

文章编号:1673-1689(2007)05-0048-05

萌发大麦种子内肽酶活力、醇溶蛋白及 氨基酸含量变化

邱然¹, 杨文洲¹, 张春玲², 赵长新¹, 闵建³

(1. 大连工业大学生物与食品工程学院, 辽宁大连 116034; 2. 东北电力大学应用技术学院 吉林省吉林 130012; 3. 大连产品质量监督检验所, 辽宁大连 116021)

摘要:以两个大麦品种垦啤8号和 Harrington 为材料研究了大麦种子萌发过程中体内醇溶性蛋白质、游离氨基酸和内肽酶活力的变化。垦啤8号大麦种子的醇溶蛋白含量高,但其降解量比 Harrington 多。垦啤8号游离氨基酸增长量略高于 Harrington。整个大麦种子发芽期间,国产品种内肽酶活力始终高于进口品种。以上表明,与 Harrington 相比,虽然国产品种垦啤8号含氮量高,但其内肽酶活力升高快,最大酶活力高,醇溶蛋白降解、转化为可输出氮的进程快,有制造优质麦芽的潜力。

关键词: 萌发; 内肽酶; 醇溶蛋白; 游离氨基酸

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Changes in Endopeptidase Activity, Content of Hordein and Free Amino Acids in Barley Seeds during Germination

QIU Ran¹, YANG Wen-zhou¹, ZHANG Chun-ling², ZHAO Chang-xin¹, MIN Jian³

(1. College of Biotechnology and Food Technology, Dalian Polytechnic university, Dalian 116034, China; 2. North-east DianLi University, Jilin 130012, China; 3. Dalian Product Quality Supervision and Testing Institute, Dalian 116021, China)

Abstract: Two species barleys, *Hordeum* sp. Kenpi No. 8 and *Hordeum* sp. Harrington were used to study changes in contents of hordein, free amino acids and endopeptidase activity during germination. Results showed that the content of hordein in Kenpi 8 was higher than that of Harrington, but decreased faster. The same tendency of free amino acids and endopeptidase activity appeared in the two species barleys during germination. It implied that, compared with Harrington, the procedures of hordein break down and transfer to transportable nitrogen in Kenpi 8 was higher and faster during germination, and this maybe an important reason of Kenpi 8 has potential to make high-quality malt.

Key words: germination; endopeptidase; hordein; free amino acid

收稿日期: 2006-11-29.

基金项目: 辽宁省高校发酵工程重点实验室开放课题项目(2004LN-FJ-004).

作者简介: 邱然(1981-), 男, 满族, 辽宁丹东人, 植物生理生化硕士研究生.

通讯作者: 赵长新(1955-), 男, 河北保定人, 教授, 主要从事微生物代谢机理研究. Email: zhaochangxin@126.com

种子萌发过程中,出现各种蛋白质的表达^[1]。蛋白质是大麦的主要组成之一,它在种子萌发过程中扮演着极其重要的角色,为种子生长发育提供养料,还调控着种子的各种生理生化反应和代谢过程,为种子自身的形成及植株的生长提供了必不可少的条件^[2]。在制麦工业中,种子发芽后,蛋白的溶解量很大,如果溶解不足,便会对啤酒酿造造成困难,并最终影响啤酒质量^[3,4]。在麦芽生产中,由于蛋白酶数量的增加,胚乳的储存蛋白会大量溶解,非蛋白氮水溶性蛋白组分增加,氮物质在糊粉层和发育的芽胚中进行生物合成。蛋白酶从发芽初便开始发挥作用,尤其作用于胚乳细胞的大麦醇溶蛋白组分。蛋白酶是在发芽过程中合成的。酶的作用主要通过内肽酶来实现。在种子萌发过程中内肽酶活性变化及其变化对醇溶蛋白降解和麦芽质量的影响还未见有详尽报道,本文以国产及进口优质啤酒大麦垦啤8号和Harrington材料对酿造大麦种子萌发过程中醇溶蛋白含量、游离氨基酸含量和内肽酶活力的变化进行了研究,以期找出它们的变化与种子萌发和麦芽质量之间的关系。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

