

网络出版时间:2015-01-05 08:59 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.02.031
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150105.0859.031.html

5 种植物油体性质的比较

齐玉红^{a,b},强卫东^{a,b},王清曼^{a,b},邹德毅^{a,b},
卢震^{a,b},郭咏昕^a,官丽莉^a,杜林娜^a,杨晶^a

(吉林农业大学 a 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, b 生命科学学院,吉林 长春 130118)

【摘要】 **【目的】**对 5 种植物油体的大小、结构及稳定性进行考察,为选择优质的植物油体奠定基础。**【方法】**利用 PBS 作为缓冲液,采用梯度离心法,提取水稻、亚麻芥、黄豆、黑豆和红花 5 种植物的油体,对这 5 种油体的外观进行观察;在倒置显微镜(10 倍目镜×40 倍物镜)下对 5 种植物油体的显微结构进行考察;用 Mastersizer 2000 激光粒度仪测定 5 种植物油体的粒径,同时比较于 4 ℃放置 15 d 后 5 种油体的粒径变化情况;通过 SDS-PAGE 电泳明确 5 种植物油体蛋白的分布情况。**【结果】**与其他植物油体相比,红花油体色泽洁白、透亮,分布均匀,粒径呈单一峰型,且峰型平滑。红花油体粒径为 0.4~11.0 μm,多数集中在 1.75~2.05 μm,水稻、亚麻芥、黄豆、黑豆油体粒径分别为 0.5~12.0,0.3~11.0,0.4~13.0,0.4~13.0 μm。在 4 ℃放置 15 d 后,5 种植物油体的粒径增大,油体中均有杂峰出现,峰型不规则。SDS-PAGE 电泳检测结果显示,5 种植物油体相关蛋白主要分布在 20.1~44.3 ku。**【结论】**红花油体较其他植物油体结构规则,分散均匀,应用前景广阔。

【关键词】 油体;显微结构;粒径

【中图分类号】 S565;TS225.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)02-0223-05

Comparison of properties of five plant oil bodies

QI Yu-hong^{a,b}, QIANG Wei-dong^{a,b}, WANG Qing-man^{a,b}, ZOU De-yi^{a,b},
LU Zhen^{a,b}, GUO Yong-xin^a, GUAN Li-li^a, DU Lin-na^a, YANG Jing^a

(a Ministry of Education Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development,

b College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: **【Objective】** This paper studied sizes, structures and stabilities of 5 plant oil bodies to provide reference for selection of good oil bodies. **【Method】** Using PBS buffer, the gradient centrifugation method was adopt to extract 5 plant oil bodies. The oil bodies were investigated and their microstructures were observed using inverted microscope. The particle sizes of different plant oil bodies were determined by laser particle analyzer Mastersizer 2000, and the changes in size after standing for 15 d were compared. The compositions of different plant oil bodies were also detected by SDS electrophoresis. **【Result】** Compared with other oil bodies, color of safflower oil body was pure white, its particle diameter was small, it dispersed uniformly with simple spike, and the particle diameter is 0.4~11.0 μm, mainly in 0.75~2.05 μm. Particle diameters of rice, linen mustard, soybean, black bean oil bodies were 0.5~12.0, 0.3~11.0, 0.4~13.0, and 0.4~13.0 μm, respectively. After standing at 4 ℃ for 15 d, the particle sizes increased and miscellaneous peaks showed up with irregular peak types. Through SDS-PAGE electrophoresis, the correlative proteins of

【收稿日期】 2013-09-23

【基金项目】 国家大学生创新创业训练项目(201310193050, 201410193037); 国家教育部博士点基金-青年教师基金项目(20122223120002); 吉林省教育厅项目(201458); 吉林省中医药管理局项目

【作者简介】 齐玉红(1990—), 女, 甘肃白银人, 主要从事生物制药研究。E-mail: 1345570232@qq.com

【通信作者】 杨晶(1981—), 女, 吉林省吉林市人, 副研究员, 博士, 主要从事植物生物反应器研究。
E-mail: yangjing5122010@163.com

different plant oil bodies were mainly in 20.1—44.3 μm . 【Conclusion】 The structure of safflower oil body was more regular than other plant oil bodies, its dispersion was more evenly and had broad application prospects.

