

# 不同谷物籽粒木聚糖酶抑制蛋白活性的分布特征研究

张俊丽<sup>1,2</sup>, 张亚坤<sup>1</sup>, 刘新育<sup>1</sup>, 王明道<sup>1</sup>, 刘亮伟<sup>1</sup>, 陈红歌<sup>1</sup>

(1. 河南农业大学 生命科学院 农业部农业微生物酶工程重点实验室 河南 郑州 450002; 2. 新乡医学院 三全学院 河南 新乡 453003)

**摘要:** 为准确了解谷物中木聚糖酶抑制蛋白活性的存在情况, 从而进一步分析这种抑制蛋白活性对谷物加工中外加木聚糖酶可能产生的负面影响。选取小麦、大麦、黑麦、绿粒小麦、荞麦、燕麦、玉米、水稻和高粱 9 种常见的谷物为材料, 测定了其籽粒以及籽粒不同部位木聚糖酶抑制蛋白的活性。结果表明, 木聚糖酶抑制蛋白活性在小麦、黑麦、绿麦和荞麦中较高, 分别为 4.27、4.76、4.18、3.61 IA/mg; 在大麦、燕麦中较低, 分别为 0.54、0.87 IA/mg; 玉米、水稻和高粱中没有发现木聚糖酶抑制蛋白活性。进一步选取木聚糖酶抑制蛋白活性较高的小麦、黑麦和绿粒小麦, 分别测定其种皮、胚和胚乳中的木聚糖酶抑制蛋白活性。结果显示, 小麦种皮、胚和胚乳中的木聚糖酶抑制蛋白活性分别是 0.06、3.67、4.47 IA/mg; 黑麦种皮、胚和胚乳中的木聚糖酶抑制蛋白活性分别是 1.70、5.42、5.39 IA/mg; 绿粒小麦种皮、胚和胚乳中的木聚糖酶抑制蛋白活性分别是 0.506、4.57 IA/mg。3 种麦类表现出一致的结果, 即木聚糖酶抑制蛋白活性在胚和胚乳中基本持平, 并且远高于种皮。

**关键词:** 谷物; 籽粒; 木聚糖酶抑制蛋白; 活性; 分布

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)01-0140-04

## Distribution Characteristics of Xylanase Inhibitor Protein Activity in Different Cereal Kernels

ZHANG Jun-li<sup>1,2</sup>, ZHANG Ya-kun<sup>1</sup>, LIU Xin-yu<sup>1</sup>, WANG Ming-dao<sup>1</sup>, LIU Liang-wei<sup>1</sup>, CHEN Hong-ge<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, China; 2. Sanquan College of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

**Abstract:** To obtain the accurate information about the activity of xylanase inhibitor protein in different cereals and further investigate its potential negative effect on the function of exogenous xylanase used in cereal processing, the kernels of 9 commonly planted cereals including wheat, barley, rye, green wheat, buckwheat, oats, corn, rice and sorghum were selected as experimental materials to study the xylanase inhibitor protein activity and the activity distribution in different fractions. The results showed that the xylanase inhibitor protein activity in wheat, rye, green wheat and buckwheat (4.27, 4.76, 4.18 and 3.61 IA/mg) was much higher than in barley and oats (0.54 and 0.87 IA/mg). The xylanase inhibitor protein activity were not detected in corn, rice and sorghum. Then wheat, rye and green wheat with higher xylanase inhibitor activity were further used to determine the distribution of xylanase inhibitor protein activity in different fractions of kernel. The inhibiting activity in seed coat, embryo and endosperm were 0.06, 3.67 and 4.47 IA/mg in wheat respectively, 1.70, 5.42 and 5.39 IA/mg in rye respectively, and 0.506, 4.57 IA/mg in green wheat respectively. It was concluded that the xylanase inhibitor protein activity was much higher in the embryo and endosperm than in the seed coat.

**Key words:** Cereal; Kernels; Xylanase inhibitor protein; Activity; Distribution

内切  $\beta$ -1,4-木聚糖酶 (EC 3.2.1.8, 以下简称木聚糖酶) 能专一性水解木聚糖的  $\beta$ -1,4-木糖苷键<sup>[1]</sup>。

收稿日期: 2012-11-16

基金项目: 河南省重点科技攻关项目 (072102220001)

