

马二兰, 林莹, 涂连, 等. 芋头球蛋白的提取纯化及其对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(14): 25–32. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020100266

MA Erlan, LIN Ying, TU Lian, et al. Extraction, Purification of Taro Globulin and Its Inhibitory Activity on α -Amylase and α -Glucosidase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(14): 25–32. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020100266

· 研究与探讨 ·

芋头球蛋白的提取纯化及其对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究

马二兰, 林莹*, 涂连, 张帆, 王伟良
(广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004)

摘要:目的: 探究芋头球蛋白体外调节血糖活性。方法: 以磷酸缓冲液提取芋头球蛋白, 以蛋白质提取率为指标考察了料液比、温度、时间和次数对蛋白质提取的影响, 在此基础上采用响应面优化提取工艺。采用 DEAE-52 离子纤维素柱层析法纯化粗蛋白, 通过高效液相色谱法检测纯化所得球蛋白的纯度, 并测定其等电点和分子量。研究了芋头球蛋白对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性及抑制动力学, 以阿卡波糖为阳性对照, 评价其体外调节血糖活性。结果: 最佳提取条件为: 料液比 1:16 g/mL、温度 41 $^{\circ}\text{C}$ 、时间 124 min, 此时提取率为 36.75% $\pm$ 0.31%, 得率 0.70% $\pm$ 0.04%, 纯度 85.72% $\pm$ 0.47%。纯化后的球蛋白经高效液相色谱检测得一主峰, 纯度为 93.27%, 得率为 0.20% $\pm$ 0.01%, 等电点 pI=5.6, 分子量为 22 kDa 左右。芋头球蛋白对两种酶的抑制活性与蛋白浓度存在量效关系, 对 α -淀粉酶的 IC_{50} 为 0.75 $\pm$ 0.10 mg/mL, 对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 为 (2.09 $\pm$ 0.19) mg/mL, 而阿卡波糖对 α -淀粉酶的 IC_{50} 为 (0.61 $\pm$ 0.13) mg/mL, 对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 为 (0.69 $\pm$ 0.16) mg/mL, 说明芋头球蛋白对 α -淀粉酶略低于阿卡波糖, 而对 α -葡萄糖苷酶抑制活性远低于阿卡波糖, 二者的抑制类型均为可逆性的非竞争性抑制, 对 α -淀粉酶抑制的 K_i =(0.61 $\pm$ 0.05) mg/mL, 对 α -葡萄糖苷酶抑制的 K_i =(0.26 $\pm$ 0.02) mmol/L。结论: 本研究优化了芋头球蛋白的提取工艺, 纯化得到芋头球蛋白, 研究发现其有一定的体外调节血糖的活性, 对功能食品的研发和芋头产品提高附加值具有一定的指导意义。

关键词: 芋头, 球蛋白, 提取, 纯化, 血糖调节

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)14-0025-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020100266

Extraction, Purification of Taro Globulin and Its Inhibitory Activity on α -Amylase and α -Glucosidase

MA Erlan, LIN Ying*, TU Lian, ZHANG Fan, WANG Weiliang

(College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: Objective: Exploring taro globulin regulating activity *in vitro*. Methods: Taro globulin was extracted by phosphate buffer. The effects of solid-liquid ratio, temperature, time and times on protein extraction were investigated with protein extraction rate as an index. Based on the test, response surface methodology was used to optimize the extraction process. The crude protein was purified by DEAE-52 ion cellulose column chromatography. The purity of purified globulin was detected by high performance liquid chromatography, and its isoelectric point and molecular weight were determined. The inhibitory activity and inhibition kinetics of taro globulin on α -amylase and α -glucosidase were studied, and acarbose was used as positive control to evaluate globulin activity of regulating blood glucose *in vitro*. Results: The optimum extraction conditions were as follows: The solid-to-liquid ratio was 1:16 g/mL, the temperature was 41 $^{\circ}\text{C}$, and the time was 124 min. Under these condition, the extraction rate was 36.75% $\pm$ 0.31%, the yield was 0.70% $\pm$ 0.04%, and the purity of

收稿日期: 2020-11-03

基金项目: 广西重点研发计划(桂科 AB1850012)。

作者简介: 马二兰(1994-),女,硕士研究生,研究方向: 粮食与油脂加工, E-mail: 1875479910@qq.com。

* 通信作者: 林莹(1971-),女,博士,教授,研究方向: 粮食与油脂加工, E-mail: ly9a9@126.com。

the protein was $85.72\% \pm 0.47\%$. The purified globulin was detected by high performance liquid chromatography with a main peak with purity of 93.27% , yield of $0.20\% \pm 0.01\%$, isoelectric point of 5.6 and molecular weight of about 22 kDa. The taro globulin exhibited inhibition on the two enzymes with dose-effect relationship. The IC_{50} was (0.75 ± 0.10) mg/mL for α -amylase and was (2.09 ± 0.19) mg/mL for α -glucosidase. The IC_{50} of acarbose were (0.61 ± 0.13) mg/mL and (0.69 ± 0.16) mg/mL. The results showed that the inhibitory activity of taro globulin on α -amylase was slightly lower than acarbose, while the inhibitory activity on α -glucosidase was much lower than acarbose. The inhibition type was reversible and uncompetitive inhibitor, with $K_i = (0.61 \pm 0.05)$ mg/ml for α -amylase and $K_i = (0.26 \pm 0.02)$ mmol/L/L for α -glucosidase. Conclusion: The extraction process of taro globulin was optimized, and taro globulin was purified. It was found that taro globulin has certain activity of regulating blood sugar *in vitro*, which would have certain guiding significance for the research and development of functional food and the increasing of added value of taro products.

