

# 大豆脂肪氧化酶研究进展\*

丁安林 张 艳

常汝镇 傅翠真

(中国农科院作物所, 100081, 北京)、(中国农科院品资所, 100081, 北京)

## ADVANCES IN RESEARCH OF SOYBEAN LIPOXYGENASE

Ding Anlin

Zhang Yan

Chang Ruzhen

Fu Cuizhen

脂肪氧化酶(Lipoxygenase)(EC1. 13. 11. 12), 通称脂氧酶(Lox), 在动植物界中广泛存在<sup>[1]</sup>。Andre 和 Hou(1932)首先发现大豆蛋白制品产生豆腥味是聚不饱和脂肪酸的酶促氧化反应的结果, 其中关键的酶是脂氧酶<sup>[2]</sup>。Theorell 等(1947)首次从大豆中获得了脂氧酶的结晶<sup>[3]</sup>。

大豆脂氧酶催化不饱和脂肪酸中含双顺式 1, 4-戊二烯结构通过加分子氧, 形成过氧化氢衍生物<sup>[4]</sup>, 从而产生豆腥味, 和其它挥发性物质<sup>[5, 6]</sup>。大豆脂氧酶是一种单一的多肽链蛋白质, 其分子量为 94—97KDa, 等电点的范围从 pH5. 7 到 pH6. 4<sup>[7]</sup>。大豆脂氧酶通常是可溶性的, 全部的酶活性在 pH6. 6 和 pH9. 0 的  $1 \times 10^5$  离心种子提取液上清液部份。成熟的大豆种子中 Lox 含量很高, 约占种子蛋白含量的 1—2%, 它的酶反应也十分强烈, 在适当条件下, 只要破碎的种子与底物如亚油酸一接触就发生反应<sup>[8]</sup>。一粒干重 160mg 的大豆种子 Lox1 和 Lox2 的量大约是 0. 23mg 和 0. 45mg, 而亚油酸 15mg, 亚麻酸 2mg 共同组成甘油脂肪酸成为 Lox 的底物<sup>[9]</sup>。

离子交换层析法可分离大豆 Lox 成 I 型与 II 型两个组分, 两组分在许多性质上都不相同。研究表明, 大豆 Lox 有四种电泳类型, Lox1 主要出现在层析法分离的 I 型中, 也正是最早被 Theorell 分离结晶的那一种。Lox2 和 Lox3 在 1970 年由 Christopher 等纯化出来<sup>[8, 10]</sup>。层析法的不断改进又将 Lox3 分离成 3a 和 3b 两种, 不过由于两者在许多性质上的相似, 仍被认为是一种同功酶<sup>[4]</sup>。这几种同功酶在酶活性的最适 pH、热稳定性、与  $\text{Ca}^{2+}$  关系、等电点、底物专一性和许多生化性质上都不同<sup>[4, 8, 10, 11, 12]</sup>。参见表 1。

脂氧酶在动物体内参与了重要反应, Lox 催化花生烯酸反应, 形成前列腺素(PG)、无

\* 本文于 1993 年 10 月 29 日收到。This paper was received on Oct. 29, 1993.

色三烯等物质,是强烈的过敏反应和动物受感染的介质,已经在哺乳动物中鉴定出来<sup>[13,14]</sup>。脂氧酶在活体植物中的作用虽然尚不明确,但已有不少研究认为它在生理上起很大作用,包括影响植物脂肪在萌发期的氧化<sup>[15]</sup>;脂肪过氧化形成的乙烯与植物叶片衰老有关<sup>[16]</sup>;脂肪氧化与种子的衰老、死亡,果蔬催熟和脱落有关<sup>[17,18,19]</sup>;Lox 在植物抗病、抗虫和伤害反应中起作用的报道也不少<sup>[20,21,22,23]</sup>。所以有人认为 Lox 在植物萌发、生长、发育、衰老和抗性的物质转化中起某种调节作用<sup>[24]</sup>。

