

环境变异对青稞热稳定蛋白质含量及蛋白质 Z 的影响

姚晓华¹, 王 越¹, 白羿雄¹, 姚有华^{1,2}, 吴昆仑¹

(¹ 青海大学农林科学院 / 青海省青稞遗传育种重点实验室 / 国家麦类改良中心青海青稞分中心, 西宁 810016;

² 青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室 / 西藏自治区农牧科学院, 拉萨 850002)

摘要: 热稳定蛋白是衡量麦芽品质的重要指标, 为探明青稞籽粒和麦芽热稳定蛋白的含量、蛋白质 Z 的组成特征以及影响条件。本研究以 3 份青稞和 1 份对照大麦品种 Gairdner 为试验材料, 对青稞籽粒及其麦芽的热稳定蛋白进行分析与鉴定, 研究了不同生态环境下青稞热稳定蛋白质含量和蛋白质 Z 的组成特征, 同时筛选出了优异啤酒用品质青稞品种 (品系)。结果表明, 青稞发芽温度为 20 ℃, 发芽时间为 72 h, 培养溶液 PH 为 5 时, 发芽及焙焦条件下最有利于青稞热稳定蛋白总含量及蛋白质 Z 的累积。利用该发芽条件筛选种植于西宁、湟源和海晏的青稞资源, 发现种植于西宁的青稞种子和发芽后热稳定蛋白总含量最低, 但是焙焦后热稳定蛋白质和蛋白质 Z 含量最高; 同时从 150 份青稞资源中筛选出热稳定蛋白质含量及蛋白质 Z 条带清晰、含量高的优异资源 15 份。本研究结果为酿造青稞品种选育、啤酒青稞和麦芽质量评价指标提供理论依据。

关键词: 青稞; 热稳定蛋白; 蛋白质 Z; SDS-PAGE

The Effect of Environmental Variation on the Content of Heat-Stabilized Protein and Protein Z in Hulless Barley

YAO Xiao-hua¹, WANG Yue¹, BAI Yi-xiong¹, YAO You-hua^{1,2}, WU Kun-lun¹

(¹ Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Qinghai University/ Qinghai Key Laboratory of Hulless Barley Genetics and Breeding/ Qinghai Subcenter of National Hulless Barley Improvement, Xining 810016;

² State Key Laboratory of Barly and Yak Germplasm Resource and Genetic Improvement/ Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lasa 850002)

Abstract: Heat-stabilized protein is an important index to measure the quality of malt. In order to explore the content of heat-stabilized protein, the composition characteristics of protein Z and the influencing conditions in barley grains and malt, three hulless barleys (Liulengzi changmang baiqingke, Qingpi qingke and 9820) and one hulled barley (Gairdner) were used to analyze and identify the heat-stabilized protein of hulless barley grains and malt. Then the content of the heat-stabilized protein of hulless barley and the composition characteristics of protein Z were studied in different ecological environments. The barley lines with excellent brewing quality were selected. The results showed that the optimal barley germination conditions (20 ℃, 72 h and PH 5) enabled the accumulation of heat-stabilized protein and protein Z in germination and kinling. The hulless barleys, which were planted and harvested at three locations (Xining, Huangyuan and Haiyan) with different climatic conditions, were tested for the content of grain. A lowest bud heat-stabilized protein, but the highest heat-stabilized protein and protein Z after kinling, were observed from the grains in Xining. Meanwhile, fifteen excellent resources with

收稿日期: 2019-06-27 修回日期: 2019-07-26 网络出版日期: 2019-08-13

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190627002>

第一作者研究方向为青稞遗传育种, E-mail: yaoxiaohua009@126.com

通信作者: 吴昆仑, 研究方向为青稞遗传育种, E-mail: wklqaaf@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31660388, 31960427); 国家大麦 (青稞) 产业技术体系 (CARS-05); 青海省科技厅应用基础研究项目 (2019-ZJ-7075); 青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室开放课题 (XZNKY-2019-C-007K05)

Foundation project: Natural Science Foundation of China (31660388, 31960427), China Agriculture Research System (CARS-05), the Project of Application and Fundamental Research in Qinghai Science and Technology Department (2019-ZJ-7075), Open Topic of State Key Laboratory of Barly and Yak Germplasm Resource and Genetic Improvement (XZNKY-2019-C-007K05)

high content of heat-stable protein were identified by testing 150 hulless barley germplasm resources. Thus, the results gained from this study will provide theoretical basis in breeding for hulless malting barley varieties with the qualified indexes.

Key words: Hulless barley; heat-stabilized protein; protein Z; SDS-PAGE

青稞 (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.), 为禾本科大麦属, 因其成熟时籽粒内外稃与颖果分离, 籽粒裸露, 故称裸大麦^[1]。青稞是青藏高原一年一熟的高寒农区的标志性作物, 主要分布在海拔 3000 m 以上的高寒地区, 具有耐寒性强, 耐旱、耐瘠薄、生育期短、适应性强、产量稳定等优异种性, 是青藏高原最具特色的农作物之一^[2]。长期以来, 青稞作为藏区最重要的粮食作物, 为藏区粮食安全提供了重要保障。但是, 随着种植业的发展, 青稞作为单纯的粮食作物, 其用途单一, 附加值低的问题日益突出。通过发掘青稞在营养、保健以及啤酒酿造等方面的利用价值, 研发专用型的啤用青稞, 改变青稞作为区域性作物所形成的区域性食品类型的特点, 使更多人群受益于青稞的营养保健作用, 将青稞转变为高附加值的外销型经济作物, 是青稞产业发展的重要方向之一。

有关热稳定蛋白的研究主要集中于大麦, 研究表明热稳定蛋白与啤酒品质关系密切^[3]。大麦热稳定蛋白的含量及组成对啤酒口感风味、泡沫及胶体稳定性等品质均具有重要的作用。啤酒中蛋白类物质含量为 300~800 mg/L, 分子量为 2~100 kD, 大多数在 15 kD 以下^[4]。近年来通过免疫化学方法分析和研究啤酒泡沫蛋白发现主要是分子量在 10~100 kD 之间的蛋白质参与了啤酒泡沫的形成, 其中分子量为 30~40 kD 的泡沫蛋白占 70% 左右^[5]。

蛋白质 Z 是大麦热稳定蛋白质中一类重要的组分^[6]。是胚乳中主要的清蛋白, 占大麦清蛋白总量的 5% 左右; 分离与大麦中的蛋白质 Z 的分子量约为 43 kD^[7]。蛋白质 Z 由于分子结构上的特性使其能够增强啤酒泡沫稳定性, 是重要的泡沫蛋白, 并且可能涉及啤酒的冷浑浊的产生, 在啤酒中其含量为 20~170 mg/L^[8]。可见, 大麦中蛋白质 Z 的含量对麦芽和啤酒质量都有重要的影响。

本研究对青稞及其麦芽的热稳定蛋白进行分析与鉴定, 研究了青稞热稳定蛋白的含量和蛋白质 Z 的组成特征以及影响条件, 为酿造青稞品种选育、啤用青稞和麦芽质量评价指标提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的 150 份青稞和 1 份大麦材料的名称和来源详见 <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190627002>, 附表 1。