Key words: taro; globulin; extraction; purification; glucose regulating activity

芋头 (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) 又称芋魁, 俗名芋艿, 天南星科芋属多年生草本传统药食两用植物^[1], 世界各地均有种植, 其中广西荔浦芋较为出名, 荔浦芋又名槟榔芋, 个头大、产量高、营养物质丰富。芋头球蛋白分为 G1 和 G2 两种, 各占可溶性蛋白的 40% 左右, 一种凝集素 Tarin, 具有独特的碳水化合物结合特性, 芋头的很多活性与其相关, 另一种为蛋白酶抑制剂的 Kunitz 家族, 氨基酸测序证实其与胰蛋白酶抑制有关^[2]。比如研究者发现中国台湾的槟榔芋蛋白经胃蛋白酶酶解后具有抗氧化活性和血管紧张素转换酶抑制作用^[3], 芋头蛋白具有抗氧化^[4]、调节免疫^[3]、抗肿瘤和抗菌生长的能力^[5]等活性。芋头蛋白提取工艺研究较少, 芋头中活性蛋白一般采用含盐缓冲液提取, 将芋头 40 °C 以下烘干打粉^[3] 或将新鲜芋头打浆^[6], 4 °C 提取, 硫酸铵盐析即可分离出蛋白质, 童晶晶等^[7] 比较了几种提取溶剂, 发现盐提蛋白胰蛋白酶抑制活性最高, 黄友如等^[8] 采用分级提取 Osborne 分级法芋艿蛋白, 其中清蛋白的提取率为 43.38%。本文采用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(含 0.3 mol/L NaCl, pH=6.8)的方法提取芋头球蛋白, 芋头球蛋白占可溶性蛋白的 80% 左右, 且文献 [2] 中报道的酶抑制活性与球蛋白有关, 因此可初步认为本研究提取纯化所得活性蛋白即为球蛋白。

α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶能催化水解淀粉和低聚糖, 引起餐后血糖升高^[9-10]。Kumari 等^[11] 提取纯化芋头蛋白, 发现其能非竞争性抑制 α -淀粉酶, 70 °C 仍然保留较高活性, 最适 pH6.9, 有研究表明块茎植物中抑制 α -淀粉酶抑制活性蛋白也能抑制 α -葡萄糖苷酶^[12], 分子量一般为 11~25 kDa 之间^[13], 与芋头中球蛋白的分子量相近, 因此猜测芋头球蛋白也有抑制活性, Sharma 等^[14] 从芋头中提取纯化得到两种 α -淀粉酶抑制活性蛋白, 能抵抗蛋白酶的酶解, 与 Mcewan 等^[13] 发现芋头蛋白一样对 α -淀粉酶抑制作用为选择性抑制。

芋头功能和营养特性已经研究了半个世纪, 芋头蛋白具有一定的生物活性^[1], 国内对蛋白类 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制剂提取工艺研究较少, 而国外研究了芋头蛋白对 α -淀粉酶抑制活性却对提取工艺没有对比与优化。因此, 本文采用磷酸缓冲液提取

芋头球蛋白, 优化提取工艺, 经 DEAE-52 离子纤维素柱层析纯化得到高活性组分, 高效液相检测纯度, SDS-PAGE 电泳测分子量, 测等电点, 研究其对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性以评价其体外血糖调节活性, 并通过酶抑制动力学初步研究作用机理, 为进一步分析活性蛋白的结构和理化性质、研究其体内调节血糖活性奠定基础, 有望指导功能食品的研发, 提高芋头产品附加值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜广西荔浦芋头 于秋末采摘自南宁百货超市; 猪胰腺 α -淀粉酶(9 U/mg)、阿卡波糖(500 mg) A9281 北京索莱宝科技有限公司; 酵母 α -葡萄糖苷酶(50 U/mg) 南京都莱生物技术有限公司; 可溶性淀粉 广州光华科技股份有限公司; 对硝基苯- α -D-葡萄糖苷 上海麦克林生化科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯; 实验用水 均为二级水。

Infinite M200 pro 酶标仪 奥地利 TECAN 公司; KND 系列凯氏定氮仪和消化炉 浙江托普云农科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 芋头蛋白的提取

1.2.1.1 芋头蛋白的提取工艺 提取工艺^[15]: 挑选完好、新鲜的芋头洗净去皮, 切成 1 cm³ 小块, 按料液比 1:15 mg/mL(干基)加入含 0.3 mol/L 氯化钠的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, 于榨汁机中匀浆 5 min, 35 °C 恒温水浴提取 2 h, 4 °C 下 5000 r/min 离心 15 min, 上清液置于冰浴中, 缓慢加入硫酸铵至 80% 饱和度, 边加边轻轻搅拌, 避免局部高浓度硫酸铵引起蛋白变性, 离心得蛋白沉淀, 溶于 10 倍体积的磷酸缓冲液, 轻轻摇匀使溶解充分, 所得蛋白液转入截留分子量 3500 kDa 的透析袋中, 置于装有蒸馏水的大烧杯在 4 °C 冰箱透析 36 h, 每 6 h 换一次水, 冻干得粗蛋白粉。芋头总蛋白含量和粗蛋白中的总蛋白含量测定参照 GB 5009.5-2016 中凯氏定氮法, 提取蛋白含量采取考马斯亮蓝法^[16], 以牛血清白蛋白为标准品制作标准曲线, 蛋白质标曲为 $y = 0.2019x + 0.0037$ ($R^2 = 0.9995$, 其中 x 为吸光度, y 为蛋白浓度)。蛋白质提

取率、得率和纯度计算公式如下^[17]:

$$\text{蛋白质提取率(\%)} = \frac{\text{提取蛋白含量}}{\text{芋头总蛋白含量}} \times 100$$

$$\text{蛋白质得率(\%)} = \frac{\text{提取蛋白含量}}{\text{芋头质量}} \times 100$$

$$\text{蛋白质纯度(\%)} = \frac{\text{蛋白含量}}{\text{粗蛋白总质量}} \times 100$$

1.2.1.2 芋头蛋白提取工艺单因素实验 设定基本条件为料液比 1:15 g/mL, 温度 35 °C, 提取时间 2 h, 次数 2 次, 改变其中一个条件, 分别考察各因素对蛋白提取率的影响^[18]: 料液比取 1:5、1:7.5、1:10、1:12.5、1:15、1:17.5、1:20 (g/mL), 温度取 25、30、35、40、50、60、70 °C, 提取时间取 30、60、90、120、150、180 min, 次数取 1、2、3、4 次。

