

大豆品质的形成和籽粒糖代谢关键酶活性

郭茜茜, 孙聪姝, 刘丽君, 董守坤

(东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以红丰9、合丰46、黑农38、垦丰5、合丰25和黑农42 6个大豆品种为材料,分析蛋白质和脂肪的含量变化过程。从中选取红丰9、垦丰5和黑农42 3份材料,测定籽粒6-磷酸葡萄糖脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶和异柠檬酸裂解酶的活性。旨在了解上游物质和能量调配对大豆品质形成的影响。结果表明:蛋白质和脂肪的积累规律相似。脂肪积累量变化与6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性强弱变化趋势相同,但脂肪含量变化较酶活性变化延迟一些。异柠檬酸脱氢酶和异柠檬酸裂解酶活性和变化趋势影响着蛋白质合成和积累。

关键词:大豆;6-磷酸葡萄糖脱氢酶;异柠檬酸脱氢酶;异柠檬酸裂解酶

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)05-0846-04

Quality Formation and the Activities of Relative Enzymes in Glycometabolism in Soybean Seeds

GUO Qian-qian, SUN Cong-shu, LIU Li-jun, DONG Shou-kun

(Agronomy College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: Six soybean varieties, Hongfeng 9, Hefeng 46, Heinong 38, Kenfeng 5, Hefeng 25 and Heinong 42, were examined in this research to study the accumulation of fat and protein in seeds. We also measured the activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase in the seeds of Hongfeng 9, Kenfeng 5, and Heinong 42. To study the relationship between the protein content, fat content and carbon metabolism, and to understand the law of distribution of matter and energy in soybean seed. Results showed that the accumulating of protein was similar to that of oil. The change of fat content was in accordance with the activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase, and a slightly earlier than the latter. Activities of isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase to have a co-effect on the buildup and synthesis of protein.

Key words: Soybean; Glucose-6-phosphate dehydrogenase; Isocitrate dehydrogenase; Isocitrate lyase

大豆的油脂和植物蛋白有很高的应用价值,其合成和积累过程一直备受关注^[1-2]。大豆脂肪合成^[3]的许多环节得到了验证,合成过程中关键酶的作用亦有鉴定性描述。大豆蛋白和脂肪的比较研究也较多,在大豆蛋白脂肪的遗传方式和遗传力^[4-5],不同品种和不同年际蛋白质脂肪积累差异^[6-8],不同肥料处理和栽培措施对蛋白质脂肪积累的影响^[9],蛋白质与脂肪合成积累的相关性^[10-13]等多方面都积累了大量的材料。蛋白质和脂肪是2种不同的能量贮存形式,合成过程中竞争利用糖代谢中间产物丙酮酸。了解物质和能量的上游调配机理对

于大豆品质形成具有重要意义^[14]。试验分析了大豆蛋白质脂肪积累及糖代谢关键酶活性变化,明确不同基因型大豆品质形成的差异。深入了解上游代谢机制和能量分配规律,为调节大豆蛋白或脂肪含量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于2008年在东北农业大学实验实习基地进行。供试品种为红丰9、合丰46、黑农38、垦丰5、合丰25和黑农42,各大豆品种生育日数接近。

收稿日期:2009-05-27

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2006BAD21B01-5,2006BAD21B01-8);大豆生物学省部共建教育部重点实验室开放基金资助项目(SB08B06)。

作者简介:郭茜茜(1983-),女,硕士研究生,研究方向为作物生理学。E-mail:xxguo19850502@126.com。

通讯作者:刘丽君,副教授,博士。E-mail:Liulijun281021@163.com。

1.2 取样方法

花后 50 d 取样一次。花后 60 d 至荚果成熟,每隔 5 d 取样一次。一部分样品用液氮处理, -70°C 贮存备用,一部分样品剖荚杀青、烘干、研碎备用。

1.3 测定方法

蛋白质:采用 Foss 全自动凯氏定氮仪 Kjeltec™ 2300 测定。

脂肪:索氏提取法。

6-磷酸葡萄糖脱氢酶^[15]: 3.5 mL 反应体系, $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘氨酸甘氨酸 (pH7.5) 0.5 mL, $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镁 1.0 mL, $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-磷酸葡萄糖 1 mL, $0.0006 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NADP 0.5 mL, 酶液 0.5 mL。对照酶液由酶提取缓冲液代替。反应于 38°C 水浴中进行,用紫外-可见分光光度计测定 340 nm 处的光吸收值,酶活力以酶液加入后 3 min 内光吸收增加表示。