表 1 几种脂氧酶同功酶性质比较

Table 1 Comparison of some characters among Lox isozymes						
性质	Loxs	Lox1	Lox2	Lox3a	Lox3b	注:参考 (4,8,10,12)
最适 pH 值		pH9	pH6.8	pH7	pH7	
热稳定性		加热稳定	加热易钝化	加热最易钝化		
Ca <sup>2+</sup> 与活性关系		受 Ca <sup>2+</sup> 刺激	受 Ca <sup>2+</sup> 刺激	受 Ca <sup>2+</sup> 抑制		
等电点		pH5.70	pH5.85	pH5.95	pH6.20	笔者
底物特性		阴离子底物 (脂肪酸)	脂化底物	生成单氧化物 有较高效率		
二硫键数		4	4	3	3	
含-HS 数		4	4.2	5.6(6)	5.9	
电荷差异		Lox1>	Lox2>	Lox3		(11)
生成过氧化氢类型		13 位	9 或 13 位	9 或 13 位 1:1		
抑制剂		类黄酮化合物 (芸香苷)	四乙秋兰姆化二硫			
Km(mMol/L)		0.012(LA)	0.016(AA)	0.34(LA)		
酶学动力学常数		LA 亚油酸底物	AA 花生四烯酸底物			

上述 Lox 的作用和各种生理功能才使它成为商业上一种重要的酶,至今在许多植物中分离出来,并在食品原料、种子的贮藏与加工中有很大的意义。Lox 对某些食品风味品质的发展是有益的。如由小麦磨制的新鲜面粉,因含类胡萝卜素而呈淡黄色,制作面包需要漂白,利用掺入适量大豆粉来漂白面团而不用化学漂白剂,使其成为绿色食品,身价倍增,就是利用 Lox 能偶联氧化类胡萝卜素进行漂白。同时 Lox 还可以提高小麦结构中麦谷蛋白交联和氧化作用<sup>[5]</sup>,Lox 还广泛利用于茶叶加工中,在红茶和乌龙茶的制造发酵工艺过程中,能促进茶叶原料的脂质过氧化作用,生成茶叶的香味。另外,在自然界使大多数食用蔬菜、水果成熟时具有特殊风味也是 Lox 系统代谢产物<sup>[24]</sup>。

但是脂质过氧化作用对生物活体本身确是有害的过程,Lox 则是引起酶促的脂质过氧化作用的重要因素。因为在植物体内由 Lox 所催化的不饱和脂肪酸的氧化过程中,有一个产生游离基的阶段,游离基及过氧化氢均是具有破坏性的活性物质,它能改变生物膜的渗透性,促进叶绿素的分解,加速细胞的衰老,使种子发芽率降低。此外 Lox 参与的脂

质过氧化作用是产生植物化学发光的重要因素<sup>[24]</sup>。华东师大张志良与张利华的研究证明大豆的发光与不饱和脂肪酸的过氧化作用有关,Lox 参与该过程(私人交流)。

Lox 与植物性食品原料的贮藏和加工关系很大,大豆加工方法不当或原料贮藏不当,其中 Lox 促使不饱和脂肪酸氧化、分解形成小分子的醛、醇、酮等挥发性物质,产生豆腥味和苦涩味等。此外 Lox 产生的脂肪酸过氧化氢物能直接与食品中的蛋白质和氨基酸结合,均可降低食品原料中的食用性和营养价值<sup>[25]</sup>。因此要尽可能降低或除去食品原料中的 Lox 活性。

消除大豆 Lox 活性,除去豆腥味的手段主要有加热处理,微波照射,改变介质的 pH,有机溶剂淬取和通过醛水解酶等<sup>[26]</sup>。这些方法都不同程度地增加了大豆产品的成本,并且常常引起大豆蛋白质溶解度下降,用作食品原料就不令人满意了。从而提出了遗传上开展 Lox 同功酶缺失体材料选育的必要性。

