

不同溶剂对香芋蛋白提取及活性的影响

童晶晶^{1,2}, 张晓元^{2,3}, 赖富饶^{1,2}, 吴晖^{1,2}, 余稳稳¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 食品安全与检测研究中心, 广东广州 510641) (2. 韶关市华工高新技术产业研究院, 广东韶关 512029) (3. 华南理工大学工业技术研究所, 广东广州 510641)

摘要: 对张溪香芋的水提物、盐提物、醇提物、Tris 提取物、等电点沉淀物的蛋白质、氨基酸组成、总糖含量、总酚含量和包括抗氧化活性、凝血活性及胰蛋白酶抑制活性进行分析, 以获得香芋蛋白活性较高的提取物。抗氧化性实验表明, 各提取物具有一定的 ABTS 清除能力和羟基自由基清除能力, 其中 Tris 提取物的 ABTS 清除能力 ($IC_{50}=3.78$ mg/mL) 和羟基自由基清除能力均较高。香芋提取物均对羊血细胞没有凝血活性, 但均对兔血细胞具有凝集活性, 特异性凝集活力大小为盐提物 (3.24×10^3 HU/mg) > Tris 提取物 (2.88×10^3 HU/mg) > 等电点沉淀物 (1.86×10^3 HU/mg) > 水提物 (1.41×10^3 HU/mg) > 醇提物 (0.98×10^3 HU/mg); 五种提取物中, 乙醇提取物没有胰蛋白酶抑制活性, 盐提物、水提物、Tris 提取物胰蛋白酶抑制活性较高, 分别为 134 TIU/mg、130.51 TIU/mg、113.30 TIU/mg。结果表明, Tris 提取物含有较多具有高活性的蛋白质, 且蛋白条带较最全。

关键字: 香芋蛋白; 抗氧化; 凝血活性; 胰蛋白酶抑制剂活性

文章编号: 1673-9078(2016)1-194-202

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.1.031

Effect of Different Solvents on the Extraction and Activities of Taro Proteins

TONG Jing-jing^{1,2}, ZHANG Xiao-yuan^{2,3}, LAI Fu-rao^{1,2}, WU Hui^{1,2}, YU Wen-wen¹

(1. Food Safety and Inspection Research Center, School of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China) (2. High and New Technology Industry Research of Institute of South China University of Technology in Shaoguan City, Shaoguan 512029, China) (3. Industrial Technology Research Institute of South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: The proteins amino acid composition, the total sugar, total phenol and the contents of water, salt, ethanol, tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and isoelectric point precipitation extracts of Zhangxi taro were determined. The antioxidant capacity, coagulating activity and trypsin inhibitory activities of the five extracts were analyzed, in order to obtain a taro protein extract with relatively high activity. The results from the experiment on antioxidant activity showed that all extracts had certain 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and hydroxyl radical scavenging capacities, and the Tris extract exhibited relatively strong scavenging capacities for both radicals. All taro extracts showed agglutinating activity against rabbit erythrocytes, but no coagulation activity against sheep erythrocytes. The specific hemagglutinating activities of the five extracts were as follows: salt extract (3.24×10^3 HU/mg) > Tris extract (2.88×10^3 HU/mg) > isoelectric point precipitation (1.86×10^3 HU/mg) > water extract (1.41×10^3 HU/mg) > ethanol extract (0.98×10^3 HU/mg). Among the five extracts, ethanol extract had no trypsin inhibitory activity. Salt extract, water extract, and Tris extract had higher trypsin inhibitory activities, and the corresponding values were 134 TIU/mg, 130.51 TIU/mg, and 113.30 mg/TIU, respectively. In conclusion, the Tris extract contained more proteins with high activity among the five extracts, as well as more protein bands than the others.

Key words: taro protein; antioxidant; coagulation activity; trypsin inhibitor activity

芋头 (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) 别名为芋

收稿日期: 2015-07-02

基金项目: 韶关市科技攻关项目 (2013GX/N05)

作者简介: 童晶晶 (1988-), 女, 在读硕士, 研究方向: 食品工程

通讯作者: 吴晖 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全、微生物工程及天然产物化学; 共同通讯作者: 张晓元 (1964-), 男, 博士, 副

教授, 研究方向: 生物医药、天然产物研究

魁, 俗称芋艿, 天南星科魁芋属植物^[1], 作为传统药物具有悠久历史, 在世界范围内广泛种植, 主要是热带及亚热带区域^[35], 根据联合国粮农组织 (FAO) 统计资料表明, 世界范围芋头的种植总面积约为 1077660 公顷, 其消费量在蔬菜中居第 14 位^[2-3]。在我国, 芋头资源丰富, 种植面积广, 以云南、广西、山东、四川、福建、江西最多^[1], 其中以广东韶关的

张溪香芋个头最大,价值最高,单个重达 10 多斤,又称炮弹芋头,因其独特的精耕细作、生态气候和优质肥水条件造就了一流的香芋品质,在国内享有盛誉,尤其在珠三角和港澳市场,2008 年被批准为国家地理标志产品^[4],2012 年被评为广东省十大最具人气土特产。

