

玉米蛋白粉水解多肽对光磷水蜈蚣的生根抑制活性*

杨 剑^{1,2}, 陈曼芳³, 于兴娜⁴, 卢昌义¹

(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. 南京林业大学风景园林学院, 南京 210037; 4. 复旦大学环境科学与工程系, 上海 200433)

摘要: 以木瓜蛋白酶、中性蛋白酶为水解酶, 以玉米蛋白粉为底物, 制备出不同酶解时间条件下的玉米蛋白水解多肽。用培养皿生物分析法检测不同玉米蛋白水解多肽在不同浓度(0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL、5 mg/mL)条件下对光磷水蜈蚣(*Kyllinga brevifolia* var. *leiolepis*)种子生根抑制活性。结果表明: 两种蛋白酶不同水解时间制备的玉米蛋白粉水解多肽对光磷水蜈蚣种子萌发生根均有抑制作用, 且随着浓度增高生根抑制活性增强; 木瓜蛋白酶在水解3 h和6 h制得玉米多肽的生根抑制活性明显优于水解9 h和12 h制得的玉米多肽, 而中性蛋白酶在不同水解时间水解玉米蛋白粉所得的水解多肽对光磷水蜈蚣的抑制活性无显著性差异; 木瓜蛋白酶制备的玉米多肽比中性蛋白酶制备的玉米多肽生根抑制活性强, 并达到极显著性差异水平($P < 0.01$)。

关键词: 玉米蛋白粉; 水解多肽; 木瓜蛋白酶; 中性蛋白酶; 根抑制活性

中图分类号: Q944.54 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2007)02-0104-04

Root-inhibiting Activity of Hydrolyzed Peptides of Corn Gluten Meal on Smoothscale *Kyllinga* (*Kyllinga brevifolia* var. *leiolepis*)

YANG Jian^{1,2}, CHEN Man-fang³, YU Xing-na⁴ and LU Chang-yi¹

(1. Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen Fujian 361005, China; 2. School of Applied Chemistry and Biotechnology, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen Guangdong 518055, China; 3. College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 4. Department of Environmental Science and Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Corn gluten peptides were prepared by two proteases in different hydrolysis times and their root-inhibiting activity on *Kyllinga brevifolia* var. *leiolepis* was conducted in petri dish bioassays at rate of 0, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 5 mg/mL. The result showed: Corn gluten peptides prepared by two proteases have root-inhibiting activity on *Kyllinga brevifolia* var. *leiolepis*, and their bioactivity becomes greater with the increasing concentrations. Inhibitory activities of peptides changed with hydrolyzing time using papain to hydrolyze CGM and corn gluten peptides prepared at hydrolysis time of 3 hours and 6 hours exhibited more inhibitory activity than that of 9h and 12h. On the contrary, no difference was found for the peptides prepared by neutrase in different hydrolysis time. Compared with papain, peptides prepared by neutrase is less inhibitory active and the ANOVA analysis shows highly significantly difference. Therefore, as a hydrolysase, papain can be taken priority to prepare the corn gluten peptides.

Key words: Corn Gluten Meal (CGM); Hydrolyzed peptides; Papain; Neutrase; Root-inhibiting activity

化学除草剂的广泛使用, 在控制杂草对农田 和城市草坪的侵入和危害方面发挥了重要作用,

* 收稿日期: 2006-05-29 修回日期: 2006-09-21

基金项目: 广东省科技发展项目(03KJ6062)。

作者简介: 杨 剑(1965-), 男, 湖北罗田人, 副教授, 博士研究生, 主要研究方向为生物技术及杂草无公害控制。

然而传统化学农药的大量使用导致杂草抗药性的增强并造成环境污染,如土壤、地下水、农产品中化学除草剂残留逐年增多,危害人类及动物的安全^[1]。因此,研制出天然、无毒副作用、可降解的除草剂有着重要的生态效益和广泛的应用前景。