1.2.1.3 响应面优化芋头蛋白提取工艺 选取料液比、提取温度和提取时间为因素, 以蛋白质提取率为响应值, 设计 Box-Behnken 试验^[19], 每组重复 3 次, 因素及水平如表 1。

表 1 响应面试验因素和水平

Table 1 Independent variables and their coded levels used in response surface methodology

因素	编码水平(Xi)		
	-1	0	1
A 料液比(g/mL)	10	15	20
B 提取温度(°C)	30	40	50
C 提取时间(min)	90	120	150

1.2.2 芋头蛋白的纯化 采用 DEAE-52 纤维素离子交换层析柱^[20]对芋头蛋白进行初步纯化。填料按照说明书中方法处理好, 装入层析柱(2.6 cm×50 cm)自然沉降, 关柱调节流速至 0.3 mL/min 平衡 12 h, 上样 5.0 mL 浓度 40 mg/mL 的芋头蛋白质溶液, 待蛋白质溶液与填料上端平齐后, 关柱, 静置吸附 1 h, 以含氯化钠浓度 0、0.1、0.2、0.3、0.4 mol/L 的磷酸缓冲液洗脱, 流速 0.2 mL/min, 15 min/管, 40 管/组。分部收集器收集洗脱液, 测 OD₂₈₀ 制作洗脱曲线, 合并洗脱液, 透析, 冷冻干燥得纯化后的芋头球蛋白。

采用高效凝胶排阻色谱(GPC)^[21]测蛋白质纯度, 色谱条件: 色谱柱 SB-804HQ; 流动相 5% 甲醇; 检测波长 280 nm; 柱温度 25 °C; 流速 0.5 mL/min。

1.2.3 芋头球蛋白等电点和 SDS-PAGE 电泳分析

1.2.3.1 芋头蛋白等电点的测定 参考文献^[22]将芋头球蛋白配成 1.0 mg/mL 溶液, 用不同浓度醋酸溶液配成不同 pH 的溶液 5.0 mL 于 15 mL 离心管中, 加入 1.0 mL 蛋白溶液, 4 °C 静置 1 h 后 5000 r/min 离心 15 min, 测上清液蛋白质浓度, 浓度最低说明沉淀量最大, 即为等电点。

1.2.3.2 芋头蛋白 SDS-PAGE 电泳分析 配制 1.0 mg/mL 蛋白质溶液, 加入 4 倍非还原上样缓冲液, 混

匀后 1000 r/min 离心 5 min, 参考文献^[23]采用 SDS-PAGE 电泳法, 配制 5% 浓缩胶、12% 分离胶, 蛋白上样量 10 μ L, 80 V 电泳至浓缩胶与分离胶的分界线处, 改为 120 V 继续电泳至分离胶底部, 考马斯亮蓝染色 30 min, 快速脱色液脱色, 凝胶成像系统拍照、分析电泳条带。

1.2.4 芋头球蛋白对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学研究

1.2.4.1 芋头球蛋白对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定 确定最佳反应时间和 α -淀粉酶浓度, 使酶反应的速率在 0.03~0.25 $\Delta A/\text{min}$ 之间^[24]。 α -淀粉酶抑制活性采用 3,5-二硝基水杨酸比色法^[25], 将 0.25 mL 的 α -淀粉酶移入 25 mL 具塞试管, 加入 0.25 mL 酶液, 0.25 mL 的蛋白质溶液, 阳性对照以同体积 1.0 mg/mL 阿卡波糖代替, 37 °C 预热 10 min, 加入 10 mg/mL 的可溶性淀粉 3.25 mL, 水浴振荡反应 10 min 后立即加入 1.5 mL DNS 终止反应, 沸水浴 5 min, 流水冷却, 蒸馏水定容至 25 mL, 空白组及对照组以同体积 PBS 代替, 酶标仪测 540 nm 处吸光度。 α -葡萄糖苷酶抑制活性采用 4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)比色法^[26], 反应体系采用 96 孔板法, 加入 120 μ L PBS, 20 μ L 样品溶液, 阳性对照以同体积 1.0 mg/mL 阿卡波糖代替, 20 μ L 0.3 U/mL 的 α -葡萄糖苷酶, 37 °C 预热 10 min, 加 20 μ L 2.5 mmol/L pNPG 反应 30 min, 加 1.0 mol/L 碳酸钠终止反应, 测 410 nm 处吸光度, 抑制率公式如下。

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{A_{\text{空白组}} - A_{\text{空白对照组}} - (A_{\text{样品组}} - A_{\text{样品对照组}})}{A_{\text{空白组}} - A_{\text{空白对照组}}}$$

1.2.4.2 α -淀粉酶活性抑制动力学研究 参考文献^[27]方法稍有改动, 不同酶浓度(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mg/mL)下测定球蛋白作用下的反应速率, 绘制反应动力学曲线。固定酶浓度为 0.5 mg/mL, 测定不同底物浓度 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mg/mL 时芋头球蛋白作用下的反应速率, 作双倒数曲线判断抑制类型, 求抑制常数 K_i 。

1.2.4.3 α -葡萄糖苷酶活性抑制动力学研究 参考文献^[28]方法稍有改动, 不同酶浓度(0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 U/mL)下测球蛋白作用下的反应速率, 绘制反应动力学曲线。测不同 pNPG 浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L 时的反应速率, 作双倒数曲线判断抑制类型, 求抑制常数 K_i 。

1.3 数据处理

所有实验均进行 3 次平行实验, 数据采用平均值 $\pm$ 标准差的形式, 采用 Design-Expert8.0.6 软件、SPSS17.0、Excel2010 和 Origin8.0 软件分析处理数据。