香芋的可食用部分为地下块茎,主要以淀粉为主,同时还含有少量的蛋白质,其蛋白质主要功能是为植物的生长需求提供营养物质,同时在营养供应过量的情况下,累积大量的营养物质。大部分的植物储存蛋白是没有生物活性的,但研究发现香芋中含有多种活性蛋白如胰蛋白酶抑制剂、凝集素、核糖体失活蛋白^[5],研究人员曾从海芋、香芋中分离出胰蛋白酶抑制剂^[6-7],HX Wang 等^[5]从海芋中分离出抗菌蛋白,Pereira PR 等^[8]从巴西香芋中纯化出凝集素,并指出其具有促进鼠脾细胞增值作用。此外,香芋块茎中还含有大量的多糖^[9]、酚类物质^[10]等营养物质,研究也表明,芋头提取物具有抗肿瘤代谢^[9, 11]功能。对于蛋白的提取,根据目的不同采用不同的方法,赵利等^[12]用盐法、酸法和碱法提取了鲑鱼皮中的胶原蛋白,李萌萌等^[13]用丙酮沉降法、酚提取法、TCA 法、磷酸缓冲液法以及 Tris-HCl 提取法提取马铃薯块茎蛋白质,Tris-HCl 提取法提取到的粗蛋白含量最高,电泳条带多且清晰;沙月霞等^[14]用 Tris-HCl 提取法、柠檬酸盐提取法提取棉叶总蛋白,提取效率高,蛋白齐全。

本研究主要采用蛋白提取常用的几种不同的提取液,对张溪香芋块茎进行提取,对比各提取物的活性,从中找出活性较高的提取物,为香芋蛋白的综合开发利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验试剂与仪器

1.1.1 实验试剂

香芋,广东省韶关市乐昌市;氯化钠、Tris、无水乙醇、氢氧化钠、硫酸铜、硫酸钾、浓硫酸、浓盐酸、考马斯亮蓝、磷酸、过硫酸钾、硫酸亚铁、双氧水、邻菲罗啉、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、冰乙酸、苯酚均为分析纯,购于广州卯林仪器有限公司。

牛血清白蛋白(BSA),GR 级,上海源叶生物科技有限公司;ABTS,上海晶纯生化科技股份有限公司;血红细胞,广州蕊特生物科技有限公司;胰蛋白酶,1:250, Biosmart 分装;BAPNA (Na-苯甲酰-DL-

精氨酸-对硝基酰胺盐酸盐)、胰蛋白酶抑制剂,广州硕恒生物科技有限公司;Marker (兔磷酸化酶 B, 97.4 ku; 牛血清白蛋白, 66.2 ku; 兔肌动蛋白, 43.0 ku; 牛碳酸酐酶, 31.0 ku; 人生长激素, 22.0 ku; 鸡蛋清溶菌酶, 14.4 ku), 北京天恩泽基因科技有限公司。

1.1.2 仪器

JW-1016 型低速离心机:安徽嘉文仪器装备有限公司;FA2204B 型电子天平:上海精密科学仪器有限公司;SHZ-D(III)循环水式真空泵:巩义市予华仪器有限公司;SCIENTZ-18N 低温冷冻干燥机:宁波新芝生物科技有限公司;KDN-102F 自动定氮仪:上海纤检仪器有限公司;752s 型紫外-可见分光光度计:上海棱光技术有限公司;A300 全自动氨基酸分析仪:德国曼默博尔;96 孔“V”型凝集板:海门乐培实验器材经营部;高速冷冻离心机:安徽嘉文仪器装备有限公司;雷磁复合 pH 计:上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 提取方法

将新鲜香芋块茎与水、0.1% NaCl、20 mM Tris、75%乙醇四种提取液以 1:2 (m/V)比例混合打浆,50 °C,180 r/min 振荡提取 30 min。后在 5000 r/min、4 °C 条件下离心 30 min 除去大颗粒,上清液 10000 r/min 4 °C 离心 20 min 除去试样微小颗粒,离心后上清液用 0.45 μm 滤膜抽滤,滤液冻干,置干燥器中保存。

等电点沉淀法:将鲜香芋块茎与 pH 10 0.1 M NaOH 溶液以 1:2 (m/V)比例混合打浆,50 °C,180 r/min 振荡提取 30 min。后在 5000 r/min、4 °C 条件下离心 30 min 除去大颗粒,上清液 10000 r/min 4 °C 离心 20 min 除去试样微小颗粒,离心后上清液用 0.45 μm 滤膜抽滤,滤液用 6 M HCl 调节 pH 至等电点 2.83,4000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀物用蒸馏水冲洗至中性,冷冻干燥后置干燥器中保存。

用碘液检验最后提取液中是否有淀粉颗粒存在。

1.2.2 蛋白测定

粗蛋白的测定参照国标 GB 5009.5-2010,可溶性蛋白的测定采用考马斯亮蓝法^[15]。

1.2.3 氨基酸组成测定

氨基酸组成的分析采用盐酸水解法。称取提纯后的提取物适量,加入 5 mL 盐酸(1+1)混合,充氮气,熔封,置 110 °C 水解 24 h。吸取适量样品 0.5~3 mL,置 60 °C 烘箱中脱酸至干燥,用样品缓冲液溶解,0.22 μm 过滤器过滤后上机分析。色氨酸(Tryptophan)在酸性条件下容易水解,所以没有测定。

1.2.4 SDS-PAGE 电泳

采用经典 Laemmli 法^[16], 浓缩胶 12%, 分离胶 5%, 75 V 电泳 5 min, 100 V 电泳 40 min。将 5 种提取物进行 SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝染色 30 min, 脱色液脱色 4 次, 每次 2 h。脱色完成后, 观察其亚基的条带组成, 以标准蛋白分子量对数值为纵坐标, 迁移率为横坐标, 绘制蛋白分子量标准曲线, 根据样品亚基迁移率计算其分子量。

1.2.5 总糖的测定

采用苯酚-硫酸法测定试样中总糖的含量^[17]。

1.2.6 总酚的测定

提取物中的总酚的提取参考参考文献^[36]。

采用 Folin-Ciocalteu 法测定试样中的总酚含量^[18]。以没食子酸为标准品做标曲, 实验结果以每克样品中含有的没食子酸当量 (GAE) 表示 (mg GAE/g)。

