

芝麻素在芝麻种子亚细胞结构中的分布

朱金蒙, 陈业明, 孔祥珍, 华欲飞

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:芝麻素等木脂素是芝麻种子中一种重要的天然抗氧化剂,具有多种生理活性功能。阐明芝麻素在芝麻种子亚细胞结构中的分布,对于芝麻深加工,尤其是芝麻素的提取和利用具有重要意义。芝麻素为脂溶性成分,故以芝麻脂质主要存在状态——油体作为主要研究对象。结果表明:芝麻中约95%的芝麻素和约95%的脂质分布在油体中,而其余部分则分布在内质网等膜结构中,显示了芝麻素和脂质之间有极规律的量化关系;碱洗对油体的芝麻素含量影响不大,而尿素则可一定程度溶出油体中的芝麻素;高速剪切可破坏油体微结构,导致芝麻素释放,而石磨制浆可极大程度保护油体微结构。

关键词:芝麻素;油体;亚细胞结构;内质网;碱洗;石磨

中图分类号:TS201.2;TS222 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2021)08-0020-05

Distribution of sesamin in the subcellular structure of sesame seeds

ZHU Jinmeng, CHEN Yeming, KONG Xiangzhen, HUA Yufei

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Sesamin and other lignans are very important natural antioxidants in sesame seeds, which have many physiological functions. Clarification of the distribution of sesamin in the subcellular structure of sesame seeds is of great importance for the deep processing of sesame, especially for the extraction and utilization of sesamin. As sesamin is a fat soluble component, the oil body, the main existing state of sesame lipid, was taken as the main research object. The results showed that approximately 95% of sesamin and 95% of lipid were distributed in the oil body, while the rest were distributed in the endoplasmic reticulum and other membrane structures, which showed a very regular quantitative relationship between sesamin and lipid. Alkali washing had little effect on sesamin content in oil body, whereas urea could dissolve sesamin to some extent. High speed shear could destroy the microstructure of oil body, resulting in the release of sesamin. However, stone mill could protect the microstructure of oil body.

Key words: sesamin; oil body; subcellular structure; endoplasmic reticulum; alkali washing; stone mill

芝麻(*Sesame indicum* L.)是一种重要的油料作物,种植历史悠久。芝麻营养丰富,其脂质含量为50%~55%,其中85%左右为不饱和脂肪酸,油酸

和亚油酸总量高达80%^[1]。芝麻蛋白质含量为20%~25%,富含蛋氨酸和色氨酸。除了脂质和蛋白质,芝麻还含有一种活性很高的天然抗氧化成分——芝麻木脂素,其在芝麻中的含量为1%左右。通过压榨法和水代法所得芝麻油中含有丰富的芝麻木脂素等抗氧化成分,使芝麻油相较于大豆油等植物油不易氧化酸败^[2]。芝麻木脂素主要是脂溶性的芝麻素(0.2%~0.5%)、芝麻林素(0.1%~0.3%)和芝麻酚(微量)等,还有少量水溶性的芝麻素酚三糖苷等,具有抗衰老^[3]、保肝护肝^[4]、降低胆固醇^[3]、降血压^[5]、降血脂^[6]、抗癌^[7]等功能。

收稿日期:2020-08-29;修回日期:2021-04-18

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助(JUSRP52025B)

作者简介:朱金蒙(1995),女,在读硕士,研究方向为油脂与植物蛋白(E-mail)1078588961@qq.com。

通信作者:陈业明,副教授,博士(E-mail)chenyeming@jiangnan.edu.cn。

芝麻种子中的脂质和蛋白质,分别储存在油体和蛋白质贮藏液泡两种细胞器中。油体是一种天然形成的乳化油滴粒子,其内部主要为甘油三酯,约占油体质量的97.5%;而油体表面是一层由极性脂(主要为磷脂)和油体蛋白组成的生物膜,分别占油体质量的1.0%和1.5%^[8]。油体作为芝麻种子储存脂质的亚细胞结构,在制取芝麻油的过程中膜结构被破坏从而使脂质释放。在芝麻油释放的过程中,芝麻素作为一种脂溶性木脂素,在芝麻油中被大量富集。但是,芝麻素是否只存在于油体中还没有明确的实验证据。因为结合芝麻素脂溶性的化学性质,芝麻素也有可能存在于一些其他的膜结构中,如蛋白质贮藏液泡膜、细胞膜、内质网、高尔基体和细胞核膜。由于油体在芝麻种子细胞中的大量存在,并且相较于其他膜结构容易被提取,因此本研究将以其为主要对象,考察芝麻素在油体中的分布和含量,再进一步计算得到芝麻素在其他膜结构的分布和含量。本研究对于芝麻深加工,尤其是芝麻素等成分的提取和利用意义重大。