异柠檬酸脱氢酶^[15-16]: 3 mL 反应体系,磷酸钾缓冲液 (pH7.5) 1 mL, $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镁 0.4 mL, $0.0125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 D-异柠檬酸钠 0.4 mL, $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NADPH 1 mL, 1 酶液 0.2 mL。对照同上。 30°C 水浴,测定 340 nm 处光吸收值。酶活力以酶液加入后 3 min 内光吸收增加表示。

异柠檬酸裂解酶^[15-16]: 3 mL 反应体系,磷酸钾缓冲液 (pH7.5) 1 mL, $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镁 0.5 mL, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 0.5 mL, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异柠檬酸钠 0.5 mL, 酶液 0.5 mL。对照同上。 30°C 水浴反应,停止反应去蛋白处理,测定 445 nm 处光吸收值。酶活力以酶液加入后 3 min 内光吸收增加表示。

2 结果与分析

2.1 不同大豆品种蛋白质含量变化

供试品种的蛋白质含量变化如图 1,花后 60 d 红丰 9 达 29.80%,黑农 42 最低只有 18.60%。合丰 46、黑农 38、垦丰 5 和合丰 25 含量相近,都在 24.00% 左右。花后 60~70 d,合丰 46 和黑农 42 的蛋白质含量连续升高,花后 70 d 蛋白质含量达到 41.01% 和 42.21%。花后 60~65 d,红丰 9、黑农 38、垦丰 5 和合丰 25 蛋白质快速积累,花后 65~70 d 含量小幅度的下降,花后 65 d 蛋白质含量分别为 44.01%、38.41%、38.61% 和 41.41%。

花后 70~80 d,红丰 9、黑农 38 和合丰 25 的蛋

白质含量先上升后下降,花后 75 d 蛋白质含量达到 44.81%、38.61% 和 45.81%。合丰 46 蛋白质含量先下降后上升,垦丰 5 蛋白质含量连续上升,在花后 80 d 蛋白质含量达 46.01% 和 40.81%。5 个品种蛋白质含量总的趋势是上升的。黑农 42 花后 70 d 蛋白质含量为 40.81%,以后呈连续下降趋势。

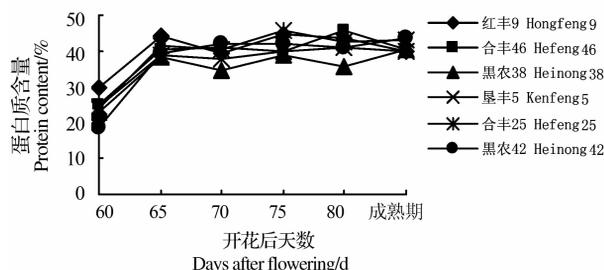


图 1 大豆蛋白质积累

Fig. 1 Accumulation of protein in the seeds

2.2 不同大豆品种脂肪含量变化

脂肪积累如图 2,花后的 60 d 红丰 9 和合丰 46 为 4.28% 和 11.46%。而黑农 38、垦丰 5、合丰 25 和黑农 42 的脂肪含量均不足 10%,黑农 38 只有 2.52%。花后 60~70 d,红丰 9、合丰 46、黑农 38 和合丰 25 的脂肪含量连续升高,达到 22.46%、22.12%、21.46% 和 20.66%。垦丰 5 和黑农 42 脂肪含量先升高后降低,花后 65 d 为 22.00% 和 20.22%。花后 70~80 d,红丰 9 脂肪含量先下降后上升,合丰 46 和合丰 25 连续下降,3 个品种的变化规律不同,但总的趋势是下降的。黑农 38 和垦丰 5 脂肪含量连续上升达到 23.78% 和 21.32%。黑农 42 脂肪含量先上升后下降,总体呈上升趋势,花后 75 d 为 21.32%。

