

大豆的抗营养因子及其改良*

丁安林 王 雁

(中国农科院作物育种栽培研究所)

常汝镇

(中国农科院作物品种资源研究所)

成熟的大豆种子含有丰富的蛋白质(约40%)。但是,也含有若干种抗营养因子,其中主要的有蛋白酶抑制剂,低聚糖,致甲状腺肿素,致过敏因子,植酸和抗维生素因子等。多数情况下,抗营养因子在加热加工过程中或萌发与发酵中受到破坏,或大大降低活性,从而可以使大豆提供人类食用或动物饲用。但是其中所需的耗能费用,最终加入到产品的成本之中,提高了产品的价格。如果采用低含量或缺失抗营养成分的种质资源,通过育种方法培育不含或含量低的大豆品种,必然会大大降低加工时去除活性的各种处理费用,还可直接用于饲养畜、禽,提高蛋白质的利用率。但是去除大豆抗营养因子育种是一桩较复杂的工作。首先利用高速而低耗的检测手段进行大量种质资源的抗营养因子低含量水平或缺失材料的筛选。如果筛选不到理想的资源,还需采用诱变技术产生这种所需的变异类型。在用合理的育种程序培育品种之前,有必要弄清这些因子的遗传规律。研究表明,抗营养因子多数属单基因的质量遗传,也有少数属多基因的数量遗传,普遍采用回交或改良回交法进行育种。培育低含量的抗营养因子的大豆还要求有良好的农艺性状,如产量、抗性水平以及品质都应具有进入市场的潜力。虽然培育完全不含任何抗营养因子的大豆难以做到,但培育出各种专用抗营养因子缺失类型的大豆还是可能的,并且已经有一些成功的例子。

一、大豆蛋白酶抑制剂

蛋白酶抑制剂是大豆蛋白质中最重要的一类抗营养因子,胰蛋白酶是若干蛋白酶的一种,通常指的大豆蛋白酶抑制剂就是指的胰蛋白酶抑制剂。它是由两类低分子量蛋白质组成,其中主要的一种称为库尼兹(Kunitz)胰蛋白酶抑制剂(KTI)。另一种主要的抑制剂称为包曼-伯克(Bowman-Birk)蛋白酶抑制剂(BBI)。两种共占种子贮藏蛋白总量的6%,种子干重的2%,能引起人或单胃动物的胰脏肿大等消化系统疾病,轻者造成消化不良,生长停滞,重者引起死亡。蛋白酶抑制剂引起了各类科学家们的注意,营养学家注重这类抑制剂对蛋白质营养的不利影响;植物遗传育种学家着眼于培育无抑制剂的突变体,并

* 本文于1993年4月16日收到。

This paper was received April 16, 1993.

将基因转育到优良的大豆品种中,改良大豆蛋白质的品质。下面将从几方面概括它的发展:

(一)大豆蛋白酶抑制剂的发现 首先观察到大豆不利于营养的问题并报道可以用加热方法加以改良的是 Osborne 的 Mendel(1917),但是发现大豆生粉中水浸提物内含有酶抑制剂的是 Read 和 Hass(1938),Bowman 和 Ham 等人(1944)进行了部分提纯。Kunitz(1945)分离出结晶。

(二)蛋白酶抑制剂的生化性质 库尼兹胰蛋白酶抑制剂分子量是 21,384 道尔顿,181 个氨基酸残基,含 2 个二硫键,活性中心是精氨酸 63—异亮氨酸 64(Wolf,1977),一个分子抑制剂能钝化一个分子的胰蛋白酶,其 X—光衍射结晶学分析得到它的全部结构特性(Wolf,1977),Singh(1969);Orf 和 Hymowitz(1979)发现它有四种电泳类型。包曼—伯克蛋白酶抑制剂是分子量为 7861 道尔顿的简单多肽,有 71 个氨基酸残基,7 个二硫键,2 个活性中心。一个是赖氨酸 16—丝氨酸 17 为胰蛋白酶抑制剂结合位点,另一个是亮氨酸 44—丝氨酸 45,是胰凝乳蛋白酶结合位点。BBI 有 5 种电泳类型,并且各种来源的抑制剂中,氨基酸序列的同源性很高(Odani 和 Ikenaka,1973;Liener 和 Kakade,1980)。