1.2.7 抗氧化能力测定

1.2.7.1 总抗氧化能力的测定

采用 ABTS 自由基清除能力^[19]评价香芋提取物的抗氧化能力

1.2.7.2 羟基自由基清除率的测定

采用 Fenton 法测定香芋提取物的羟基自由基清除能力^[20]

1.2.8 凝血活性测定^[21]

香芋提取物凝集活性的测定按照参考文献^[21]的方法进行

1.2.9 胰蛋白酶抑制剂活性测定^[22~23]

以大豆蛋白酶抑制剂作为对照。用经典 BAPNA 法^[22]测定香芋提取物中的胰蛋白酶抑制活性。

1.3 数据分析

采用 SPSS 17.0 对数据进行显著性分析, 采用 Excel 2007 和 Origin 7.5 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 五种提取物组成比较

2.1.1 蛋白含量

五种提取物总蛋白含量大小为等电点沉淀物>Tris 提取物>水提取物>盐提取物>醇提取物, 可溶性蛋白含量大小为水提取物>Tris 提取物>盐提取物>醇提取物>等电点沉淀物 (表 1)。等电点沉淀物总蛋白含量高, 但可溶性蛋白含量低, 是由于在强酸强碱条件下, 去掉了一些溶于酸性溶液的杂质使得总蛋白含量较高, 同时蛋白质发生部分变性, 导致溶解度降低。其余四种提取物可溶性蛋白占总蛋白比例均在 50% 以上, 其中水

提取物最高为 61.38%。可溶性蛋白与总蛋白差异较大, 可能是冷冻干燥对样品蛋白造成影响, 使蛋白的溶解性降低。

表 1 五种提取物蛋白含量比较

Table 1 Comparison of proteins from the five extracts

	干物质得率/%	总蛋白含量/%	可溶性蛋白/%	可溶性蛋白占总蛋白百分比/%
盐提	2.4	34.17±1.41 ^d	19.76±0.45 ^b	57.83
水提	2.76	36.87±0.40 ^c	22.63±0.21 ^a	61.38
醇提	1.59	16.28±0.04 ^e	8.15±1.41 ^c	50.06
Tris 提	3.36	40.51±0.23 ^b	22.24±0.48 ^a	54.90
等电点沉淀物	1.08	74.33±0.13 ^a	8.60±0.14 ^e	11.57

注: 不同小写字母 (a~e) 表示同一列之间有显著性差异 ($p<0.05$); 差异显著性分析采用 SPSS 中的 Duncan's 法。

2.1.2 多糖含量

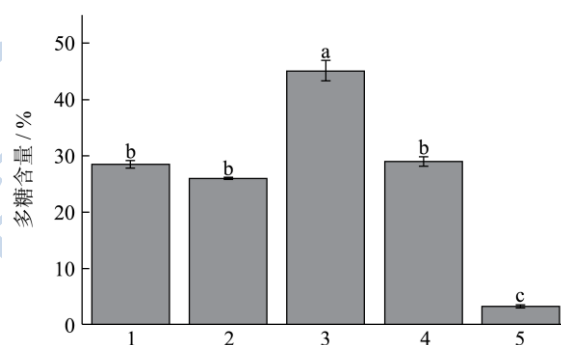


图 1 五种提取物中总糖含量比较

Fig.1 Comparison of total carbohydrates from the five extracts

注: 1: 盐提取物; 2: 水提取物; 3: 醇提取物; 4: Tris 提取物; 5: 等电点沉淀物。不同小写字母 (a~c) 表示同一列之间有显著性差异 ($P<0.05$); 差异显著性分析采用 SPSS 中的 Duncan's 法。

五种提取物中总糖含量差异比较显著 (图 1), 大小比较为醇提取物 (45.11%) > Tris 提取物 (28.91%) > 盐提取物 (28.53%) > 水提取物 (25.81%) > 等电点沉淀物 (3.35%), 前四种提取物总糖含量均较高, 在 30% 左右。其中醇提取物总糖含量达到 45% 左右。多糖是极性大分子化合物, 易溶于水、碱而不溶于乙醇, 且不同多糖在不同浓度的低级醇溶液中具有不同的溶解性质, 低浓度的乙醇溶液可以沉淀分子量较大的多糖, 而小分子量的多糖或寡糖则保留在溶液中^[37]。实验中, 水系提取液的多糖含量均比 75% 乙醇提取液低 50% 左右, 表明香芋中除含有部分极性大的多糖, 还含有大量极性小的多糖, 用 75% 乙醇对香芋进行提取时, 可以提取出香芋中的醇溶性蛋白以及小分子多糖, 大分子多糖以及其他大部分水溶性物质沉淀出来, 使

得提取出的总糖纯度相对其他提取物较高。等电点沉淀物经过碱溶酸沉处理,总糖在碱性条件下发生降解,同时酸沉过程去掉大部分的杂质,使得提取物中总糖含量较低。

2.1.3 总酚含量

研究表明^[24],芋艿切片的近周皮部位和微管束颜色较深,微管束脉管切口处显示为一个个深蓝色的小点,表明这些部位含酚类物质的量较多。这也正是香芋褐变的原因所在,同时,研究证实香芋酚类物质中含有绿原酸和酪氨酸。实验过程中,香芋在空气中长期放置易发生褐变,尤其是其提取液敞口放置几个小时内发生褐变,检测其酚类物质的含量非常有必要。

五种提取物酚类物质含量存在显著性差异(图2),大小比较为 Tris 提取物(4.53 mg GAE/g) > 盐提取物(4.11 mg GAE/g) > 水提取物(3.08 mg GAE/g) > 等电沉淀物(2.85 mg GAE/g) > 醇提取物(1.47 mg GAE/g)。Tris 提取物的得率为 3.36%,经换算香芋块茎中总酚含量为 19.59 mg GAE/100 g 左右,均比土耳其芋头(187±53 mg GAE/100g)^[31]、新加坡芋头(180 mg GAE/100g)^[32]以及日本芋头(46 mg GAE/100 g)^[34]低,与斐济芋头(12~39 mg GAE/100 g)^[33]含量相当,总酚含量的差异可能是由于芋头生长条件、品种、样