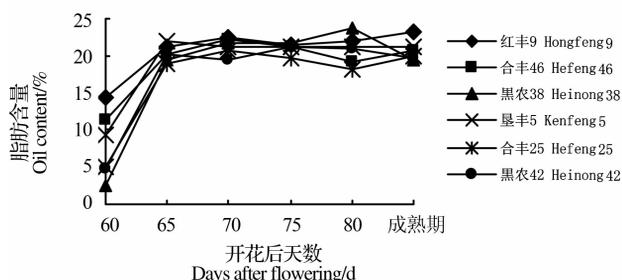


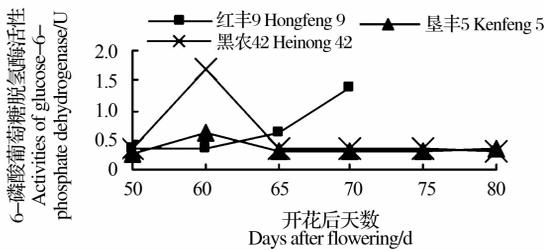
图 2 大豆脂肪积累

Fig. 2 Accumulation of fat in the seeds

2.3 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性和脂肪含量

6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性与脂肪合成密切相

关。酶活性是代谢途径强弱的标志之一,由酶活性的变化可以推导代谢途径的强弱变化。6-磷酸葡萄糖脱氢酶是戊糖磷酸途径关键酶,戊糖磷酸途径保障着脂肪酸合成专一性氢供体 NADPH 60% ~ 90% 的供给。如图 2、3 供试 3 个品种脂肪含量变化趋势与 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性变化趋势完全相同,脂肪变化延迟一些,高脂肪品种的酶活性在整个脂肪积累过程中表现上升趋势。如图 3 所示,红丰 9 酶活性连续上升,垦丰 5 和黑农 42 先上升后下降,随后表现平稳。花后 50 ~ 65 d,3 个品种的酶活性总体呈上升趋势,与脂肪含量迅速升高的时期(花后 60 ~ 70 d)相对应。



* 酶活力(U)以酶液加入后 3 min 内 OD 值增加表示

* Activity of isocitrate dehydrogenase (U) is light absorption increased at 340 nm in 3 minutes

图 3 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性

Fig. 3 Activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase

2.4 异柠檬酸脱氢酶和异柠檬酸裂解酶活性及蛋白质含量

异柠檬酸脱氢酶和异柠檬酸裂解酶代表三羧酸循环和三羧酸循环支路的代谢强弱,TCA 为氨基酸合成提供碳架,三羧酸循环支路保障 TCA 的碳架补给。如图 1、3、4、5 所示,蛋白质合成的底物供给代谢(三羧酸循环)减弱竞争代谢(戊糖磷酸途径)增强,高蛋白品种原料供给能力和碳架补给能力都较高。蛋白质大量积累期(花后 60 ~ 70 d),3 个品种的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性都升高,高蛋白和高脂肪品种垦丰 5 和红丰 9 的异柠檬酸脱氢酶活性下降,异柠檬酸裂解酶活性升高,丰产品种黑农 42 异柠檬酸脱氢酶活性小幅升高,异柠檬酸裂解酶活性下降(图 1,3,4,5),原料供给能力低下限制了蛋白质的合成。垦丰 5 异柠檬酸脱氢酶活性在花后 60、70 和 75 d 表现高活性优势,异柠檬酸裂解酶始终表现高活性,这与高蛋白的品种特征相适应(图 4,5)。

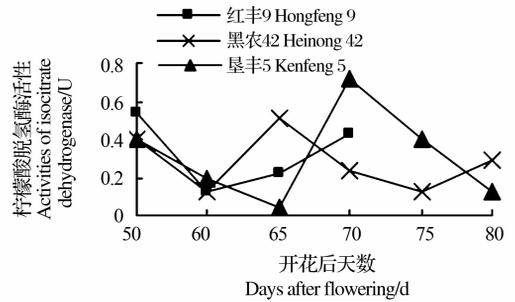
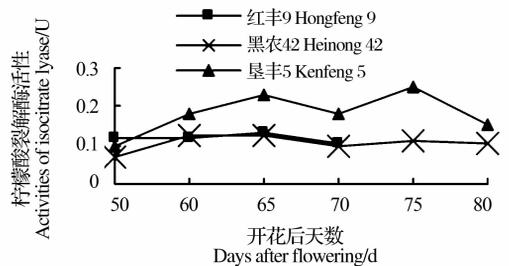


