

赵宏玉,孙娅楠,张根生,等. 荞麦蜜中的多酚类成分与蛋白复合物[J]. 江苏农业科学,2018,46(12):157-160.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.12.039

荞麦蜜中的多酚类成分与蛋白复合物

赵宏玉^{1,3}, 孙娅楠², 张根生¹, 乔江涛³, 张红城^{1,3}

(1. 哈尔滨商业大学, 黑龙江哈尔滨 150010; 2. 深圳出入境检验检疫局, 广东深圳 518045;

3. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

摘要:荞麦蜜用 2 mol/L NaCl 水溶液处理,经 3 ku 超滤管超滤,分别测定 NaCl 处理前后蜂蜜水滤出液的总酚含量,通过三维(3D)荧光、非变性凝胶电泳(Native-PAGE)、液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)分析荞麦蜜水溶液经 3 ku 超滤管超滤的截留液成分。结果表明,经 2 mol/L NaCl 处理的蜂蜜水滤出液组分中总酚含量明显高于未经处理的,说明荞麦蜜中可能有部分多酚类化合物与蛋白相互结合,以复合物的状态存在;3D 荧光光谱中有明显的多酚、蛋白成分特征峰,证明荞麦蜜中存在多酚与蛋白复合物;经 Native-PAGE、LC-MS/MS 质谱分析推测,荞麦蜜中多酚类成分是与蜂王浆主蛋白 1(MRJP 1_*Apis mellifera* L.)结合而形成复合物的。

关键词:荞麦蜜;多酚类成分;蛋白复合物;非变性凝胶电泳;液相色谱串联质谱

中图分类号:S896.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)12-0157-03

人类食用蜂蜜的历史可以追溯到史前时期,主要是用作甜味剂^[1-2]。最近有研究表明,蜂蜜具有抗氧化、抗菌、抗炎等多种生物学功能,这些功能的产生来源于其本身的物理化学特性^[3],包括蜂蜜中的糖、矿物质、多酚、蛋白质、氨基酸及经由葡萄糖氧化产生的过氧化氢等^[4-5]。多酚具有独特的可以在相互之间或与其他分子之间形成复合物的能力,其中最主要的特性就是与蛋白质亲和,这也导致许多可溶或不可溶复合物的形成^[6],而蜂蜜中多酚类化合物是否与蛋白质发生复合尚不明确。

中国是蜂蜜生产大国,荞麦蜜是我国重要的单花蜜之一,是一种具有独特麦芽香味的深色蜜。有研究发现,在不同种类来源的单花蜜中,荞麦蜜的抗氧化活性和氧自由基吸收能力(ORAC)相对最强^[7],且多酚类物质含量十分丰富^[8]。本试验通过探讨荞麦蜜中是否存在多酚-蛋白质复合物及与多酚类化合物结合的蛋白质种类,旨在引导人们关心蛋白质和多酚相互作用的重要性及蜂蜜中这种复合物的营养学和生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 试验材料 荞麦蜜样品,2016 年产自内蒙古,存放于 4 ℃ 冰箱中。

1.1.2 试剂 三氯化铝、碳酸钠、氢氧化钠、氯化钠、三氯乙酸、三氟乙酸、乙腈、丙酮、甲酸等,均为分析纯,购自北京化学试剂公司;考马斯亮蓝 G-250、碘乙酰胺,购自北京索莱宝科技有限公司;甲醇,购自美国 Fisher 公司;98% 没食子酸、芸香

苷对照品,购自上海佳和生物科技有限公司;福林-酚试剂,购自北京康为世纪生物科技有限公司;Novex® 4-12% Tris-甘氨酸凝胶、2 × 上样缓冲液、10 × Tris-甘氨酸电泳缓冲液、20~1 200 ku 非预染蛋白 marker,购自美国英杰生命技术有限公司。

