

- [9] 冯俊涛, 石勇强, 张兴. 56种植物抑菌活性筛选试验[J]. 西北农林科技大学学报, 2001, 29(2): 65-68.
- [10] 杨顺义, 郭东艳, 沈慧敏, 等. 苍耳等14种植物对植物病原菌的抑菌活性[J]. 植物保护, 2006, 32(3): 68-71.
- [11] 吴文君, 刘惠霞, 朱靖博, 等. 天然产物杀虫剂原理方法实践[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1998.
- [12] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1988.
- [13] 方中达. 植病研究方法[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998.

几种天然蛋白原料水解物的除草活性初步研究

杨 剑^{1, 2}, 于兴娜³, 卢昌义¹

(1. 厦门大学环境科学研究中心, 厦门 361005; 2. 深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院, 深圳 518055; 3. 复旦大学环境科学与工程系, 上海 200433)

摘要 以鱼粉、肉骨粉、豆粕、菜籽粕及苕粉等几种天然蛋白原料为底物, 以碱性蛋白酶为水解酶制备出天然蛋白原料的水解物, 用培养皿生物分析法检测不同蛋白原料水解物在不同浓度(0.5、1、2.5 mg/mL)条件下对杂草野菊种子的生根抑制活性。结果表明: 不同蛋白原料制备出的水解物对野菊种子萌发根系生长均有抑制作用, 并且随着浓度增加其抑制活性增强, 不同蛋白原料水解物的除草活性有显著性差异, 其除草活性顺序为: 鱼粉水解物> 肉骨粉水解物> 豆粕水解物> 菜籽粕水解物> 苕粉水解物, 水解物的根抑制活性与原料的蛋白含量及其水解物的多肽含量成正相关性, 作者推测, 天然蛋白水解物中的多肽可能是植物种子萌发时根系生长抑制活性物质, 但这种根抑制活性究竟是由于特异性多肽的化感作用还是植物种子萌发时对高氮胁迫反应有待进一步研究。

关键词 天然蛋白原料; 水解物; 野菊; 根抑制活性

中图分类号 S 482.49; Q 556.3

A preliminary study on the herbicidal activity of the hydrolysates from five natural protein materials

Yang Jian^{1,2}, Yu Xingna³, Lu Changyi¹

(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 The hydrolysates of five proteins materials namely fish meal (FM), meat and bone meal (MBM), soy bean meal (SBM), rapeseed meal (RSM) and wheat gluten meal (WGM), were prepared with alcalase and their root inhibiting activity to Indian dandrathema, *Dendranthema indicum* (L.) Des Moul was measured in Petri dish at different concentrations, i.e. 0, 0.5, 1, 2, 5 mg/mL. All hydrolysates showed root inhibiting activity, and their bioactivity was raised as their concentrations increased. The herbicidal activities of the five hydrolysates were significantly different from each other. The herbicidal activities declined in the following sequence: fish hydrolysate (FH), meat and bone hydrolysate (MBH), soybean hydrolysate (SBH), rapeseed hydrolysate (RSH) and wheat gluten meal (WGH). The root inhibiting activity was positively correlated to the peptide contents of the hydrolysates and protein contents of the materials, suggesting that the peptides in the hydrolysates were herbicidal bioactive substances. However, whether the herbicidal activity is due to the allelopathy of special peptides or only to the high N stress against germinating seeds remains unclear and further studies are needed.

Key words natural protein materials; hydrolysate; *Dendranthema indicum*; root inhibiting activity

杂草控制是农业生态系统和城市草坪管理中的主要问题之一, 化学除草方法由于廉价、省工和高效

而成为目前最为普遍的杂草控制方法。然而,随着大量化学农药施入土壤而导致环境污染,危害人体健康以及对生物多样性的不良影响,人们开始寻求对环境友好的天然生物源除草剂来控制杂草,并取得一些令人鼓舞的进展^[1-4]。20世纪90年代以来,美国 Iwoa 州立大学 Christians 及其学生对玉米蛋白粉及其水解物除草活性作了长期而较全面研究,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前除草剂用于草坪杂草及草莓田间一年生杂草防治,继而从玉米蛋白粉水解物中分离出高除草活性的多肽^[5-8]。由于玉米蛋白粉为高蛋白原料,由此,作者推测,可能其他蛋白原料及其水解物对植物种子萌发有抑制作用,而除草活性强弱可能与蛋白含量及水解物的组成有关。天然蛋白,特别是植物蛋白原料一般不溶于水,不能象其他除草剂那样制成水剂喷施,从而限制其使用。为此,本研究选用蛋白质含量不同的原料作为底物,以土壤中分解蛋白质最为主要的碱性蛋白酶为水解酶制备不同蛋白原料的水解物,用培养皿生物分析法,检测这些水解物对杂草野菊种子萌发抑制效果,分析不同蛋白原料的蛋白含量及水解物中多肽含量对除草活性的影响。