作者简介: 张俊丽 (1982-), 女, 河南商丘人, 硕士, 主要从事微生物酶工程研究。

通讯作者: 陈红歌 (1967-), 女, 河南许昌人, 教授, 博士, 主要从事酶学研究。

木聚糖是组成植物细胞壁的主要成分。微生物发酵生产的木聚糖酶已广泛用于麦型饲料添加、面包加工等领域。近年来,在小麦、玉米等不同谷物中发现了木聚糖酶抑制蛋白的存在,这些抑制蛋白对谷物自身的木聚糖酶不起作用,而特异性地抑制外源木聚糖酶的活性。由于其对外源木聚糖酶功效的影响,有关木聚糖酶抑制蛋白的研究日益深入。目前已从小麦中纯化得到3种类型木聚糖酶抑制蛋白,即 TAXI(*Triticum aestivum* xylanase inhibitor)<sup>[2]</sup>、XIP(Xylanase inhibitor protein)<sup>[3]</sup>、TLXI(Thaumatococcus-like xylanase inhibitor)<sup>[4]</sup>。不同类型的抑制蛋白分子量、等电点有所不同,对木聚糖酶的抑制特异性也有差异。许多研究表明,谷物中木聚糖酶抑制蛋白的存在与植物抵御病原菌的入侵有关<sup>[5-6]</sup>。

已有研究证实,在木聚糖酶应用领域,如面包加工<sup>[3]</sup>、饲料加工<sup>[7]</sup>、小麦谷朊粉-淀粉分离<sup>[8-9]</sup>等,谷物中木聚糖酶抑制蛋白的存在会导致木聚糖酶作用效率降低,影响谷物加工过程或谷物饲料的利用率。为准确了解谷物中木聚糖酶抑制蛋白对谷物加工过程的阻碍作用,从而采取措施最大程度地发挥木聚糖酶的功效,本研究分析了不同谷物中木聚糖酶抑制蛋白的存在状况及分布特征,拟为后续研究提供基础数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 谷物材料

黑麦、燕麦、绿麦、荞麦、水稻、高粱均购自郑州市种子市场;小麦和大麦分别由国家小麦工程技术研究中心的牛吉山老师和牛洪斌老师惠赠;玉米由河南农业大学植物解剖与生理研究室提供,所用谷物籽粒发芽率均达到95%以上。

### 1.2 谷物籽粒中粗蛋白的提取

用粉碎机将各样品粉碎,过孔径0.35 mm的筛子,称取5 g粉碎过筛的全籽粒粉,加入25 mL蒸馏水,在小三角瓶中混合均匀,在5℃的摇床上180 r/min振荡30 min,4℃、6 000 r/min离心15 min,再取1 mL上清放入1.5 mL小离心管中,4℃、12 000 r/min离心10 min,得到的上清即为提取的粗蛋白液。

### 1.3 谷物不同部位粗蛋白的提取

将小麦、黑麦和绿粒小麦稍湿水将胚用针刺下来,然后在研钵里轻磨将种皮去掉,最后将各部分都晾干粉碎同样过孔径0.35 mm的筛子。称量分离并粉碎好的种皮、胚和胚乳各1 g,加入5 mL蒸馏水充分混匀,在5℃的摇床上180 r/min振荡30 min,

4℃、6 000 r/min离心15 min,再取1 mL上清放入1.5 mL小离心管中,4℃、12 000 r/min离心10 min,得到的上清即为粗蛋白提取液。

### 1.4 木聚糖酶抑制活性的测定

以毕赤酵母工程菌发酵产生的GH11家族木聚糖酶(基因登录号:EU375728)为测定木聚糖酶抑制活性时的指示酶,具体方法:取木聚糖酶酶液,适当稀释酶液使其木聚糖酶活力测定OD值在0.6~0.8(相当于0.92~1.23 IU/mL木聚糖酶),用来测定木聚糖酶抑制蛋白的抑制活性。取2份200 μL的木聚糖酶酶液,一份加入200 μL的抑制蛋白,另一份加入200 μL的0.2 mol/L pH值7.0磷酸缓冲液,混匀,30℃保温30 min。从保温后的2份混合液中分别取100 μL,测定其木聚糖酶活性<sup>[6]</sup>。以加入缓冲液的反应管的木聚糖酶活力为对照,加入抑制蛋白的样品每降低0.01个木聚糖酶活力单位定义为1个木聚糖酶抑制单位(IA)。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同谷物的木聚糖酶抑制蛋白活性

分别测定了小麦、大麦、黑麦、绿粒小麦、荞麦、燕麦、玉米、水稻、高粱9种谷物的木聚糖酶抑制蛋白活性,结果如图1所示,在小麦、黑麦、绿粒小麦、大麦、燕麦和荞麦中木聚糖酶抑制蛋白活性分别为4.27、4.76、4.18、0.54、0.87、3.61 IA/mg,而在玉米、水稻和高粱中没有发现木聚糖酶抑制蛋白活性。小麦、黑麦、绿粒小麦、大麦、燕麦和荞麦中均有木聚糖酶抑制蛋白活性,其中小麦、黑麦、绿粒小麦和荞麦中明显较高,而在玉米、水稻和高粱中未检测到木聚糖酶抑制蛋白活性。

