

黑荆树皮单宁不同级分对水解酶的抑制作用*



姚 开, 吕远平, 石 碧*, 何 强

(四川大学轻工与食品工程学院, 四川 成都 610065)

YAO K

摘 要: 通过对黑荆树皮单宁进行醇沉纯化和溶剂萃取分级, 可得到分子量分布范围不同的单宁级分。各级分对 5 种水解酶均表现出不同程度的抑制作用, 具有一定的选择性。其抑制能力与抑制剂常数 K_i 值有关, 分子量大的单宁级分, K_i 值小, 对酶活性的抑制作用大, 同时, 证明了黑荆树皮单宁对纤维素酶的抑制作用属于非竞争性抑制。

关键词: 植物单宁; 黑荆树皮单宁; 分级; 水解酶; 抑制作用

中图分类号: TQ 943 文献标识码: A 文章编号: 0253-2417(2000)04-0006-05

植物单宁是植物次生代谢的产物, 广泛存在于植物的根、茎、叶、花、果实中, 人们在摄食、饮茶及服用中草药的同时都摄取了一定量的植物单宁。牲畜的生长和农作物的抗病虫害等也都与植物单宁有关^[1~4]。因此, 从与人类生活的相关性和可再生资源的利用角度考虑, 植物单宁是一类很值得关注、研究和开发的天然产物。

植物单宁的分子结构和化学特性使其具有多重生物活性。例如, 抑酶活、抗病毒、抗病菌、抗炎症、抗衰老、抗癌变、抗心血管疾病等, 其中对酶促反应的抑制作用被认为是其生物活性最本质的体现^[5]。单宁对酶的抑制作用具有一定的选择性, 单宁的酚羟基可与某些酶蛋白分子上的基团(—COOH, —SH, —NH₂ 等) 发生化学反应, 使之构型发生改变, 引起酶活力下降, 致使酶促反应速度降低, 单宁也可与酶促反应的某些大分子底物(如蛋白质、多糖、脂质等) 结合, 生成对酶反应活性降低的底物。单宁与金属离子的络合特性也会影响到金属酶的活性和酶的激活作用。单宁分子量的大小是影响单宁与酶蛋白结合能力的很重要因素^[1, 6~8]。本文通过对黑荆树皮单宁进行纯化和分级处理, 研究了不同分子量分布范围的单宁组分与抑酶活性之间的关系, 为植物单宁在食品、化妆品、医药、畜牧、植保等众多领域的精细化应用, 提供了有价值的参考数据和途径。

* 收稿日期: 2000-01-26

基金项目: 国家自然科学基金“具有生物活性的单宁化合物及其磷酸酯衍生物的合成(29872025)”资助项目。

作者简介: 姚开(1955-), 男, 北京市人, 副教授, 博士生, 主要从事植物单宁化学和食品微生物研究。

* 通讯联系人。

1 材料与方法

1.1 材料

α -淀粉酶和脂肪酶为无锡酶制剂厂产品;纤维素酶为上海明珠东风生物技术公司产品;果胶酶和胰蛋白酶为 Sino 公司产品;对-甲苯磺酰-L-精氨酸酯(BAEE)为 Sigma 公司产品,其他试剂均为国产分析纯试剂。

黑荆树皮单宁 5 个试样中,未纯化单宁为广西武鸣烤胶厂生产的、未经化学处理的黑荆树皮烤胶,单宁纯度为 77.1%;纯化单宁是在一定条件下,采用浓度为 90% 乙醇醇沉除去大部分蛋白质、多糖等非单宁成分后,再用石油醚浸提去除脂类物质,浓缩除去溶剂后得到的试样,其单宁纯度较之未纯化单宁提高了 10%,乙醚级分和乙酸乙酯级分是在 pH 4.0 条件下,分别用乙醚萃取 4 次和乙酸乙酯萃取 6 次纯化单宁,经浓缩去除有机溶剂而得到。萃余水级分为以上溶剂萃取后的剩余水溶物。各级分的分子量分布范围采用高效液相色谱法进行表征。具体实验过程见作者发表的相关论文^[9]。

