

4种玉米水解肽的除草活性及与相对分子质量的关系

杨 剑^{1,2}, 卢昌义¹, 于兴娜³ (1. 厦门大学 环境科学研究中心, 福建 厦门 361005 2. 深圳职业技术学院 应用化学与生物技术学院, 广东 深圳 518055 3. 复旦大学 环境科学与工程系, 上海 200433)

摘要: 以碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶和中性蛋白酶 4种蛋白酶为水解酶制备玉米蛋白水解肽, 用培养皿生物分析法检测在不同浓度(0.5, 1.0, 2.0和 5.0 mg·mL⁻¹)下的 4种玉米蛋白水解肽对光鳞水蜈蚣(*Kyllinga brevifolia* var. *leiolepis*)种子萌发过程中根系生长的抑制活性; 采用超滤法制备相对分子质量不同的肽段并比较其除草活性。结果表明: 不同浓度下的 4种玉米蛋白水解肽对光鳞水蜈蚣种子萌发过程中根系生长均有抑制作用, 且随着水解肽浓度的增高, 其对根系生长的抑制活性增强; 碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶制备的玉米蛋白粉水解肽对根系生长的抑制活性明显高于风味蛋白酶和中性蛋白酶制备的玉米蛋白粉水解肽。相对分子质量不同的玉米蛋白粉水解肽对根系生长的抑制活性存在差异, 5 000 u以下的小分子肽具有更高的抑制活性。

关键词: 蛋白酶; 玉米蛋白粉; 水解肽; 根系; 抑制活性; 分子量

中图分类号: S482.4⁺ Q556⁺.3 文献标识码: A 文章编号: 1673-4831(2006)03-0033-04

Herbicidal Activities of Corn Gluten Peptides Prepared by Different Proteases and Their Relations to Molecular Weight

YANG Jian^{1,2}, LU Chang-yi¹, YU Xing-na³ (1. Environmental Science Research Center Xiamen University Xiamen 361005 China 2. School of Applied Chemistry and Biotechnology Shenzhen Polytechnic Shenzhen 518055 China 3. Department of Environmental Science and Engineering Fudan University, Shanghai 200433 China)

Abstract Corn gluten peptides were prepared by four different kinds of proteases and their respective root inhibiting activities on smoothscale *Kyllinga* (*Kyllinga brevifolia* var. *leiolepis*) were evaluated in Petri dish bioassay when they were 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0 mg·mL⁻¹ in concentration. Results show that they all demonstrated root inhibiting activity which increased with their concentration. Herbicidal activities of peptides prepared by alcalase and Papain were significantly higher than those prepared by flavourzyme and neutrase. The peptides varied in bioactivity with molecular weight. Peptides small in molecular weight (< 5 000 u) exhibited higher herbicidal activity than those large in molecular weight.

Key words protease; corn gluten peptide; root inhibiting activity; molecular weight

化学除草剂因其作用迅速、效果显著、省工省时等优点而被广泛应用于农田和草坪杂草的防治, 但是由于使用不当以及雾滴漂移、淋溶、药液挥发、选择性不理想及降解产物的危害等原因, 化学除草剂不仅严重影响作物及草坪本身的生长发育, 还可能造成环境质量下降、人类健康受损以及地下水遭受污染, 同时带来耐药杂草种群增加、抗除草剂杂草出现等问题^[1]。随着人们环保和健康意识的增强以及对化学除草剂使用后果的深入了解, 杂草无公害防治逐步受到重视, 其中开发天然无毒副作用的植物源除草剂被认为是无公害防治杂草的一条有效途径^[2]。