2 结果与分析

2.1 芋头蛋白的提取

2.1.1 单因素实验 如图 1, 随着料液比的提高, 蛋白质提取率先增加后趋于稳定, 因为料液比的提高可

以增加原料与提取溶剂的接触面积,促进蛋白质溶出,但料液比超过 1:15 g/mL 后,不仅会增加杂质溶出,溶液中盐离子增多可能使蛋白变性,且导致蛋白浓度过低不利于后续的盐析,因此选取 1:15 g/mL 为宜。如图 2,温度对蛋白质的提取率影响较大,低于 25 °C 不利于蛋白质溶出,高于 60 °C 可能引起淀粉糊化而包裹住蛋白质阻碍其溶出,40 °C 之前提取率随温度急剧变化,之后趋于稳定,70 °C 时提取率降低,可能是因为淀粉糊化包裹蛋白在离心时除去,为保证活性和提取率选取 40 °C 作为提取温度。如图 3,蛋白质提取率随提取时间先增加后降低,蛋白质的提取率与时间密切相关,时间少于 60 min 时蛋白质没有充分溶出,导致提取不够充分,而时间超过 150 min 蛋白质可能会变性沉淀而在离心中除去,因此,选取 120 min 作为提取时间。如图 4,提取 2 次以后,蛋白质提取率增加变缓慢,表明大部分蛋白质已充分提取,因此,选取 2 次作为提取次数。

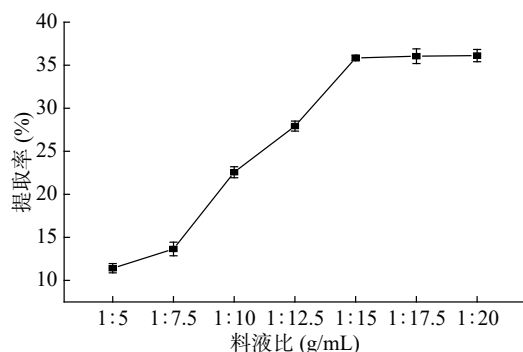


图 1 料液比对芋头球蛋白提取率的影响
Fig.1 Effect of solid-to-liquid ratio on the extraction yield of taro globulin

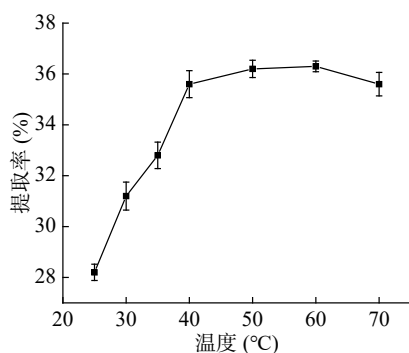


图 2 温度对芋头球蛋白提取率的影响
Fig.2 Effect of extraction temperature on the taro globulin extraction rate

2.1.2 响应面优化芋头蛋白提取工艺 根据 Box-Behnken 设计试验,结果见表 2。使用 Design Expert 8.0.6 分析和拟合后得芋头蛋白的提取率(Y)对料液比(A)、提取温度(B)和提取时间(C)的二次多项式回归模型:

$$Y(\%) = 36.62 + 1.20A + 0.51B + 0.94C - 0.18AB - 0.36AC - 0.20BC - 2.70A^2 - 0.36B^2 - 1.10C^2$$

如表 3 进行显著性分析,模型回归 $P < 0.0001$,失

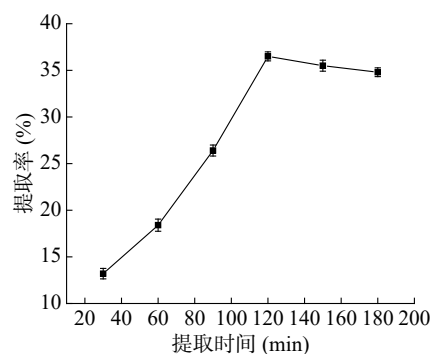


图 3 时间对芋头球蛋白提取率的影响
Fig.3 Effect of extraction time on taro globulin extraction rate

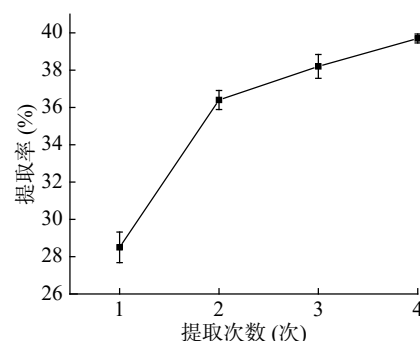


图 4 次数对芋头球蛋白提取率的影响
Fig.4 Effect of extraction times on taro globulin extraction rate

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Design and results of response surface methodology

实验号	因素			响应值
	料液比(mL/g)	温度(°C)	时间(min)	蛋白质提取率(%)
1	10	30	120	31.81±0.83
2	20	30	120	34.53±1.16
3	10	50	120	32.94±0.95
4	20	50	120	34.96±0.66
5	10	40	90	30.25±0.79
6	20	40	90	33.39±0.98
7	10	40	150	32.97±0.58
8	20	40	150	34.67±0.85
9	15	30	90	33.45±1.07
10	15	50	90	35.11±0.84
11	15	30	150	35.62±0.72
12	15	50	150	36.48±0.86
13	15	40	120	36.56±0.59
14	15	40	120	36.51±0.62
15	15	40	120	36.59±0.74
16	15	40	120	36.68±0.84
17	15	40	120	36.74±0.69

拟项 $0.0662 > 0.05$, 表明残差由随机误差引起,模型复决定系数 $R^2 = 0.9971$,所以模型可解释 99.71% 的响应值变化,模型校正决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9933$,与 R^2 接近,表明模型具有充分性和准确性。由表中 F 值可知三因素对提取率的影响: $A > C > B$,即料液比>提取时间>提取温度,一次项 A、B、C,交互项 AC 和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 极显著 ($P < 0.01$);交互项 BC 显著 ($P < 0.05$);其他均不显著。

表 3 回归模型方差分析表
Table 3 Analysis of variance of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	59.99229	9	6.66581	262.9955	<0.0001	**
A-料液比	11.47205	1	11.47205	452.6229	<0.0001	**
B-提取温度	2.0808	1	2.0808	82.09672	<0.0001	**
C-提取时间	7.10645	1	7.10645	280.3807	<0.0001	**
AB	0.1225	1	0.1225	4.833164	0.0639	
AC	0.5184	1	0.5184	20.45316	0.0027	**
BC	0.16	1	0.16	6.312704	0.0402	*
A ²	30.70611	1	30.70611	1211.491	<0.0001	**
B ²	0.532127	1	0.532127	20.99477	0.0025	**
C ²	5.053138	1	5.053138	199.3685	<0.0001	**
残差	0.17742	7	0.025346			
失拟项	0.1429	3	0.047633	5.519506	0.0662	
净误差	0.03452	4	0.00863			
总离差	60.16971	16				

