

# 大豆种子贮藏蛋白遗传改良研究进展

刘春<sup>1,2</sup>, 王显生<sup>1</sup>, 麻浩<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>南京农业大学大豆研究所, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏南京 210095; <sup>2</sup>衡阳师范学院生命科学系, 湖南衡阳 421008)

**摘要:**大豆种子中含有40%左右的蛋白质,是世界重要的植物蛋白来源,7S和11S组分是大豆种子贮藏蛋白的主要构成部分,约占70%。7S组分主要由 $\alpha'$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ 亚基构成,这三个亚基分别由*Cgy*<sub>1</sub>、*Cgy*<sub>2</sub>和*Cgy*<sub>3</sub>基因控制;11S组分由酸性多肽链和碱性多肽链组成的A<sub>1a</sub>B<sub>1b</sub>、A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub>、A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>、A<sub>3</sub>B<sub>4</sub>和A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub>等五个亚基构成。这些亚基分别由*Gy*<sub>1</sub>、*Gy*<sub>2</sub>、*Gy*<sub>3</sub>、*Gy*<sub>4</sub>和*Gy*<sub>5</sub>基因控制。大豆种子贮藏蛋白亚基变异类型丰富,除对大豆种质进行筛选外,国外研究者已通过杂交育种和辐射诱变育种培育出了高11S/7S比值的品系。通过外源基因导入和编码大豆贮藏蛋白基因修饰来提高大豆种子蛋白品质的遗传工程方面已经起步。理化诱变也是改良大豆蛋白品质的一条可行途径。所有这些研究对于改良大豆贮藏蛋白的营养价值和加工品质都具有重要意义。

**关键词:**大豆;种子贮藏蛋白;遗传改良;7S和11S;亚基

**中图分类号:**S565.1      **文献标识码:**A      **文章编号:**1000-9841(2008)05-0866-08

## Genetic Improvement on Soybean Seed Storage Proteins

LIU Chun<sup>1,2</sup>, WANG Xian-sheng<sup>1</sup>, MA Hao<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement; Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu; <sup>2</sup>Department of Life Science, Hengyang Normal University, Hengyang 421008, Hunan, China)

**Abstract:** Soybean seeds are one of the most-important vegetable protein sources because of their high protein content (about 40%). The storage proteins in soybean seeds consist of two major components, 7S globulin ( $\alpha$ -conglycinin) and 11S globulin (glycinin), which together account for about 70% of the total seed protein. 7S globulin consists of three primary subunits,  $\alpha'$ ,  $\alpha$  and  $\beta$ ,  $\alpha'$ ,  $\alpha$  and  $\beta$  are encoded by *Cgy*<sub>1</sub>, *Cgy*<sub>2</sub> and *Cgy*<sub>3</sub>, respectively; 11S globulin consists of five major subunits which designated as A<sub>1a</sub>B<sub>1b</sub>, A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>, A<sub>3</sub>B<sub>4</sub> and A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub>, respectively. Each subunit is composed of two parts; an acidic polypeptide and a basic polypeptide, which are linked by a single disulfide bond. The five subunits are encoded by five genes, which are designated as *Gy*<sub>1</sub>, *Gy*<sub>2</sub>, *Gy*<sub>3</sub>, *Gy*<sub>4</sub> and *Gy*<sub>5</sub>, respectively. There is great genetic diversity of the relative contents of seed storage protein and their subunits in soybean germplasm. In addition to screening soybean germplasm for variation, high 11S/7S ratio lines have been obtained by crossing breeding and radiation induction. The genetic engineering of soybean proteins by introduction of foreign genes into transgenic soybean plants and modification of genes encoding storage proteins of soybeans have been started. Physic-chemic induction is also a feasible method to improve soybean protein quality. All of these are very important to improve the functional and nutritional properties of soybean proteins.

**Key words:** Soybean; Seed storage protein; Genetic improvement; 7S and 11S; Subunits

大豆种子中含有40%左右的蛋白质,其中90%是贮藏蛋白,它营养价值丰富、全面,食品功能特性优良,是世界重要的植物蛋白来源。大豆种子贮藏蛋白在种子形成过程中逐渐合成和积累,又在种子萌发过程中逐渐降解,这些贮藏蛋白为大豆种子的萌发提供了氨基酸和氮的主要来源。此外,大豆种子贮藏蛋白基因表达调控机制的研究也是一个有价

值的课题。该文综述了国内外大豆种子贮藏蛋白在遗传改良方面的研究概况。

### 1 大豆种子贮藏蛋白组分及其亚基

大豆种子贮藏蛋白组分可按不同标准划分。Osborne根据蛋白质的溶解度差异把大豆和其它豆科植物蛋白质分为溶于水的清蛋白、溶于盐的球蛋

收稿日期:2008-05-26

基金项目:引进国际先进农业技术计划(948计划)资助项目(2001-207);高等学校学科创新引智计划资助。

作者简介:刘春(1978-),男,硕士,讲师,现主要从事大豆品质改良与利用方面的研究。

通讯作者:麻浩,博士,教授。E-mail:Lq-ncsi@njau.edu.cn。

白、溶于乙醇的醇溶蛋白和溶于稀酸和稀碱的谷蛋白,并分析了大豆蛋白质各组分的含量<sup>[1]</sup>。周新安等按此划分标准对大豆种子蛋白质组成成分的分析,结果表明:清蛋白含量为 7.50%,球蛋白为 28.56%,醇溶蛋白为 1.81%,谷蛋白为 5.71%<sup>[2]</sup>。随着超速离心技术的发展,Naismith 采用离心技术,根据沉降系数将大豆蛋白质区分为 2S、7S、11S 和 15S 组分。其中 7S 和 11S 约占大豆球蛋白总量的 70% 左右,是大豆种子贮藏蛋白的主要成分<sup>[3]</sup>。现在的大豆种子贮藏蛋白的分类大都按此法划分。

### 1.1 2S 组分

2S 组分分子量在 27.8 ~ 32.5 kDa 之间,等电点在 pH5.8 ~ 4.5 之间<sup>[4]</sup>。Koshiyama 等发现 2S 蛋白包括两个免疫学特性不同组分,即二者具有不同的抗原性。2S 球蛋白在圆盘电泳上可分为 6 条带,其中以  $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ 、 $\alpha_4$  三条带为主带,占全部 2S 球蛋白的 80%,具有胰蛋白酶抑制剂的作用<sup>[5]</sup>。