1.2 热稳定蛋白与蛋白质 Z 最优条件筛选

1.2.1 发芽培养 不同发芽时间: 精选饱满度一致且无病虫害的 3 份青稞六棱子长芒白青稞、青皮青稞、9820 和 1 份大麦 Gairdner (对照), 清水浸泡 1 h, 用 0.5% 高锰酸钾消毒 30 min, 清水洗净, 将种子浸入蒸馏水后置于 4 ℃ 冰箱中保存 24 h。每品种各取 20 粒种子播种于直径为 10 cm、铺有 3 层蒸馏水浸润滤纸的培养皿内, 置于暗培养箱中催芽, 培养温度为 20 ℃, 3 次重复。每天向滤纸加水数滴, 保持适当湿度, 使麦芽含水率 $\geq 40\%$ ^[9]。间隔 24 h 取样 1 次, 直至 120 h, 每次取 2 份, 其中 1 份直接液氮研磨, 另 1 份 78 ℃ 焙焦 1.5 h 后研磨, 于 -20 ℃ 保存。原麦为发芽 0 h, 种子磨粉后至密封管中, 于 4 ℃ 保存。

不同温度: 试验材料、种子选取、消毒、浸种及播种、暗培养、重复、加水同发芽培养。暗培养温度为 10 ℃、15 ℃、20 ℃、25 ℃, 发芽 72 h 后取样, 用于热稳定蛋白质含量的测定, 取样及保存方法同不同发芽时间处理。以温度 10 ℃ 为对照, 其他同本处理。

不同 pH: 试验材料、种子选取、消毒及重复同发芽培养。采用 pH 3.0、pH 4.0、pH 5.0 和 pH 6.0 的柠檬酸溶液于 4 ℃ 冰箱中浸种 24 h。每品种各取 20 粒种子播种于直径为 10 cm、铺有 3 层柠檬酸溶液浸润滤纸的培养皿内, 置于暗培养箱中催芽, 培养温度为 20 ℃, 发芽 72 h 后取样, 保存方法同不同发芽时间处理。

不同生态环境: 检测了青海省西宁市、湟源县和海晏县的 4 份青稞热稳定蛋白质含量变化情况。试验材料、种子选取、消毒及浸种方法同发芽培养。采用 pH 5.0 的柠檬酸溶液于 4 ℃ 冰箱中浸种 24 h。每品种各取 20 粒种子播种于直径为 10 cm、铺有 3 层柠檬酸溶液浸润滤纸的培养皿内, 置于暗培养箱中催芽, 培养温度为 20 ℃, 发芽时间为 72 h, 3 次重复,

原麦及麦芽取样和保存方法同不同发芽时间处理。

优异啤用品质青稞品种(系)的筛选:试验材料为 2015 年种植于西宁的 151 份青稞资源,种子选取、消毒、浸种方法、发芽环境、原麦及麦芽取样及保存方法同不同生态环境处理。

1.2.2 热稳定蛋白提取、浓缩及含量测定 根据样品的含水量,称取扣除水分后绝干粉碎的样品 1 g,加入 4 ℃ 提取缓冲液 5 mL(配方:Tris-Cl 50 mmol/L, NaCl 10 mmol/L, DTT 1 mmol/L, EDTA·Na₂ 1 mmol/L, PH 7.5),摇匀,4 ℃ 提取 1 h,每间隔 10 min 摇 1 次。4000 r/min 离心 15 min,收集上清,获得蛋白粗提液。将此粗提液置于 100 ℃ 沸水浴 20 min,4000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,上清即为热稳定蛋白提取液^[10],含量测定采用 Bradford 法^[11]。当蛋白质浓度低于 0.5 mg/mL 时,采用丙酮沉淀法获得的提取浓缩液^[12]。

1.2.3 SDS-PAGE 使用 Laemmli 不连续电泳系统在 4 ℃ 下进行电泳,5% 的浓缩胶(80×8×1 mm),12.5% 的分离胶(80×80×1 mm),每泳道上样量为 12 μg。采用恒压模式,其中浓缩胶中电压为 80 V,分离胶中电压为 200 V^[13]。凝胶使用考马斯亮蓝 R250 染色,脱色后采用凝胶成像系统拍照、分析。

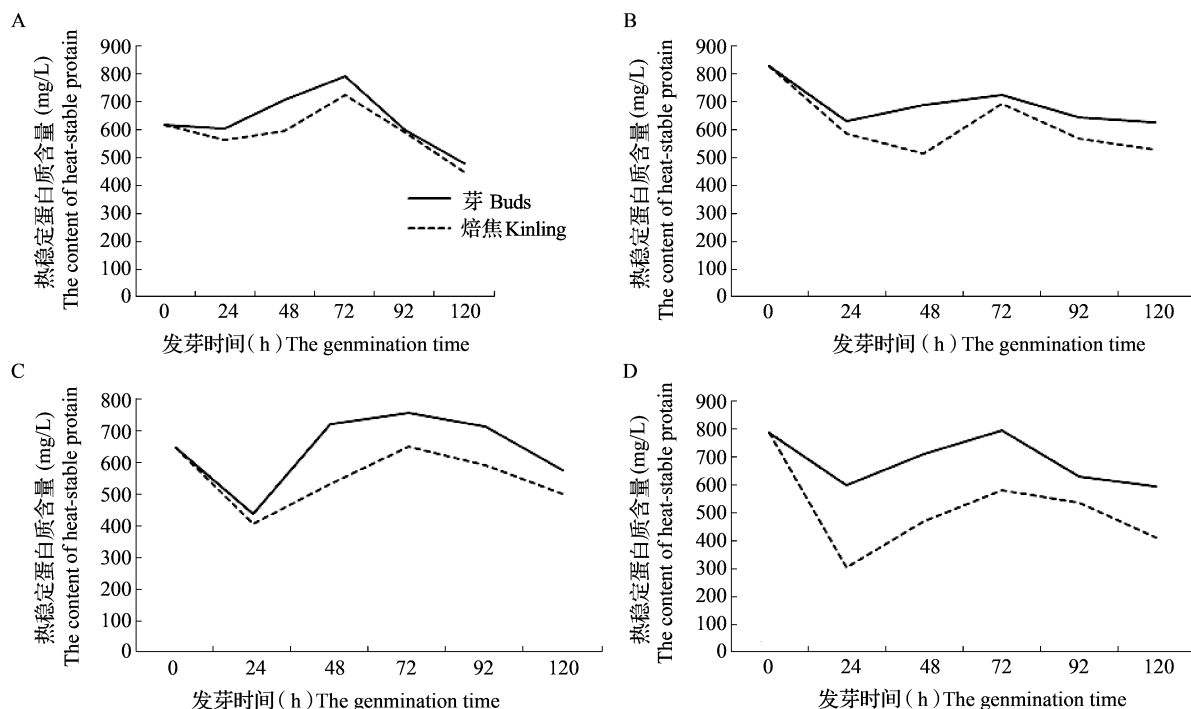
1.3 数据处理与计算

用 Microsoft Excel 2013 进行数据整理,用 stst 2.0 进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 发芽时间对青稞热稳定蛋白质含量及组分的影响

2.1.1 热稳定蛋白质含量 由图 1 可知,与新鲜芽相比,焙焦后的 4 份麦芽热稳定蛋白质含量均有不同程度的降低,降幅范围为 0.97%~49.34%,且对照 Gairdner 降幅普遍高于青稞品种。与原麦相比,种子发芽 24 h 和焙焦后热稳定蛋白质含量迅速下降,其中对照 151 降幅最大,芽降低了 24.42%,焙焦后降低了 61.71%,均与原麦蛋白质含量差异极显著($P<0.01$);六棱子长芒白青稞、青皮青稞和 9820 发芽 24 h 热稳定蛋白质含量分别降低 2.61%、23.33% 和 32.87%,焙焦后分别降低 8.96%、29.24% 和 38.01%。之后随着发芽时间的延长,热稳定蛋白质含量先增高后降低,发芽 72 h 麦芽和焙焦后的热稳定蛋白质含量最高,与发芽 24 h 差异极显著($P<0.01$),且焙焦后六棱子长芒白青稞热稳定蛋白质含量最高,与对照 Gairdner 差异极显著($P<0.01$)。由以上结果可知,青稞籽粒发芽 72 h 是



