

没食子单宁与蛋白质、磷脂和糖的反应研究

何强 石碧 姚开 贾冬英 四川大学轻纺与食品工程学院 成都 610065

T520 A

摘 要 本文定量研究了没食子单宁(β -1, 2, 6-三没食子酰基-D-葡萄糖 TGG 和 β -1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰基-D-葡萄糖 PGG)与多种蛋白质、磷脂和糖的反应。结果表明没食子单宁与蛋白质(组蛋白、牛血清清蛋白、酪蛋白和明胶)及磷脂(卵磷脂、脑磷脂和神经磷脂)有较强的结合作用,而与糖的结合较弱,PGG 比 TGG 具有更强的与生物物质(蛋白质、磷脂和糖)结合的能力。实验表明,蛋白质-没食子单宁反应和磷脂-没食子单宁反应是氢键和疏水键协同作用的结果,而在糖-没食子单宁反应中氢键是主要的作用方式。

关键词 没食子单宁 生物物质 结合 抗营养作用

Abstract The binding of gallotannins(β -1, 2, 6-tri-O-galloyl-D-glucose TGG and β -1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-D-glucose PGG) on typical proteins, phospholipids and sugars was examined quantitatively. The results indicated that gallotannins bound more on proteins (histone, bovine serum albumin, casein and gelatin) and phospholipids (L- α -lecithin, L- α -cephalin and Sphingomyelin) than on sugars, and that PGG had stronger binding affinity on proteins, phospholipids and sugars than TGG. It also showed that protein-gallotannin and phospholipid-gallotannin interactions were the results of cooperative effects of hydrogen and hydrophobic bonds, and that hydrogen bond was the predominant effect in the interactions between gallotannins and sugars.

Key words Gallotannins Biomass Binding Antinutritional effects

没食子单宁是指没食子酸与葡萄糖通过酯键结合的一类化合物,其典型结构如图1所示。没食子单宁及其衍生物在食品加工中表现出许多有用的特性,如用作抗氧化剂、防腐剂、蛋白质沉淀剂和酶活抑制剂等^[1]。研究表明,这些特性很大程度上依赖于没食子单宁与蛋白质、多糖和生物碱的作用,从而导致相应复合物的生成。由于这些复合物中的食物成分在人或动物体内难以被利用,所以没食子单宁在食品加工中同时具有一定的抗营养性^[2]。没食子单宁广泛存在于水果、蔬菜和动物饲料中,其抗营养性与人类健康以及畜牧业的发展有着密切的联系,已有许多报道涉及没食子单宁与蛋白质、生物碱和金属离子的相互作用。如 Takechi 和 Tanaka^[3]的研究表明,没食子单宁与碱性蛋白和碱性脂肪的作用强于与酸性或中性成分的作用。作者也曾研究了没食子单宁与多种氨基酸的作用,发现当所测氨基酸含有更多疏水基团时,它与没食子单宁的亲合力更强^[4]。本文基于色谱分离的方

法,系统研究了没食子单宁与多种蛋白质、磷脂和糖的作用,为该类别化合物的抗营养性研究提供了理论依据。

1 材料及方法

1.1 材料及仪器

β -1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰基-D-葡萄糖(PGG)和 β -1, 2, 6-三没食子酰基-D-葡萄糖(TGG)由英-荷联合利华公司提供; α -淀粉酶、胃蛋白酶、组蛋白、牛血清清蛋白、酪蛋白、卵磷脂、脑磷脂、神经磷脂、麦芽四糖和麦芽六糖购自 Sigma 公司;明胶、葡萄糖、麦芽糖和可溶性淀粉购自华美生物工程公司;其它化学药品为分析纯。

LD4-2 型离心机(北京医用离心机厂);HZS-H 水浴振荡器(哈尔滨东联电子公司);旋转蒸发器(上海医械专机厂);UV-2501PC 型光谱仪(日本岛津公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的建立

将 PGG 和 TGG 分别用乙醇-水(9:1, v/v)配制成 20、40、60、80、100、120、150、180、220、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标准溶液,以空白乙醇-水溶液作对照实验,于 278nm 波长^[3]处测定各标准溶液的吸光度,建立标准曲线,其

