

大豆抗原蛋白去除工艺的研究进展

李婷琳, 孙泽威

(吉林农业大学 动物科学技术学院, 吉林 长春 130118)

摘要:大豆抗原蛋白作为一种热稳定性抗营养因子,常规热处理难以去除,成为大豆蛋白源在人类食品及饲料中安全高效利用的瓶颈。文章对大豆中主要抗原蛋白及其理化性质以及物理处理、化学处理、生物处理、糖基化处理等大豆抗原蛋白去除方法的研究进展进行综述,以期大豆抗原蛋白加工去除工艺的发展提供参考。

关键词:大豆球蛋白; β -伴大豆球蛋白;去除工艺

中图分类号:TS201.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2012)02-0311-05

Research Advance on Removal Process of Soybean Antigenic Proteins

LI Ting-lin, SUN Ze-wei

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China)

Abstract: As a kind of thermostability antinutritional factors, the soybean antigenic proteins are difficult to be inactivated by common thermal treatment, which limit the safe and high efficiency utilization of soybean protein source by humans and animals. In this article, research advance on removal processes of soybean antigenic proteins which including treatments by physical method, chemical agents, biologic ways and glycosylation reaction were summarized, so as to offer reference for development on removal process of soybean antigenic proteins.

Key words: Glycinin; β -Conglycinin; Removal process

大豆抗原蛋白是大豆加工制品中残留量最高,抗营养作用最强的一种大豆抗营养因子,可引起婴幼儿^[1-2]以及小鼠^[3]、仔猪^[4-5]、犊牛^[6-7]等动物发生肠道及其它器官的过敏反应^[8],并导致肠黏膜损伤,小肠形态结构发生损伤性变化^[9-10],进而引起腹泻、生产性能下降甚至死亡,是世界公认的八大食物过敏原之一^[11-12]。

针对这一问题,国内外学者从物理、化学、微生物学、蛋白质糖基化方法及作物育种等多角度对大豆抗原蛋白免疫原性的钝化方法展开了卓有成效的研究工作。该文对大豆抗原蛋白的去除工艺的研究进展进行了综述,以期大豆抗原蛋白加工去除工艺的发展与优化提供必要的参考资料。

1 大豆中主要抗原蛋白及其理化性质

大豆中目前已被确认的抗原蛋白有21种。主要包括:大豆疏水蛋白、大豆壳蛋白、大豆抑制蛋白、大豆空泡蛋白、大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白、2S白蛋白等。其中大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白

免疫原性最强,占大豆籽实总蛋白的65%~80%,是大豆中的主要抗原蛋白^[13]。

1.1 大豆球蛋白的性质

大豆球蛋白是六聚体复合物,相对分子量为300~380 kDa,每个六聚体复合物包含2个三聚体,每个三聚体由3个单体组成,每一单体又包含1条酸性多肽链和1条碱性多肽链。这2条多肽链来自同一前体,系前体在蛋白体中被剪切形成,2条多肽链之间由二硫键相连^[14]。

1.2 β -伴大豆球蛋白的性质

β -伴大豆球蛋白为1个三聚体,相对分子量为150~200 kDa。 β -伴大豆球蛋白主要由3种亚基组成,即 α 、 α' 和 β ,各亚基的相对分子质量分别为68、77和57 kDa。 β -伴大豆球蛋白的单个亚基的热稳定性不同,其顺序为 β (90.8℃) > α' (82.7℃) > α (78.6℃)^[13]。

2 大豆抗原蛋白去除工艺

2.1 物理方法

2.1.1 普通加热处理法 加热法的原理是利用蛋

收稿日期:2012-01-03

基金项目:国家自然科学基金项目(31072037)。

第一作者简介:李婷琳(1987-),女,在读硕士,研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail:tinglin1987@163.com。