A: 六棱子长芒白青稞; B: 青皮青稞; C: 9820; D: Gairdner, 下同

A: Liulengzi changmang hulless barley, B: Qingpi hulless barley, C: 9820, D: Gairdner, The same as below

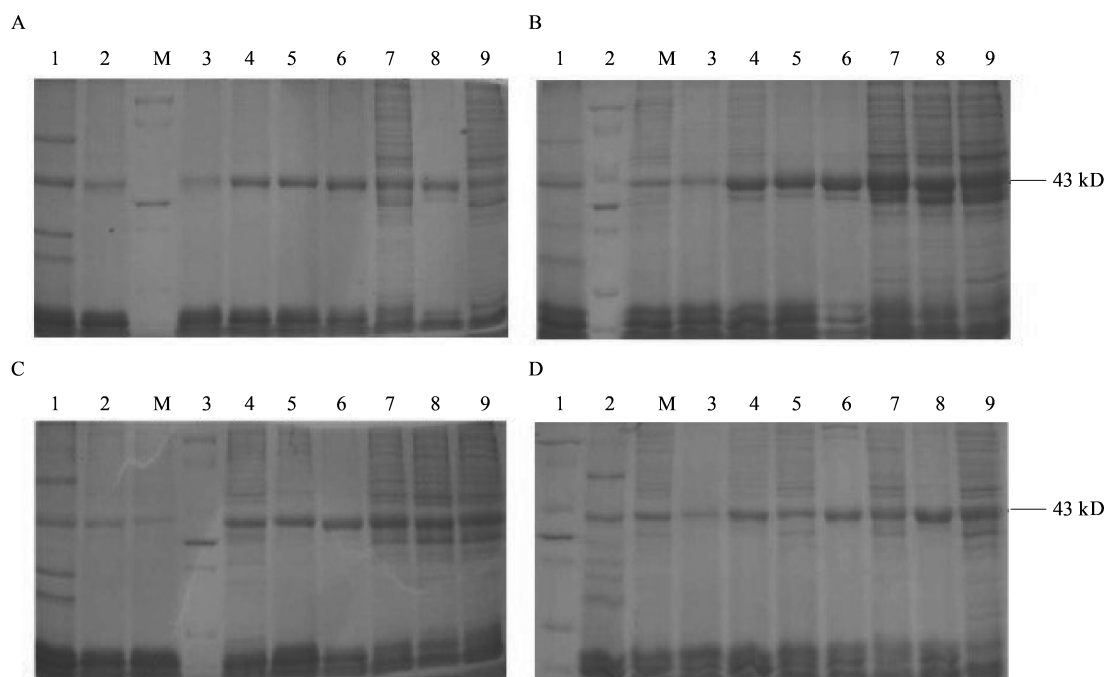
图 1 发芽时间对 4 份青稞(大麦)热稳定蛋白质含量的影响

Fig.1 The heat-stable protein content of four hulless barley lines at different germination time

热稳定蛋白质获得率最高的时期。

2.1.2 蛋白质 Z 的变化 由图 2 可知,随着青稞种子发芽时间的延长,青稞发芽和焙焦后热稳定蛋白条带的颜色逐渐变深,尤其是 43 kD 左右的蛋白质

Z 变化最为明显,但是发芽后期(96~120 h)麦芽焙焦后热稳定蛋白质杂带较多。综合热稳定蛋白质含量的变化情况,将 72 h 设定为青稞麦芽的最佳培养时间。



M: marker; 1: 原麦; 2: 发芽 48 h; 4: 发芽 72 h; 6: 发芽 96 h; 8: 发芽 120 h; 3: 发芽 48 h 焙焦; 5: 发芽 72 h 焙焦; 7: 发芽 96 h 焙焦; 9: 发芽 120 h 焙焦; 每泳道蛋白质上样量为 10 μ g, 下同

M: marker, 1: raw grain, 2: germinating for 48 h, 4: germinating for 72 h, 6: germinating for 96 h, 8: germinating for 120 h, 3: kilning for 48 h, 5: kilning for 96 h, 7: kilning for 96 h, 9: kilning for 120 h, Sampling protein amount of every land was 10 μ g, the same below

图 2 发芽时间对 4 份材料热稳定蛋白质含量的影响

Fig.2 The protein Z content of four hulless barley lines at different germination time

2.2 发芽温度对青稞热稳定蛋白质含量和蛋白质 Z 的影响

2.2.1 热稳定蛋白质含量 由图 3 可知,与新鲜芽相比,焙焦后的 4 份麦芽热稳定蛋白质含量均有不同程度的降低,降幅范围为 0.14%~35.69%。随着温度的升高麦芽及焙焦后热稳定蛋白质含量先增加后降低,且两者均在 20 $^{\circ}$ C 时其含量达到最高值。与最低温度 10 $^{\circ}$ C 相比,20 $^{\circ}$ C 时六棱子长芒白青稞、青皮青稞、9820 和 Gairdner 芽热稳定蛋白分别提高 105.48%、88.67%、45.46 和 43.81%; 焙焦后分别提高 45.03%、84.91%、34.40% 和 28.62%, 差异均达到极显著水平 ($P<0.01$)。由以上结果可知,发芽温度为 20 $^{\circ}$ C 是青稞热稳定蛋白质得率最高的时期。

2.2.2 蛋白质 Z 的变化 由图 4 可知,随着温度的升高,青稞发芽和焙焦后热稳定蛋白条带的颜色逐渐变深,温度为 20 $^{\circ}$ C 和 25 $^{\circ}$ C 时 43 kD 左右的蛋白

质 Z 变化最为明显,但是 25 $^{\circ}$ C 时麦芽焙焦后热稳定蛋白质杂带较多,且温度过高麦芽容易发霉。综合热稳定蛋白质含量的变化情况,将 20 $^{\circ}$ C 为青稞麦芽的最佳培养温度。

2.3 发芽 pH 对青稞热稳定蛋白质含量和蛋白质 Z 的影响

2.3.1 热稳定蛋白质含量 由图 5 可知,与新鲜芽相比,焙焦后的 4 份麦芽热稳定蛋白质含量均有不同程度的降低,降幅范围为 3.73%~40.42%。随着 pH 的升高,热稳定蛋白质含量先增加后降低,且均在 pH 5 时含量达到最高值。与最低的 pH 3 相比,pH 5 时六棱子长芒白青稞、青皮青稞、9820 和 Gairdner 芽热稳定蛋白分别提高 128.37%、36.11%、22.64 和 47.01%; 焙焦后分别提高 56.57%、75.62%、42.84% 和 62.28%, 差异均达到极显著水平 ($P<0.01$)。由以上结果可知,发芽 pH 5 是青稞热稳定蛋白质获得率最高的时期。