1 材料与与方法

1.1 原料及预处理

本试验用的原料为豆粕、棉籽粕、芡粉、鱼粉及肉骨粉,均为深圳市华宝饲料有限公司提供。为了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。其方法如下:将各原料经粉碎机粉碎后过 100 目筛,收集筛下粉末作为酶解底物。凯氏定氮法定各原料的蛋白质含量。

1.2 水解肽制备

分别称取 5 种蛋白原料 30 g 加入至 500 mL 的三角瓶中,各加入 270 mL 去离子水配成 10% 悬浮液后置于恒温振荡器中振荡,速率为 120 r/min,以原料蛋白溶液为底物,再按 $V(\text{酶}) : m(\text{底物}) = 1.5\%$, 分别加入碱性蛋白酶(Alcalase 2.4 L 丹麦 Novo Nodisk 公司),水解条件为: pH 8.0, 温度 60 °C, 6 h。反应过程中用 pH 计监测反应体系 pH 的变化,用少许 10% 氨水调节反应体系的 pH 使之稳定在 8.0。反应结束后 100 °C 煮沸 10 min 灭酶及

赶走残存的游离氨,冷却后 4 500 r/min 离心 20 min,取上清液经两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,收集所得的冻干粉为蛋白原料水解物样品。测定各原料水解物的 pH 及氮氮含量。

1.3 培养皿生根抑制活性检测

本试验以杂草野菊 [*Dendranthema indieum* (L.) Des Moul] 种子作生根抑制活性检测材料,该杂草发芽率高,生长势整齐。用 75% 乙醇浸野菊种子 1 min 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,分别加入 2 mL 不同浓度(分别为 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg/mL) 5 种蛋白原料水解肽后用 Parafilm 封口胶封口培养,以去离子水为对照,各处理和对照选用 20 粒种子,各处理重复 3 次。培养条件:每天光照 16h, 温度 25 °C, 光照强度 1 500 lx, 培养 7 d。培养时间结束后用数显游标卡尺测量各幼苗根系长度。

1.4 蛋白原料及水解多肽含量测定

蛋白原料中蛋白质含量、水解物的多肽含量采用凯氏定氮法。称取 0.2 g 各蛋白质及多肽样品,移入干燥的消化瓶中,加入 0.6 g CuSO₄·6H₂O 及 20 mL 浓硫酸,置于消化炉中消化,消化完全后将消化液定容至 100 mL,准确吸取定容好的消化液 10 mL 置于蒸馏瓶中蒸馏, NH₃ 用 10% 硼酸溶液吸收(其中加入 2~3 滴混合指示剂)。控制最终接受液体积 100 mL 左右,此时接收液由原来的紫红色变为绿色。用 0.100 0 mol/L 标准 HCl 溶液滴定直到溶解颜色由绿色变回淡紫红色。每个样品重复 3 次。

样品中蛋白质含量按下式计算:

$$X = [(A - B) \times C \times 14 \times 6.25] / M$$

X —试样蛋白质的含量(g/100 g); A —样品滴定时消耗的标准盐酸体积(mL); B —空白滴定时消耗的标准盐酸体积(mL); C —标准盐酸的浓度(0.100 0 mol/L); M —试样的质量(g); 6.25—氮换算为蛋白质的系数。

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, 参数统计分析为独立样本 T 检验, 显著性水平设置 $\alpha=0.05$ 。

2 结果分析

不同蛋白原料所制备的水解物对野菊种子根系生长均具有抑制效果(表 1), 同一种蛋白原料所制备的水解物随着浓度的增加, 对野菊种子萌发生根抑制作用也增强, 如鱼粉所制备的水解物当浓度为 0.5 mg/mL 时, 抑制率为 69.06% , 当浓度增加到 1.0 mg/mL 时, 抑制率达到 82.37% , 当浓度增加到 2.0 mg/mL 时, 野菊种子生根完全被抑制。通过 ANOVA 分析表明, 不同蛋白原料所制备的水解物对野菊种子萌发生根的抑制活性具有极显著差异。

表 1 5 种蛋白原料水解物不同浓度对野菊种子萌发的根长抑制率¹⁾

水解物	抑制率/%			
	$0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$5.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
鱼粉	(69.06 ± 4.92) a	(82.37 ± 3.14) a	100.00 a	100.00 a
肉骨粉	(49.96 ± 2.30) b	(76.46 ± 4.36) a	100.00 a	100.00 a
豆粕	(35.62 ± 1.50) c	(44.08 ± 2.90) b	100.00 a	100.00 a
菜籽粕	(28.17 ± 1.86) d	(47.03 ± 0.08) b	(83.36 ± 2.60) b	100.00 a
苕粉	(11.56 ± 1.77) e	(15.15 ± 0.90) c	(34.456 ± 2.50) c	(51.29 ± 1.75) b