1 材料与方法

1.1 实验材料

生芝麻,市售。蔗糖、盐酸、三氯甲烷、无水甲醇、无水硫酸钠、石油醚、尿素、碳酸钠、氢氧化钠、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、三氟乙酸(TFA)、三氯乙酸均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司;N-三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)、二硫苏糖醇(DTT)、丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、溴酚蓝均为分析纯,芝麻素标准品(纯度 $\geq 99.9\%$),购于美国Sigma公司;甲醇为色谱纯,购于百灵威科技有限公司。

九阳JYL-Y5打浆机;PHS-3C型pH计;HimacCR-21G型离心机,日本Hitachi公司;BE-210G电泳仪,日本Bio-Craft株式会社;Chemi Doc XRS+凝胶成像仪,美国Bio-Rad公司;Agilent 1100型高效液相色谱仪,美国Agilent公司。

1.2 实验方法

1.2.1 芝麻浆液的制备

将生芝麻在4℃下使用去离子水浸泡16h,手工脱皮,得到脱皮芝麻。向脱皮芝麻中按质量比1:9加入去离子水,用打浆机于18000 r/min打浆3min,4层纱布过滤得到芝麻浆液。芝麻浆液于3000g离心15min,得到3层,分别为上层油体富集物(油体、芝麻蛋白和其他成分的混合物)、中间层清液以及下层沉淀。分别测定各层的脂质和芝麻素含量。

1.2.2 油体的纯化

为了避免芝麻素的吸附对于油体芝麻素含量的影响,对油体富集物进行纯化处理。取1.2.1的油体富集物,一部分分散到9 mol/L尿素溶液中(油体富集物与尿素溶液质量比1:10),另一部分分散到20%蔗糖溶液中(油体富集物与蔗糖溶液质量比1:10)并分成二等份,分别调pH至7和11。再置于冰水浴搅拌30min,然后于6750g离心15min得到上浮油体。重复操作两次后,将得到的油体用去离子水清洗两次(油体富集物与去离子水质量比1:10,冰水浴搅拌30min,于6750g离心15min),去除尿素和碱。

1.2.3 碱泡制浆

将生芝麻在1% Na₂CO₃溶液中浸泡1h后手工脱皮,脱皮芝麻继续在1% Na₂CO₃溶液中浸泡15h(芝麻与Na₂CO₃溶液质量比为1:9)。将脱皮芝麻和浸泡液分开,分别使用打浆机和石磨两种方式制浆。4层纱布过滤后,加入20%蔗糖溶液,调pH至11,冰水浴搅拌30min后,高速离心(42500g,60min),得到上层较纯的油体、中间层清液及下层沉淀1。将中间层清液调pH至4.5进行酸沉,静置1h后离心(3000g,15min),取下层,记为沉淀2(清液浓缩物)。记录各部分的质量,并测定离心前原始浆液和离心后的油体、沉淀1以及沉淀2的脂质和芝麻素含量。

1.2.4 基本成分的测定

水分含量的测定参考GB5009.3—2016的直接干燥法。脂质含量的测定参考Phillips等^[9]的氯仿-甲醇法。

1.2.5 芝麻素含量的测定

样品制备:参考Rangkadilok等^[10]的方法对芝麻素含量进行测定。取0.5g左右样品,加入5mL 80%甲醇,于40℃超声90min后离心(3000g,5min),将上清倒入10mL容量瓶,剩下的沉淀部分继续加入4.5mL 80%甲醇超声30min后离心,将上清并入容量瓶,用80%甲醇定容。混合均匀后过0.22 μm滤膜,待HPLC分析。