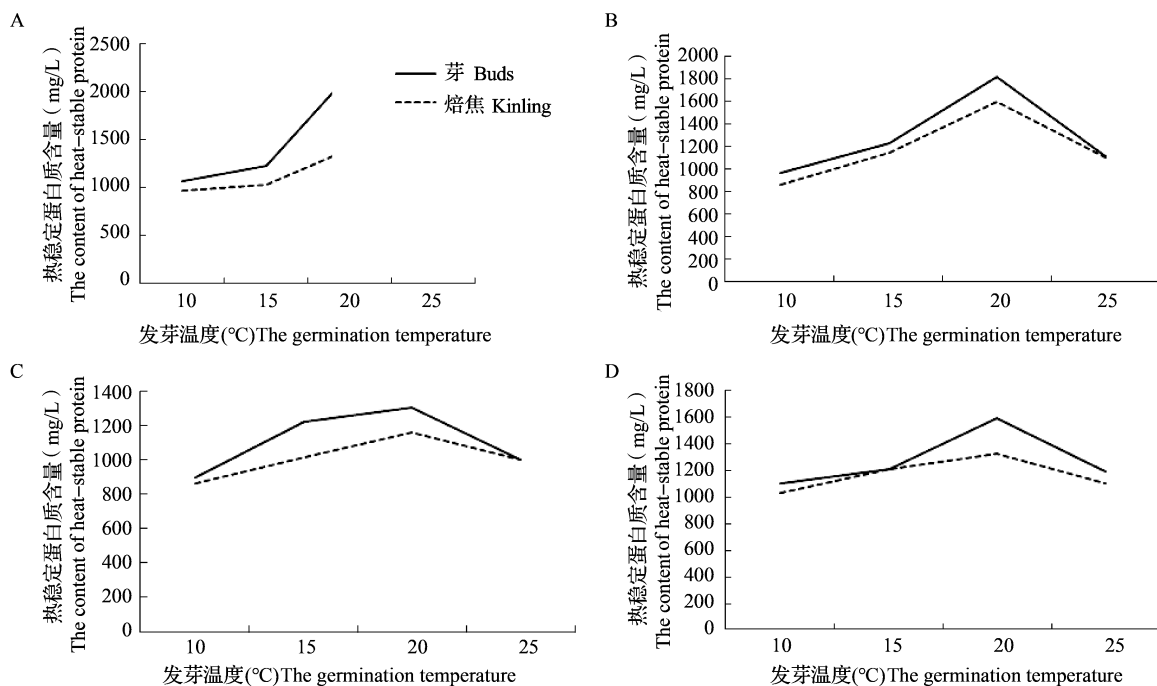
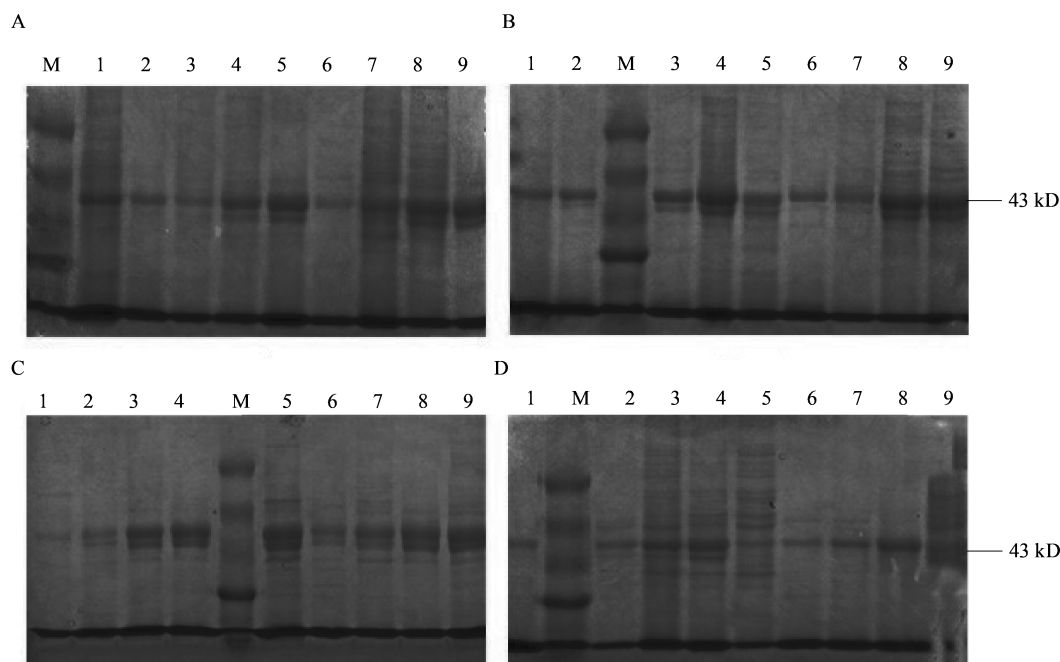


图3 温度对4份材料热稳定蛋白质含量的影响

Fig.3 The heat-stable protein content of four hulless barley lines at different temperature



M: marker; 1: 原麦; 2: 10 °C发芽; 3: 15 °C发芽; 4: 20 °C发芽; 5: 25 °C发芽; 6: 10 °C焙焦; 7: 15 °C焙焦; 8: 20 °C焙焦; 9: 25 °C焙焦
M: marker, 1: raw grains, 2: germinating at 10 °C, 3: germinating at 15 °C, 4: germinating at 20 °C, 5: germinating at 25 °C, 6: kinling at 10 °C, 7: kinling at 15 °C, 8: kinling at 20 °C, 9: kinling at 25 °C

图4 温度对4份材料热稳定蛋白质含量的影响

Fig.4 The protein Z content of four hulless barley lines at different temperature

