

## 抑胃酶剂的提取及其抑制动力学研究

刘锴英

(福州大学化学系, 福州)

刘华珍 陈伟

(福建省微生物研究所, 福州)

抑胃酶剂是福东链霉菌 (*Streptomyces fudongus* n. sp. Liu) 的次级代谢产物, 该菌株是采用平板透明圈法筛选得到。抑胃酶剂对胃蛋白酶有强的抑制作用, 其抑制活力随着抑制剂的浓度的增加而增大,  $ID_{50}$  为  $0.0095 \mu\text{g/ml}$ 。它对胃蛋白酶呈竞争性抑制, 当以酪蛋白为底物并按 Dixon 作图法求得的抑制常数  $K_i$  值为  $6.0 \times 10^{-9} M$ 。

**关键词** 抑胃酶剂; 酶抑制剂; 福东链霉菌

在研究微生物产生的酶抑制剂的过程中, 作者采用平板透明圈法<sup>[1]</sup>, 筛选到一株对胃蛋白酶有强烈抑制作用的菌株——福东链霉菌 (*Streptomyces fudongus* n. sp. Liu)<sup>[2]</sup>, 并从该菌株的次级代谢产物中提取得抑胃酶剂。它是一种无色针状的结晶, 易溶于甲醇、乙醇、乙酸和二甲基亚砷, 微溶或不溶于乙酸乙酯、乙醚、苯、氯仿等有机溶剂, 不过它的钠盐易溶于水。它是一种五肽化合物, 在其组成中含有三种氨基酸: 丙氨酸、缬氨酸和一种新的氨基酸——4-氨基-3-羟基-6-甲基庚酸。这三种氨基酸的残基数比为 1:2:2。由于抑胃酶剂具有结构新颖、特异性强、抑制活力高、药理学性能好等特点, 并能促进食用菌子实体的生长、提高食用菌产量。因此它是一种既有学术意义又有实际应用价值的酸性蛋白酶抑制剂。本文在提取纯化的基础上着重从动力学角度研究抑胃酶剂与胃蛋白酶的结合关系。

### 材料和方法

#### (一) 材料

1. 酶: 胃蛋白酶, 25000—30000u/ml, 美国 Sigma 公司。

2. 底物: 酪蛋白, 上海化学试剂采购供应站试剂厂。血红蛋白, DR. Theodor schuchardt munchen。

3. 培养基 (g/L): 葡萄糖 10, 甘油 10, 肉膏 7.5, 蛋白胨 7.5, NaCl 1,  $K_2HPO_4$  0.1, 微量元素盐溶液 1ml, pH6.5。

4. 抑胃酶剂: 作者从福东链霉菌 S-038 菌株的发酵液中提取得到的纯品 ( $ID_{50} = 0.0095 \mu\text{g/ml}$ )。

#### (二) 方法

1. 抑胃酶剂的提取: 将福东链霉菌接种于培养基中, 在  $28^\circ\text{C}$  摇瓶发酵 3—4 天, 调 pH = 2—3, 用正丁醇萃取, 有机相经减压浓缩后得样品 I ( $ID_{50} = 0.1 \mu\text{g/ml}$ )。样品 I 转入硅胶柱 (35cm × 3.2cm) 进行硅胶柱层析, 先用乙酸乙酯: 丙酮 (4:1) 展开, 再用丙酮洗脱, 活性部分经沉淀、离心、干燥后得样品 II ( $ID_{50} = 0.026 \mu\text{g/ml}$ )。然后将样品 II 进行 DEAE——纤维素柱层析 (52cm × 3.2cm), 用

本文于 1987 年 2 月 23 日收到。

0.02N  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  水溶液洗脱, 活性部分经Amberlate IRA-401离子交换树脂脱色后再进行Sephedex G-15通透层析, 用15%甲醇水溶液洗脱, 减压浓缩、结晶得样品Ⅲ ( $\text{ID}_{50} = 0.0095\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 见图1。质谱测定表明其分子量为685。

## 2. 抑胃酶剂的抑制活力测定: 抑胃



图1 抑胃酶剂结晶 (7×10)  
Fig. 1 Crystal of pepsin inhibitor

酶剂的抑制活力测定是采用改进了的Anson法<sup>[3]</sup>。分别取1.0ml一定浓度的胃蛋白酶溶液, 与1.0ml含有抑胃酶剂或不含有抑胃酶剂的0.02M, pH=2.0的KCl-HCl缓冲溶液混合, 在37℃保温结合3min后加入3.0ml, 0.6%的酪蛋白或1%的血红蛋白底物, 并在37℃恒温反应30min后加入3.0ml 1.7M高氯酸终止反应, 在室温下静置1h后过滤除去沉淀物并在280nm波长处测定其吸光率, 求出抑制百分率<sup>[4]</sup>和酶的残留活力<sup>[5]</sup>。