### 1.2 7S 组分

大豆 7S 组分是糖蛋白,碳水化合物占 7S 伴大豆球蛋白总量的 5% 左右<sup>[6]</sup>。7S 球蛋白的空间结构是紧密折叠的,其中  $\alpha$ -螺旋结构、 $\beta$ -折叠结构和不规则结构分别占 5%、35% 和 60%。7S 伴大豆球蛋白中含有人体必需的 8 种氨基酸,赖氨酸含量高于 11S 球蛋白<sup>[7]</sup>。7S 球蛋白中色氨酸和蛋氨酸总量是 11S 球蛋白的 1/5 ~ 1/6,所以 7S 伴大豆球蛋白与 11S 球蛋白相比是低含硫氨基酸蛋白质<sup>[8]</sup>。

大豆 7S 球蛋白分子量为 180 ~ 210 kDa,包括 3 种组分: $\beta$ -伴大豆球蛋白( $\beta$ -conglycinin)、 $\gamma$ -伴大豆球蛋白( $\gamma$ -conglycinin)和碱性 7S 球蛋白,其中  $\beta$ -伴大豆球蛋白是主要存在形式,由  $\alpha'$ 、 $\alpha$  和  $\beta$  三种亚基组成<sup>[9]</sup>,分子量分别为 72 kDa、68 kDa 和 52 kDa<sup>[10]</sup>,这三种主要亚基以同源或异源三聚体形式存在<sup>[11]</sup>。也有报道  $\beta'$ 亚基的存在<sup>[12]</sup>。笔者在大豆种质资源籽粒贮藏蛋白鉴定中也发现多份种质含有  $\beta'$ 亚基。Thanh 和 Shibasaki 把 7S 蛋白分成 6 种异构体( $B_1$  -  $B_6$ ):  $B_1$ ,  $\alpha' \beta \beta$ ;  $B_2$ ,  $\alpha \beta \beta$ ;  $B_3$ ,  $\alpha \alpha' \beta$ ;  $B_4$ ,  $\alpha \alpha \beta$ ;  $B_5$ ,  $\alpha \alpha \alpha'$ ;  $B_6$ ,  $\alpha \alpha \alpha$ 。这些异构体在氨基酸比例和碳氢比例上都稍有不同<sup>[9,13-14]</sup>。

### 1.3 11S 组分

11S 组分(大豆球蛋白)也是一种六聚体糖蛋白,但是糖的含量要比 7S 组分少得多,只有 0.8%,分子量为 300 ~ 380 kDa,约占种子总蛋白的 35%<sup>[15]</sup>,可分为酸性多肽链  $A_{1a}$ (MW ~ 38 kDa)、 $A_{1b}$

(MW ~ 38 kDa)、 $A_2$ (MW ~ 38 kDa)、 $A_3$ (MW ~ 45 kDa)、 $A_4$ (MW ~ 38 kDa)、 $A_5$ (MW ~ 11 kDa),碱性多肽链  $B_{1a}$ (MW ~ 19 kDa)、 $B_{1b}$ (MW ~ 19 kDa)、 $B_2$ (MW ~ 19 kDa)、 $B_3$ (MW ~ 20 kDa)、 $B_4$ (MW ~ 19 kDa)等 11 个多肽链,它们以二硫键结合形成特定的酸-碱配对的二聚体<sup>[16]</sup>。Scallan 等根据分子大小和同源性把它们划分为两组:组 I ( $A_{1a} B_{1b}$ 、 $A_2 B_{1a}$  和  $A_{1b} B_2$ )和组 II ( $A_5 A_4 B_3$  和  $A_3 B_4$ )。组 II 又可分为 II a ( $A_5 A_4 B_3$ )和 II b ( $A_3 B_4$ )两个亚组<sup>[17]</sup>。

### 1.4 15S 组分

15S 组分占大豆种子蛋白 11% 左右,分子量在 600 kDa 以上,它并不是单纯蛋白质,而是由多种分子构成的。在酸沉淀或透析沉淀时,15S 首先沉淀。目前对这一组分研究得还很不透彻,还未能单独分离提取到<sup>[15]</sup>。

## 2 大豆种子贮藏蛋白亚基的遗传研究

### 2.1 7S 球蛋白亚基的遗传

Kitamura 等认为  $\alpha'$ 亚基的产生由一显性基因  $Cgy_1$ 控制,而  $\alpha'$ 亚基的缺失由一隐性基因  $cgy_1$ 控制<sup>[18]</sup>。Davies 等研究认为, $\alpha$ 亚基的产生由一显性基因  $Cgy_2$ 控制,而  $\alpha$ 亚基的缺失由一隐性基因  $cgy_2$ 控制<sup>[19]</sup>。Tsukada 等认为  $\beta'$ 亚基由一个隐性基因  $cgy_3$ 控制,纯合  $Cgy_3/Cgy_3$ 无  $\beta'$ 亚基, $Cgy_2$ 和  $Cgy_3$ 紧密连锁, $Cgy_{2a}$ 和  $Cgy_{2b}$ 分别代表  $\alpha$ 亚基电泳正常型和慢型的基因,并认为  $\beta$ 亚基的表现受环境因素的影响而很难对其基因进行遗传分析<sup>[12]</sup>。Hayashi 等在研究 7S 全缺失突变体的特点时指出,Southern 和 Northern 杂交分析表明缺失并非 7S 球蛋白亚基基因缺失或结构缺陷,而很可能发生在 mRNA 转录水平<sup>[20]</sup>。

### 2.2 11S 球蛋白亚基的遗传

11S 球蛋白的基因家族至少有 5 个成员,即  $Gy_1$ 、 $Gy_2$ 、 $Gy_3$ 、 $Gy_4$ 、 $Gy_5$ ,分别编码  $A_{1a} B_{1b}$ 、 $A_{1b} B_2$ 、 $A_2 B_{1a}$ 、 $A_5 A_4 B_3$  和  $A_3 B_4$ 。每个大豆球蛋白基因编码一种由单一 mRNA 翻译而成的球蛋白亚基前体,该前体是由信号序列、酸性(A)肽、短肽接头和碱性(B)肽组成<sup>[21]</sup>。Cho 等利用 AFLP 分析了这些基因的遗传规律及组织形式,认为  $Gy_1$ 、 $Gy_2$  紧密连锁于一个遗传位点,两基因之间相隔 3 kb, $Gy_3$ 、 $Gy_4$  和  $Gy_5$  分别位于基因组的 3 个位点,遵循孟德尔分离规律,独立遗传<sup>[22]</sup>。Kaizuma 等报道,通过  $\gamma$ 射线处理筛选出