2.3.2 蛋白质 Z 的变化 由图 6 可知,随着 pH 的升高,青稞麦芽和焙焦后热稳定蛋白条带的颜色逐渐变深,pH 5 时麦芽焙焦后热稳定蛋白质条带较清

晰,杂带较少,且 43 kD 左右的蛋白质 Z 变化最为明显。综合热稳定蛋白含量的变化情况,pH 5 为青稞麦芽的最佳培养值。

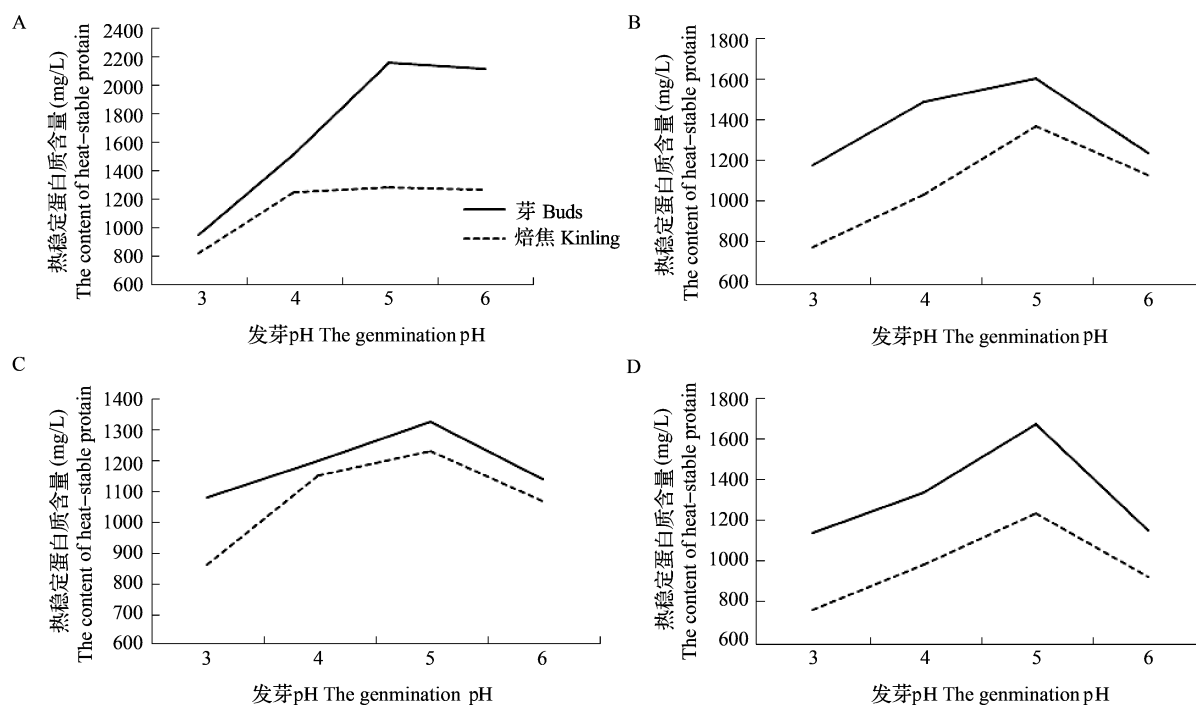
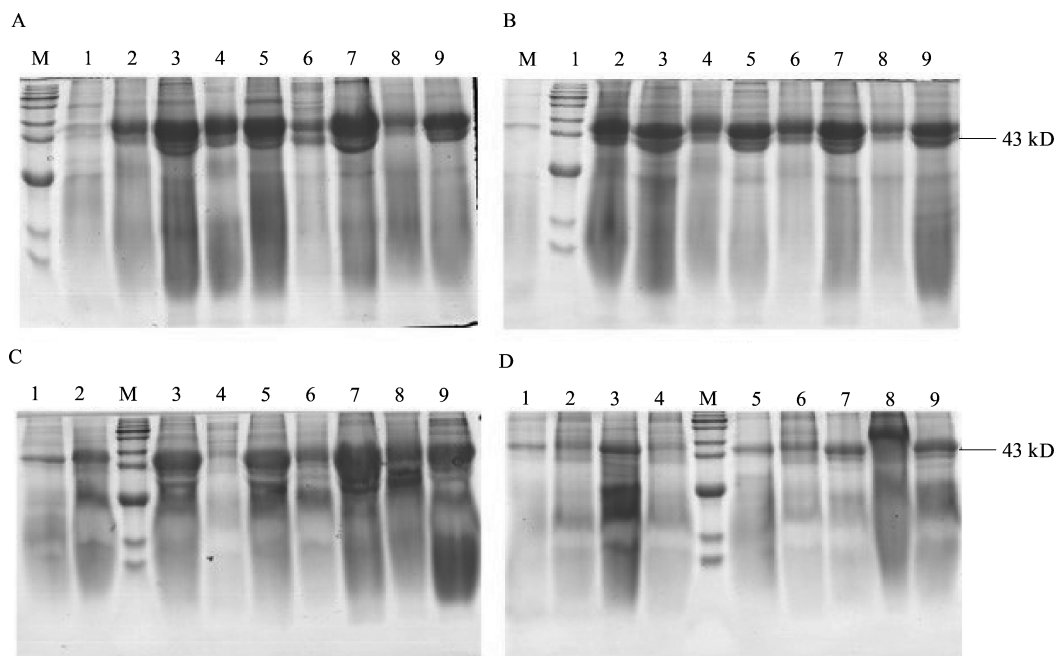


图5 不同 pH 对 4 份材料热稳定蛋白质含量的影响

Fig.5 The heat stable protein content of four hulless barley lines with different pH



M: marker; 1: 原麦; 2: pH 3 焙焦; 3: pH 3 鲜芽; 4: pH 4 焙焦; 5: pH 4 鲜芽; 6: pH 5 焙焦; 7: pH 5 鲜芽; 8: pH 6 焙焦; 9: pH 6 鲜芽
M: marker, 1: raw grains, 2: kinling under pH 3, 3: germinating under pH 3, 4: kinling under pH 4, 5: germinating under pH 4, 6: kinling under pH 5, 7: germinating under pH 5, 8: kinling under pH 6, 9: germinating under pH 6

图6 pH 对 4 份材料热稳定蛋白质含量的影响

Fig.6 The protein Z content of four hulless barley liens with different pH

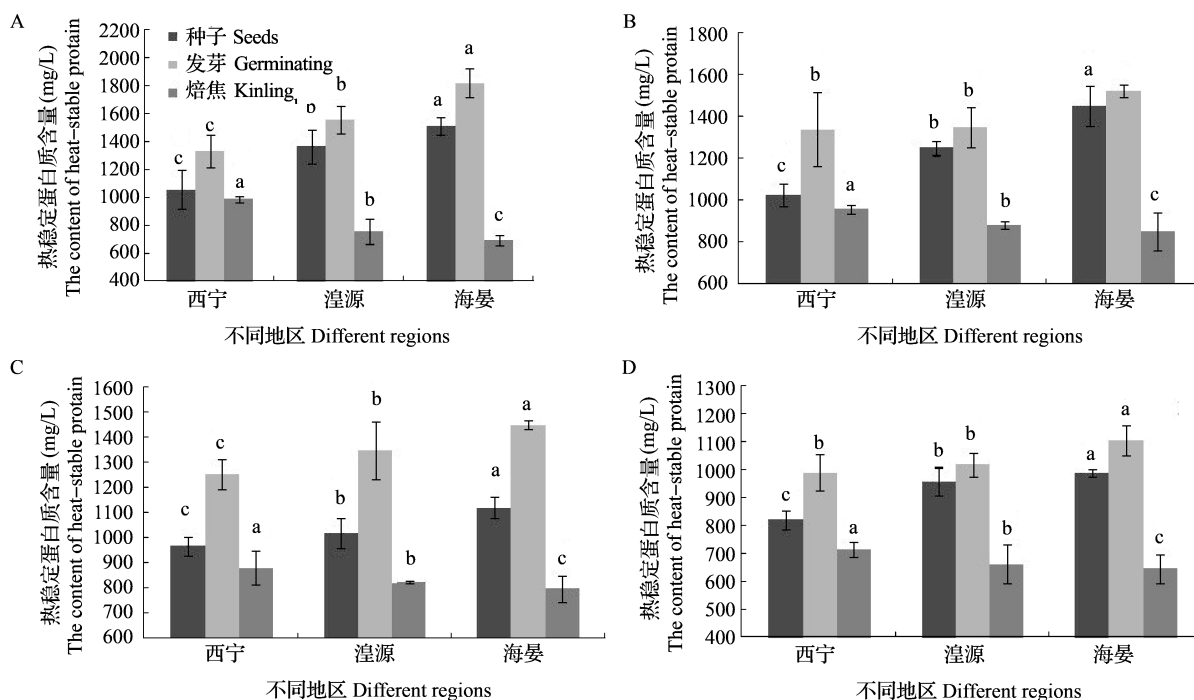
2.4 不同生态环境对青稞热稳定蛋白的影响

2.4.1 热稳定蛋白含量 由图 7 可知,与原麦相比,发芽后六棱子长芒白青稞、青皮青稞、9820 和 Gairdner 热稳定蛋白质总含量出现不同程度的升高,

升高幅度为 4.8%~32.21%;焙焦后则出现不同程度的降低,降低幅度为 6.46%~53.89%。另外,种植于青海省海晏县的原麦和麦芽热稳定蛋白质含量最高,青海省西宁的最低,两者差异显著 ($P<0.05$);而焙焦后