1.1.3 主要仪器与设备 微量移液器,由德国艾本德(上海)国际贸易有限公司生产;AL204 型分析天平,由梅特勒-托利多仪器有限公司生产;Easy-nLC 1000 系统耦合 Orbitrap Fusion 质谱仪、Sorvall Biofuge Startos 型台式离心机,由美国赛默飞(中国)有限公司生产;SHB-III 型循环水式真空泵,由长城科工贸有限公司生产;DZF-6090 型真空干燥箱,由上海一恒科学仪器有限公司生产;超纯水系统,由美国密理博公司生产;KQ-50DB 型数控超声波清洗器,由昆山市超声仪器有限公司生产;Amicon Ultra 3KD 超滤管、PROTEAN 等电聚焦电泳仪、Mini-Protein II 垂直板电泳装置、电泳图像扫描仪,由美国 Bio-Rad 公司生产;XCell SureLock® Mini-Cell 蛋白垂直电泳槽,由美国英杰生命技术有限公司生产;TS-2 型脱色摇床,由江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司生产;F-4600 荧光分光光度计,由日本日立公司生产;2080TW 型 LG 微波炉,由 LG 电子(天津)电器有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 多酚与蛋白复合物提取液的制备 在荞麦蜜加入 2 mol/L NaCl 配制成蜂蜜水,经 3 ku 超滤管超滤,于 12 000 r/min 离心 15 min,分别得到滤出液、截流液 2 个组分,置于 4 ℃ 冰箱中保存。

1.2.2 荞麦蜜中总酚含量的测定 以没食子酸为对照品,采用福林-西奥卡特(Folin-Ciocalteu)法建立总酚含量的标准曲线;未经氯化钠处理和经氯化钠处理的蜂蜜水均用 3 ku 超滤管超滤,各取 0.2 mL,采用福林-西奥卡特(Folin-Ciocalteu)法测定,以没食子酸相对含量表示总酚含量,重复 3 次。

1.2.3 荞麦蜜提取物中总黄酮含量的测定 以芸香苷为对照品,采用三氯化铝(AlCl₃)法建立总黄酮的标准曲线;未经

收稿日期:2017-01-07

基金项目:国家蜂产业技术体系(编号:CARS-45-KXJ18)。

作者简介:赵宏玉(1992—),女,黑龙江哈尔滨人,硕士研究生,从事蜂产品应用与加工研究。E-mail:470085310@qq.com。

通信作者:张红城,博士,副研究员,从事功能食品与生物活性物质、食品生物技术研究。E-mail:460414874@qq.com。

氯化钠处理和经氯化钠处理的蜂蜜水均用 3 ku 超滤管超滤,各取 0.2 mL 进行测定,用芸香苷相对含量表示样品中的总黄酮含量,重复 3 次。

1.2.4 荞麦蜜样品三维(3D)荧光光谱的全波长扫描 将荞麦蜜配制成蜂蜜水,经 3 ku 超滤管超滤,于 12 000 r/min 离心 15 min,分别得到滤出液、截流液 2 个组分,用 3D 荧光光谱测定,测定条件:激发起始波长 200.0 nm、激发终止波长 700.0 nm、激发采样间隔 10.0 nm、发射起始波长 210.0 nm、发射终止波长 710.0 nm、发射采样间隔 10.0 nm、扫描速度 30 000 nm/min、激发狭缝 5.0 nm、发射狭缝 5.0 nm、电压 400 V,响应值为自动。

1.2.5 非变性凝胶电泳(Native-PAGE)结合液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)检测蜂蜜样品中的蛋白 选取大于 3 ku 的组分,采用 4%~12% Tri-甘氨酸预制凝胶进行电泳,恒压 125 V,电泳时间 3 h,上样量 5 μ L;用考马斯亮蓝 G-250 染色,低火微波 1 min,再在摇床上染色 5 min;用脱洗液脱色至背景干净、蛋白条带清晰;取 Native-PAGE 胶上的条带进行脱盐处理用于胶内酶解:样品用 25 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)还原二硫键,用 55 mmol/L 碘乙酰胺烷基化,再用测序级改性的胰蛋白酶用 50 mmol/L 碳酸氢铵于 37 $^{\circ}$ C 处理 12 h 以达到分离胶消化;所得到的肽段在 50% 乙腈水溶液中用 1% 三氟乙酸提取 2 次,真空离心,蒸发浓缩器浓缩;将处理好的肽段进行质谱分析,质谱条件:100 mm \times 2 cm、3 μ m Acclaim PepMap C₁₈ 色谱柱分离,以 300 nL/min 流速运行 60 min 梯度洗脱,流动相 A 为水并含有 0.1% 甲酸,流动性 B 为乙腈并含有 0.1% 甲酸,350~1 550 m/z 、分辨率 120 000 进行全扫描;离子阱二级质谱扫描,使用自带的蛋白质谱搜库软件(Version PD1.4)对 UniProtKB/Swiss-Prot 数据库进行搜索匹配。

