

糖基化大豆蛋白酶解物的分离纯化及耐消化稳定性的研究

李烨彤, 苏志光, 张 惠, 郭顺堂

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

**摘要:**以糖基化大豆蛋白为原料,经碱性蛋白酶酶解制得具有抑制致病菌粘附功能的糖肽,并分析功能性糖肽的消化稳定性。酶解物用 Sephadex G-25 层析可获得表观分子量分别为20 000 Da、6 500 Da 和小于3 000 Da 组分。对酶解物胃蛋白酶和胰蛋白酶体外模拟依次消化 2 h 后, 20 000 ~ 6 500 Da 的大豆糖肽分子量变化不大,较稳定,而分子量小于3 000 Da 的大豆糖肽中有 5% 被消化,稳定性略有变化。说明糖基化大豆蛋白酶解物其功能性成分可以较稳定存在于消化系统。

**关键词:**糖基化;大豆蛋白;酶解物;消化

**中图分类号:**TS214.2      **文献标识码:**A      **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2015. 03. 0474

Separation and Purification of Glyco-soyprotein Hydrolysis and Its Digestion's Resistance Stability

LI Ye-tong, SU Zhi-guang, ZHANG Hui, GUO Shun-tang

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Using glyco-soyprotein as raw material, enzymolysed by alkaline protease to obtain glycopeptides with th function of inhibiting pathogenic bacteria adhesion, the digestion of glycopeptide stability was analyzed. Enzymolysed content with Sephadex G-25 chromatography could obtain molecular weight of 20 000 Da, 6 500 Da and less than 3 000 Da components. After enzymolysed by Pepsin and trypsin *in vitro* 2 hours in sequence, glycopeptides molecular weight between 20 000 Da and 6 500 Da were relatively stable, but the molecular weight less than 3 000 Da had been digested 5%. It indicated that glycopeptides with functional ingredients could exist in the digestive system steadily.

**Keywords:** Glycosylation; Soyprotein; Hydrolysates; Digestion

天然  $\beta$ -伴大豆球蛋白是含有 3.8% 甘露糖和 1.2% 葡糖胺的糖蛋白<sup>[1]</sup>,糖链以 N-糖基化的方式与肽链中的丝氨酸相连<sup>[2]</sup>。对大豆糖蛋白的 N-聚糖结构研究发现,糖链构型主要是高甘露糖型(96.6%)和含有木糖的 N-乙酰葡糖胺(3.4%)<sup>[3]</sup>。研究表明  $\beta$ -伴大豆球蛋白的酶解物可以抑制致病菌尤其是大肠杆菌对肠细胞的粘附和感染,能够改善肠道微生态环境<sup>[4]</sup>,同时,对肠炎具有预防和防治效果<sup>[5]</sup>。根据这一特性,可以利用大豆糖蛋白开发成具有保健功能的产品或食品配料。但是  $\beta$ -伴大豆球蛋白在大豆蛋白中的含量较低,原料有限限制了它的工业化生产。前期的研究已明确通过美拉德反应和酶解可以得到高含量糖基化大豆蛋白酶解物,这为进一步产品开发奠定了基础。本研究在糖基化大豆蛋白酶解物制备基础上通过体外消化模拟试验对糖基化大豆蛋白酶解物稳定性进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

低温脱脂豆粕,蛋白质(干基)  $\geq 50\%$ ,安阳漫

天雪食品制造有限公司;大豆分离蛋白,实验室自制;甘露低聚糖,成都协力魔芋科学种植加工园有限公司;胃蛋白酶、胰蛋白酶, Sigma; TrisBase, Promega, USA; 碱性蛋白酶, Novozyme (液体, 2.4 AU·g<sup>-1</sup>); 甲醇, Dima Technology Inc (色谱纯); Sephadex G-25, Amersham Pharmacia (Coarse)。

喷雾干燥塔, Janpan Made; 酸度计, 上海虹宜仪器厂; 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; 自动部分收集器, 上海沪西分析仪器厂; 冷冻干燥机, 北京博医康技术公司; 紫外可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; 高效液相色谱系统, 美国 Agilent 公司; Protein Pak 60 凝胶柱, 美国 Waters 公司。