### 2.2 小麦、黑麦和绿粒小麦不同部位的木聚糖酶抑制蛋白活性

选取测得的木聚糖酶抑制蛋白活性高的小麦、黑麦和绿粒小麦,测定其不同部位的木聚糖酶抑制蛋白活性,结果如图2所示,小麦种皮、胚和胚乳中的木聚糖酶抑制蛋白活性分别是0.06、3.67、4.47 IA/mg;黑麦种皮、胚和胚乳中的木聚糖酶抑制蛋白活性分别是1.70、5.42、5.39 IA/mg;而绿粒小麦种皮中未测到木聚糖酶抑制蛋白活性,绿粒小麦胚和胚乳中的木聚糖酶抑制蛋白活性分别是5.06、4.57 IA/mg。由图2可知,3种麦类籽粒不同部位木聚糖酶抑制蛋白活性表现出一致的结果,即胚和胚乳中都具有较高的木聚糖酶抑制蛋白活性,而种皮中木聚糖酶抑制蛋白活性较低甚至检测不到。

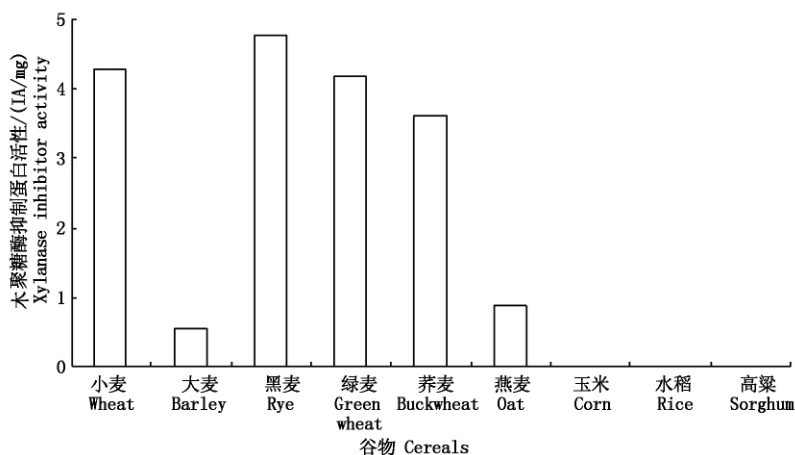


图1 不同谷物中木聚糖酶抑制蛋白活性

Fig.1 Xylanase inhibitor activity in different cereals

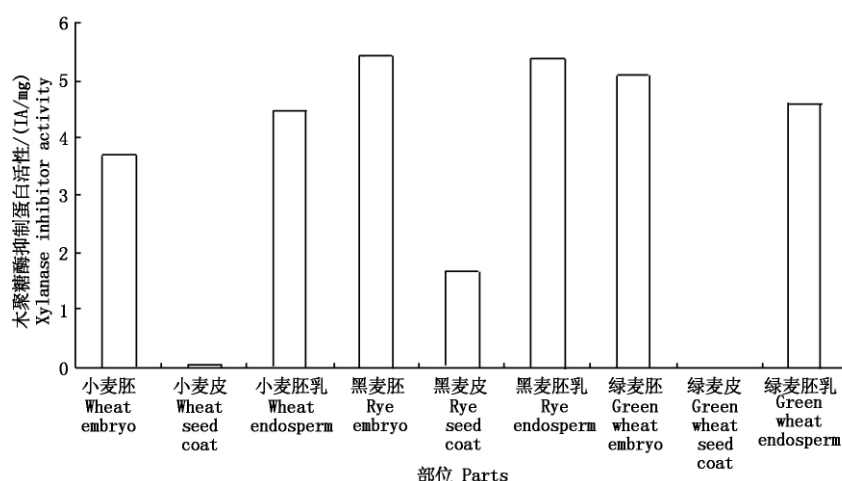


图2 谷物不同部位木聚糖酶抑制蛋白活性

Fig.2 Xylanase inhibitor activity in different parts of cereals

### 3 结论与讨论

本研究证实,国内小麦(包括绿粒小麦品种)、大麦、黑麦中都含有不同水平的木聚糖酶抑制蛋白活性,与 Goesaert 等<sup>[10]</sup>结果一致;而在玉米、水稻、高粱中未检出木聚糖酶抑制蛋白活性。与 Goesaert 等<sup>[11]</sup>结果显著不同的是,本研究明确地显示了燕麦和荞麦中也具有木聚糖酶抑制蛋白活性,原因可能主要为所用谷物材料品种的不同导致结果有差异,正如小麦不同品种间木聚糖酶抑制活性存在明显差异一样<sup>[12]</sup>;另外,由于某些类型的木聚糖酶抑制蛋白如 taxi-III、taxi-IV 和 XIP-I 等是诱导性蛋白<sup>[13]</sup>,同一谷物在不同地区被病原真菌感染的程度不同,其表现出的木聚糖酶抑制蛋白含量也会不同;这些因素都会导致有关木聚糖酶抑制蛋白的差异。更为可靠的方法可以通过对三型抑制蛋白的免疫印迹定量来实现。