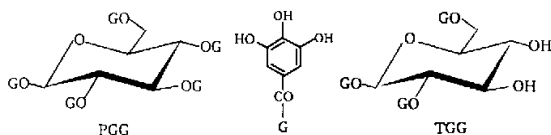


图1 没食子单宁典型结构图

方程为:

$$\text{PGG: } A = 0.0023C + 0.0006, R^2 = 0.9880$$

$$\text{TGG: } A = 0.0018C - 0.011, R^2 = 0.9912$$

1.2.2 柱色谱分析

将 PGG 和 TGG 分别用乙醇-水 (9:1, v/v) 配制成 0.2mg/ml 溶液, 各种蛋白质、磷脂和糖也分别用乙醇-水 (9:1, v/v) 配制成 1mg/ml 溶液。分别取各种生物物质溶液各 5ml 与 5ml PGG (或 TGG) 溶液混合于 20ml 带塞试管中, 置于水浴振荡器内, 30℃ 反应 12h。反应液离心处理 (2000r/min, 15min), 取 2ml 上清液上柱色谱 (Sephadex LH-20)。柱子预先经乙醇-水 (9:1, v/v) 平衡, 并以此作洗脱液, 洗脱流速为 0.22ml/min, 柱下以薄层色谱检测。以纤维素板作固定相, 以 6% AcOH (v/v) 作展开相, 收集 $R_{f, \text{PGG}}$ 0.10 ($R_{f, \text{TGG}}$ 0.13) [5] 洗脱液于 35℃ 真空浓缩, 浓缩液于 278nm 处经分光光度法测定其中游离 PGG (或 TGG) 的含量。PGG 和 TGG 与生物物质的结合率分别表示为 PBP 和 PBT, PBP 或 PBT 越大, 表明该生物物质与 PGG 或 TGG 作用越强。其计算式如下:

$$\text{PBP (PBT) } =$$

$$\frac{\text{反应初溶液中 PGG (TGG) ng 数} - \text{反应后上清液中 PGG (TGG) ng 数}}{\text{反应初溶液中 PGG (TGG) ng 数}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 分析方法的确定

实验结果如表 1 所示。通常在研究没食子单宁与生物物质作用时, 采用的方法是直接分析反应后上清液中没食子单宁的含量, 或者用离心处理所得的沉淀量来表示没食子单宁与生物物质作用的强度。实验中发现该方法具有一定的局限性, 如当组蛋白与 PGG (TGG) 作用后, 实验发现离心后沉淀量很少, 明显低于牛血清蛋白 (BSA) 所产生的沉淀量, 分光光度测得其上清液中 PGG (TGG) 含量较高, 但当用色谱法处理上清液后, 发现组蛋白的 PBP (78%) 和 PBT (58%) 与 BSA 的 PBP (80%) 和 PBT (59%) 相近。由此证明沉淀量的多少与作用后形成的复合物的溶解性有关, 当所形成的复合物是可溶的而存在于上清液中时, 对上清液的直接分光光度分析将导致游离没食子单宁含量的增大, 从而所反应的该生物物质与没食子单宁作用强度将偏弱。故在本实验中采用柱色谱对反应后上清液进行分离后再定量分析, 从而保证了实验结果的准确性。

2.2 结合反应时间的确定

为了确定各种生物物质与没食子单宁反应的时间,

表 1 各生物物质与没食子单宁的结合率

生物物质	分子量 ($\times 10^3$)	PBP (%)	PBT (%)
蛋白质			
α -淀粉酶	97	47	34
胃蛋白酶	34	30	19
组蛋白	15	78	58
牛血清蛋白	69	80	59
酪蛋白	> 100	82	62
明胶	100	87	65
磷脂			
卵磷脂	0.83	77	59
脑磷脂	0.79	69	55
神经磷脂	0.75	66	49
糖			
葡萄糖	0.18	8	6
麦芽糖	0.34	11	8
四麦芽糖	0.67	19	12
六麦芽糖	0.99	30	19
可溶性淀粉	100	41	30

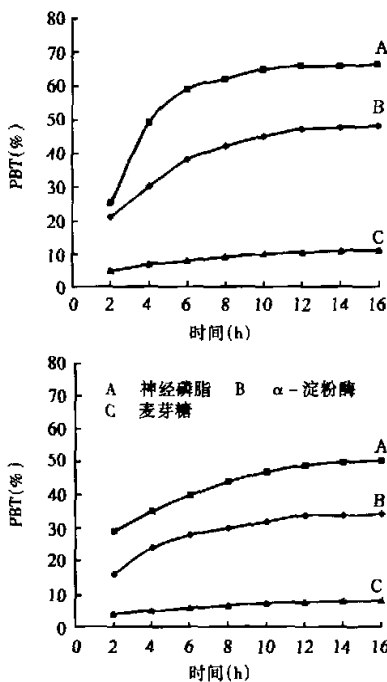


图 2 生物物质与没食子单宁结合率随时间变化关系

经过初步试验, 选择了与没食子单宁结合相对较弱的 α -淀粉酶 (B)、神经磷脂 (A) 和麦芽糖 (C) 进行实验, 考察各自与 PGG 和 TGG 的结合率与时间的变化关系。

