

# 大豆发芽过程中油体和蛋白质贮存液泡的形态变化

郭金燕, 赵路苹, 陈业明, 华欲飞

(江南大学 食品学院/食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘要:**利用透射电子显微镜观察了大豆发芽过程中蛋白贮存液泡和油体的形态变化过程。结果显示:干燥大豆细胞中密集地充满着蛋白质贮存液泡和油体,随着发芽天数的延长,液泡会渐渐聚合增大,当天数达到4 d时,会聚合形成一个占据细胞大部分空间的大液泡,并且液泡中的蛋白质不断发生减少;发芽1~2 d的豆芽,油体显示出聚集于液泡表面的趋势,并且比远离液泡的油体小;发芽 $\geq 4$  d时,油体数目不断发生减少;发芽过程中,大部分油体被消化利用渐渐变小或者消失,而有少部分油体发生聚合增大,这应该跟油体表面的油体蛋白被水解相关:一方面,油体蛋白被水解会使甘油三酯暴露,利于它们的消化利用,另一方面,油体蛋白水解去除了油体聚合增大的空间障碍。最后,绿豆芽的蛋白质和脂质消化利用的速度要比黄豆芽快,这跟光照条件下,绿豆芽的生理活动更加活跃有关。

**关键词:**大豆发芽;油体;蛋白质贮存液泡;油体蛋白水解

**中图分类号:**S565.1

**文献标识码:**A

**DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.05.0833

## Behaviors of Protein Storage Vacuoles and Oil Bodies during Soybean Germination by Transmission Electron Microscopy

GUO Jin-yan, ZHAO Lu-ping, CHEN Ye-ming, HUA Yu-fei

(School of Food Science and Technology/State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Soybean germination is not only used to produce soybean sprouts, but also important in soybean growth. The protein in protein storage vacuoles (PSVs) and the lipid in oil bodies (OBs) are hydrolyzed in soybean germination to supply materials and energy for growth and seedling. In this study, transmission electron microscopy was used to monitor the behaviors of OBs and PSVs in soybean germination. It was found that each soybean cell was fully filled with OBs and PSVs in dry soybean. During germination, PSVs were gradually coalesced into larger vacuoles, and formed one final vacuole after 4 days, and the contents of PSVs were gradually decreased; after 1-2 days germination, OBs tended to approach the PSVs, and the approached OBs were smaller than the ones far from PSVs; most of OBs was mobilized to become smaller ones or disappear, and a few of OBs were coalesced into large oil droplets, which should be closely correlated with the oleosin hydrolysis. On one hand, oleosin hydrolysis could expose the triglycerides, which was beneficial for the subsequent hydrolysis of triglycerides. On the other hand, oleosin could efficiently inhibit the coalescence of OBs, so oleosin hydrolysis should be the reason for the formation of large oil droplets. At last, it was found that the mobilization of PSVs, especially OBs, was quicker when soybean germination was conducted with light.

**Keywords:** Soybean germination; Oil bodies; Protein storage vacuoles; Oleosin hydrolysis

脂质和蛋白质是大豆种子的两种主要成分,它们分别贮存于细胞器——油体<sup>[1]</sup>和蛋白质贮存液泡中<sup>[2]</sup>。根据经典的油体模型<sup>[3]</sup>,油体的核心由甘油三酯组成(94%~98%)<sup>[4]</sup>,表面由一层磷脂和镶嵌于其中的膜蛋白(油体蛋白,oleosin)组成,与细胞膜的半膜结构很类似,是一种稳定的天然微胶囊<sup>[5]</sup>。另外,油体还含有一定量的维生素E<sup>[6]</sup>和植物甾醇<sup>[7]</sup>。不同于油体,蛋白质贮存液泡是具有一层磷脂双分子层的囊泡,囊泡内主要含有大豆球蛋白(glycinin)和 $\beta$ -伴球蛋白( $\beta$ -conglycinin)<sup>[2]</sup>。大豆发芽过程中,脂质在内源酶作用下发生水解消耗为生长发育提供能量,而蛋白质在内源酶作用下发生水解,为生长发育提供物质基础<sup>[1-2]</sup>。Shi等<sup>[8]</sup>发现大豆发芽会使得豆芽的蛋白质含量升高,而脂质含