HPLC分析条件:SilGreen HPLC Column反相C18柱(250mm×4.6mm,5 μm);流动相由水(溶剂A)和甲醇(溶剂B)组成,梯度体系为0min,5%B,0~5min 5%~18%B,5~10min 18%~35%B,10~15min 35%~62%B,15~18min 62%~80%B,18~22min 80%B,22~23min 80%~5%B,在此条件下(5%B)25℃平衡3min;流速1.0 mL/min;上样量20 μL,检测波长287nm。

标准溶液配制:准确称量芝麻素标准品配制成质量浓度为 1 mg/mL 的芝麻素标准溶液,分别稀释至 5、20、40、100、200 $\mu\text{g/mL}$,过膜待 HPLC 分析。

标准曲线的绘制:以芝麻素质量浓度(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线,得到标准曲线方程为 $y = 20.493x + 14.968$, $R^2 = 0.9999$,线性范围为 5 ~ 200 $\mu\text{g/mL}$ 。利用此公式计算样品中的芝麻素含量。

1.2.6 Tricine - SDS - PAGE

将样品稀释至蛋白质含量为 4 g/L,分别加入样品溶解液(0.25 mol/L Tris - HCl 缓冲液(pH 6.8), 1% SDS)、1% 溴酚蓝指示剂和 1 mol/L DTT 溶液,沸水浴 5 min 后上样。制胶参考 Schagger^[11]的方法,采

用 16% 丙烯酰胺分离胶和 4% 丙烯酰胺浓缩胶进行电泳。上样量为 10 μL ,以 30 V 的恒定电压进行 1 h 后,将电压调至 100 V 直至结束。再经固定、染色、脱色后拍照,使用 Image Lab 3.0 软件分析。

1.2.7 数据处理

使用 Origin 9.5 和 SPSS 22.0 软件对实验数据进行整理、分析,每次实验设置 2 ~ 3 组平行,当 $P < 0.05$ 时存在显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 芝麻浆液(打浆机)离心后各组分中的芝麻素及脂质含量