2 结果与分析

2.1 荞麦蜜样品中的总酚和总黄酮含量

试验结果表明,未经 NaCl 处理和经 NaCl 处理荞麦蜜水

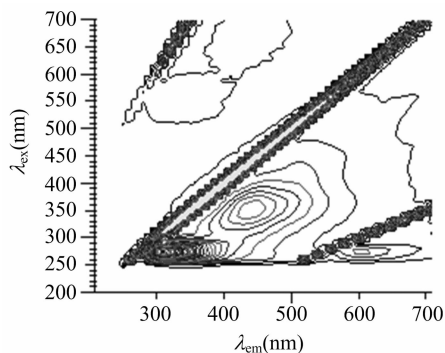


图1 未经 NaCl 处理的荞麦蜜水样品 3D 荧光光谱

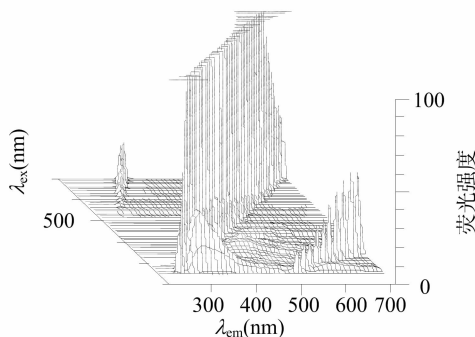
2.3 Native-PAGE 和 LC-MS/MS 分析荞麦蜜中的复合蛋白

2.3.1 Native-PAGE 分析 由图 4 可知,蜂王浆主蛋白 1 提取液(F)分别在 620、290、66 ku 附近有明显的条带,处理后大于 3 ku 的荞麦蜜超滤液 2 个重复组分 M1、M2 在 620、290、66 ku 附近也有明显的条带出现,且条带位置均略高于 F 组分,说明荞麦蜜大于 3 ku 的组分中可能是蜂王浆主蛋白 1,并且是以复合物形式存在的。

溶液的滤出液中总酚和总黄酮含量有一定差异,未经 NaCl 处理的荞麦蜜总酚、总黄酮含量分别为(1 742.1 \pm 63.6)、(23.5 \pm 5.3) mg/kg,经 2 mol/L NaCl 处理的荞麦蜜总酚、总黄酮含量分别为(2 723.8 \pm 41.3)、(28.7 \pm 6.4) mg/kg,经 2 mol/L NaCl 处理的蜂蜜水滤出液总酚含量明显高于未经处理的,这可能是由于蜂蜜经 2 mol/L NaCl 水溶液处理后,破坏了蛋白和多酚二者之间的非共价键,使复合的多酚游离出来,经超滤后多酚与蛋白分离,使得小于 3 ku 的多酚含量升高;荞麦蜜经 NaCl 处理前后的样品总黄酮含量相差很小,为 5.2 mg/kg,说明蜂蜜中主要是多酚和蛋白发生复合,而不是黄酮。

2.2 荞麦蜜样品 3D 荧光光谱全波长扫描结果

3D 荧光光谱是近些年来在荧光光谱分析基础上发展起来的一种荧光分析技术^[9],与普通的荧光光谱分析方法相比,3D 荧光光谱法具有能够获得激发波长 λ_{ex} 与发射波长 λ_{em} 同时变化时的荧光强度信息的优点,可以提供在普通发射谱中得不到的信息^[10],能够提供荧光强度、荧光偏振等物理参数,进而了解蛋白质分子中荧光生色基团所处的微环境,有助于阐述蛋白质的结构与功能^[11],成为研究其他物质与蛋白质相互作用的主要手段^[12]。有研究表明,蛋白质的激发波长为 280 nm,发射波长为 305~354 nm^[13],多酚类物质的激发波长为 330~385 nm,发射波长为 420~485 nm^[14]。由图 1 可知,未经 NaCl 处理的荞麦蜜有 2 个峰,第 1 个位置为 λ_{ex} = 276~283 nm、 λ_{em} = 313~324 nm,表明样品中存在蛋白成分;第 2 个位置为 λ_{ex} = 335~368 nm、 λ_{em} = 420~464 nm,表明样品中存在多酚成分。由图 2、图 3 可知,NaCl 处理的荞麦蜜经超滤后小于 3 ku 的组分中只有 1 个峰, λ_{ex} = 353~367 nm、 λ_{em} = 431~468 nm,表明样品中只存在多酚成分;大于 3 ku 的组分中有 2 个峰,对应的 λ_{ex} = 347~378 nm、 λ_{em} = 429~476 nm 和 λ_{ex} = 271~289 nm、 λ_{em} = 305~346 nm,说明该组分中既有多酚类化合物又有蛋白,这是由于游离态的多酚成分分子量不可能大于 3 ku。因此可以推测,组分中大于 3 ku 的多酚类物质是以多酚和蛋白的复合物形式存在的。