量降低(相对于豆芽干物质)。另外,大豆发芽也会使得其它小分子成分发生变化,如异黄酮等<sup>[9]</sup>。大豆发芽一方面是生产豆芽菜的基本过程,另一方面也是大豆植株生长的前期过程。本研究将通过透射电子显微镜来考察油体和蛋白质贮存液泡在发芽过程中的形态变化,为详细理解大豆发芽过程提供基础理论。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

大豆原料为南农88-31,购于南京农业大学国家大豆改良中心。丙酮、磷酸二氢钠和磷酸一氢钠购于国药集团化学试剂有限公司。25%戊二醛和包埋剂(spurr's resin)购于美国Sigma公司。

收稿日期:2014-05-17

基金项目:国家自然科学基金(31301496);2012年教育部基本科研—青年基金(2050205)。

第一作者简介:郭金燕(1991-),女,学士,主要从事植物蛋白科学与技术研究。E-mail:foodergjy@163.com。

通讯作者:陈业明(1982-),男,博士,副教授,主要从事植物蛋白科学与技术研究。E-mail:chenyeming19821213@gmail.com。

透射电子显微镜,日本日立公司。

1.2 豆芽制备

第一天 14:00,用去离子水冲洗 20 g 大豆数次,加入适量(约为大豆质量的 6 倍)离子水,在 4℃ 冰箱浸泡 18 h。第二天 8:00,将吸胀大豆放入底部和边框有孔塑料框中开始发芽(室温 25 ~ 30℃,见光),并盖上带孔保鲜膜。第三天 14:00,用去离子水冲洗 20 g 大豆数次,加入适量去离子水,在 4℃ 冰箱浸泡 18 h。第四天 8:00,循环进行。通过重复以上方法,可以在第 9 天同时得到发芽 1,2,4,6 和 8 d 的绿豆芽。黄豆芽的制备在避光条件下同时进行,其他发芽及处理条件相同。豆芽每天浇水 4 次(8:00、12:00、16:00、20:00),以原始干燥大豆作为对照。

1.3 电子显微镜样品制备

样品制备参照 Krishnan 的方法<sup>[10]</sup>稍作改动,只利用戊二醛固定,不需继续用四氧化锇固定。另外,脱水时采用丙酮梯度溶液。

戊二醛固定:第 9 天 8:00,用双面刀片将豆芽子叶切成 2 mm × 2 mm × 10 mm 的长方体,并迅速将其浸泡于 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液中(pH7.2;50 mmol·L<sup>-1</sup>)。过夜后,用 50 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液(pH7.2)漂洗 6 次,开始时间间隔较短,15 ~ 20 min 换 1 次,最后 1 次间隔 1 h。

丙酮梯度脱水:从低浓度脱水剂逐步过渡到高浓度脱水剂。30% 丙酮(20 min)→50% 丙酮(30 min)→70% 丙酮(30 min)→80% 丙酮(30 min)→90% 丙酮(30 min)→95% 丙酮(30 min)→100% 丙酮(30 min)→100% 丙酮(30 min)→100% 丙酮(30 min)。

浸透:浸透的目的是用包埋剂逐步取代植物组织中的脱水剂,使细胞内外空隙被包埋剂所填充。包埋剂:丙酮(1:3)浸透 2 ~ 3 h→包埋剂:丙酮(1:1)浸透 4 ~ 5 h→包埋剂:丙酮(3:1)浸透 10 ~