大麦品种:进口品种加拿大大麦 *Hordeum sp.* Harrington;大连中粮麦芽有限公司提供;国产品种垦啤8号 *Hordeum sp.* NO. 8;北大荒麦芽集团提供。

1.2 试验方法

1.2.1 麦芽制备 采用浸水4 h后断水8 h的方法浸麦48 h,并使其最终浸麦度达到44%~47%。然后取出大麦,进入发芽阶段,控制温度为16℃,湿度90%以上。发芽4 d后焙焦制成麦芽^[4]。从浸麦开始分别取发芽0,24,48,72,96,120,144 h的大麦及麦芽(170 h)样品,用去离子水反复冲洗5遍,备用。

1.2.2 醇溶蛋白质含量测定 用考马斯亮蓝G-250溶液进行显色、比色,标准曲线用小牛血清蛋白制作^[6]。

1.2.3 游离氨基酸含量测定 用茚三酮溶液显色法测定植物组织中氨基酸总量^[6]。

1.2.4 内肽酶活力的测定 根据Reimerdes^[7]的方法,每1mg蛋白质在1 h内的 A_{570} 变化表示内肽酶活力的大小。

1.2.5 醇溶蛋白的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 取0.1 g去皮种子,研磨成粉末,转移至1.5 mL离心

管中,加入1 mL提取液室温下提取24 h。4℃、15 000×g下离心15 min。提取液为体积分数70%乙醇(内含少许β-巯基乙醇和PSMF)。将上清液用缓冲液定容至5 mL,取定容后的样品100 μL加100 μL样品缓冲液(125 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 4% SDS, 20% glycerol, 10% Mercaptoethanol)。混匀后,在沸水浴煮沸3~5 min,取20 μL立即上样。用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离样品(凝胶浓度为12%)。电泳完成后,经染色、脱色、照相后用Image J凝胶成像分析系统对醇溶蛋白大小亚基条带进行分析^[9]。

2 结果与分析

2.1 大麦种子基本指标检测

由表1可看出,国产品种垦啤8号在千粒重、含水率及总氮含量方面均低于进口品种Harrington,两品种的发芽力指标相同。

表1 大麦种子基本指标检测

	千粒 质量/g	含水 率/%	发芽 力/%	总氮/%
垦啤8号	41.04	8.16	95	11.68
Harrington	42.06	8.76	95	10.76

2.2 大麦种子萌发过程中醇溶蛋白含量变化

对大麦蛋白的体内合成过程进行研究,发现大麦醇溶蛋白和谷蛋白是在谷物成熟后期合成并沉淀于蛋白体和包被在淀粉颗粒外,胚乳细胞中醇溶蛋白将淀粉颗粒包裹起来^[9]。如果在种子萌发过程中醇溶蛋白不完全降解,将对淀粉降解酶的移动形成物理屏障,从而限制淀粉水解^[10],严重削弱了种子的生理功能。同时未降解的醇溶蛋白在淀粉糖化过程中也可以形成二硫键结合的复合物,将导致麦汁过滤困难问题,并降低麦芽浸出率^[3]。深入研究大麦醇溶蛋白,将对制麦及啤酒酿造行业有重要意义,对研究遗传与育种也有一定的意义。

从图1可以看出,垦啤8号每克种子中醇溶蛋白质量为18.4 mg,高于Harrington 16.6 mg。从种子浸水开始,醇溶蛋白含量开始缓慢减少。萌发72~96 h,这两个品种醇溶蛋白含量迅速下降。在萌发90 h之前,垦啤8号醇溶蛋白水平一直高于进口品种Harrington。90 h后,垦啤8号醇溶蛋白水平开始低于Harrington,这种状态一直保持到发芽结束。焙焦结束,每克垦啤8号麦芽中醇溶蛋白质量为9.2 mg,比原麦减少了50%;每克Harrington麦芽中质量为10.2 mg,比原麦减少了38.6%。可

见,在大麦种子萌发过程中,垦啤8号醇溶蛋白降解量远远大于进口品种 Harrington。一般认为,国产大麦总氮含量较高,不利于制造啤酒麦芽,这主要是因为麦芽含氮量与浸出率呈显著负相关^[11-13]。然而由本实验可明显看出,虽然国产品种原麦含氮量较高,但经适当工艺萌发后其醇溶蛋白降解量大,仍然能制造出含氮量低的优质麦芽,这进一步证明了赵长新^[14]等人的研究,国产大麦在制麦中的应用将有很大潜力。

