

# 文冠果壳皂苷抑制胰脂肪酶活性的研究

耿杰, 张洪梅, 周泉城

(山东理工大学农业工程与食品科学学院, 山东淄博 255049)

**摘要:** 本文旨在确定文冠果壳皂苷作为减肥因子对胰脂肪酶活性的作用效果。通过对胰脂肪酶反应条件 (pH、反应时间和反应物加入顺序) 的摸索, 确定 AB-8 大孔树脂纯化的文冠果壳皂苷对胰脂肪酶活性的影响, 并通过紫外吸收光谱 (200~340 nm)、荧光光谱 (激发波长 290 nm, 扫描波长 300~450 nm) 确定文冠果壳皂苷对胰脂肪酶作用的机理。研究结果表明, 文冠果壳皂苷对胰脂肪酶抑制率高达 87.5%, 最佳反应体系 pH 7.4, 反应时间 15 min, 反应物加入顺序为底物与文冠果壳皂苷预热后加入胰脂肪酶溶液反应。文冠果壳皂苷与胰脂肪酶作用后, 改变了胰脂肪酶中发光氨基酸 (Trp、Tyr) 所在微环境, 胰脂肪酶分子结构和构象发生变化, 导致胰脂肪酶紫外吸收光谱最大吸收波长红移和荧光强度降低, 胰脂肪酶活性抑制。文冠果壳皂苷可通过抑制胰脂肪酶发挥减肥因子的作用。

**关键词:** 文冠果壳; 皂苷; 胰脂肪酶; 抑制作用; 机理; 酶构象; 紫外吸收光谱; 荧光光谱

文章编号: 1673-9078(2014)11-89-92

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.017

## Inhibitory Effect of *Xanthoceras sorbifolia* Nutshell Saponin on Pancreatic Lipase

GENG Jie, ZHANG Hong-mei, ZHOU Quan-cheng

(School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

**Abstract:** In this study, the influence of saponin from *Xanthoceras sorbifolia* nutshell (SXS) which was considered as a weight-reducing agent on pancreatic lipase activity was studied. The effects of SXS purified by AB-8 macroporous resin on pancreatic lipase were investigated by evaluating various experimental conditions (pH, reaction time, and order of adding reagents). The mechanism of SXS-mediated inhibition of pancreatic lipase was studied using ultraviolet absorption spectrometry (200~340 nm) and fluorescence spectrometry (excitation wavelength 290 nm, scanning wavelength 300~450 nm). The results indicated that the inhibition rate of SXS to pancreatic lipase activity could reach 87.5% using the optimal reaction system of pH 7.4, reaction time 15 min, and preheating the substrate and SXS together prior to adding the pancreatic lipase solution. Following the reaction of SXS and pancreatic lipase, the microenvironment of luminous amino acids (Trp, Tyr), the molecular structure, and the conformation of pancreatic lipase were changed. This resulted in a red-shift in the maximum absorption wavelength in the ultraviolet absorption spectrum of pancreatic lipase, and a reduction in fluorescence intensity. Further, pancreatic lipase activity was inhibited. Thus, SXS can act as a weight-reducing agent through the inhibition of pancreatic lipase.

**Key words:** *Xanthoceras sorbifolia* nutshell; saponin; pancreatic lipase; inhibitory effect; mechanism; enzyme conform; ultraviolet absorption spectrum; fluorescence spectrum

文冠果 (*Xanthoceras sorbifolia*, XS) 是我国独有的珍贵木本油料树种。文冠果的枝干、果皮、果壳等都含有具有各种功效作用的活性成分, 如黄酮、皂苷、甾醇等等<sup>[1]</sup>。目前对文冠果研究主要集中在油脂、蛋白质等成分, 对于其他组成成分研究较少, 如皂苷、黄酮等<sup>[1~2]</sup>。

皂苷 (saponin) 广泛存在于植物界, 具有多方面

药理学活性, 在许多生命活动中发挥着重要作用, 如抗炎、抗肿瘤、抑制 HIV 蛋白酶、促进 NGF 介导的神经突触生长活性、改善学习记忆以及提高人体抗糖尿等活性<sup>[3~4]</sup>。文冠果壳作为文冠果油提取的废料, 富含皂苷类化合物。Chan 等<sup>[5]</sup>从文冠果壳中分离得到六种皂甙, 分别为皂甙 Y8、Y10、Y0、Y2、Y3 和 Y7。