### 一、脂氧酶的分析方法

大豆脂氧酶的分析与纯化在 70—80 年代成为不少科学家努力研究的对象。由于同功酶的存在,更形复杂化的异质性使分析 Lox 采用了多种技术与方法。

#### 1. 氧电极与分光光度法

Lox 活性用多元不饱和脂肪酸如:亚油酸、亚麻酸或花生四烯酸为底物,利用氧电极和分光光度法定量<sup>[4]</sup>。

1)氧电极法:根据底物浓度一定,反应体系中的溶解氧浓度的变化与酶活力大小呈线性关系进行定量测定。由于 Lox 催化时耗氧,溶液中氧浓度减少。其速率与酶活力大小成正比,利用氧电极可以精确地测定酶活力,此方法灵敏度极高,但测定时的温度要注意控制。此法最好与分光光度计法配合使用,因为用花生四烯酸为底物时测 Lox2 和用亚油酸为底物测 Lox3 可靠性欠佳。

2)分光光度法:根据 Lox 使多元不饱和脂肪酸氧化形成具有共轭双键的过氧化物,此化合物在 234nm 波长处有吸收峰。峰的高度与酶活力有显著的正相关,可用分光光度计定量测定。测定时亦需控制好温度和时间等因素。此法迅速而灵敏,但底物浓度要尽量低,低到能反应线性关系的浓度即为合理。测定时记录 234nm 吸收值。

#### 2. 电泳法测定与鉴定大豆种子脂氧酶类型

为开展遗传分析和育种材料鉴定,不仅要了解 Loxs 的总含量,还要对种子 Lox 同功酶类型进行分析。以下两种电泳都可对三种同功酶进行定性分析:

##### 1)聚丙烯酰胺—SDS 电泳(PAGE—SDS)

根据 Lox 同功酶之间分子量的微小差异进行分离、显带、将谱带与缺失体材料对照,可以满意地鉴定 Lox 同功酶的存在。该法虽可鉴别出 Lox1、Lox2 和 Lox3 三条同功酶带,但要特别注意电极液中微小的离子强度和 pH 的改变,因为这些都是使实验失败的原因。而我国现有的许多试剂和实验条件常不易满足这样的稳定性<sup>[27,26]</sup>。

##### 2)等电聚焦聚丙烯酰胺电泳(IEF—PAGE)

根据脂氧酶同功酶的等电点差异和最适酶活性的 pH 不同原理,70 年代就有人用 IEF 研究大豆 Lox 的异质性,1984 年喜多村将它与免疫法相结合,能对大豆的粗提取液

中三种同功酶进行很高的分辨,不过当时他们用的技术较费时,价格昂贵<sup>[26]</sup>。Max o. Funk (1985)用水平 IEF—PAGE 可以辨别大豆不同品种中各种 Lox 类型。并利用层析聚焦进行大量的制备<sup>[28]</sup>。本文作者根据上述电泳技术探索了 Lox 类型分析,并对原方法特别是染色技术进行改进,使之适于育种程序和资源筛选中采用<sup>[29]</sup>。

### 3. 其他研究脂氧酶的技术:

1)专一性抗体互作和酶联免疫法(ELISA):此法可成功地进行群体规模 Lox 类型的筛选<sup>[30]</sup>。

2)离子交换和等电聚焦层析:用于 Lox 的分离、纯化和制备<sup>[31]</sup>。

3)阳离子交换高压液相色谱和快速蛋白液相色谱分析:很灵敏地用于鉴别 Lox 同功酶类型<sup>[32]</sup>。

4)气相色谱技术:用于 Lox 产物,豆腥味生成物 C<sub>6</sub> 醛类及其衍生物的定性与定量分析<sup>[33]</sup>。

5)免疫荧光衰减扫描:研究 Lox 在活体细胞组织中的定位<sup>[9]</sup>。

6)胡萝卜素脱色法:简易、快速测定 Lox 活性<sup>[34]</sup>。

7)显色法:低成本地用于种质初筛<sup>[35]</sup>。

## 二、脂氧酶缺失体大豆的筛选鉴定

1981 年,美国 Hildebrand 和 Hymowitz 对 6,499 份美国大豆资源进行了脂氧酶活性筛选,用分光光度法发现了 PI 133226(印尼品种),PI 408251(朝鲜品种)两份缺失 Lox1 的材料,又用氧吸收法,电泳法,等电聚焦和免疫扩散等得到了缺失的肯定<sup>[36]</sup>。

