

## 大豆致敏蛋白及其清除方法的研究进展

曾蕊,宋波,拓云,吴帅,蓝岚,姜自芹,刘珊珊

(东北农业大学 大豆生物学教育部重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:**大豆含有丰富的蛋白质和平衡的氨基酸组分,是人和畜禽优质的植物蛋白源。然而,近年来,大豆中含有的抗原蛋白导致人和动物过敏反应的问题越来越受到关注,大豆致敏蛋白的相关研究成为大豆蛋白研究与应用的新热点。该文综述了大豆致敏蛋白的种类、特征,对有效加工、灭活大豆致敏蛋白的方法进行了归纳,着重介绍了传统育种方法结合基因工程手段在创制低致敏原大豆新种质方面的应用及研究进展,为进一步提高大豆及其制品的品质质量、保证其在人类食品和畜禽饲料中的安全与高效利用提供科学参考。

**关键词:**大豆;致敏蛋白;清除处理方法

**中图分类号:**S565.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2011)06-1040-07

## Research Progress on the Allergy Substance in the Soybean Protein and Its Removal Methods

ZENG Rui, SONG Bo, TUO Yun, WU Shuai, LAN Lan, JIANG Zi-qin, LIU Shan-shan

(Key Laboratory of Soybean Biology of Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Soybean has been recognized as one of the important protein sources in the field of food processing and animal forage because of its nutritional and functional benefits. However, soybean contains allergenic protein. For patients allergic to soybean, the risk of the soybean-allergic individual is increasing due to its extended application. On the other hand, the antigenic matter of soybean protein could also cause young animal allergy. To some extent, the nutritional value of soybean was affected by soybean antigen. The study on soybean antigen has attracted more attention. This article summarized the characteristics of the known allergens and technological approaches to decrease and removal soybean allergen. Meanwhile it discussed and suggested the developing trend and working emphasis of future research in these areas.

**Key words:** Soybean; Allergic protein; Removal methods

大豆含有丰富的蛋白质和平衡的氨基酸组分,是人和畜禽优质的植物蛋白源。随着大豆蛋白分离技术的改进,大豆蛋白制品的口感和食品功能性不断完善,大豆分离和浓缩蛋白被广泛添加于婴儿奶粉等各类加工食品中。这让多数人受益,但同时也使得过敏人群很难选到无添加大豆蛋白的食品。大豆致敏蛋白主要会影响人类的消化吸收功能,引发包括皮肤、肠胃、呼吸等方面的不良反应<sup>[1-2]</sup>。另外,豆粕是动物饲料的主要原料之一,大豆致敏蛋白在动物中主要造成肠道损伤,破坏新陈代谢,在饲喂大豆添加饲料的多种主要的畜产动物:如仔猪<sup>[5-6]</sup>、犊牛<sup>[7-8]</sup>、羔羊<sup>[9-10]</sup>和鼠<sup>[9]</sup>中都有出现过敏

反应的报道,大豆中含有的抗原蛋白导致人和动物过敏反应的问题越来越受到人们的关注<sup>[11-12]</sup>。

大豆致敏蛋白的清除能明显提高大豆食品与饲料的营养价值和食用安全性,研究表明,零抗原或低抗原大豆或豆粕的营养价值与动物蛋白相当,且能显著降低成本。据统计,每吨去抗原大豆蛋白饲料与动物蛋白相比可降低1 000元成本<sup>[13]</sup>。因此,在弄清大豆中所含致敏蛋白的种类与特性的基础上,有针对性地采取相应的处理措施,使大豆致敏蛋白失活、钝化,从而生产低致敏蛋白或无致敏原大豆蛋白,这在食品生产与饲料加工上均具有广阔的应用前景。

收稿日期:2011-09-08

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31071440);黑龙江省普通高等学校青年骨干支持计划资助项目(1155G12);哈尔滨市科技攻关计划资助项目(2008RFLXN002);博士后研究人员落户黑龙江科研启动资助项目(2009HB009);转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2008ZX08004-004)。

**第一作者简介:**曾蕊(1986-),女,在读硕士,研究方向为大豆遗传育种。E-mail: knacn2@126.com。

**通讯作者:**刘珊珊(1972-),女,教授,博士生导师,研究方向为大豆遗传育种。E-mail: ars336699@yahoo.com.cn。

## 1 大豆是致敏蛋白源之一

许多含有蛋白的食物都可能对一定的人群引起过敏反应,食品引起的过敏反应会造成儿童及成人严重的营养问题,避免食用这类食物通常是解决该问题的方法,但这严重限制了过敏人群的食品选择范围,并因此影响了他们的生活质量。在美国,90% 以上的食品过敏反应与牛奶、鸡蛋、花生、大豆和小麦等有关,其中,大豆、花生、牛奶和鸡蛋中含有多重致敏蛋白<sup>[11-12]</sup>。