品处理方法不同造成的。五种提取物中 Tris 提取物总酚含量最高,醇提取物最低,可能香芋中含有的极性强的水溶性酚类物质含量较高,而弱极性的酚类物质含量较低,并且其中的水溶性酚类物质与蛋白质紧密结合,使得香芋经过酸碱处理后具有与水提取物相当的酚类物质。

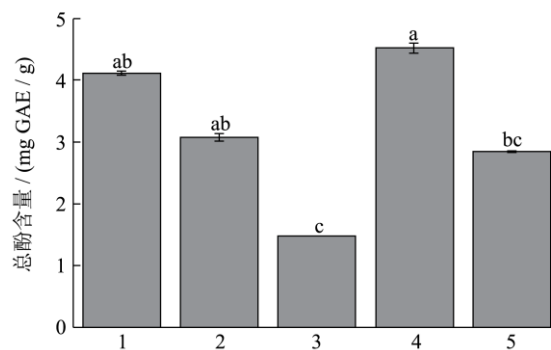


图2 五种提取物酚类物质含量比较

Fig.2 Comparison of phenolic compounds from the five extracts

注: 1: 盐提取物; 2: 水提取物; 3: 醇提取物; 4: Tris 提取物; 5: 等电点沉淀物。注:不同小写字母(a~c)表示同一组之间有显著性差异(P<0.05);差异显著性分析采用 SPSS 中的 Duncan's 法。

2.1.4 氨基酸组成

表2 五种香芋蛋白提取物中蛋白质的氨基酸组成 (mg/g 蛋白质)

Table 2 Amino acid composition of the five protein extracts from taro (mg/g protein)

	碱提取物	盐提取物	水提取物	醇提取物	tris 提取物
必需氨基酸					
异亮氨酸(Ile)	34.78	78.31	70.72	51.31	78.53
蛋氨酸(Met)	12.22	34.67	31.67	30.68	35.98
缬氨酸(Val)	53.30	38.78	38.83	43.24	36.27
苯丙氨酸(Phe)	47.66	8.98	10.96	28.88	8.53
亮氨酸(Leu)	98.29	22.19	19.59	30.50	19.50
苏氨酸(Thr)	55.37	45.66	42.28	17.22	37.17
赖氨酸(Lys)	51.32	28.45	25.85	11.66	26.40
总和	352.94	257.04	239.90	213.49	242.37
非必需氨基酸					
天冬氨酸(Asp)	146.99	140.77	128.65	99.57	122.72
丝氨酸(Ser)	60.32	62.54	60.56	44.49	52.71
谷氨酸(Glu)	129.29	132.41	131.13	163.62	121.08
脯氨酸(Pro)	48.33	83.91	98.86	76.79	118.19
甘氨酸(Gly)	57.17	37.67	34.18	24.40	49.00
丙氨酸(Ala)	45.25	59.37	50.65	138.68	77.19
半胱氨酸(Cys)	3.73	40.10	31.14	21.35	66.17
酪氨酸(Tyr)	47.55	59.49	56.84	68.35	52.67
组氨酸(His)	29.41	21.12	18.87	25.30	20.97

转下页

接上页					
精氨酸(Arg)	79.01	105.57	149.21	123.97	76.94
总和	647.06	742.96	760.10	786.51	757.63
EAA/(NEAA+NEAA)	35.29	25.7	23.99	21.35	24.24
EAA/NEAA	54.5	34.59	31.56	27.14	31.99

$$\text{蛋白质的氨基酸评分} = \frac{\text{每克待评蛋白质中某种必需氨基酸含量(mg)}}{\text{每克标准蛋白质中某种必需氨基酸含量(mg)}} \times 100$$

表 3 五种香芋提取物蛋白质的氨基酸评分

Table 3 Amino acid scores (AAS) (%) of the five protein extracts from taro

	碱提取物	盐提取物	水提取物	醇提取物	Tris 提取物	FAO/WHO/UNU2-5 岁儿童参考模式 (mg/g 蛋白)
Phe+Tyr	151	64	108	154	97	63
Ile	124	280	253	183	280	28
Leu	149	34*	30*	46	30*	66
Lys	88	49	45	20*	46	58
Met+Cys	64*	299	251	208	409	25
Thr	163	134	124	51	109	34
Val	152	111	111	124	104	35
His	155	111	99	133	110	19

注: *表示第一限制性氨基酸。

不同提取物氨基酸组成存在较大差异(表 2、3), 五种提取物均以天冬氨酸和谷氨酸为主, 缺乏赖氨酸, 必需氨基酸所占的比例均偏低, 其中等电点沉淀物必需氨基酸含量较高, 而醇提取物必需氨基酸含量最低为 21.35%, 盐提取物、水提取物、Tris 提取物天冬氨酸和谷氨酸含量较高, 苯丙氨酸含量偏低。等电点沉淀物的第一限制性氨基酸为含硫氨基酸, 其氨基酸评分为 64, 盐提取物、水提取物、Tris 提取物的第一限制性氨基酸为亮氨酸, 其氨基酸评分分别为 34、30、30, 醇提取物的第一限制性氨基酸为赖氨酸, 其氨基酸评分为 20。