芝麻素标准品、芝麻浆液、油体富集物、清液及沉淀的 HPLC 谱图如图 1 所示。

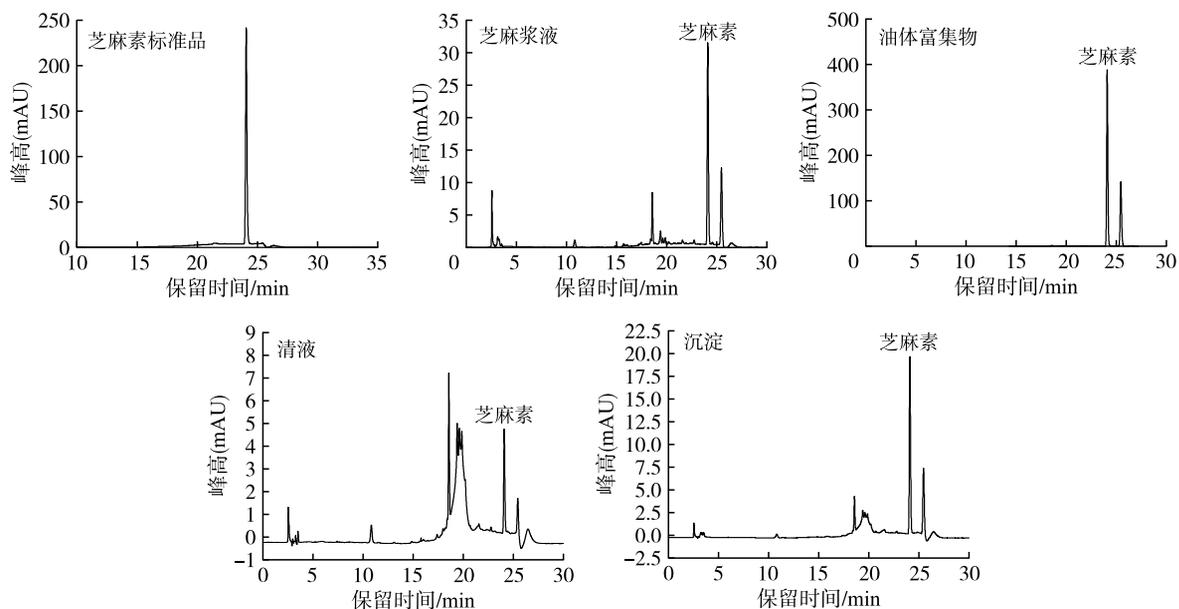


图 1 芝麻素标准品及样品的 HPLC 谱图

由图 1 可知,芝麻素保留时间为 24.1 min,油体富集物的 HPLC 谱图除了芝麻素,在 26 min 左右还有 1 个峰,经标准品确认,该峰为芝麻林素。在清液和沉淀的 HPLC 谱图中,除了芝麻素和芝麻林素外,还有一些小的杂峰。根据 Rangkadilok 等^[10]的研究,这些峰包含一些水溶性的木脂素。

油体富集物、清液和沉淀中的芝麻素和脂质含量(干基)见表 1。

表 1 油体富集物、清液和沉淀中的芝麻素和脂质含量(干基)

样品	芝麻素含量/(mg/g)	脂质含量/%
油体富集物	5.18 \pm 0.12 ^a	92.20 \pm 1.34 ^a
清液	0.00 \pm 0.01 ^c	56.00 \pm 0.98 ^b
沉淀	1.08 \pm 0.03 ^b	19.42 \pm 0.35 ^c

注:同列的不同小写字母表示具有显著性差异($P < 0.05$)。下同

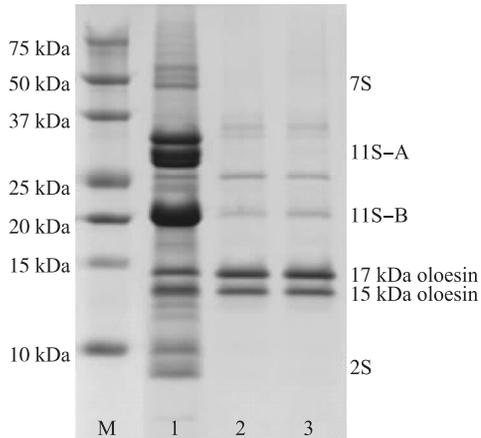
由表 1 可知,相比于油体富集物和沉淀,清液由于固形物含量过低,芝麻素未能被有效提取和检出。因此,下面研究将通过调节 pH 至 4.5 进行酸沉来浓缩清液中的油体和蛋白质等成分,再对所得沉淀进行芝麻素的提取和检测。

油体富集物和沉淀中的芝麻素与脂质之间存在极高的正相关性,即脂质含量越高,芝麻素含量也越高。贾斌等^[12]在对 317 个品种的芝麻进行成分含量分析时发现,芝麻脂质含量与芝麻素含量呈极显著正相关。梅鸿献等^[13]也发现芝麻素和芝麻脂质含量呈显著正相关。本研究通过计算发现,油体富集物中分布的芝麻素和脂质分别占芝麻浆液中芝麻素和脂质总量的 73% 和 77%,也呈现出了极高的正相关性,这表明了芝麻素与油体之间的极大相关性。

2.2 碱和尿素处理对油体中芝麻素含量的影响

2.1 的研究结果说明,芝麻素极有可能分布在

油体中,但也存在吸附在油体表面的可能性。因此,本部分通过设计如下实验,来确认芝麻素是吸附在油体表面还是分布在油体中。通过比较极端的溶液条件(pH 11的20%蔗糖溶液和9 mol/L尿素溶液)来破坏油体与吸附成分之间的相互作用,以去除吸附蛋白的效果来表征,结果见图2。蔗糖的作用是增大液相密度,以增大油体与液相之间的密度差,使更多的油体在离心作用下(6 750 g, 15 min)上浮。



注: M为Marker, 1、2、3分别为pH 7、pH 11的20%蔗糖溶液和9 mol/L尿素溶液处理后的油体富集物。

图2 碱和尿素处理后油体富集物的还原性蛋白凝胶电泳图

从图2可以看出,pH 11的20%蔗糖溶液和9 mol/L尿素溶液可有效去除油体表面吸附的芝麻蛋白(如7S、11S和2S),而pH 7的20%蔗糖溶液(对照)处理的油体仍然吸附较多的芝麻蛋白。表2为碱和尿素处理后油体的脂质和芝麻素含量。