的缺失组 I ( $A_{1a}B_{1b}$ 、 $A_{1b}B_2$  和  $A_2B_{1a}$ ) 的变异类型表现为单一隐性基因控制<sup>[23]</sup>。Kitamura 等以缺少  $A_5A_4B_3$  亚基品种(雷电)与缺失  $\alpha'$  亚基品种(毛振)杂交,对  $F_2$  和  $F_3$  代分析结果表明: $A_5A_4B_3$  亚基缺失由隐性基因  $gy_4$  控制,与控制  $\alpha'$  亚基缺失基因  $cgy_1$  无连锁关系<sup>[18]</sup>。Kitamura 等利用一个野生大豆缺失  $A_3B_4$  亚基的新突变体与缺失组 I 全部亚基、缺失  $A_5A_4B_3$  亚基亲本杂交,对  $F_2$  560 粒种子采用 SDS-PAGE 检测 11S 球蛋白,结果显示  $A_3B_4$  亚基的存在与缺失符合 3:1 比例, $A_5A_4B_3$  亚基的存在与缺失也符合 3:1 比例,表明  $A_3B_4$  亚基和  $A_5A_4B_3$  亚基的缺失均由单一隐性基因控制;组 I 亚基则像一个集团,在  $F_2$  种子检测中未发现其不同亚基的重组类型;在  $F_2$  代中出现 8 种基因型,包括 1 种具有全部 11S 球蛋白的原始型、3 种单突变体类型、3 种双突变体类型和 1 种缺失全部 11S 亚基的三突变体类型,分离比例为 27:9:9:9:3:3:3:1,表现出控制组 I、 $A_3B_4$  和  $A_5A_4B_3$  三个基因位点呈独立分配;他们指出,11S 亚基双隐性和三隐性基因导致 11S 球蛋白含量降低,但值得注意的是,7S 蛋白则没有明显的增加;相反 7S 低含量品系中,11S 蛋白的提高补偿了 7S 的降低,从而保持了籽粒蛋白含量的恒定<sup>[24]</sup>。Teraishi 等研究指出,虽然  $\alpha'$ 、 $\alpha$  和  $\beta$  亚基是由归属于不同连锁群的多基因家族编码的,但有一个单主效基因 *Scg-1* (7S 球蛋白的抑制基因),控制着它们的缺失。该缺失性状不是因为 7S 蛋白亚基基因的改变或缺失造成的,而是由于缺少转录基因造成的,这表明 *Scg-1* 抑制 7S 蛋白亚基基因的表达。连锁分析表明 *Scg-1* 座位与  $\alpha$  和  $\beta$  亚基基因位于同一染色体的同一区段,三者之间紧密连锁。此外,包含 *Scg-1*、 $\alpha$  和  $\beta$  亚基基因位点的染色体区段甲基化,说明亚基缺失与多拷贝基因沉默有关<sup>[25]</sup>。*Scg-1* 对大豆的生长发育无明显影响,因此在调控大豆种子蛋白组分方面 *Scg-1* 是一个有用的基因资源。

笔者在 SDS-PAGE 筛选到蛋白亚基特异种质的基础上,运用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2-DE)分析大豆贮藏亚基正常品种南农大黄豆和亚基变异品种桂阳紫金豆种子总蛋白的蛋白质组。差异蛋白质组学显示,等电点和分子量分别约为 5.40 和 37.85 kDa、5.24 和 37.2 kDa、5.15 和 37.05 kDa 的蛋白质点在正常品种种子中表达而在缺失品种中未表达。对这 3 个蛋白质点用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)测定其胶内酶解后的肽

质量指纹谱(PMF),对获得的 PMF 用 Mascot 软件在 NCBI 数据库中查询比对,鉴定出这 3 个蛋白质点均为大豆球蛋白  $A_{1a}B_{1b}$  亚基同源三聚体,表明桂阳紫金豆种子贮藏蛋白缺少  $A_{1a}b_{1b}$  亚基。此后,作者研究了 4 个不同蛋白亚基类型( $A_{1a}B_{1b}$  亚基正常、 $A_{1a}B_{1b}$  亚基缺失; $A_3B_4$  亚基正常、 $A_3B_4$  亚基缺失)的品种所配成的 6 个杂交组合的  $F_1$ 、 $F_2$ 、 $F_3$  种子蛋白亚基表现及其遗传。结果表明: $A_{1a}B_{1b}$ 、 $A_3B_4$  亚基正常分别受一显性基因控制, $A_{1a}B_{1b}$ 、 $A_3B_4$  亚基缺失分别受一对隐性基因控制,控制  $A_{1a}B_{1b}$ 、 $A_3B_4$  亚基正常的基因分别对控制  $A_{1a}B_{1b}$ 、 $A_3B_4$  亚基缺失的基因均表现为完全显性,其  $F_2$  的分离均符合 3:1 的遗传比例,这些与前人的研究结果相符。其中, $A_{1a}B_{1b}$  亚基的遗传规律是首次与  $A_2B_{1a}$  和  $A_{1b}B_2$  亚基分开而单独被研究的。笔者进一步对所掌握的 11S 组分亚基缺失体的亚基缺失的分子机制进行研究发现,亚基的缺失一类是因基因的翻译起始密码子 ATG 变成了 ATA,这直接影响后面的翻译,导致了亚基的缺失;另一类原因是由于在基因中插入了大段序列而导致的缺失(结果待发表)。

### 3 7S 和 11S 亚基含量变异类型及其遗传改良

11S 和 7S 球蛋白由于氨基酸组成和结构不同,其营养性和功能性有较大的差异。在每单位蛋白中 11S 球蛋白中含硫氨基酸的含量是 7S 球蛋白中的 4 倍。7S 蛋白疏水氨基酸多,表面活性强,因此乳化性好;但因分子中含二硫键和巯基少,所以凝胶的硬度低;而 11S 蛋白中含有丰富的二硫键及巯基,它所形成的凝胶硬度强<sup>[26]</sup>。因而,大豆种子蛋白中 11S 和 7S 的相对含量不仅可直接影响蛋白的营养特性,也可直接影响其功能性,从而影响其应用。所以,国内外对 11S 和 7S 球蛋白的研究非常重视。

