

外源植物激素对大麦抗菌蛋白的影响

栾南, 赵长新

(大连工业大学生物工程学院, 辽宁 大连 116034)

摘要: 通过在制麦的浸麦阶段添加赤霉素(GA₃)、脱落酸(ABA)、细胞分裂素(6-BA)3种植物激素,考察外源植物激素与大麦抗菌蛋白的关系。结果表明,在发芽结束时,添加GA₃的实验组中,0.05 mg/L实验组抗菌蛋白含量最高(为566.6 μg/g),0.5 mg/L实验组蛋白含量最低;在添加ABA的实验组中,20 mg/L的实验组抗菌蛋白含量最高,为514.9 μg/g,40 mg/L蛋白含量最低;在添加6-BA的实验组中,20 mg/L的实验组抗菌蛋白含量最高(为484.4 μg/g),10 mg/L的最低。

关键词: 植物激素; 大麦; 抗菌蛋白

中图分类号: TS262.5; TS261.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2012)09-0065-03

Effects of Exogenous Plant Hormones on Antibacterial Protein Content of Barley

LUAN Nan and ZHAO Changxin

(School of Bioengineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

Abstract: Three plant hormones including GA₃, ABA and 6-BA were added respectively during barley steeping. At the end of malting, in GA₃-added experimental groups, the content of antibacterial protein was the highest (566.6 μg/g) as the addition level was 0.05 mg/L and the lowest as the addition level was 0.5 mg/L; in ABA-added groups, the content of antibacterial protein was the highest (514.9 μg/g) as the addition level was 20 mg/L and the lowest as the addition level was 40 mg/L; in 6-BA-added groups, the content of antibacterial protein was the highest (484.4 μg/g) as the addition level was 20 mg/L and the lowest as the addition level was 10 mg/L.

Key words: plant hormones; barley; antibacterial protein

大麦抗菌蛋白是一类小分子多肽,包括硫堇、植物防御素、ns-LTP等^[1],其中ns-LTP是主要活性成分。大麦抗菌蛋白能够抑制真菌,尤其是酵母的生长,具有耐热性,能够经受啤酒生产中麦汁煮沸温度而不变性,从而进入啤酒发酵中,影响酵母生长代谢,使发酵周期延长,导致企业生产成本增加^[2]。大麦抗菌蛋白是由诱导产生的,外界的特定环境因素能够诱导大麦抗菌蛋白基因的表达^[3],从而进行免疫调控。

植物在自然界生长中,免疫系统经过不断进化完善,形成了复杂、高效多重防御反应体系。研究表明,植物激素在植物防御反应网络中同样起着重要作用^[4]。植物激素如水杨酸、茉莉酸素、乙烯是诱导防御信号路径的主要信号^[5]。

外源植物激素作为植物生长调节剂,被广泛用于农业生产、植物离体组织培养、制麦等领域,而同样是参与植物免疫防御,植物激素与抗菌蛋白之间的联系目前尚未有研究。因此,本试验尝试在大麦发芽过程中添加适当

浓度梯度的植物激素,检测大麦抗菌蛋白含量的变化,探讨植物外源激素与大麦抗菌蛋白之间的联系,从而为进一步研究抗菌蛋白提供相应理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

材料:法国大麦(Sebastian),中粮麦芽(大连)有限公司。

试剂:赤霉素(GA₃)、脱落酸(ABA)、细胞分裂素(6-BA)(sigma);其余试剂均为分析纯。

仪器:Jeo White微型制麦设备,澳大利亚Jeo White公司;DHG-9070电热鼓风干燥箱,上海海向仪器厂;高速多功能粉碎机,上海市久品工贸有限公司;SIM-F124制冰机,日本三洋制冷;WFJ7200可见分光光度计,尤尼柯仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 制麦