2.1.5 SDS-PAGE 电泳图谱

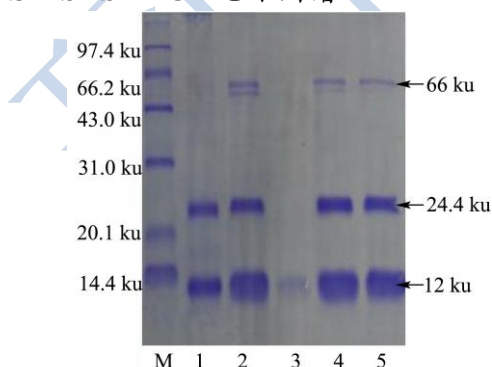


图 3 五种提取物的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE patterns of the five extracts

注: M: 蛋白标准品; 1: 等电点沉淀物; 2: tris提取物; 3: 醇提取物; 4: 水提取物; 5: 盐提取物。

五种提取物中蛋白质经 SDS-PAGE 电泳后的结果如图 3 所示, 香芋蛋白由多个不同分子量的亚基组成, 五种提取物中, Tris 提取物可以看到 4 条清晰的蛋白条带, 分子量为 12 ku、24.4 ku、63 ku、66 ku 左右, 水提取物和盐提取物, 均能看到 3 条主要的蛋白条带, 分子量为 12 ku、24.4 ku、66 ku 左右, 等电点沉淀物看到 2 条主要的蛋白条带, 分子量为 12 ku、24.4 ku 左右, 而醇提取物只有分子量为 12 ku 左右的主条带, 条带损失较为严重。主要是由于 Tris 对蛋白的溶解能力强, 它可以使大部分蛋白从样品中溶出, 而等电点沉淀法经盐酸沉淀后, 去掉了一些杂蛋白, 使得蛋白亚基数目减少。醇提取物中的蛋白为醇溶蛋白, SDS-PAGE 显示, 其只有一个亚基, 已达到电泳纯, 可以直接用于后期研究。

2.2 抗氧化能力

2.2.1 ABTS 清除能力

ABTS 清除能力反映了样品的总抗氧化能力, 总抗氧化能力测定能显示出机体的抗氧化状态。五种提取物均具有一定的 ABTS 清除能力(图 3), 且存在剂量效应关系, ABTS 清除率均随提取物浓度增大而增大, 各提取物 ABTS 清除能力 (IC₅₀) 的大小比较为: 醇提取物 (3.31 mg/mL) > Tris 提取物 (3.78 mg/mL)、盐提取物 (3.78 mg/mL) > 水提取物 (4 mg/mL) > 等电点沉淀物 (4.56 mg/mL)。各提取物 ABTS 清除能力与

其中的总糖含量存在正相关性。

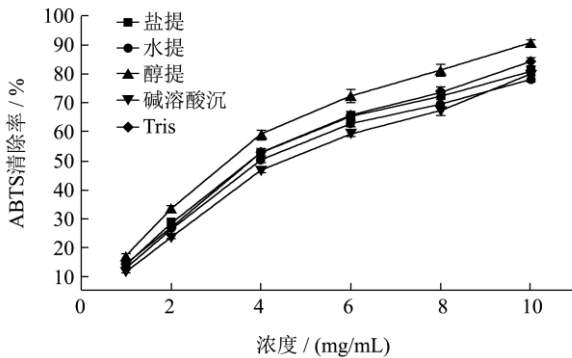


图4 五种提取物的 ABTS 清除能力比较

Fig.4 Comparison of ABTS-scavenging capacities of the five extracts

2.2.2 羟基自由基清除能力

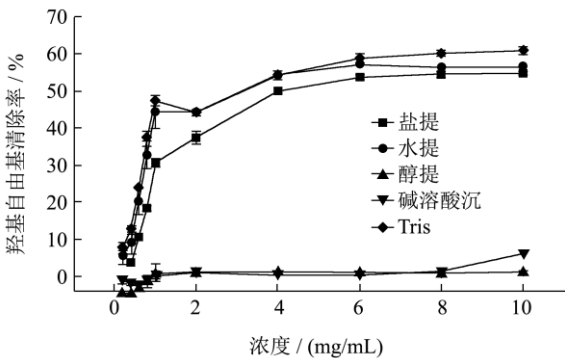


图5 五种提取物的羟基自由基清除能力比较

Fig.5 Comparison of hydroxyl radical scavenging capacities of the five extracts

羟基自由基是一种氧化能力很强的自由基，其氧化速率高，反应速度快，是造成生物组织脂质过氧化，蛋白质和多糖分解的重要活性氧^[25]，同时它可诱发链式反应，导致多种自由基损伤^[26]。各提取物均呈先增大后趋于平缓的趋势（图5），在0~1 mg/mL的浓度范围内，增大的速率较后期快，其中等电沉淀物和醇提取物的羟基自由基清除能力较弱基本趋于0，盐提取物、水提取物和 Tris 提取物的羟基自由基清除能力较强，在6 mg/mL时趋于平缓，达到50%~60%之间。

2.3 凝血活性

凝集素是一类非免疫球蛋白本质的蛋白或糖蛋白，在自然界中分布广泛，最丰富的来源是植物的种子，普遍存在于植物的储藏器官中^[21]。研究表明，凝集素具有细胞凝集作用，且对不同来源的血细胞具有不同的凝集效果；植物凝集素通过细胞毒性作用可以抵御病虫害；通过免疫调节功能调节细胞的增殖、粘附和凋亡；抗真菌作用，使真菌的生长受到抑制；抑制 HIV-1 逆转录酶活性等。前人研究表明^[27]，香芋中

含有甘露糖结合凝集素，且具有防御和储藏功能。本研究采用羊血和兔血对香芋提取物的凝集活性进行评价，结果表明，香芋提取物对羊血不具有凝集活性（数据未给出），但对兔血具有凝集活性，这与 Patricia Ribeiro Pereira 等^[28]的研究一致。提取物特异性凝集活力大小为盐提取物>Tris 提取物>等电点沉淀物>水提取物>醇提取物。