2.3.2 LC-MS/MS 质谱鉴定结果 分别选取 Native-PAGE 电泳中 N1~N6 胶进行胶内酶解,利用 LC-MS/MS 对其蛋白进行鉴定,以进一步确认荞麦蜜中与多酚类物质复合的蛋白质种类。由表 1 可知,N1 组分与蜂王浆主蛋白 1(MRJP 1_*Apis mellifera* L.)的序列覆盖率为 73.15%,鉴定得到的肽段数为 33 个;N2 组分与 MRJP 1_*Apis mellifera* L.、MRJP 3_*Apis mellifera* L. 的序列覆盖率分别为 75.23%、54.41%,鉴定得到的肽段数分别为 38、27 个;N3 组分与

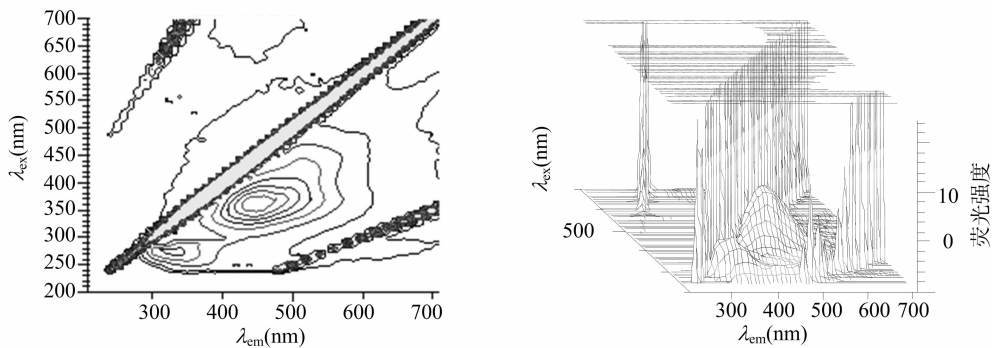


图2 经 NaCl 处理的荞麦蜜水样品大于 3 ku 的 3D 荧光光谱

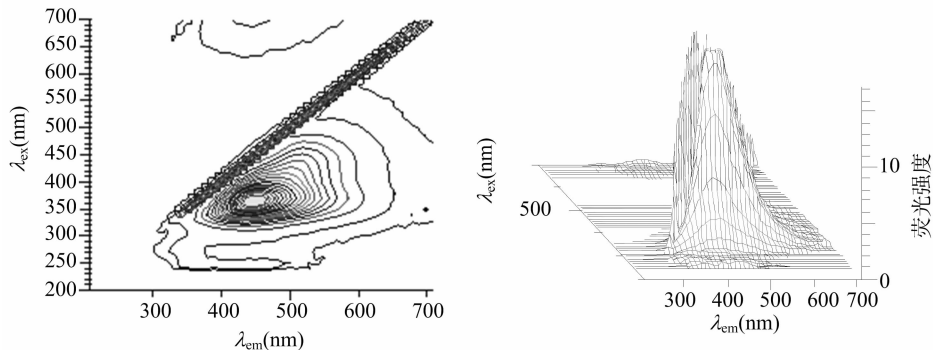
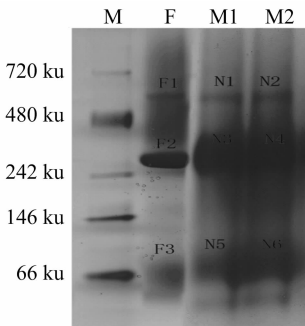