Key words: oil body; microscopic structure; particle diameter

大部分植物种子都将脂类作为主要储藏物质,而这些脂类主要储存在某种亚细胞器颗粒中,分散成许多小的相对稳定的亚细胞微滴,这些亚细胞微滴称为油体(Oil body)或拟脂体(Lipid bodies),也有的称为油质体(Oleosome)^[1-2]。油体由单层的磷脂膜、三酰甘油(TAG)以及表面镶嵌的油体蛋白、钙结合蛋白、固醇结合蛋白组成^[3]。其中储存在油体内部的 TAG 可为种子萌发提供能量^[4]。油体蛋白是油体表面主要的膜蛋白,为碱性疏水蛋白,由 3 部分组成,包括亲脂的 N 端、C 端和中间的疏水区域^[5]。N 端和 C 端镶嵌在油体表面,暴露在细胞质中;中间的疏水区域通过磷脂膜进入到油体内部。因此,油体会产生电阻和静电排斥,使其能够独立存在^[6-8]。在油体悬浮液中,油体作为独立个体存在,可以作为疫苗、食品、化妆品和个人护理产品的乳化剂^[9-14]。

近 20 年来,对于油体的研究趋向多样化。最近的研究热点是采用油体构建的植物生物反应器——油体表达系统^[15]来生产外源蛋白。加拿大 Sembio-sys 公司用植物生物反应器表达了多种药用蛋白,如在红花中表达人胰岛素,且已达到商业化生产水平。由于植物油体在医药、食品、工业等行业有着极其广泛的用途,其开发越来越受到人们的重视。Deckers 等^[10]将提取的植物油体应用于食品、药品以及化妆护肤品中。因此,选择优质的植物油体,对于其开发利用具有重要意义。本试验改进了 Tzen 等^[16]和 Jacks 等^[17]提出的植物油体提取方法,利用 PBS 作为提取缓冲液,从红花、水稻、亚麻芥、黄豆和黑豆 5 种植物中提取油体,通过显微镜和激光粒度仪,观测不同植物油体的结构和大小,并对这 5 种植物的油体进行 SDS-PAGE 电泳检测,确定 5 种植物油体的蛋白分子质量,以期筛选优质的植物油体奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻、亚麻芥、黄豆、黑豆和红花 5 种植物种子由吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程研究中心保存。

试验所用化学试剂购自北京化工试剂公司,蛋白 Marker 和 $5\times$ 上样 buffer 购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 植物油体的提取 采用改进了的 Tzen 等^[16]和 Jacks 等^[17]报道的植物种子油体提取方法——梯度离心法进行。将 5 种植物种子分别浸泡在蒸馏水中(种子与蒸馏水的质量体积比为 1:5),4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜;然后将浸泡好的植物种子置于 300 μL 、pH 7.0 的 PBS 缓冲溶液中,用榨汁搅拌机搅拌 3 min,得到 5 种植物种子的匀浆液,用 3 层滤布过滤除去残渣;滤出液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 g 条件下离心 30 min,收集上层物质;将其重新悬浮于 PBS 缓冲溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 g 离心 10 min,收集上层物质;4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 g 离心 10 min 后,使上层物质重新分散在 PBS 溶液中(pH 7.0),同样条件再离心 3 次,将得到的上层油体置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.2.2 植物油体的显微结构观察 分别称取 5 种植物油体 0.5 g,加入 5 mL PBS (pH 7.0, 10 mmol/L)溶液稀释成质量分数 10% 的油体悬浮液。将其滴在载玻片上,盖好盖玻片,放置在倒置显微镜(10 倍目镜 $\times$ 40 倍物镜)下观察植物油体的分布情况。

1.2.3 植物油体粒径的测定 将 1.2.2 中油体悬浮液稀释 1 000 倍,使其达到相应的遮光度,用 Mastersizer 2000 激光粒度仪于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下测定油体平均粒径 d_{50} ,每个样品平行测定 3 次。

1.2.4 植物油体的稳定性测定 将 1.2.2 中 5 种植物种子的油体悬浮液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 15 d,然后将其稀释 1 000 倍,使其达到相应的遮光度,用 Mastersizer 2000 激光粒度仪于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下测定油体的平均粒径 d_{50} ,每个样品平行测定 3 次。同时,在倒置显微镜下(10 倍目镜 $\times$ 40 倍物镜)镜检,观察 5 种植物油体的聚集情况。