表2 碱和尿素处理油体的脂质和芝麻素含量(干基)

处理条件	芝麻素含量/(mg/g)	脂质含量/%
20%蔗糖,pH 7	5.92 ± 0.13 ^a	95.35 ± 1.41 ^a
20%蔗糖,pH 11	6.13 ± 0.18 ^b	98.23 ± 1.08 ^b
9 mol/L尿素	5.96 ± 0.15 ^a	97.72 ± 1.28 ^b

由表2可知,由于油体表面吸附的芝麻蛋白被去除,pH 7、pH 11的20%蔗糖溶液和尿素处理的油体比表1中油体富集物的芝麻素含量高。去除蛋白的量越多,油体的芝麻素含量越高。pH 11的20%蔗糖溶液处理的油体与pH 7的20%蔗糖溶液处理的油体芝麻素与脂质含量之比相当,说明绝大多数的芝麻素存在于油体中,而不是吸附在油体表面。而经尿素处理的油体,其芝麻素含量低于pH 11的20%蔗糖溶液处理的油体,这是因为尿素可与油体中含有6个碳原子以上的直链化合物(脂肪酸等)形成结晶型尿素包合物^[14],可能导致少量芝麻素随着脂质一起被分散到下层清液中,从而使芝麻素含

量偏低。因此,后续研究将使用pH 11的20%蔗糖溶液处理来进一步考察芝麻素的分布。

2.3 芝麻素与油体相关性的量化分析

在芝麻种子中,油体的平均粒径为2.0 μm左右。在打浆机剧烈的剪切作用(18 000 r/min, 3 min)下,油体极有可能被剪切成很小的油滴粒子,从而不利于油体的离心上浮。另外,油体被剪切的过程中,芝麻素也有可能和芝麻蛋白发生相互作用,从而影响芝麻素与油体相关性的分析。因此,本部分以石磨这种温和的方式来制浆,以打浆机制浆为对照。在离心分离处理时,浆液的液相条件为pH 11和20%蔗糖溶液,并采用高速离心(42 500 g, 60 min),以期让所有的油体粒子上浮。另外,为了让尽可能多的芝麻固形物(主要是油体、芝麻蛋白和膜结构脂质)进入浆液,脱皮芝麻采用1% Na₂CO₃溶液浸泡后制浆,并加入20%蔗糖溶液并调pH至11。如前所述,离心后清液固形物含量极低,不利于芝麻素的提取和检测,因此通过调节pH至4.5来沉淀浓缩清液中固形物。油体、清液和沉淀中的芝麻素和脂质的分布与含量见表3。

表3 油体、清液和沉淀中的芝麻素和脂质的分布与含量

制浆方式	样品	芝麻素含量/%	脂质含量/%
打浆机制浆	油体	86.14	85.41
	清液	10.79	13.09
	沉淀	1.15	1.50
石磨制浆	油体	94.99	94.39
	清液	2.48	3.61
	沉淀	1.45	2.00

由表3可知:对于打浆机制取的浆液,离心后,浆液中85.41%的脂质进入上浮;离心后3组分的芝麻素总回收率为98.08%,其中上浮油体占86.14%,清液pH 4.5浓缩物占10.79%,下层沉淀占1.15%。对于石磨制取的浆液,离心后,浆液中94.39%的脂质进入上浮;离心后3组分的芝麻素总回收率达到98.92%,其中上浮油体占94.99%,清液pH 4.5浓缩物占2.48%,下层沉淀占1.45%。结果说明:打浆机制浆可明显破坏芝麻油体的微结构,从而影响芝麻素在离心分离3组分中的分布;石磨制浆可极大程度保护芝麻油体的微结构,高速离心可有效分离油体。另外,对于石磨制取的浆液,高速离心后,清液部分呈透明状态,说明几乎所有的油体已被分离进入上浮。因此,清液和沉淀中的脂质(约5.61%)可能来源于膜结构(如内质网和高尔基体等)的脂质。研究表明,芝麻等油料种子在成熟