热稳定蛋白质含量西宁最高,海晏最低,两者差异显著 ($P<0.05$)。由以上结果可知,青海省西宁市的气

候条件更有利于青稞麦芽焙焦后热稳定蛋白质含量的累积。

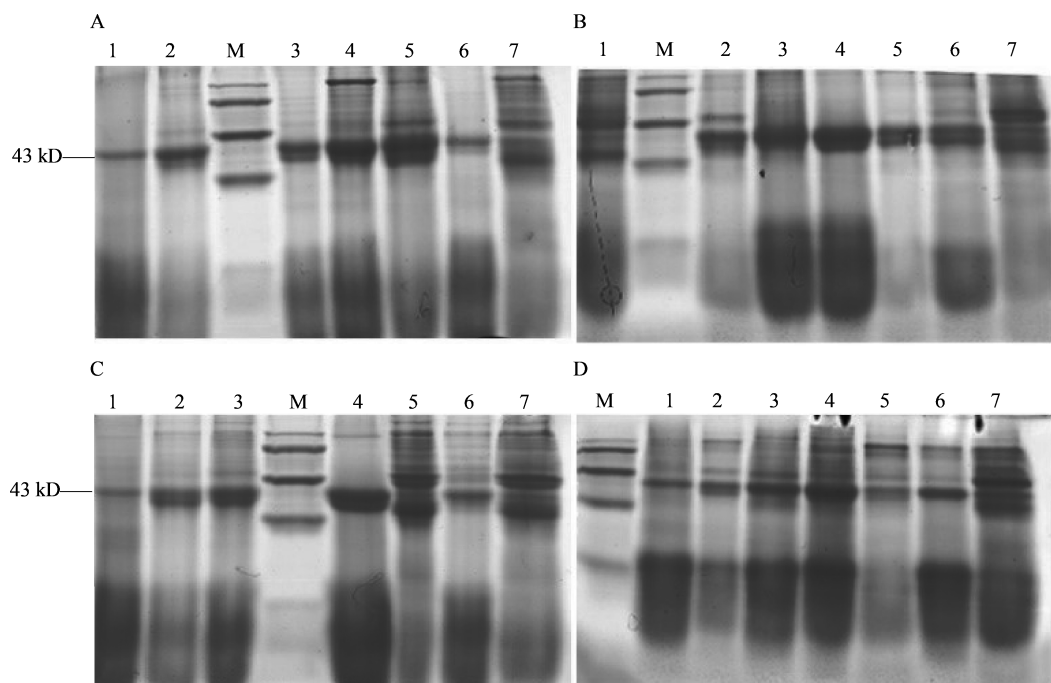


同一处理不同地区间不同小写字母表示 $P<0.05$ 水平差异显著

Different small letters in the same treatment of different regions showed significant difference in $P<0.05$ level

图 7 不同生态区对 4 份材料热稳定蛋白质含量的影响

Fig.7 The heat stable protein content of four hulless barley lines harvested from different ecology areas



M: marker; 1: 原麦; 2: 发芽 (湟源); 3: 焙焦 (湟源); 4: 发芽 (西宁); 5: 焙焦 (西宁); 6: 发芽 (海晏); 7: 焙焦 (海晏)

M: marker, 1: raw grains, 2: germinating (Huangyuan), 3: kinling (Huangyuan), 4: germinating (Xining),

5: kinling (Xining), 6: germinating (Haiyan), 7: kinling (Haiyan)

图 8 不同生态区对 4 份材料热稳定蛋白质组分的影响

Fig.8 The protein Z content of four hulless barley lines harvested from different ecology areas

2.4.2 蛋白质 Z 的变化 由图 8 可知,种植于青海省西宁市的材料发芽和焙焦后热稳定蛋白质中蛋白质 Z 条带的颜色最深。综合热稳定蛋白质含量的变化情况,青海省西宁市的气候条件更有利于蛋白 Z 的累积。

2.5 优异啤用品质青稞品种(品系)的筛选

对青海大学农林科学院青稞研究室繁育保存的 150 份青稞资源进行筛选,获得 15 份优异啤用品质的种质资源(表 1)。结果显示,虽然这部分青稞资

源种子和芽的热稳定蛋白质含量并非都高于对照大麦品种 Gairdner,但是焙焦后热稳定蛋白质含量较对照高,且蛋白质 Z 条带清晰,颜色深。其中长身子青稞长青稞、六棱子长芒白青稞和康青 3 号青稞资源芽焙焦后热稳定蛋白质含量最高,均比对照高 49% 以上,与对照差异极显著($P<0.01$)。且 SDS-PAGE 结果显示,这 15 份种质资源芽焙焦后蛋白质 Z 条带比对照清晰、颜色深(图 9)。

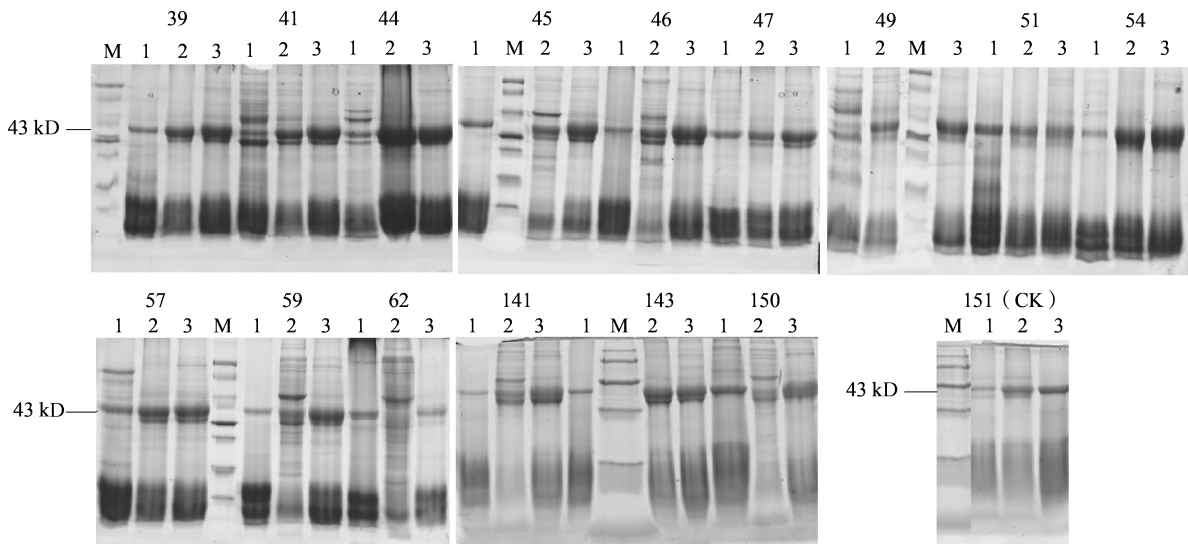
表 1 筛选的 15 份优异啤用品质青稞资源

Table 1 Fifteen hulless barley screened with excellent brewing quality germplasm resources

