

刘金香,姚正颖,张卫明,等. 2 个产地续随子种子油体提取及其脂肪酸成分的比较分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):256-258.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.084

2 个产地续随子种子油体提取及其脂肪酸成分的比较分析

刘金香¹,姚正颖²,张卫明^{1,2},孙力军²

(1. 南京师范大学生命科学学院,江苏南京 210023; 2. 南京野生植物综合利用研究院,江苏南京 210042)

摘要:油体是植物种子贮脂的细胞器,通过分离油体来提取脂类为研究植物脂类提供了方便快捷的方法。首次建立了能源植物续随子种子油体的提取方法,提取了江苏海安和河南朱集 2 个产地的续随子种子油体,并通过气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术,分别测定油体脂肪酸的组成与含量。结果表明,2 个产地的续随子种子油体脂肪酸都以油酸为主,含量分别为 83.32%、73.99%,其中含量较多的脂肪酸还有棕榈酸、亚油酸、硬脂酸等;2 种种子中的脂肪酸以油酸(82.04%、75.63%)和棕榈酸(6.00%、11.75%)为主,相对含量差异显著,且油酸含量与棕榈酸含量呈负相关,即油酸含量高的种子的棕榈酸含量较低。

关键词:能源植物;油体;提取;气相色谱-质谱联用技术;脂肪酸

中图分类号:S216.2;TQ646 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)03-0256-03

油体是植物种子贮脂的细胞器,化学组分含量因植物种类而异,且与植物生长的环境和营养条件有关,一般为直径 0.5~2.0 μm 的弹性球体或椭球体^[1-3]。油体的主要成分为中性脂(主要为三酰甘油,简称为 TAG)、油体蛋白和磷脂(PL),其内部为疏水的液态 TAG 核心,外层是由磷脂单分子层及镶嵌的油体蛋白形成的半单位膜,油体表面具有亲水特性^[4]。磷脂和蛋白通过空间位阻和静电排斥作用赋予油体显著的物化稳定性(抗机械搅拌、抗冻融、抗氧化等),从而阻止油体相互融合,这一特性使得油体可用离心的方法分离纯化^[5-6]。大戟科植物续随子(*Euphorbia lathyris*)是一种优良能源植物,其种子油脂肪酸成分以 C_{16} 、 C_{18} 脂肪酸为主,且油酸(只含 1 个不饱和双键)含量高达 83%^[7],与理想柴油替代品的分子组成类似。有研究表明,理想的生物柴油替代品结构特点是单不饱和脂肪酸含量高、多不饱和脂肪酸含量低、饱和脂肪酸含量适中^[8],其分子式可表示为 $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_2$ 。通过离心分离续随子种子油体,从而提取脂肪酸,再通过甲酯化制备生物柴油,可降低生物柴油制备成本。然而到目前为止,还无有关续随子油体的报道。本研究提取续随子种子油体,并通过气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术,分析了江苏海安和河南朱集 2 个产地的续随子种子油体脂肪酸的成分与含量,为续随子种子油体及脂肪酸研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

收稿日期:2014-11-10

基金项目:国家自然科学基金(编号:31100224);江苏省自然科学基金(编号:BK2011131)。

作者简介:刘金香(1987—),女,硕士研究生,主要从事植物生理与资源利用研究。

通信作者:孙力军,博士。E-mail:shengwudiqu@126.com。

1.1.1 材料 将分别来源于江苏海安和河南朱集 2 个产地的续随子种子,于 2013 年 10 月种植于南京野生植物综合利用研究院试验田中,按相同的方法进行栽培管理,翌年 7 月成熟后收获,收获的种子即为本研究所用种子,简称为海安种子、朱集种子。

1.1.2 主要仪器 7820A 气相串联 5975 质谱检测器,安捷伦科技有限公司;Hitachi 20PR-52D 高速冷冻离心机,日本日立工机株式会社。

1.2 方法

1.2.1 油体的提取 参考 Katavic 等的方法^[9]并作适当改动。分别取 5 g 朱集种子和海安种子,在 20 mL GMI(1 mmol/L EDTA、10 mmol/L KCl、1 mmol/L MgCl_2 、2 mmol/L DTT(双对氯苯基三氯乙烷)、0.6 mol/L 蔗糖、0.15 mol/L Tricine-KOH, pH 值 7.5)中研磨成匀浆,3 层纱布过滤,再加 20 mL FMI(除蔗糖由 0.6 mol/L 换成 0.4 mol/L 外,其他成分与 GMI 相同)后,12 000 g 离心 20 min,上层即为粗油体层;取上层油层重悬于 20 mL GMI,再加 15 mL 正己烷,12 000 g 离心 20 min;取上层油层重悬于 20 mL 的 GMI 中,再加 15 mL FMI,12 000 g 离心 20 min;最终油体层悬浮于 5 mL GMI 中(GMI 和 FMI 均于 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷)。