早期研究表明, 某些植物组织提取物及植物残体在土壤中的分解产物能抑制植物种子发芽^[3-5], 其中玉米组织提取物及凋落在土壤中的残体对植物

种子萌发及幼苗生长影响研究较多^[6-7]。20世纪90年代以来, 美国 Iowa 州立大学 CHRISTIANS 等^[8-9]对玉米蛋白粉及其水解肽的除草活性作了长期而全面的研究, 发现玉米蛋白粉能抑制植物种子萌发时根系的形成, 而对已发育成熟的植物根系则没有影响, 并由此开发出玉米蛋白粉萌前除草剂用于防治草坪杂草及草莓田间杂草。但由于玉米蛋白粉为固体粉末, 不溶于水, 因而它不象液体除草剂那样能被喷施和易于渗入土壤而发挥功效。进一步研究玉米蛋白粉水解肽对植物种子生根抑制作用的结果表明, 玉米蛋白粉水解肽比玉米蛋白粉具有更高的除草活性^[10]。但他们制备玉米蛋白粉水解肽所

基金项目: 广东省科技发展项目(03KJ6062)

收稿日期: 2006-03-21

用的水解酶仅限于碱性蛋白酶,且制备出的水解肽是分子量不同的混合肽。一些研究表明,肽活性除与其氨基酸的组成及结构有关外,还与相对分子质量有关^[11-12]。为此,笔者比较 4 种蛋白酶水解玉米蛋白粉所制备的水解肽对植物种子的生根抑制作用,采用超滤法制备相对分子质量不同的水解肽并比较其除草活性,为筛选可制备高除草活性肽的酶系及了解除草活性肽的性质并进一步对其进行分离纯化提供必要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 原料的预处理

玉米蛋白粉为山东鲁州食品有限责任公司生产。由于玉米蛋白原料为较大的褐色片状颗粒,为便于酶解反应时酶与底物能够充分接触,需要将原料进行预处理:将原料玉米蛋白粉经粉碎机粉碎后过孔径为 0.4 mm (100 目)筛,收集筛下淡黄色粉末作为酶解底物。采用凯氏定氮法^[13]测得其蛋白质质量分数为 0.51。

1.2 玉米蛋白粉水解肽的制备

称取 4 份 30 g 玉米蛋白粉分别加入 4 个 500 mL 三角瓶中,各加入 270 mL 去离子水配成 100 g·L⁻¹玉米蛋白粉悬浮液后置于恒温振荡器中振荡,速率为 120 r·min⁻¹,以玉米蛋白粉悬浮液为底物,分别按酶与底物比为 15 μL·g⁻¹、15 μL·g⁻¹、15 mg·g⁻¹和 15 mg·g⁻¹加入碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶,按照厂家推荐的最适条件确定各种蛋白酶水解温度和 pH 值(表 1),不同蛋白酶的水解时间均设置为 6 h。反应过程中用 pH 计监测反应体系 pH 值的变化,用少许 100 mL·L⁻¹氨水调节反应体系的 pH 值,使之稳定在各种酶所需的最适 pH 水平。反应结束后 100 °C 煮沸 10 min 灭酶活及赶走残存的氨气,冷却后于 4 500 r·min⁻¹离心 20 min 取上清液经 2 层滤纸抽滤以除去上清液表面漂浮的杂质,过滤后的上清液置于旋转蒸发仪中浓缩,经冷冻干燥,收集所得的冻干粉即为玉米蛋白粉的不同水解肽样品。

1.3 杂草种子萌发过程中根系生长抑制活性检测

以杂草光磷水蜈蚣(*Kyllinga brevifolia* var. *leiolepis*)种子作为根系生长抑制活性的检测材料,这主要是由于该杂草发芽率高,生长势整齐。先用 750 mL·L⁻¹酒精浸泡光磷水蜈蚣种子 1 min 再用去离

子水冲洗 3 次,放在双层滤纸上置于直径为 6 cm 的培养皿中。先加入 1 mL 去离子水,加盖培养 5 d 后,分别加入 1 mL 不同浓度(0.5、1.0、2.0 和 5.0 mg·mL⁻¹)4 种蛋白酶酶解的玉米蛋白粉水解肽后用 Parafilm 封口胶封口培养,以去离子水为对照。各处理和对照各选用 20 粒种子,均重复 3 次。培养条件:每天光照 16 h 温度 25 °C, [光]照度 1 500 lx 培养时间共 12 d 培养结束后用数显游标卡尺测量各幼苗根系中最长根长度作为统计指标。