猪胰脂肪酶 (porcine pancreatic lipase, PPL) 是一种特殊的胞内酯键水解酶, 它能催化甘油三酯水解为甘油和脂肪酸<sup>[6]</sup>, 在食品、化妆品、制药、造纸等领域广泛应用<sup>[7]</sup>。PPL 活性中心一般由丝氨酸、天冬氨酸/谷氨酸、组氨酸组成三联体<sup>[8]</sup>。PPL 分子空间结

收稿日期: 2014-03-11

基金项目: 教育部归国留学人员启动基金

作者简介: 耿杰 (1989-), 女, 在读硕士, 研究方向: 功能食品开发

通讯作者: 周泉城 (1977-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 功能食品开发

构的中央是 1 个疏水  $\beta$ -折叠其周围包绕着两亲的  $\alpha$ -螺旋。3 个氨基酸以高度保守的几何取向位于中央  $\beta$ -折叠一侧的“环”中<sup>[9]</sup>。许多因素对 PPL 活性有影响, 导致酶催化能力被抑制或激活。

随着生活水平的提高, 肥胖引起的糖尿病、高血脂症、心血管疾病等日益严重。天然减肥成分因比化学合成的减肥药物副作用小, 而受到人们广泛青睐。胰脂肪酶是脂肪消化的关键酶, 对其活性的抑制可以阻止脂肪的吸收消化, 能很好的预防和治疗肥胖病。因此, 本试验确定了一种文冠果壳中皂苷的分离纯化方法, 并就文冠果皂苷对胰脂肪酶的抑制作用进行研究, 以期文冠果皂苷应用于减肥药物、功能性食品领域提供思路和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

文冠果购于陕西金道种业有限公司, X-5大孔吸附树脂购自沧州宝恩吸附材料科技有限公司, 胰脂肪酶购自合肥博美生物科技有限公司, 临用前以 pH7.4 磷酸缓冲液配成适宜浓度酶溶液。所用其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 试验设备

RE 52-86E 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; 中高压制备色谱, 上海星猫仪器设备有限公司; TDL-40B, 离心机, 上海安亭科学仪器厂; U-3310 紫外光谱仪, Hitachi Tokyo Japan; F-4500, Hitachi Tokyo Japan。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 文冠果皂苷制备

文冠果果壳 8 kg, 60~90 °C 石油醚脱脂 3 次, 液料比 5:1, 时间 24 h。加入 75% 的乙醇 (V:V, 1:7) 浸提 24 h。滤去残渣, 回收乙醇得浸膏。将浸膏 8 倍水量溶解, 3500 r/min 离心分离 15 min, 取上清液冷冻干燥。

取 5 g 皂苷提取物 150 mL 水溶解, 乙酸乙酯 (1:1) 萃取 3 次, 除去杂质, 水层用水饱和的正丁醇 (1:1) 萃取 3 次, 合并正丁醇相, 浓缩至 3 mL, 得粗提物。

AB-8 大孔树脂湿法装柱 (柱长度 46 cm, 柱内直径 2.6 cm), 用蒸馏水冲柱子 pH 为 7.0, 加入浓缩后的皂苷粗提液, 流速 15 mL/min, 乙醇蒸馏水梯度洗脱, 按吸收峰收集洗脱液。选取皂苷含量较高的洗脱液浓缩冻干作为胰脂肪酶活性实验抑制剂。本实验选用的文冠果皂苷纯度为 94.7%。

#### 1.3.2 抑制猪胰脂肪酶活性试验

##### 1.3.2.1 胰脂肪酶抑制活性测定方法及抑制率计算

胰脂肪酶活性测定参照文献<sup>[10]</sup>方法稍作修改, 在锥形瓶中加入 5 mL 磷酸缓冲液 (pH 7.4, 0.025 mol/L) 和 4 mL 聚乙烯醇三油酸甘油酯底物乳化液 (0.229 g/mL), 置于 37 °C 水浴中震荡保温 10 min, 然后加入 1 mL 酶溶液 (2 mg/mL) 反应 15 min, 加 95% 乙醇 15 mL 终止酶反应。在反应液中滴加 2 滴酚酞指示剂, 用 0.025 mol/L NaOH 标准溶液滴定, 记录 NaOH 消耗量。空白实验中酶溶液在反应终止后加入。