1934 年,Duke 等<sup>[3]</sup>最早指出,大豆可能是一种重要的食物致敏原。1980 年,Moroz 和 Yang 用过敏症患者的血清首次科学的证明大豆是致敏原,这些过敏症患者在大豆加工工厂工作,豆粉通过空气传播的方式使他们产生过敏反应,大豆中的这种致敏原分离后,被命名为胰蛋白酶抑制剂(KSTI)<sup>[14]</sup>。随后,关于大豆蛋白致敏特性的报道不断深入。1980 年 Shibasaki 等<sup>[15]</sup>也证明大豆蛋白中有丰富的致敏蛋白成分,并且通过对大豆过敏患者血清中的 IgE 抗体进行 RAST 抑制分析,结果表明 2S、7S、11S 球蛋白有交叉反应;大部分的致敏成分都是 2S、7S、11S 球蛋白的组成成分。1988 年,Burks 等<sup>[16]</sup>通过对患过敏性皮炎的大豆过敏患者的血清进行免疫化学分析发现,大豆致敏原主要是 7S、11S 球蛋白,而不是 2S 球蛋白。1990 年 Rodrigo 等<sup>[17]</sup>发现,大豆粉尘的吸入可以引发哮喘。在由大豆粉尘引发哮喘的病人的血清中含有一种特殊的 IgE 抗体,它可以与一种分子量低于 14 kDa 的糖蛋白发生特异性反应,并假定该糖蛋白是  $\beta$ -伴大豆球蛋白或大豆莢中特定的蛋白的降解产物,命名为 Gly m 1 和 Gly m 2。1990 年 Herian 等研究发现,对大豆和花生都过敏的患者的血清会与分子量为 50 ~ 60 kDa (可能是  $\beta$ -伴大豆球蛋白)的几种蛋白成分发生反应;另外,还可以与一种 20 kDa 的成分(确认不是 KSTI,但与只对大豆过敏的患者的血清免疫反应强烈)发生反应。同年,Herian 对不同的致敏物质进行了描述,并且根据免疫印迹模式(immunoblotting patterns)将其分为了 3 个等级<sup>[14]</sup>。而 Ogawa<sup>[18]</sup>则认为,虽然在不同患者体内 IgE 结合蛋白是不同的,但是病人不能根据免疫印迹模式(immunoblotting patterns)分为不同群体。

到 2010 年 4 月 16 日为止,致敏原数据库(<http://www.allergenonline.org/>)已收录 38 种大豆过敏原,其中 2 种来自野生型大豆,36 种来自栽培大豆。目前的研究结果表明:大豆过敏蛋白主要为种子储藏蛋白、结构蛋白和防御相关蛋白。其中属储藏蛋白的致敏蛋白主要包括 Gly m Bd 60K( $\beta$ -伴球蛋白  $\alpha$ -亚基)、Gly m Bd 28K 和 Gly m Bd 30K(P34);结构蛋白包括 Gly m 1(疏水蛋白)、Gly m 2(壳蛋白)、Gly m 3(抑制蛋白)等;防御相关蛋白包括病理相关蛋白、KSTI(胰蛋白酶抑制剂)、凝集素多肽片段等。

## 2 大豆 7S 球蛋白是主要的大豆致敏蛋白

大豆过敏患者的血清免疫反应试验证明,大豆种子贮藏蛋白是大豆蛋白中的主要过敏原<sup>[19]</sup>。Ogawa 对 16 种致敏蛋白的研究结果表明,其中 10 种致敏蛋白为 7S 球蛋白组分,其它的主要为 2S 球蛋白和乳清组分,而 11S 球蛋白组分几乎没有任何致敏性<sup>[19]</sup>,他们将其中较突出的 3 种致敏蛋白命名为:Gly m Bd 30K、Gly m Bd 28K 和 Gly m Bd 60K<sup>[18]</sup>,以上 3 种致敏蛋白均为 7S 球蛋白组分。

### 2.1 Gly m Bd 30K/P34 致敏蛋白

Gly m Bd 30K 是大豆 7S 球蛋白组分之一,最容易与对大豆敏感的过敏性皮炎患者血清中的 IgE 抗体发生免疫反应,并且反应最强烈<sup>[19]</sup>,能被 65% 的对大豆敏感的过敏性皮炎患者的血清识别<sup>[20]</sup>,被认为是大豆中致敏性最强的致敏蛋白。Gly m Bd 30K 也被称为大豆油脂体相关蛋白 P34<sup>[21]</sup>。Chua 等<sup>[22]</sup>研究表明,P34 与一种尘螨(dust mite)过敏原 Der p 1 同源性达 30%。Kalinski 等首次从大豆油脂体膜上分离得到 P34,筛选 cDNA 并克隆得到了空泡蛋白(a vacuolar storage protein),与一种属于木瓜蛋白酶超家族(papain super family)的半胱氨酸蛋白酶(thiol proteases)有高度的同源性,但很可能不具蛋白酶活性,因为在其活性中心缺失了一个半胱氨酸,取而代之的是甘氨酸;Kalinski 等<sup>[23]</sup>的研究表明成熟的 P34 蛋白由 257 个氨基酸残基组成,是通过分子量为 47kDa 的 P34 前体蛋白,除去一个 122 个氨基酸残基的 N-端序列得到的。随后,Kalinski 等<sup>[24]</sup>通过电镜免疫技术(an electron microscopic immunostaining technique),又进一步将 Gly m Bd 30K(P34)定位在大豆子叶节中,并证明在大豆幼苗