1) 同列数据后具有不同小写字母者表示在 0.05 水平差异显著。

表 2 不同蛋白原料的蛋白质含量

蛋白质原料	蛋白质含量/%
鱼粉	61.28 ± 1.70
肉骨粉	56.67 ± 0.85
豆粕	43.71 ± 0.71
菜籽粕	41.37 ± 1.20
苕粉	16 ± 0.79

表 3 不同蛋白原料水解物的多肽含量

水解物	多肽含量/%
鱼粉	90.05 ± 1.95
肉骨粉	79.83 ± 1.72
豆粕	60.20 ± 1.81
菜籽粕	64.68 ± 1.10
苕粉	24.00 ± 2.10

3 讨论

本试验选用的鱼粉、肉骨粉、豆粕、菜籽粕及苕粉目前主要作为动物饲料及添加剂而普遍应用, 其实, 这些蛋白原料最早是作为天然有机肥料用在农业生产上, 只是随着化学合成肥料出现, 作为肥料的应用逐年减少^[9], 但随着有机农业的兴起及城市草坪业的迅速发展, 天然有机原料作为缓释有机肥的研究再度引起人们的兴趣^[10-13]。有关天然有机肥料对植物种子萌发生根的抑制作用有较多的报道, 但不同研究所推测根抑制机理不同, 较早的研究表

以鱼粉水解物对野菊种子生根抑制活性最强, 苕粉水解物活性最弱, 除草活性由强到弱顺序为: 鱼粉水解物 > 肉骨粉水解物 > 豆粕水解物 > 菜籽粕水解物 > 苕粉水解物。比较各原料水解物的根抑制活性与各原料的蛋白含量及水解物多肽含量发现, 蛋白含量高的原料其制备水解物的除草活性高(表 1、表 2), 水解物多肽含量高一般其除草活性也高, 其中仅发现菜籽粕水解物含量略高于豆粕水解物多肽含量, 但除草活性低于豆粕水解物的根抑制活性(表 1、表 3), 说明水解物的除草活性可能与其水解物组成有一定关系。上述结果表明, 一般而言, 原料蛋白含量高其制备的水解物种多肽含量也高, 根抑制活性也强。

明, 土壤施入大量的棉粕能使玉米种子萌发降低 70% , 萌发的幼根出现大量坏死, 根毛消失, 这种现象归结为玉米刚萌发的根系被降解棉粕的真菌感染所致^[14]。Ells 等研究发现土壤施入一种动物蛋白饲料植物——紫花苜蓿能抑制黄瓜的种子萌发及幼苗生长, 并认为这种抑制作用是由于紫花苜蓿在土壤分解过程所产生的氨积累到一定程度时对种子根系的毒性所致^[15]。Liu 等研究玉米蛋白粉的除草性时发现玉米蛋白粉除草活性部分是蛋白质部分, 其水解物具有更高的除草活性, 并分离出高活性的小分子多肽^[16]。本研究发现, 蛋白含量高的原料制备出的水解物的多肽含量高, 对杂草植物种子萌发时根系生长的抑制作用也强, 因此, 多肽很可能是抑制种子萌发生根的主要活性物质。由于本试验所制备的水解物主要是不同分子量多肽的混合物, 这些天然蛋白水解物的除草活性究竟是特异性多肽的化感作用, 还是仅仅由于高氮对植物种子萌发的胁迫所致, 有待进一步分析。本试验所应用的原料为动物饲料, 所用的水解酶为食品级的碱性蛋白酶, 制备过程中加入的少量氨水经过灭酶步骤中挥发掉, 没有残留, 经测定各水解物中的氨氮含量均小于 1×10^{-5} , pH 在 $6.87 \sim 7.05$, 说明这种抑制作用不是来

自水解多肽制备过程中产生氨氮及 pH 碱性过高造成的。因此,下一步的工作有必要探明天然蛋白原料的水解多肽对植物种子生根的萌发机理,包括多肽对植物种子萌发的作用是直接作用还是间接作用,以及抑制作用的生理生化及遗传机制。天然蛋白原料水解物可以作为天然萌前除草剂应用在农田,特别是非直播种子有机蔬菜生产及城市草坪的杂草防治上有着重要的应用,而且还可兼用作有机肥料,这样可以减少使用化学除草剂和化肥对环境产生的污染,具有良好的经济效益、生态效益和社会效益。