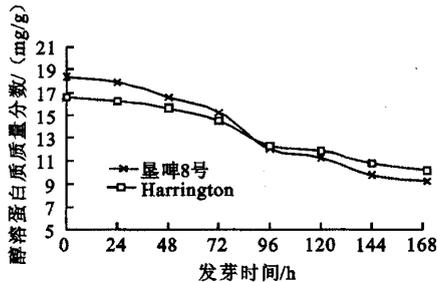


图1 大麦种子萌发过程中醇溶蛋白质量变化

Fig. 1 Changes in hordein content in barley seeds during germination

2.3 大麦种子萌发过程中游离氨基酸质量变化

氨基酸质量的变化受到其净生成速度(主要是蛋白质降解和氨基酸从头合成速度)及外运速度和新蛋白质合成利用速度的影响,因此氨基酸质量在一定程度上与蛋白质的变化相联系(图2)。在种子萌发前48 h,即浸断水阶段,游离氨基酸含量缓慢升高,Harrington游离氨基酸升高幅度高于垦啤8号,垦啤8号游离氨基酸质量分数由26.4 $\mu\text{g/g}$ 升高到35.2 $\mu\text{g/g}$,Harrington由23.8 $\mu\text{g/g}$ 升高至39.3 $\mu\text{g/g}$ 。48 h到144 h,即种子的发芽阶段,游离氨基酸含量逐渐迅速增高,垦啤8号在60 h后即超过Harrington,这种状态一直保持到最后,在发芽结束时垦啤8号游离氨基酸含量达到149.8 $\mu\text{g/g}$,Harrington达到134.6 $\mu\text{g/g}$ 。在绿麦芽焙焦阶段,两个品种游离氨基酸含量仍有缓慢增长,分别在结束时达到最大值,垦啤8号为154 $\mu\text{g/g}$,高于Harrington 143 $\mu\text{g/g}$ 。由图1得知,垦啤8号醇溶蛋白降解量高,这与其游离氨基酸水平增长量正相关。

2.4 大麦种子萌发过程中内肽酶活力变化

在大麦种子浸断水的前24 h,内肽酶活力增长缓慢。这一阶段主要是吸水阶段,种子体内含水率升至30%左右^[15],动员与萌发有关的各种水解酶类的形成及酶活力的提高。接下来的48 h,是种子内肽酶活力快速升高的阶段。这一时期,垦啤8号

和Harrington的内肽酶活力分别由6.4和3.9 L高至87.6和64.9。从72 h到发芽结束,内肽酶活力仍有缓慢提升。发芽结束,两个品种酶活力都达到最高。由内肽酶活力变化曲线(图3)看出,整个大麦种子发芽期间,国产品种酶活力始终高于进口品种,这与赵长新等人的观点相符^[16]。利用国产大麦制麦,虽然种皮厚,但容易过滤;蛋白含量高,但酶活力也高,可以增加辅料的添加比例,降低啤酒酿造成本。