(三)营养学研究 大豆是世界上最重要的蛋白质来源,对动物饲养和人类营养的贡献很大,所以大豆蛋白酶抑制剂的研究受到高度的重视。传统的去除抑制剂活性的方法是加热钝化法。用大鼠进行的一项实验证明,加热使抑制剂活性下降与蛋白质的生物价提高是平行的,但当加入纯结晶抑制剂时又可恢复活性,其活性与生大豆粉一样,再经饲喂动物证实,能使其生长停滞(Rackis 1974)。进一步研究证明,这种抑制作用的机理不单是酶的水解作用受到抑制,当加入水解物与蛋白酶,并不能去除抑制作用。这是由于胰腺分泌的增加,胰腺机能亢进,使必需的含硫氨基酸大量亏损,大豆蛋白质本来就缺少含硫氨基酸,胰腺肥大过多地消耗含硫氨基酸,加重了这一亏损。但引起胰腺肥大的机理至今仍未完全搞清。另外还发现动物与人的酶系统在利用大豆产品方面不完全相同,动物受蛋白酶抑制剂毒害的影响远远大于人类。

(四)植物生理与分子生物学的研究 蛋白酶抑制剂对植物本身具有有利的一面。普遍认为起着某些保护作用。如认为蛋白酶抑制剂有抗虫作用。Hilder(1987)将一种抑制剂的基因转移到烟草中,表达了大量的蛋白酶抑制剂,并对烟草食心虫有显著抗性。K. Diane 和 Jofuku(1989)把库尼兹胰蛋白酶抑制剂基因作为种子蛋白基因模式,研究它在胚发育过程中的表达,发现它是由若干顺式单元(Cis—elements)所控制,听从专一性的“程序”所调遣,并在时间、空间和数量方面都有不同的表达模式。这种控制性“程序”在胚的形成期就已定下来了。(Perez Grau 和 Goldberg,1989)。

(五)在植物遗传育种上的发展 在这个领域里主要集中在对蛋白酶抑制剂缺乏突变体的研究上。包曼—伯克蛋白酶抑制剂的研究不像库尼兹胰蛋白酶抑制剂那样清楚,最近 J. M. Domagalski 等人(1992)用单克隆抗体—ELISA 技术鉴定出 8 个多年生野生大豆种含有 BBI 缺失体类型,显示出培育不含 BBI 的大豆品种的可能。但是目前胰蛋白酶抑制剂缺失突变体的研究主要还是针对库尼兹胰蛋白酶抑制剂而言。

Orf 和 Hymowitz(1979)发现大豆胰蛋白酶抑制剂 KT1 在种子蛋白提取液中,PAGE 图谱上出现三种 Rf 值类型,定名为 Ti^a、Ti^b 和 Ti^c,与在相同 Rf 值位置不显任何谱带的 ti

类型呈共显隐性关系,组成了同一基因位点的复等位基因系。Orf(1980)和 Chiang(1984)研究了胰蛋白酶抑制剂与酸性磷酸化酶及亮氨酸氨肽酶关系,证明它们同属大豆第九连锁群。赵述文等(1992)发现我国甘肃大豆地方品种中的一份材料具有新的电泳谱带,尚在进行深入研究,我们的研究也证实了该材料确实为一种新类型。

分子遗传学研究表明,大豆库尼兹胰蛋白酶抑制剂因子是受若干个基因(KTi1、KTi2、KTi3……)组成的基因家系的编码控制(Diane 和 Jofkuka, 1989)。对基因 KTi3 的进一步研究表明,产生缺失突变是一种移码突变。只有三个核苷酸的改变引起转录后的蛋白质不表达(Jofuku 和 Goldberg, 1989)。