1.2.5 植物油体蛋白的 SDS-PAGE 电泳检测 将 1.2.1 中提取的植物油体 0.01 g 加入 1.5 mL 离心管中,用 50 μL PBS (pH 7.0, 10 mmol/L)缓冲溶液稀释后,取 40 μL 样品加入 10 μL $5\times$ 上样 buffer,混合均匀,沸水中煮 10 min,取出冷却至室温后,

10 000 *g* 离心 5 min,取上清液,每孔加样 10 μ L,进行 12%分离胶的 SDS-PAGE 电泳分离,80 V 电泳 10 min,待样品通过浓缩胶后,电压增至 120 V 直至样品到达胶板最下方,结束电泳;然后考马斯亮蓝 R250 染色 2 h,用脱色液脱色后,观察结果。

2 结果与分析

2.1 5 种植物油体的外观

观察提取的 5 种植物油体外观,结果见图 1。

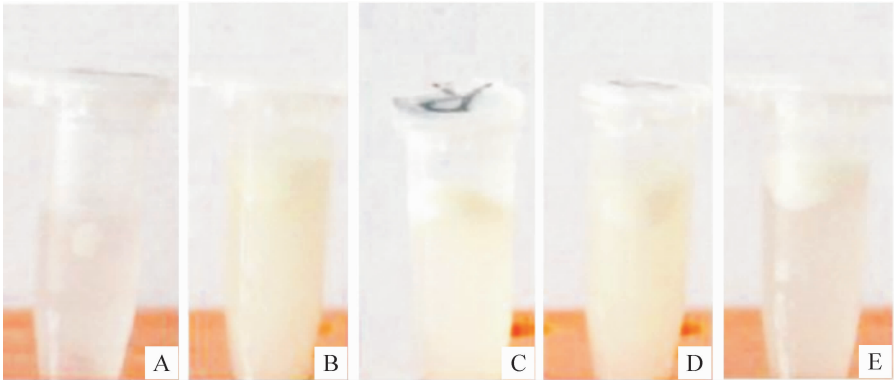


图 1 5 种植物油体的外观

A. 水稻;B. 亚麻芥;C. 黄豆;D. 黑豆; E. 红花

Fig. 1 External observation on five plant oil bodies

A. Rice;B. Linen mustard;C. Soybean;D. Black beans;E. Safflower

图 1 显示,红花油体色泽洁白、透亮,其他植物油体呈白色略带微黄;亚麻芥、红花、黄豆和黑豆种子的油体提取率较高,而水稻中油体提取率较低。

2.2 5 种植物油体的显微结构

在倒置显微镜下观察 5 种植物油体的结构,结果见图 2。

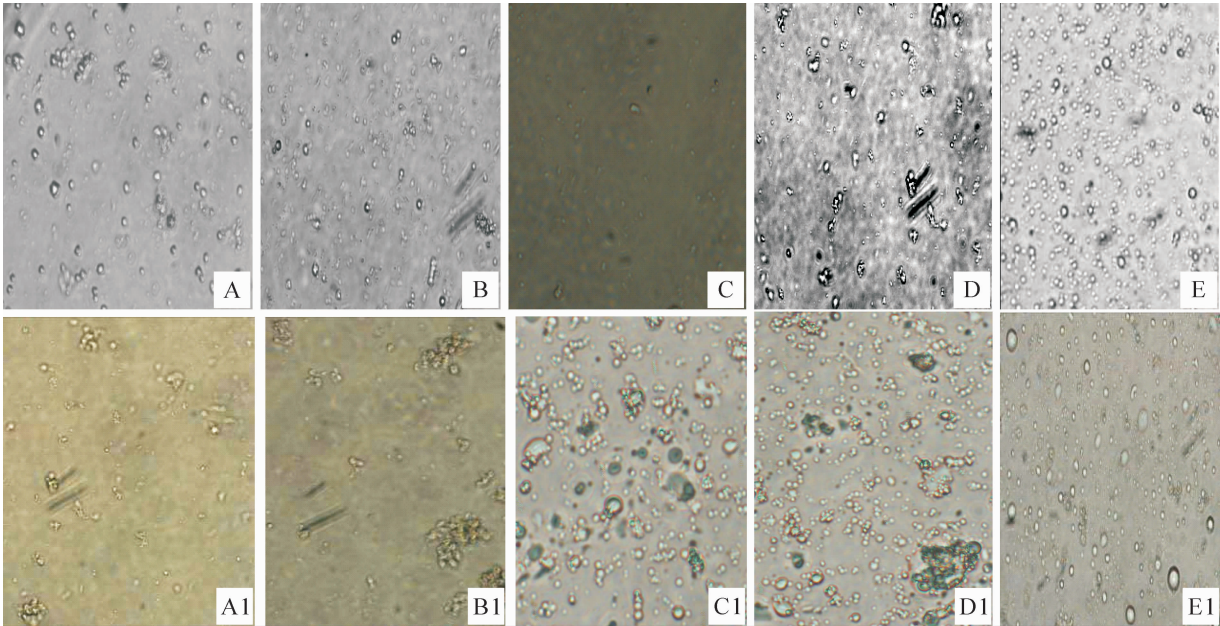


图 2 5 种植物油体的显微结构(400 $\times$)