通过比较有无抑制剂加入情况下, 脂肪酶活力的差异, 就可以得到样品对脂肪酶的抑制率。抑制率计算公式为:

$$\text{抑制率} / \% = \frac{\text{脂肪酶活力} - \text{抑制酶活力}}{\text{脂肪酶活力}} \times 100$$

##### 1.3.2.2 不同 pH 对胰脂肪酶活性的影响

按 1.3.3.1 方法, 在锥形瓶中加入不同 pH 的磷酸缓冲液 5 mL 和 4 mL 底物乳化液, 加入定量文冠果皂苷溶液, 37 °C 水浴保温 10 min, 加入 1 mL 胰脂肪酶溶液反应 15 min, 测定反应速率, 计算抑制率。

##### 1.3.2.3 不同反应时间对抑制作用的影响

取定量的底物溶液与定量文冠果皂苷溶液于 30 °C 水浴保温 10 min, 然后加入定量的胰脂肪酶溶液反应不同的时间, 测定反应的速率, 计算抑制率。

##### 1.3.2.4 不同反应顺序对抑制作用的影响

其他条件相同, 设置有无抑制剂两组。底物乳液、文冠果皂苷溶液和胰脂肪酶按以下 3 种顺序加入: (A) 底物乳液与胰脂肪酶反应 10 min 后加入文冠果皂苷; (B) 文冠果皂苷与胰脂肪酶预热 10 min 后加入底物乳液进行反应; (C) 底物乳液与文冠果皂苷预热 10 min 后加入胰脂肪酶进行反应。测定残余酶活, 计算抑制率。

#### 1.3.3 文冠果皂苷对胰脂肪酶构象的影响

##### 1.3.3.1 不同浓度皂苷对胰脂肪酶的紫外吸收光谱的影响

取 4 mL 浓度为 2 mg/mL 的胰脂肪酶溶液, 分别加入不同微量体积 (0、0.02、0.04、0.08 mL) 的文冠果皂苷溶液 (3 mg/mL)。混合均匀后, 室温放置 10 min, 以相同浓度的小分子溶液作空白, 记录 200~340 nm 的紫外吸收光谱。

##### 1.3.3.2 不同浓度皂苷对胰脂肪酶的荧光光谱的影响

以 290 nm 为激发波长, 室温下测定 300~450 nm 的荧光光谱, 溶液浓度及反应条件同 1.3.3.1。

## 2 结果与分析

## 2.1 AB-8 大孔树脂纯化文冠果皂苷粗提液

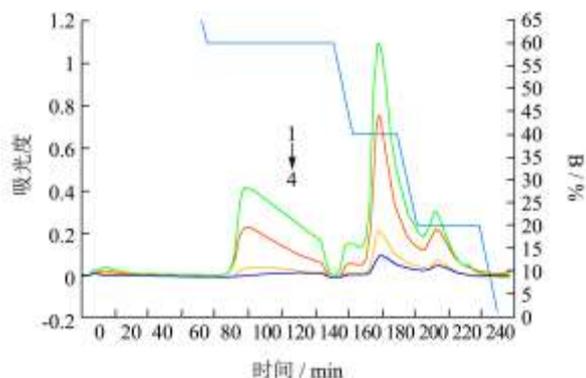


图1 AB-8 纯化文冠果皂苷粗提液的紫外吸收光谱,

Fig.1 UV absorption spectra of crude SXS extract purified by AB-8

注: 1→4 依次为检测波长 280、254、310、365 nm。

从图 1 可知, 40% 乙醇水作为洗脱剂, 文冠果皂苷粗提液经 AB-8 大孔树脂纯化分离, 四个波长检测下的紫外吸收光谱曲线形状相似, 均有 4 个不同分子量或结构的皂苷峰, 峰与峰之间的重合度较少, 说明分离效果较好。收取 180 min 下峰作为本研究的文冠果皂苷样品进行后续试验。