图 4 异柠檬酸脱氢酶活性

Fig. 4 Activities of isocitrate dehydrogenase/U



* 酶活力(U)以酶液加入后 3 min 内 OD 值增加表示

* Activity (U) is light absorption increased at 340 nm in 3 minutes

图 5 异柠檬酸裂解酶活性

Fig. 5 Activities of isocitrate lyase

3 结论与讨论

研究代谢途径的变化,可以检测中间产物的变化量或者关键酶的活性。中间产物是上游代谢的产物亦是下游代谢的底物,其含量很难测定。酶活性是代谢途径强弱的标志^[17],可以通过酶活性的强弱来推导代谢途径的变化。戊糖磷酸途径为脂肪合成提供氢供体。三羧酸循环为蛋白质合成提供碳架,乙醛酸循环补给 TCA 的碳架流失。这些代谢途径的变化直接影响着大豆品质的形成^[18-20]。

蛋白质和脂肪积累规律大致相同,首先是短期的迅速积累过程,然后是含量的小幅度调整,或升高或降低,品种间差异很大。蛋白和脂肪的大量积累是同时进行的,都集中在花后 60 ~ 70 d,从酶活性变化表现来看,脂肪合成上游代谢的物质和能量调配能力较蛋白质强一些。在一定程度上,6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性变化趋势体现着脂肪含量的变化趋势。异柠檬酸脱氢酶和异柠檬酸裂解酶活性体现着不同品种蛋白质合成能力的差异。

