

油脂体组成、结构及油脂体蛋白研究进展

胡 琪, 郭诗文, 吕 莹, 施小迪, 郭顺堂*
(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 油脂体是由中性脂质、环绕中性脂质的磷脂和嵌插在磷脂层中的蛋白组成的小球体, 是植物油脂储存的重要器官。油脂体中的蛋白对油脂体的独立性、完整性起重要作用, 并且在种子萌发过程中, 能激活油脂体表面的相关酶类, 从而促进代谢, 为机体提供能量, 促进植物的生长。本文综述油脂体的组成、结构以及油脂体蛋白的结构、功能性质, 为油脂体的利用和开发提供参考。

关键词: 油脂体; 油脂体蛋白; 油脂体钙蛋白; 甾醇蛋白

Review of Research on Components, Structure and Proteins of Oil Body

HU Qi, GUO Shiwen, LÜ Ying, SHI Xiaodi, GUO Shuntang*
(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Oil body is an important oil storage organ that contains a matrix of triacylglycerol surrounded by a layer of phospholipid with proteins inserted in it. Proteins in oil body have great effect on maintaining oil body as individual entities and activating related enzymes on the surface of oil body during seed germination, which can be helpful for accelerating metabolism and providing energy, thus promoting the growth of plants. This article systematically states the components, structure of oil body, and the functions and structure of oil body proteins in order to provide a theoretical reference for the industrial application of oil body.

Key words: oil body; oleosin; caleosin; steroleosin

中图分类号: S38

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 11-0230-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201511043

油脂体是由一层磷脂膜包围基质三酰基甘油 (triacylglycerol, TAG), 蛋白镶嵌在膜上形成的完整、稳定、独立存在于细胞质中的膜结构小球体。油脂体主要存在于被子植物中, 如芸苔、花生、芝麻、玉米^[1-2]等中; 同时也存在于裸子植物如银杏、苏铁属^[3]等中。Huang^[4]发现, 在原始植物菌类和藻类中也存在油脂体, 且含有油脂体的组织能够抵抗干旱等不良环境, 具有长期储存油脂的能力。但是, 有些植物如橄榄、鳄梨等的中果皮, 则不能抵抗干旱等不良环境带来的影响, 因为这些组织中的“油脂体”虽然具有与油脂体相同的外形轮廓, 但其表面不存在类似油脂体的完整蛋白组成^[5]。因此可以说油脂体的表面蛋白对提升油脂体抵抗不良环境的能力具有重要作用。

近年来, 关于油脂体的研究不断增加, 这主要是基于油脂体潜在的利用价值。油脂体能作为乳状液应用于食品、护肤品、洗护用品等中, 如冰淇淋、果汁等^[6-7], 添加了油脂体的果汁口感更浓厚, 且能够阻止固形物的

沉淀; 而冰淇淋中添加油脂体则可以去除乳化过程, 同时减少非脂乳固体的添加, 这可以有效降低冰淇淋的制作成本。目前油脂体蛋白主要用于生物技术研究, 如采用油体蛋白作为融合蛋白, 在 *B. carinata* 中表达成具有消除 Cd^{2+} 作用的蛋白^[8]。

油脂体因其独特的易提取、稳定的性能, 较适用于食品、医药、护肤品等行业, 并对行业的发展具有重要意义。

1 油脂体的组成

通过电子显微镜观察发现, 成熟种子中的油脂体通常呈球形, 当油脂体被分离出后, 仍然以球体形式存在^[9], 不同种子中的油脂体直径从 $0.2 \sim 2.5 \mu\text{m}$ 不等, 这可能是植物生长过程中不同的营养条件和环境因素影响的结果。而在同种种子中, 油脂体在不同组织中的大小也不尽相同。例如, 在玉米胚芽中, 种子子叶中的油脂体比胚轴

收稿日期: 2014-07-11

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目 (2013AA102208)

作者简介: 胡琪 (1990—), 女, 硕士, 主要从事食品加工研究。E-mail: Nicole1010796405@163.com

*通信作者: 郭顺堂 (1962—), 男, 教授, 博士, 主要从事蛋白质加工与利用研究。E-mail: shuntang@cau.edu.cn

中的大^[4]。油脂体的大小和形状主要由油与蛋白的比例决定,在玉米种子中,高油和低油品种的玉米其油脂体的形状、大小不同。种子中油/蛋白比例越高,油脂体越大,呈球形;油/蛋白比例越低,油脂体越小,呈不规则状。