玉米蛋白粉(Corn Gluten Meal, CGM)是指玉米加工中的副产物,由玉米湿磨加工过程中从淀粉分离出的蛋白废水干燥而得—又称玉米面筋粉,约含有 60% 的蛋白质,其中玉米醇溶蛋白 68%,谷蛋白 22%,球蛋白 1.2%^[2]。20 世纪 90 年代初,美国 Iowa 州立大学的 Christians 等发现玉米蛋白粉能抑制植物种子萌发时根系的形成,证实了玉米蛋白粉中起根抑制活性作用的成分是蛋白质,并作为无公害天然萌前除草剂成功应用在草坪及有机农业一年生杂草防治上^[3,4],但玉米蛋白粉为固体粉末,不溶于水,因而它不能象液体除草剂那样能喷施和易于渗入土壤发挥功效,后来 Christians 等发现用碱性蛋白酶水解玉米蛋白粉制备的水解多肽比玉米蛋白粉具有更高的生根抑制活性^[5]。我国玉米蛋白粉原料丰富,价格低廉,因此开发研制生根抑制活性水解多肽有着重要的生态意义和经济价值。本文研究了利用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶水解玉米蛋白粉制备的水解多肽的生根抑制活性,并对玉米蛋白粉水解多肽的制备工艺进行了改进,旨在为杂草无公害控制提供新的途径和技术依据。

1 材料与方 法

1.1 原料的预处理

试验用玉米蛋白粉由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,为了便于水解反应时酶与底物能够充分接触,需要将原料进行预处理。方法为将原料玉米蛋白粉经粉碎机粉碎后过 100 目筛,收集筛下淡黄色粉末作为水解底物。

1.2 玉米蛋白粉水解多肽制备

称取 4 份 30 g 玉米蛋白粉分别加入到 4 个 500 mL 的三角瓶中,各加入 270 mL 去离子水配成 10% 玉米蛋白粉水溶液后置于恒温振荡器中震荡,速率为 120 r/min,以此 4 份玉米蛋白粉水溶液为底物,再按酶与底物比 1.5% (w/w, v/w) 分别加入木瓜蛋白酶(丹麦 NOVO Nodisk 公司,标定活力 1.5 AU/g)和中性蛋白酶(广西南宁天绿生物制品有限公司,标定活力 81.5 万 U/g)各

两份,2 蛋白酶水解温度和 pH 按照厂家推荐的最适条件进行(表 1),不同蛋白酶的水解时间均设置为 3 h、6 h、9 h、12 h。反应过程中用 pH 计监测反应体系 pH 值的变化,用少许 10% 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。反应结束后 100 °C 煮沸 10 min 灭活酶及赶走残存的氨气,冷却后 4 500 r/min 离心 20 min,取上清液经二层滤纸抽滤以除去上清液表面漂浮的杂质,过滤后的上清液经浓缩干燥后即 为玉米蛋白粉不同水解多肽样品。

表 1 两种蛋白酶的水解条件

Table 1 The hydrolysis condition of enzymes

酶 Enzyme	中性蛋白酶 Neutrase	木瓜蛋白酶 Papain
温度 Temperature/ °C	50	60
pH	7.0	7.0

1.3 生根抑制活性检测

以杂草光磷水蜈蚣(*Kyllinga brevifolia* var. *leiolepis*) 种子作生根抑制活性检测材料,这主要是由于该杂草发芽率高,生长势整齐。用 75% 酒精浸泡光磷水蜈蚣种子 1 min,然后用去离子水冲洗 3 次后放在双层滤纸上,置于 6 cm 的培养皿中,先加入 1 mL 去离子水,盖上上盖培养 5 d 后,分别加入 1 mL 不同浓度(分别为 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 2.0 mg/L, 5.0 mg/mL) 玉米蛋白粉水解多肽后用 Parafilm 封口胶封口培养,以去离子水为对照,各处理和对照选用 20 粒种子,各处理重复 3 次。培养条件为每天光照 16 h,温度 25 °C,光照强度 1 500 lx,培养 12 d。培养结束后用数显游标卡尺测量各幼苗根的长度作为统计标准。抑制率计算公式如下为抑制率 (%) = (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 (±s) 表示。多组间差异采用 One-Way ANOVA 分析,方差齐者,组间两两比较采用 Dunnett 法,方差不齐者采用 Tamhane 分析。

2 结果与分析

2.1 木瓜蛋白酶水解 CGM 制备根抑制活性肽的活性检测

木瓜蛋白酶水解玉米蛋白粉所制备的水解多肽对杂草均有明显的抑制效果(表 2),同一水解时间所制备的玉米蛋白粉水解多肽随着浓度的增

加,对光鳞水蜈蚣种子萌发生根抑制作用也增强,如水解 3 h 所制备的水解多肽当浓度为 0.5 mg/L 时,抑制率为 57.62%,当浓度增加到 1.0 mg/L、2.0 mg/L 和 5 mg/L 时,抑制率分别达到 68.80%、74.55% 和 84.03%;通过 ANOVA 分析表明,不同水解时间所得的水解多肽对光鳞水蜈蚣的抑制活性具有极显著性差异(表 3)。DUNNET 法分析表明,与水解 6 h 制备的玉米水解多肽的根抑制活性相比较,水解时间为 3 h 的抑制活性在各浓度时均表现为无显著性差异(p