1.2 方法

1.2.1 黑荆树皮单宁不同级分对酶活力的抑制 将黑荆树皮单宁各级分配制成浓度为 10.0 g/L 的水溶液,根据预测实验结果,定量加入到各种酶-底物反应液中,使单宁的浓度达到 2.0 g/L,以蒸馏水作为空白对照,测定各种酶的活力^[10],如此重复 3 次,计算单宁各级分对不同酶的平均抑制率。一个 α -淀粉酶活力单位定义为在测定条件下,每分钟释放出 1 μ mol 还原糖所需的酶量;一个纤维素酶活力单位定义为在测定条件下,每分钟内释放出 1 μ mol 葡萄糖所需的酶量;一个果胶酶活力单位定义为在测定条件下,每小时生成 1 μ mol 还原糖所需的酶量;一个胰蛋白酶活力单位定义为在测定条件下每分钟水解 1 μ mol BAEE 所需的酶量;一个脂肪酶活力单位定义为在测定条件下,每分钟滴定 1.0 mL 0.05 mol/L NaOH 溶液所需的酶量。

1.2.2 黑荆树皮单宁不同级分与纤维素酶结合的抑制剂常数 K_i 值测定 配制不同浓度的底物-纤维素酶-单宁级分反应液,使不同反应液的底物浓度分别为 0.25、0.50、0.625、1.25 g/L,单宁各级分的浓度均为 2.0 g/L,纤维素酶浓度均为 0.33 g/L,以蒸馏水替代单宁级分作空白对照,酶活力测定方法如前述。

2 结果与讨论

2.1 单宁不同级分对酶活力的抑制

黑荆树皮单宁不同级分(浓度为 2.0 g/L)对 5 种水解酶的抑制作用见表 1。

由表 1 可看出,黑荆树皮单宁各级分对 5 种水解酶均显示一定的抑制作用,而且由于单宁纯度和分子量分布范围的不同,表现出不同级分对同一种酶的抑制作用有较大差异。其中,单宁的乙酸乙酯级分与萃余水级分对 5 种水解酶活力的抑制作用最大,且抑制率基本相同,乙醚级分对 5 种酶的抑制作用最小。这说明分子量大的单宁组分,由于酚羟基数目多,可以与酶蛋白形成多点结合,使酶分子的空间结构发生较大程度的改变,从而导致酶活力较大程度的降低^[1,11~13]。尽管萃余水级分较之乙酸乙酯级分含有较多分子量的单宁组分,

表 1 黑荆树皮单宁不同级分对酶活力的抑制率(%)

Table 1 Inhibitory rate of different fractions of black wattle bark tannin on the enzyme activities(%)

单宁试样 tannin samples	α -淀粉酶 α amylase	纤维素酶 cellulase	果胶酶 pectinase	胰蛋白酶 trypsin	脂肪酶 lipase
空白 control	0	0	0	0	0
未纯化单宁 unpurified tannin	43.8	39.5	40.0	42.4	36.2
纯化单宁 purified tannin	48.2	43.3	47.5	45.9	38.5
乙醚级分 ether extract	32.5	28.9	31.5	24.9	28.2
乙酸乙酯级分 ethyl acetate extract	67.8	67.2	65.0	57.1	53.7
萃余水级分 residue of extraction	66.6	64.4	62.5	38.7	52.0

但其非单宁含量也相对较高,这可能是二者表现出对酶活力抑制相似的原因,其中的一个例外是萃余水级分单宁对胰蛋白酶的抑制率较低,这可能表明单宁的酶活力抑制性还与其亲水性等其它因素有关,尚待进一步研究。纯化后的单宁纯度提高了 10%,故对 5 种水解酶活力的抑制作用稍大于未纯化单宁。此外,表 1 结果还显示出同一单宁级分对不同水解酶活力的抑制程度不同,说明单宁对酶的抑制作用具有一定的选择性,这是由酶本身的化学组成和分子结构所决定的。

2.2 黑荆树皮单宁不同级分与纤维素酶结合的抑制剂常数 K_i 值

为进一步探讨单宁不同级分对酶抑制作用的机理,测定了不同底物浓度下,单宁各级分对纤维素酶活力的抑制效果。根据不同底物浓度(s)条件下,得到的反应速度(v),采用 Lineweaver-Burk 法^[11],以 $1/v$ 对 $1/s$ 作图,连线并外推至与 x 轴相交,见图 1。

