

大豆籽粒中异黄酮及底物含量动态变化研究

王 静,李冬梅,黄月明,李文滨,张大勇

(东北农业大学 农学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:大豆异黄酮具有特定的生理活性,因此引起人们的广泛关注。研究大豆籽粒发育过程中异黄酮含量及其合成底物含量的变化规律,分析造成大豆籽粒异黄酮含量差异的合成代谢底物方面的原因,对于利用传统或分子生物学手段改良大豆籽粒异黄酮含量均具有重要意义。为此,选用大豆籽粒异黄酮含量差异较大的6份材料统一种植,在籽粒发育的R5、R6、R7和R8期分别取籽粒提取测定异黄酮、游离苯丙氨酸、香豆酸和柚皮素含量。结果表明:大豆异黄酮的3种苷元总含量及大豆黄素、染料木素含量均随生育进程逐渐升高;大豆黄素先于染料木素在大豆种子中开始积累;大豆籽粒中游离苯丙氨酸和柚皮素含量随种子发育进程含量逐渐降低,香豆酸含量逐渐升高;不同品种异黄酮含量在各生育阶段与游离苯丙氨酸含量多呈负相关,与香豆酸含量多呈正相关。

关键词:大豆异黄酮;苯丙氨酸;香豆酸;柚皮素

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2014.05.0697

Dynamic Change of Soybean Isoflavone and Its Synthetic Substrate During Seeds Developing

WANG Jing, LI Dong-mei, HUANG Yue-ming, LI Wen-bin, ZHANG Da-yong

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The soybean isoflavone has become a worldwide focus, as it has many beneficial functions to human beings. It will be helpful to the genetic improvement of isoflavone content that analyzing isoflavone content and its synthetic substrate content during seeds developing and the reasons of the differences between isoflavone content because of substrate content. The experiment was designed for the above purpose. Six soybean lines with different isoflavone content were planted in this experiment. The content of isoflavone, free phenylalanine, coumarate and naringenin were measured at R5, R6, R7 and R8, respectively. The results showed that the content of isoflavone increased from R5 to R8, and the synthesis and accumulation of daidzein was earlier than genistein. The content of free phenylalanine and naringenin decreased from R5 to R8. The content of coumarate increased from R5 to R8. The correlation coefficients between the isoflavone content and the free phenylalanine content were nearly negative except for R7 stage. All the correlation coefficients between the isoflavone content and the coumarate content were positive. The correlation coefficients between the isoflavone content and naringenin content were a little confusing.

Key words: Isoflavone; Free phenylalanine; Coumarate; Naringenin

大豆异黄酮具有多方面的生物功能,如诱导大豆根瘤菌结瘤;对大豆病、虫害侵染产生应激反应,起到抗毒素功能;对人体具有缓解妇女更年期综合征、预防骨质疏松、预防心脑血管疾病等生理保健功能,这些保健功能的发现使大豆异黄酮成为人们关注的热点^[1-3]。然而大豆异黄酮作为保健食品价格较高,主要因其在大豆籽粒中含量低,分离纯化生产成本高。

大豆异黄酮合成代谢途径已经较为清晰,大豆异黄酮是莽草酸途径下游的苯丙氨酸途径的一个分支途径中的次生代谢物。异黄酮类物质的合成前体是苯丙氨酸和丙二酰辅酶A,苯丙氨酸经苯丙氨酸裂解酶(PAL)、香豆酸辅酶A连接酶(4CL)、查尔酮合成酶(CHS)、查尔酮异构酶(CHI)、异黄酮还原酶(IFR)等酶催化,形成的配糖体也即苷元再经过羟基化、甲氧基化和烷基化加工过程,最后形成不同的异黄酮类化合物。通过综合分析前人研究结果发现,胁迫条件,如磷素缺乏、紫外辐射、长期

冷凉处理等措施可以有效刺激大豆异黄酮的合成积累。原因可能在于这些处理能够促使整个代谢途径对反应底物的需求更加迫切,因而活化了整个途径,增加了底物流,作为苯丙氨酸代谢途径一个分支的异黄酮合成途径获得了更多的底物,所以合成增加。Liu等^[4]将大豆IFS基因转入拟南芥F3H和DFR双突变体tt6/tt3中,由于分支途径的阻断,转基因植株中染料木素含量提高5~30倍。Yu等^[5]通过在大豆种子中表达玉米的C1和R转录因子,活化苯丙氨酸途径,使整个代谢途径的底物含量水平提高,可以提高大豆黄素(daidzein)积累。以上研究结果更为直接地证明了异黄酮合成代谢底物对异黄酮的合成产生较大影响。同时,国内外很多研究均发现不同大豆品种间籽粒异黄酮含量差异很大,甚至高低含量相差可达5倍以上^[6-8]。品种间异黄酮含量的差异是否是由于底物含量水平的差异所致还未见研究报道。为此选择了大豆籽粒