**1.2 试验方法**

1.2.1 糖基化大豆蛋白酶解物的制备及其凝胶过滤

将低变性脱脂豆粕与水按 1:15 的比例进行混合, pH 调节至 8.0, 高速搅拌 1.5 h, 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 除去沉淀。上清液用 4 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸调至 pH4.5, 静置 30 min, 在 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 水洗 2 次, 沉淀即为大豆分离蛋白。

将自制的大豆分离蛋白配成一定浓度的蛋白

收稿日期:2014-08-18  
基金项目:国家“十二五”科技支撑计划(2012BAD34B04)。  
第一作者简介:李烨彤(1990-),女,硕士,主要从事蛋白质加工研究。E-mail: yetong091@163.com。  
通讯作者:郭顺堂(1962-),男,教授,博导,主要从事蛋白质加工利用。E-mail: shuntang@cau.edu.cn。

溶液,并将等质量的甘露低聚糖溶于蛋白溶液中喷雾干燥。将得到的样品平铺于培养皿中置于干燥器内,干燥器底部倒入一定量饱和 KBr 溶液控制相对湿度为 79%,保存在 80℃ 的恒温箱中进行糖基化反应 7 h。

用上述制得的糖基化蛋白样品配制 2% 的糖基化大豆蛋白液 (w/v),用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 调节 pH8.0,按酶/底物 (v/m) = 5/100 添加碱性蛋白酶,55℃,保持 pH8.0 酶解 5 h,95℃ 灭酶 10 min,冷却至室温。调节 pH4.5,4 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 30 min,取上清液调节 pH7.2 得到糖基化大豆蛋白酶解物,冻干备用。

用 Sephadex G-25 凝胶柱 (2.6 cm × 60 cm,凝胶颗粒大小 100 ~ 300  $\mu\text{m}$ ) 进行凝胶过滤<sup>[6]</sup>。将一定量干粉状的 Sephadex G-25 加入到 5 倍体积的重蒸馏水中,在沸水浴中溶胀 2 h,冷却脱气后装柱。然后用 3 ~ 5 倍柱体积的脱气重蒸馏水进行平衡。

将冻干的肽产物溶解 ( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 后用 Sephadex G-25 进行凝胶过滤,并用脱气重蒸馏水进行洗脱,以  $36 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$  的流速进行定时 ( $5 \text{ min} \cdot \text{管}^{-1}$ ) 收集。然后在 210 nm 处测定洗脱液的紫外吸收,在 485 nm 处测定经苯酚 - 硫酸处理后的洗脱液的吸光值并计算每管洗脱液中糖的含量。根据所得的数据做分布曲线,并收集不同峰值处的洗脱液,冻干后备用。

**1.2.2 胃/胰蛋白酶消化试验** 将糖基化大豆蛋白酶解物冻干粉配制成 0.5% (m/v) 的溶液,用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 HCl 将溶液的 pH 调到 2.0,加入 1% (酶/底物) 的胃蛋白酶在 37℃ 条件下进行消化,消化到 120 min 时取出样品,用直径为 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤作液相样品,再将样品在沸水中加热 5 min 灭酶。取其样品进入高效体积排阻色谱柱进行分子量测定。

将上述灭酶后的样品溶液用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 将溶液的 pH 调到 7.4,加入 1% (酶/底物) 胰蛋白酶在 37℃ 条件下继续消化,计时消化 120 min 取出样品,用直径为 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤作液相样品,将样品 80℃ 加热 15 min 灭酶,同样进行分子量测定。通过高效体积排阻色谱法 (SE-HPLC) 测定糖基化大豆蛋白酶解物消化前后分子量的变化,考察胃蛋白酶和胰蛋白酶对糖基化大豆蛋白酶解物稳定性的影响。

### 1.3 测定项目与方法

**1.3.1 水解度 (Degree of Hydrolysis, DH%) 的测定** 水解度的计算采用 pH-Stat 法<sup>[7]</sup>。中性或微碱性

条件下水解度定义为:

$$DH(\%) = \frac{\text{多肽键断裂数}(h)}{\text{蛋白质底物总肽键数}(h_{\text{tot}})} \times 100$$