Tzen^[9]和Slack^[10]等通过多次离心分离获得比较纯的油脂体,测定其含有92%~98%的中性脂质,1%~4%的磷脂,1%~4%的蛋白。其中,中性脂质大部分是TAG,还有少量的甘油二酯和游离脂肪酸。但油脂体中游离脂肪酸的量可能会改变。Huang^[4]研究发现,长时间储存的种子,其游离脂肪酸含量会增加,这主要是由磷脂和三酰基甘油水解而成的。磷脂主要是卵磷脂,还有少量的磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰肌醇;蛋白质大多是油体蛋白,还有少量油体钙蛋白和甾醇蛋白。此外,还发现了细胞色素c还原酶、脂肪酶^[11]、乙醛酸循环磷脂酶^[12]等,这些酶在种子萌发时分解油脂体中的脂质,为种子提供能量,以完成种子的萌发过程或帮助种子度过不良环境。

2 油脂体的结构

通过早期的研究知道,油脂体主要是由三酰基甘油、磷脂和蛋白组成;此外,油脂体不论是在体内或体外都保持着稳定性,即在外界环境及油脂体自身结构不发生变化的前提下不发生聚集、融合等现象,能较好地溶解于水中。1992年,Tzen等^[9]通过酶解实验发现,经胰蛋白酶酶解的油脂体稳定性被破坏,发生了聚集等不良反应,Tzen等^[13]采用胰蛋白酶酶解油脂体得到了同样的结果。而用磷脂酶A2或C处理的油脂体仍然保持较好的稳定性;若先用胰蛋白酶处理油脂体再加入磷脂酶则发现磷脂被水解,油脂体发生了融合。实验结果表明,油脂体是以三酰基甘油为基质,一层磷脂层包围三酰基甘油,蛋白镶嵌在油脂体表面的小球体。Tzen等^[9]首先得出了油脂体的结构图,Hsieh等^[14]对油脂体结构图进行了完善,见图1。Huang^[4]分析油脂体认为,一个油脂体单位是由13个磷脂分子和1个油体蛋白分子组成,油脂体的结构单位如图2所示。

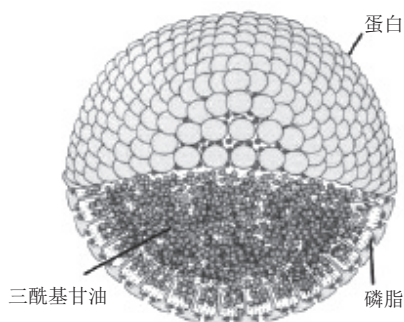


图1 油脂体结构图^[14]

Fig.1 Structural model of oil body^[14]

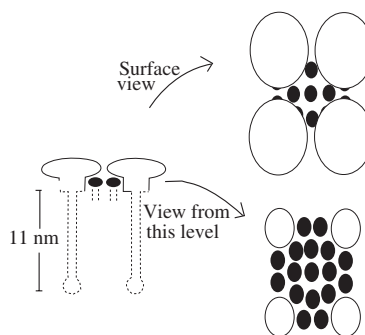


图2 油脂体结构单位图^[4]

Fig.2 Surface view of a structural unit^[4]

植物细胞中的油脂体具有极佳的稳定性,即使从植物组织中提取出来仍然保持良好的稳定性。Huang^[4]认为维持油脂体稳定性的原因主要有两点:负电性和空间阻力,油脂体表面的蛋白、磷脂等相互作用,形成了紧密、稳定的带电层,阻止油脂体之间相互作用发生聚集;油脂体表面的蛋白,其空间结构也在一定程度上阻止了油脂体的相互作用,从而维持油脂体的稳定性。由此可见,油脂体中的蛋白对维持油脂体的稳定性起决定性作用。