12 h→纯包埋剂浸透 24 h→纯包埋剂浸透 48 h。

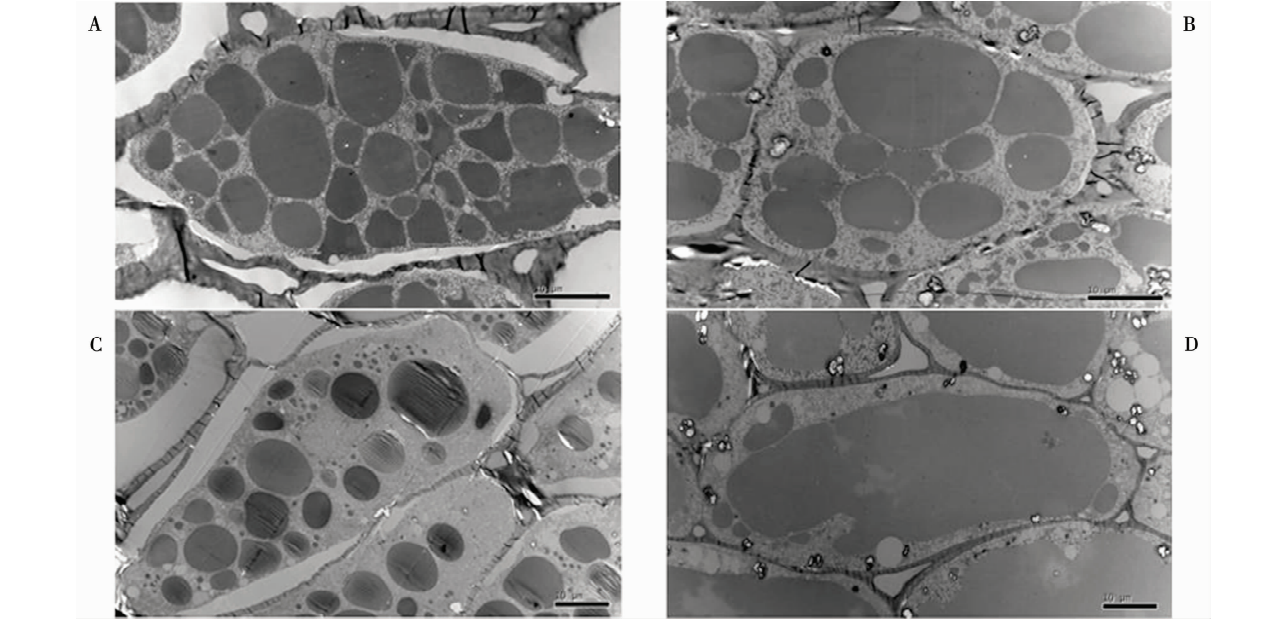
切片:将含有包埋好样品的包埋板放入烘箱内,30℃ 下放置 48 h,60℃ 放置 48 h。组织块从烘箱中取出后,将样品切成数十纳米厚的薄片,放于铜网上,进行电子显微镜观察。