图3 经 NaCl 处理的荞麦蜜水样品小于 3 ku 的 3D 荧光光谱



F—蜂王浆主蛋白 1 提取液；M1、M2—处理后大于 3 ku 的 2 个重复组分；M—marker

图4 荞麦蜜各洗脱组分的 Native-PAGE 电泳分析

MRJP 1_ *Apis mellifera* L.、MRJP 2_ *Apis mellifera* L. 的序列覆盖率分别为 86.57%、66.37%，鉴定得到的肽段数分别为 38、25 个；N4 组分与 MRJP 1_ *Apis mellifera* L.、MRJP 2_ *Apis mellifera* L. 的序列覆盖率分别为 83.56%、71.02%，鉴定得到的肽段数为 34、29 个；N5 组分与 MRJP 1_ *Apis mellifera* L.、MRJP 2_ *Apis mellifera* L. 的序列覆盖率分别得为 55.09%、67.36%，鉴定得到的肽段数分别为 24、27 个；N6 组分与 MRJP 1_ *Apis mellifera* L. 的序列覆盖率为 67.70%，鉴定得到的肽段数为 30 个。因此推测，荞麦蜜中的蛋白主要由 MRJP 1_ *Apis mellifera* L.、MRJP 2_ *Apis mellifera* L.、MRJP 3_ *Apis mellifera* L. 组成的。从生物信息学比对结果看，确定荞麦蜜大于 3 ku 组分中的蛋白为 MRJP 1_ *Apis mellifera* L.。

表 1 LC-MS/MS 鉴定荞麦蜜中的蛋白种类

组分	登记号	覆盖率(%)	肽段数(个)	分子量(u)	等电离点	蛋白名称
N1	O18330	73.15	33	48.9	5.34	MRJP 1_ <i>Apis mellifera</i> L.
N2	O18330	75.23	38	48.9	5.34	MRJP 1_ <i>Apis mellifera</i> L.
	Q17060	54.41	27	61.6	6.96	MRJP 3_ <i>Apis mellifera</i> L.
N3	O18330	86.57	38	48.9	5.34	MRJP 1_ <i>Apis mellifera</i> L.
	O77061	66.37	25	51.0	7.27	MRJP 2_ <i>Apis mellifera</i> L.
N4	O18330	83.56	34	48.9	5.34	MRJP 1_ <i>Apis mellifera</i> L.
	O77061	71.02	29	51.0	7.27	MRJP 2_ <i>Apis mellifera</i> L.
N5	O18330	55.09	24	48.9	5.34	MRJP 1_ <i>Apis mellifera</i> L.
	O77061	67.36	27	51.0	7.27	MRJP 2_ <i>Apis mellifera</i> L.
N6	O18330	67.70	30	48.9	5.34	MRJP 1_ <i>Apis mellifera</i> L.

3 结论

通过测定荞麦蜜中总酚含量、3D 荧光光谱及 Native - PAGE、LC - MS/MS 质谱分析，确认荞麦蜜中存在多酚与蛋白复合物，且多酚类成分是与蜂王浆主蛋白 1 (MRJP 1_ *Apis mellifera* L.) 结合的，这为蜂蜜中复合物营养学和生物学功能

的进一步研究提供了理论参考。

参考文献：

[1] 陈丽娟, 费晓庆, 谭梦茹, 等. 超高效液相色谱 - 高分辨质谱法测定蜂蜜中的苯甲酸、山梨酸、安赛蜜与糖精钠[J]. 分析测试学报, 2016, 35(9): 1142 - 1146.

张霞,黄端杰. 储藏条件对普洱茶品质的影响及其茶汤饮用安全性分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(12):160-163.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.12.040

储藏条件对普洱茶品质的影响 及其茶汤饮用安全性分析

张霞^{1,2}, 黄端杰¹

(1. 长江大学园艺园林学院,湖北荆州 434025; 2. 长江大学根系生物学研究所,湖北荆州 434025)

摘要:将普洱茶储藏于不同温度和湿度梯度下,研究储藏过程中主要理化成分、菌落总数和亚硝酸盐含量的变化。结果表明,随着储藏时间的延长,水浸出物和氨基酸含量呈减少趋势;茶多酚含量和菌落总数都是先增加,储藏 15 d 左右又逐渐减少;可溶性糖含量总体呈增加趋势;亚硝酸盐含量呈缓慢增加的趋势,总体变化较小,一直低于国标 GB/T 5749—2006 可允许的最低标准($\leq 1 \mu\text{g/mL}$);储藏 20 d 时普洱茶微生物种群数量达到 9.11×10^{10} CFU/L,远远超出国家标准,35% 潮水量,25 °C 温度环境下增加最快。综合评价认为,普洱茶自身含水量高,储藏环境温度过高,长时间储藏会增加普洱茶饮用的风险。