生长过程中,P34蛋白还可再去除一个10个氨基酸的肽链,形成P32蛋白。Bando等<sup>[25]</sup>研究表明,Gly m Bd 30K(P34)的糖基化位点位于成熟蛋白的第170位天冬酰胺处,并且包括甘露糖、N-乙酰氨基葡萄糖、岩藻糖、木糖,它们分别以3:2:1:1的比例存在。在Helm等<sup>[26]</sup>对抗原表位的研究中,5个主要的抗原表位分别被定位于:3-12、100-110、229-238、299-308和331-340位的氨基酸残基上。

## 2.2 Gly m Bd 28K 致敏蛋白

Gly m Bd 28K是一种分子量和等电点分别为26 kDa和6.1的糖蛋白,聚糖基团(glycan moiety)以N-连接的方式与位于Gly m Bd 28K蛋白的氨基酸序列上的第20位的Asn连接,并且与Gly m Bd 30K的多糖组成相同<sup>[27]</sup>。Gly m Bd 28K的糖基化位点可能是IgE抗体识别的重要的表位。用去糖基化处理的糖蛋白与过敏病人血清中IgE抗体特异结合,结果显示其活性会丧失,推断与N-端连接的聚糖部分就是一般植物性蛋白的IgE反应活性决定域<sup>[27]</sup>。进一步分析Gly m Bd 28K的抗原表位,发现它主要的线性C-末端IgE结合的抗原表位位于S256和A270之间,用丙氨酸扫描技术研究抗原结构域染色质伸展活性,定位了5个IgE结合贡献最大的氨基酸残基Y260、D261、D262、K264和D266<sup>[28]</sup>。Gly m Bd 28K在大豆中含量较低,是将去脂大豆分离提纯后得到的一种7S球蛋白组分<sup>[29]</sup>,在对大豆敏感的过敏性皮炎患者中可以产生25%的发病率<sup>[18]</sup>。它属于Cupin蛋白家族,这个家族的很多成员都具有过敏原性,比如花生Ara h1、Ara h2,大豆 $\beta$ -伴球蛋白和大豆球蛋白的G1和G2蛋白<sup>[30]</sup>。

## 2.3 Gly m Bd 60K 致敏蛋白

大豆 $\beta$ -伴大豆球蛋白约占大豆籽粒总蛋白含量的25%,是7S球蛋白的组分之一,是影响大豆籽粒蛋白营养品质及加工品质的重要组分。大豆 $\beta$ -伴大豆球蛋白是由 $\alpha'$ -(76 kDa)、 $\alpha$ -(72 kDa)和 $\beta$ -(52~54 kDa)亚基组成的分子量为150 kDa的三聚体化合物<sup>[31]</sup>,该三聚体的亚基组成呈现丰富的多态性。在1995年之前,科学家们只能确定Gly m Bd 60K是另一个7S球蛋白成分,但是无法确认是 $\alpha$ -亚基与 $\alpha'$ -亚基和 $\beta$ -亚基中的哪一个。 $\alpha$ -亚基与 $\alpha'$ -亚基和 $\beta$ -亚基在氨基酸序列上有高度的同源性,其中 $\alpha$ -亚基与 $\alpha'$ -亚基的相似性更是超过90%。

1995年Ogawa等<sup>[32]</sup>研究表明, $\alpha$ -亚基与 $\alpha'$ -亚基的抗原表位均为160个氨基酸残基,然而其中17个残基是有差异的,并且识别 $\alpha$ -亚基的IgE抗体与 $\alpha'$ - $\beta$ -亚基并不发生交叉反应。由此确认Gly m Bd 60K即 $\beta$ -伴大豆球蛋白的 $\alpha$ -亚基,它能被25%的对大豆敏感的过敏性皮炎患者的血清识别<sup>[32]</sup>。Gly m Bd 60K也是一种糖蛋白,分子量和等电点分别为57 kDa和4.9。由Gly m Bd 60K的cDNA得到的前体包含543个氨基酸残基<sup>[33]</sup>,IgE抗体结合的抗原表位位于N-端的232~383残基处<sup>[32]</sup>。随后Guo等<sup>[34]</sup>在对大鼠的研究中发现 $\alpha'$ -亚基具有免疫刺激能力(immune-stimulating capacity)并且可以诱发过敏反应。Hari等<sup>[31]</sup>的研究进一步表明, $\beta$ -伴大豆球蛋白的 $\alpha$ 亚基、 $\alpha'$ -亚基和 $\beta$ 亚基都是潜在的过敏原。