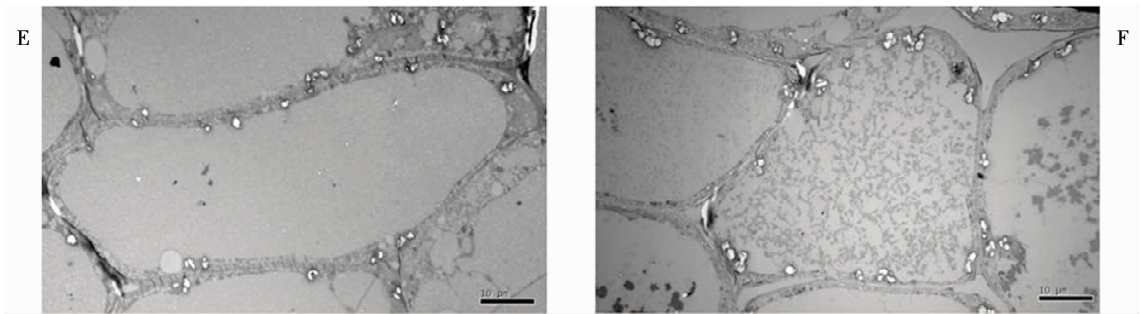
2 结果与讨论

2.1 发芽过程中油体和蛋白质贮存液泡的形态变化

图 1 和图 2 分别是绿豆芽和黄豆芽子叶中油体和蛋白质贮存液泡随着发芽天数的形态变化过程。干燥大豆中,每个子叶细胞中密密麻麻地填充着蛋白质贮存液泡(黑色不规则球)和油体(白色小圆球)。随着发芽天数的延长,蛋白质贮存液泡渐渐聚合形成一个大液泡,并且液泡填充物(贮存蛋白:主要为大豆球蛋白和β-伴球蛋白)有渐渐减少的趋势(颜色由深变浅)。这说明蛋白水解成小肽,并被运送出细胞去支持根茎和新叶的生长。这与前人的研究是相符的<sup>[2]</sup>。通过比较图 1 和图 2,可以发现黄豆芽的蛋白质贮存液泡中的蛋白质水解的要比绿豆芽慢,这应该这是由于绿豆芽在光照的作用下生理活动更活跃<sup>[8]</sup>。

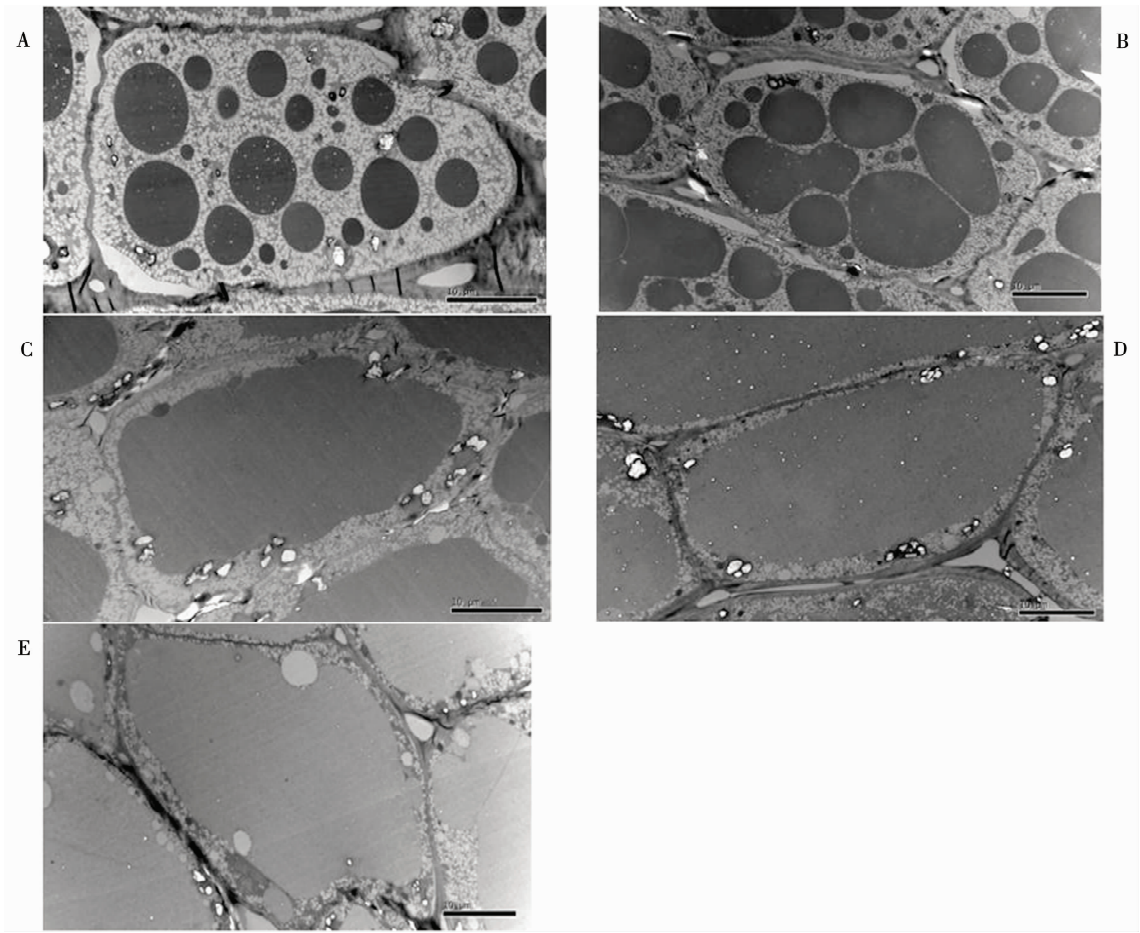
油体数目随着发芽天数的延长,渐渐地减少,并被挤到细胞膜边缘。这与豆芽生长发育过程中脂质减少(通过呼吸作用变成 CO<sub>2</sub>)是相符的<sup>[8]</sup>,说明发芽过程中脂质(主要是甘油三酯)是渐渐被消耗提供能量的。少部分的油体会发生聚合增大,这说明在发芽过程中,油体表面结构被破坏了。Tzen 等<sup>[3]</sup>报道油体表面的油体蛋白可以有效地阻止油体聚合增大,而 Chen 等<sup>[11]</sup>发现大豆发芽过程中油体蛋白是不断被水解的,所以这些研究结果可以用来解释为什么少量油体会聚合增大。