3 油脂体蛋白

3.1 油脂体蛋白的种类及基本性质

油脂体表面含有多种不同的蛋白,为维持油脂体的个体完整和稳定起到了重要作用。油脂体蛋白中较早被关注的是油体蛋白。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE)^[15]和免疫细胞化学实验得知,油脂体蛋白是一种低分子质量的碱性蛋白^[16],且仅存在于油脂体中。油脂体蛋白是被子植物油脂体中含最丰富的蛋白,并对油脂体的稳定、抗氧化等起到重要作用,因此,对油脂体蛋白的研究及发现都较早、较成熟。除油体蛋白外,Chen等^[17]从大米油脂体中还发现了3种新的蛋白Sop1~3,因Sop1的DNA序列与大米中的一种与钙结合蛋白相同^[18],Sop2与甾醇结合,故将其分别命名为油体钙蛋白(caleosin)^[19]和甾醇蛋白^[20]。Lin等^[20]分析Sop3的结构发现,其可能是一种能与甾醇结合的类似Sop2的蛋白,通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术获得了Sop3的cDNA克隆基因,并在大肠杆菌中进行免疫识别抗体实验得到证实。因此将Sop2和Sop3分别命名为甾醇蛋白A和甾醇蛋白B。

总结目前对油脂体蛋白的研究,将油脂体蛋白分为3个种类:油体蛋白(15 kD,称为H-油体蛋白,17 kD,称为L-油体蛋白)^[21]、油体钙蛋白(27 kD)和甾醇蛋白(39、41 kD,即甾醇蛋白A、B)。H-油体蛋白和L-油

体蛋白都存在于被子植物中, 但仅L-油体蛋白存在于裸子植物中; 油体钙蛋白不仅存在于高等植物中, 原始物种藻类和菌类中也有发现^[22]。早期的研究认为油体蛋白是油脂体中最主要的蛋白, 维持油脂体的稳定性。而油体钙蛋白则是一种少数蛋白, 与油体蛋白共同存在于花粉、种子的油脂体中, 对维持油脂体的功能特性起辅助作用。但新的研究发现在许多原始物种如藻类、菌类、苏铁等植物中油体钙蛋白是主要蛋白, 且不存在油体蛋白。也就是说, 油体蛋白和油体钙蛋白均可以作为主要结构蛋白维持油脂体的稳定性, 但二者存在的植物种类不同。Jiang等^[3]通过文献检索发现能编码油体钙蛋白而不能编码油体蛋白的基因大多存在于原始物种中, 且二者都能作为主要结构蛋白存在维持油脂体的完整性、稳定性, 由此Jiang等认为油体蛋白可能是油体钙蛋白长期进化而来, 此外, Lin等^[23]认为油体钙蛋白是油脂体蛋白中最原始的蛋白, 但二者之间的联系与区别还有待实验论证。

3.2 油脂体蛋白质的结构及异同点

目前发现的油脂体中的蛋白包括油体蛋白、油体钙蛋白和甾醇蛋白, 前两者包含3个结构区域, 即N端、C端和中部区, 甾醇蛋白仅含有N端和C端。

以油体蛋白为例: 1) N端, 是由40~60个氨基酸组成的两亲区域, 其二级结构目前还不清楚。根据其疏水和亲水残基的分布, Huang^[4]认为N端大部分的区域与油脂体的表面性质有关。2) 中部, 是由68~74个氨基酸组成的疏水区, 这可能是所有有机体中发现的最长的疏水序列。该区域的二级结构目前存在2种观点, 反相平行的 α -螺旋^[24]和 β -折叠^[25]。两个实验室分别采用圆二色谱和傅里叶变换红外光谱, 模拟油脂体自然环境的条件, 测定油脂体蛋白的中部疏水区的二级结构。测定结果, 一个显示是 α -螺旋结构^[26], 另一个是 β -折叠结构^[20]。近来也有研究表明, 用同步辐射圆二色性(synchrotron radiation circular dichroism, SRCD)测定蛋白二级结构时, 若以SDS为处理液, 则油体钙蛋白主要以 α -螺旋结构存在, 若以Amphipols为处理液, 则主要以 β -折叠结构存在, 这主要是由于 α -螺旋和 β -折叠之间可相互转换^[27]。因此我们认为这可能就是中部疏水区二级结构测定结果不一的原因。DNA测序分析发现不同植物组织中, 油脂体蛋白在中部疏水区的氨基酸序列相似度非常高, 而在这个区域中, 12~14个氨基酸残基的相似度更高, 即中部疏水区的Proline Knot结构^[4], 保守区序列对蛋白的功能性质起决定性作用。3) C端, 是由33~40个氨基酸组成的两亲区, 其二级结构为 α -螺旋。不同种类油脂体中的油体蛋白都含有以上3个结构区域, 分子质量总和为15 kD, 但油体蛋白的分子质量区别很大, 从15~26 kD不等^[4,28-29], 其分子质量超过15 kD的部分会延伸到N端和C端^[4]。也就