## 2.4 其它致敏原

大豆中可以引发过敏反应的结构蛋白主要包括Gly m 1(疏水蛋白)、Gly m 2(壳蛋白)、Gly m 3(抑制蛋白)等。1990年,Rodrigo等将引发巴塞罗那哮喘的2种致敏蛋白分别命名为Gly m 1和Gly m 2<sup>[17]</sup>。随后又发现了Gly m 1的2个亚型(isoform),分别命名为Gly m 1 A和Gly m 1 B,其分子量分别为7.5和7 kDa<sup>[34]</sup>。它们的氨基酸序列与在子房壁的内果皮中合成的一种疏水蛋白有相似性,并在发育过程中逐渐沉积在种子表面,是一种结构蛋白<sup>[35]</sup>。Gly m 2存在于豆荚中,分子量为8 kDa,等电点为6.0,它与豌豆子叶节中的贮藏蛋白有同源性,并且与绿豆中的一种病程相关蛋白也同源<sup>[36]</sup>。Gly m 3的分子量为14 kDa,等电点为4.4,与桦树花粉抑制蛋白Bet v 2同源,一致性达到73%;另外,它还与其它11种大豆前纤维(profilin)有69%~88%的一致性<sup>[37]</sup>。Gly m 1、Gly m 2和Gly m 3这3种大豆致敏蛋白,都可以引起呼吸性气喘等过敏症状,它们均分布于豆荚中。大豆中还有许多其它抗原蛋白,但总体含量比较低,总共占大豆总抗原蛋白的15%~20%<sup>[38]</sup>,关于这类致敏蛋白有待进一步深入研究。

## 3 大豆致敏蛋白的清除处理方法

大豆所含的多种致敏蛋白是限制大豆在食品和饲料加工中广泛利用的关键因素,因此,如何降低、去除大豆致敏蛋白就成为提高大豆蛋白品质,

保障大豆制品在人类食品和畜禽饲料中安全与高效利用的关键性问题。目前,国内外普遍采用的方法主要包括物理处理、化学处理和育种改良的手段。

### 3.1 物理方法

热处理在国内的饲料加工工艺中是一种常用的方法,它可以使蛋白结构变性。热处理包括干热法和湿热法。干热法包括烘炒、焙炒、热风喷射、爆裂、微波辐射、红外辐射等;湿热法包括蒸汽加热、蒸煮、膨化、挤压等<sup>[39]</sup>。Ohishi 等<sup>[40]</sup>发现,通过挤压蒸煮和加热超过 66℃ 可将小牛血清中抗原降低 0.1%。SDS-PAGE 分析结果表明,致敏性的降低是由于蛋白分子结构的破坏和修饰。然而,孙鹏等<sup>[41]</sup>研究表明,热蒸汽处理可以降低  $\beta$ -伴大豆球蛋白的含量,但仍然存在免疫原性。Yamanishi 等<sup>[42]</sup>研究表明,大多数致敏蛋白的表位结构是有序的,所以热变性是可以引起致敏性下降的,但对于这些热稳定致敏蛋白的处理效果不明显。另外,日本学者利用物理射线诱导大豆突变结合传统育种方法,选育到低过敏原大豆种质<sup>[43]</sup>。

### 3.2 化学方法

3.2.1 改变分子结构 Tsuji 等<sup>[44]</sup>用 Maillard(美拉德)型多糖共轭来修饰致敏位点,可以降低致敏蛋白的致敏能力。他们将酸沉淀大豆蛋白与半乳甘露聚糖按质量比 1:5 混合,然后冷冻干燥。在相对湿度 79%,温度 60℃ 条件下诱导发生美拉德反应,几天后大豆致敏潜力降低。Babiker 等<sup>[45]</sup>对此方法进一步做出了验证,在 Gly m Bd 30 K 上连接了一个半乳甘露聚糖,结果发现该共轭复合物对过敏症患者的血清及 Gly m Bd 30 K 单克隆抗体完全没有反应。说明这是一种很有效的消除致敏性的方法。

3.2.2 化学试剂处理 Obala 等在未去脂豆浆中加入还原剂后离心,可以将约 90% 的 Gly m Bd 30K 移到油层中。Samoto 等<sup>[46]</sup>研究表明,在去脂豆浆中,在特定条件下( $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 4.5)加入还原剂( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaHSO}_3$ )后离心,约 97% 的 Gly m Bd 30K 以沉淀形式被除去,其它主要的大豆贮藏蛋白在离心后留在了上清液中。Samoto 等<sup>[47]</sup>进一步研究发现,少量包含在还原剂中的 Gly m Bd 30K 仍然存在于上清液中,这表示 Gly m Bd 30K 与  $\alpha$ -或  $\alpha'$ -亚基可能存在二硫键连锁。随后,他们对