通讯作者:孙泽威(1974-)男,博士,副教授,主要从事饲料抗营养因子的研究。E-mail:sunzewe@jlau.edu.cn。

白质对热的不稳定性,通过加热,破坏饲料中的热不稳定性抗营养因子,如蛋白酶抑制因子、大豆凝集素,致甲状腺肿素和脂肪氧化酶等^[15]。然而,大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白是热稳定性抗原蛋白^[16],直接加热并不能彻底破坏其抗原活性。例如,经过加热处理的大豆制品中具有抗原活性的球蛋白残留量仍高达18%^[17]。并且,普通热处理在破坏大豆抗原蛋白天然分子表面抗原表位的同时,也会暴露出新的抗原表位。虽然普通加热的方法对于去除热不稳定性抗营养因子具有效率高,无残留,简单易行,成本较低等优势,但是应用此种方法去除抗原蛋白效果并不理想。

2.1.2 膨化处理法 膨化是指让原料在加热加压的情况下突然减压而使之膨胀的过程,这是对原料既加热又进行机械破裂的过程。将大豆原料膨化后会导致其抗营养因子失活,而且可使细胞壁破裂。相关研究表明膨化加工的大豆粕能降低仔猪血清中大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白的抗体效价,并能减轻仔猪对大豆蛋白的过敏反应程度^[18]。

膨化分为干法膨化和湿法膨化。干法膨化是指不用额外加热也不用加水,将物料通过水分,能量,机械能,压力等综合作用,进行挤压,摩擦,推进,瞬间高温,快速喷出等一系列加工工艺,达到膨化物料的目的。其操作较简单,设备成本低,但挤压温度不易控制,对营养物质的破坏较大。湿法膨化主要是在膨化过程中向膨化腔内注入一定压力的水蒸气达到物料所需湿度和压力的膨化工艺,经此种膨化后产品的水分相对较高,需再进行干燥、冷却处理。湿法膨化通过加蒸汽后,易于调质,可以提高单位时间内的产量,而且对一些抗营养因子具有更强的破坏作用,并且对营养成分的破坏相对于干法膨化而言较小,能进一步提高大豆的营养价值^[19]。

膨化技术具有广泛、便利、高效及安全的特点,质量更加稳定可靠,产量也更加可观,膨化大豆具有高能量、高蛋白和高消化率的特性。国内某膨化大豆厂称其膨化产品中大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白含量均可降至4%。但大部分膨化大豆厂并不检测抗原蛋白,所以,实际生产中对膨化大豆抗原蛋白的去除程度仍待进一步研究。

2.1.3 微波处理法 微波是指频率为300 MHz ~ 300 GHz,波长在1 mm ~ 1 m的电磁波。当电磁波在介质内部起作用时,蛋白质、脂肪、碳水化合物等极性分子受到交变电场的作用而剧烈震荡,造成分

子间相互摩擦运动,使物料温度升高,从而起到微波加热的作用。并且这种热效应可以使得蛋白质的分子结构发生改变,进而破坏大豆中的抗营养因子^[20]。实验证实,微波对蛋白质含量影响不大,适当的微波处理对提高大豆蛋白的营养价值有促进作用^[21]。由于微波加热是通过微波能与食品直接相互作用进行表面与内部一致的整体加热,故应用于食品加工具有如下优点,加热速度快,受热均匀,产品质量高,且加热过程具有自动热平衡性能,反应灵敏易于控制,热效率高,设备占地面积少等^[22-26]。

2.1.4 其它热处理法 除以上几种常用方法之外,干热法中的烘炒、焙炒、热风喷射、爆裂及湿热法中蒸汽加热、蒸煮、挤压等方法^[20],虽然能够去除热不稳定性抗营养因子,但是对于热稳定性抗营养因子,如大豆抗原蛋白,去除效果则不理想。