## 结 果

### (一) 抑胃酶剂对胃蛋白酶的抑制作用

抑胃酶剂对胃蛋白酶有强的抑制作用, 其最大半抑制浓度为0.6059 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在一定的温度、pH=2.0的条件下, 以一定量的底物和一定量的胃蛋白酶进行酶解反应, 胃蛋白酶催化水解底物的反应速度随着抑制剂含量的增加而明显地降低, 见图2。

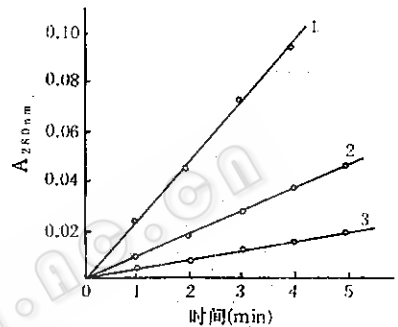


图2 抑胃酶剂对胃蛋白酶的抑制作用

Fig. 2 Inhibition of pepsin inhibitor on pepsin

12℃, pH=2.0, KCl-HCl buffer  
酶和抑制剂保温结合5 min Enzyme and inhibitor incubated for 5 min  
酶浓度 Enzyme concentration: 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$   
底物(Casein) 浓度 Substrate concentration: 0.6%

1. 不加抑制剂 Without inhibitor
2. 抑制剂浓度 Inhibitor concentration: 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
3. 抑制剂浓度 Inhibitor concentration: 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$

如果在37℃, pH=2.0的条件下, 以一定量的酪蛋白或血红蛋白为底物; 在不同浓度的抑胃酶剂的存在下, 测定抑制剂的抑制活力和酶的残留活力。结果表明: 当抑制剂浓度增大时, 抑制剂对酶开始是以等当量抑制呈直线关系, 直线外推后即可求得等当量抑制时的比值即1微克抑制剂所能抑制胃蛋白酶的微克数, 称为当量抑制比, 当抑制浓度继续增大时, 抑制剂与胃蛋白酶所结合的络合物开始部分地溶解,

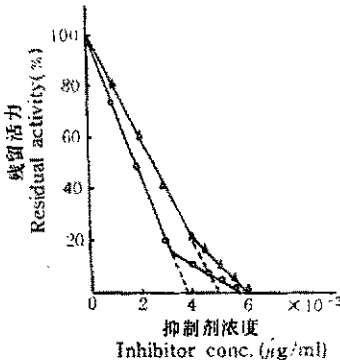


图3 以酪蛋白、血红蛋白为底物时抑胃酶剂的抑制活力  
 Fig. 3 Inhibitory activity of pepsin inhibitor, when casein and hemoglobin were used as substrate  
 。酪蛋白浓度 Casein concentration : 0.6%  
 △血红蛋白浓度 Hemoglobin concentration: 1%  
 胃蛋白酶最终浓度 End-concentration of pepsin: 2µg/ml  
 抑胃酶剂浓度分别为 Concentration of pepsin inhibitor: 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.045, 0.05, 0.055, 0.06 µg/ml

曲线就随之弯曲, 从而得到第二部分直线, 外推后求得全抑制时的抑制剂对胃蛋白酶的比值, 称为全抑制比, 见图3。并从图3中直接求得抑胃酶剂对胃蛋白酶的最大半抑制浓度 ( $ID_{50}$ )、当量抑制比和全抑制比, 并按Green和Work的近似处理法求得抑制常数 ( $K_i$ ) 见表1。

表1 抑胃酶剂与胃蛋白酶的结合关系  
 Table 1 Binding relationship between pepsin inhibitor and pepsin

底物 Substrate	最大半抑制浓度 ( $ID_{50}$ ) (µg/ml)	当量抑制比 Equivalent inhibition ratio	全抑制比 Complete inhibition ratio	$K_i$
酪蛋白 Casein	0.0095	1:51	1:34	$1.3 \times 10^{-9}$
血红蛋白 Hemoglobin	0.012	1:41	1:33	$1.1 \times 10^{-9}$

(二) 抑制作用类型

在温度、pH值与前述的相同条件下, 以不同浓度的抑制剂, 不同浓度的底物为参数测定酶解反应后的光密度, 然后根据预先作好的标准曲线求出各个的反应速度, 最后按Dixon作图法作图, 见图4。根据图4中诸直线簇的交点, 可以从横轴上读出抑制常数  $K_i = 6.0 \times 10^{-8} M$ 。

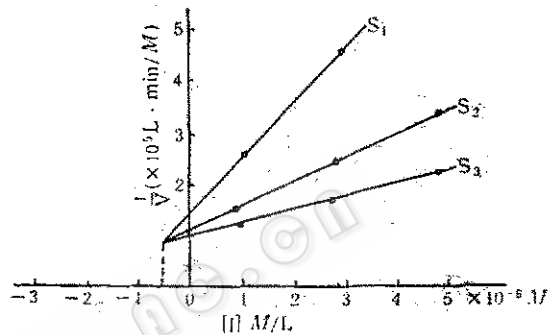


图4 抑制作用的Dixon图  
 Fig. 4 Dixon plots of inhibition  
 酶浓度 Enzyme concentration: 5.3µg/ml  
 底物酪蛋白浓度 Casein concentration:  $S_1 = 0.64g/ml$ ,  $S_2 = 1.9g/ml$ ,  $S_3 = 3.2g/ml$