在酶解的过程中,反应体系 pH 随水解的持续进行而降低,为了维持 pH 的恒定,向酶解反应液中滴加  $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH,记录碱液的消耗量。水解度可由下式计算:

$$DH(\%) = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{M_p} \times \frac{1}{h_{\text{tot}}} \times 100$$

式中:  $B$  = 酶解过程中碱液消耗量 (mL);  $N_b$  = 碱液当量浓度;  $\alpha$  =  $\alpha$ -氨基的平均解离度 (pH8.0,  $T = 40^\circ\text{C}$  时,  $1/\alpha = 1.20$ ; pH8.0,  $T = 55^\circ\text{C}$  时,  $1/\alpha = 1.105$ );  $M_p$  = 蛋白质的质量 (g);  $h_{\text{tot}}$  = 蛋白质底物总的肽键数 大豆蛋白的  $h_{\text{tot}} = 7.8$ 。

**1.3.2 糖含量分析** 根据苯酚硫酸法<sup>[8]</sup>,并参考董群等<sup>[9]</sup>改进的方法进行测定,以葡萄糖为标样。

**1.3.3 分子量分布测定** 采用高效体积排阻色谱法 (SE-HPLC) 测定。分别称取 20 mg 样品冻干粉溶于  $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液中,配制成浓度为  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液,用直径为 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤后进样。色谱条件: Agilent 1100 高效液相色谱系统,色谱柱: Protein Pak 60 体积排阻色谱柱 (Waters, 7.8 mm × 300 mm, bead size 10  $\mu\text{m}$ , fractionation range 1-20 kDa); 流动相:  $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液; 检测: 214 nm; 流速  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温  $30^\circ\text{C}$ 。分子量校正曲线所用标准品为: 胰蛋白酶抑制剂 (Mw 20100)、蛋清溶菌酶 (Mw 14400)、AB2-80 (Mw 7823)、AB2-81 (Mw 5856)、AB2-95 (Mw 3313), 根据标准品分子量的对数与保留时间作回归分析,获得的回归方程为  $T = 37.303 - 5.4083 \lg MW$  ( $R^2 = 0.9814$ ,  $P < 0.05$ ), 式中 MW 为分子量, T 为保留时间。根据标准品分子量的对数与保留时间之间的回归方程计算样品的分子量分布。

## 2 结果与分析

### 2.1 糖基化大豆蛋白酶解物水解度的测定

大豆分离蛋白与甘露低聚糖质量比 1:1 糖基化改性之后,如图 1 所示糖基化蛋白在 Alcalase 酶解的过程中,0 ~ 30 min 内碱液的消耗量最大,溶液的 pH 明显下降。30 ~ 240 min 酶解反应变得较为缓慢。240 min 之后 NaOH 的消耗量基本不变,即酶解反应已经基本完成。经测定,此时的水解度达到 27%。

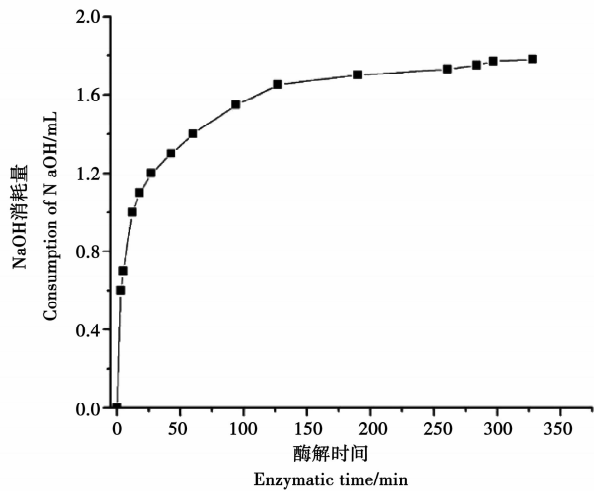


图1 Alcalase 酶解糖基化大豆蛋白过程中碱液的消耗情况  
Fig. 1 Consumption of 1.0 mol·L<sup>-1</sup> NaOH during hydrolysis reaction of glycoprotein treated with Alcalase

2.2 糖基化大豆蛋白酶解物的凝胶层析分离纯化

利用凝胶过滤对糖基化大豆蛋白酶解物进行分离,图2 紫外吸收峰表征肽组分,糖基化大豆蛋白酶解物经 G-25 层析后主要分离为 2 个肽组分,第一个组分的洗脱峰 A 时间在 200 min,第二个组分的洗脱峰 B 时间在 400 min 附近。这一结果与张雪梅等报道的结果相似<sup>[10]</sup>。