#### 3.1 大豆种子贮藏蛋白不同 11S/7S 比值种质的筛选

Kitamura 等利用 SDS-PAGE 对 1700 份大豆种质贮藏蛋白分析表明,11S 与 7S 的比值一般为 1.12。并发现秣食豆(公 503)和毛振两种质具有较高的 11S/7S 比值,分别为 2.59 和 1.61<sup>[27]</sup>;徐豹等分析了中国不同纬度 213 份野生大豆的 11S/7S 比值,平均为 1.06,比值变异幅度为 0.36~2.44,并发现 1 份比值高达 4.40 的种质<sup>[28]</sup>;黄丽华等对我国 122 份大豆品种种子贮藏蛋白 11S 和 7S 组分的研

究表明 11S/7S 比值范围为 0.69 ~ 2.58, 平均值为 1.61<sup>[29]</sup>; 王丽侠等对我国 1757 份大豆种质资源 11S 和 7S 组分的研究表明 11S/7S 比值范围为 0.72 ~ 2.99, 平均值为 1.885<sup>[30]</sup>。关荣霞等对 175 份中国大豆材料进行检测表明 11S/7S 比值范围为 0.77 ~ 4.67<sup>[31]</sup>; 麻浩等对 603 份地方品种和 103 份育成品种贮藏蛋白亚基相对含量的研究表明 11S/7S 平均值分别为 1.54 和 1.65, 变异范围分别为 0.77 ~ 3.86 和 0.90 ~ 2.30<sup>[32]</sup>。

除对大豆种质进行筛选外, 国外研究者已通过杂交育种和辐射诱变育种培育出了高 11S/7S 比值的品系。Ogawa 等利用毛振 × F<sub>1</sub> (Oodat No. 1 × 秣食豆公 503) 杂交组合培育出一些遗传上稳定但 7S 含量较低的品系, 这些品系的特点是 7S 球蛋白 α' 亚基缺失、α 和 β 亚基含量显著下降。对 7S 低含量品系与普通品种的 7S 和 11S 球蛋白、总蛋白、蛋白体及氨基酸组成进行比较表明, 7S 低含量品系的 7S 球蛋白仅为普通品种的一半, 而 11S 球蛋白则比普通品种高 14%, 但蛋白质组成的显著改变并未影响总蛋白含量及蛋白体的发育及形态; 而且 4 个代表性 7S 低含量品系平均含硫氨基酸含量比普通品种高 20%; 7S 与 11S 含量呈显著负相关 ( $r = -0.84$ )<sup>[33]</sup>。这些结果也表明, 在积累过程中 11S 球蛋白可补偿 7S 的降低, 从而保证 7S 低含量品系的种子总蛋白含量的相对恒定性。Takahashi 等从 γ 射线处理的 Karikei 434 (α' 缺失、α 和 β 低) 后代中鉴定出一个 α' 和 α 缺失、β 低、11S/7S 比值极高的大豆突变品系; 对该品系 3 个世代的观察检测表明, 尽管 7S 蛋白显著下降, 但总蛋白含量则没有减少, 同时也未发现对生理特性有不利影响<sup>[34]</sup>。

### 3.2 大豆种子贮藏蛋白 7S、11S 组分亚基含量变异类型

胡志昂等用 SDS 梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳分析了我国 82 份栽培大豆和 127 份野生大豆的种子蛋白, 发现在野生大豆种子蛋白的一些亚基有迁移率的变异, 尤以 β 亚基的变异最为常见, 并报道了 1 例 α' 亚基快、A4 亚基慢的电泳变异类型<sup>[35]</sup>。关荣霞等报道筛选出 1 份 β 亚基自然缺失的种质<sup>[31]</sup>。而国外学者对此研究得较多。在常规筛选方面, Kitamura 等从日本大豆种质中发现毛振 (Keburi) 缺乏 α' 亚基, 秣食豆 (公 503) 的 α' 和 β 亚基为减半类型<sup>[27]</sup>。Staswick 和 Nielsen 发现了缺失 A5A4B3 亚基类型的品种 Raiden<sup>[36]</sup>。Harada 等认为在日本大

豆种质中缺失 A5A4B3 亚基的类型比较普遍<sup>[37]</sup>。Davies 等则报道了 4 种电泳迁移率变化的类型: 慢 α'、慢 α、αα' 双带和 β 亚基的变异, 其中慢 α' 变异只是在 5M 尿素的 SDS 电泳中才表现出来<sup>[19]</sup>。Tsukada 等发现了 β' 亚基和慢 α 的类型<sup>[12]</sup>。Harada 等发现了几个 β 亚基缺失的材料<sup>[38]</sup>。在日本野生大豆种质中, Kitamura 等发现了 A3B4 缺失的类型<sup>[24]</sup>, Hajika 等发现了 7S 球蛋白全缺失的类型<sup>[39]</sup>, 而 Teraishi 等则发现一个缺失 α'、α 和 β 亚基的类型<sup>[25]</sup>。在人工诱导方面, 通过 γ 辐射诱导, Odanaka 和 Kaizuma 发现了缺失 α、β 亚基和缺失组 I (A<sub>1a</sub>B<sub>1b</sub>、A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> 和 A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub>) 的两种类型<sup>[40]</sup>, Takahashi 等从 γ 射线处理的 Karikei434 (α' 缺失、α 和 β 低) 后代中鉴定出一个 α' 和 α 缺失、β 低的类型<sup>[34]</sup>, Hayashi 等发现了 7S 球蛋白全缺失的类型<sup>[20]</sup>。不过, 通过诱变获得的材料常伴有黄萎病、不育或致死等不正常现象。Takahashi 等利用各种亚基缺失材料采用聚合杂交的方法, 获得了一个 11S 和 7S 全缺的品系<sup>[41]</sup>。

笔者曾以 1400 份大豆品种资源为材料, 利用 SDS-PAGE 分析贮藏蛋白 11S 和 7S 组分及其亚基含量与亚基缺失情况, 从 1400 份参试材料中鉴定出 34 份亚基含量特异材料, 其中包括 α' 和 α 亚基含量低、β 亚基含量低、A<sub>3</sub>B<sub>4</sub> 亚基缺失、A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub> 亚基缺失和 A<sub>1a</sub>B<sub>1b</sub> 亚基缺失种质。在筛选获得的蛋白亚基缺失种质的基础上, 从 2003 年开始, 作者利用聚合杂交方法, 在缺失 A<sub>1a</sub>B<sub>1b</sub>、A<sub>3</sub>B<sub>4</sub> 和 A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub> 亚基单株间及其分离后代间进行杂交, 经 SDS-PAGE 检测表明: 获得了 5 份缺失 A<sub>1a</sub>B<sub>1b</sub>、A<sub>3</sub>B<sub>4</sub> 和 A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub> 亚基的种质。