2.2 化学方法

2.2.1 乙醇处理法 化学方法主要是用有机或无机溶剂对大豆进行处理。乙醇是一种很强的亲水溶剂,能破坏稳定的蛋白质高级结构的次级键,使具有抗原活性的蛋白质显著变性失去致敏作用。一些学者应用热乙醇(65 ~ 80℃)提取大豆产品,发现其产物中测不出大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白,故推测,热乙醇处理能减少大豆抗原对胃蛋白酶及胰蛋白酶的敏感性。处理后豆饼的抗原含量只有处理前的1/3,血清抗体滴度也明显降低。有人用70%的热乙醇于75℃处理豆饼30 min,结果发现,处理后的饲料干物质,其大豆蛋白的抗原性明显降低,能量和蛋白质的消化率均有提高,其中蛋白质的消化率提高幅度最大^[27]。

张建云等^[28]指出,化学钝化法是去除抗原蛋白的有效途径。但该方法大多都采用溶液浸泡,这样既有水溶性物质的损失,又存在产品烘干耗费热能的弊端,并且还含有害溶剂的残留,不易在实际生产中广泛推广,因此还需进一步研究改进。

2.2.2 其它化学试剂处理法 除乙醇之外,还可以利用尿素、亚硫酸钠、偏重亚硫酸钠、半胱氨酸,硫酸加双氧水处理大豆及其饼粕。不同的溶剂对应不同种类的抗营养因子会有不同程度的去除效果。

2.3 生物学方法

2.3.1 微生物发酵处理法 微生物发酵法是指利用微生物,在适宜的条件下,将原料经过特定的代谢途径转化为人类所需要的产物的方法。微生物

发酵处理法可以去除饲料中的抗营养因子,同时,发酵后的大豆蛋白还有其它一些营养优势,如发酵后的大豆蛋白中的大分子蛋白质被降解为小分子蛋白、肽和氨基酸,它们易溶解,在消化系统中更易降解和直接吸收利用;发酵后的大豆蛋白中含有一定数量的益生菌,可以明显改善肠道微生态环境,对增强机体的健康和营养都有很大作用。石慧^[29]研究表明若将豆粕发酵分为枯草芽孢杆菌的好氧性前发酵,酵母菌和乳酸菌的厌氧性后发酵则可以得到抗原蛋白几乎完全降解的样品,当前发酵温度为35℃,发酵时间为48 h;后发酵温度为42℃,发酵时间为32 h时,大豆中2种主要抗原蛋白的残留率仅为0.15%。

鲍宇茹等^[20]认为,与物理、化学方法相比较,应用微生物方法消除或抑制大豆蛋白中的抗营养因子具有较多的优点。它的处理效率高,成本低,可明显提高大豆的适口性,有一定的诱食效果;最重要是没有残留,应用比较安全。在大力提倡绿色安全健康的今天,采用生物技术法消除大豆蛋白中的抗营养因子,对我国大豆种植业、饲料加工业都将产生积极的推动作用。

2.3.2 酶解处理法 大豆抗原蛋白并非抗酶蛋白,故可以应用酶制剂来降低抗原蛋白的免疫原性。王之盛等^[23]报道,复合外源酶制剂在不同的pH值缓冲条件下降解抗原蛋白的效率不同,对生大豆的酶解效果优于豆粕。并且,此种酶制剂在酸性条件下有利于生大豆11 S抗原蛋白的降解,在碱性条件下有利于豆粕抗原蛋白的降解,在中碱性条件下有利于7 S和11 S小分子质量抗原蛋白的降解,pH 4.0和37℃是复合酶制剂降解大豆抗原蛋白的适宜环境条件,并可提高大豆蛋白的真蛋白降解率。

另外,饲料当中添加特异性的蛋白酶也可以降低大豆抗原蛋白的抗营养特性,例如酸性蛋白酶p2和碱性蛋白酶p1都能不同程度的降低大豆蛋白的抗原性。其中,酸性蛋白酶p2能够特异性的降解分子质量大于66 kDa的大豆抗原蛋白。但此法的缺点是适宜的蛋白酶不易商品化生产。所以,如何使用适当的酶制剂来水解大豆中的抗原物质是当前研究的重点^[30]。