注: *, 差异显著($P<0.05$), **, 差异极显著($P<0.01$)。

由图 5 反映的是第三个因素处于零水平判断另外两个因素的交互作用, 随料液比和温度的增加, 提

取率先提高后降低, 提取率随温度的变化幅度小于料液比, 交互作用不显著; 随料液比和提取时间的增加, 提取率先提高后降低, 在几何中心点达到最大, 交互作用显著, 随提取时间和提取温度, 提取率在温度提高时变化不大, 随提取时间增加提取率快速提高后趋于平缓, 两者的交互作用较显著, 这与表 3 中 AC 的交互作用最显著一致, 即料液比和时间对提取率的交互影响最大。最优提取条件的确定及验证: 将回归方程对 A、B、C 分别取一阶偏导数等于零, 得到最佳条件为料液比 15.67:1 mL/g、温度 41.33 ℃、时间 124 min, 此时的提取率为 36.88%±0.25%, 考虑实际操作将其修正为料液比 16:1 mL/g、温度 41 ℃、时间 124 min, 为验证响应面试验的准确性, 重复实验 3 次, 得提取率为 36.75%±0.31%, 和预测值吻合良好, 表明此模型可用。童晶晶^[15]采用盐提法提取香芋蛋白, 提取率为 55.68%, 常银子等^[29]采用酶法提取芋艿分离蛋白的提取率为 10.20%, 芋头蛋白的提取率与芋头品种和提取方法有关, 本研究蛋白提取率

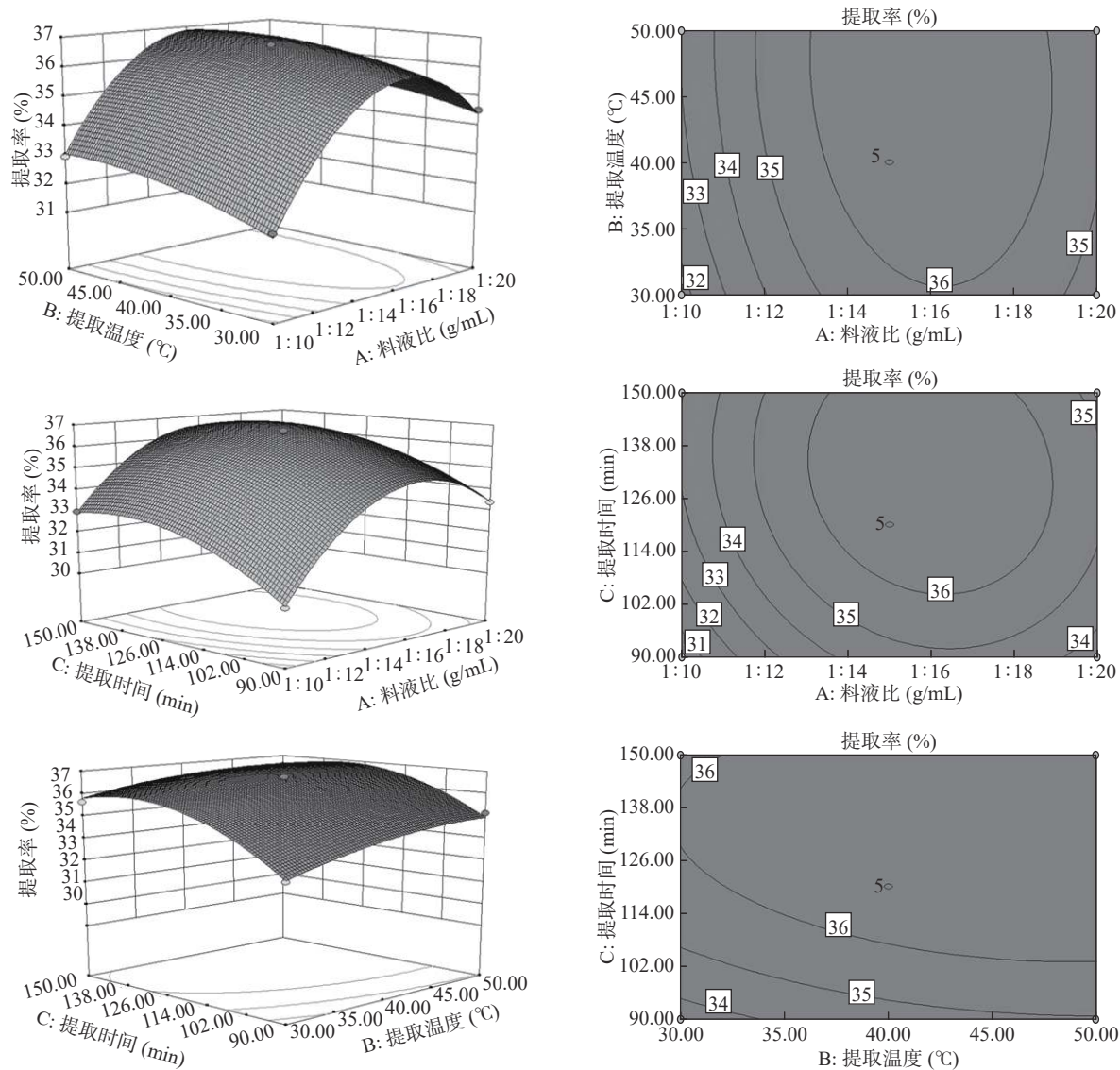


图 5 各因素交互作用响应面图和等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots showing the interaction of various factors

相对较高,可用于活性蛋白的提取。

2.2 芋头蛋白的纯化

由图 6 和表 4 可知,芋头粗蛋白经 DEAE-52 纤维素层析柱后得四个洗脱组分,其中 0.1 mol/L 氯化钠洗脱组分蛋白含量最高,由含量可求出得率为 0.20%±0.01%,且活性最高,可作为活性蛋白进一步研究。