1983 年喜多村启介,鉴定出了两份 Lox3 缺失体的日本品种,即 Wasenatsu(PI 417458)和 Ichigowase (PI 205085)<sup>[30]</sup>。

以后不久 Davies 等又发现了 PI 86023 为 Lox2 缺失类型,并发表 Lox2 的鉴定论文<sup>[27]</sup>。

至今在这项研究中,领先的美、日两国都具有成套的缺失脂氧酶品系,美国在 1987 年注册登记了缺失体等基因系有:lx1 lx1 lx2 lx2 lx3 lx3 lx1 lx1 lx3 lx3 和 lx2 lx2 lx3 lx3 五种类型。日本人也相继拥有上述基因类型的日本品种,并且还具有 Lox1.2 和 Lox1.2.3 缺失体<sup>[37,38]</sup>。

笔者在 1992—1993 年期间,用 IEF—PAGE 法对 26 个省、市 253 份大豆进行了 Lox 类型的初步筛选与鉴定,其中 26 份材料表现为 Lox 异型缺失,并且看出南方地区的异型率比北方地区高,长江中下游地区还有 Lox 含量很少的类型。缺失 Lox2 和缺失 Lox3b 也多集中在川、鄂和江苏、上海一带,是否与这些地区的人民喜食青毛豆,长期自然选择和人工选择,形成了大粒、易煮、风味好的菜用大豆类型有关。同时还看出,异型 Lox 的材料中,夏、秋大豆型居多。

## 三、脂氧酶的遗传

成熟的大豆种子中至少存在三种脂氧酶的异构形式,即 Lox1、Lox2 和 Lox3。这些同功酶有不同的生化特异性,在电泳中有不同的迁移率,已如前述。

Hildebrand 等(1982)用引进的缺失 Lox1 的 PI 133226 和 PI 408251 与有正常

Lox1 活性的大豆品种 williams、Forrest、Columbia 和 Altona 配制杂交组合,研究大豆种子 Lox1 的遗传。结果表明,这些组合所有  $F_1$  种子都有 Lox1 活性, $F_2$  种子分离为 3:1,表明 Lox1 的存在为简单的显性,杂合  $F_2$  植株产生的  $F_3$  种子也分离为 3:1。正反交获得同样的结果,表明 Lox1 活性的遗传没有母本或细胞质效应。存在 Lox1 蛋白的基因符号为  $Lx1$ ,缺失 Lox1 蛋白的基因为  $lx1$ 。连锁研究指出, $Lx1$  位点与  $W1$ (花色)、 $Lt$ (种子外源凝集素)或  $SP1$ ( $\beta$ -淀粉酶)等位点没有连锁关系<sup>[39]</sup>。

喜多村等(1983)研究了脂氧酶-3(Lox3)的遗传,通过免疫学和电泳两种方法发现品种 Wasenatsu (PI 417458)和 Ichigowase (PI 205085)缺少 Lox3,配制了 Raiden  $\times$  Wasenatsu 等组合,其结果都获得了同样的分离比率,仅以 Raiden  $\times$  Wasenatsu 为例说明。 $F_1$  植株自交结实的 95 粒种子,用免疫和电泳法测定 Lox3,其中 77%(73 粒)含有 Lox3,23%(22 粒)缺失这一同功酶,结果表明缺失 Lox3 为纯合隐性等位基因  $lx3$  控制,存在脂氧酶为显性( $Lx3$ )。