A~E. 刚提取的植物油体;A1~E1. 4 $^{\circ}$ C 放置 15 d 的植物油体;A、A1. 水稻;B、B1. 亚麻芥;C、C1. 黄豆;D、D1. 黑豆;E、E1. 红花

Fig. 2 Microstructures of 5 plant oil bodies (400 $\times$)

A—E. Oil bodies; A1—E1. Oil bodies standing at 4 $^{\circ}$ C for 15 days; A, A1. Rice; B, B1. Linen mustard;

C, C1. Soybean; D, D1. Black beans; E, E1. Safflower

图 2-A~E 显示,红花油体分散较为均匀,油体形状更为完整、规则;亚麻芥油体较小,分散也比较

均匀;5 种植物油体在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中放置 15 d 后(图 2-A1~E1),5 种植物油体均发生聚集,大小不均一。

2.3 5种植物油体的粒径

由图 3 可见,5 种植物油体的粒径差距较大,水稻油体分布不是很均匀,检测粒径的峰型出现波动,粒径为0.5~12.0 μm,多数集中在 6.01~6.95 μm;亚麻芥油体的粒径为 0.3~11.0 μm,多数集中在 1.75~2.25 μm;黄豆和黑豆油体的粒径均为 0.4~

13.0 μm;红花油体粒径为 0.4~11.0 μm,多数集中在 1.75~2.05 μm,呈单一峰型,且峰型平滑。5 种植物油体在 4 ℃冰箱中放置 15 d 后,其油滴之间发生聚集,粒径增大;5 种植物油体均有杂峰出现,且峰型不规则。