这个想法做了验证,用 Tohoku 124( $\alpha$ -和  $\alpha'$ -亚基双缺)为材料与普通品种做对照,在去脂豆浆中, Gly m Bd 30K 的移除率从 97% 提高到 99.8%<sup>[47]</sup>。

添加化学试剂的方法,虽然可以很大程度甚至完全除去大豆中的致敏蛋白,但会造成产品中的化学物质残留,会对人体造成伤害,而后除去化学物质又提高了加工成本,因此该方法并没有得到广泛的应用<sup>[48]</sup>。

3.2.3 酶解处理 酶的水解作用是降低大豆蛋白致敏性的有效方法,但其作用程度受酶的种类<sup>[49]</sup>、水解程度以及水解前处理<sup>[50]</sup>等诸多因素的影响。虽然水解可以破坏一些抗原表位,特别是构象表位,但同时也会暴露出一些隐藏在三维结构内部或疏水区的线性抗原表位。因此,想要特异、有效地降低或去除特定的致敏原,还应该深入地了解该致敏蛋白的结构特点。

在日本,酶解法是消除大豆致敏原的一个重要途径。Yamanishi 等<sup>[49]</sup>将种子高压灭菌,在 37℃ 下用蛋白酶处理 20 h(与日本传统食品纳豆发酵条件相同),产物与纳豆相似;经免疫印迹和 ELISA 检测发现并没有与 F<sub>5</sub> 单克隆抗体或患者血清发生免疫反应,这说明酶解法可以有效的去除致敏蛋白。

### 3.3 育种手段

由于大豆致敏蛋白具有热稳定性,因此,采用物理化学等方法并不能彻底去除大豆中的致敏蛋白、生产零抗原的大豆产品,目前降低大豆致敏性的加工处理方法,如膨化法、热乙醇处理、微生物发酵及酶解等方法都不同程度地增加了加工成本。选育无致敏蛋白优良大豆新品种不仅可以从根本上改良大豆的蛋白品质,彻底清除致敏蛋白,而且可以减少为清除大豆蛋白的致敏作用所必需的加工工艺,从而大大降低深加工成本,有效保证大豆蛋白及其制品的高效及安全利用。大豆种子致敏蛋白缺失品种的选育是减少或除去大豆致敏蛋白源的最佳方法,也是大豆蛋白质品质改良育种的最新研究热点之一。现将 3 种主要的致敏蛋白 Gly m Bd 28K、Gly m Bd 30K 和 Gly m Bd 60K 在育种学领域的研究进展归纳如下。

Gly m Bd 28K 缺失型种质自然变异丰富,关荣霞等<sup>[51]</sup>对 175 份中国栽培大豆品种进行筛选,其中 44% 为 Gly m Bd 28K 缺失型种质;Ogawa 等<sup>[18]</sup>对日本栽培大豆品种以及进口大豆品种进行筛选,供试

材料中80%为Gly m Bd 28K缺失型种质。

Gly m Bd 30K是大豆中致敏性最强的蛋白<sup>[52]</sup>,然而,在日本已报道的所有品种和品系的筛选中,尚未发现缺失Gly m Bd 30K的种质资源;在我国,关荣霞等<sup>[51]</sup>筛选了175份多样性广、具有代表性的中国大豆品种,都没有检测到缺失Gly m Bd 30K的材料。2005年,Herman等<sup>[53]</sup>借助基因枪法用Gly m Bd 30K的沉默载体pKS73转化大豆体细胞,成功的抑制了转基因大豆的Gly m Bd 30K蛋白合成,得到了缺失致敏蛋白Gly m Bd 30K的转基因大豆。

1995年Ogawa等<sup>[32]</sup>研究表明,Gly m Bd 60K即是 $\beta$ -伴大豆球蛋白的 $\alpha$ -亚基;2009年Hari等<sup>[31]</sup>的研究进一步表明, $\beta$ -伴大豆球蛋白的 $\alpha$ 亚基、 $\alpha'$ -亚基和 $\beta$ 亚基都是潜在的过敏原。目前,人们已经得到了一系列经人工诱变或自然变异产生的具有不同亚基缺失组合表现的7S球蛋白 $\beta$ -伴大豆球蛋白致敏蛋白缺失型种质。1981年,Kitamura和Kaizuma<sup>[54]</sup>鉴定出了 $\alpha'$ -亚基缺失的Keburi与 $\alpha$ -和 $\beta$ -亚基含量都很低的Mo-shi-dou 503,并且通过杂交育种得到了1个 $\alpha'$ -亚基缺失、 $\alpha$ -和 $\beta$ -亚基含量都很低的品种Kari-kei 434。1994年,Takahashi等<sup>[43]</sup>用20 kR的 $\gamma$ 射线照射Kari-kei 434得到了1个 $\beta$ -伴大豆球蛋白 $\alpha'$ -亚基和 $\alpha$ -亚基(Gly m Bd 60K)缺失、 $\beta$ -亚基含量显著下降的新品系Tohoku 124,其亚基缺失性状是由独立遗传的单隐性基因Scg-1控制的。1996年,Samoto等<sup>[55]</sup>利用单克隆抗体C5进行免疫沉淀分析又表明,Tohoku 124同时缺失Gly m 28K过敏原。因为同时缺失Gly m Bd 60K和Gly m Bd 28K,Tohoku 124在无致敏蛋白大豆产品开发方面具有极大的利用潜力和商业价值。1996年,Hajika等<sup>[52]</sup>在日本Kumamoto县的野生大豆品种中发现了 $\beta$ -伴大豆球蛋白 $\alpha'$ -、 $\alpha$ -和 $\beta$ -亚基全部缺失的突变体,将其命名为QT2。QT2农艺性状表现正常,其亚基缺失的特性是由一个显性单基因Scg-1控制的。