1.2.2 油体极性脂与中性脂的分离与提取 参考 Katavic 等的方法^[9]并作适当改动。向分离得到的油体中加入等体积的石油醚,涡旋振荡,12 000 g 离心 10 min;收集上层富含中性脂(即 TAG)的石油醚相,重复上述石油醚萃取过程 3 次,将每次收集的上层混合,氮气吹干。剩余部分与 1.5 倍体积的三氯甲烷-甲醇(体积比 2:1)混合,振荡,收集下层三氯甲烷相,用 1 mL 甲醇-水(体积比 1:1)清洗 2 次,氮气吹干,即得到极性脂(即 PL)。将收集的油成分进行 GC-MS 分析。

1.2.3 脂肪酸成分的测定与分析

1.2.3.1 脂肪酸甲酯化 采用硫酸-甲醇法,对提取的油体进行脂肪酸甲酯化,其过程如下:10 μL 样品与 10 μL (即

6 μg 的十七烷酸($\text{C}_{17:0}$)混合作为内标,移入带塞玻璃试管中,在试管中加入 1.5 mL 硫酸甲醇溶液(5% 硫酸 + 95% 甲醇),充氮气后密封;将试管在 85 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 1 h,冷却,加入 1.5 mL 正己烷和 1 mL 水终止甲基化反应,振荡后于 2 500 r/min 离心 10 min,收集上清液,氮气吹干后加入 20 mL 正己烷,取 2 μL 样进行 GC-MS 分析。将种子研磨后,采用上述方法,对种子直接甲酯化,并进行 GC-MS 分析。

1.2.3.2 GC-MS 检测条件 (1)气相色谱条件。Agilent HP-5MS (30 m \times 250 μm \times 0.25 μm)毛细管色谱柱,程序升温,初始柱温 120 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min,以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温到 260 $^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min;载气为 99.999% 氦气,流速 1 mL/min,进样口温度 230 $^{\circ}\text{C}$,接口温度 230 $^{\circ}\text{C}$;进样量为 2 μL ,分流比 30 : 1。(2)质谱条件。EI 离子源,离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$,MS 四极杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$,扫描范围 50 ~ 550 amu,溶剂延迟 3.0 min。检索标准谱库 NIST11.L,利用峰面积归一法计算各组相对含量。

2 结果与分析

2.1 种子油体的提取

由图 1 可知,收获的海安种子、朱集种子外观基本一致,千粒质量分别为 41.394、44.102 g,二者差异不显著($P < 0.05$)。种子中的磷脂和蛋白由于空间位阻和静电排斥作用,赋予了油体稳定性,主要体现在油体的互不相溶性,这使得油体可以用离心的方法分离。在提取油体过程中,海安种子的研磨液颜色较朱集种子的研磨液黄,而最终提取的 2 种种子油体颜色均为乳白色,这是油体乳化的结果。可见,提取时的研磨过程并没有破坏油体的结构,即在提取过程中,油体保持了表面亲水、内部疏水的基本特征,同时也显示了油体显著的稳定性,这与其他植物种子油体的性质相同^[3,10]。

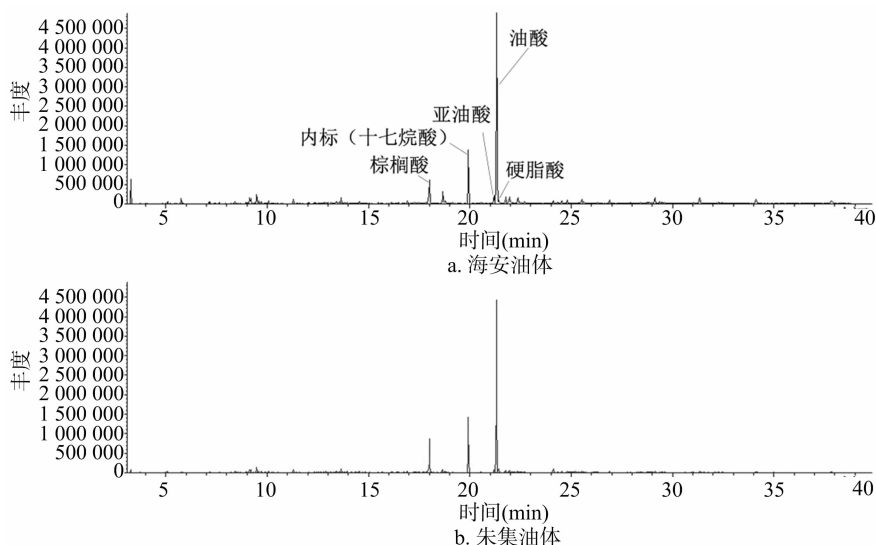


图2 海安种子和朱集种子的油体脂肪酸总离子流图示

在提取油体过程中,加入正己烷是为了去除结构不完整的油体,因此得到的正己烷相含有油体破碎时产生的脂肪酸。GC-MS 分析结果(表 1)显示,正己烷相中的脂肪酸同样是油酸占绝大部分(海安种子为 67.72%,朱集种子为 77.82%),其次是棕榈酸(海安种子为 26.07%,朱集种子为 16.09%),还有少量的亚油酸和硬脂酸。综上所述,2 种种子