收稿日期:2014-06-06

基金项目:国家自然科学基金(31101168);哈尔滨市科技局创新人才项目(2011RFQXN040);东北农业大学博士科研启动基金项目。

第一作者简介:王静(1988-),女,硕士,主要从事作物遗传育种研究。E-mail: dongnongwj@sina.com。

通讯作者:张大勇(1976-),男,副研究员,硕士,主要从事作物遗传育种研究。E-mail: dongnongzhangdy@163.com。

异黄酮含量高低差异较大的6份材料,研究其籽粒发育过程中异黄酮含量与底物含量动态变化情况及二者之间的相关关系,以期利用传统育种或分子生物手段改良大豆籽粒异黄酮含量提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

选择6份大豆异黄酮含量高、中、低差异较大,生育期较一致的材料:东农1202、东农1210、东农1207、东农1208、东农1212、东农1213。这6份材料从东北农业大学大豆所保存的300份种质资源材料中筛选获得。

1.2 方法

田间试验在东北农业大学实验实习基地进行,随机区组种植。4行区,行长5 m。田间调查生育时期,统一选择生育进程一致的植株挂牌标记。分别于R5、R6、R7和R8期取样,将相同生育时期所取3次重复样品混合进行烘干。105℃杀青30 min,80℃烘干4 h至恒重,之后进行样品粉碎,用于异黄酮、苯丙氨酸、香豆酸和柚皮素含量测定。

异黄酮含量的提取测定参照张大勇等^[11]的方法进行;游离苯丙氨酸含量测定参照GB/T 5009.124-2003,由于测定大豆未成熟籽粒中游离氨基酸,所以省略盐酸水解步骤。柚皮素含量的分离测定参照李

江^[12]的方法,采用液相色谱进行检测。香豆酸含量的提取测定参照张才华等^[13]的方法。

1.3 数据分析

采用Excel 2003和SPSS 13.0进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 大豆籽粒异黄酮积累规律

从图1可以看到,6个供试品系大豆籽粒中大豆黄酮素含量、染料木素含量及3种苷元总含量在R5~R8期均随生育进程逐渐升高,但是,异黄酮两种组分含量积累进程是有差异的,大豆黄酮素在籽粒刚刚形成的R5期就开始形成,而染料木素在R5期积累较少,有些品系甚至低至检测不出来,从R6期染料木素含量迅速积累,至R8期与大豆黄酮素含量相当。

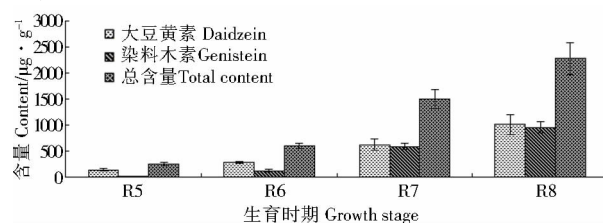


图1 不同生育时期大豆籽粒异黄酮含量变化趋势
Fig. 1 Isoflavone content in soybean seeds during different growth stages