参考文献

- [1] ABBAS H K, TANAKA T, DUKE S O, et al. Susceptibility of various crop and weed species to AAE toxin, a natural herbicide[J]. *Weed Technol*, 1995, 9: 125-130.
- [2] AYER S W, ISAAC B G, KRUPA D M, et al. Herbicidal compounds from microorganisms[J]. *Pestic Sci*, 1989, 27: 221-223.
- [3] CASINI P, OLIVERO L. Allelopathic effects of legume cover crops on cogon grass (*Imperata brasiliensis* Trin.)[J]. *Allelopathy J*, 2001, 88: 189-200.
- [4] DUKE S O, DA YAN F E, RIMANDO A M, et al. Chemicals from nature for weed management[J]. *Weed Sci*, 2002, 50: 138-151.
- [5] CHRISTIANS N E. The use of corn gluten meal as a natural pre-emergence weed control in turf[J]. *Intl Turfgrass Soc Res J*, 1993, 7: 284-290.
- [6] DILLEY C A, NONNECKE G R, CHRISTIANS N E. Corn based extracts to manage weeds and provide nitrogen in matted row strawberry culture[J]. *HortSci*, 1993, 37: 1053-1056.
- [7] 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.
- [8] LIU D L, CHRISTIANS N E. Bioactivity of a pentapeptide isolated from corn gluten hydrolysate on *Lolium perenne* L[J]. *J Plant Growth Regul*, 1996, 15: 13-17.
- [9] RUBINS E J, BEAR F E. Carbon nitrogen ratios in organic fertilizer materials in relation to the availability of their nitrogen[J]. *N Jersey Agri Exp Sta*, 1942: 411-423.
- [10] EMINO E R. Effectiveness of fish soluble nutrients as fertilizers on container grown plants[J]. *HortSci*, 1981, 16: 338.
- [11] GAGNON B, BERROUARD S. Effects of several organic fertilizers on growth of greenhouse tomato transplants[J]. *Can J Plant Sci*, 1994, 74: 167-168.
- [12] ERIS A, SIVRITEPE H O, SIVRITEPE N. The effects of seaweed (*Ascophyllum nodosum*) extract on yield and quality criteria in peppers[J]. *Acta Hort*, 1995, 412: 185-192.
- [13] HASEGAWA N, FUKUMOTO Y, MINODA M, et al. Promotion of plant and root growth by soybean meal degradation products[J]. *Biotechnol Lett*, 2002, 24: 1483-1486.
- [14] SHERWIN M E. The effect of fertilizers on germination and seedling growth[J]. *J Amer Soc Agron*, 1923, 23: 66-73.
- [15] ELLS J E, MCSAY A E, WORKMAN S M. Toxic effects of manure, alfalfa, and ammonia on emergence and growth of cucumber seedlings[J]. *HortSci*, 1991, 26: 380-383.
- [16] LIU D L Y, CHRISTIANS N E. Isolation and identification of root inhibiting compounds from corn gluten hydrolysate[J]. *J Plant Growth Regul*, 1994, 13: 227-230.

科技动态

拜耳作物科学——拜耳集团的子公司,是一家全球领先的创新型作物科学公司,致力于植物保护、种子处理、绿色生态科技和非农业虫害治理。在全球 120 多个国家设有分支机构,2005 年销售额约为 59 亿欧元。拜耳作物科学的产品覆盖面非常广,同时提供配套服务来支持现代化可持续发展的农业和非农业应用技术。

1989 年拜耳作物科学在中国成立了首个农业化学品合资企业。发展至今,拜耳作物科学在中国拥有一家生产企业和四个研究农场,在中国 22 个省设有办事处。利用强大的本土化生产能力、开发成果和贴近客户的营销网络,为中国上亿农民提供直接服务。

在中国市场上,拜耳作物科学以其品种众多的产品成为杀虫剂、杀菌剂和除草剂领域的领先者。早在上世纪 80 年代初期,拜耳就将今日仍然家喻户晓的杀虫剂产品——敌杀死引入中国;20 世纪 90 年代,适用于小麦的高效除草剂——骠马进入中国市场;1994 年,针对水稻螟虫的特效农药——锐劲特在中国成功登记,为世界上人口最多且以水稻为主要粮食的中国农业做出了巨大贡献。2005 年,高效环保的杀菌剂——银法利在中国获得全球第一个登记,为优质、绿色蔬菜生产提供了有利保障。这些,只是拜耳作物科学引入中国的 110 多个产品中的一小部分。目前中国生产和使用的超过四分之一的植保产品都源于拜耳作物科学发明的有效成分。

拜耳作物科学在中国已经建立起完善的销售网络和服务体系,透过这一体系,我们能够为农民提供面对面的培训和指导。与所有的合作伙伴共同成长,是我们的目标。

拜耳作物科学致力于引进更多新的有效成分产品,透过与合作伙伴共同搭建的平台和网络,将这些创新产品带给中国亿万农民,以造福他们及其最终食品消费者,并且倡导改善环境状况。