在我国的栽培大豆品种中,经测定 99% 以上属于 Ti^a 型,极少数为 Ti^b 与 Ti^c 型,并未发现 titi 型(王衍桐等, 1989),“七五”对全国 1.4 万余份资源进行筛选也未发现 titi 型材料。Orf 和 Hymowitz, 1979 年从大量大豆种质资源中发现不含库尼兹胰蛋白酶抑制剂的两份 titi 材料,即 PI 157440 和 PI 196168。80 年代又将控制不含库尼兹胰蛋白酶抑制剂的 ti 基因转育到美国的一些栽培品种中,如 Williams 82, Amsoy 71 和 Clark 63 等。经过多代回交得到了产量和其他重要农艺性状与轮回亲本相似的等位基因品系(Bernard 和 Hymowitz, 1986)。这些品系的大豆胰蛋白酶抑制剂活性仅是普通大豆的 50%(Orf, 1990),最近我国傅翠真等人(1992)测定 KTi 的活性, titi 品系是普通品种的 59%~86%。1990 年美国已有了个以“库尼兹”命名的 titi 型商用大豆品种。日本的岩手大学等也进行了大豆 ti 基因的转育。1986 年,我国引进了美国的 L81-4590、L83-4387 和 L81-4871,笔者用上述材料为亲本开展了大豆不含库尼兹胰蛋白酶抑制剂育种。到 1990 年已初步育成了我国第一批具 titi 基因的品系。近年来美国对直接利用不含库尼兹胰蛋白酶抑制剂的大豆生粉饲喂畜、禽(猪、鸡)兴趣很高,并收到良好效果。据 1990 年堪萨斯州的报道,一项与内布拉斯加州的合作研究证明,用无库尼兹胰蛋白酶抑制剂大豆生粉为猪饲料,比传统豆粕配方更节省能源,每普式耳大豆节省 0.75~1.0 美元开支。由于采用未经变性的无胰蛋白酶抑制剂大豆作饲料,提高了蛋白利用率,比常规配方饲养的猪增重更快。

二、低聚糖

在大豆脱脂产品中存在的主要低聚糖是蔗糖、棉籽糖和水苏糖,约占豆粉的 15%(Aspinall, 1988)。大豆低聚糖中的水苏糖和棉籽糖可以引起鼠、狗等动物和人的消化不良症,出现腹胀病(Steggerda, 1968)。人和动物不能消化水苏糖与棉籽糖的原因是缺乏 α -半乳糖苷酶(Rackis, 1970; Murphy, 1972),致使嫌气微生物活跃,生成气体物质从而造成腹胀(Calloway, 1972)。McGumins(1983)报道了大豆的糖代谢能量较低,喂鸡比喂猪更低 20%。各种低聚糖在大豆中变化范围很大,据我国吉林省农科院大豆所测定 181 份吉林省大豆中,低聚糖的变幅 2.7~6.4%。日本农林水产省 Takeshiyasui(1984)分析了野生与栽培大豆 26 份,其变幅是 0.8~5.1%。从大豆总糖和各种单糖的遗传性研究表明:对异质型植株的选择,在株系的基础上进行应比用单粒遗传方法更为有效,糖含量的高低属中等遗传力(Open Shaw 和 Hadley, 1978; 1981)。不同糖含量的基因型与年份之间未观察到互作效应。在某些情况下,低糖含量与低产有关(Orf, 1989)。有关人的腹胀因子的研究是相当困难与昂贵的。只有当低聚糖水平能真实地揭示出腹胀程度时,才能考虑使用化学方法进行基因评价。在进行化学分析前尤其要注意贮藏条件,不要引起酶的降解和使豆种中糖