表2 五种提取物凝血活性比较

Table 2 Comparison of coagulation activities of the five extracts

样品	凝集效价	凝集活力 HU	特异性活力 $\times 10^3$ HU/mg
盐提取物	1:32	0.64	3.24 \pm 0.05 ^a
水提取物	1:16	0.32	1.42 \pm 0.01 ^d
醇提取物	1:4	0.08	1.00 \pm 0.13 ^e
Tris 提取物	1:32	0.64	2.88 \pm 0.05 ^b
等电点沉淀物	1:8	0.16	1.86 \pm 0.02 ^c

注：不同小写字母（a~e）表示同一列之间有显著性差异（ $P < 0.05$ ）；差异显著性分析采用 SPSS 中的 Duncan's 法。

2.4 胰蛋白酶抑制活性

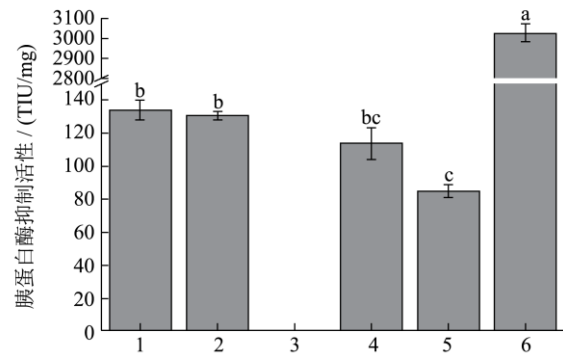


图6 五种提取物的胰蛋白酶抑制活性比较

Fig.6 Comparison of trypsin inhibitory activities of the five extracts

注：1: 盐提取物；2: 水提取物；3: 乙醇提取物；4: Tris 提取物；5 等电点沉淀物；6: 大豆胰蛋白酶抑制剂。不同小写字母（a~c）表示同一列之间有显著性差异（ $P < 0.05$ ）；差异显著性分析采用 SPSS 中的 Duncan's 法。

胰蛋白酶抑制剂(Trypsin inhibitor, TI)普遍存在于自然界的动物、植物和微生物中，目前，研究较多的胰蛋白酶抑制剂主要来源于人类主要的粮食，如豆科、乔本科^[29]，在天南星科植物中也有所发现，如半夏、海芋^[29]。胰蛋白酶抑制也具有抗微生物、抗虫害、调节生物的生长发育，甚至细胞的凋亡。也有研究表明胰蛋白酶抑制剂具有抗病毒和抗癌作用。以大豆胰蛋白酶抑制剂为对照，对香芋的五种提取物的胰蛋白酶

抑制活性进行测定(图6),结果表明,香芋的提取物中除乙醇提取物之外,均具有胰蛋白酶抑制活性,且五种提取物中胰蛋白酶抑制活性大小比较为盐提物(134 TIU/mg)>水提物(130 TIU/mg)>Tris 提取物(113 TIU/mg)>等电点沉淀物(85 TIU/mg)>醇提物(0 TIU/mg)。由图可知,醇提物没有检测到胰蛋白酶抑制活性,可能主要是由于香芋胰蛋白酶抑制剂为水溶性蛋白,不溶于醇溶液中。其中,等电点沉淀物是经过酸碱处理后的蛋白质,仍具有较高胰蛋白酶抑制活性,表明香芋胰蛋白酶抑制剂具有较高的耐酸耐碱能力。

3 结论

3.1 水提物、盐提物、Tris 提取物中可溶性蛋白含量均较高为50%以上,同时还伴有多糖、酚类物质的存在。五种提取物氨基酸以天冬氨酸和谷氨酸为主,必需氨基酸所占的比例均偏低。盐提物、水提物、Tris 提取物的第一限制性氨基酸为亮氨酸,等电点沉淀物的第一限制性氨基酸为含硫氨基酸,醇提物的第一限制性氨基酸为赖氨酸,可能是由于不同氨基酸在不同提取液中溶解度差异造成的。

3.2 SDS-PAGE 分析表明,香芋蛋白由多个不同分子量的亚基组成,Tris 由于其对蛋白的溶解性强,能将大部分的蛋白提取出来,电泳图谱显示的蛋白条带数最多;其次是水提物和盐提物;等电点沉淀物是经过酸碱处理后的,高分子量的聚合物条带消失,只有低分子量的两条带;而醇提物只有分子量为12 ku左右的清晰条带,表明香芋蛋白中的醇溶蛋白主要是由小分子量的亚基组成,且已达到电泳纯,可直接用于后期的其他功能和结构研究。

3.3 对五种提取物的抗氧化能力进行比较,各提取物均具有一定的ABTS清除能力,且具有剂量效应关系,并且各提取物的ABTS清除能力与提取物中的总糖含量存在正相关性;盐提物、水提取物和Tris 提取物具有一定的羟基自由基清除能力,等电点沉淀物和醇提物没有或者较弱的羟基自由基清除能力。与其蛋白含量进行比较发现,其抗氧化能力大小与其蛋白含量不存在相关性,可能是提取物中其他成分相互作用的结果。以上研究表明,提取物中除含有蛋白质外,还含有大量的多糖,以及酚类物质。ABTS清除能力与羟基自由基清除能力间也不存在相关性,提取物的ABTS清除能力在一定浓度下能达到80%以上,而五种提取物的羟基自由基的清除能力达到60%左右就不再增长,可能是由于提取物对不同的抗氧化体系的抗氧化能力不同造成的。

3.4 香芋提取物对羊血没有凝集活性,但对兔血具有较强的凝集活性;香芋的盐提物、Tris 提取物、水提物均含有较高的胰蛋白酶抑制剂,乙醇提取物不含胰蛋白酶抑制剂,表明香芋胰蛋白酶抑制剂不溶于75%乙醇溶液而溶于水体系中,且具有较强的耐酸耐碱能力。