## 2.2 抑制胰脂肪酶活性试验

### 2.2.1 不同 pH 对胰脂肪酶活性的影响

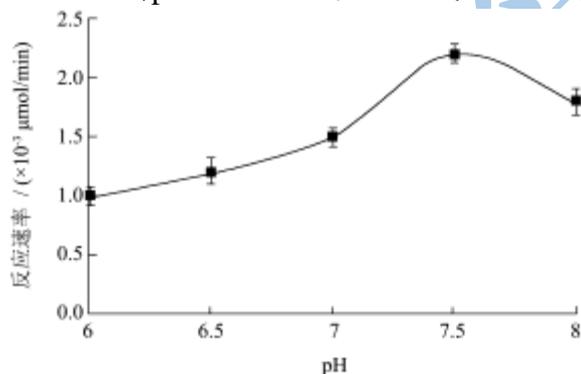


图 2 pH 值对胰脂肪酶活性影响

Fig.2 Effects of pH on pancreatic lipase activity

从图 2 可以看出, 反应速率随着 pH 的增加而增大, 当 pH 7.4 时, 酶反应速率达到最大值  $2.20 \times 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{min}$ , 随后碱性增强反应速率减小。反应体系 pH 值能改变酶分子表面电荷从而影响酶的活力。猪胰脂肪酶  $pI=5.0$ , 在 pH 7.4 的缓冲体系中带负电荷在油-水界面发生反应时, 与带负电荷的亲水端相斥, 使酶分子更容易与有机相的底物接触, 从而发挥出最大活性<sup>[11]</sup>。

### 2.2.2 不同反应时间对抑制作用的影响

由图 3 可见, 反应时间小于 10 min 时, 抑制率随

着时间的延长而线性增加; 当反应时间超过 10 min 后, 抑制率增幅减小, 15 min 后, 抑制率略有减小, 文冠果皂苷对胰脂肪酶的抑制作用趋于稳定。因此, 实验最佳反应时间为 15 min。

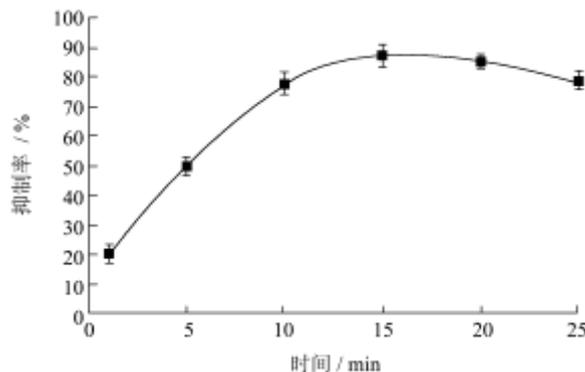


图 3 反应时间对胰脂肪酶活性影响

Fig.3 Effects of reaction time on pancreatic lipase activity

### 2.2.3 不同反应物加入顺序对胰脂肪酶抑制作用的影响

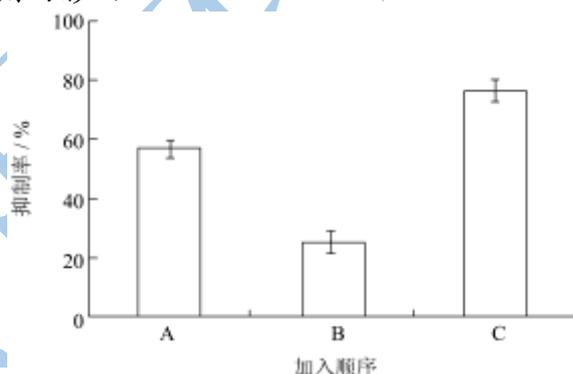


图 4 反应物加入顺序对胰脂肪酶活性影响

Fig.4 Effect of reagent addition sequence on pancreatic lipase activity

从图 4 可知, 按顺序 C 进行反应, 文冠果皂苷对胰脂肪酶的抑制率最高, 可达 76.9%。这可能是由于文冠果皂苷与底物乳液聚乙烯醇三油酸甘油酯结合, 形成大分子物质, 减少了胰脂肪酶对底物的影响。

## 2.3 文冠果皂苷对胰脂肪酶构象的影响

### 2.3.1 不同浓度的文冠果皂苷对胰脂肪酶的紫外吸收光谱的影响

大多数蛋白质分子在 220 nm 左右有一个强吸收峰, 是由于肽键的 C=N 的  $\pi-\pi^*$  跃迁引起的, 与蛋白质的  $\alpha$ -螺旋含量有关<sup>[12]</sup>, 同时在 280 nm 处有一个由色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)等芳香环对光的吸收引起的吸收峰。

不同浓度的文冠果皂苷作用于胰脂肪酶的紫外吸收图谱如图 5。由图可知 PPL 在 220 nm 附近出现最大吸收峰, 且随文冠果皂苷浓度的增加, PPL 在 220

nm 附近的吸收大幅度减小, 最大吸收波长有少许红移。抑制剂浓度为 $3 \times 10^{-2}$  mg/mL 比  $1.5 \times 10^{-2}$  mg/mL 时最大吸光度红移 6 nm, 说明酶分子构型已经发生改变<sup>[13]</sup>。因此, 文冠果皂苷作用胰脂肪酶后, 导致酶蛋白分子构象发生变化。