对经 G-25 层析的酶解物洗脱液进行收集,图3 糖含量峰表示的是含糖组分,含糖组分两个洗脱峰与图2 肽组分的 2 个吸收峰时间都在 200 min 和 400 min 附近。表明 A 和 B 的成分为糖肽。张雪梅<sup>[10]</sup>研究发现β-伴大豆球蛋白中的甘露低聚糖组分主要分布在前一个洗脱峰中,为图2 和 3 中的 A 组分。而糖基化大豆蛋白酶解物不仅前一洗脱峰 A 含糖量明显提高,而且原本不含糖的洗脱峰 B 的含

糖量也明显增加了。这一结果意味着不含糖的肽链已被大量的糖基化,经过酶解形成的分子量大小不同的肽均结合了糖链,说明糖基化大豆蛋白酶解物中存在大豆糖肽组分。

2.3 大豆糖肽的分子量分布

对 G-25 凝胶过滤获得的 A、B 两个组分分别进行了分子量分析,结果如图4 所示,高分子量的糖肽组分主要是由 4 部分组成,分子量在20 000 ~6 500 Da(图4A);而低分子量的大豆糖肽组分主要也是由 4 部分组成,但分子量均在3 000 Da 以下(图4B)根据杨柏崇等研究报道,β-伴大豆球蛋白酶解物经 HPLC 逆向色谱进一步分离后成为更低的分子量组分<sup>[4]</sup>。因此,本实验中获得 G-25 层析过滤物有可能是低分子肽的聚合体。

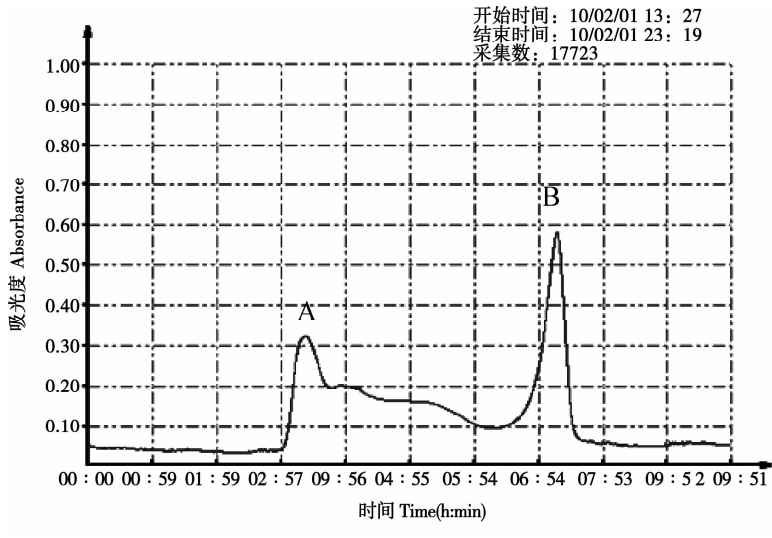


图2 糖基化大豆蛋白酶解物的凝胶层析谱图  
Fig. 2 Spectra of gel chromatography of glycoprotein hydrolysis

