利用 SDS-PAGE 检测纤溶酶对人血纤维蛋白原的降解。人血纤维蛋白原在凝血酶的作用下可以凝聚为血纤维蛋白,而血纤维蛋白是构成血栓的主要组分<sup>[1]</sup>,因此,检测纯化的纤溶酶在体外对人血纤维蛋白原的降解情况可以说明纤溶酶的溶栓潜力。纤溶酶与人血纤维蛋白原不同保存时间的样品的 SDS-PAGE 图谱见图 6。

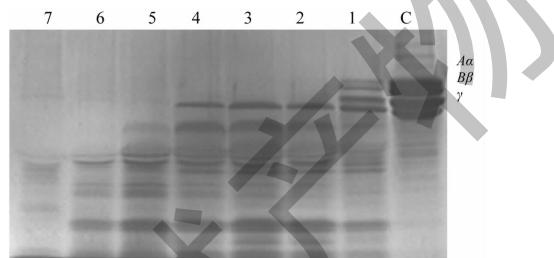


图 6 利用 SDS-PAGE 分析纤溶酶降解人血纤维蛋白原情况

Fig. 6 Analysis of reduced human fibrinogen after digestion by the purified enzyme by SDS-PAGE

注:泳道 C 是对照;泳道 1~7 分别为纤溶酶降解人血纤维蛋白 5 min、45 min、1 h、2 h、6 h、9 h 和 24 h 的样品。Note:Lane C: Control; Lanes 1~7: Degradation pattern of fibrinogen at different time intervals of 5 min, 45 min, 1 h, 2 h, 6 h, 9 h and 24 h, respectively.

如图 6 所示,与好食脉孢霉纤溶酶共存 5 min 时,人血纤维蛋白原的  $A\alpha$ 、 $B\beta$  和  $\gamma$  三条肽链均有不同程度的降解,当共存 45 min 时  $A\alpha$  和  $B\beta$  链已经完全降解,当共存 6 h 时  $\gamma$  链完全降解。人血纤维蛋白原的  $A\alpha$  链 C 末端结构相对松散,易于被外源纤溶酶降解,例如 PTEFP 纤溶酶只能水解人血纤维蛋

白原的  $A\alpha$  链,不能水解  $B\beta$  和  $\gamma$  链<sup>[3,15]</sup>。好食脉孢霉纤溶酶能完全降解人血纤维蛋白原的三个亚基,作用方式与蛹虫草(*Cordyceps militaris*)纤溶酶相似<sup>[11]</sup>。

### 2.3.3 纤溶酶激活纤溶酶原的分析

市售的牛血纤维蛋白原中含有残余的纤溶酶原,因此配制的血纤维蛋白平板中含有纤溶酶原,将配制好的血纤维蛋白平板在 85 ℃ 下保温 30 min,钝化纤溶酶原,经过这样处理的平板称为阴性平板,不经过此处理的平板称为阳性平板<sup>[11]</sup>。平板法测定好食脉孢霉纤溶酶作用方式的结果见图 7。

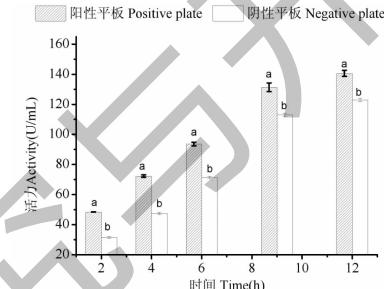


图 7 纯化的纤溶酶激活纤溶酶原的分析( $n = 3$ )

Fig. 7 Analysis of plasminogen activation by the purified fibrinolytic enzyme ( $n = 3$ )

注:同组列中带有不同上标的值存在显著差异( $P < 0.05$ )。

Note: Values with the different superscript within the column of same group are significantly different ( $P < 0.05$ ).

如图 7 所示,在保温不同时间时,好食脉孢霉纤溶酶在阳性平板上测得的酶活力显著大于阴性平板( $P < 0.05$ ),说明好食脉孢霉纤溶酶不仅可以直接降解血纤维蛋白,还具有激活纤溶酶原间接促进血纤维蛋白降解的功能。报道表明,不同来源的纤溶酶可能具有不同的纤溶方式,一些纤溶酶直接降解血纤维蛋白<sup>[17]</sup>,还有一些纤溶酶具有激活纤溶酶原的功能<sup>[16]</sup>,但是,也有少数纤溶酶与好食脉孢霉纤溶酶相似,兼具上述两种功能,如蛹虫草纤溶酶、纳豆激酶<sup>[11,12]</sup>。

### 2.3.4 纤溶酶对人血清白蛋白的降解

人血清白蛋白是血浆的主要组成成分,在机体内执行多种生理功能,例如控制渗透压、转运生物分子等<sup>[20]</sup>。利用 SDS-PAGE 检测好食脉孢霉纤溶酶对人血清白蛋白的降解情况,结果见图 8。

如图 8 所示,好食脉孢霉纤溶酶与人血清白蛋白共存 12 h 范围内未降解人血清白蛋白。这与蛹虫草(*Cordyceps militaris*)纤溶酶不同,蛹虫草纤溶酶