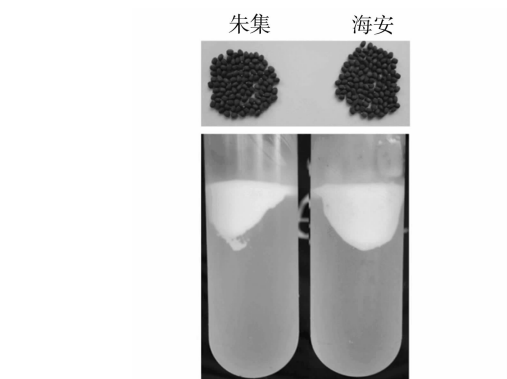


图1 种子形态及油体在离心管中的状态

2.2 种子和油体的脂肪酸组成分析

海安种子、朱集种子经 GC-MS 分析后共检测出 7 种主要脂肪酸,其中饱和脂肪酸有 4 种,包括月桂酸、棕榈酸、硬脂酸和二十四烷酸;不饱和脂肪酸有 3 种,包括亚油酸、油酸和二十碳烯酸。种子油体经 GC-MS 分析后共检测出 4 种主要脂肪酸,即油酸、亚油酸、棕榈酸和硬脂酸,脂肪酸总离子流图见图 2。从表 1 可知,在所检测到的油体脂肪酸中油酸含量最高,海安种子、朱集种子油体中的油酸含量分别为 83.32%、73.99%,且差异显著($P < 0.05$);其次是棕榈酸,海安种子的含量(10.56%)显著低于朱集种子(15.97%)。2 种种子油体中的亚油酸和硬脂酸含量基本相同,且差异不显著。上述 4 种脂肪酸在 2 种种子中的含量分布情况与油体种子中的相对含量情况基本相似,均以油酸含量最高,其中海安种子的油酸含量为 82.04%,显著高于朱集种子的 75.63%。海安种子、朱集种子中棕榈酸的含量在分别为 6.00%、11.75%,差异显著($P < 0.05$)。

和油体中的脂肪酸以油酸和棕榈酸为主,且相对含量差异显著。种子脂肪酸中的油酸含量与棕榈酸含量呈现负相关关系,即油酸含量高的种子(海安种子的 82.04% > 朱集种子的 75.63%),则棕榈酸含量较低(海安种子的 6.00% < 朱集种子的 11.75%),这为能源植物续随子的高油育种研究提供了新视角。油体中 4 种脂肪酸的组成比例与种子中的情况类

表 1 种子、油体和正己烷相中主要脂肪酸的相对含量

脂肪酸	油体中的含量(%)		正己烷相中的含量(%)		种子中的含量(%)	
	海安	朱集	海安	朱集	海安	朱集
月桂酸	—	—	—	—	3.59 ± 0.11a	3.94 ± 0.21a
棕榈酸	10.56 ± 0.38b	15.97 ± 0.29a	26.07 ± 0.03a	16.09 ± 0.19b	6.00 ± 0.25b	11.75 ± 0.19a
亚油酸	3.09 ± 0.20a	3.19 ± 0.14a	2.41 ± 0.12a	2.53 ± 0.06a	3.14 ± 0.09a	3.03 ± 0.38a
油酸	83.32 ± 0.08a	73.99 ± 0.29b	67.72 ± 0.12b	77.82 ± 0.29a	82.04 ± 0.29a	75.63 ± 0.22b
硬脂酸	3.03 ± 0.09a	2.85 ± 0.17a	3.80 ± 0.16a	3.56 ± 0.13a	2.29 ± 0.09	2.42 ± 0.19a
二十碳烯酸	—	—	—	—	—	—
二十四烷酸	—	—	—	—	2.94 ± 0.20a	3.23 ± 0.09a

注: $n=3$ 。同行种子、油体和正己烷相中的 2 个产地的数据后标有不同字母者表示差异显著($P<0.05$);标有相同字母者表示差异不显著($P>0.05$)。

似,这可能是因为种子中的脂肪酸大部分储存在油体中。另外,在种子中检测到了二十四烷酸,而油体和正己烷相中均未检出,这可能是由于在油体的提取过程中,二十四烷酸并没有被富集在油体提取液中。