## 4 提高营养与加工特性的遗传工程研究

### 4.1 外源基因导入

目前有关通过导入外源基因并使之表达来提高大豆种子蛋白品质的转基因方面的研究成果报道不多。较成功例子是 Kim 等通过蛋白质工程技术, 选用 pKGA<sub>1a</sub>B<sub>1b</sub>IV + Met 做表达质粒, 对大豆球蛋白前体 (细胞内大豆球蛋白合成初始产物) 进行修饰改性, 以期改进其功能性<sup>[42]</sup>。

孙英等研究发现导入花器官发育调节基因 *gag1* 引起大豆种子贮藏蛋白组成发生变化, 转基因大豆含硫氨基酸含量得到提高<sup>[43]</sup>。

此外也有将编码大豆蛋白基因导入其他植物中

并使之表达的例子。例如 Bray<sup>[44]</sup> 和 Lawton<sup>[45]</sup> 等将 7S 球蛋白  $\alpha'$  和  $\beta$  亚基的基因导入矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 和烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 中并得以表达和积累。Altenbach<sup>[46]</sup>、Clercq 等<sup>[47-48]</sup> 构建了一个编码巴西坚果 (*Bertholletia excelsa*) 或拟兰芥 *thaliana* 2S 贮藏蛋白嵌合基因, 并将其转入到拟兰芥、油菜或烟草等植物中, 2S 贮藏蛋白在这些转基因植物中也得以表达并积累。

#### 4.2 编码大豆贮藏蛋白基因的修饰

通过蛋白质工程技术修饰基因主要有以下四个方面的内容: (1) 结构域交换; (2) 从编码大豆贮藏蛋白基因可变区 (V 基因区段) 删除基因碎片或将删除基因碎片插入到可变区; (3) 将合成 DNA 或外源基因片段插入到可变区; (4) 基因突变 (即定点诱变)。

**4.2.1 结构域交换** 根据氨基酸序列同源性将大豆球蛋白亚基分成的两组 (组 I:  $A_{1a}B_{1b}$ ,  $A_{1b}B_2$ ,  $A_2B_{1a}$ , 组 II:  $A_3B_4$ ,  $A_5A_4B_3$ )。每组中亚基有 84% ~ 89% 序列是同源的, 两组之间亚基有 45% ~ 49% 序列是同源的<sup>[49]</sup>, 也就是说, 亚基之间同源性是相当高的。另一方面, 不同的亚基对大豆蛋白功能性贡献是不一样的。再者不同亚基含硫氨基酸含量不同。因此通过交换编码结构域可产生新的贮藏蛋白, 其功能性质或营养价值均有改进或提高, 且蛋白质折叠过程中不会出现构象问题。事实上, Utsumi<sup>[50]</sup> 将  $A_2B_{1a}$  亚基  $B_{1a}$  结构域和  $A_{1a}B_{1b}$  亚基  $B_{1b}$  结构域交换, 构建一个编码  $A_2B_{1b}$  新基因,  $A_2B_{1b}$  亚基共含有 9 个甲硫氨酸残基。这个通过交换结构域产生的基因, 由于它有 1 个大豆球蛋白分子原始结构域, 因而有望在转基因大豆中作为一个稳定亚基表达, 也就是说, 它可自组装形成一个大豆球蛋白分子。

**4.2.2 编码大豆贮藏蛋白基因可变区基因碎片的删除** 基因片段删除或插入必须在贮藏蛋白亚基可变区域, 这是因为可变区在形成和维持贮藏蛋白结构方面几乎不起作用, 因而这种基因改性是可行的, 否则转基因植物中所要表达的蛋白质就有可能发生构象问题, 影响多肽链正确折叠形成蛋白质分子。Wright 认为在  $A_{1a}B_{1b}$  亚基上存在着 I、II、III、IV 和 V 5 个可变区, 这些区域位于亲水区, 说明它们位于蛋白质分子表面<sup>[51]</sup>。Nakamura 等发现热诱导凝胶形成能力取决于大豆球蛋白亚基结构热不稳定性, 也就是说, 亚基结构构象稳定性降低增加热诱导凝胶形成速度, 从而增强凝胶强度。此外, 凝胶强度随

着亚基大小和游离巯基基团空间位置变化而增强; 凝胶透明度随着游离巯基基团数目减少或其位置改变而增加<sup>[52]</sup>。Kato 和 Yutani 曾报道蛋白质乳化能力取决于分子不稳定性, 即不稳定性增加, 乳化能力增加<sup>[53]</sup>。从以上有关蛋白质凝胶形成和乳化能力研究结果来看, 可以推测, 疏水性增加或亚基结构构象稳定性降低, 将有助于提高乳化能力、凝胶形成速度或凝胶强度。 $A_{1a}B_{1b}$  亚基所有可变区具有较强亲水性。因此, 部分或全部删除可变区会引起亚基分子疏水性增加, 从而降低分子稳定性, 结果使其乳化性能、凝胶形成速度或凝胶强度提高。另一方面, 将疏水片段插入可变区会使分子量加大, 疏水性增加, 从而提高其凝胶强度和/或乳化性能。

**4.2.3 外源基因导入与基因突变** 基因突变技术是通过在基因水平上对其编码的蛋白质分子进行改造, 在其表达后用来研究蛋白质结构与功能的一种方法。这一技术的出现使蛋白质结构与功能关系的研究产生革命性变化, 可根据需要来研究特定氨基酸残基、特定结构单元在蛋白质结构形成和功能表达中的作用。根据其特点, 可将基因突变分为两大类: 位点特异性突变和随机突变。位点特异性突变又可大体分为三种类型: 一类是通过核苷酸介导基因突变; 第二类是盒式突变或片段取代突变; 第三类是利用聚合酶链式反应 (PCR), 以双链 DNA 为模板进行基因突变。其中 PCR 技术的出现为基因突变、基因剪接开辟了一条极其有效、快捷的道路。当然无论哪种方法都可在为蛋白质编码的基因序列上产生插入、缺失和取代等突变<sup>[54]</sup>。