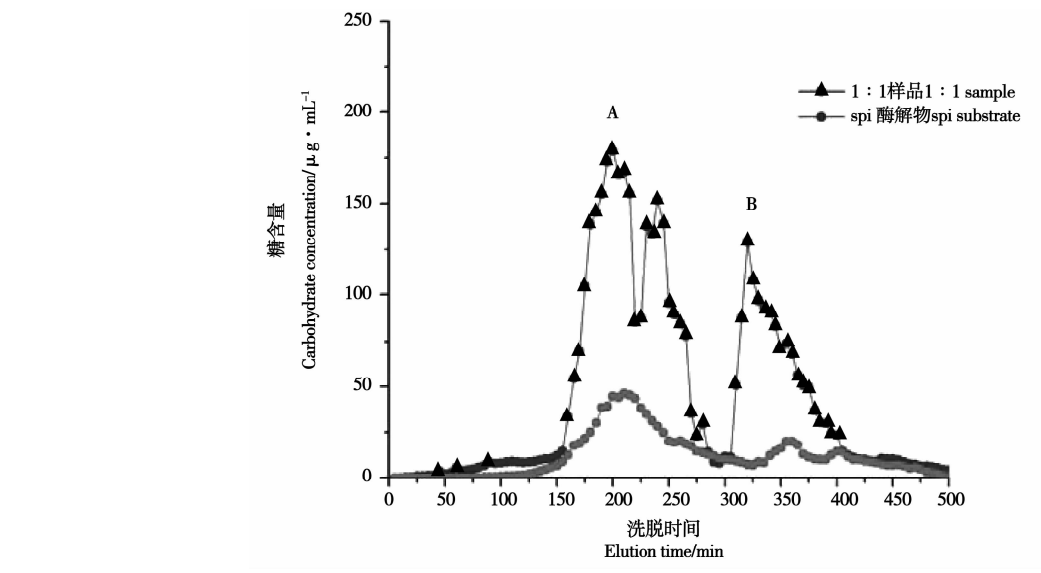


图 3 凝胶层析洗脱液各组分含糖量

Fig. 3 The sugar content of gel filtration eluate component

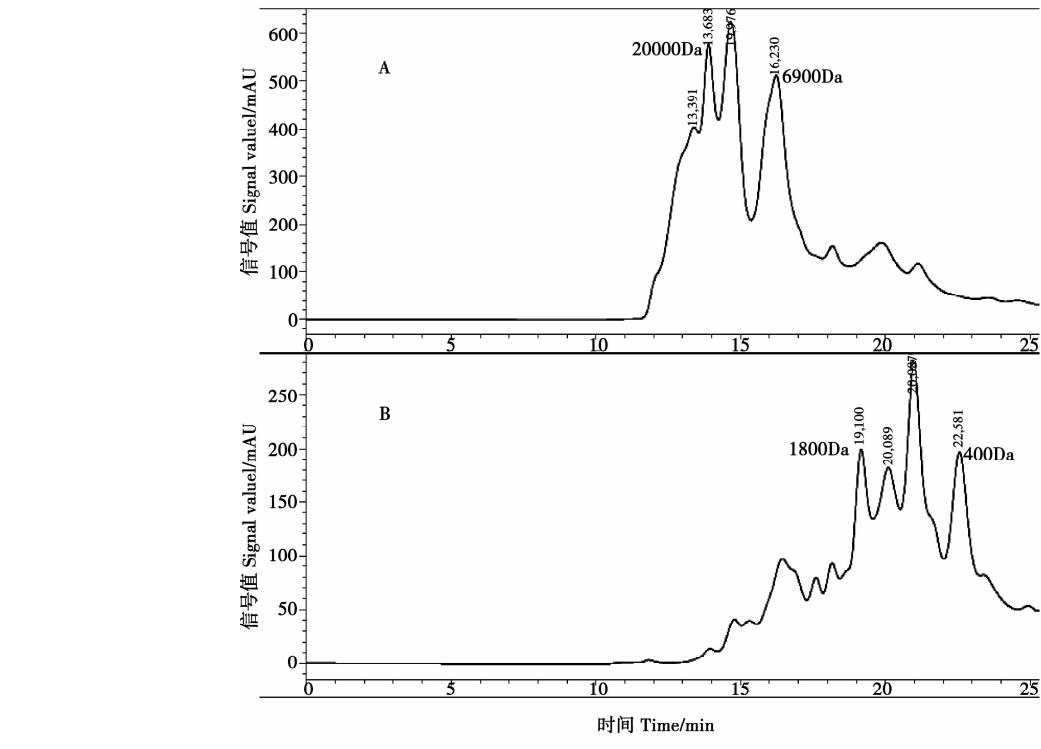


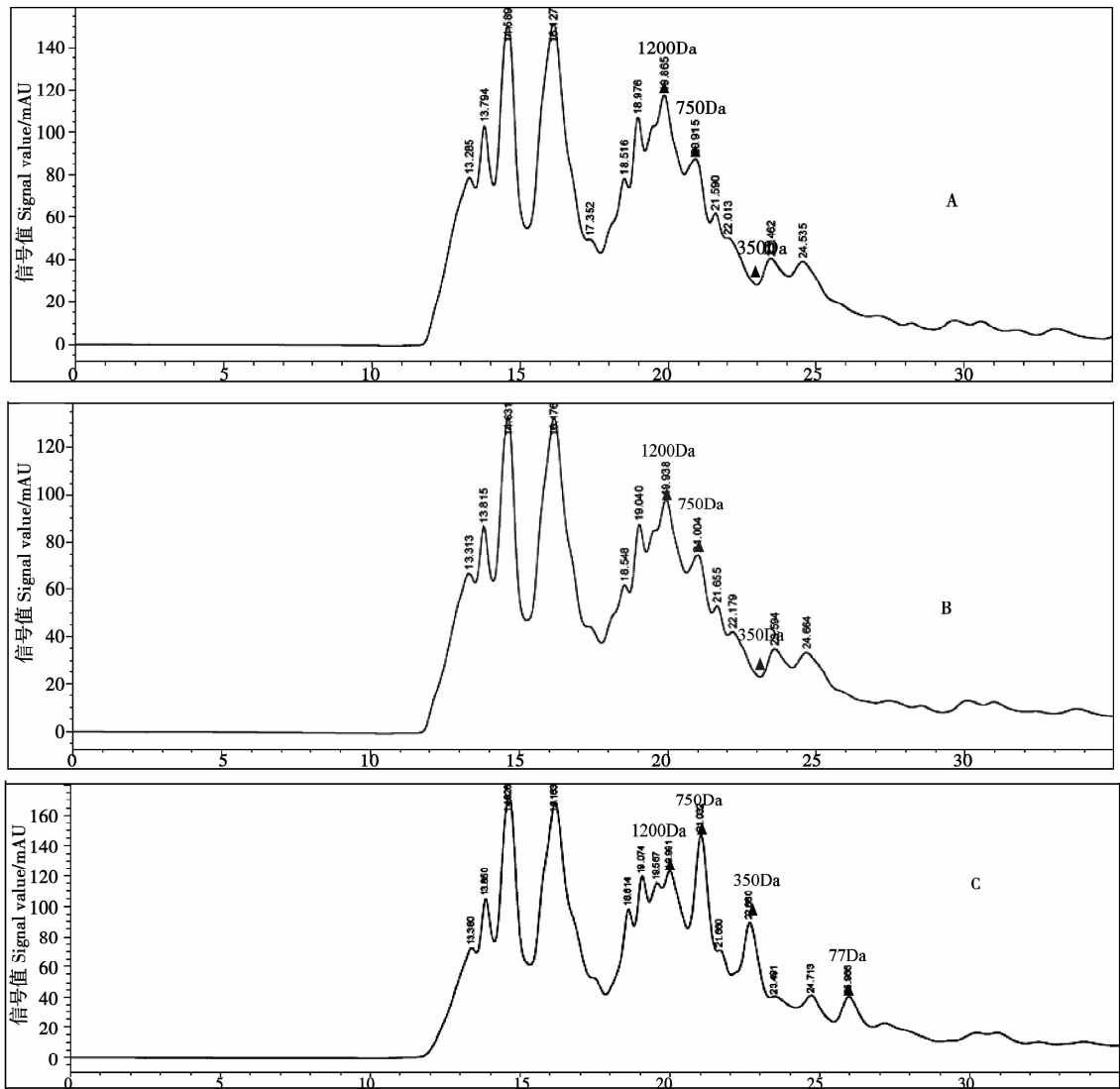
图 4 大豆糖肽的分子量分布图谱

Fig. 4 Molecular weight distribution of glycopeptides

2.4 大豆糖肽的消化稳定性

蛋白酶解物的功能性结构能否保持稳定是肽类产品评价的重要关注点。一般情况下常采用体外胃蛋白酶、胰蛋白酶水解模拟消化道环境模式来模拟人体自然生理消化过程<sup>[11-12]</sup>。蛋白质在胃里被胃蛋白酶消化的最佳 pH 是 1~2,在十二指肠中,胰蛋白酶在 pH7~8 下继续被水解<sup>[13]</sup>。在进食情况