近年来,各种酶制剂在饲料中的应用日益增加,有着广阔的应用前景,但是对于酶制剂的耐受性、稳定性以及影响酶制剂作用的外在因素等问题还未得到彻底解决。并且,酶制剂的使用具有专一

性,如何选择适当的酶制剂是去除抗原蛋白的关键,且注意添加酶的量要适当,过量会扰乱消化道的正常消化机能并产生不良作用。

2.4 糖基化方法

蛋白质糖基化工程,就是通过对蛋白质表面的糖链进行改造,从而改良蛋白质性质的一种技术^[31]。蛋白质糖基化是蛋白质的一种重要的翻译后修饰^[32],糖基化可以掩护表达系统中产生的重组产物的暴露表位,N-连接和O-连接的寡糖的末端唾液酸残基对于掩护抗原决定簇和表位是非常重要的^[33]。这表明糖基化反应对于去除抗原蛋白免疫原性具有积极的作用。

Jürgen等^[34]研究证明,将大豆分离蛋白结合果糖和果糖寡聚体通过干法和湿法进行糖基化反应可以降低抗原蛋白免疫原性。实验表明,若将大豆蛋白的抗原性定义为100%,在无糖条件下于95℃中加热5 h后,大豆蛋白在液体系统中抗原性仅下降20%,而相同条件下,大豆蛋白一低聚果糖或果糖的糖基化复合物的抗原性会下降90%。

糖基化反应产物与反应时间、温度、pH值、溶剂等有重要关系,也与参与反应的糖(包括单糖、寡糖和多糖)、氨基酸、蛋白质有很大关系^[35]。因此,目前的糖基化反应还未投入生产当中,若想在饲料工业中通过此项技术去除抗原蛋白还需要继续探索。

2.5 其它方法

通过使用射线照射的方法可降低大豆籽实中亚基的含量与抗原性,但是这种方法难度较大,另外,通过育种及基因工程的手段也可降低大豆抗原蛋白的致敏原性。中国科学院采用筛选育种的方法得到缺失7 S球蛋白Gly m Bd 28K和7S球蛋白 α -亚基的大豆新品种。利用基因敲除的方法,使某个特异基因“沉默”,使其不起作用从而达到去除致敏原的目的。也有报道称美国科学家成功培育出过敏性低的大豆品种^[36]。日本京都大学也开发出一种不易引起过敏的低变原大豆^[37]。但是,基因改造食品同样需要复杂的安全性评价过程^[38],并且成本较高,周期较长,目前仍未大量投入实际生产当中。

3 展 望

综上所述,膨化法、乙醇处理法、生物技术法、糖基化方法、育种和基因工程法都能够有效的去处大豆抗原蛋白,去除率也均在90%以上,但是各种

方法均有利弊,目前比较成熟且应用较广泛的工艺当属加热法中的膨化法;乙醇处理会残留较多化学药品,并且其加工成本还需要降低,流程还需要进一步优化;生物技术法也是一种前景比较广阔的方法,但是由于酶制剂的专一性,在实际生产领域中需要采取具有针对性的选择后方可使用;糖基化方法是一种相对安全有效的方法,但其工艺流程还处于探索过程中,目前还没有在饲料行业中大范围投入应用;大豆育种与基因工程的应用成本较高,且科研周期较长,目前尚未在实际生产中广泛应用。因此,应该采取何种措施来去除大豆抗原蛋白,不能一概而论,需要视具体情况进行选择。