A:原始大豆;B~F:发芽1,2,4,6和8 d。  
A:Original soybean; B-F: One, two, four, six and eight days after germination, respectively.

图 1 绿豆芽的油体和蛋白质贮存液泡的形态变化  
Fig. 1 The behaviors of oil bodies and protein storage vacuoles during soybean germination when exposed to light



A~E:发芽1,2,4,6和8 d。  
A-E: One, two, four, six and eight days after germination, respectively.

图 2 黄豆芽的油体和蛋白质贮存液泡的形态变化  
Fig. 2 The behaviors of oil bodies and protein storage vacuoles during soybean germination in darkness

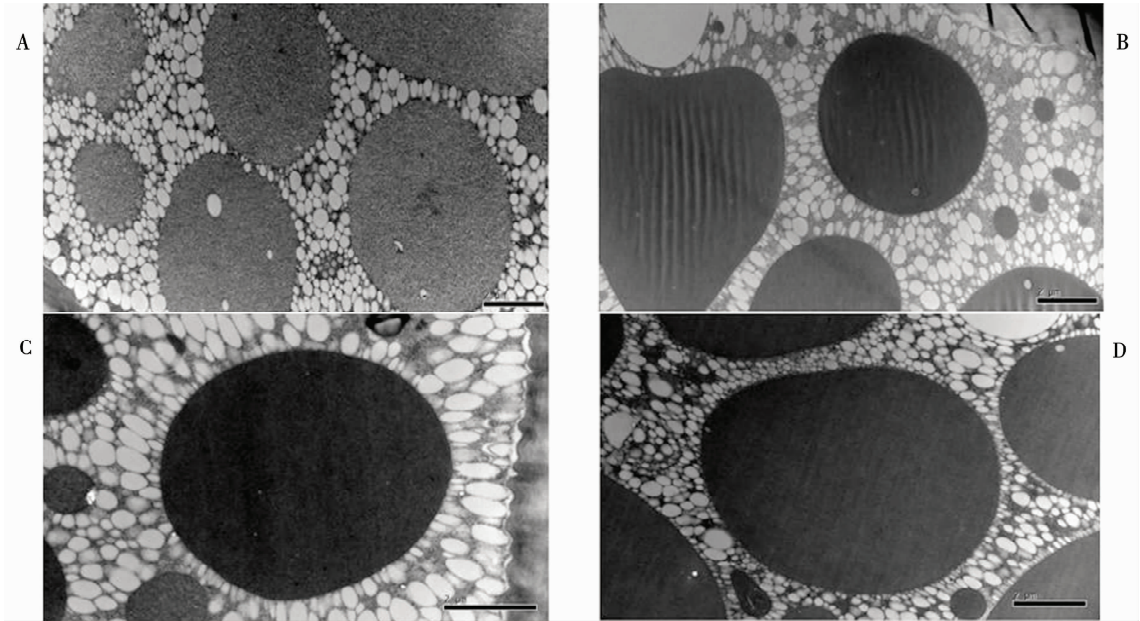
**2.2 发芽过程中油体和蛋白质贮存液泡的关联性**  
在电子显微镜观察的过程中发现:在发芽1~2 d时,跟液泡膜接触的油体一般都很小,而远离液泡的油体一般都比较小。绿豆芽发芽1 d时,油体比较密集,而当发芽2 d时,油体变得稀疏了,并且油体有接触液泡的趋势。这可能意味着油体只有在接触液泡时,才能被有效的消化利用。黄豆芽发芽