如图 2 所示, α -淀粉酶、神经磷脂和麦芽糖与没食子单宁在反应开始时结合速率较快, 当反应到 10h 时结合率变化较慢, 到 12h 时结合率几乎不再增加,

故实验中生物质与没食子单宁的反应时间确定为12h。

2.3 疏水键在结合反应中的作用

由表1可知,组蛋白、酪蛋白和明胶与PGG和TGG的作用强于其它所测蛋白质,同时磷脂也表现出较强的与PGG和TGG结合能力,这主要是由于疏水键的作用。在组蛋白、酪蛋白和明胶的多肽链氨基酸片段中富含芳香族基团和疏水烃基侧链,特别是脯氨酰基的存在(酪蛋白含16.8%,明胶含20%,w/w)^[6],使得溶液中这些氨基酸片段周围形成一个疏水区,同样磷脂的疏水烃基链也可形成这样的疏水区,故没食子单宁通过分子中的疏水基团-没食子酰基^[7]与生物质分子中疏水区经疏水键而结合起来。

由表1还可看出PGG与生物质的结合率高于TGG,这也是由于疏水键的作用。在乙醇-水(9:1, v/v)溶液体系中,PGG的溶解度低于TGG,说明其与生物质形成氢键的能力低于TGG^[8]。而PGG分子中含有五个没食子酰基,多于TGG(3个),故PGG具有较强的疏水结合能力,使其与生物质的结合率高于TGG。

2.4 氢键在结合反应中的作用

由表1可知,糖随着聚合度的增大,其PBP和PBT值增大。另一方面,在BSA分子中其脯氨酰基含量只有4%^[6],但BSA的PBP与PBT值却接近于酪蛋白,这些都说明氢键也是没食子单宁与生物质作用方式之一。随着糖聚合度的增大,其分子中的羟基数增多,从而与没食子单宁的极性基团-酚羟基形成氢键的机会增多,所以其PBP和PBT值增大。蛋白质分子中的极性基团,如胍基、酰胺、肽基、氨基和羧基均可参与氢键的形成,这正是BSA具有较高PBP和PBT值的原因。而磷脂分子中的羰基和磷酸基也可参与氢

键的形成,所以蛋白质和磷脂与生物质作用时,除有疏水键作用之外,还有氢键的作用。

3 结论

3.1 蛋白质和磷脂与没食子单宁PGG和TGG结合时,既有疏水键的作用,也有氢键的作用,是二者协同作用的结果。组蛋白、酪蛋白、明胶、BSA、卵磷脂、脑磷脂和神经磷脂具有较强的与PGG和TGG结合能力。

3.2 在糖与没食子单宁作用时,氢键是主要的作用形式。随着糖聚合度增大,其与没食子单宁结合增强。

3.3 PGG由于比TGG含有更多的没食子酰基,它与生物质结合的能力强于TGG与生物质的结合能力。

参考文献

- 1 何强,姚开,石碧. 倍酸酯类化合物的合成及其应用. 日用化学与工业, 2000, 30(1): 29~32.
- 2 何强,姚开,石碧. 植物单宁的营养学特性. 林产化学工业, 2001, 21(1): 80~85.
- 3 M. Takechi, Y. Tanaka. Binding of 1, 2, 3, 4, 6 - pentagalloyl - glucose to proteins, lipids, nucleic acids and sugars. Phytochemistry, 1987, 26: 95~97.
- 4 B. Shi, X. Q. He, E. Haslam. Gelatin - polyphenol interaction. J. Am. Leather Chemists Association, 1994, 89: 98~104.
- 5 Q. He, B. Shi, K. Yao, et al. Synthesis of gallotannins. Carbohydrate Research, 2001, 335: 245~250.
- 6 张洪渊. 生物化学教程. 成都: 四川大学出版社, 1994, 76~80.
- 7 G. Luck, H. Liao, N. Murray, et al. Polyphenols, astringency and proline - rich proteins. Phytochemistry, 1994, 37(2): 357~371.
- 8 石碧,狄莹. 植物多酚. 北京: 科学出版社, 2000, 81~85.

交联 PVP 对茶多酚的吸附作用

黎新明 西北工业大学材料科学与工程系 西安 710072

崔英德 广东工业大学轻工化工学院 广州 510090

Ts27 A

摘 要 采用自制交联 PVP 处理铁观音茶叶水,在交联度为 0.5%、用量为 7g/L、温度 30℃ 下处理 30min 时,茶多酚的吸附率为 66.83%。分析吸附机理认为,交联 PVP 上的活性吸附中心与茶多酚形成氢键吸附。

关键词 聚乙烯吡咯烷酮(PVP) 水凝胶 茶多酚 吸附

Abstract The tea polyphenols were absorbed by crosslinked PVP. at 0.5% linkage at Tg/L dosage, 30℃ temperature and 30min time. About 66.83% tea polyphenols of tea beverage could be absorbed, And the absorption mechanism was