在我国,关于大豆蛋白质组分改良育种的相关报道较少,刘珊珊等<sup>[56-57]</sup>利用黑龙江省第二积温带主栽中熟高油大豆品种东农47为受体材料,以致敏蛋白缺失、7S球蛋白亚基组成为 $[(\alpha' + \alpha) + 11S \text{ 酸性亚基}]$ -缺失型日本引进育种材料“日B”为供体亲本配制组合,于2008年创制了具有中国大豆遗传背景的,适于黑龙江省栽培的大豆7S球蛋白 $\alpha$ -

亚基(Gly m Bd 60K致敏蛋白)缺失型新种质,2011年春季繁育了 $\alpha$ -亚基缺失型BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>代材料,同时对以上材料进行分子标记辅助选择,以期得农艺性状优良、高含硫氨基酸、 $\alpha$ -亚基(Gly m Bd 60K致敏蛋白)缺失型新品种。

## 4 问题与展望

大豆在全世界的种植范围不断扩大,随着食品工业的扩大化、国际化,大豆蛋白制品的消费人群不断增加,探索有效降低、清除大豆中的致敏蛋白,降低大豆的致敏性,是高效利用大豆及其制品,保证其安全性的重要问题。目前,有关大豆抗原蛋白的理化特性<sup>[22,26-27,31-32]</sup>、致敏机理<sup>[1-10]</sup>的研究不断深入,大豆食品脱敏加工方法不断改进<sup>[39,43,46,50]</sup>,低致敏原种质<sup>[42,51,54-57]</sup>不断涌现。然而,仍有些未知抗原成分有待于进一步揭示,它们的理化特性、在动物体内的相关作用机理,以及不同致敏蛋白之间的关联,仍需深入的研究。借助分子标记辅助育种选育致敏蛋白缺失品种,可以有针对性的除去致敏蛋白,降低加工成本,是减少或除去大豆致敏蛋白源的最佳方法,这在食品生产与饲料加工上均具有广阔的应用前景。

## 参考文献

- [1] Sampson H A. Update on food allergy[J]. Allergy and Clinical Immunology, 2004, 113: 805-819.
- [2] Sicherer S H, Sampson H A. Food allergy[J]. Allergy and Clinical Immunology, 2006, 117: S470-S475.
- [3] Duke W W. Soybean as a possible important source of allergy[J]. Allergy and Clinical Immunology, 1934(5): 300-305.
- [4] 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.
- [5] Li D F, Nelssen J L, Reddy P G, et al. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig[J]. Animal Science, 1990, 68: 1790-1799.
- [6] 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.
- [7] Lallès J P, Dréau D, Salmon H, et al. Identification of soyabean allergens and immune mechanisms of dietary sensitivities in preruminant calves[J]. Research in Veterinary Science, 1996, 60: 111-116.