编号 Number	名称 Name	热稳定蛋白质含量 (mg/L) The content of bud heat-stable protein		
		原麦 Raw grains	芽 Buds	焙焦 Kinling
39	小青稞	999.55 ± 69.17 ABC	1396.77 ± 55.74 sF	1532.14 ± 124.36 ABC
41	无皮青稞	1095.26 ± 124.37 A	1417.37 ± 84.59 EF	1681.53 ± 71.78 AB
44	长身子青稞	831.33 ± 32.05 DE	1588.48 ± 105.22 CDE	1751.36 ± 129.69 A
45	长青稞	975.03 ± 25.60 ABCD	1120.37 ± 124.71 G	1749.31 ± 207.18 A
46	六棱子长芒白青稞	840.79 ± 39.06 DE	1703.07 ± 159.46 BCD	1746.75 ± 111.69 A
47	六棱小青稞	1042.77 ± 85.06 AB	1263.12 ± 118.28 FG	1439.88 ± 113.49 BCD
49	六棱头白青稞	1017.21 ± 63.73 ABC	1314.02 ± 88.53 FG	1519.37 ± 176.35 ABC
51	李家庄六棱	728.88 ± 28.38 E	1966.58 ± 94.1 A	1407.66 ± 66.81 BCD
54	康青 3 号	1049.78 ± 53.50 AB	1478.41 ± 24.59 DEF	1754.16 ± 51.07 A
57	9642	934.10 ± 29.36 BCD	1636.51 ± 185.46 CDE	1419.32 ± 23.93 BCD
59	9828	1017.22 ± 78.44 ABC	1400.63 ± 94.13 EF	1591.53 ± 39.22 ABC
62	35-40	933.19 ± 28.90 BCD	1441.99 ± 49.85 EF	1369.15 ± 103.84 CD
141	化隆长芒青稞	1021.14 ± 78.40 ABC	1796.18 ± 100.53 ABC	1462.58 ± 121.52 ABC
143	海晏白青稞	875.13 ± 20.22 CD	1217.64 ± 103.97 FG	1548.70 ± 51.84 ABC
150	短白青稞	994.88 ± 29.83 ABC	1291.11 ± 70.83 FG	1555.87 ± 99.94 ABC
151	Gairdner (大麦)	907.72 ± 15.10 BCD	1937.65 ± 84.7 AB	1172.11 ± 137.91 D

同列不同大写字母表示 $P<0.01$ 水平差异显著

Different capital letters in the same column showed significant difference in $P<0.01$ level



M: marker; 1: 原麦, 2: 发芽, 3: 焙焦

M: marker, 1: raw grains, 2: germinating, 3: kinling

图 9 优异青稞(大麦)资源热稳定蛋白质组分的变化

Fig.9 The variation on protein Z content of elite hulless barley germplasm resources

3 讨论

3.1 发芽环境(时间、温度和 PH)对热稳定蛋白总含量及蛋白质 Z 的影响

麦芽制造是种子萌发在严格条件控制的环境下进行的^[14],其中麦芽的发芽条件是热稳定蛋白含量与组成的重要影响因素^[15]。本研究对不同发芽时间、发芽温度和 PH 值对麦芽中热稳定蛋白含量及组分的变化进行了比较分析。结果表明,培养温度为 20℃,发芽时间为 72 h,培养溶液 PH 为 5 时,发芽及焙焦条件下最有利于青稞热稳定蛋白总含量及蛋白质 Z 的累积。种质资源的评价与育种的利用直接相关,本试验利用该发芽条件筛选出热稳定蛋白含量及蛋白质 Z 优异的青稞资源 15 份,为啤用青稞品种的应用奠定材料基础;另外,大麦啤用品质除了热稳定蛋白外,还包括麦芽糖化时间、糖化力、粘度、 β -葡聚糖、可溶性氮、蛋白质等^[16-17],因此,在今后优异啤用品质青稞材料筛选中还要注意这些关键指标的筛选。

研究发现,青稞(大麦)种子浸种 0~24h 热稳定蛋白含量急速下降,分析原因,一方面热稳定蛋白主要来自糊粉层的贮藏蛋白,在发芽初期被迅速降解,为胚根和胚芽的生长提供营养与能量^[18];另一方面某些热稳定蛋白可能是一些发芽初期所需的关键酶的酶原,为了抵御种子休眠期间的特殊环境而以此稳定形成存在的^[19]。而在较长发芽时间、较高发芽温度和 PH 下,热稳定蛋白含量会下降而组分蛋白质 Z 含量却升高(条带增粗)。以温度对部分青稞与大麦热稳定蛋白含量的影响为例,25℃处理和 20℃处理比较,六棱子长芒白青稞、青皮青稞、9820 和 Gairdner 4 个青稞(大麦)品种芽热稳定蛋白含量分别降低了 42.98%、38.77%、23.11% 和 24.67%;焙焦后热稳定蛋白含量分别降低 11.45%、30.60%、13.69% 和 16.95%,差异均达到极显著水平($P<0.01$)。但是经 Gel-Pro Analyzer 软件分析条带亮度发现,六棱子长芒白青稞和 9820 两个青稞品种的蛋白质 Z 含量明显提高。分析原因可能是发芽环境较差时(发芽时间较长、温度和 PH 较高)需要较多的营养物质损耗,因而使得某些青稞热稳定蛋白有所减少,而这两个品种的蛋白质 Z 在热稳定蛋白中属于较稳定的一类,较少受到发芽环境的影响,推测发芽环境更恶劣时其含量会下降。另外发现,麦芽经焙焦后热稳定蛋白的含量也比焙焦前迅速下降,原因可能是高温使一些热稳定蛋白在结构上发生了变化,最终导致表观上热稳

定蛋白质含量的下降^[20]。

蛋白质 Z 是最早发现的维持啤酒泡沫稳定性的蛋白,分子量约 43 kD,以 Z4、Z7 和 Zx 3 种形式存在^[21-22]。本研究发现,青稞种子在发芽 72h 后和较高发芽温度(20℃,25℃)发芽及焙焦后蛋白质 Z 均出现两条带(图 2、图 4),而对照的大麦品种发芽及焙焦后并没有明显的变化。为明确这两条带的组成及是否对麦芽品质产生影响,将种子原样品带和发芽及焙焦后的两条带切取后送至深圳华大基因股份有限公司进行测序。结果发现,青稞原麦中的蛋白质 Z 主要是 Z4;发芽及焙焦后分子量较高的条带仍然为 Z4,较低的条带可能为 Z4 的降解产物和 Z7,两者比例约为 2:1。前人研究表明,大麦中蛋白质 Z4:Z7 约为 4:1^[20],而本研究中青稞种子在较高温度条件发芽及焙焦过程中蛋白质 Z7 比例明显升高,这一变化对青稞麦芽品质是否产生有益的影响有待进一步研究。

3.2 不同生态环境对热稳定蛋白总含量及蛋白质 Z 的影响

酿酒大麦蛋白质的含量和组分除了受遗传因素、发芽环境的影响外,还受栽培地的生态环境的影响。不同产地的大麦其酿造品质差异很大,最终会影响着大麦的价值^[23]。据有关遗传力测算的资料,大麦籽粒遗传因素有的仅占 20%,环境对大麦籽粒蛋白质的影响高达 80%^[24-25]。大麦中热稳定蛋白质的含量和组分可以用来指示或预测麦芽和啤酒的品质,并可作为大麦啤用品质改良的一个依据^[8,26]。但在青稞啤用品质的改良的相关研究鲜见报道。本试验通过分析不同生态区的青稞(大麦)的发芽及焙焦后的热稳定蛋白含量和蛋白质 Z 的变化情况发现西宁虽然没有湟源县和海晏县有利于总的热稳定蛋白质的累积,但焙焦后含量却是最高的,而且西宁地区蛋白质 Z 在焙焦前后的累积量都是最大的。可见海拔较低,降雨量较大、气温较高且温差较小的地区有利于焙焦后热稳定蛋白和蛋白质 Z 的累积,可能是不同生态环境对焙焦前后热稳定蛋白质的各组分的合成存在差异,但其合成机理有待进一步研究。