表 1 4 种蛋白酶的最适水解温度和 pH 值

Table 1 Optimal hydrolysis conditions of four different kinds of proteases

种类	温度 / °C	pH 值
碱性蛋白酶	60	8.0
中性蛋白酶	50	7.0
木瓜蛋白酶	60	7.0
风味蛋白酶	50	7.0

1.4 超滤分析

以碱性蛋白酶制备的玉米蛋白水解肽为样品进行超滤以制备相对分子质量不同的水解肽。使用 Millipore Labscale TFF System 超滤仪进行超滤,超滤膜相对分子质量为 5 000 u。在超滤过程中保持进口压力为 13.79 万 Pa (20 psi),出口压力为 6.89 万 Pa (10 psi),当透过液体积达到原样品体积的 60% 时停止超滤,分别收集透过液(相对分子质量小于 5 000 u 肽)和保留液(相对分子质量大于 5 000 u 肽),使用 Laborta 4000 旋转蒸发仪对其进行浓缩,旋转速度 90 r·min⁻¹,蒸馏温度 55 °C。浓缩的透过液和保留液置于 -80 °C 冰箱中冷冻 2 h 后进行冷冻干燥,冻干温度为 -54 °C。当腔体压力保持不变达 2 h 时即达冻干终点,分别收集保留液和透过液的冻干粉,并按 1.3 的方法进行除草活性检测。

1.5 数据统计分析

抑制率(%)计算方法如下:抑制率 = [(对照组根长 - 处理组根长) / 对照组根长] × 100%。统计分析借助 SPSS 11.5 for windows 统计软件包完成。所有定量指标均用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,参数统计分析方法为独立样本 t 检验,显著性水平设为 $\alpha = 0.05$ 采用 OneWay ANOVA 法进行多组间差异分析。

2 结果与分析

2.1 4 种蛋白酶水解玉米蛋白粉制备除草活性肽的活性比较

酶解 6 h 时 4 种蛋白酶水解玉米制备的水解肽对杂草种子萌发根系生长的抑制影响见表 2。

表 2 4 种蛋白酶水解玉米制备的水解肽对光磷水蜈蚣的抑制影响

Table 2 Inhibitional effect on *Kyllinga brevifolia* var. *leiolepis* of four different kinds of peptides prepared out of hydrolysis of corn gluten by the enzymes

水解肽浓度 / (mg·mL ⁻¹)	抑制率 %			
	碱性蛋白酶	木瓜蛋白酶	中性蛋白酶	风味蛋白酶
0.5	62.75±3.22	57.91±5.14	44.78±7.46*	41.56±7.87**
1.0	68.50±2.22	65.35±1.72	60.22±5.92*	52.51±7.60**
2.0	78.71±3.29	74.52±5.26	71.50±6.46*	61.75±5.61**
5.0	86.80±1.92	84.70±2.37	83.76±1.84*	72.70±7.78**

*表示 $P < 0.05$ **表示 $P < 0.01$, 与碱性蛋白酶比较。

由表 2 可知, 碱性蛋白酶水解玉米制备的水解肽对光磷水蜈蚣的抑制率高于其他 3 种蛋白酶水解肽。Dunnett 和 Tamhane 法分析表明, 与碱性蛋白酶水解玉米水解肽的抑制活性比较, 木瓜蛋白酶水解玉米水解肽无显著差异 ($P > 0.05$), 风味蛋白酶水解玉米水解肽具有显著差异 ($P < 0.05$), 而中性蛋白酶水解玉米水解肽则表现出极显著差异 ($P < 0.01$)。ANOVA 方差分析 (表 3) 表明, 选用不同蛋白酶水解玉米制备的除草活性肽对杂草的抑制具有极显著差异 ($P < 0.01$)。