- [8] Lallès J P, Tukur H M, Toullec R. Immunochemical methods of assaying glycinin and  $\beta$ -conglycinin in soybean products • prediction of digestibility of soybean nitrogen and soybean immunogenicity in the calf[J]. *Ann Zootech (Paris)*, 1997, 46: 193-205.
- [9] Johnston C. Effect of injecting lambs with soyflour extract on serum soy protein antibody concentration and rate of gain[J]. *Small Ruminant Research*, 1996, 21(2): 149-154.
- [10] Ouédraogo C L, Lallès J P, Toullec R, et al. Roasted full fat soybean as an ingredient of milk replacers for goat kids[J]. *Small Ruminant Research*, 1998, 28(1): 53-59.
- [11] 任贤丽. 大豆抗营养因子及其食品钝化技术[J]. *粮油加工*, 2010(11): 116-119. (Ren X L. Soybean anti-nutritional factors and the food processing elimination[J]. *Cereals and Oils Processing*, 2010(11): 116-119.)
- [12] Messina M, Barnes S. The role of soy products in reducing risk of cancer[J]. *National Cancer Institute*, 1991, 83: 541-546.
- [13] 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 on the soybean antigen[J]. *Chinese Fodder*, 2004(20): 14-15.)
- [14] Moroz L A, Yang W H. Kunitz soybean trypsin inhibitor: a specific allergen in food anaphylaxis[J]. *The New England Journal of Medicine*, 1980, 302: 1126-1128.
- [15] Shibasaki M, Suzuki S, Tajima S, et al. Allergenicity of major component proteins of soybean[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 1980, 61: 441-448.
- [16] Burks A W, Brooks J R, Sampson H A. Allergenicity of major component proteins of soybean determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges[J]. *Allergy and Clinical Immunology*, 1988, 81: 1135-1142.
- [17] Rodrigo M J, Morell F, Helm R M, et al. Identification and partial characterization of the soybean-dust allergens involved in the Barcelona asthma epidemic[J]. *Allergy and Clinical Immunology*, 1990, 85: 778-784.
- [18] Ogawa T, Samoto M, Takahashi K. Soybean allergens and hypoallergenic soybean products[J]. *Nutritional Science and Vitaminology*, 2000, 46(6): 271-279.
- [19] Ogawa T, Bando N, Tsuji N, et al. Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis[J]. *Nutritional Science and Vitaminology*, 1991, 37: 555-565.
- [20] Helm R M, Cockrell G, Connaughton C, et al. Mutational analysis of the IgE-binding epitopes of P34/Gly m Bd 30K[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000, 105(2): 378-384.
- [21] Ogawa T, Bando N, Tsuji H, et al. Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1995, 57: 1030-1033.
- [22] Chua K Y, Stewart G A, Thomas W R, et al. Sequence analysis of cDNA coding of a major house dust mite allergen, Der p 1, homology with cysteine proteases[J]. *Experimental Medicine*, 1988, 157: 175-182.
- [23] Kalinski A, Weisemann J M, Matthews B F, et al. Molecular cloning of a protein associated with soybean seed oil bodies that is similar to thiol proteinases of the papain family[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265: 13843-13848.
- [24] Kalinski A J, Melroy D L, Dwivedi R S, et al. A soybean vacuolar protein (P34) related to thiol proteases which is synthesized as a glycoprotein precursor during seed maturation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267: 12068-12076.
- [25] Bando N, Tsuji H, Yamanishi R, et al. Identification of the glycosylation site of a major soybean allergen, Gly m Bd 30K[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1996, 60: 347-348.
- [26] Helm R, Cockrell G, Herman E, et al. Cellular and molecular characterization of a major soybean allergen[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 1998, 117: 29-37.
- [27] Hiemori M, Bando N, Ogawa T, et al. Occurrence of IgE antibody-recognizing N-linked glycan moiety of a soybean allergen, Gly m Bd 28K[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2000, 122: 38-45.
- [28] Xiang P, Haas E J, Zeece M G, et al. C-Terminal 23 kDa polypeptide of soybean Gly m Bd 28 K is a potential allergen[J]. *Planta*, 2004, 220: 56-63.
- [29] Tsuji H, Bando N, Hiemori M, et al. Purification and characterization of soybean allergen Gly m Bd 28K[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1997, 61: 942-947.
- [30] Mills E N C, Jenkins J, Marigheto N, et al. Allergens of the cupin superfamily[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2002, 30: 925-929.
- [31] Krishnan H B, Kim W S, Jang S C, et al. All three subunits of soybean  $\beta$ -conglycinin are potential food allergens[J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57: 938-943.
- [32] Ogawa T, Bando N, Tsuji T, et al.  $\alpha$ -Subunit of  $\beta$ -conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1995, 59(5): 831-833.
- [33] Sebastiani F L, Schmit E S, Beachy R N. Complete sequence of a cDNA of alpha subunit of beta-conglycinin[J]. *Plant Molecular Biology*, 1990, 15(1): 197-201.
- [34] Guo P, Piao X, Cao Y, et al. Recombinant soybean protein  $\beta$ -conglycinin  $\alpha'$  subunit expression and induced hypersensitivity reaction in rats[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2008, 145: 102-110.
- [35] Gonzalez R, Polo F, Zapatero L, et al. Purification and characterization of major inhalant allergens from soybean hulls[J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 1992, 22(8): 748-755.
- [36] Codina R, Lockey R F, Rama R. Purification and characterization of a soybean hull allergen responsible for the Barcelona asthma out-