参考文献

- [1] Duke W W. Soybean as a possible important source of allergy[J]. *Journal of Allergy*, 1934(5):300.
- [2] Niggemann B, Sielaff B, Beyer K, et al. Outcome of double-blind, placebo-controlled food challenge tests in 107 children with atopic dermatitis[J]. *Clinical and Experimental Allergy*, 1999, 29(1): 91-96.
- [3] Christensen H R, Bruun S W, Frokioer H, et al. Antigenic specificity of serum antibodies in mice fed soy protein[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2003, 132(1): 58-67.
- [4] Li D F, Nelssen J L, Reddy P G, et al. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig[J]. *Journal of Animal Science*, 1990, 68:1790.
- [5] Lallès J P, Toullec R. Abstract of soybean products in milk replacers for farm animals; processing, digestion and adverse reactions [J]. *Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 2:565-576.
- [6] Lallès J P, Dréau D, Salmon H, et al. Identification of soybean allergens and immune mechanisms of dietary sensitivities in pre-ruminant calves [J]. *Research in Veterinary Science*, 1996, 60: 111-116.
- [7] Lallès J P, Tukur H M, Toullec R. Immunochemical methods of assaying glycinin and β -conglycinin in soybean products. Prediction of digestibility of soybean nitrogen and soybean immunogenicity in the calf[J]. *Ann Zootech Paris*, 1997, 46:193-205.
- [8] 秦贵信, 孙泽威, 赵元, 等. 大豆中主要抗原蛋白的研究进展[J]. *吉林农业大学学报*, 2008, 30(4): 553-558 (Qin G X, Sun Z W, Zhao Y, et al. Research Advance in Study on Allergen Proteins in Soybean[J]. *Journal of Jilin Agriculture University*, 2008, 30(4): 553-558.)
- [9] Kelly D, O'Brien J J, Mc Cracken K J. Effect of creep feeding on the incidence, duration and severity of post weaning diarrhea in pigs[J]. *Research in Veterinary Science*, 1990, 49:223-228.
- [10] Hampson D J, Smith W C. Influence of creep feeding and dietary in take after weaning on malabsorption and occurrence of diarrhea in the newly weaned pig[J]. *Research in Veterinary Science*, 1986, 41:63-69.
- [11] Gizzarelli F, Corinti S, Barletta B, et al. Evaluation of allergenicity of genetically modified soybean protein extract in a murine model of oral allergen specific sensitization [J]. *Clinical and Experimental Allergy*, 2006, 36:238-248.
- [12] Zuercher A W, Fritsche R, Cortesy B, et al. Food products and allergy development, prevention and treatment [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17(2):198-203.
- [13] 唐堂. 大豆抗原蛋白 Glycinin 与 β -Conglycinin 的分离纯化与定量检测方法的建立 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009. (Tang T. Purification of soybean Glycinin and β -Conglycinin and development of quantitative detection method [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009.)
- [14] 方华, 季春源. 大豆抗原蛋白的基本结构及作用机理 [J]. *江西饲料*, 2007(6):1-6. (Fang H, Ji C Y. Basic structure and mechanism of action on soybean antigen protein [J]. *Jiangxi Feed*, 2007(6):1-6.)
- [15] 詹桂琴, 张永亮, 习欠云. 常见植物性饲料抗营养因子的危害及其消除方法 [J]. *广东饲料*, 2009, 18(1):39-41. (Zhan G Q, Zhang Y L, Xi Q Y. Damage and elimination ways of common vegetable feed's antinutrition factors [J]. *Guangdong Feed*, 2009, 18(1):39-41.)
- [16] 胡迪生, 郭金枝, 马曦. 大豆 β -伴大豆球蛋白研究进展 [J]. *中国畜牧杂志*, 2010, 46(5):65-68. (Hu D S, Guo J Z, Ma X. Research progress of β -Conglycinin protein [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2010, 46(5):65-68.)
- [17] 李德发, 马曦, 孙鹏. 大豆抗原蛋白研究进展 [C]// 动物营养研究进展—中国畜牧兽医学会动物营养学分会第八届全国代表大会暨第十届学术研讨会论文集, 2008:10-22. (Li D F, Ma X, Sun P. Research progress of soybean antigen protein [C]// Research Progress of Animal Nutrition-Papers Symposium of The 8th National Representative and Tenth Seminar of Animal Nutrition in Chinese Association of Animal and Veterinary Sciences, 2008: 10-22.)
- [18] Li D F. Interrelationship between hypersensitivity to soybean protein and growth performance in early-weaned pigs [J]. *Journal of Animal Science*, 1991, 69(10):4061-4069.
- [19] 陈翠莲, 窦丽娟, 张英东, 等. 膨化大豆质量和营养价值评估要点 [J]. *饲料工业*, 2010, 31(11):48-51. (Chen C L, Dou L J, Zhang D Y, et al. Outline of evaluation of extrusion soybean's quantity and nutritional value [J]. *Feed Industry*, 2010, 31(11): 48-51.)
- [20] 鲍宇茹, 魏雪芹. 大豆抗营养因子研究概况 [J]. *中国食物与营养*, 2010(9):20-23. (Bao Y R, Wei X Q. Research survey of soybean antinutrition factors [J]. *China Food and Nutrition*, 2010(9):20-23.)
- [21] 刘晓庚, 曹崇江, 周逸婧. 微波加工对食品安全性的影响 [J]. *食品科学*, 2008, 29(5):484-488. (Liu X G, Cao C J, Zhou Y J. Effect of microwave machining on food safety [J]. *Food Science*, 2008, 29(5):484-488.)
- [22] 王绍林. 微波食品工程 [M]. 北京: 机械工业出版社, 1994. (Wang S L. Microwave food project [M]. Beijing: Machine Industry Press, 1994.)