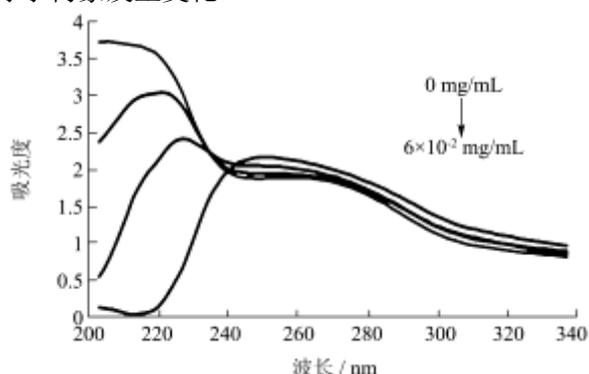


图5 不同浓度文冠果皂苷与胰脂肪酶的紫外吸收光谱

Fig.5 UV absorption spectra of pancreatic lipase and SXS at different concentrations (SXS concentrations)

注: 文冠果皂苷浓度从上到下依次为:  $0$ 、 $1.5 \times 10^{-2}$ 、 $3 \times 10^{-2}$ 、 $6 \times 10^{-2}$  mg/mL。

### 2.3.2 不同浓度的文冠果皂苷对胰脂肪酶的荧光光谱的影响

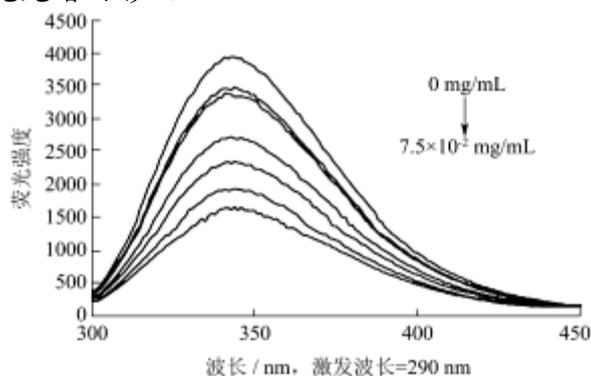


图6 不同浓度文冠果皂苷与胰脂肪酶的荧光光谱

Fig.6 Fluorescence spectra of pancreatic lipase and SXS at different concentrations

注: 文冠果皂苷浓度从上到下依次为:  $0$ 、 $7.5 \times 10^{-3}$ 、 $1.5 \times 10^{-2}$ 、 $3 \times 10^{-2}$ 、 $4.5 \times 10^{-2}$ 、 $6 \times 10^{-2}$ 、 $7.5 \times 10^{-2}$  mg/mL。

由图6可知, PPL在344 nm处有一荧光发射峰, 其发射峰值为3921, 而与文冠果皂苷作用后, 其在344 nm处的发射峰并未发生位移, 但强度却明显降低, 而且随着文冠果皂苷浓度增加, 荧光强度逐渐降低。蛋白质荧光的变化在一定程度上反映了蛋白质分子中荧光发色团本身及周围环境的变化, 在组成蛋白质的氨基酸中, 只有含芳香环的色氨酸(Trp)、苯丙氨酸(Phe)和酪氨酸(Tyr)才具有荧光特性<sup>[13]</sup>。295 nm 波长光激发时, 蛋白质分子中的 Trp 残基受到激发, 所产生荧光的强度和位置与这些残基所处的微环境密切相关。图

6 显示文冠果皂苷与胰脂肪酶发生了相互作用导致胰脂肪酶荧光强度降低, 这与文献报道结果一致<sup>[13-14]</sup>。这种作用可引起胰脂肪酶中 Trp、Phe、Tyr 等几种氨基酸的微环境及蛋白质分子构象行为的变化, 变化后的结构不利于胰脂肪酶催化底物分解, 故酶活力逐渐降低<sup>[14]</sup>。这与紫外吸收光谱所得到的结果是一致的。