每份大麦为300 g,与无菌水以1:2.5比例浸麦,放

收稿日期:2012-05-02

作者简介:栾南(1987-),男,河南南阳人,硕士研究生,研究方向:大麦蛋白组学。

通讯作者:赵长新(1955-),教授,硕士生导师。

入微型制麦设备内培养。浸麦工艺采用 5 h→10.5 h→5.5 h→3 h,共 24 h,发芽 96 h,温度 16 °C,湿度 90 %。

1.2.2 激素的添加

本实验选择添加的激素为:赤霉素(GA₃)、脱落酸(ABA)、细胞分裂素(6-BA),记为实验组,不添加激素的为空白对照组。

添加方式:在浸麦最后一次浸水时添加。每个激素选取 4 个不同浓度添加。

1.2.3 麦芽样品的处理

将样品鼓风干燥(35 °C,24 h),磨粉后,过 50 目筛,收集麦芽粉^[6]。

1.2.4 大麦抗菌蛋白的提取

采用冰浴浸提,硫酸铵分级沉淀方法^[7]。

1.2.5 抗菌蛋白的测定

采用考马斯亮蓝法检测,牛血清白蛋白作为标准蛋白质^[8]。

1.2.6 SDS-PAGE 分析

将硝酸纤维素膜过滤的抗酵母蛋白液用作电泳分析。采用不连续电泳方法,15 %分离胶,5 %浓缩胶,电泳凝胶使用考马斯亮蓝 R250 染色^[9]。

2 结果与分析

2.1 激素对大麦抗菌蛋白含量影响

2.1.1 赤霉素 GA₃ 对大麦抗菌蛋白含量的影响

赤霉素是植物内源激素中种类最多、生理功能最广的一种激素^[10]。如图 1 所示,抗菌蛋白含量在大麦发芽期间变化较为明显,发芽结束时,低浓度(0.05 mg/L) GA₃ 实验组蛋白含量最高,为 566.6 μg/g;5.00 mg/L 实验组次之,为 543.5 μg/g;50.0 mg/L 实验组蛋白含量为 522.1 μg/g;0.5 mg/L 实验组最低,为 499 μg/g。空白对照组蛋白含量为 510 μg/g。

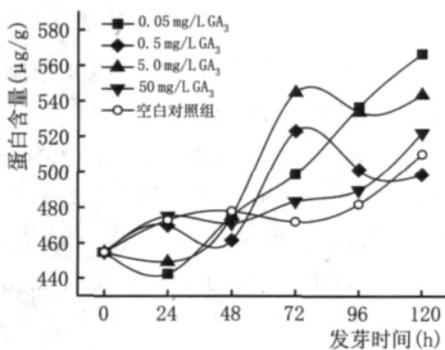


图 1 GA₃ 对大麦抗菌蛋白含量影响

赤霉素对大麦具有促进生长的作用,当浓度为 0.5 mg/L 时,促进大麦的发芽,抗菌蛋白没有被有效表达,但浓度升高时,会影响大麦的正常生理代谢,使其处于不利环境。低浓度赤霉素可使抗菌蛋白含

量提高,减少不利环境对大麦生长的影响。

2.1.2 脱落酸 ABA 对大麦抗菌蛋白含量的影响

脱落酸(ABA)是调控植物生长发育的一种激素,对提高植物对逆境胁迫的适应性有重要作用^[11]。图 2 为 ABA 对大麦抗菌蛋白含量的影响。

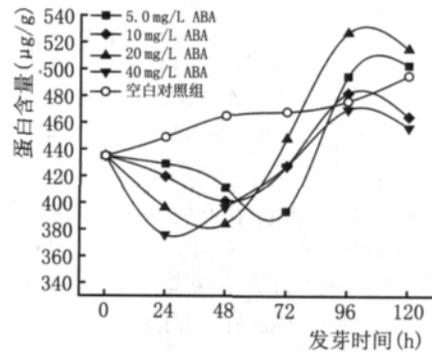


图 2 ABA 对大麦抗菌蛋白含量影响

由图 2 可看出,发芽过程中 ABA 对大麦生长产生抑制作用,使得主要水解酶系活性降低,发育减慢。发芽结束时,20.0 mg/L 实验组 ABA 蛋白含量最高,为 514.9 μg/g;5.0 mg/L 次之,为 502.6 μg/g;空白为 495 μg/g;10 mg/L 实验组为 464.4 μg/g;40 mg/L 实验组蛋白含量最低,为 456.3 μg/g。高浓度的 ABA 能有效抑制大麦抗菌蛋白基因表达,减少其含量。