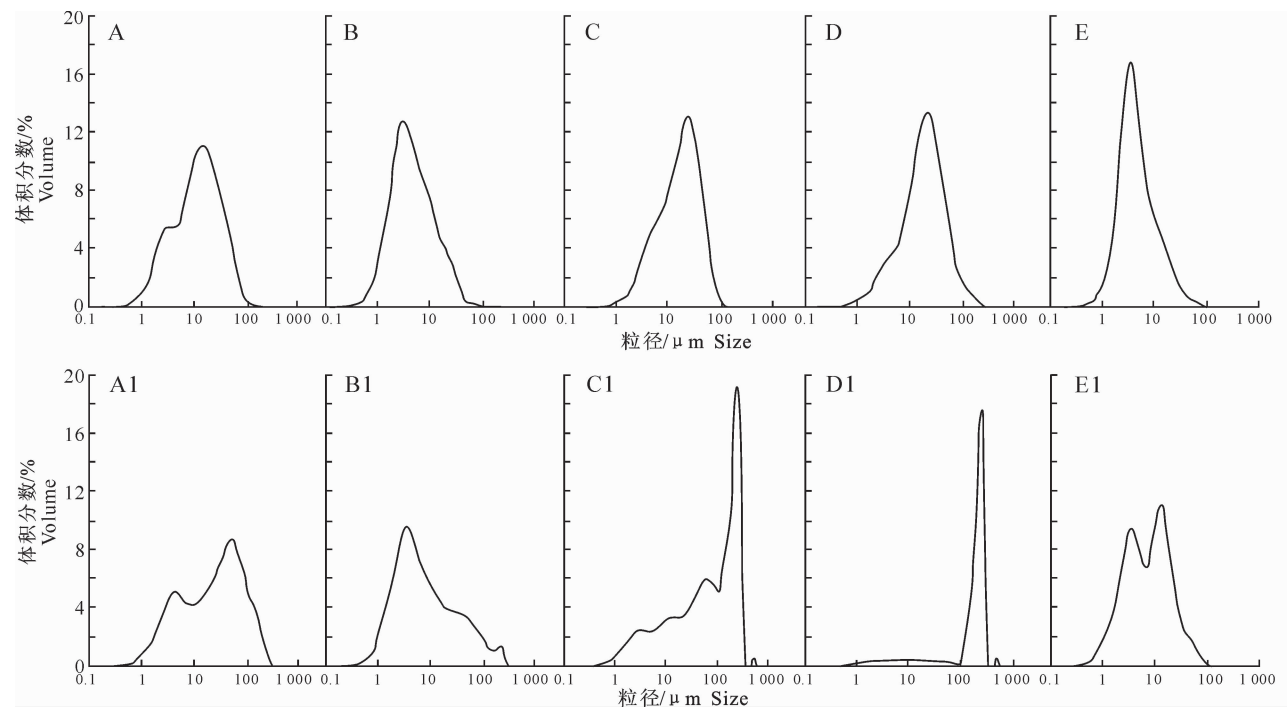


图 3 5种植物油体的粒径分布

A—E. 刚提取的植物油体;A1—E1. 4 ℃放置 15 d 的植物油体;A、A1. 水稻;B、B1. 亚麻芥;C、C1. 黄豆;D、D1. 黑豆;E、E1. 红花

Fig. 3 Size distribution of 5 plant oil bodies

A—E. Oil bodies;A1—E1. Oil bodies standing at 4 ℃ for 15 days;A、A1. Rice;B、B1. Linen mustard;

C、C1. Soybean;D、D1. Black beans;E、E1. Safflower

2.4 5种植物油体的 SDS-PAGE 检测

5 种植物油体蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析结果见图 4。

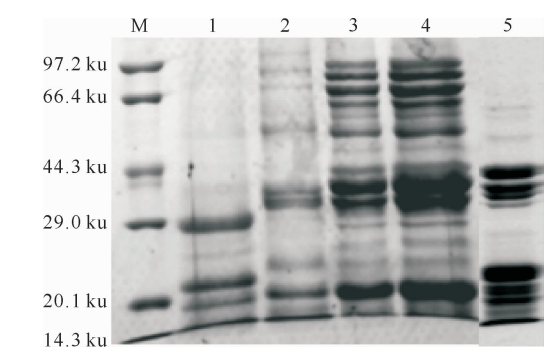


图 4 5种植物油体蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

M. 蛋白 Marker;1. 水稻;2. 亚麻芥;3. 黄豆;4. 黑豆;5. 红花

Fig. 4 SDS-PAGE electrophoresis of 5 plant oil bodies

M. Protein Marker;1. Rice;2. Linen mustard;

3. Soybean;4. Black beans;5. Safflower

从图 4 可以看出,5 种植物油体的相关蛋白组成均不相同,其中水稻油体中蛋白分子质量为 20.1~29.0 ku;亚麻芥油体中蛋白分子质量为 20.1~35.0 ku;黄豆和黑豆油体中相关蛋白较多,其分子质量为 20.1~97.0 ku;红花油体中的蛋白分子质量主要集中在 20.1~44.3 ku。

3 讨论

油体是生物体内最小的细胞器,主要以颗粒状的形式存在于植物种子中,主要功能是储藏脂类,为种子萌发和幼苗生长提供碳源和能源^[18]。近年来,植物油体得到越来越多的关注,目前研究较多的植物油体如大豆、油菜、亚麻芥等,已经被开发成油体乳液,应用在个人护理产品中^[19-21]。据文献报道,利用高碱性物质提取大豆油体,可以得到纯净的、杂蛋

白少的油体,但是在一定程度上会改变油体成分^[22]。因此,本研究选用 PBS 法提取油体,比较了 5 种植物油体的结构及粒径,考察了 5 种植物油体的稳定性和油体蛋白的分子质量。本研究结果显示,与其他植物油体相比,红花油体色泽洁白,油体规则,分散均匀,说明红花油体更适用于油体产品的开发;5 种植物油体在 4℃ 冰箱中放置 15 d 后,其油滴之间均发生聚集,粒径增大,这可能是由于油体表面蛋白被中和的负电荷越多,油体表面所带电荷量越少,油体中油滴之间的静电斥力也越小,因此油滴和油滴之间发生聚集现象,从而造成油体平均粒径的增大。当植物油体脱离种子独立存在时,容易发生聚集,造成植物油体体外的不稳定表现。因此,本研究还将继续探索油体的最佳稳定剂和保存条件,使其在一定的环境条件下能够稳定存在。

[参考文献]