## 3 结论

3.1 文冠果皂苷对胰脂肪酶的活性存在一定抑制作用, 最大抑制率可达 87.5%, 且抑制率与反应体系的 pH 值、反应时间以及加入反应物顺序密切相关。因此, 作为减肥因子应用于保健食品或药品中, 文冠果皂苷是非常有前景的。而且其开发还解决了文冠果壳的废物利用, 并提高了文冠果的经济价值和社会效益。

3.2 由紫外吸收光谱和荧光光谱变化可知, 文冠果皂苷与酶相互作用后, 改变了酶的紫外吸收和荧光特性, 引起酶分子结构和构象变化, 从而致使酶的活性降低。

## 参考文献

- [1] 麻起. 文冠果的综合开发利用-油脂和蛋白质的开发利用 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2013
- [2] MA Qi. Comprehensive utilization of xanthoceras sorbifolia bunge oils and proteins [D]. Zhengzhou: Henan Industry University, 2013
- [3] Zhang H, Zhou Q. Tyrosinase inhibitory effects and antioxidative activities of saponins from xanthoceras sorbifolia nutshell [J]. PLOS ONE, 2013, 8(8): e70090
- [4] 刘树军. 文冠果子仁霜的质量控制方法: 中国, 200510010531.X[P], 2005-11-11. <http://211.157.104.87:8080/sip/o/zljs/hyjs-jieguo.jsp>
- [5] Nie W, Luo J G, Wang X B, et al. An insight into enrichment and separation of oleanane-type triterpenoid saponins by various chromatographic materials [J]. Separation and Purification Technology, 2009, 65: 243-247
- [6] Chan P K, Zhao M, Cheet, et al. Cytotoxic acylated triterpene saponins from the husks of xanthoceras sorbifolia [J]. Journal of Nature Products, 2008, 71(7): 1247-1250
- [7] 郑毅, 叶海梅, 周虢, 等. 脂肪酶活力测定研究进展 [J]. 工业微生物, 2005, 35(4): 36-40
- [8] ZHENG Yi, YE Hai-mei, ZHOU Xie, et al. Progress of lipase activity determination [J]. Industrial Microbiology, 2005, 35(4): 36-40
- [9] Gao X, Cao S, Zhang K. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from

- a newly isolated *Pseudomonas* strain [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 27(1-2): 74-82
- [8] Kwon H J, Amada K, Haruki M, et al. Identification of the histidine and aspartic acid residues essential for enzymatic activity of a family I. 3 lipase by site-directed mutagenesis [J]. *FEBS Letters*, 2000, 483(2-3): 139-142
- [9] Malcata F X, Reyes H R, Garcia H S, et al. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipase [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992, 14(6): 426-446
- [10] Anil Kumar H S, Prashith Kekuda T R, Vinayaka K S, et al. Anti-obesity (pancreatic lipase inhibitory) activity of *everniastrum cirrhatum* (Fr.) hale (parmeliaceae) [J]. *Pharm Journal*, 2011, 3(19): 65-68
- [11] 霍世欣,周陶忆,司晓晶,等. 荷叶黄酮化合物对胰脂肪酶抑制作用的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2008, 20(2): 328-331  
HUO Shi-xin, ZHOU Tao-yi, SI Xiao-jing, et al. Inhibitory effect on pancreatic lipase of flavonoids derived from lotus leaf [J]. *Natural Product Research and Development*, 2008, 20(2): 328-331
- [12] 盛良全,闫向阳,徐华杰,等. 烟碱与牛血清白蛋白相互作用的光谱研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27(2): 306-308  
SHRNG Liang-quan, YAN Xiang-yang, XU Hua-jie, et al. Study on the interaction between BSA and nicotine [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, 27(2): 306-308
- [13] 黎春怡,黄卓烈,何平异,等. 异丙醇对猪胰脂肪酶催化动力学和分子光谱的影响[J]. *化学与生物工程*, 2007, 24(9): 46-49  
LI Chun-yi, HUANG Zhuo-lie, HE Ping-yi, et al. Effect of isopropanol on catalytic kinetics and molecular spectrum of porcine pancreas lipase [J]. *Chemistry and Bioengineering*, 2007, 24(9): 46-49
- [14] 刘惠君,刘维屏,陈爱平,等. 光谱法研究异丙甲草胺及其 S-对映体与脲酶的相互作用机制[J]. *光谱学与光谱分析*, 2004, 24(2): 166-168  
LIU Hui-jun, LIU Wei-ping, CHEN Ai-ping, et al. The reaction mechanism of metolachlor and s-isomer with urease [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2004, 24(2): 166-168