如果在不同的底物浓度下测定抑胃酶剂对胃蛋白酶的抑制作用, 并按Lineweaver-Burk的双倒数作图法作图, 见图5。

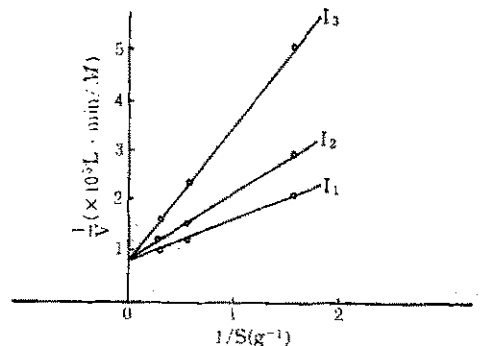


图5 抑胃酶剂抑制作用的Lineweaver-Burk图  
 Fig. 5 Lineweaver-Burk plots of inhibition  
 酶浓度 Enzyme concentration: 5.3µg/ml  
 抑胃酶剂浓度 Pepsin inhibitor concentration:  $(I)_1 = 0$ ,  $(I)_2 = 0.95 \times 10^{-8} M$ ,  $(I)_3 = 2.8 \times 10^{-8} M$

抑制剂和胃蛋白酶的结合与底物酪蛋白之间呈竞争性抑制。

## 讨 论

抑胃酶剂是一种来自微生物次级代谢产物的小肽类酸性蛋白酶抑制剂。上述实验结果表明,它对胃蛋白酶有很强的抑制作用,其最大半抑制浓度 $ID_{50} = 0.0095 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,以酪蛋白为底物时,其当量抑制比值为1:51与理论值相近,这说明抑胃酶剂与胃蛋白酶的结合几乎是定量的。抑胃酶剂对胃蛋白酶的抑制作用随着抑制剂浓度的增加而增大,它和胃蛋白酶的结合与底物酪蛋白之间呈竞争性抑制。当反应体系中酶与抑制剂的浓度保持恒定时,抑胃酶剂对胃蛋白酶的抑制活

力则随着反应体系中底物浓度的增大而降低。抑胃酶剂与胃蛋白酶的结合是相当稳定的,其抑制常数不论是以Dixon作图法还是按Green和Work的计算法所求得的 $K_i$ 值在数量级上都是 $10^{-9}$ ,这与微生物产生的糜蛋白酶抑制剂的 $K_i$ 值也相近<sup>[7]</sup>。抑胃酶剂除了能抑制人体中的胃蛋白酶外,对人体中的组织蛋白酶D、血管紧张素释放酶也有抑制作用,它能有效地抑制食用菌生长过程中产生的酸性蛋白酶,促进子实体生长,使香菇、蘑菇等的产量明显地提高。可以预料它不仅是一种有用的生化工具,而且将在治疗人体中与胃蛋白酶、组织蛋白酶D、血管紧张素释放酶的功能有关的功能性疾病中发挥作用,同时将在食用菌的生产上开拓出新的前景。

## 参 考 文 献

- [1] 刘华珍等, 抗生素, 8(5):275—279, 1983.
- [2] 刘华珍等, 微生物学论文集, 科学出版社, 北京, pp. 17—20, 1985.
- [3] Anson, M. L.: *J. Gen. physiol.*, 22:79—89, 1938.
- [4] 刘华珍等, 抗生素, 8(5):280—284, 1983.
- [5] 屈贤铭、戚正武, 生物化学与生物物理学报, 3(2):230—240, 1963.
- [6] Green, N. M. et al.: *J. Biochem.*, 54:347, 1953.
- [7] 刘筠英等, 福州大学学报, 自然科学版, 13(4):79—82, 1985.

## EXTRACT OF PEPSIN INHIBITOR AND ITS INHIBITION KINETICS

Liu Qiying

(Department of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou)

Liu Huazhen    Chen Wei

(Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou)

Pepsin inhibitor produced by S-038 strain is a secondary metabolite of *Streptomyces fudongus* n. sp. Liu. This strain is screened by the method of plate transparent zone. The inhibitor shows strong inhibition for pepsin,  $ID_{50} = 0.0095\mu\text{g/ml}$ . with the increase of concentration of inhibitor the inhibition is increased, showing competitive inhibition for pepsin. The inhibitory constant ( $K_i$ ) is  $6.0 \times 10^{-9}M$ , when the substrate is casein and determined by Dixon plot method.

### Key words

Pepsin inhibitor; *Streptomyces fudongus*; enzyme inhibitor