表 3 4 种蛋白酶水解玉米制备的水解肽除草活性的 ANOVA 方差分析

Table 3 ANOVA of the four different kinds of peptides

变异来源	水解肽浓度 / (mg·mL ⁻¹)	df	SS	MS	F	P
组间差异	0.5	3	0.714	0.238	10.913	< 0.001
	1.0	3	0.221	0.074	6.559	0.003
	2.0	3	0.579	0.193	25.985	< 0.001
	5.0	3	0.471	0.157	15.941	< 0.001

2.2 超滤后透过液和保留液中水解肽的除草活性比较

超滤法是应用孔径为 1.0~2.0 nm (或更大) 的超滤膜来过滤含有大分子或微细粒子的溶液, 使大分子或微细粒子从溶液中分离的过程。超滤的推动

力是压差, 在溶液一侧加压, 使溶剂透过膜而得到分离。碱性蛋白酶解液超滤后透过液和保留液中水解肽的除草活性见图 1。

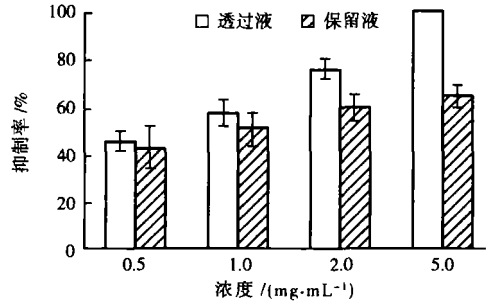


图 1 经 5 000 u 超滤膜超滤后透过液与保留液中水解肽对光磷水蜈蚣的抑制影响

Fig. 1 Inhibitional effect on *Kyllinga brevifolia* var. *leiolepis* of peptides in the filtering liquor from 5 000 u hyperfiltration and residual solution by 5 000 u Pellicon

由图 1 可知, 水解肽经过 5 000 u 超滤膜超滤后, 透过液和保留液对光磷水蜈蚣均有抑制作用, 且透过液即分子量为 5 000 u 以下的肽液与保留液相比具有更高的抑制率。浓度为 0.5、1.0、2.0 和 5.0 mg·mL⁻¹ 水解肽透过液的抑制率分别达 45.70%、57.79%、75.76% 和 100%; 而在同样浓度下保留液的抑制率分别为 42.97%、50.74%、59.44% 和 64.28%。独立样本 t 检验分析结果 (表 4) 表明, 透过液与保留液除在 0.5 mg·mL⁻¹ 浓度下无显著差异 ($t = 0.664, P > 0.05$), 其余各浓度条件下均具有极显著差异 ($P < 0.01$)。由此可见, 相对分子质量在 5 000 u 以下的小分子肽具有更强的除草活性。

表 4 独立样本 t 检验结果

Table 4 Independent samples test

变异来源	水解肽浓度 / (mg·mL ⁻¹)	df	t	P
透过液与保留液组间差异	0.5	14	0.664	0.517
	1.0	25	2.824	0.009
	2.0	18	7.752	< 0.001
	5.0	15	26.342	< 0.001