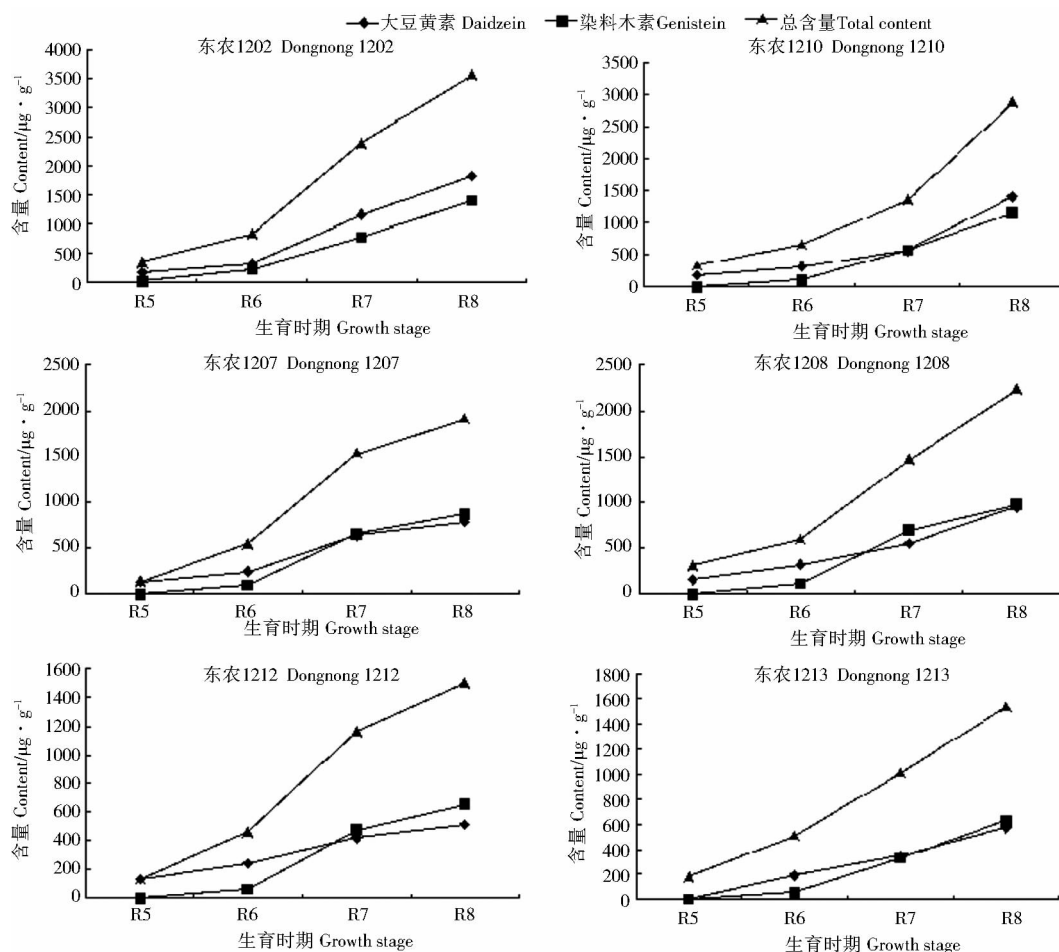


图2 不同品种大豆籽粒发育过程中异黄酮积累趋势
Fig. 2 The isoflavone content in soybean seeds among different genotypes

不同品种间各生育阶段的异黄酮积累变化规律见图2。由图2可知,6个不同品种的异黄酮组分含量和3种苷元总含量差异较大。品系间差异在R8期达到最大,3种苷元总含量最高的东农1202是最低的东农1212的2.36倍。6个品系中,有5个品系在R5期,大豆黄素含量高于染料木素含量,只有东农1213在R5期大豆黄素和染料木素均未检测出来。各不同品种的籽粒异黄酮含量变化趋势再次验证大豆黄素在籽粒中的形成积累要早于染料木素。在R6期,6个品系籽粒中大豆黄素含量均高于染料木素含量。之后的R7和R8期染料木素迅速积累,二者含量或有高低。

2.2 大豆籽粒中异黄酮合成代谢底物及中间产物变化规律

伴随籽粒中异黄酮含量的积累,籽粒中游离苯丙氨酸含量的变化动态见图3。苯丙氨酸是整个苯丙氨酸代谢途径的最初底物,在大豆籽粒逐渐形成过程中,籽粒中游离苯丙氨酸呈现逐渐降低的趋势。在所测定的3个时期中,各品系均在R5期最高,在随后的R6和R7期逐渐降低。

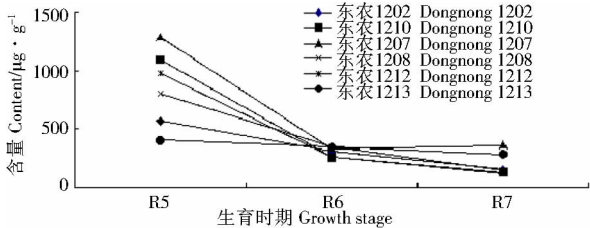


图3 大豆籽粒发育过程中籽粒中游离苯丙氨酸含量的变化趋势
Fig.3 The PHE content in soybean seeds during different growth stages

香豆酸在苯丙氨酸代谢途径中是位于苯丙氨酸下游的中间代谢产物。由图4可知,作为苯丙氨酸的下游产物,香豆酸含量的变化趋势却与苯丙氨酸含量的变化趋势相反。从R5到R7期,随籽粒发育进程,香豆酸含量逐渐增加。

由图5可知,大豆籽粒中柚皮素含量随生育进

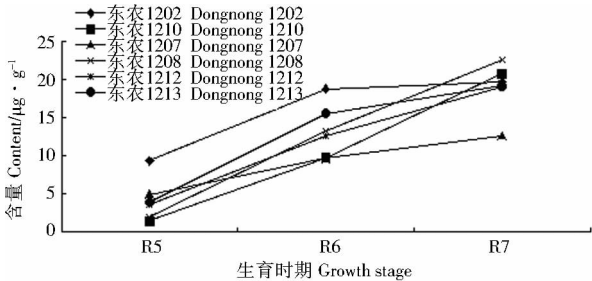


图4 大豆籽粒发育过程中籽粒中香豆酸含量的变化趋势
Fig.4 The coumalic acid content in soybean seeds during different growth stages