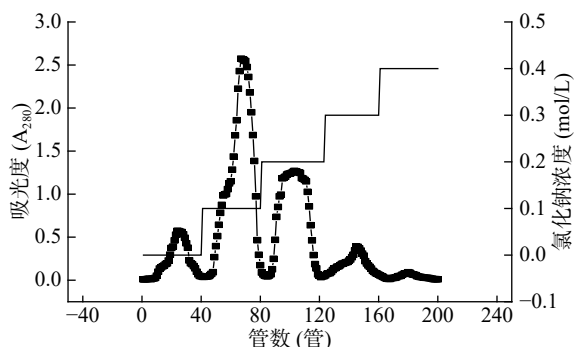


图 6 DEAE-52 纤维素层析柱纯化芋头球蛋白洗脱曲线
Fig.6 Elution curve of taro globulin purified by deae-52 ion exchange chromatography

表 4 DEAE-52 纤维素柱层析不同盐浓度洗脱组分的蛋白质含量和酶抑制活性

Table 4 Protein content and enzyme inhibitory activity of elution components with different salt concentrations on DEAE-52 cellulose column chromatography

NaCl 浓度 (mol/L)	蛋白质含量 (mg)	1.0mg/mL 蛋白质对 α -淀粉酶的抑制率 (%)	1.0mg/mL 蛋白质对 α -葡萄糖苷酶的抑制率 (%)
0	13.84±0.15	7.62±0.16	5.32±0.38
0.1	65.58±0.41	58.62±0.45	35.92±0.87
0.2	53.24±0.47	12.32±0.23	9.05±0.59
0.3	15.24±0.28	8.43±0.26	5.86±0.27
0.4	3.49±0.52	4.72±0.45	2.12±0.33

由图 7 和表 5 可知,芋头蛋白纯化洗脱曲线中共有 4 个吸收峰,在 20.078 min 处有一主峰,经计算得该峰对应蛋白的纯度为 93.27%,表明蛋白纯化效果较好。

2.3 芋头蛋白等电点和 SDS-PAGE 电泳分析

2.3.1 芋头蛋白等电点的测定 如图 8, pH=5.6 时上清液蛋白浓度最低,说明此时蛋白沉淀量最大,即为芋头球蛋白等电点,在 Damares 等测得的芋头球蛋白 G1 等电点(pI)为 5.5~9.5 内^[30]。

2.3.2 芋头蛋白 SDS-PAGE 电泳分析 如图 9 所示,芋头粗蛋白分子量为 12、22、40、55 和 63 kDa,纯化后得到电泳纯的球蛋白,分子量为 22 kDa 左右,与文献 [2] 中具有蛋白酶抑制活性的芋头球蛋白的分子量一致。Sharma 等^[14] 提取纯化得到的两种具有 α -淀粉酶抑制活性的蛋白的分子量为 14.3 和 12.5 kDa,文献 [30] 中报道的一种芋头球蛋白也由 12.5 kDa 的同型亚基组成,其与很多活性有关。童晶晶^[15] 比较了不同提取溶剂的分子量,发现 Tris 提取物所含条带最多,胰蛋白酶抑制活性最强,表明

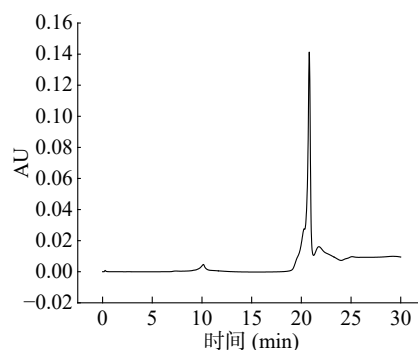


图 7 芋头球蛋白经纯化在 HPLC 流出曲线
Fig.7 Taro globulin HPLC outflow curve after purified

表 5 芋头蛋白提取率和纯度

Table 5 Extraction rate and purity of taro protein

样品	蛋白质提取率 (%)	蛋白质得率 (%)	蛋白质纯度 (%)
粗蛋白	36.75±0.31 ^a	0.70±0.04 ^a	85.72±0.47 ^a
球蛋白	10.47±0.07 ^b	0.20±0.01 ^b	93.27±0.29 ^b

注: 同列不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

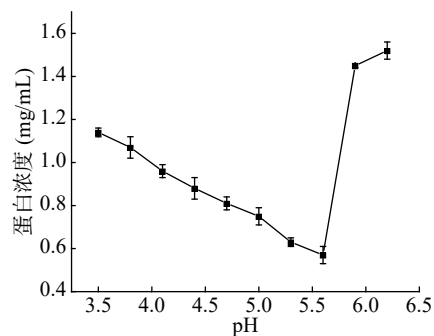


图 8 上清液球蛋白浓度随 pH 变化曲线
Fig.8 Curve of globulin concentration in supernatant with pH

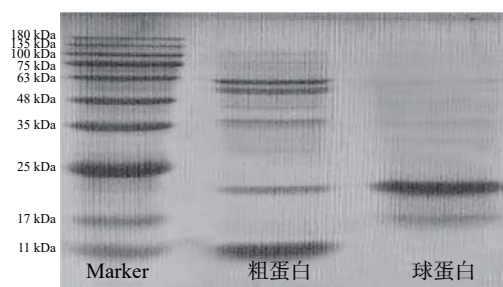


图 9 芋头球蛋白电泳图

Fig.9 Electropherogram of taro globulin

一定浓度的缓冲液能促进蛋白溶出且蛋白种类保留率高,本文采用的磷酸缓冲液提取的蛋白条带也较多,说明可用于活性蛋白的提取。

2.4 芋头球蛋白对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学研究

2.4.1 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定 由图 10、图 11 可知,随着芋头球蛋白浓度增加,其对两种酶的抑制活性均增强,且呈良好的量效关系。利用 SPSS 软件求出芋头球蛋白对 α -淀粉酶的 IC_{50} 为 (0.75±0.10) mg/mL,对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 为 (2.09±0.19) mg/mL,阿卡波糖对 α -淀粉酶的 IC_{50} 为

