

蛋白酶抑制剂的研究

1. 蛋白酶抑制剂产生菌的筛选

何继春 曲桂英 董南田 刘桂芝 郑美媛

(黑龙江省应用微生物研究所, 哈尔滨)

酶抑制剂, 是指能使酶蛋白中的活性基团或活性中心的化学性质发生改变, 从而引起酶活性下降或完全丧失的物质。而蛋白酶抑制剂除能消炎, 抗消化性溃疡外, 还能用来预防癌症, 识别细胞或组织中的各种蛋白酶, 用它做亲合层析的活性基团, 或探讨生理机制中蛋白酶的功能。

1965年梅泽^[1]在放线菌培养液中发现了蛋白酶抑制剂, 并广泛地进行了研究。本文主要报道蛋白酶抑制剂产生菌的筛选。

材 料 和 方 法

(一) 平板撒土法分离菌株

将经过风干粉碎的土壤样品放在无菌纸片上, 反转纸片去掉大部分土壤颗粒, 然后分别在精氨酸琼脂培养基*和甘油查氏琼脂培养基**平板上方轻轻弹动该纸片, 使粘附在纸片上的土壤微粒均匀地撒布在培养基表面上, 28℃培养7天左右, 将长好的单菌落移接于相应的琼脂斜面上, 28℃培养7天作为原始测定菌株。

* 精氨酸琼脂培养基: 精氨酸 1 克, 甘油 12.5 克, NaCl 1 克, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 克, K_2HPO_4 1 克, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.001 克, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 克, 琼脂 20 克, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.001 克, 蒸馏水 1000 毫升。

** 甘油查氏琼脂培养基: 甘油 30 克, NaNO_3 2 克, K_2HPO_4 1 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 克, KCl 0.5 克, FeSO_4 0.01 克, 琼脂 15 克, 水 1000 毫升, pH7.2—7.4。

(二) 蛋白酶抑制剂的培养方法

1. 摇瓶培养产生抑制剂: 摇瓶培养使用的培养基组成(%): 葡萄糖 1, 淀粉 1, 牛肉膏 0.75, 蛋白胨 0.75, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.0007, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0001, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0002, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.0008, pH7.2。

250 毫升三角瓶装 30 毫升培养基, 1 个大气压力下蒸汽灭菌 30 分钟, 然后接入新分离出的放线菌, 于 28℃ 摇床上振荡培养 7 天。

2. 琼脂平板培养产生抑制剂: 新分离出的放线菌分别涂于精氨酸和甘油琼脂平板上, 于 28℃ 培养 7 天, 挖块。

(三) 抑制胰蛋白酶物质的活性测定

使用胰蛋白酶琼脂平板法。将 90 毫升 0.5% 酪蛋白酮缓冲液 (pH7.4) 和 0.7 克琼脂一起加热溶化, 加 0.4 克 $BaCl_2$, 混匀并冷至 50℃ 左右, 加 10 毫升含胰蛋白酶 (25 微克/毫升或 50 微克/毫升) 的酮缓冲液 (pH7.4), 迅速混匀后制成厚约 2 毫米的琼脂平板。再将发酵液注入琼脂平板上的不锈钢环内, 或将上述琼脂块直接放在琼脂平板上, 在 4℃ 左右的冰箱中静置 30 分钟, 使其活性物质扩散到胰蛋白酶琼脂平板中, 再移到 37℃ 温箱中保温。当琼脂块或金属环周围仍为乳白色, 则表明有抑制胰蛋白酶的活性物质存在。以抑制圈直径大小表示相对活性的高低。

实验结果

一、放线菌产生胰蛋白酶抑制剂的筛选结果

从土壤中分到 833 株放线菌, 进行了定性的筛选试验, 结果见表 1。

实验表明, 在自然界广泛存在着产生胰蛋白酶抑制剂的放线菌, 总检出率达 13.9%, 不同菌株产生抑制剂所需的条件不同, 绝大多数菌株只在三种培养基中的一种上显示出活性, 只

表 1 放线菌产生胰蛋白酶抑制剂的筛选结果

试验菌数 (株)	产生抑制剂的培养方式	胰蛋白酶溶液浓度 (微克/毫升)	产生蛋白酶抑制剂的菌数 (株)	百分率 (%)
400	甘油查氏琼脂平板	50	14	3.5
165	甘油查氏琼脂平板	50	5	3.03
	精氨酸琼脂平板	50	3	1.81
278	甘油查氏琼脂平板	25	27	9.7
	精氨酸琼脂平板	25	5**	1.79
	摇瓶	25	76*	27.33

* 其中 8 株在甘油查氏琼脂平板上显示出活性, 1 株在三种培养基上均显示出活性。

** 其中 4 株在甘油查氏琼脂上显示出活性。

有一个菌株在三种培养基上均显示出活性, 8 个菌株在二种培养基上显示出活性。

二、产生胰蛋白酶抑制剂菌株的相对活性

由 833 株放线菌中选出的 102 株, 测定了它们培养物对蛋白酶的相对抑制活性, 结果见表 2。

表 2 不同菌株产生抑制胰蛋白酶的相对活性

胰蛋白酶溶液浓度 (微克/毫升)	抑制圈直径 (毫米)	菌株数 (株)	百分率 (%)
50	<15	5	62.5
	15—20	2	25
	>20	1	12.5
25	<15	67	71.2
	15—20	25	26.6
	>20	2	2.2

结果表明, 不同菌株产生的活性相差很大, 但表现出高活性的菌株 (抑菌圈直径大于 20 毫米) 所占比例并不大。试验结果还可看出, 测定抑制剂活性使用的胰蛋白酶琼脂平板中所含胰蛋白酶量多少很重要, 25 微克/毫升的胰蛋白酶浓度时产生菌的检出率, 较 50 微克/毫升浓度的胰蛋白酶为高。

表 3 产胰蛋白酶抑制剂放线菌的分离

类群名称	黄色	吸水	金色	粉红胞	薰衣草	灰褐	灰红紫	赭灰	青色	球胞	绿色
菌株数 (株)	2	3	29	8	17	26	13	1	1	1	1

三、产生胰蛋白酶抑制剂的放线菌的分布

我们将今年筛选到的产胰蛋白酶抑制剂的菌株,分别移接至高氏琼脂平板上培养,28℃培养7天,根据中国科学院微生物研究所放线菌分类组的分类方法进行分群,结果见表3。

表3表明,几乎在链霉菌属各个类群中,都发现了产生胰蛋白酶抑制剂的放线菌,其中以金色和灰褐类群所占的比例最大。

讨 论

实验的结果说明,在自然界中广泛存在着

产生胰蛋白酶抑制剂的放线菌。而自微生物产生的蛋白酶抑制剂,均为小分子的多肽,毒性小。这些问题的机理,有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Hamao Umezawa: Inhibitors of Proteolytic Enzymes, *Enzyme inhibitors of microbial origin*, University of Tokyo press, Tokyo. 1972, 15—52.