1 d时,油体比较密集,而当发芽2 d时,油体依然比较密集,这说明黄豆芽里的脂质消化利用要比绿豆芽慢<sup>[8]</sup>。Chen等<sup>[11]</sup>报道 Gly m Bd 30K (或 P34 probable thiol protease)可能是水解油体蛋白的蛋白酶,而 Kalinski等<sup>[12]</sup>利用免疫学方法确定 Gly m Bd 30K是一种存在于液泡里的蛋白。越来越多的研究表明,油体蛋白的水解是油体消化利用的第一



步<sup>[13]</sup>。因此,液泡膜表面的油体变小可能是由于液泡里的 Gly m Bd 30K 透过液泡膜作用于油体蛋白,

导致油体表面结构破坏,使得甘油三酯暴露,从而有利于后面的消化产生能量。



A:发芽1 d 绿豆芽;B:发芽2 d 绿豆芽;C:发芽1 d 黄豆芽;D:发芽2 d 黄豆芽。

A: Green sprout germinated for one day; B: Green sprout germinated for two days; C: Yellow sprout germinated for one day; D: Yellow sprout germinated for two days.

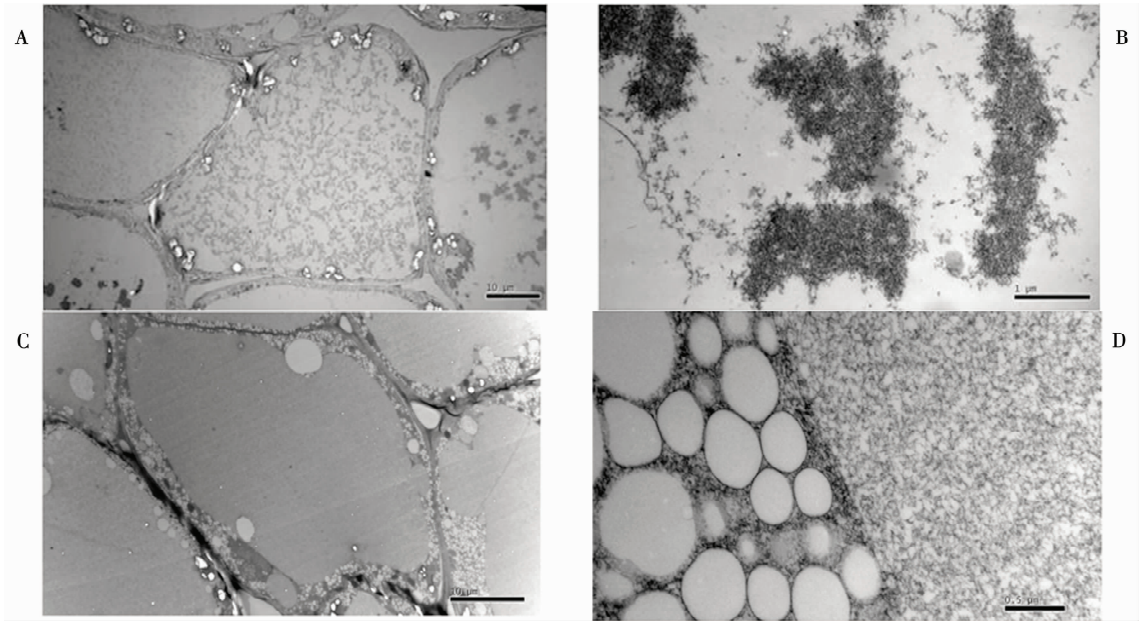
图3 油体与蛋白质贮存液泡的相互关系

Fig.3 The relationship between oil bodies and protein storage vacuoles

2.3 发芽8 d后豆芽的蛋白质贮存液泡

图1显示发芽8 d的绿豆芽的蛋白质贮存液泡显示出了非常不同的形态。通过增加放大倍数,可以发现液泡里的无规则物是蛋白质聚集体(图4),而它们周围的白色部分则说明这个区域(白色部