3.5 上述研究表明,用不同溶剂对香芋蛋白进行提取,提取物在组成和活性方面存在较大差异。醇提物的ABTS清除能力较高,DPPH清除能力较高(2 mg/mL时的清除率达到100%),其余活性均较低;等电点沉淀物具有一定的凝血活性和ABTS清除能力,胰蛋白酶抑制活性和羟基自由基清除能力较弱;水提物具有一定的胰蛋白酶抑制活性和凝血活性,抗氧化能力较弱;香芋盐提物、Tris 提取物均具有一定的抗氧化能力、凝血活性、胰蛋白酶抑制活性;Tris 提取物的酚类物质、多糖较多,SDS-PAGE电泳图谱含亚基条带数最多。所以,五种提取剂中,采用Tris 提取香芋中的活性成分可以起到最好的效果。对于蛋白质的分离纯化实验中,要得到纯度较高,且活性较高的蛋白采用盐提法较优。许多研究表明^[22,30],胰蛋白酶抑制剂具有抗癌、抗肿瘤的功能,香芋蛋白中含有胰蛋白酶抑制剂,后续研究将对包括胰蛋白酶抑制剂在内的香芋蛋白进行分离纯化与活性评价研究。

参考文献

- [1] 程元珍.红芽芋品质分析及其芋泥的加工研究[D].合肥:合肥工业大学,2012
CHEN Yuan-zhen. Analysis of the red bud taro and study on processing of taro puree [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2012
- [2] 联合国粮农组织统计年鉴(1997)[M].北京:中国农业科技出版社,1999
Statistical yearbook of The UN FAO (1997) [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999
- [3] 沈镡.云南部分芋资源的遗传多样性分析[D].北京:中国农业科学院,2000
SHEN Di. Genetic diversity analysis of partial taro resources in Yunnan [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2000
- [4] 郭耀主编.广东经济年鉴[R].广州:广东旅游出版社,2008
GUO Yao edite. Economic yearbook for Guangdong [R]. Guangzhou: Guangdong Travel & Tourism Press, 2008
- [5] HX Wang, TB Ng. Alocasin, an anti-fungal protein from rhizomes of the giant taro alocasia macrorrhiza [J]. Protein Expression and Purification, 2003, 28: 9-14

- [6] BC Hammer, DC Shaw, JH Bradbury. Trypsin inhibitors from colocasia esculenta, aloccasia macrorrhiza and cytosperma chamissonis [J]. Phytochemistry, 1989, 28: 3019-3026
- [7] JH Bradbury, BC Hammer. Comparative study of proteinase inhibitors in tropical root crops and survey of allelochemicals in the edible aroid [J]. Agric. Food Chem., 1990, 38: 1448-1453
- [8] Pereira PR, Del Aguila EM, Vericimo MA., Purification and characterization of the lectin from taro (*Colocasia esculenta*) and its effect on mouse splenocyte proliferation *in vitro* and *in vivo* [J]. Protein J, 2014, 33: 92-99
- [9] Hye-Ryung Park, Hyun-Sun Lee, Sun Young Cho, et al. Anti-metastatic effect of polysaccharide isolated from colocasia esculenta is exerted through immunostimulation [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2013, 31: 361-368
- [10] 王佳宏,郁志芳,杜传来.芋艿褐变底物及多酚氧化酶特性研究[J].食品工业科技,2008,29(2):141-145
WANG Jia-hong, YU Zhi-fang, DU Chuan-lai. Browning substrates and characterization of polyphenol oxidase from taro [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(2): 141-145
- [11] Kundua B, Patricia Campbellc, Brian Hamptond, et al. Antimetastatic activity isolated from colocasia esculenta (Taro) [J]. Anticancer Drugs, 2012, 23(2): 200-211
- [12] 赵利,温慧芳,袁美兰,等.基于不同提取方式的鱼皮胶原蛋白对重组鱼肉的影响[J].现代食品科技,2015,3:220-227
ZHAO Li, WEN Hui-fang, YUAN Mei-lan, et al. Different kinds of fish skin collagen on the influence of the restructured fish products [J]. Modern Food Science and Technology, 2015,3:220-227
- [13] 李萌萌,蒋继志,王会仙.几种提取马铃薯块茎蛋白质方法的比较研究[J].安徽农学通报,2009,15(23):37-38
LI Meng-meng, JIANG Ji-zhi, WANG Hui-xian. Comparison of protein extraction methods from potato tuber [J]. Anhui Agri. Sci. Bull., 2009, 15(23): 37-38
- [14] 沙月霞,简桂良,肖崇刚.棉叶总蛋白提取及 SDS-PAGE 电泳的改良[J].棉花学报,2005,17(3):146-150
SHA Yue-xia, JIAN Gui-liang, XIAO Chong-gang. An improved method for extraction and SDS-PAGE of total protein in cotton leaves [J]. Cotton Science, 2005, 17(3): 146-150
- [15] 邓丽莉,潘晓倩,生吉萍,等.考马斯亮蓝法测定苹果组织微量可溶性蛋白含量的条件优化[J].食品科学, 2012, 24: 185-189
DENG Li-li, PAN Xiao-qian, SHENG Ji-ping, et al. Optimization of experimental conditions for the determination of water soluble protein in apple pulp using coomassie brilliant blue method [J]. Food Science, 2012, 24: 185-189
- [16] J E 科林根等著.精编蛋白质科学实验指南[M].李慎涛等,译.北京:科学出版社,2007
Coligan J E, et al. Short Protocols in Protein Science [M]. Translate by LI Shen-tao,et al. Beijing: Science Press, 2007
- [17] 余稳稳,吴晖,赖富饶,等.响应面法优化去皮绿豆多糖提取工艺技术的研究[J].食品工业科技,2014,17:236-240
YU Wen-wen, WU-Hui, LAI Fu-rao, et al. Study of extracting water-soluble polysaccharide from dehulled mung bean by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 17: 236-240
- [18] 李青,张名位,张瑞芳.5 种籼稻品种谷壳中游离态和结合态酚类物质含量及其抗氧化活性比较[J].中国农业科学,2012,45(6):1150-1158
LI Qing, ZHANG Ming-wei, ZHANG Rui-fang. Free and bound phenolic contents and antioxidant activity of five varieties of indica rice husk [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(6): 1150-1158
- [19] 陶浚,乔李娜,童晶晶,等.蚂蚁黑色素的提取、纯化及抗氧化活性研究[J].天然产物研究与开发,2012,24:873-876,915
TAO Jun, QIAO Li-na, TONG Jing-jing, et al. Extraction, purification and antioxidant activity of melanin from the black ants [J]. Nat Prod Res Dev, 2012, 24: 873-876, 915
- [20] 陈彩薇,吴晖,赖富饶,等.米糠中不同存在形态酚类物质的抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2015,31(2):42-46
CHEN Cai-wei, WU Hui, LAI Fu-rao,et al. Study on different form phenolics' antioxidant activity [J]. Modern Food Science and Technology,2015,31(2):42-46
- [21] 王超.豆类凝集素的提取分离及纯化[D].哈尔滨,哈尔滨工业大学,2013
WANG Chao. Extraction, isolation and purification of lectin from leguminosae beans [D]. Harbin, Harbin Institute of Technology, 2013
- [22] 邓乐.甘薯蛋白 sporamin 抗肿瘤效果研究[D].北京,中国农业科学院,2009
DENG Le. The study of anticancer effect of sporamin [D]. Beijing, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009
- [23] NY/T 1103.2-2006,转基因植物及其产品食用安全检测抗营营养素第 2 部分:胰蛋白酶抑制剂的测定[S]
NY/T 1103-2006, Safety assessment of genetically modified