(0.61 ± 0.13) mg/mL, 对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 为 (0.69 ± 0.16) mg/mL。芋头球蛋白对 α -淀粉酶的抑制活性与阿卡波糖相当, 而对 α -葡萄糖苷酶抑制活性低于阿卡波糖。

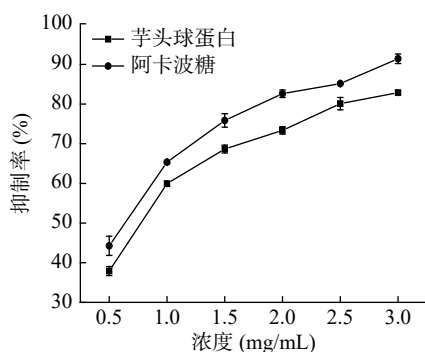


图 10 芋头球蛋白和阿卡波糖对 α -淀粉酶的抑制作用

Fig.10 Inhibitory effects of taro globulin and acarbose on α -amylase

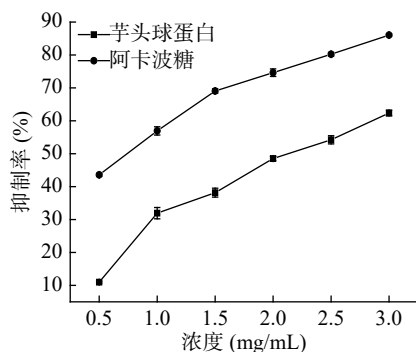


图 11 芋头球蛋白和阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

Fig.11 Inhibitory effects of taro globulin and acarbose on α -glucosidase

2.4.2 芋头球蛋白对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学研究 参考文献 [27,31] 能够确定芋头球蛋白对 α -淀粉酶的抑制作用类型, 由抑制动力学曲线图 12、图 13 可知, 加入不同浓度蛋白时所得的直线交于原点, 且随蛋白浓度增加斜率减少, 说明芋头球蛋白对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶均为可逆抑制, 且图 14、图 15 的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线符合非竞争性抑制的特点, 因此推测芋头球蛋白对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶为非竞争性抑制, 蛋白与酶通过形成复合物来抑制酶, 该复合物阻断活性位点或改变酶的构象, 最终导致其催化活性降低, 与文献一致^[11]。由表 6 的双倒数曲线方程可以求得芋头球蛋白对 α -淀粉酶抑制的 $K_i = (0.61 \pm 0.05)$ mg/mL, 对 α -葡萄糖苷酶抑制的 $K_i = (0.26 \pm 0.02)$ mmol/L, 说明芋头球蛋白对两种酶的抑制活性均较高。

3 结论

芋头不仅提供营养物质, 还是天然活性物质的主要来源。本研究从芋头中提取纯化得到一种球蛋白, 发现其对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶均具有较高的抑制活性, 存在量效关系, 且纯化后活性明显提高, 抑制类型均为可逆的非竞争性抑制, 表明芋头球蛋白具有一定的体外调节血糖活性, 但还需进一步对球蛋

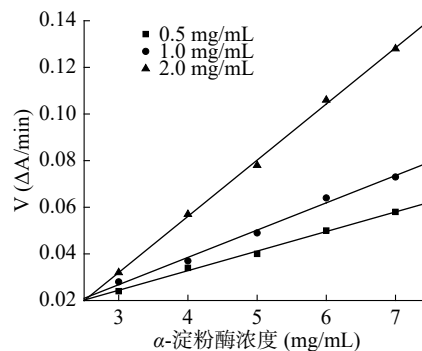


图 12 芋头球蛋白对 α -淀粉酶的抑制动力学曲线

Fig.12 Inhibitory kinetic curve of taro globulin on α -amylase

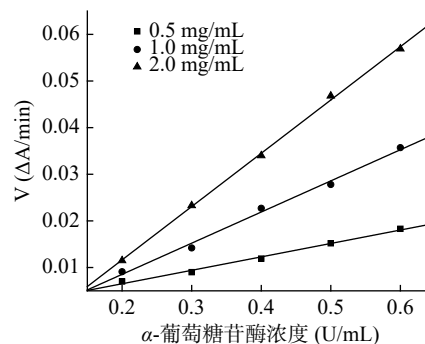


图 13 芋头球蛋白对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学曲线

Fig.13 Inhibitory kinetic curve of taro globulin on α -glucosidase

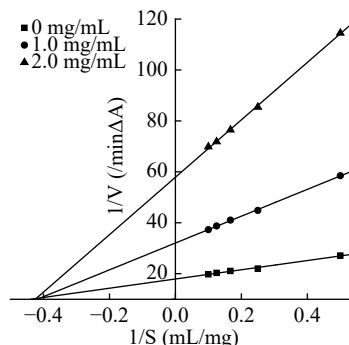


图 14 芋头球蛋白与 α -淀粉酶反应的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig.14 Lineweaver-Burk plots of the reactions of α -amylase with taro globulin

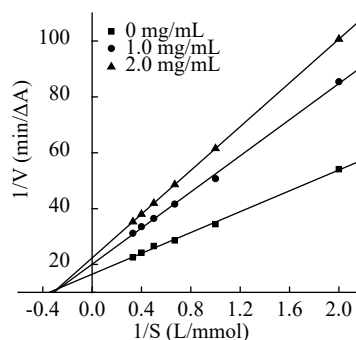


图 15 芋头球蛋白与 α -葡萄糖苷酶反应的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig.15 Lineweaver-Burk plots of the reactions of α -glucosidase with taro globulin

表6 芋头球蛋白与 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶反应的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线方程Table 6 Lineweaver-Burk plots equation of the reactions of α -amylase and α -glucosidase with taro globulin

球蛋白浓度(mg/mL)	α -淀粉酶反应的双倒数曲线方程	α -葡萄糖苷酶反应的双倒数曲线方程
0	$y=25.385x+11.77, R^2=0.997$	$y=23.689x+12.706, R^2=0.9934$
1.0	$y=59.583x+30.255, R^2=0.9974$	$y=33.67x+18.526, R^2=0.9948$
2.0	$y=119.7x+62.758, R^2=0.996$	$y=39.143x+22.322, R^2=0.9967$