2.3 油体极性脂与中性脂的脂肪酸组成分析

将油体中的极性脂和中性脂分离后,分别进行 GC-MS 检测,分析其脂肪酸组成,结果见表 2。由表 2 可知,油体极性脂和中性脂的主要脂肪酸均以十八碳烯酸(油酸,含 1 个不饱和双键)为主,其次是十六烷酸。值得注意的是,在种子来源不同(海安种子和朱集种子)的中性脂中,主要的脂肪酸相对含量相似;而在极性脂中,主要的脂肪酸相对含量有较大差异,尤其是十八碳烯酸(海安种子 65.64% 和朱集种子

72.57%)和十六烷酸(海安种子 21.02% 和朱集种子 13.37%)。这种十八碳烯酸与十六烷酸呈负相关的脂肪酸组成形式与油体中脂肪酸组成形式是一致的。在油体形成过程中,内质网中的磷脂酰胆碱(一种极性脂)能被用于细胞膜脂和 TAG(中性脂)的合成,可见极性脂与中性脂之间存在转化关系^[9]。十八碳烯酸与生物柴油的理想分子相近^[8],因此在续随子的定向育种中可以考虑十八碳烯酸与十六烷酸的负相关关系,即提高十八碳烯酸含量,降低十六烷酸含量。在油体的结构组成中,中性脂(TAG)占据了绝大部分空间,而极性脂(磷脂)只存在于油体的表面,因此中性脂含量比极性脂含量多很多;另外,在中性脂中还检测到了二十碳烯酸,而极性脂中检测到了十二碳烷酸。

表 2 油体中的极性脂和中性脂中主要脂肪酸的相对含量

碳原子数:双键数	中性脂的脂肪酸组成(%)		极性脂的脂肪酸组成(%)	
	海安	朱集	海安	朱集
12:0	—	—	4.82 ± 0.21	5.16 ± 0.17
16:0	7.77 ± 0.19	8.22 ± 0.23	21.02 ± 0.19	13.37 ± 0.36
18:2	2.87 ± 0.21	2.93 ± 0.18	3.98 ± 0.20	4.13 ± 0.23
18:1	85.62 ± 0.27	84.93 ± 0.35	65.64 ± 0.31	72.57 ± 0.13
18:0	2.05 ± 0.05	2.16 ± 0.17	4.54 ± 0.12	4.77 ± 0.22
20:1	1.70 ± 0.11	1.76 ± 0.08	—	—

注: $n=3$ 。

3 结论

本研究建立了能源植物续随子种子油体的提取方法,提取了来源于江苏海安和河南朱集 2 个产地的续随子种子油体。结果显示,海安种子和朱集种子油体的脂肪酸以油酸(83.32% 和 73.99%)和棕榈酸(10.56% 和 15.97%)为主;种子中的脂肪酸以油酸(82.04% 和 75.63%)和棕榈酸(6.00% 和 11.75%)为主,且油酸含量与棕榈酸含量呈负相关。

参考文献:

[1]Chen B C,McClements D J,Gray D A. Physical and oxidative stability of pre-emulsified oil bodies extracted from soybeans[J]. Food Chemistry,2012,132(3):1514-1520.

[2]Huang A H C. Oil bodies and oleosins in seeds[J]. Annual Review of Plant Biology,1992,43:177-200.

[3]Nikiforidis C V,Kiosseoglou V,Scholten E. Oil bodies:an insight on their microstructure-maize germ vs sunflower seed[J]. Food Research International,2013,52(1):136-141.

[4]Jolivet P,Acevedo F,Boulard C A,et al. Crop seed oil bodies:from challenges in protein identification to an emerging picture of the oil

body proteome[J]. Proteomics,2013,13(12/13):1836-1849.

[5]Tzen J T,Huang A H. Surface-structure and properties of plant seed oil bodies[J]. Journal of Cell Biology,1992,117(2):327-335.

[6]Payne G,Lad M,Foster T,et al. Composition and properties of the surface of oil bodies recovered from *Echium plantagineum* [J]. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces,2014,116(116):88-92.

[7]危文亮,金梦阳,马冲,等. 续随子油脂脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂,2007,32(5):70-71.

[8]Wang R,Hanna M A,Zhou W W,et al. Production and selected fuel properties of biodiesel from promising non-edible oils: *Euphorbia lathyris* L., *Sapium sebiferum* L. and *Jatropha curcas* L.[J]. Biore-source Technology,2011,102(2):1194-1199.

[9]Katavic V,Agrawal G K,Hajduch M,et al. Protein and lipid composition analysis of oil bodies from two *Brassica napus* cultivars[J]. Proteomics,2006,6(16):4586-4598.

[10]David A,Yadav S,Bhatla S C. Plant oil bodies and oleosins:structure,function and biotechnological applications[M]//Bernd H A. Bionanotechnology:biological self-assembly and its applications. Norfolk,England;2013:187.