2.1.3 细胞分裂素 6-BA 对大麦抗菌蛋白含量的影响

细胞分裂素具有促进细胞分裂与伸长、种子萌发、调控营养物质运输、打破种子休眠等功能^[12]。ABA 能够促进种子生长,主要是根的伸长,水解酶活性的提高,蛋白的合成分解十分迅速。6-BA 对大麦抗菌蛋白含量的影响结果见图 3。

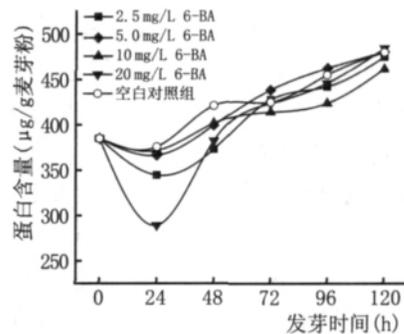


图 3 6-BA 对大麦抗菌蛋白含量影响

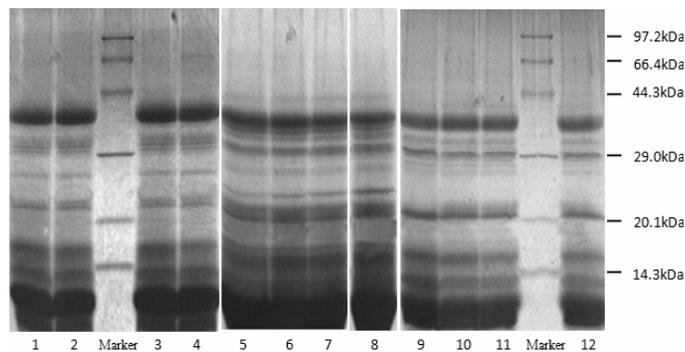
从图 3 来看,ABA 对大麦抗菌蛋白含量的影响不明显。发芽结束时,4 个组所测抗菌蛋白含量区别不大,与空白对照也较为接近,蛋白含量区分不如上述 2 种激素明显。

发芽结束时,20 mg/L 实验组蛋白含量最高,为 484.4 μg/g;5.0 mg/L 实验组次之,为 480.3 μg/g;空白组为 480 μg/g;2.5 mg/L 实验组蛋白含量为 474.9 μg/g;

10 mg/L 浓度实验组最低,为 461.3 $\mu\text{g/g}$ 。

2.2 大麦发芽过程添加激素对抑菌蛋白分泌量 SDS-PAGE 分析

从添加 3 种外源植物激素溶液样品提取抗菌蛋白,其 120 h 抗菌蛋白 SDS-PAGE 图谱见图 4。



注:泳道 1-4,5-8,9-12 分别为赤霉素(GA_3)、脱落酸(ABA)、细胞分裂素(6-BA)浓度从低到高 4 组样品蛋白。

图 4 120 h 抗菌蛋白 SDS-PAGE 图谱

由图 4 可看出,从添加 3 种外源植物激素溶液样品中所提取的抗菌蛋白条带位置基本相同,分子量大约在 40 kDa 与 16 kDa 之间。分子量为 40 kDa 的蛋白是蛋白质^[1],分子量为 16 kDa 的蛋白是 Ns-LTP^[13],二者均有抗菌活性,能够有效抑制真菌生长。还有硫堇、植物防卫素等成分,由于它们分子量较小(5 kDa 左右),所以在电泳图上没有显示出来,15 kDa 分子量以下的条带大部分为大麦淀粉酶抑制剂^[14],其余为杂蛋白。

3 结论

制麦过程中添加赤霉素已经成为成熟工艺,但其他植物激素对大麦抗菌蛋白影响的研究目前很少。不同浓度的赤霉素(GA_3)、脱落酸(ABA)、细胞分裂素(6-BA)能够影响大麦的发芽进程,对大麦抗菌蛋白含量产生影响,0.05 mg/L 的赤霉素(GA_3),20 mg/L 的脱落酸(ABA),20 mg/L 的细胞分裂素(6-BA),能使大麦抗菌蛋白含量提高,分别可达 566.6 $\mu\text{g/g}$ 、514.9 $\mu\text{g/g}$ 、484.4 $\mu\text{g/g}$,与空白对照组相比,提高 11.1%、4%、3.1%;0.5 mg/L 的