Croes 等<sup>[14]</sup>采用免疫印迹定量法测定了小麦不同组分木聚糖酶抑制蛋白含量,结果显示,木聚糖酶

抑制蛋白都是在富含糊粉组分(Aleurone-rich fraction)中含量最高,是白面粉组分(White flour)的4倍,是富含皮层组分(Pericarp-rich fraction)的10倍。本研究只将最外层种皮分离开来而没有将糊粉层分开,绝大部分糊粉层都存在于胚乳成分中,这导致胚乳中木聚糖酶抑制蛋白活性较高,由此可推测本试验结果与 Croes 等<sup>[14]</sup>的测定结果基本吻合。本研究对小麦不同部位木聚糖酶抑制活性的量化分析将对以小麦为原料的木聚糖酶应用过程具有一定的酶效评估意义。

#### 参考文献:

- [1] Simpson D J, Fincher G B, Huang A H C *et al.* Structure and function of cereal and related higher plant(1/4)- $\beta$ -ta-xylan endohydrolases[J]. J Cereal Sci 2003, 37: 111 - 127.
- [2] Debyser W, Peumans W J, Van Damme E J M *et al.* Triticum aestivum xylanase inhibitor(TAXI), a new class of enzyme inhibitor affecting breadmaking performance[J]. J Cereal Sci, 1999, 30: 39 - 43.

- [3] McLauchlan W R ,Garcia-Conesa M T ,Williamson G ,*et al.* A novel class of protein from wheat which inhibits xylanase [J]. *Biochem J* ,1999 ,338: 441 – 446.
- [4] Fierens E ,Rombouts S ,Gebruers K ,*et al.* TLXI ,a novel type of xylanase inhibitor from wheat( *Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family [J]. *Biochem J* ,2007 ,403( 3) : 583 – 591.
- [5] Beliën T ,Van Campenhout S ,Robben J ,*et al.* Microbial endoxylanases: Effective weapons to breach the plant cell-wall barrier or ,rather ,triggers of plant defense systems [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions* ,2006 ,19( 10) : 1072 – 1081.
- [6] 王明道 魏照辉 张俊丽 ,等小麦不同生育期木聚糖酶活性及木聚糖酶抑制活性的变化 [J] *麦类作物学报* ,2010 ,30( 3) : 544 – 547.
- [7] Perez-Vendrell A M ,Brufau J. Role of xylanase-inhibitors on nutritive value of wheat-based diets supplemented with different xylanases for poultry [C] //14th European Symposium on Poultry Nutrition. Norway: Lillehammer 2003.
- [8] Wang M ,Hamer R J ,van Vliet T ,*et al.* Effect of water unextractable solids on gluten formation and properties: mechanistic considerations [J]. *J Cereal Sci* ,2003 ,37: 55 – 64.
- [9] Wang M ,Hamer R J ,van Vliet T ,*et al.* Interaction of water extractable pentosans with gluten proteins: effect on dough properties and gluten quality [J]. *J Cereal Sci* ,2002 ,36: 25 – 37 .
- [10] Goesaert H ,Elliott G ,Paul A ,*et al.* Occurrence of proteinaceous endoxylanase inhibitors in cereals [J]. *Biochim Biophys Acta* ,2004 ,1696: 193 – 202.
- [11] Goesaert H. Occurrence ,purification and properties of endoxylanase inhibitors in different cereals [D]. Leuven: Katholieke Universiteit Leuven 2002.
- [12] Gebruers K ,Courtin C M ,Goesaert H ,*et al.* Endoxylanase inhibition activity in different European wheat varieties and milling fractions there of [J]. *Cereal Chem* ,2002 ,79: 613 – 616.
- [13] Igawa T ,Ochiai-Fukuda T ,Takahashi-Ando N ,*et al.* New TAXI-type xylanase inhibitor genes are inducible by pathogens and wounding in hexaploid wheat [J]. *Plant Cell Phys* ,2004 ,45: 1347 – 1360.
- [14] Croes E ,Gebruers K ,Luyten N. Immunoblot quantification of three classes of proteinaceous xylanase inhibitors in different wheat( *Triticum aestivum*) cultivars and milling fractions [J]. *J Agri Food Chem* ,2009 ,57: 1029 – 1035.