- try Press, 1994.)
- [23] 刘钟栋. 微波技术在食品工业中的应用[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1998. (Liu Z D. Adhibition of microwave technique on food industry[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1998.)
- [24] 高福成. 现代食品工程高新技术[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2006. (Gao F C. Advanced technology on modern food engineering[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2006.)
- [25] 李里特, 李秀婷, 张友龙. 微波加工果蔬脆片的研究[J]. 食品科学, 1995(1): 20-23. (Li L T, Li X T, Zhang Y L. Research of microwave machining on fruit vegetable chips[J]. Food Science, 1995(1): 20-23.)
- [26] 蒋家新, 邓建军, 张宁. 米饼微波膨化工艺的研究[J]. 粮油学报, 2000(5): 45-48. (Jiang J X, Deng J J, Zhang N. Research of rice cake Microwave craft[J]. Chinese Cereals and Oils Association, 2000(5): 45-48.)
- [27] 刘欣, 冯杰. 大豆抗原蛋白的研究进展[J]. 中国饲料, 2004(20): 14-15. (Liu X, Feng J. Research progress of soybean antigen protein[J]. China Feed, 2004(20): 14-15.)
- [28] 张建云, 易中华, 马秋刚, 等. 饲料抗营养因子对单胃动物的影响[J]. 饲料研究, 2009(8): 10-12. (Zhang J Y, Yi Z H, Ma Q G, et al. Effect of feed anti nutrition factors on monogastric animal[J]. Feed Research, 2009(8): 10-12.)
- [29] 石慧, 罗璇, 刘艳, 等. 两步发酵法降解大豆抗原蛋白的研究[J]. 饲料工业, 2011, 32(3): 22-25. (Shi H, Luo X, Liu Y, et al. Research of two step yeast approach on degrading soybean antigen protein[J]. Feed Industry, 2011, 32(3): 22-25.)
- [30] 王之盛, 况应谷, 周安国, 等. 酶解去除大豆产品抗原蛋白的效果研究[J]. 饲料博览, 2004(11): 1-4. (Wang Z S, Kuang Y G, Zhou G A, et al. Research on the effect of enzymolysis clearing off soybean antigen protein[J]. Feed Review, 2004(11): 1-4.)
- [31] 赵洪亮, 刘志敏. 蛋白质糖基化工程[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(9): 18-23. (Zhao H L, Liu Z M. Protein glycosylation engineering[J]. Journal of Chinese Biotechnology, 2003, 23(9): 18-23.)
- [32] Kohata A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins[J]. European Journal of Biochemistry, 1992, 209: 483-501.
- [33] 王家红, 童玥, 朱玥, 等. 蛋白质糖基化的研究进展[J]. 药物生物技术, 2011, 18(1): 77-80. (Wang J H, Tong Y, Zhu Y, et al. Research progress on protein glycosylation[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2011, 18(1): 77-80.)
- [34] Jürgen V D L, Manuel J, Javier M F, et al. In vitro glycation and antigenicity of soy proteins[J]. Food Research International, 2007, 40: 153-160.
- [35] 郑文华, 许旭. 美拉德反应的研究进展[J]. 化学进展, 2005, 17(1): 122-129. (Zheng W H, Xu X. Research progress of Maillard reaction[J]. Progress in Chemistry, 2005, 17(1): 122-129.)
- [36] 尹红. 美国科学家首次成功培育过敏性低大豆品种[J]. 粮食与油脂, 2003(1): 22. (Yin H. American scientist firstly successfully breed soybean variety which contain low irritability[J]. Journal of Cereals and Oils, 2003(1): 22.)