Kim 等制备几种类型大豆球蛋白  $A_{1a}B_{1b}$  亚基修饰基因, 并将其命名为 ( $A_{1a}B_{1b-3}$ )、( $\Delta I$ )、( $\Delta V8$ )、( $IV+4Met$ ) 和 ( $V+4Met$ )。( $A_{1a}B_{1b-3}$ ) 是指 N-末端 3 个氨基酸残基删除, ( $\Delta I$ ) 是指可变区 I 删除, ( $\Delta V8$ ) 是指从可变区 V 中删除 8 个氨基酸残基。( $IV+4Met$ ) 和 ( $V+4Met$ ) 是指将 4 个连续甲硫氨酸残基分别插入可变区 IV 和 V。由于甲硫氨酸具有一定的疏水能力, 因此插入甲硫氨酸残基, 分子疏水性增加。在修饰基因转移至大豆植株之前, 为了评价这些经过改性后  $A_{1a}B_{1b}$  蛋白是否能够在正常折叠并表现出所期望的功能性质, Kim 等在 *E. coli* 株系 JM105 中构建一个  $A_{1a}B_{1b}$  亚基 cDNA 高水平表达系统。在这个系统中, 改性蛋白  $A_{1a}B_{1b}$  亚基表达质粒被导入 *E. coli* 中, 根据利用该系统所作试验表明, 在 *E. coli* 细胞中, 一些改性蛋白质以可溶性蛋白形式

高水平积累(通常占全部细菌蛋白含量的 10% ~ 20%),且可自组装形成三体<sup>[42]</sup>。

## 5 理化诱变改良大豆蛋白品质的研究

禾本科作物诱变突变研究始于上世纪 20 年代后期。大豆方面的研究于 1957 年才开始。美国、日本、德国、前苏联等国先后开展了物理和化学诱变研究。试验表明,热中子和  $\gamma$  射线不仅引起产量因子的遗传性变异,还可引起种子蛋白质和脂肪含量的突变。我国于 1958 年开始大豆诱变研究,先后培育出黑农 4、黑农 16、辽豆 3 号、铁丰 18、黑农 37、黑农 26、黑农 38 等 25 个品种。进入 20 世纪 70 年代中期,人们对大豆要求的不再仅仅是产量,而是逐渐扩展到蛋白质、脂肪及其组分上。

Odanaka 和 Kaizuma 通过  $\gamma$  辐射诱导发现了缺失  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基和缺失组 I 的两种类型<sup>[40]</sup>,Takahashi 等从  $\gamma$  射线处理的 Karikei434 后代中鉴定出一个  $\alpha'$  和  $\alpha$  缺失, $\beta$  低的类型<sup>[34]</sup>。王培英等采用  $\gamma$  辐射(急、慢照射)、热种子、快中子等物理因子以及甲烷磺酸乙酯(EMS)、叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )等化学诱变剂处理,研究了不同诱变因素对大豆种子蛋白质、脂肪含量、大豆油脂酸组成等性状的作用,探索了改良大豆品质的可行途径<sup>[55]</sup>。

笔者采用 0.2%、0.4% EMS 分别处理南农 493-1 和南农 99C-6 两个品种种子以及利用<sup>60</sup>Co $\gamma$  射线处理 76 个品种种子,处理之后及时播种,单株收获,SDS-PAGE 检测  $M_2$  代和  $M_3$  代种子贮藏蛋白亚基。结果表明:化学诱变率约为 2.92%,物理诱变率约为 5.71%,对大豆蛋白的诱变效果 0.4% EMS 处理优于 0.2% EMS 处理,而<sup>60</sup>Co $\gamma$  射线慢照射处理优于化学诱变处理。并从  $M_3$  代种子中筛选出了 211 粒亚基变异种质。

综上所述,大豆种子贮藏蛋白的遗传改良研究已经在种质筛选、组分及亚基的结构与功能、亚基的遗传规律、遗传工程和诱变育种等方面进行了广泛而深入的研究,并取得了一系列的成果。近十几年来,关于大豆种子贮藏蛋白基因及其表达调控的研究也正在逐渐深入,也取得了一些进展,但在贮藏蛋白亚基缺失的分子机理方面,知之甚少,而这对于调控大豆蛋白 11S/7S 比例从而提高其含硫氨基酸的量非常重要。因此大豆种子贮藏蛋白基因表达调控及亚基突变缺失的分子机理的研究仍是今后研究的

重要课题。

## 参考文献

- [1] Osborne T B. The vegetable proteins [M]. Longmans, Green and Co. London. 1924.
- [2] 周新安,盖钧镒,马育华. 大豆种子贮藏蛋白组成及其相关分析[J]. 大豆科学,1992,11(3):191-197. (Zhou X A, Gai J Y, Ma Y H. Study on the components of seed storage protein and their correlations in soybean [J]. Soybean Science, 1992, 11(3): 191-197.)
- [3] Naismith W E F. Ultracentrifuge studies of soya bean protein [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1955, 16(2): 203-210.
- [4] Koshiyama I, Kikuchi M, Harada K, et al. 2S globulins of soybean seeds. I. Isolation and characterization of protein components [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1981, 29(2): 336-340.
- [5] Koshiyama I, Kikuchi M, Fukushima D. 2S globulins of soybean seeds. II. Physicochemical and biological properties of protease inhibitors in 2S globulins [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1981, 29(2): 340-343.
- [6] 丁勇. 大豆种子贮藏蛋白遗传工程研究 [J]. 中国生物工程杂志, 1995, 15(5): 7-11 (Ding Y. Study on genetic engineering of soybean seed storage protein [J]. China Biotechnology, 1995, 15(5): 7-11.)
- [7] 王金龙, 陈存来. 大豆种子贮藏蛋白组分 11S/7S 研究概况 [J]. 山东农业科学, 1998, 36(1): 48-50. (Wang J L, Chen C L. Study advance on 11S/7S in soybean seed storage protein [J]. Shandong Agricultural Science, 1998, 36(1): 48-50.)
- [8] 刘志胜, 李里特, 辰巳英三. 大豆蛋白营养品质和生理功能研究进展 [J]. 大豆科学, 2000, 19(3): 263-268. (Liu Z S, Li L T, Tatsumi. Nutritional quality and physiological functions of soy protein [J]. Soybean Science, 2000, 19(3): 263-268.)
- [9] Thanh V H, Shibasaki K. Heterogeneity of beta-conglycinin [M]. Biochimica et Biophysica Acta, 1976, 469(3): 326-338.
- [10] Fontes E P B, Moreira M A, Davies C S, et al. Urea-elicited changes in relative electrophoretic mobility of certain glycinin and (-conglycinin subunits [J]. Plant Physiology, 1984, 76(3): 840-842.
- [11] Hill J E, Breidenbach R. W. Protein of soybean seeds II. Accumulation of the major protein components during seed development and maturation [J]. Plant Physiology, 1974, 53(3): 747-751.
- [12] Tsukada Y K, Kitamura K, Harada K, et al. Genetic analysis of subunits of two major storage protein ( $\beta$ -conglycinin and glycinin) in soybean seeds [J]. Japanese Journal of Breeding, 1986, 36(3): 390-400.
- [13] Thanh V H, Shibasaki K.  $\beta$ -conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1977, 490(3): 370.
- [14] Thanh V H, Shibasaki K. Major proteins of soybean seeds. Subunit