白进行鉴定、研究构效关系和体内作用机制。另外,可进一步对其体内消化进行研究;或者酶解蛋白得到活性肽,对生物活性肽片段进行后续分离、纯化和测序研究,应用于保健食品、食品配料或其他类型的食品。

参考文献

- [1] 童晶晶, 赖富饶, 吴晖, 等. 加工因素对张溪香芋全粉品质影响[J]. *粮食与油脂*, 2014, 27(8): 20-24.
- [2] Pereira P R, Silva J T, Vericimo M A, et al. Crude extract from taro (*Colocasia esculenta*) as a natural source of bioactive proteins able to stimulate haematopoietic cells in two murine models[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 18: 333-343.
- [3] Wu C, Lin K. The Antioxidative Characteristics of taro and sweet potato protein hydrolysates and their inhibitory capability on angiotensin converting enzyme[J]. *Food Science and Technology Research*, 2017, 23(6): 845-853.
- [4] Pereira P R, Corrêa A C N T, Vericimo M A, et al. Tarin, a potential immunomodulator and cox-inhibitor lectin found in taro (*Colocasia esculenta*) [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2018, 17(4): 878-891.
- [5] Yu J, Liu P, Duan J, et al. Itches-stimulating compounds from *Colocasia esculenta* (taro): Bioactive-guided screening and LC-MS/MS identification[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015, 25(20): 4382-4386.
- [6] Ribeiro P P, Mere D A E, Afonso V M, 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]. *The Protein Journal*, 2014, 33(1): 92-99.
- [7] 童晶晶, 张晓元, 赖富饶, 等. 不同溶剂对香芋蛋白提取及活性的影响[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(1): 194-202.
- [8] 黄友如, 王教飞, 李昕蓓, 等. 芋艿分离蛋白的制备及工艺条件优化[J]. *常熟理工学院学报*, 2017, 31(2): 97-103.
- [9] 罗丽平, 李冰晶, 赵景芳, 等. 三种食用菌提取物体外抗氧化与降血糖活性研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(20): 324-329.
- [10] 李波, 包怡红, 高峰, 等. 红松球磷片多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(1): 63-65.
- [11] Kumari B, Sharma P, Nath A K. α -Amylase inhibitor in local Himalyan collections of *Colocasia*: Isolation, purification, characterization and selectivity towards α -amylases from various sources[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2012, 103(1): 49-55.
- [12] Tiengburanatam N, Boonmee A, Sangvanich P, et al. A novel α -glucosidase inhibitor protein from the rhizomes of *Zingiber ottensii* Valetton [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 162(7): 1938-1951.
- [13] Mcewan R, Madivha R P, Djarova T, et al. Alpha-amylase inhibitor of amadumbe (*Colocasia esculenta*): Isolation, purification and selectivity toward alpha-amylases from various sources[J]. *African Journal of Biochemistry Research*, 2010, 4(9): 220-224.
- [14] Sharma K K, Pattabiraman T N. Natural plant enzyme inhibitors. Isolation and characterisation of two α -amylase inhibitors from *Colocasia antiquorum* tubers[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1980, 31(10): 981-991.
- [15] 童晶晶. 香芋蛋白的提取及其胰蛋白酶抑制剂的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- [16] 杨静华. 考马斯亮蓝法测定苦荞麦中可溶性蛋白的含量[J]. *山西医药杂志*, 2018, 47(2): 206-207.
- [17] 石玮婷, 李荣, 姜子涛. 紫苏籽蛋白的提取及纯化研究[J]. *中国食品添加剂*, 2013(4): 68-74.
- [18] 黄文. 白果活性蛋白的分离、纯化、结构及其生物活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2002.
- [19] 阙森琳, 蒋玉蓉, 曹美丽, 等. 响应面试验优化藜麦种子多酚提取工艺及其品种差异[J]. *食品科学*, 2016, 37(4): 7-12.
- [20] 周晓薇, 王静, 段浩, 等. 铁棍山药蛋白质的分离纯化及体外抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2011, 32(9): 31-35.
- [21] 李雨哲. 马氏珍珠贝糖蛋白提取纯化及其抗氧化活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2011.
- [22] 崔竹梅, 王红玲, 张占琴, 等. 鹰嘴豆籽粒清蛋白和球蛋白等电点、相对分子量的测定[J]. *干旱地区农业研究*, 2007(6): 89-95.
- [23] 周仲卿等夏其昌张祥明. 蛋白质电泳技术指南[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 23-30.
- [24] 刘睿, 潘思轶, 刘亮, 等. 高粱原花青素对 α -淀粉酶活力抑制动力学的研究[J]. *食品科学*, 2005(9): 171-174.
- [25] 秦樱瑞, 黄先智, 曾艺涛, 等. 干燥方法对苦瓜降糖成分含量的影响[J]. *食品科学*, 2015, 36(15): 56-61.
- [26] Wu Y, Zhou Q, Chen X, et al. Comparison and screening of bioactive phenolic compounds in different blueberry cultivars: Evaluation of anti-oxidation and α -glucosidase inhibition effect[J]. *Food Research International*, 2017, 100: 312-324.
- [27] 张永军, 黄惠华. 茶多酚对胰 α -淀粉酶的抑制动力学研究[J]. *食品工业*, 2010, 31(1): 7-9.
- [28] 马庆一, 陈丽华, 杨海廷, 等. 山茱萸中 α -葡萄糖苷酶抑制活性因子的筛选(I)[J]. *食品科学*, 2007(1): 167-170.
- [29] 常银子, 王丽霞, 仲山民, 等. 酶法提取芋艿蛋白质工艺[J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(3): 19-22.
- [30] Damares C, Monte-Neshich T L R R. Characterization and spatial localization of the major globulin families of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) tubers[J]. *Plant Science*, 1995, 112: 149-159.
- [31] 伍城颖, 吴启南, 王红, 等. 茨种皮多酚提取物体外抑制 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(16): 91-94.