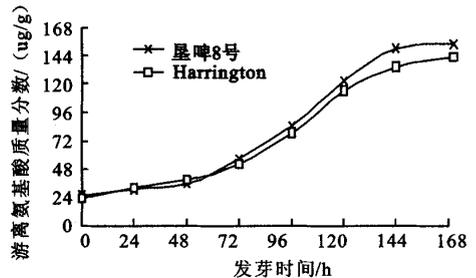


图2 大麦种子萌发过程中游离氨基酸含量变化

Fig. 2 Changes in free amino acids content in barley seeds during germination

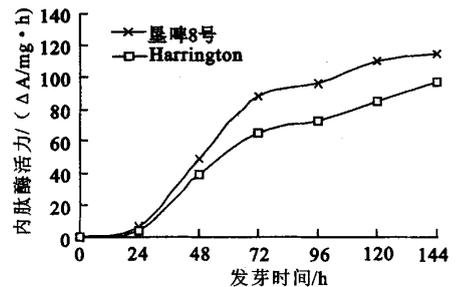


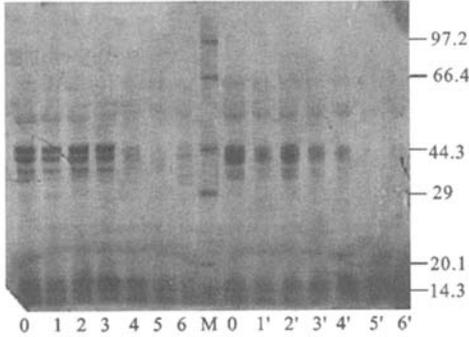
图3 大麦种子萌发过程中内肽酶活力变化

Fig. 3 Changes in endopeptidase activity in barley seeds during germination

2.5 大麦萌发过程中醇溶蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

从图4可以看出,垦啤8号大麦比Harrington大麦在凝胶图谱上条带清晰。通过凝胶成像分析软件Image J分析表明,在大麦发芽的0~3 d,垦啤8号蛋白含量高于Harrington,而发芽4~6 d正与此相反,这与图1用考马斯亮蓝G-250法所测结果一致,也说明垦啤8号内肽酶对其醇溶蛋白降解和外运多于Harrington。大麦醇溶蛋白在其SDS-PAGE图谱上显示,中低分子量蛋白含量较多。通过对比两个品种大麦醇溶蛋白组成发现,在29 000~443 00间,Harrington较垦啤8号有更多的蛋白条带,在66 400附近,呈现出Harrington含有而垦啤8号没有的条带,在低于201 00的蛋白亚基中,

两品种条带组成基本相同。两品种醇溶蛋白组成的不同,是由品种遗传所决定。两个品种在发芽 4~6 d 醇溶蛋白含量的减少,主要体现在中高分子量蛋白条带的缺失上,低于 201 00 蛋白亚基组成及含量与发芽前 3 d 大致相同,这说明在种子萌发过程中,内肽酶主要作用中高分子量醇溶蛋白,降解为低相对分子质量肽类及氨基酸。



泳道 0~6, 垦啤 8 号原麦、发芽 1 d, …… , 发芽 6 d; M, 标准蛋白 Marker, 相对分子质量为 14 300、201 00、29 000、44 300、66 400、97 200; 泳道 0~6', Harrington 原麦、发芽 1 d, …… , 发芽 6 d。

图 4 大麦种子中醇溶蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE of hordein in barley seeds

3 结 语

种子萌发包括胚的萌动与生长和胚乳中贮藏产物的动员。种子的贮藏物质需要经过分解后,才能以可利用的方式动员到胚中去,以支持胚的迅速生长,这样就需要一些分解酶类的迅速合成。作物种子萌发时,内肽酶活性迅速上升,种子蛋白质出现明显的降解。

大麦种子萌发过程中或在制麦过程中一个本质的变化是蛋白质含量及组成的改变,其中大麦醇溶蛋白水平的下降最为明显。醇溶蛋白是重要的

蛋白源,其含量占可溶性蛋白质的 50% 以上。在种子萌发进程中,蛋白质特别是醇溶蛋白适时适量地降解并有效地向正在发育的器官和组织中运输,对后者的生长发育十分重要。因为这些被降解的蛋白质不仅仅是提供氮源,更重要的是这些氮源是合成新蛋白质特别是各种各样酶的原料,正是在这些新蛋白质的参与下使得新器官的发育得以有条不紊地进行。叶片中蛋白质的降解主要由内肽酶起作用^[5],种子萌发过程中内肽酶活性的变化直接影响到蛋白质(主要是醇溶蛋白)的降解和转运。从醇溶蛋白含量变化曲线(见图 1)和内肽酶活力变化曲线(见图 2)可看出,醇溶蛋白的降解量与内肽酶活力的升高正相关,国产品种垦啤 8 号虽然蛋白含量高,特别是醇溶蛋白含量高于加麦 Harrington,但垦啤 8 号内肽酶活力比 Harrington 提前达到最大值,且在整个发芽过程中,其酶活力一直高于 Harrington,这就使得垦啤 8 号大麦有制造优质麦芽的潜力。蛋白质大分子必须降解成小分子才能在植物体内不同部分有效地运输,内肽酶活性的高低直接影响到蛋白质的降解从而影响到氮的转运。从内肽酶活性变化来看,垦啤 8 号内肽酶的活力始终高于 Harrington,这样就加速了蛋白质的降解,有利于蛋白向胚中转移,醇溶性蛋白质的电泳结果也证实了这一点。种子内游离氨基酸水平的变化与蛋白质含量多少、内肽酶活性高低、分解速度、合成速度和外运速度的快慢有关。两品种游离氨基酸含量变化趋势基本一致,从萌发 24 h 之后开始同时上升,这与萌发期内它们的内肽酶活性基本同时升高和醇溶蛋白降解相一致。大麦蛋白质尤其是醇溶蛋白的降解无疑是评价能否制出优质麦芽的一个重要指标,因此,如何调节萌发期内大麦种子中内肽酶活性,使醇溶蛋白适当地降解并向胚中运输适量的氮,将成为种子萌发机理研究及制麦科技和遗传育种的一个重要方面。