程呈现逐渐降低的趋势,到R7期,除东农1202外,其余5个品系柚皮素含量均低至无法检出。

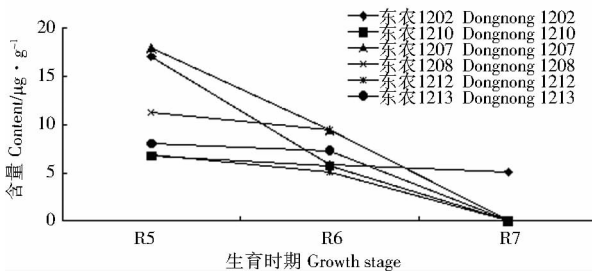


图5 大豆籽粒发育过程中籽粒中柚皮素含量的变化趋势
Fig.5 The naringenin content in soybean seeds during different growth stages

2.3 异黄酮含量与底物含量关系

苯丙氨酸和大豆黄素、染料木素及异黄酮总含量间相关关系如表1所示,除R7期大豆黄素含量和3种苷元总含量与苯丙氨酸含量呈正相关外,其他时期各相关系数均为负值。R5~R7期大豆黄素含量与苯丙氨酸含量显著负相关,3种苷元总含量与苯丙氨酸极显著负相关。香豆酸在所研究的各时期,除与R7时期的大豆黄素无相关外,其他均呈正相关。R5~R7期异黄酮组分和苷元总含量与香豆酸含量均呈极显著正相关。柚皮素含量与R6期的大豆黄素、染料木素及3种苷元总含量呈正相关,其余均为负相关。

表1 大豆籽粒异黄酮含量与所研究代谢底物和中间产物的相关关系
Table 1 The correlation coefficient between isoflavone and metabolic substrates

生育时期 Growth stage	异黄酮 Isoflavone	苯丙氨酸 PHE	香豆酸 Coumalic acid	柚皮素 Naringenin
R5 ~ R7	大豆黄素 Daidzein	-0.51 *	0.63 **	-0.39
	染料木素 Genistein	-0.58	0.70 **	-0.42
	异黄酮总含量 Total	-0.61 **	0.76 **	-0.41
R5	大豆黄素 Daidzein	-0.33	0.37	-0.26
	染料木素 Genistein	-0.38	0.38	-0.10
	异黄酮总含量 Total	-0.36	0.18	-0.06
R6	大豆黄素 Daidzein	-0.41	0.38	0.43
	染料木素 Genistein	-0.36	0.46	0.43
	异黄酮总含量 Total	-0.37	0.50	0.43
R7	大豆黄素 Daidzein	0.23	0	-0.74
	染料木素 Genistein	-0.10	0.19	-0.39
	异黄酮总含量 Total	0.11	0.12	-0.74

*** 分别表示差异达到0.05和0.01显著水平。
*** denote significant difference at 0.05 and 0.01 probability level, respectively.

不同生育时期大豆品系间异黄酮含量与底物含量间相互关系表明,异黄酮含量与游离苯丙氨酸含量多呈正相关,说明游离苯丙氨酸含量高的品种有异黄酮含量低的趋势;异黄酮含量与香豆酸含量均为正相关,说明香豆酸含量高的品种有异黄酮含量高的趋势;而柚皮素含量与异黄酮含量呈负相关,说明柚皮素含量高品种有异黄酮含量低的趋势。

3 讨论

3.1 大豆籽粒异黄酮及其合成底物含量变化规律

大豆籽粒中异黄酮组分含量及3种苷元总含量随发育进程逐渐升高,并且大豆黄素先于染料木素开始合成积累的变化规律与前人研究结果^[9-10]一致。对异黄酮合成底物含量的测定同异黄酮含量一样进行了R5~R8期共4个生育时期的测定,但是R8期3个底物含量很低,香豆酸和柚皮素含量在多数品种中都检测不出来,所以进行统计分析时主要关注R5~R7期3个生育期。在所研究的这3个生育时期,苯丙氨酸含量逐渐降低,香豆酸含量逐渐升高,柚皮素含量逐渐降低。