对上述结果进行测验,观察了 25 个自交  $F_2$  植株种子  $Lx3$  和  $lx3$  等位基因的分离。7 个植株每一株被测定的全部种子有  $lx3$  表现型,其余的 18 个植株中,6 株的种子具有  $Lx3$  表现型,其余 12 株的种子分离为存在和缺失 Lox3 约为 3:1 的比率。 $F_3$  种子的分离比率也获得与预期一致的结果<sup>[30]</sup>。

Davies 等(1986)鉴别出 PI 86023 具有缺失脂氧酶-2 同功酶的纯合基因,用它与含有缺失脂氧酶-1 及-3 等位基因的育种品系配制组合,用  $F_2$  和  $F_3$  种子提取物进行电泳分析,结果指出,这一基因与  $Lx1$  位点紧密连锁,与  $Lx3$  位点则是独立的,存在脂氧酶-2 的显性等位基因符号为  $Lx2$ ,而隐性基因  $lx2$  为缺失脂氧酶-2。鉴定的种子中有缺失脂氧酶-2 和-3 的,但没有发现既缺少脂氧酶-1 又缺失脂氧酶-2 的<sup>[27]</sup>。

喜多村等(1985)也研究了脂氧酶-2 的遗传以及脂氧酶-1、-2 和-3 同功酶基因间的遗传关系。他们用 PI 86023(缺失 Lox2)和 Suzuyutaka(正常型)配制组合,后代的分离表现证实了 Lox 同功酶的缺失由单一的等位基因控制的结果。用 PI 86023 与 Tohoku74(缺失 Lox3)配制正反交组合,总数 474 粒  $F_2$  种子的电泳分析结果, $Lx2$  位点独立于  $Lx3$  位点,PI 86023 与一个  $Lx1$  和  $Lx3$  双缺失的突变品系间的杂交组合中,总数 157 个  $F_2$  种子电泳分析表明  $Lx3$  位点独立于  $Lx1$  和  $Lx2$  位点与前面正反交  $F_2$  种子分析所指出的  $Lx2$  和  $Lx3$  位点不连锁是一致的。这一研究还鉴别出二种类型的双缺失突变种子,即同时缺少 Lox1 和 Lox3 及 Lox2 和 Lox3 同功酶的类型。

上述研究报告表明,三种脂氧酶同功酶 Lox1、Lox2 和 Lox3 的缺失等位基因均已被鉴定出来,这表明不含脂氧酶的种子在遗传上是可能的。如果三个隐性等位基因全部在单一基因型中纯合,若脂氧酶对种子和植株的存活没有影响,而  $lx1$  和  $lx2$  位点确能够出现重组,分化双隐性  $lx1lx1lx2lx2$  基因型就可以实现。目前,日本人通过辐射处理,确已获得三缺失的突变体<sup>[37,38]</sup>。

#### 四、无豆腥味大豆种质创新及品种选育

培育无豆腥味的大豆虽然可以从资源鉴定和筛选入手,直接利用 Lox 同功酶缺失体类型,但是在某一地区直接利用是有困难的。辽阔的松辽平原和广大的黄淮海流域较少出

现直接能利用的 Lox 缺失体品种。因此从外地引入 Lox 缺失体大豆进行转育是必要的。

笔者 1990 年从美国引入 Lox 缺失体材料,并开始利用。以 1991Century 缺失体等基因系做亲本,开展杂交育种用 IEF—PAGE 分析技术对 1992 年收获的 F<sub>2</sub> 代自交材料分株取样进行缺失体类型分析,证实了后代中已获得了缺失体 Lox1、缺失体 Lox2、缺失体 Lox3 和缺失体 Lox2.3 的类型。