- structure of  $\beta$ -conglycinin [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1978, 26(3): 692-695.
- [15] 李里特. 大豆加工与利用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 111-112 (Li L T. Soybean processing and utilization[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003: 111-112.)
- [16] Badley R A, Atkinson D, Hauser H, et al. The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1975, 412(2): 214-228.
- [17] Scallan B, Thanh V H, Floener L A, et al. Identification and characterization of DNA clones encoding group- glycinin subunits [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1985, 70(3): 510-519.
- [18] Kitamura K, Davies C S, Nielsen N C. Inheritance of alleles for *Cgy<sub>1</sub>* and *Cgy<sub>4</sub>* storage protein genes in soybean [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1984, 68(2): 253-357.
- [19] Davies C S, Coates B, Nielsen. Inheritance and biochemical analysis of four electrophoretic variants of  $\beta$ -conglycinin from soybean [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1985, 71(3): 351-358.
- [20] Hayashi M, Harada K, Kitamura K. Characterization of a 7S globulin-deficient mutant of soybean (*Glycine max* (L.) Merri.) [J]. Molecular And General Genetics, 1998, 258(2): 208-214.
- [21] Tumer N, Richter J D, Nielsen N C. Structural characterization of the glycinin precursors [J]. Journal of Biological Chemistry, 1982, 257(8): 4016-4018.
- [22] Cho T J, Davies C S, Nielsen N C. Inheritance and organization of glycinin genes in soybean [J]. The Plant Cell, 1989, 1(3): 329-337.
- [23] Kaizuma N. A mutant line on 11S globulin subunits induced with gamma-ray irradiation [J]. Japanese Journal of Breeding, 1990, 40(5): 505-506.
- [24] Kitamura K, Ishimoto M, Kaizuma K. Genetic relationships among genes for the subunits of soybean 11S globulin [J]. Japanese Journal of Breeding, 1993, 43[Suppl 2]: 159-163.
- [25] Teraishi K, Takahashi M, Hajika M, et al. Suppression of soybean  $\beta$ -conglycinin genes by a dominant gene, Seg-1 [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(8): 1266-1272.
- [26] Saio K, Watanabe T. Differences in functional properties of 7S and 11S soybean protein [J]. Texture Studies, 1991, 9(2): 211-241.
- [27] Kitamura K, Norihiko K. Mutant strains with low level of subunits of 7S globulin in soybean seeds [J]. Japanese Journal of Breeding, 1981, 31(4): 353-359.
- [28] 徐豹, 邹淑华, 庄炳昌, 等. 野生大豆 (*G. soja*) 种子贮藏蛋白组份 11S/7S 的研究 [J]. 作物学报, 1990, 16(8): 235-241. (Xu B, Zou S H, Zhuang B C, et al. Study on seed storage protein component 11S/7S of wild soybean (*G. soja*) [J]. Acta Agronomica Sinica, 1990, 16(8): 235-241.)
- [29] 黄丽华, 麻浩, 王显生, 等. 大豆种子贮藏蛋白 11S 和 7S 组份的研究 [J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(3): 20-23. (Huang L H, Ma H, Wang X S, et al. Study on 11S and 7S fraction of seed storage protein in soybean [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2003, 25(3): 20-23.)
- [30] 王丽侠, 郭顺堂, 付翠真, 等. 大豆种子贮藏蛋白 11S 与 7S 组份的研究 [J]. 中国粮油学报, 2004, 19(4): 53-57. (Wang L X, Guo S T, Fu C Z, et al. The analysis of 11S/7S in soybean storage protein [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2004, 19(4): 53-57.)
- [31] 关荣霞, 常汝镇, 邱丽娟, 等. 栽培大豆蛋白亚基 11S/7S 组成及过敏蛋白缺失分析 [J]. 作物学报, 2004, 30(11): 1076-1079. (Guan R X, Chang R Z, Qiu L J, et al. Analysis of protein subunit 7S/11S constitution and allergen lacking of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivars [J]. Acta Agronomica Sinica, 2004, 30(11): 1076-1079.)
- [32] 麻浩, 王显生, 刘春, 等. 706 份中国大豆种质贮藏蛋白 7S 和 11S 组份及其亚基相对含量的研究 [J]. 大豆科学, 2006, 25(1): 11-17. (Ma H, Wang X S, Liu C, et al. The content variation of 7S, 11S globulins and their subunits of seed storage protein of 706 Chinese soybean germplasm [J]. Soybean Science, 2006, 25(1): 11-17.)
- [33] Ogawa T, Tayama E, Kitamura K, et al. Genetic Improvement of seed storage proteins using three variant alleles of 7S globulin subunits in soybean (*Glycine max* L.) [J]. Japanese Journal of Breeding, 1989, 39(2): 137-147.
- [34] Takahashi K, Banba H, Kikuchi A, Ito M. An induced mutant line lacking the  $\alpha$ -subunit of  $\beta$ -conglycinin in soybean (*Glycine max* (L.) Merri.) [J]. Breeding Science, 1994, 46(1): 65-66.
- [35] 胡志昂, 王洪新, 赵述文, 等. 栽培大豆和野生大豆 (*Glycine soja*) 种子蛋白的变异 [J]. 大豆科学, 1986, 5(3): 205-210. (Hu Z A, Wang H X, Zhao S W, et al. Variation of seed protein for cultivated and wild soybean (*Glycine soja*) [J]. Soybean Science, 1986, 5(3): 205-210.)
- [36] Staswick P E, Hermodson M A, Nielsen N C. Identification of the acidic and basic subunit complex of glycinin [J]. Journal of Biological Chemistry, 1981, 256(16): 8752-8755.
- [37] Harada K, Toyokawa Y, Kitamura K. Genetic analysis of the most acidic 11S globulin subunit and related characters in soybean seeds [J]. Japanese Journal of Breeding, 1983, 33(1): 23-30.
- [38] Harada K, Barker S, Goldberg R. Soybean  $\beta$ -conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and posttranscriptional processes [J]. The Plant Cell, 1989, 1(4): 415-425.
- [39] Hajika M, Takahashi M, Sakai S, et al. A new genotype of 7S globulin ( $\beta$ -conglycinin) detected in wild soybean (*Glycine soja*) [J]. Breeding Science, 1996, 46(4): 385-386.
- [40] Odanaka H, Kaizuma N. Mutants on soybean storage proteins induced with  $\gamma$ -ray irradiation [J]. Japanese Journal of Breeding, 1989, [Suppl 1], 39: 430-431.
- [41] Takahashi M, Uematsu Y, Kashiwaba K, et al. Accumulation of high levels of free amino acids in soybean seeds through integration of mutation conferring seed protein deficiency [J]. Planta, 2003, 217(4): 577-586.
- [42] Kim C S. Enhanced emulsifying activity of soybean proglycinin