由图 1 可以看出,无论有无单宁存在,底物浓度($1/s$)与酶促反应速度($1/v$)均呈直线关系,根据 $K_m = -1/x$,得 $K_m = 0.625$ g/L,两种情况下的米氏常数相同。无单宁存在时,酶促反应的最大速度 $V_{\max} = 1.50$ $\mu\text{mol}/\text{min}$,有单宁级分存在时的最大反应速度 v_p 见表 2。根据公式 $K_i = I V_p / (V_{\max} - V_p)$ (I 为单宁浓度)^[13],可以计算反应体系中单宁各级分与纤维素酶结合的抑制剂常数 K_i ,见表 2。

表 2 酶促反应的 V_p 值与 K_i 值Table 2 V_p and K_i values of the enzyme catalysis reactions

单宁试样 tannin samples	未纯化单宁 unpurified tannin	纯化单宁 purified tannin	乙醚级分 ether extract	乙酸乙酯级分 ethyl acetate extract	萃余水级分 residue of extraction
V_p ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	0.908	0.850	1.066	0.492	0.534
K_i (g/L)	3.07	2.62	4.91	0.98	1.11

计算结果显示,黑荆树皮单宁各级分对纤维素酶的抑制均属于可逆的非竞争性抑制。其抑制程度取决于 K_i 值的大小。黑荆树皮单宁乙酸乙酯级分的抑制剂常数 K_i 值最小,说

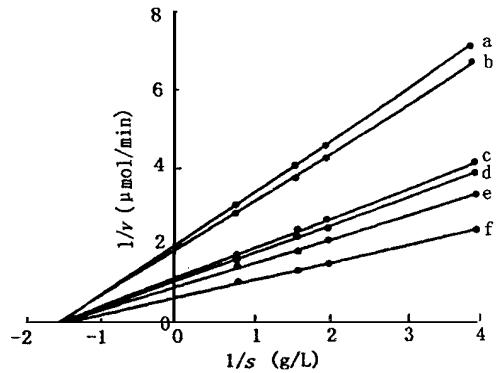


图 1 单宁各级分对纤维素酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 1 Lineweaver-Burk diagram of the inhibition of cellulase

a. 乙酸乙酯级分 ethyl acetate extract; b. 萃余水级分 residue of extraction; c. 纯化单宁 purified tannin; d. 未纯化单宁 unpurified tannin; e. 乙醚级分 ether extract; f. 空白 control

明其与纤维素酶结合的亲和力强,酶活性受抑制程度大;而乙醚级分的 K_i 值最大,与酶结合的亲和力弱,酶活性受抑制程度小,此与 2.1 实验结果是一致的,进一步证实了抑制剂中单宁的有效含量及分子量大小与酶活性之间的关系。

可以认为,单宁(I)和底物(S)同时与酶(E)发生结合,生成没有催化活性的EIS三元复合物,如图2所示。单宁并非与酶的活性中心结合,而是在酶蛋白表面形成多点交联,分子量越大的单宁,酚羟基数目越多,交联度越大,酶蛋白的空间结构改变越大,从而使酶不能保持催化反应所必须的构象,致使酶活性中心的催化能力降低^[1, 5, 11~12]。

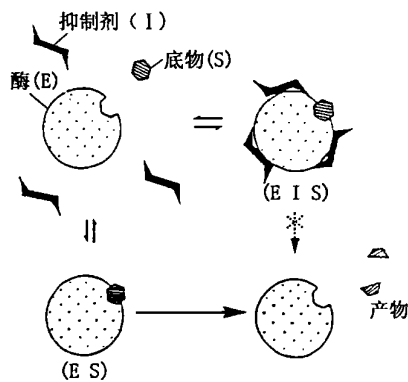


图2 单宁、底物与酶蛋白结合的示意图

Fig.2 Scheme of combination of tannin substrate and enzyme

3 结论

3.1 黑荆树皮单宁不同级分对5种水解酶均有不同程度的抑制作用,且抑制作用具有一定的选择性。

3.2 单宁含量越高、分子量越大的级分,抑制剂常数 K_i 值越小,与酶蛋白的结合能力越强,对酶活性的抑制作用越大。

3.3 黑荆树皮单宁对酶的抑制作用属于非竞争性抑制,即只影响酶促反应的速度,而不影响酶的化学本质。

3.4 本研究结果表明通过适当的方法提高植物单宁的精细化程度,可望使这类天然产物得到更好的利用。

参考文献:

- [1] 孙达旺. 植物单宁化学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992: 414-426.
- [2] KUMAR R, SINGH M. Tannins, their adverse role in ruminant nutrition[J]. J. Agricultural Food Chemistry, 1984, 32: 447-453.
- [3] BRAVO L, MANAS E, SAURA-CAUXTO F. Dietary non-extractable condensed tannins as indigestible compounds: Effect on faecal weight and protein and fat extraction [J]. Agricultural Food Science, 1993, 63: 63-68.
- [4] MAHMOOD S. A comparison of effects of body weight and feed intake on digestion in Broiler Cockerels with effects of tannin[J]. Nutrition, 1993, 70: 704-709.
- [5] HASLAM E, LILLY T, CAL Y, et al. Traditional herbal medicines—the role of polyphenols[J]. Planta Medica, 1989, 55(1): 4-8.
- [6] BICKLEY J. Vegetable tannins and tanning[J]. Soc. Leather Technology Chemistry, 1991, 76: 4-5.
- [7] LUCK G, LIAO H, MURRAY N, et al. Polyphenols, astringency and proline rich proteins [J]. Phytochemistry, 1994, 37(2): 357-371.
- [8] FIELD J, LETTINGA G. Toxicity of tannic compounds to microorganisms. HEMINGWAY R, LAKES P (ed). Plant Polyphenols [M]. New York: Plenum Press, 1992: 673-689.
- [9] 姚开, 吕远平, 石碧, 等. 黑荆树皮单宁不同级分的抑菌性能[J]. 精细化工, 2000, 17(7): 398-401.

- [10] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 轻工业出版社, 1998: 680-742.
- [11] 沈同, 王镜岩, 赵邦梯. 生物化学[M]. 上海: 高等教育出版社, 1984: 245-256.
- [12] 石碧, 何先琪, 张敦信, 等. 植物鞣质与胶原的反应机理研究[J]. 中国皮革, 1995, 22(8): 26-31.
- [13] HASLAM E. Plant polyphenols-vegetable tannins revisited[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1989: 170-185.

INHIBITORY EFFECTS OF DIFFERENT FRACTIONS OF BLACK WATTLE BARK TANNINS ON HYDROLASES

YAO Kai, LÜ Yuan-ping, SHI Bi, HE Qiang

(*Light Industry and Food Engineering College, Sichuan University, Chengdu 610065, China*)

Abstract: Tannin fractions with different molecular weight distributions were obtained by purification of alcohol precipitation and fractionation of solvent extractions of black wattle bark tannins. The data observed in the experiments indicated that tannin fractions possess varying inhibitory effects on activity of hydrolases, showing selective inhibition. Based on comprehensive investigations of cellulase, it was displayed that the inhibitions are related to the inhibitor constant K_i . When the molecular weight of the fractions is higher, K_i value is lower and the inhibitory effect is stronger. Meanwhile, the inhibition of the fractions on the cellulase was proved to be a noncompetitive one.

Key words: vegetable tannins; black wattle bark tannins; fractionation; hydrolases; inhibition

下期要目

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------|
| 马尾松硫酸盐浆两段氧脱木质素最佳工艺条件的研究 | 天然松香大分子多相催化反应的孔效应研究
(英文) |
| 真菌致泡桐材组分变化研究 | 水溶性丙烯海松酸聚酯的合成及性能研究 |
| α -蒎烯择形催化异构化机理研究 | 氢化松香主要化学组成的研究 |
| 造纸废液喷雾干燥工艺参数影响因素探讨 | 以脱羧腰果壳液制表面活性剂 |
| 磷酸- 催化剂法生产活性炭的工艺研究 | 植物单宁的营养学特性(综述) |
| 合成丁香酸的新方法 | 固-液混合酸催化水合萜二醇合成松油醇的研究 |
| 纤维素和木聚糖复合诱导合成木聚糖酶的研究 | 氯化亚砷合成 AKD 的工业化生产 |
| 木聚糖酶预处理对麦草化机浆可漂性及白度的改善 | 从山苍子中提取柠檬醛及柠檬醛的测定研究
(简报) |
| 抗松材线虫病的马尾松种源化学成分与抗性机理研究(第 II 报) | |