此项研究工作尚须继续完成对后代的加工选择和每年的 Lox 复测,以期得到农艺性状良好的,可以提供生产和研究利用的品系。

Pfeiffer 等(1992)比较了 Lox1 的近等基因系的农艺性状,并测定了 Century 缺失 Lox 近等系在种子与莢上对黑点枯萎病(*Phomopsis longicolla* Hobbs)的敏感性。结果表明在植株高度、百粒重、蛋白质与脂肪含量和抗涝性等都不不良影响,成熟期上有不明显(一天)之差。虽然在缺 Lox3 和缺 Lox2.3 的两年试验中有一年较重地感染黑点病,但对产量影响不大<sup>[40]</sup>。

笔者(1991 年)在育成的无胰蛋白酶抑制剂(citi)品系的基础上开展导入缺失 Lox2 和缺失 Lox2.3 的基因的研究。用 IEF 和 PAGE 两种电泳法测定 Lox2 和 SBTI—A2,已发现两个株系材料中有 titilx2lx2 的双无基因型。对无库尼兹胰蛋白酶抑制剂和无脂氧酶—2 的农艺性状观察正在进行中,温室生长可以正常结实,收获的种子已在 1993 年夏播。

这种基因类型 1992 年前尚未见国内外有所报道,至少还没有可利用的品系与品种的注册。

## 参考文献

- [1] Salzmann, V. et al., 1984, Pentane formation during the anaerobic reactions of reticulocyte lipooxygenase; comparison with lipooxygenase from soybeans and green pea seeds. *Biochim Biophys Acta*, 795: 535—542
- [2] Andre, E. et al., 1932, Sur la presence d'une oxydase des lipides ou lipoxydase dans la graine de soja, *glycine soja* Lief. *Compte Rendu Acad Sci(Paris)*, 194: 645—647
- [3] Theorell, H. et al., 1947, Crystalline lipoxidase. *Acta Chem Scand*, 1: 571—576
- [4] Axelrod, B. et al., 1981, Lipooxygenase from soybeans. *Meth Enzymol*, 71: 441—451
- [5] Eskin, N.A.M. et al 1977, Biochemistry of lipooxygenase EC—1.13.11, 12 in relation to food quality. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 9: 1—41
- [6] Rackis, J.J. et al., 1977, Lipid derived flavors of legume protein products. *J Am Oil Chem Soci*, 54: 468—473
- [7] Hildebrand, D.F. et al., 1988, Plant lipooxygenases; Occurrence, properties and possible Functions. *Curr Tropics Plant*, 7: 201—219
- [8] Christopher, J. P. et al., 1970, Isolation of an isoenzyme of soybean lipooxygenase. *Biochim Biophys Acta*, 198: 12
- [9] Marjan, V.G. et al., 1983, Localization of lipooxygenases 1 and 2 in germinating soybean seeds by an indirect immunofluorescence technique. *Techni Plant Physiol* 73: 262—267
- [10] Christopher, J. P. et al., 1972, Isolation of a third isoenzyme of soybean lipooxygenase. *Biochim Biophys Acta*, 284: 54
- [11] David, F. et al., 1991, Changes in lipooxygenase isozyme levels during soybean embryo development. *Plant Sci*, 75: 1—8
- [12] Yenofsky, R.L. et al., 1988, Isolation and characterization of a soybean (*Glycine max*) lipooxygenase—3 gene.