的过程中,油体的生物合成是在内质网上,合成完成后释放进入细胞质基质中^[15]。基于油体生物合成的过程,油体中的芝麻素必然是由内质网所提供,因此清液和沉淀中的芝麻素(约3.93%)极大可能是来源于内质网等膜结构。

3 结论

通过系统实验,本研究阐明了芝麻中绝大部分(约95%)的芝麻素富集在油体中,其余部分可能分布于内质网等膜结构中。同时,本研究还证明了芝麻总脂质的约95%由油体贡献,其余脂质由内质网等膜结构成分贡献。碱处理对于油体的芝麻素含量影响不大,而尿素处理可一定程度减少油体的芝麻素含量。剧烈的剪切处理(打浆机制浆),会导致油体微结构的破坏,使油体中的芝麻素释放,从而与浆液中的芝麻蛋白发生相互作用。石磨制浆可极大地保护油体的微结构。本研究为芝麻素的提取和利用提供了新思路,如可以水为加工介质直接提取富集芝麻素的芝麻油体,作为一种具有功能性的植物奶油类产品。

参考文献:

- [1] ARSLAN C, UZUN B, ULGER S, et al. Determination of oil content and fatty acid composition of sesame mutants suited for intensive management conditions[J]. J Am Oil Chem Soc, 2007, 84(10):917-920.
- [2] FUKUDA Y, OSAVA T, KAWAKISHI S, et al. Chemistry of lignan antioxidants in sesame seed and oil[J]. ACS Sym Ser, 1994, 547:264-274.
- [3] VISAVADIYA N P, NARASIMHACHARYA A V R L. Sesame as a hypocholesterolaemic and antioxidant dietary component[J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(6):1889-1895.
- [4] CHIU H F, CHEN T Y, TZENG Y T, et al. Improvement of liver function in humans using a mixture of *Schisandra* fruit extract and sesamin[J]. Phytoth Res, 2013, 27(3):368-373.
- [5] LEE C C, CHEN P R, LIN S, et al. Sesamin induces nitric oxide and decreases endothelin-1 production in HUVECs: possible implications for its antihypertensive effect[J]. J Hyperten, 2004, 22(12):2329-2338.
- [6] ASHAKUMARY L, ROUYER I, TAKAHASHI Y, et al. Sesamin, a sesame lignan, is a potent inducer of hepatic fatty acid oxidation in the rat[J]. Metab Clin Exp, 1999, 48(10):1303-1313.
- [7] PENALVO J L, HEINONEN S M, AURA A M, et al. Dietary sesamin is converted to enterolactone in humans[J]. J Nutr, 2005, 135(5):1056-1062.
- [8] 刘廷航,王美琪,曾志正. 芝麻种子油体和蛋白质体基础研究及生物技术之上应用[J]. 化学,2007,65(1):55-62.
- [9] PHILLIPS K M, MARIA T T, GROVE T M, et al. Simplified gravimetric determination of total lipid in food composites after chloroform-methanol extraction[J]. J Am Oil Chem Soc, 1997, 74(2):137-142.
- [10] RANGKADILOK N, PHOLPHANA N, MAHIDOL C, et al. Variation of sesamin, sesamol and tocopherols in sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds and oil products in Thailand[J]. Food Chem, 2010, 122(3):724-730.
- [11] SCHAGGER H. Tricine-SDS-PAGE[J]. Nature Protocols, 2006, 1(1):16-22.
- [12] 贾斌,王允,尹海燕,等. 黑、白芝麻营养成分及品质的差异分析[J]. 河南农业科学,2020,49(5):69-74.
- [13] 梅鸿猷,魏安池,刘艳阳,等. 芝麻种质资源芝麻素、蛋白质、脂肪含量变异及其相关分析[J]. 中国油脂,2013,38(4):87-90.
- [14] 吴明一. 尿素包合法纯化不饱和脂肪酸的研究[D]. 天津:天津大学,2007.
- [15] SONG Y H, WANG X D, ROSE R J. Oil body biogenesis and biotechnology in legume seeds[J]. Plant Cell Rep, 2017, 36:1519-1532.

·公益广告·

适度加工, 营养更丰富!

《中国油脂》宣