下食物在胃里的半排空时间是 0.5~3.0 h,在十二指肠和空肠里的驻留时间为 2~2.75 h,在回肠里的时间为 5~7 h<sup>[14]</sup>。为考察大豆糖肽对胃肠道胃蛋白酶和胰蛋白酶消化的抵抗作用,在模拟体内消化道环境的条件下,胃蛋白酶和胰蛋白酶处理大豆糖肽,测定处理前后复合物的分子量的变化。



A、B 和 C 分别为未消化的、胃蛋白酶消化 2 h 和经胃蛋白酶消化 2 h 后又经胰蛋白酶消化 2 h 的大豆糖肽。  
A, B and C are respectively soybean glycopeptide undigested, pepsin digested 2 h and by trypsin digested 2 h after pepsin digestion, respectively.

图 5 高效体积排阻色谱法测定大豆糖肽分子量分布图

Fig. 5 Molecular weight distribution of glycopeptides by SE-HPLC

从图 5 中可以看出,大豆糖基化蛋白碱性蛋白酶酶解物经过胃蛋白酶的消化作用后,分子量分布和含量变化均不明显。但继续经胰蛋白酶消化后,其高效体积排阻色谱图有向后移的趋势,但整体上变化不大;但是分子量小于3 000 Da 的部分较之未消化的和经胃蛋白酶消化的大豆糖肽出现了不同吸收峰,20 min 时分子量为1 200 Da 的峰面积由原来的 14% 减小了 5%,21 ~ 23 min 内分子量为 750 Da 和 350 Da 的两个峰的峰面积分别增加了 3% 和 7%,26 min 时分子量出现了低于 100 Da 的现象,此比例占据了 3.5%。上述数据表明在胰蛋白酶的作用下小于3 000 Da 部分有一定程度消化。说明分子量分布在20 000 ~ 6 500 Da 部分大豆糖肽具有较好的抗消化稳定性。

3 结 论

利用碱性蛋白酶对糖基化大豆蛋白进行酶解,酶解在 4 h 即可完成,水解度达到 27%。经 SE-HPLC 分析表明酶解物主要是分子量在20 000 Da 到6 500 Da 和分子量在3 000 Da 以下的组分。相比天然的  $\beta$ -伴大豆球蛋白酶解物,糖基化大豆蛋白酶解物中大豆糖肽含量显著增加。利用胃蛋白酶和胰蛋白酶体外消化实验发现分子量小于3 000 Da 的大豆糖肽中有 5% 被进一步消化,而分子量在20 000 ~ 6 500 Da 的大豆糖肽很稳定,表现了良好的抗消化性。这一结果为糖基化大豆蛋白酶解物的工业化生产和功能性保持技术开发提供了重要的参考依据。

参考文献

[1] Koshiyama I. Carbohydrate component in 7S protein of soybean casein fraction[J]. Agricultural and Biological Chemistry,1966, 30 (7):646-650.

[2] Maruyama N, Katsube T, Wada Y, et al. The roles of the N-linked glycans and extension regions of soybean  $\beta$ -conglycinin in folding, assembly and structural features[J]. Biochemistry Journal, 1998, 258(2):854-862.

[3] Kimura Y, Ohno A, Takagi S. Structural analysis of N-glycans of storage glycoproteins in soybean (*Glycine max* L.) seed [J]. Bio-science Biotechnology and Biochemistry, 1997, 61 ( 11 ) : 1866-1871.

[4] Yang B C, Lyu Y, Chen Y, et al. Inhibitory action of soybean  $\beta$ -conglycinin hydrolysates on salmonella typhimurium translocation in Caco-2 Epithelial cell monolayers [J]. Agricultural Food Chemistry, 2008, 56 ( 16 ) :7522-7527.

[5] Ren J H, Yang B C, Lyu Y, et al. Protective and reparative effects of peptides from soybean  $\beta$ -Conglycinin on mice intestinal mucosa injury[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2014, 65(3):345-350.

[6] 郭勇. 现代生化技术[M]. 广州:华南理工大学出版社,1996: 42-46. ( Guo Y. Modern biochemical technology [M]. Guangzhou: South China University of Technology Press,1996:42-46. )

[7] Adler-Nissen J. Enzymatic hydrolysis of food proteins[M]. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.

[8] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Calorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956,28:350-356.