- Mol Gen Genet, 211, 215—222
- [13] Samuelsson, B. et al., 1983, Mediators of immediate hypersensitivity reaction and inflammation. *Science*, 220, 568—575
- [14] Needleman, P. et al., 1986, Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem*, 55, 69—102
- [15] Holman, R.T. et al., 1948, Lipoxidase activity and fat composition of germinating soybeans. *Arch Biochem Biophys*, 17, 459—466
- [16] Bousquet, J. F. et al., 1984, Lipid peroxidation forms ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and may operate in leaf senescence. *Proc Nat Acad Sci USA*, 81, 7124—7127
- [17] Harman, G.E. et al., 1976, Association of lipid oxidation with seed ageing and death. *Nature*, 260, 323—324
- [18] Parrish, D.J. et al., 1978, On the mechanism of aging in soybean seeds. *Plant Physiol*, 61, 365—368
- [19] Veldink, G.A. et al., 1977, Plant lipoxygenases. *Prog Chem Fats Lipids*, 15, 131—166
- [20] Hildebrand, D.F. et al., 1986, Peroxidative responses of leaves in two soybean genotypes injured by two spotted spider mites (Acari: Tetranychidae). *J Econ Entomol*, 79, 1459—1465
- [21] Lupu, R. et al., 1980, The involvement of lipoxygenase and antioxidants in pathogenesis of powdery mildew on tobacco plants. *Physiol Plant Pathol*, 16, 241—248
- [22] Ocampo, C.A. et al., 1986, Increased lipoxygenase activity is involved in the hypersensitive response of wheat leaf cells infected with avirulent rust fungi or treated with fungal elicitor. *Z Naturforsch*, 41c, 559—563
- [23] Shukle, R.H. et al., 1983, Lipoxygenase, trypsin inhibitor, and lectin from soybean; effects on larval growth of *manduca sexta* (Lepidoptera: sphingidae). *Environ Entomol*, 12, 789—791
- [24] 王海滨, 1990, 植物的脂肪氧化酶. *植物生理学通讯*, 2, 63—67
- [25] Wolf, W.J., 1975, Lipoxygenase and flavor of soybean protein products. *J Agri Food and Chem*, 23, 136—141
- [26] Kitamura, K. et al., 1984, Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L-1-less, L-2-less and L-3-less soybeans. *Agric Biol Chem*, 48(9), 2339—2346
- [27] Davies, C. et al., 1986, Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-2 in soybean. *Crop Sci*, 26, 460—462
- [28] Funk, M.O. et al., 1985, Resolution of the isoenzymes of soybean lipoxygenase using isoelectric focusing and chromatofocusing. *Anal Biochem*, 146, 246—251
- [29] 刘立军, 1993, 改进的大豆脂肪氧化酶电泳显色方法. *植物生理学通讯*, 29(3), 199—201
- [30] Kitamura, K. et al., 1983, Genetics analysis of null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. *Crop Sci*, 23, 924—927
- [31] Verhuc, W.M. et al., 1972, The heterogeneity of soybean lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta*, 285, 43—53
- [32] Ramadoss, C.S. et al., 1982, High-performance liquid chromatographic separation of lipoxygenase isozymes in crude soybean extracts. *Anal Biochem*, 127, 25—31
- [33] Zhuang, Hong et al., 1991, Effects of polyunsaturated free fatty acids and esterified linoleoyl derivatives on oxygen consumption and C<sub>9</sub>-aldehyde formation with soybean seed homogenates. *J Agri Food Chem*, 39, 1357—1364
- [34] Kikuchi, A.K. et al., 1987, Simple and rapid carotene bleaching tests for the detection of lipoxygenase isozymes in soybean seeds. *J J Breed*, 37, 10—16
- [35] Hammand, E.g. et al., 1992, Rapid screening techniques for lipoxygenases in soybean seeds. *Crop Sci*, 32, 820
- [36] Hildebrand, D.F. et al., 1981, Two soybean genotypes lacking lipoxygenase-1. *J A Oil Chem Soc*, 58, 583
- [37] 章祖涵, 1992, 日本的无豆腥味大豆育种. *农业与园艺*, 67(10)
- [38] Makita Hajika, et al., 1991, A line lacking all the seed lipoxygenase isozymes in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] induced by gamma-ray irradiation. *Japan J. Breed* 41, 507—509
- [39] Hildebrand, D.F. et al., 1982, Inheritance of lipoxygenase-1 activity in soybean seeds. *Crop Sci*, 22, 851—853
- [40] Pfeiffer, T. W. et al., 1992, Agronomic performance of soybean lipoxygenase isolines. *Crop Sci*, 32, 357—362