> 0.05);水解时间为 9 h 时,浓度为 5 mg/L 的抑制活性具有显著性差异($p < 0.05$),并且在 0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、2.0 mg/mL 时表现出极显著差异($p < 0.01$);水解时间为 12 h 的抑制活性也均表现出极显著性差异($p < 0.01$)。说明不同水解时间制备出玉米蛋白粉±水解多肽对杂草种子生根抑制活性存在差异。因此,选用木瓜蛋白酶制备玉米蛋白粉根抑制活性多时,选用水解 3 h 即可制备出高生根抑制活性水解多肽。

表 2 木瓜蛋白酶水解玉米蛋白粉制备的水解多肽对光鳞水蜈蚣的种子萌发生根抑制活性

Table 2 Root-inhibiting activity on *Kyllinga brevifolia* var. *leiolepis* by corn gluten hydrolysate derived from papain

时间 Time/h	浓度 / (mg/mL) Concentration			
	0.5	1.0	2.0	5.0
3	59.01±6.08	67.80±4.58	74.55±4.57	84.03±2.21
6	57.91±5.14	65.35±1.72	74.52±5.26	84.70±2.37
9	47.69±7.37*	55.33±7.28*	67.21±5.59*	78.05±4.36*
12	47.14±8.40*	57.03±3.37*	66.75±4.40*	74.89±2.30*

注:与水解时间 6 h 比较

Note: Compared with 6-hour sample * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 3 木瓜蛋白酶制备玉米蛋白水解多肽生根抑制活性的方差分析

Table 3 The ANOVA of root-inhibiting activity of com gluten hydrolysate by papain

变异来源 Variance resource	浓度 / (mg/mL) Concentration	Df	SS	MS	F	P
时间 Time	0.5	3	0.490	0.163	8.975	< 0.001
组间 Between groups	1.0	3	0.548	0.183	16.518	< 0.001
差异 Difference	2.0	3	0.260	0.087	8.481	< 0.001
	5.0	3	0.257	0.086	24.548	< 0.001

2.2 中性蛋白酶水解 CGM 制备根抑制活性肽的活性检测

中性蛋白酶在不同的水解时间水解玉米蛋白粉得到的水解多肽也具有较好的抑制效果(表 4)。由表 4 可以看出,在水解时间为 3 h、6 h、9 h、12 h,浓度为 0.5 mg/mL 时的抑制率分别为 40.63%、41.56%、41.93%、43.06%;浓度为 1.0 mg/mL 的抑制率达到 54.82%、52.51%、55.18%、53.37%;浓度为 2.0 mg/mL 时抑制率

达到 65.27%、61.75%、61.83%、62.52%;在浓度为 5.0 mg/mL 时抑制率达到 75.64%、72.70%、74.99%、71.28%。

ANOVA 分析表明,中性蛋白酶在不同水解时间水解玉米蛋白粉所得的水解多肽对光鳞水蜈蚣的抑制活性无显著性差异(表 5)。即水解时间的长短对制备高活性根抑制活性肽的影响不大,因此在生产工艺过程中可缩短水解时间以获得更高的生产效率。

表 4 中性蛋白酶水解玉米蛋白粉制备的水解多肽对光鳞水蜈蚣种子萌发生根的抑制作用

Table 4 The root-inhibiting activity on seed germination of *Kyllinga brevifolia* var. *leiolepis* by com gluten hydrolysate derived from neutrase

时间 Time/h	浓度 Concentration / (mg/mL)			
	0.5	1.0	2.0	5.0
3	40.63±10.99	54.82±5.14	65.27±2.61	75.64±3.78
6	41.56±7.87	52.51±7.60	61.75±5.61	72.70±7.78
9	41.93±6.95	55.18±7.38	61.83±4.95	74.99±4.13
12	43.06±7.14	53.37±6.62	62.52±5.88	71.28±3.47

注:与水解时间 6 h 比较

Note: Compared with 6-hour sample

表 5 中性蛋白酶制备玉米蛋白水解多肽生根抑制活性的方差分析

Table 5 The ANOVA of root-inhibiting activity of corn gluten hydrolysate by neutrase

变异来源 Variance resource	浓度/(mg/mL) Concentration	Df	SS	MS	F	P
时间 Time	0.5	3	0.015	0.004	0.136	0.938
组间 Between groups	1.0	3	0.009	0.003	0.177	0.911
差异 Difference	2.0	3	0.016	0.005	0.488	0.694
	5.0	3	0.038	0.013	1.113	0.359