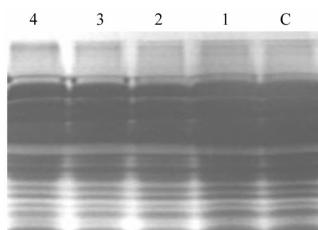


图 8 纤溶酶对人血清白蛋白的影响

Fig. 8 Effect of purified enzyme on human serum albumin注:泳道C是人血清白蛋白对照;泳道1~4分别为纤溶酶降解人血清白蛋白30 min、2 h、6 h和12 h的样品。Note:Lane C:Control of HSA; Lanes 1-4:Degradation pattern of human serum albumin at different time intervals of 30 min, 2 h, 6 h and 12 h, respectively.

与人血清白蛋白共存4 h时即对其产生了降解<sup>[11]</sup>。好食脉孢霉纤溶酶不降解人血清白蛋白,并且由图5和图6可知,该酶具有降解人血纤维蛋白原和激活纤溶酶原的双重功能,与已开发为药品的纳豆激酶、蚓激酶溶解血纤维蛋白的方式相似,因此,极具有开发为溶栓药物的潜力<sup>[3]</sup>。

### 3 结论

采用多种层析模式相结合的纯化方式从公认安全菌株好食脉孢霉(*Neospora sitophila*)的胞外代谢产物中纯化了一种纤溶酶,纯化倍数为86.6倍,比活力为519.59 U/mg。该酶是一种丝氨酸蛋白酶,能顺次降解人血纤维蛋白原的A $\alpha$ 、B $\beta$ 和 $\gamma$ 链。该酶不仅可以直接溶解血纤维蛋白,还可以作为纤溶酶原激活剂。此外,该酶不降解人血清白蛋白。上述结果表明,好食脉孢霉纤溶酶具有开发为预防血栓形成和治疗血栓疾病的药物的潜力。

### 参考文献

- Fan Y, Liao XL, Pan YS, et al. Intravenous thrombolysis is safe and effective for the cryptogenic stroke in China: data from the thrombolysis implementation and monitor of acute ischemic stroke in China (TIMS-China) [J]. J Stroke Cerebrovasc, 2019, 28(1):220-226.
- Hébert M, Lesept F, Vivien D, et al. The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA) [J]. Rev Neurol, 2016, 172:186-197.
- Patra JK, Shukla AC, Das G. Advances in pharmaceutical biotechnology: recent progress and future applications [M]. Berlin: Springer, 2020:383-390.
- Kim DW, Choi JH, Park SE, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Petasites japonicus* [J]. Int J Biol Macromol, 2015, 72:1159-1167.
- Li YX, Li XX, Huang YH, et al. The *in vitro* anti-thrombolytic effect and bio-security of fibrinolytic enzyme SNFE from *Sipunculus nudus* Linnaeus in Guangxi coastal area of China [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28: 1789-1792.
- Pan SH, Chen GG, Zeng JJ, et al. Fibrinolytic enzyme production from low-cost substrates by marine *Bacillus subtilis*: process optimization and kinetic modeling [J]. Biochem Eng J, 2019, 141:268-277.
- Salunke AS, Kharat AS. Data on isolation and purification of fibrinolytic enzyme from *Pseudomonas baetica* SUHU25 [J]. Data in Brief, 2019, 26:104369.
- Meshram V, Saxena S, Paul K, et al. Production, Purification and characterization of a potential fibrinolytic protease from endophytic *Xylaria curta* by solid substrate fermentation [J]. Appl Biochem Biotech, 2017, 181:1496-1512.
- Osmolovskiy AA, Rukavitsyna ED, Kreier VG, et al. Production of proteinases with fibrinolytic and fibrinogenolytic activity by a micromycete *Aspergillus ochraceus* [J]. Microbiology, 2017, 86:512-516.
- Shirasaka N, Naitou M, Okamura K, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3 [J]. Mycoscience, 2012, 53:354-364.
- Liu XL, Kopparapu NK, Li Y, et al. Biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris* [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 94 (Part B):793-801.
- Lin HTV, Wu GJ, Hsieh MC, et al. Purification and characterization of Nattokinase from cultural filtrate of red alga *Porphyra dentata* fermented by *Bacillus subtilis* N1 [J]. J Mar Sci Tech, 2015, 23:240-248.
- David DP, Rowland HD. Evidence for safety of *Neurospora* species for academic and commercial uses [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66:5107-5109.
- Ishii R, Iwagaki C. Studies on the manufacture of carotene-fortified foods by *Neurospora sitophila*. VII. Carotene retention of several fortified foods [J]. J Ferment Technol, 1953, 31: 471-473.
- Kim HC, Choi BS, Sapkota K, et al. Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces tenuipes* [J]. Process Biochem, 2011, 46:1545-1553.
- Park IS, Park JU, Seo MJ, et al. Purification and biochemical characterization of a 17 kDa fibrinolytic enzyme from *Schizophyllum commune* [J]. J Microbiol, 2010, 48:836-841.

(下转第 1919 页)