- plant and derived products part2: assay of anti-nutrients pancreatic trypsin inhibitor [S]
- [24] 王佳宏.鲜切芋苏冷藏期间品质、生理及酶促褐变机理研究[D].南京:南京农业大学,2005
WANG Jia-hong. Studing on physiology, quality and browning mechanism of fresh-cut *colocasia esculenta* (L.) *schott* during refrigeration storage [D]. Nanjing: Nanjing Agriculture University, 2005
- [25] 王炳娟,卢青,邹洪.气相色谱法测定 Fenton 反应产生的羟基自由基及其清除作用[J].理化检验(化学分册), 2009, 45(1): 88-90
WANG Bing-juan, LU Qing, ZHOU Hong. GC determination of OH free radical and its scavenging action [J]. PTCA part B: CHEM ANAL, 2009, 45(1): 88-90
- [26] 金鸣,蔡亚欣,李金荣.邻二氮菲- Fe^{2+} Fe^{2+} 氧化法比色测定羟自由基[J].心肺血管病杂志,1996,15(1): 62
- [27] Peter R. Shewry. Tuber storage proteins [J]. Annals of botany, 2003, 91: 755-769
- [28] Patr'cia Ribeiro Pereira ,Eduardo Mere Del Aguila, Maur'cio Afonso Ver'cimo, et al. Purification and characterization of the lectin from taro (*colocasia esculenta*) and its effect on mouse splenocyte proliferation in vitro and in vivo [J]. Protein J , 2014, 33: 92-99
- [29] 王荣春,孙建华,何述栋,等.胰蛋白酶抑制剂的结构与功能研究进展[J].食品科学,2013,34(9):364-368
WANG Rong-chun, SUN Jian-hua, HE Shu-dong, et al. Recent advance in research on the structure and function of trypsin inhibitor [J]. Food Science, 2013, 34(9): 364-368
- [30] 周炜.半夏蛋白纯化、表达及其活性研究[D].浙江:浙江理工大学,2014
ZHOU Wei. Purification, expression and bioactivity analysis of the proteins from *pinellia ternata* [D]. Zhejiang: Zhejiang Sci-Tech University, 2014
- [31] Sebnem Simsek, Sedef Nehir E. *In vitro* starch digestibility, estimated glycemc index and antioxidant potential of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) corm [J]. Food Chemistry, 2015, 168: 257-261
- [32] Isabella M, Lee B L, Lim M T, et al. Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore [J]. Food Chemistry, 2009, 120: 993-1003
- [33] Lako J, Trenerry, V C, Wahlqvist M, et al. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods [J]. Food Chemistry,2007, 101: 1727-1741
- [34] Takebayashi J, Oki T, Watanabec J, et al. Hydrophilic antioxidant capacities of vegetables and fruits commonly consumed in Japan and estimated average daily intake of hydrophilic antioxidants from these foods [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2013, 29: 25-31
- [35] Hye-Ryung Park, Hyun-Sun Lee, Sun Young Cho, Yoon-Sook Kim, Kwang-Soon Shin. Anti-metastatic effect of polysaccharide isolated from *Colocasia esculenta* is exerted through immunostimulation [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2013,31: 361-368
- [36] 王全逸.马铃薯多酚类化合物对结肠癌和肝癌细胞增值的影响及花色苷生物合成关键酶基因的研究[D].南京农业大学,2010
WANG Quan-yi. Effect of potato polyphenols on the proliferation of colon and liver cancer cells and study on anthocyanin biosynthesis genes [D]. Nanjing Agricultural University, 2010
- [37] 任涛.桑黄多糖研究[D].吉林大学,2009
REN Tao. Study on polysaccharides of *phellinus linteus* [D]. Jilin University, 2009