参考文献

- [1] 刘丽君. 生物技术在大豆品质改良中作用的概况[J]. 大豆通报, 1998, 6: 22-24. (Liu L J. Overview of biotechnology in quality to improve of soybean[J]. Soybean Bulletin, 1998, 6: 22-24.)
- [2] 王培英, 许德春, 郭玉虹, 等. 人工诱变改良大豆品质的研究[J]. 核农学报, 2000, 14 (1): 21-23. (Wang P Y, Xun D C, Guo Y H, et al. Induced mutation for soybean quality[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2000, 14 (1): 21-23.)
- [3] 任波, 李毅. 大豆种子脂肪酸合成代谢的研究进展[J]. 分子植物育种, 2005, 3(3): 301-306. (Ren B, Li Y. Research advances on fatty acid biogenesis metabolism in soybean seed[J]. Molecular Plant Breeding, 2005, 3(3): 301-306.)
- [4] 陈恒鹤, 尹丽华, 王大秋. 大豆蛋白质及脂肪含量的遗传和选择效果研究 II. 早期世代的变异与遗传选择[J]. 大豆科学, 1991, 10 (1): 1-9. (Chen H H, Yin L H, Wang D Q. Studies on inheritance and selection effect of protein and oil content in soybean II. Variability and genetic selection in early generations[J]. Soybean Science, 1991, 10 (1): 1-9.)
- [4] 李群. 大豆蛋白质与油份含量基因的 SSR 标记及初步定位[D]. 南京: 南京农业大学, 2004: 40-46. (Li Q. Targeting and mapping of protein and oil content related genes by SSR markers in soybean[D]. Nanjing Agricultural University, 2004: 40-46.)
- [5] 王文真, 刘兴媛, 曹永生. 中国大豆种质资源的蛋白质含量研究[J]. 中国种业, 1998, 1: 35-37. (Wang W Z, Liu X Y, Cao Y S. Study on protein content of China soybean [J]. China Seeds, 1998, 1: 35-37.)
- [6] 单宏. 黑龙江省大豆品质及特征特性的初步分析[J]. 黑龙江农业科学, 1999, 3: 48-50. (Shan H. Study on quality and characteristic of Heilongjiang soybean[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 1999, 3: 48-50.)
- [7] 陈霞, 赵贵兴, 张淑华, 等. 黑龙江省大豆品种蛋白质含量及其组份分析[J]. 大豆通报, 2000, 6: 19-21. (Chen X, Zhao G X, Zhang S H, et al. Study on protein content and ingredient of Heilongjiang soybean [J]. Soybean Bulletin, 2000, 6: 19-21.)
- [8] 苗兴芬, 陈庆山, 申洪波, 等. 种肥对大豆籽粒蛋白质、油份含量形成的影响[J]. 大豆科学, 2004, 23 (4): 311-314. (Miao X F, Chen Q S, Shen H B, et al. Affection seed fertilizer on protein and oil content of soybean seeds [J]. Soybean Science, 2004, 23 (4): 311-314.)
- [9] 宋启建, 盖钧镒, 马育华. 大豆蛋白质和油分含量生态特点研究[J]. 大豆科学, 1990, 9(2): 121-128. (Song Q J, Gai J Y, Ma Y H. A study on ecological property of protein content and oil content in soybean [J]. Soybean Science, 1990, 9(2): 121-128.)
- [10] 张恒善, 付艳华, 孙太石, 等. 大豆种子脂肪和蛋白质积累规律的研究[J]. 大豆科学, 1993, 12(4): 296-300. (Zhang H S, Fu Y H, Sun T S, et al. Study on the rule of accumulation of oil and protein soybean seed [J]. Soybean Science, 1993, 12(4): 296-300.)
- [12] 张代军, 周顺启, 栾怀海, 等. 高油大豆品种蛋白质和油份积累规律的研究[J]. 大豆科学, 2005, 24(4): 301-304. (Zhang D J, Zhou S Q, Luan H H, et al. Study on protein and oil accumulation law of high-oil soybean varieties [J]. Soybean Science, 2005, 24 (4): 301-304.)
- [13] 李志刚, 宋书宏, 李瑞平, 等. 大豆籽粒中干物质、脂肪和蛋白质积累规律的研究[J]. 作物杂志, 2008, 4: 52-54. (Li Z G, Song S H, Li R P, et al. Study on the accumulation regularity of soybean seeds dry matter, fat and protein [J]. Crop Magazine, 2008, 4: 52-54.)
- [14] 陈俊意. 甘蓝型黄籽油菜油分与色素、蛋白质及糖代谢间关系的研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 2004: 13-14, 53. (Chen J Y. Study on relation between oil content and pigments protein and sugar in rapeseed (*Brassica napus*. L) [D]. Chongqing: Southwest Agricultural University, 2004: 13-14, 53.)
- [15] 陈玉萍, 刘后利. 甘蓝型油菜子油分的积累与某些生理生化变化关系的研究[J]. 武汉植物学研究, 1995, 13 (3): 240-246. (Cheng Y P, Liu H L, Studies on the relationship between oil content and the change of biological metabolism in *Brassica napus* L. seed [J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 1995, 13(3): 240-246.)
- [16] 陈俊意. 甘蓝型黄籽油菜油分与色素、蛋白质及糖代谢间关系的研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 2004: 18-20. (Chen J Y. Study on relation between oil content and pigments protein and sugar in rapeseed (*Brassica napus*. L) [D]. Chongqing: Southwest Agricultural University, 2004: 18-20.)
- [17] Glock G E, Melean P. Levels of enzymes of the direct oxidative pathway of carbohydrate metabolism in mammalian tissues and tumours [J]. Biochemistry, 1954, 56: 171-175.
- [18] 唐湘如, 官春云. 作物产量和品质的碳氮及脂肪代谢调控研究进展[J]. 湖南农业大学学报, 1997, 23(1): 93-103. (Tang X R, Guan C Y. Relationship between activities of several enzymes and the oil, protein and yield of rapeseeds (*Brassica napus*) [J]. Journal of Hunan Agricultural University, 1997, 23(1): 93-103.)
- [19] Munshi S K, Kumari AniLa. Metabolic relationship of pod wall with lipid biosynthesis in developing mustard seeds [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1997, 24(1): 51-57.
- [20] Luthra R, Munshi S K, Sukhija P S. Relationship of carbohydrate metabolism with lipid biosynthesis in developing sunflower (*Helianthus annulus* L.) seeds [J]. Plant Physiology, 1991, 137: 312-318.