组分改变(Mwandemele,1982)。这项结果提示人们可以利用加工过程采用适合的酶来去除低聚糖。近年的研究表明,低聚糖的生物合成是通过半乳糖单元的代谢途径进行的,这将有利于肯定它们在植物体中的作用和腹胀的形成(Castillo,1990)。

三、致甲状腺肿素

据报道,大豆也能引起鸡、鼠等动物的甲状腺肿大(Block 等,1961;M Carison,1933;Patton 等,1939;Wilgus 和 Cassner,1941)。在人类中,尤其在婴儿中也报道引起了甲状腺肿大(Hydavitz,1960;Van Wyr 和 Cowrker,1959)。而且这种影响可因添加食用碘而减缓。Konijn 等(1972;1973)提出可能是一或二个氨基酸与一个糖分子组成的糖肽,因为引起甲状腺肿大的酶的确切成分不完全清楚,所以无法进行缺失突变体的资源筛选。

四、致过敏因子

与大多数抗营养因子不同,过敏反应只影响个别具有对特殊成份(或因子)高度敏感的人。这些过敏因子对常人来说无论摄取多少量都是良性的。因此大豆产品只对一些人表现出过敏症(Liener,1981)。据认为,包括几种不同成份的蛋白质如:大豆球蛋白, β -伴球蛋白,2S-球蛋白,被认为是能引起过敏反应的成分,如:大豆脂氧酶催化花生烯酸形成前列腺素等物质,它们是强过敏反应和感染动物的介质。(Kilslam Anssissons,1979;Moroz 和 Yang,1980;Slibasaski 等,1980)。目前除胰蛋白酶抑制剂外的所有大豆蛋白质,都被推测为能引起许多人的过敏症,(Orf,1989)。日本喜多村启介等正在对大豆致过敏因子进行研究,并有了进展(私人交流)。

五、植酸盐

某些金属如:Ca、Mg、Zn、Cu 和 Fe 在营养中的重要性是众所周知。大豆中含有较高的植酸盐,当人们摄入大豆产品时,对这些金属元素的需求随之也增加了。用大豆蛋白作膳食喂猴子,可发现患缺 Fe 性贫血症,可能就是植物蛋白中的物质干扰金属的生物利用。如植酸具有很强的螯合能力,能与 Ca、Fe、Zn、Mg 等阳离子结合,使这些营养元素利用率降低。O'Dell(1960)和 Ciener(1981)也讨论过大豆蛋白的矿质元素的生物利用率,发现了大豆植酸复合物对金属离子具有特殊的亲和力,并且加入 EDTA 可消除。根据我国调查,儿童缺 Mn、缺 Zn 率很高。在以植物蛋白为主的中国,研究如何提高金属离子的利用率和降低大豆中的植酸含量的关系很有现实意义,目前可通过改进加工方法来解决,如湿酸法和加成法(Anderson,1980)。据曹柳青(1991)报道:种子发芽可大大减低植酸的含量。植酸含量在大豆中有相当大的变幅(Rabay,1984),在 38 个大豆品种中植酸含量范围 14~23mg/g 干粉大豆。20 份野生种(*Glycine soja*)中为 19~28mg/g 干粉(Hymowitz,1985)。

六、抗维生素因子

在大豆中发现了抗维生素因子,并有过若干报道(Hymowitz,1985;Liener,1980;1981;Rackis,1972)。用未经加热过的豆粉喂养小鸡,必须增加 VD₃ 才能防止佝偻病(Carlson 和 Coworkers,1964)。据 Murillo 和 Gaunt(1975)推测,抗 VE 活性由 α 生育酚氧化酶引起的。大豆中含 VB₁₂ 也较低(Edelstein 和 Guggenheim,1970)。因为这些抗维生素因子尚未完全弄清楚,从大豆中进行广泛筛选和开展去除这些因子的育种工作还不可能着手进行。