参考文献(References):

- [1] Bewley J D, Black M. *Seeds Physiology of Development and Germination*[M]. New York: Plenum Press, 1994.
- [2] Shewry P R, Casey R. *Seed Proteins*[M]. Dordrecht: Kluwer Academic, 1999.
- [3] Moonen J H E, Grabeland A, Muts G C J. The molecular structure of gel protein from barley, its behavior in wort filtration and analysis[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 1987(93):125-130.
- [4] Howard K A. The relationship between D hordein and malting quality in barley[J]. *Journal of Cereal Science*, 1996(24): 47-533.
- [5] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle

- of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, (72): 248-254.
- [6] 管敦仪. 啤酒工业手册(中册)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998(7): 190-192.
- [7] Reimerdes E H, Klostermeyer H. Determination of proteolytic activities of casein substrates. In: Lorand L. *Methods in Enzymology*. Vol. 45[M]. New York: Academic Press, 1976. 26-28.
- [8] 王银改. Image J 软件在检验医学图像分析处理中的应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(7): 747-748.
WANG Yin-gai. Application of Image J in medical image processing[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2005, 28(7): 747-748. (in Chinese)
- [9] Brennan C S, Smith D B, Harris, N, et al. The production and characterization of Hor3 null lines of barley provides new information on the relationship of D hordein to malting performance [J]. *Journal of Cereal Science*, 1998(28): 291-299.
- [10] Smith D B, Lister P R. Gel-forming proteins in barley grain and their relationships with malting quality[J]. *Journal of Cereal Science*, 1983(1): 229-239.
- [11] Bishop L R, Day F E. The effect of variety on the relation between nitrogen content and extract[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 1993, 99: 545-551.
- [12] Seew ard B. The essential requirements of barley form aking brewing and distilled malts [J]. *The Maltsters View Ferment*, 1990, 3: 50-54.
- [13] Smith D B. Barley seed protein and its effects on malting and brewing quality[J]. *Plant Var Seeds*, 1990, 3: 63-80.
- [14] 刘耀平, 赵长新, 王培忠, 等. 适合东北种植的垦啤2号大麦制麦工艺[J]. *大连轻工业学院学报*, 2000, 19(2): 112-117.
LIU Yao-ping, ZHAO Chang-xin, WANG Pei-zhong, et al. Malting process of hordeum sp. kenpi No. 2 barley from northeast china[J]. *Journal of Palian Institute of Light Industry*, 2000, 19(2): 112-117. (in Chinese)
- [16] 皮向荣, 赵长新, 邱然, 等. 青稞萌发中两种淀粉酶的研究[J]. *酿酒科技*, 2005, 138(12): 60-62.
PI Xiang-rong, ZHAO Chang-xin, QIU Ran, et al. Research on two kinds of amylase in tibetan barley germination[J]. *Liquor-Making Science & Technolgy*, 2005, 138(12): 60-62. (in Chinese)
- [17] 赵长新, 窦少华, 孙付保. 国产垦啤22号大麦制麦酶系的影响因素[J]. *无锡轻工大学学报: 食品与生物技术*, 2004, 23(3): 73-84.
ZHAO Chang-xin, Dou Shao-hua, SUN Fu-bao. Factors and mechanism influencing the enzyme activity of Chinese barley kenpi No. 2[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2004, 23(3): 73-84. (in Chinese)

(责任编辑: 杨萌)