分)的蛋白已经被消耗掉了,这与豆芽生长发育过程中蛋白质不断发生水解消耗是相符的。另外,可以发现黄豆芽的蛋白质贮存液泡也发生了类似的现象(图4),不过没有绿豆芽明显。这些蛋白发生聚集的机理现在还不是很清楚。



A:放大1 800 倍(绿豆芽);B:放大25 000 倍(绿豆芽);C:放大2 500 倍(黄豆芽);D:放大40 000 倍(黄豆芽)。

A: 1 800 × (green sprout); B: 25 000 × (green sprout); C: 2 500 × (yellow sprout); D: 40 000 × (yellow sprout).

图4 发芽8 d后豆芽的蛋白质贮存液泡

Fig.4 The protein storage vacuoles in soybean sprouts germinated for 8 days



ed. Beijing: Higher Education Press, 2006:241-242. )

[12] 熊庆娥. 植物生理学实验教程[M]. 四川:四川科学技术出版社,2003: 81-83. (Xiong Q E. Plant physiology experiment[M]. Sichuan: Sichuan Science and Technology Press, 2003:81-83. )

[13] 宋健,郭勇,于丽杰,等. 大豆种皮色相关基因研究进展[J]. 遗传,2012, 34(6): 687-694. (Song J, Guo Y, Yu L J, et al. Progress in genes related to seed-coat color in soybean[J]. Hereditas, 2012, 34(6): 687-694. )

[14] Anand S C. Soybean plant introductions with resistance to race 4 or race 5 of soybean cyst nematode[J]. Crop Scicence, 1988, 29: 1181-1184.

[15] 王梓贞,韩英鹏,滕卫丽,等. 大豆胞囊线虫非小种特异性抗性品种的抗性评价与农艺性状相关分析[J]. 大豆科学, 2009, 28(4): 647-650. (Wang Z Z, Han Y P, Teng W L, et al. Multiple SCN races resistance in soybean related to several agronomic traits[J]. Soybean Science,2009, 28(4): 647-650. )

[16] 徐金瑞,张名位,刘兴华,等. 黑大豆种质抗氧化能力及其与总酚和花色苷含量的关系[J]. 中国农业科学,2006, 39(8): 1545-1552. (Xu J R, Zhang M W, Liu X H, et al. Correlation between antioxidation, and content of total phenolics and anthocyanin in black soybean accessions[J]. Sientia Agricultura Sinica, 2006, 39(8): 1545-1552. )

[17] 徐冉,李伟,张礼凤,等. 大豆抗烟粉虱(*Bemisia tabaci Gennadius*)与农艺品质性状的关系[J]. 中国农业科学,2009, 42

(4): 1252-1257. (Xu R, Li W, Zhang F L, et al. Relationship between resistance to whitefly (*Bemisia tabaci Gennadius*) and agronomic and quality traits of soybean[J]. Sientia Agricultura Sinica,2009, 42(4): 1252-1257. )

[18] 胡国玉,李杰坤,黄志平,等. 不同结荚习性夏大豆种质的农艺表现及其与产量的相关分析[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(2): 417-422. (Hu G Y, Li J K, Huang Z P, et al. Agronomic characters and their correlations with yield in summer soybean varieties of different growth habit[J]. Journal of Plant Genetic Resources,2014, 15(2): 417-422. )

[19] 杜志强. 不同结荚习性抗线大豆农艺性状与产量相关研究[J]. 黑龙江农业科学,2014(4): 4-7. (Du Z Q. correlations analysis between agronomic trait and yield of resistant varieties for soybean cyst nematode with different podding habits[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences,2014(4): 4-7. )