2.3 两种蛋白酶水解 CGM 制备根抑制活性肽的活性比较

选用水解时间为 6 h 时, 2 种蛋白酶水解玉米蛋白粉得到的水解多肽对杂草种子生根抑制作为抑制活性的比较(图 1)。从图 1 可以看出, 木瓜蛋白酶水解玉米蛋白粉制备的水解多肽与中性蛋白酶水解多肽相比具有更高的抑制活性。ANOVA 方差分析表明, 木瓜蛋白酶水解玉米多肽的根抑活性与中性蛋白酶水解玉米多肽的根抑制活性在各浓度均表现出极显著性差异($P < 0.01$)。

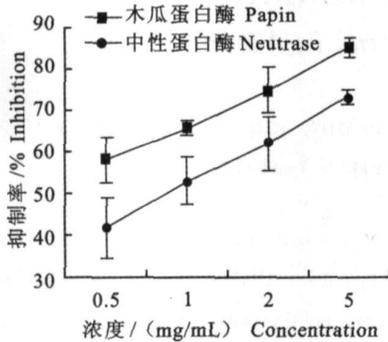


图 1 木瓜蛋白酶和中性蛋白酶水解玉米蛋白粉制备的水解多肽根抑制活性比较

Fig. 1 The root-inhibiting activity on *Kyllinga brevifolia* var. *leiolepis* derived from corn gluten peptides by two enzymes

3 讨论

本研究结果表明: 2 种蛋白水解酶制备的玉米多肽均有较强的根抑制活性, 水解时间对制备出的玉米多肽的生根抑制活性有影响, 其中木瓜蛋白酶在水解 3 h 和 6 h 制得玉米多肽的根抑制活性明显优于水解 9 h 和 12 h 制得的玉米多肽的根抑制活性, 而中性蛋白酶在不同水解时间水解玉米蛋白粉所得的水解多肽对光磷水蜈蚣的抑制活性无显著差异。但木瓜蛋白酶制备的玉米多肽比中性蛋白酶制备的玉米多肽根抑制活性强。通过本方法制备的不同玉米蛋白粉除草肽样品为淡黄色的粉末, 多肽含量均大于 70%, 易溶于水, 便于配置成各种浓度施用。本研究工艺与 Christian

等^[6]制备工艺区别在于本工艺采用的水解酶为木瓜蛋白酶、中性蛋白酶而不是碱性蛋白酶, 此外, Christian 等用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 调节水解反应体系的 pH 值, 而本试验则用少许 10% 氨水调节反应体系 pH, 不仅方便简单, 且不发生沉淀, 由于氨水遇高温很快挥发, 经检测样品 NH_4^+ 浓度极低, 小于 10 mg/kg。因此, 相对 Christians 等的工作, 本工艺更为简便。玉米蛋白粉水解多肽的除草机制是通过阻断种子根系分生组织的有丝分裂来抑制种子根系的形成, 这种抑制作用不论是对双子叶植物杂草还是单子叶植物杂草都有效果, 而对萌发后的成熟根系则没有影响, 且对环境不产生任何的污染作用^[6], 由于玉米蛋白水解多肽含氮量高 (> 10%), 所以它又可以作为农作物及草坪植物的肥源。因此它有可能作为一种天然萌前除草剂应用在农业杂草防治上, 特别是在有机转换型蔬菜、城市草坪的一年生杂草防治上有着重要的应用, 这样可以减少使用化学除草剂对环境产生的污染, 具有良好的经济、生态和社会效益。

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] 翟瑞文, 李颜群. 玉米肽的制备、特性与应用 [J]. 食品工业, 1998, (3): 11~13.
- [3] Christians N E. The use of corn gluten meal as a natural preemergence weed control in turf [J]. Intl. Turfgrass Soc. Res. J., 1993, 7: 284~290.
- [4] Dille C A, Nonnecke G R, Christians N E. Corn-based extracts to manage weeds and provide nitrogen in matted-row strawberry culture [J]. Hort Sci., 2002, 37(7): 1053~1056.
- [5] Liu D L, Christians N E, Garbutt J T. Herbicidal activity of a hydrolysed corn gluten meal on three grass species under controlled environments [J]. J Plant Growth Regul., 1994, 13: 221~226.
- [6] Christians N E, Garbutt J T, Liu D. Preemergence weed control using plant protein hydrolysate [J]. U. S. Patent, 1994, (5): 749.