GA_3 ,40 mg/L 的 ABA、10 mg/L 的 6-BA 能够有效降低大麦抗菌蛋白含量,这为减轻大麦抗菌蛋白从而减少对酵母发酵过程的影响提供了一个新的思路。

参考文献:

- [1] Gorjanović S, Sužnjević D, Beljanski M, et al. Effects of lipid transfer protein from malting barley on brewers yeast fermentation[J]. Inst. Brew, 2004,110:297-302.
- [2] Kenneth A L, Graham G S, Ian P M. Beer polypeptides and silica gel. Part . Polypeptides involved in foam formation[J].Journal of the Institute of Brewing,2003,109(1):73-79.
- [3] Boutrot F, Guirao A, Alary R, et al. Wheat non-specific lipid transfer protein genes display a complex of expression in deceloping seeds[J].BiochimBiophys Acta,2005,1730(2):114-125.
- [4] 张增艳,陈洋,邵艳军.植物激素调控植物防御反应的研究进展[J].作物杂志,2009(6):13-16.
- [5] 李文琴,贺长征,阎富英,等.植物生长调节剂与抗生素在种子处理中的应用[J].天津农业科学,2002,8(2):31-34.
- [6] 李珊,官斌,荀娟,等.制麦过程中添加金属离子与赤霉素对大麦发芽过程淀粉酶系影响的研究[J].食品与发酵工业,2009,35(1):82-86.
- [7] 姜晓雷,韩丹,李明达,等.几种麦芽抗酵母菌粗蛋白含量比较及性质分析[J].食品工业科技,2011(2):112-114.
- [8] 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.
- [9] 郭尧君.蛋白质电泳试验技术[M].北京:科学出版社,2005:58-76.
- [10] 钱静亚,肖香,黄达明,等.赤霉素对发麦制麦特性的影响[J].中国酿造,2009,(4):38-42.
- [11] 刘璞,陈珈.植物激素脱落酸的信号转导[J].植物生理学通讯,2000,36(2):165-166.
- [12] 王三根.细胞分裂素在植物抗逆和延衰中的作用[J].植物学通报,2000,17(2):121-126.
- [13] Gorjanović S, Spillner E, Beljanski M, et al. Malting Barley Grain Non-specific Lipid-Transfer Protein (ns-LTP):Importance for Grain Protection[J].Inst Brew,2005,111(2):99-104.
- [14] 孙俊,徐凯,孙丽华,等.四种大麦间泡沫蛋白质含量差异的比较[J].食品科学,2009,30(3):180-183.

(上接第 64 页)

- [10] Kimura M.A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J].J Mol Evol,1980:111-120.
- [11] Saitou N,Nei M.The neighbor-joining method:a new method for reconstructing phylogenetic trees[J].Mol Biol Evol,1987:406-425.
- [12] Stackebrandt E.Ebers,J.Taxonomic parameters revisited:tarnished gold standard[J].Microbiol Today,2006,33:152-155.
- [13] Devereux R,He S H ,Doyle C L et al,1990. Diversity and origin of Desulfovibrio species:phylogenetic definition of a family

- [J].Bacteriol,172(7):3609-3619.
- [14] Vaishampayan P,Miyashita M Ohnishi A et al;Description of rummeliibacillus stabekissi gen.nov.,sp.nov.and reclassification of Bacillus pycnus Nakamura et al.2002 as Rummeliibacillus pycnus comb.nov[J].Int J Syst Evol Microbiol, 2009,59(5):1094-1099.
- [15] 周新虎,陈翔,李燕荣,等.洋河大曲主要菌系的研究[J].酿酒科技,2011(9):56-59.
- [16] 张明春,曹敬华,向苇,等.白云边酿酒大曲微生物分析研究[J].酿酒科技,2010(2):65-67.