[9] 董群,郑丽依,方积. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药理学杂志,1996, 31(9):550-553. ( Dong Q, Zheng L Y, Fang J. Modified phenol-sulfuric acid method for determination of the content of oligo-and polysaccharides[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 1996, 31(9):550-553. )

[10] 张雪梅. 大豆蛋白酶解产物中的糖肽及其对小鼠脾细胞增殖效果的研究[D]. 北京:中国农业大学,2003. ( Zhang X M. Glycopeptides in soy protein hydrolysates and their effects on proliferation of murine splenocytes[D]. Beijing: China Agricultural University, 2003. )

[11] Parrot S, Degraeve P, Curia C, et al. *In vitro* study on digestion of peptides in Emmental cheese: Analytical evaluation and influence on angiotensin converting enzyme inhibitory peptides[J]. Nahrung Food, 2003,47:87-94.

[12] Vermeirssen V, van Camp J, Decroos K, et al. The impact of fermentation and in vitro digestion on the formation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein [J]. Journal of Dairy Science, 2003,86:429-438.

[13] Canapathy V, Leibach F H. Protein digestion and assimilation. In textbook of gastroenterology: yamada T, Ed. Lippincott Williams Wilkins: Piladelphia, 1999,456-467.

[14] Oomen A G, Hack A, Minkus M, et al. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants[J]. Environmental Science Technology, 2002, 36(15): 3326-3334.

(上接第 462 页)

[11] 宋秋来,曾祥亮,张磊,等. 春大豆植株磷素积累与转运动态的研究[J]. 土壤通报, 2011, 42(2): 382-387. ( Song Q L, Zeng X L, Zhang L, et al. Research of phosphorus accumulation and dynamics of transport in soybean [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2011, 42(2): 382-387. )

[12] 李远明,姜妍,祖伟,等. 不同施肥对滴灌大豆磷素积累与分配的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2013 ( 6 ) : 57-62. ( Li Y M, Jiang Y, Zu W, et al. Effect of different fertigation treatments on phosphorus accumulation and distribution in soybean [J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2013 ( 6 ) : 57-62. )

[13] Steven J, Crafts-Brandner. Phosphorus nutrition influence on leaf senescence in soybean [J]. Plant Physiology. 1992, 98: 1128-1132.

[14] 蔡柏岩,葛菁萍,祖伟. 磷素水平对不同大豆品种产量和品质的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2008, 14(1): 65-70. ( Cai B Y, Ge J P, Zu W. Yield and quality of different soybean varieties as affected by different phosphorus supplies [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2008, 14(1): 65-70. )

[15] 张大勇,宁海龙,杨庆凯. 东北地区几个大豆品种的蛋白质,脂肪含量的差异[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(1): 18-20. ( Zhang D Y, Ning H L, Yang Q K. Difference of oil and protein contents of several soybean varieties to the ecological condition in northeast of China [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2003, 25(1): 18-20. )

[16] 郭庆元,李志玉,涂学文. 大豆高产优质施肥研究与应用[J]. 中国农学通报,2003,19(3): 89-104. ( Guo Q Y, Li Z Y, Tu X W. Studing and application of fertilization techniques for high-yield and good quality in soybean [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2003,19(3): 89-104. )

[17] 王建国,李兆林,李文斌,等. 磷肥与大豆产量及品质的关系[J]. 农业系统科学与综合研究, 2006, 22(1): 55-57. ( Wang J G, Li Z L, Li W B, et al. Application of phosphorus in relation to soybean yield and quality [J]. System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture, 2006, 22(1): 55-57. )

[18] 丁洪,李生秀. 磷对大豆不同品种产量和品质的影响[J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(2): 66-70. ( Ding H, Li S X. Effect of phosphorus on grain yield and quality in soybean cultivars [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1998, 20(2): 66-70. )

[19] Myo W, Sutkhet N, Ed S. Effects of phosphorus on seed oil and protein contents and phosphorus use efficiency in some soybean varieties[J]. Kasetsart Journal(Natural Science),2010,44: 1-9.

[20] 王维军. 大豆的磷素营养与施肥[J]. 中国农业科学, 1963 ( 11 ) : 41-44. ( Wang W J. Phosphorus nutrition and fertilization of soybean[J]. Scientia Agricultura Sinica,1963(11):41-44. )