3.2 大豆籽粒异黄酮含量与底物含量间的关系

在大豆籽粒不同发育阶段,异黄酮含量与苯丙氨酸含量呈负相关趋势;作为苯丙氨酸下游产物的香豆酸,它的含量与异黄酮含量呈正相关;柚皮素含量在R6期与籽粒异黄酮含量呈正相关,其余时期呈负相关。异黄酮含量与苯丙氨酸含量呈负相关趋势的可能原因为:异黄酮含量高的品种,是由于从苯丙氨酸开始的整个代谢途径代谢活跃,因此消耗更多的苯丙氨酸,作为下游众多产物之一的异黄酮含量相应增加。作为苯丙氨酸下游产物的香豆酸,它的含量与异黄酮含量呈正相关,说明在苯丙氨酸解氨进入该途径后,整个代谢途径的底物含量水平高更利于异黄酮合成积累。柚皮素在不同生育时期与异黄酮相关关系较为复杂,主要原因可能是由于有几个代谢分支共同竞争柚皮素,造成相关关系的不确定性。

参考文献

- [1] 王江海,袁建平,刘昕.大豆异黄酮生理活性的研究进展[J].中国食品学报,2004,4(4):92-97. (Wang J H, Yuan J P, Liu X. Recent progress of the research on the biological activities of soybean isoflavones[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2004, 4(4): 92-97.)
- [2] 王燕,王艳春,蔡红艳,等.大豆异黄酮药理作用的研究进展[J].吉林医药学院学报,2013,34(3):225-228. (Wang Y, Wang Y C, Cai H Y, et al. Research progress in pharmacological actions of soy isoflavones[J]. Journal of Jilin Medical College, 2013, 34(3): 225-228.)
- [3] 张大勇,徐杰,张淑珍,等.大豆异黄酮含量的遗传及生态效应研究进展[J].东北农业大学学报,2006,37(4):525-528. (Zhang D Y, Xue J, Zhang S Z, et al. Some research advance of genetics and eco-physiological factors affecting isoflavone contents in soybean seeds[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2006, 37(4): 525-528.)
- [4] Liu C J, Blount J W, Steels C L. Bottlenecks for metabolic engineering of isoflavone glycoconjugates in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America, 2002, 99(22): 14578-14583.
- [5] Yu O, Shi J, Hession A O. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed [J]. Phytochemistry, 2003, 63(7): 753-763.
- [6] Carrao-panizzi M C, Kitamura K. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars [J]. Breeding Science, 1995, (45): 295-300.
- [7] 来永才,李炜,王庆祥,等.黑龙江省野生大豆高异黄酮新种质创新利用 I 异黄酮含量及与籽粒相关性状的 analysis [J]. 大豆科学, 2006, 25(4): 414-416. (Lai Y C, Li W, Wang Q X, et al. Innovation and utilization of new high isoflavone resource of wild soybean in Heilongjiang province I Analysis of isoflavone content and relevant of characters [J]. Soybean Science, 2006, 25(4): 414-416.)
- [8] 李辉,戴常军,兰静,等.黑龙江省栽培大豆异黄酮含量的初步分析[J].中国粮油学报,2007,22(1):38-40. (Li H, Dai C J, Lan J, et al. Primary analyse of isoflavones contents in Heilongjiang province soybean cultivars [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2007, 22(1): 38-40.)
- [9] Kim J A, Chung I M. Change in isoflavone concentration of soybean (*Glycine max* L.) seeds at different growth stages [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007, 87(3): 496-503.
- [10] Kitamura K, Igita K, Kikuchil A. Low isoflavone in some early maturing cultivars, so-called 'Summer type Soybean' (*Glycine max* L. Merrill) [J]. Japan Journal of Breed, 1991, 41: 651-654.
- [11] 张大勇,李文滨,卢翠华.黑龙江省大豆籽粒异黄酮含量生态差异[J].作物学报,2009,35(4):711-717. (Zhang D Y, Li W B, Lu C H. Ecologic difference of isoflavones content in soybean seeds in Heilongjiang province [J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(4): 711-717.)
- [12] 李江.反相高效液相色谱法测定化橘红中柚皮苷和柚皮素含量[J].实用临床医药杂志,2009,13(10):74-77. (Li J. Measuring the content of naringenin and naringin in *Exocarpium citi rubrum* using HPLC [J]. Journal of Clinical Medicine in Practice, 2009, 13(10): 74-77.)
- [13] 张才华,郭兴杰,宝炉丹,等.反相高效液相色谱法测定不同产地白花蛇舌草中的对香豆酸[J].色谱,2005,23(2):180-182. (Zhang C H, Guo X J, Bao L D, et al. Determination of p-coumaric acid in *Hedyotis diffusa* Willd. from different sources by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2005, 23(2): 180-182.)