- [37] 张可喜. 日本研究出不易引起过敏的大豆[J]. 大豆通报, 2002(3): 30. (Zhang K X. Japanese research the soybean which difficult to lead allergy[J]. Soybean Bulletin, 2002(3): 30.)
- [38] 林化成, 姬洪波. 大豆抗原蛋白的致敏作用及其缓解机制的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(7): 38-42. (Lin H C, Ji H B. Research progress of soybean protein's allergization and remission mechanism[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2011, 38(7): 38-42.)
- ~~~~~
- (上接第 310 页)
- [8] [71] Cheng T Y, Saka T, Voqui-Dinh T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. Plant Science Letters, 1980, 19: 91-99.
- [72] Loganathan M, Maruthasalam S, Shiu L Y, et al. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merrill) through direct somatic embryogenesis from the immature embryonic shoot tip[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2010, 46: 265-273.
- [73] 程林海, 孙毅, 王立国. 大豆不同外植体植株再生的研究[J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(2): 25-24. (Cheng L H, Sun Y, Wang L G. Study on the regeneration of various explants of soybean. [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1998, 20(2): 25-24.)
- [74] Joyner E Y, Boykin L S, Lodhi M A. Callus induction and organogenesis in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cv. Pyramid from mature cotyledons and embryos[J]. Plant Science Journal, 2010, 4, 18-21.
- [75] 刘立侠, 李望丰, 王德利, 等. 应用嫁接技术提高转基因大豆的遗传转化效率的方法: 中国, CN1926961 [P]. 2007-03-14. (Liu L X, Li W F, Wang D L, et al. The method for improving the genetic transformation efficiency of transgenic soybean by grafting technique; China, CN1926961 [P]. 2007-03-14)
- [76] Christianson M L, Warnick D A, Carlson P S. A morphogenetically competent soybean suspension culture[J]. Science, 1983, 222: 632-634.
- [77] Parrott W A, Hoffman L M, Hildebrand D F. Recovery of primary transformants of soybean [J]. Plant Cell Reports, 1989, 7: 615-617.
- [78] Finer J J, Nagasawa A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill) [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1988, 15: 125-136.
- [79] Bailey M A, Boerma H R, Parrott W A. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1993; 29: 102-108.
- [80] Dan Y, Reichert N A. Soybean transformation and regeneration methods: US Patents, 5968830 [P]. 1999-10-19.
- [81] Torisky R S, Kovacs L, Avdiushko S, et al. Development of a binary vector system for plant transformation based on the super-virulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Chry5 [J]. Plant Cell Reports, 1997, 17: 102-108.
- [82] Yin Z, Wang G L. Evidence of multiple complex patterns of T-DNA integration into the rice genome [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100: 461-470.