- breaks. II. Purification and sequencing of the Gly m 2 allergen [J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 1997, 27(7):424-430.
- [37] Rihs H P, Chen Z, Rueff F, et al. IgE binding of the recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes [J]. *Allergy and Clinical Immunology*, 1999, 104(6):1293-1301.
- [38] Lui D Y M, White E T, Litster J D. Dissolution behavior of soy proteins and effect of initial concentration [J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55:2467-2473.
- [39] 郝涤非. 大豆抗营养因子及其在食品加工中的消除 [J]. *食品科技*, 2007(12):235-238. (Hao D F. Soybean anti-nutrition factor and in food processing elimination [J]. *Food Science and Technology*, 2007(12):235-238.)
- [40] Ohishi A, Watanabe K, Urushibata M, et al. Detection of soybean antigenicity and reduction by twin-screw extrusion [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1994, 71:1391-1396.
- [41] 孙鹏, 秦贵信. 蒸汽处理对纯化大豆抗原含量及免疫原性的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2006, 26(5):551-554. (Sun P, Qin G X. Steam treatment of the purified soybean antigen content and immunogenicity [J]. *Journal of Chinese Veterinary*, 2006, 26(5):551-554.)
- [42] Yamanishi R, Huang T, Tsuji H, et al. Reduction of the soybean allergenicity by the fermentation with *Bacillus natto* [J]. *Food Science and Technology International*, 1995, 1:14-17.
- [43] Takahashi K, Banaba H, KiKuchi A, et al. An induced mutant line lacking the  $\alpha$ -subunit of  $\beta$ -conglycinin in soybean [J]. *Breed Science*, 1994, 46(1):251-255.
- [44] Tsuji H, Okada N, Bando N, et al. Fate of major soybean allergen, Gly m Bd 30k, in rice-, barley-, and soybean-koji miso (fermented soybean paste) during fermentation [J]. *Food Science and Technology International (Tokyo)*, 1997, 3:145-149.
- [45] Babiker E F E, Hiroyuki A, Matsudomi N, et al. Effect of polysaccharide conjugation or transglutaminase treatment on the allergenicity and functional properties of soy protein [J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(3):861-871.
- [46] Samoto M, Akasaka T, Mori H, et al. Simple procedure for removing the 34-kDa allergenic protein, Gly m 1, from defatted soy milk [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1994, 58:2123-2125.
- [47] Samoto M, Takahashi K, Fukuda Y, et al. Substantially complete removal of the 34-kDa allergenic soybean protein, Gly m Bd 30k, from soy milk of a mutant lacking  $\alpha$ - and  $\alpha'$ -subunits of conglycinin [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1996, 60:1911-1913.
- [48] 高美云, 张通, 刘宾, 等. 豆粕抗营养因子及其生物改性的研究 [J]. *中国饲料*, 2010(8):37-41. (Gao M Y, Zhang T, Liu B, et al. Research on the anti-nutrition factors of soybean meal and the method of fermentation [J]. *Chinese Fodder*, 2010(8):37-41.)
- [49] Yamanishi R, Tsuji H, Bando N, et al. Reduction of the allergenicity of soybean by treatment with proteases [J]. *Nutritional Science and Vitaminology*, 1996, 42(6):581-587.
- [50] Lee J O, Lee S L, Cho S H, et al. A new technique to produce hypoallergenic soybean proteins using three different fermenting microorganisms [J]. *Allergy and Clinical Immunology*, 2004, 113(2):S239.
- [51] 关荣霞, 常汝镇, 邱丽娟, 等. 栽培大豆蛋白亚基 11S/7S 组成及过敏蛋白缺失分析 [J]. *作物学报*, 2004, 30(11):1076-1079. (Guan R X, Chang R Z, Qiu L J, et al. Analysis of protein subunit 7S/11S constitution and allergen lacking of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivars [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2004, 30(11):1076-1079.)
- [52] Hajika M, Takahashi M, Sakai S, et al. A new genotype of 7S globulin detected in wild soybean [J]. *Breed Science*, 1996, 46(2):385-386.
- [53] Herman Eliot M. Soybean allergenicity and suppression of the immunodominant allergen [J]. *Crop Science*, 2005, 45:462-467.
- [54] Kitamura K, Kaizuma N. Mutant strains with low level of subunits of 7S globulin in soybean seeds [J]. *Japanese Journal of Breeding*, 1981, 31(2):353-359.
- [55] Samoto M, Takahashi K, Fukuda Y, et al. Substantially complete removal of the 34-kDa allergenic soybean protein, Gly m Bd 30K, from soy milk of a mutant lacking  $\alpha$  and  $\alpha'$  subunits of conglycinin [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1996, 60:1911-1913.
- [56] 刘珊珊, 滕卫丽, 姜自芹, 等. 大豆 7S 球蛋白  $\alpha$ -亚基缺失型种质创新 [J]. *作物学报*, 2010, 36(8):1409-1413. (Liu S S, Teng W L, Jiang Z Q, et al. Development of soybean germplasm lacking of 7S globulin  $\alpha$ -subunit [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36(8):1409-1413.)
- [57] 葛玉君, 高丽辉, 田福东, 等. 7S 球蛋白亚基含量变异大豆种质的性状鉴定 [J]. *中国油料作物学报*, 2008, 30(2):174-178. (Ge Y J, Gao L H, Tian F D, et al. Agronomic and quality characteristics of soybean germplasm identification by various subunit deficiency of 7S globulin [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2008, 30(2):174-178.)