- modified by protein engineering[J]. Food Science and Biotechnology, 1999, 8 (3):184-188.
- [43] 孙英. 转 *gaga1* 基因大豆的培育及初步鉴定[D]. 南京农业大学, 2003:33-43. (Sun Y. Transformation of soybean with gene *gaga1* and primary characterization of transgenic plants[D]. Nanjing Agricultural University, 2003:33-43.)
- [44] Bray E A, Naito S, Pan N S, et al. Expression of the  $\beta$ -subunit of  $\beta$ -conglycinin in seeds of transgenic plants[D]. Planta, 1987, 172 (3):364-370.
- [45] Lawton M A, Tierney M A. Expression of a soybean  $\beta$ -conglycinin gene under the control of the Cauliflower Mosaic Virus 35S and 19S promoters in transformed petunia tissues[J]. Plant Molecular Biology, 1987, 9(3):315-325.
- [46] Altenbach S B, Pearson K W, Meeker G, et al. Enhancement of the methionine content of seed proteins by the expression of a chimeric gene encoding a methionine-rich protein in transgenic plants[J]. Plant Molecular Biology, 1989, 13(5):513-522.
- [47] Clercq A D, Vandewiele M, Rycke R D. Expression and processing of an Arabidopsis 2S albumin in transgenic tobacco[J]. Molecular Journal of General Genetics, 1990, 221(3):306-314.
- [48] Clercq A D, Vandewiele M, Damme J V, et al. Stable accumulation of modified 2S albumin seed storage proteins with higher methionine contents in transgenic plants[J]. Plant Physiology, 1990, 94 (3):970-979.
- [49] Yagasaki K, Kaizuma N, Kitamura K. Inheritance of glycinin subunits and characterization of glycinin molecules lacking the subunits in soybean (*Glycine max* (L.) Merri.) [J]. Breeding Science, 1996, 46(1):11-15.
- [50] Utsumi S. Improvement of nutritional value and functional properties of soybean proteins and protein engineering[J]. New Food Industry, 1990, 32 (5):71-84.
- [51] Wright D J. The seed globulins part II. In "Developments in Food Proteins" [M]. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1998:119-127.
- [52] Nakamura T, Utsumi S, Mori T. Effects of temperature on the different stages in thermal gelling of glycinin[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1985, 33 (6):1201-1203.
- [53] Kato A, Yutani K. Correlation of surface properties with conformational stabilities of wild-type and six mutant tryptophan synthase  $\alpha$ -subunit substituted at the same position[J]. Protein engineering, 1988, 2(2):153-156.
- [54] 王大成. 蛋白质工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002:94-105. (Wang D C. Protein engineering[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002:94-105.)
- [55] 王培英, 许德春, 郭玉虹, 等. 人工诱变改良大豆品质的研究[J]. 核农学报, 2000, 14 (1):21-23. (Wang P Y, Xu D C, Guo Y H, et al. Induced mutation for soybean quality[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2000, 14 (1):21-23.)

(上接第 865 页)

合制备大豆小分子多肽的工艺条件:粗胰酶用量为  $9\ 000\ \text{U} \cdot \text{g}^{-1}$  水解温度  $55^{\circ}\text{C}$ , pH 值 8.5, 水解时间 6.0 h。中性微生物蛋白酶条件:加酶量  $8\ 500\ \text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ , pH 值 7.5, 温度  $45^{\circ}\text{C}$ , 时间为 2 h。此条件下, 多肽得率为 73.98%。同时还建立了大豆小分子活性多肽的质量检测标准。试验生产的大豆小分子多肽纯度为 93.33%, 平均分子量为 300~700D。

## 参考文献

- [1] Bernard F G, Alexandre Z, Robert M, et al. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food[J]. Food Research International, 2004, 37:123-131.
- [2] 江志炜, 沈蓓英, 潘秋琴. 蛋白质加工技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002:262-267. (Jiang Z W, Shen P Y, Pan Q Q. Manufacturing technology of proteins [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002:262-267.)
- [3] 宋俊梅, 曲静然, 徐少萍. 大豆肽的研究进展[J]. 山东轻工业学院学报, 2002, 16(3):1-3, 53. (Song J M, Qu J R, Xu S P. Advances in study on soy peptides [J]. Journal of Shandong Institute of Light Industry, 2002, 16(3):1-3, 53.)
- [4] 赵小兰. 胰酶制备的工艺研究[J]. 青海医药杂志, 2000, 30(4):56. (Zhao X L. Preparation technology of pancreatin [J]. Journal of Qinghai Medicine & Pharmacy, 2000, 30(4):56.)
- [5] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1994:142-147. (Zhao Y F. Application and principal biochemical technology [M]. Wuhan: Wuhan University Press, 1994:142-147.)
- [6] 天津轻工业学院等. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999:85-87. (Tianjin Institute of Light Industry et al. Industrial Fermentation Analysis [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999:85-87.)
- [7] 李书国, 陈辉. 大豆多肽的功能特性及加工工艺[J]. 粮油食品科技, 2000, 8(1):14-15. (Li S G, Chen H. Study on functions and technology of soy peptides [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods 2000, 8(1):14-15.)
- [8] 郭红, 李茂辉, 高素杰, 等. 大豆小分子肽抗氧化效应的初步研究[J]. 中华医学研究杂志, 2007, 7(3):196-198. (Guo H, Li M H, Gao S J. Preliminary study on anti-oxidative capability of soybean minor peptides [J]. Journal of Chinese Medicine Research, 2007, 7(3):196-198.)