参考文献

- [1] 郭本兆. 青海经济植物志. 西宁:青海人民出版社,1987:701
Guo B Z. Qinghai economic flora. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1987: 701
- [2] 姚晓华,吴昆仑. 青稞脂质转运蛋白基因 *blt4.9* 的克隆及其对非生物胁迫的响应. 作物学报, 2016, 42(3): 399-406
Yao X H, Wu K L. Isolation of *blt4.9* gene encoding LTP protein in hulless barley and its response to abiotic stresses. Acta Agronomica Sinica, 2016, 42(3): 399-406

- [3] 陈霞,石维忱,赵淑娟,姜晓雷,李明达,赵睿,赵长新. 不同品种大麦热稳定蛋白—蛋白质 Z 与 LTP 蛋白耐热温度的研究. 食品与发酵工业, 2010, 36(5): 32-35
Chen X, Shi W C, Zhao S J, Jiang X L, Li M D, Zhao R, Zhao C X. Heat resistance of heat-stable protei-protein Z and LTP in different barley. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(5): 32-35
- [4] Dale C J, Young T W, Brewer S. Amino acid analysis of beer polypeptides. Journal of the Institute of Brewing, 2013, 95(2): 89-97
- [5] Hollemans M, Tonies A. The role of specific proteins in beer foam. Proceedings of Congress-European Brewery Convention, 1989, 22: 561-568
- [6] Bobálová J, Petry-Podgórska I, Laštovičková M, Chmelík J. Monitoring of malting process by characterization of glycation of barley protein Z. European Food Research and Technology, 2010, 230(4): 665-673
- [7] Evans D E, Hejgaard J. The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part I. The effect of germination and kilning on the level of protein Z4, protein Z7 and LTP1. Journal of the Institute of Brewing, 2012, 105(3): 159-170
- [8] Evans D E, Sheehan M C, Stewart D C. The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part II: The influence of malt foam-positive proteins and non-starch polysaccharides on beer foam quality. Journal of the Institute of Brewing, 2012, 105(3): 171-178
- [9] 孙付保,陈霞,王晓丹,程贺,赵长新. 国产主要东北大麦和华东大麦热稳定蛋白的比较. 中国酿造, 2010, 29(10): 81-83
Sun F B, Chen X, Wang X D, Cheng H, Zhao C X. Comparison of heat-stable protein in Chinese northeast and east barleys. China Brewing, 2010, 29(10): 81-83
- [10] 王凤敏,栗建光,龚友才,戴志刚,陈基权,郑海燕,李燕. 不同红麻种子耐老化性差异及热稳定蛋白的研究. 植物遗传资源学报, 2010, 11(1): 5-9
Wang F M, Su J G, Gong Y C, Dai Z G, Chen J Q, Zheng H Y, Li Y. Difference of aging tolerance and heat-stable proteins in seeds of difference kenaf cultivars. Journal of Plant Genetic Resources, 2010, 11(1): 5-9
- [11] Bradford M M. A Rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. Analytical Biochemistry, 1976, 72(S1-2): 248-254
- [12] 吴晓亮,辛萍萍,张志娥,陈晓玲,陶澜,卢新雄. 水稻种子室温贮藏最适含水量及其热稳定蛋白的研究. 中国农业科学, 2006, 39(11): 2214-2219
Wu X L, Xin P P, Zhang Z E, Chen X L, Tao L, Lu X X. Studies on optimum moisture content and heat-stable protein of rice seeds sored at room temperature. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(11): 2214-2219
- [13] 付深造,辛霞,张志娥,陈晓玲,辛萍萍,卢新雄. 利用热稳定蛋白特异条带鉴别籼粳稻的方法研究. 植物遗传资源学报, 2011, 12(1): 19-24
Fu S Z, Xin X, Zhang Z E, Chen X L, Xin P P, Lu X X. Method for identifying Indica-Japonica rice by using specific heat-stable protein bands. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 12(1): 19-24
- [14] Lapitan N L V, Hess A, Cooper B, Botha A M. Differentially expressed genes during malting and correlation with malting quality phenotypes in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theoretical and Applied Genetics, 2009, 118(5): 937-952
- [15] Knorr V, Kerpess R, Wieser H, Zarnkow M, Becker T, Koehler P. Production and application of barley malt extract with high peptidase activity for the degradation of gluten in wort. European Food Research and Technology, 2016, 242(4): 585-597
- [16] 潘永东,包奇军,张华瑜,柳小宁. 啤酒大麦新品种在甘肃省中部地区的适应性研究. 大麦与谷类科学, 2008(3): 1-3
Pan Y D, Bao Q J, Zhang H Y, Liu X N. Adaptability of new barley varieties in central gansu province. Barley and Cereal Sciences, 2008(3): 1-3
- [17] Asres T, Tadesse D, Wossen T, Sintayehu A. Performance evaluation of malt barley: from malting quality and breeding perspective. Journal of Crop Science and Biotechnology, 2018, 21(5): 451-457
- [18] 孙俊,张天雪,孙丽华,徐凯,赵长新. 大麦发芽过程中热稳定蛋白质的变化及部分生化特性. 大连轻工业学院学报, 2008, 27(3): 223-227
Sun J, Zhang T X, Sun L H, Xu K, Zhao C X. Characterization of heat-stable protein in germinating barley seeds. Journal of Dalian Polytechnic University, 2008, 27(3): 223-227
- [19] 周芸芸,陈爽,王国华,陆英,王荣,王小溪,王安平,林智平. 制麦过程中蛋白酶活力变化和蛋白质溶解情况的研究. 啤酒科技, 2017(12): 42-51
Zhou Y Y, Chen S, Wang G H, Lu Y, Wang R, Wang X X, Wang A P, Lin Z P. Changes of protease activity and protein dissolution in wheat making process. Beer Science and Technology, 2017(12): 42-51
- [20] Brandt A, Svendsen I, Hejgaard J. A plant serpin gene. Structure, organization and expression of the gene encoding barley protein Z4. European Journal of Biochemistry, 2010, 194(2): 499-505
- [21] Fasoli E, Aldini G, Regazzoni L, Kravchuk A V, Citterio A, Righetti P G. Les Maitres de l' Orge: proteome content your mug. Journal of Proteome Research, 2010, 9(10): 5262-5269
- [22] Han Y P, Wang J J, Li Y X, Hang Y, Yin X S, Li Q. Circular dichroism and infrared spectroscopic characterization of secondary structure components of protein Z during mashing and boiling processes. Food Chemistry, 2015, 188: 201-209
- [23] 吴晓明,陈锦新,吴桂玉. 啤酒大麦品种的蛋白质含量和环境变异研究. 大麦科学, 2004(1): 27-29
Wu X M, Chen J X, Wu G Y. Study on protein content and environmental variation of malting barley cultivar. Barley Science, 2004(1): 27-29
- [24] 陈锦新,张国平,汪军妹,陈仲华,周体耀. 氮肥运筹对大麦β-葡聚糖酶活性和麦芽品质的影响. 作物学报, 2004, 30(1): 47-51
Chen J X, Zhang G P, Wang J M, Chen Z H, Zhou T Y. The Effects of timing of N application on barley β-glucanase activity and malt quality. Acta Agronomica Sinica, 2004, 30(1): 47-51
- [25] 孙立军,吕耀昌,孔繁玲,刘文欣. 大麦高蛋白种质遗传稳定性分析. 大麦科学, 2002(3): 8-13
Sun L J, Lv Y C, Kong F L, Liu W X. Genetic stability analysis of high-protein germplasms of barley. Barley Science, 2002(3): 8-13
- [26] Steiner E, Gastl M, Becker T. Protein changes during malting and brewing with focus on haze and foam formation: a review. European Food Research and Technology, 2011, 232(2): 191-204