[20] 李晨阳,张振山,刘玉兰. <sup>60</sup>Co- $\gamma$  辐照对霉变大豆中粗脂肪特性影响的研究[J]. 食品工业,2014,35(6): 15-19. (Li C Y, Zhang Z S, Liu Y L. effect of <sup>60</sup>Co- $\gamma$  irradiation on the oil properties of mildew soybean[J]. The Food Industry,2014, 35(6): 15-19. )

[21] 田清震,盖钧锰. 大豆起源与进化研究进展[J]. 大豆科学, 2001, 20(1): 54-59. (Tian Q Z, Gai J Y. A review on the research of soybean origination and evolution[J]. Soybean Science, 2001, 20(1): 54-59. )

(上接第 836 页)

3 结 论

通过透射电子显微镜观察发现,绿豆芽里的生理活动要比黄豆芽活跃。绿豆芽中的蛋白质和脂质的水解速度要比黄豆芽快。随着发芽天数的延长,蛋白质贮存液泡渐渐聚合增大形成一个占据细胞大部分空间的大液泡,并且内容物越来越少;油体数目越来越少,并且有少部分油体会发生聚合增大;油体显示出接触液泡的趋势,并且接触液泡的油体显示出更加容易被消化利用的趋势。这可能与液泡里含有水解油体蛋白的酶有关。

参考文献

[1] Herman E M. Immunogold-localization and synthesis of an oil body membrane protein in developing soybean seeds[J]. Planta, 1987, 172:336-345.

[2] He F, Huang F, Wilson K A, et al. Protein storage vacuole acidification as a control of storage protein mobilization in soybeans [J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58:1059-1070.

[3] Tzen J T C, Huang A H C. Surface structure and properties of plant seed oil bodies[J]. The Journal of Cell Biology, 1992, 117: 327-335.

[4] Tzen J T C, Cao Y Z, Laurent P, et al. Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species[J]. Plant Physiology, 1993, 101: 267-276.

[5] Iwanaga D, Gray D A, Fisk I D, et al. Extraction and characterization of oil bodies from soy beans: A natural source of pre-emulsified soybean oil[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,

2007, 55: 8711-8716.

[6] Fisk I D, Gray D A. Soybean (*Glycine max*) oil bodies and their associated phytochemicals[J]. Journal of Food Science, 2011, 76: 1349-1354.

[7] Gallier S, Gordon K C, Singh H. Chemical and structural characterisation of almond oil bodies and bovine milk fat globules[J]. Food Chemistry, 2012, 132: 1996-2006.

[8] Shi H, Nam P K, Ma Y. Comprehensive profiling of isoflavones, phytosterols, tocopherols, minerals, crude protein, lipid, and sugar during soybean (*Glycine max*) germination[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 4970-4976.

[9] 姚占静,郭睿,李宁. 大豆与大豆芽中异黄酮提取工艺研究[J]. 大豆科学,2008,27(2):357-360. (Yao Z J, Guo R, Li N. Research on extraction of isoflavones from soybean and sprouts [J]. Soybean Science, 2008, 27(2): 357-360. )

[10] Krishnan H B. Preparative procedures markedly influence the appearance and structural integrity of protein storage vacuoles in soybean seeds [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56: 2907-2912.

[11] Chen Y, Zhao L, Cao Y, et al. Oleosins (24 and 18 kDa) are hydrolyzed not only in extracted soybean oil bodies but also in soybean germination[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62: 956-965.

[12] Kalinski A, Melroy D L, Dwivedi R S, et al. A soybean vacuolar protein (P34) related to thiol proteases is synthesized as a glycoprotein precursor during seed maturation[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267: 12068-12076.

[13] Matsui K, Hijiya K, Tabuchi Y, et al. Cucumber cotyledon lipoxxygenase during postgerminative growth. Its expression and action on lipid bodies [J]. Plant Physiology, 1999, 119: 1279-1287.