3 讨论

酶解 6 h 时, 4 种蛋白酶制备的玉米蛋白粉水解肽均显示出较高的除草活性。与碱性蛋白酶相比, 木瓜蛋白酶水解玉米蛋白粉水解肽对光磷水蜈蚣的

抑制活性无显著差异 ($P > 0.05$), 风味蛋白酶水解玉米蛋白粉水解肽具有显著差异 ($P < 0.05$), 而中性蛋白酶水解玉米蛋白粉水解肽呈极显著差异 ($P < 0.01$)。因此, 选择玉米蛋白粉作为底物制备除草活性肽时, 可以优先考虑使用碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶进行水解。在生物活性肽的研究中, 以降血压肽的研究最为广泛而深入。降血压肽的活性与其结构密切相关, 具有高降血压活性的降血压肽都有类似的氨基酸组成与结构, 且其活性与相对分子质量有关, 如 KM 等^[14]利用超滤膜反应器收集了不同相对分子质量范围的肽, 并测定各组分的降血压活性, 发现相对分子质量小于 1500 u 的组分降血压活性最强。然而除草活性肽的活性与其氨基酸的组成、结构及相对分子质量关系研究还很少。LU 等^[15]从玉米蛋白粉水解肽中分离并鉴定了 5 个具有除草活性的 2 肽和 1 个 5 肽, 他们还推测, 玉米蛋白粉水解肽中还包含有更多具有除草活性的水解肽, 但尚未发现除草活性肽的生物活性与特定氨基酸组成及相对分子质量的关系。由于一般玉米蛋白粉水解肽是不同肽段的混合物, 了解玉米水解肽的相对分子质量与除草活性的关系, 对进一步制定分离肽单体的技术路线具有指导意义。本研究初步证实, 相对分子质量小于 5000 u 的玉米水解肽具有更高的除草活性, 因此在玉米水解肽的分离纯化时可先通过超滤法进行初步筛选, 然后进行下一步分离(如凝胶层析及高效液相色谱), 以提高分离纯化效率。

参考文献:

- [1] 江佳富, 王俊, 蔡平, 等. 杂草生物防治研究回顾与展望(综述) [J]. 安徽农业大学学报, 2003, 30(1): 61-65
- [2] LAX A R, SHEPHERD H S, EDWARDS J V T. A Chlorosis Inducing Toxin for *Alternaria* as a Potential Herbicide [J]. Weed Technology 1988, 2: 540-544
- [3] NIELSEN K F, CUDDY T F, WOODS W B. The Influence of the Extract of Some Crops and Soil Residues on Germination and Growth [J]. Canadian Journal of Plant Science 1960, 40:

188-197

- [4] PATRICK Z A. Phytotoxic Substances Associated With the Decomposition in Soil of Plant Residues [J]. Soil Science 1971, 111: 13-18
- [5] GUENZI W D, MCCALIA T M, NORSTADT F A. Presence and Persistence of Phytotoxic Substances in Wheat Oat Corn and Sorghum Residues [J]. Agronomy Journal 1967, 59: 163-165.
- [6] CHOU C H, PATRICK Z A. Identification and Phytotoxic Activity of Compounds Produced During Decomposition of Corn and Rye Residues in Soil [J]. Journal of Chemical Ecology 1976, 2: 369-387
- [7] JMENEZ J J, SCHULTZ K, ANAYA A L, et al. Allelopathic Potential of Corn Pollen [J]. Journal of Chemical Ecology 1983, 9: 1011-1025
- [8] CHRISTIANS N E. The Use of Corn Gluten Meal as a Natural Pre-emergence Weed Control in Turf [J]. International Turfgrass Society Research Journal 1993, 7: 284-290
- [9] DILLEY C A, NONNECKE G R, CHRISTIANS N E. Corn Based Extracts to Manage Weeds and Provide Nitrogen in Matted Row Strawberry Culture [J]. HortScience 2002, 37(7): 1053-1056.
- [10] LIU D L, CHRISTIANS N E, GARBUTT J T. Herbicidal Activity of a Hydrolyzed Corn Gluten Meal on Three Grass Species Under Controlled Environments [J]. Journal of Plant Growth Regulation 1994, 13(4): 221-226
- [11] SAITO Y, WANEZAKI K, KAWATO A, et al. Structure and Activity of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides From Sake and Sake Lees [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 1994, 58(10): 1767-1771
- [12] 黄国清. 玉米降血压肽分离纯化的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2004
- [13] 张英. 食品理化与微生物检测实验 [M]. 北京: 中国轻工出版社, 2005: 80-86
- [14] KIM S K, BYUN H G, PARK P J, et al. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Purified From Bovine Skin Gelatin Hydrolysate [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2001, 49(6): 2992-2997.
- [15] LIU D L, CHRISTIANS N E. Bioactivity of a Pentapeptide Isolated From Corn Gluten Hydrolysate on *Lolium perenne* L [J]. Journal of Plant Growth Regulation 1996, 15(1): 13-17.

作者简介: 杨剑 (1965-), 男, 湖北罗田人, 博士生, 主要研究方向为杂草无公害控制及生物技术。