- [1] Huang A H C. Oil bodies and oleosins in seeds [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1992, 43:177-200.
- [2] 仇健,谭晓凤. 植物种子油体及相关蛋白研究综述 [J]. 中南林业学院学报, 2005, 25(4): 96-100.
- Qiu J, Tan X F. A research summary of oil bodies and protein-associated oil bodies in plant seeds [J]. Journal of Central South Forestry University, 2005, 25(4): 96-100. (in Chinese)
- [3] Tzen J T C, Lie G C, Huang A H C. Characterization of the charged components and their topology on the surface of plant seed oil bodies [J]. J Biol Chem, 1992, 267: 15626-15634.
- [4] Capuano F, Beaudoin F, Napier J A, et al. Properties and exploitation of oleosins [J]. Biotechnol Adv, 2007, 25: 203-206.
- [5] Adams G G, Imran S, Wang S, et al. Extraction, isolation and characterization of oil bodies from pumpkin seeds for therapeutic use [J]. Food Chemistry, 2012, 134: 1919-1925.
- [6] Ling H. Oleosin fusion expression systems for the production of recombinant proteins [J]. Biol Brat, 2007, 62: 119-123.
- [7] Tzen J T C, Lai Y K, Chan K L, et al. Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in the oil bodies of diverse seed species [J]. Plant Physiol, 1990, 94: 1282-1289.
- [8] Tai S S K, Chen M C M, Peng C C, et al. Gene family of oleosin isoforms in sesame seed oil bodies and their structural stabilization to reconstituted oil bodies [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, 66: 2146-2153.
- [9] Roberts N, Scott R, Tzen J. Recent biotechnological applications using oleosins [J]. Open Biotech J, 2008, 2: 13-21.
- [10] Deckers H M, Van Rooijen G, Boothe J, et al. Oil body based

- personal care products; United States, US 6183762B1 [P]. 2001-02-06.
- [11] Chiang C J, Chen H C, Kuo H F, et al. A simple and effective method to prepare immobilized enzymes using artificial oil bodies [J]. Enzyme Microb Tech, 2006, 39: 1152-1158.
- [12] Chiang C J, Chen H C, Chao Y P, et al. One-step purification of insoluble hydantoinase overproduced in *Escherichia coli* [J]. Protein Expr Purif, 2007, 52: 14-18.
- [13] Payne G, Lad M, Foster T, et al. Composition and properties of the surface of oil bodies recovered from *Echium plantagin-eum* [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 116: 88-92.
- [14] Bhatla S C, Vandana S, Kaushik V. Recent developments in the localization of oil body associated signalling molecules during lipolysis in oilseeds [J]. Plant Signal Behav, 2009, 4: 176-182.
- [15] 赵传志, 卢金, 东苏磊. 以油体作为生物反应器的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2008(2): 75-79.
- Zhao C Z, Lu J, Dong S L. The research progress of oil body as bioreactor [J]. Biotechnology Bulletin, 2008(2): 75-79. (in Chinese)
- [16] Tzen J T C, Peng C C, Cheng D J, et al. A new method for seed oil body purification and examination of oil body integrity following germination [J]. Journal of Biochemistry, 1997, 121(4): 762-768.
- [17] Jacks T J, Hensarling T P, Neucere J N, et al. Isolation and physicochemical characterization of the half-unit membranes of oilseed lipid bodies [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1990, 67(6): 353-361.
- [18] Shimada T L, Hara-Nishimura I. Oil-body-membrane proteins and their physiological functions in plants [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2010, 33(3): 360-363.
- [19] Bai F W, Yan W, Zhang S J, et al. Immobilized lipase of reconstructed oil bodies and its potential application in biodiesel production [J]. Fuel, 2014, 128: 340-346.
- [20] Carlsson A S, Zhu L H, Andersson M, et al. Platform crops amenable to genetic engineering: A requirement for successful production of bio-industrial oils through [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2014, 3: 58-64.
- [21] Nikiforidis C V, Scholten E. High internal phase emulsion gels (HIPE-gels) created through assembly of natural oil bodies [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 5: 1-7.
- [22] 曹艳芸, 陈业明, 华欲飞. 高碱性提取的大豆油体的成分变化研究 [J]. 中国粮油学报, 2014, 29(3): 37-41.
- Cao Y Y, Chen Y M, Hua Y F. Composition changes of soybean seed oil body by high alkaline extraction [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2014, 29(3): 37-41. (in Chinese)