小 结

大豆抗营养因子及其种质育种研究,对作物育种学家确是一种挑战。从已获得了长足进展的胰蛋白酶抑制剂缺失突变体的研究为例,我们可以获得这样的概念:首先从认识这种抗营养因子开始,随之进行资源筛选,遗传研究和缺失突变体育种。每一步都需要广泛的交叉学科间的协作,以及力求采用高效的先进的检测技术。

另外,从整体大豆的营养潜力的发挥来看,抗营养因子缺失体的研究和育种虽然能改进大豆的营养价,但是现阶段也必须考虑到采用部分热处理的效果,并根据不同需要去利用不同的缺失突变体,更为现实些。

各种抗营养因子中,毫无疑问地首先要去除胰蛋白酶抑制剂和降低低聚糖含量。至于其他各种抗营养因子,在对它们起主要功能作用的确切成分研究清楚之前,进行资源筛选和开展缺失体的育种都会是相当困难的。但随着科学技术的发展,终将会对这些抗营养因子进行逐一的探索,推动大豆营养品质的改良研究走向更新的领域。

参 考 文 献

- [1] 王连铮、王金陵主编. 1992, 大豆遗传育种学, 科学出版社
- [2] 胡明祥, 1988, 大豆籽粒蛋白质的遗传改良, 大豆科学 7(3): 231~239
- [3] 王衍桐, 李福山, 常汝镇, 1986, 从种子蛋白电泳分析看我国大豆品种 Ti 和 sp₁ 位点等位基因的分布, 作物学报 12(1): 31~37
- [4] 赵述文, 王海, 1992, 大豆 (*G. max*) 种子蛋白 SBTi 位点新类型的发现及甘肃省大豆 SBTi 位点各等位基因频率的研究, 大豆科学 11(1): 93~96
- [5] 傅翠真等, 1992, 豆类中胰蛋白酶抑制剂活性测定与初步分析, 大豆科学 11(3): 269~272
- [6] 丁安林等, 1990, 不含 SBTi-A₂ 的基因导入我国大豆的遗传表达, 作物学报 16(1): 26~31
- [7] 曹柳青等, 1991, 测定大豆中植酸评价某些矿物质的可利用性, 食品科学 3: 3~5
- [8] 吕耀昌等, 1991, 大豆、食用豆、玉米和小麦籽粒中植酸和酸溶性总磷的分析研究, 中国粮油学报 6(4): 2~4
- [9] Castillo E. N., de Lumen B. O., Reyes P. S., De lumen H. Z. 1990. Raffinose synthase and galactinol synthases in developing seeds and leaves of legumes. J. Agric. Food Chem. 38: 351~355
- [10] Hilder, (ed.) 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature 300(12): 160~163
- [11] Hymowitz T. 1985. Antinutritional factors in soybean genetics and breeding. In R. shible(ed) Proceedings of World Soybean Research Conference III. Westview press. Boulder, Co, 368~373
- [12] Jofuku K. D., Schipper R. D., Goldberg R. B. 1989. A frameshift mutation prevents Kunitz trypsin inhibitor mRNA accumulation in soybean embryos. Plant Cell 1: 427~436
- [13] Jofuku K. D., Goldberg R. B. 1989. Kunitz trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in transformed tobacco plant. Plant Cell 1: 1079~93
- [14] Liener I. E. and Kakada 1980. Protease inhibitors. In I. E. (ed) liener toxic comstiluentes of plant food stuffs. Academic press. New York 7~71
- [15] Mercury 1990. Nov. 11. Soybean Make Good Swine Feed
- [16] Orf O. H. 1990. Breeding soybeans lacking antinutritional factorys, Proceeding World Soybean Research Conference IV. 1091~1100
- [17] Perez-Grau L., Goldberg R. B. 1989. Soybean seed protein genes are regulated spatially during embryogenesis. Plant Cell. 1: 1095~1109
- [18] Domagalski J. M. et. al. 1992. Nulls for the Major Soybean Bowman-Birk Protease Inhibitor in the genus *Glycine*. Crop Science. 32: 1502~1505