关键词:普洱茶;游离氨基酸;茶多酚;可溶性糖;亚硝酸盐;菌落总数

中图分类号: TS272.5⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)12-0160-04

普洱茶是以地理标志保护范围内的云南大叶种晒青茶为原料,并在地理标志保护范围内采用特定的加工工艺制成的具有独特品质特征的茶叶^[1]。“越陈越香,红褐明亮”是普洱茶最为独特的风味与特色^[2]。普洱茶的储存对其风味的形成至关重要,依仓储环境不同可分为干仓和湿仓,干仓和湿仓的主要差别在于温度、湿度和通风程度等环境条件的不同。一般认为,干仓存储普洱茶,既保存普洱茶的本质真性,又增加了品茗价值,但是要达到品饮年份,需要很长的时间;湿仓能加速普洱茶的后发酵,在短时间内达到自然仓储多年的效果,但湿仓茶容易产生仓味,进而极易发生霉变^[3],饮用是否安全也有待研究。普洱茶陈化的机理是什么、怎样才能满足

普洱茶最佳存储环境等方面的研究极少。本研究以普洱茶为原料,设置不同潮水量和温度,模拟湿仓环境储藏,通过感官审评各储藏时间普洱茶的品质变化,并测定主要成分含量对各茶样的茶汤进行饮用安全性分析,从而探究不同储藏条件对普洱茶品质形成的影响。为普洱茶的后续储藏提供参考,也为干仓或湿仓普洱茶的品质鉴定、存储工艺及饮用安全性提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为 2013 年特级宫廷普洱茶,产自云南普洱,外形条索紧实匀整、红褐匀净,冲泡后的汤色红浓明亮,略带陈香,滋味醇厚,叶底红褐欠软。

1.2 试验设计

普洱茶的茶坯潮水量是渥堆前的一个关键技术^[4],潮水量是指往样品茶中加水增湿至设定的茶坯含水量。本试验设

收稿日期:2016-12-15

基金项目:湖北省教育厅青年基金(编号:Q20141310);长江大学根系生物学研究所开放基金(编号:R201403)。

作者简介:张霞(1981—),女,湖北天门人,硕士,讲师,主要从事茶学的研究与教学工作。E-mail:1584385415@qq.com。

[2] 宾冬梅. 蜂蜜的生理功能及开发利用[J]. 特产研究,2004,26(1):57-61.

[3] Alvarez L M. Honey proteins and their interaction with polyphenols [D]. Saint Catharines: Brock University, 2011.

[4] Tsao R, McCallum J. Fruit and Vegetable Phytochemicals: chemistry, nutritional, value and stability [M]. New Jersey: Wiley - Blackwell, 2009.

[5] Rawel H A, Meidtnr K, Kroll J. Binding of selected phenolic compounds to proteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(10): 4228-4235.

[6] Bennick A. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins[J]. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 2002, 13(2): 184-196.

[7] Gheldof N, Wang X H, Engeseth N J. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2002, 50(21): 5870-5877.

[8] 曹炜, 索志荣. Folin - Ciocalteu 比色法测定蜂蜜中总酚酸的含量[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(12): 80-82.

[9] 陈银节, 缪九军, 张宗元. 三维荧光光谱的油气指示意义[J]. 天然气地球科学, 2005, 16(1): 69-72.

[10] 刘笑菡, 张运林, 殷燕, 等. 三维荧光光谱及平行因子分析法在 CDOM 研究中的应用[J]. 海洋湖沼通报, 2012(3): 133-145.

[11] 刘洛生, 王兴坡, 赵全芹, 等. 头孢噻肟与人血清白蛋白的相互作用机制[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(6): 1130-1133.

[12] 申炳俊, 曹宇宁, 周锦秀, 等. 荧光和紫外光谱法研究柯里拉京与人血清白蛋白之间的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2016, 36(10): 431-432.

[13] 刘娟, 高铁俊, 董捷, 等. 蜂王浆室温储存过程中的褐变产物[J]. 食品科学, 2012(6): 238-241.

[14] Ellis G P. The maillard reaction[J]. Advances in Carbohydrate Chemistry, 1959, 14(3): 63-134.