是说, 油体蛋白的分子质量区别主要在于N端和C端, 延伸到C端的序列具有两亲性, N端的目前还不清楚。延伸区的灵活性较强, 因此它对蛋白质的功能影响较小, 但是对蛋白质的空间结构起到了一定作用, 增加了位阻效应, 有利于防止油脂体的聚集, 对维持油脂体的稳定起到一定的作用。

油体钙蛋白的N端也是亲水的, 但不同于油体蛋白的是它含有一个单独的与钙结合的手型EF^[30], 钙能增强油体钙蛋白的溶解性和表面特性^[31], Chen等^[32]发现单子叶植物油脂体中的油体钙蛋白的N端较双子叶植物长40~70个残基。C端也是亲水的^[23], 且含有4个磷酸结合位点(12 kD)^[33-34], 其N端和C端分别是油体蛋白的3倍, 但中部疏水区较小, 由一个 α -螺旋和短锚组成。甾醇蛋白仅含有N端疏水区和C端亲水区, N端有2个 α -螺旋结构, 亲水区含有还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)^[34]结合子域和甾醇结合子域^[35]。甾醇蛋白A、B在结构上的区别是甾醇结合子域的大小不同, 脱氢酶活性检测发现, 甾醇蛋白B可能拥有更大、选择性更高的NADPH。3种蛋白的简易结构见图3^[36]。

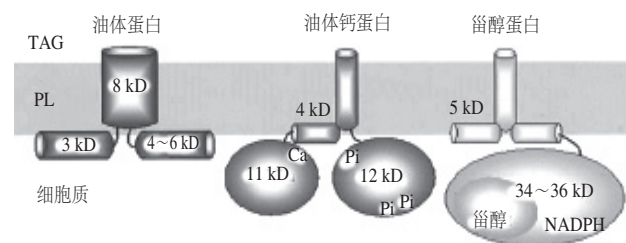


图3 3种油脂体蛋白的二级结构简图^[36]
Fig.3 Secondary structures of oleosin, caleosin, and steroleosin^[36]

在油体蛋白中, 中部疏水区是插入磷脂层中的, 而在油体钙蛋白中, 中部区仅短锚结构存在于磷脂层, 而短锚结构比油体蛋白中部疏水区小, 导致油体钙蛋白不及油体蛋白稳定^[18]。这可能是因为插入磷脂层中的部分越大, 与磷脂层及油脂之间的作用力越大, 有利于蛋白稳定的吸附在油脂体表面。油脂体蛋白中最重要的结构是疏水区, 3种蛋白中仅甾醇蛋白的疏水区存在于N端, 其他都在中部区。此外, 3种蛋白的保守区也有很大差别, 在油体蛋白中是Proline Knot结构, 油体钙蛋白中是Dx[D/N]xDG-钙结合区, 甾醇蛋白中是Proline Knob结构^[35]。Abell等^[37]研究发现失去保守区“Proline Knot”结构的油体蛋白多肽在运输过程中失去了其自身的稳定性, 无法形成正常的油脂体, 即保守区对蛋白的功能特性起决定性作用。甾醇蛋白的N端含有自由的蛋氨酸, 而油体蛋白和油体钙蛋白的N端都发生了乙酰化, 形成了封锁的结构, 这样有利于提高抵抗热的稳定性, 并

且能阻止泛素化反应^[21], 泛素是一种小蛋白, 它的主要功能是标记需要分解的蛋白, 使其被水解。而N端乙酰化后, 阻止了泛素化反应, 从而保护它们不被降解, 提高油脂体抵抗热的稳定性, 起到长期储存油脂的作用。

油脂体中的3种蛋白质在结构上虽然存在很多不同, 但归纳来看, 3种蛋白质的保守区都是决定蛋白质功能特性的决定因素, 如蛋白质的稳定性、酶识别位点等, 而N、C端的两亲区域则对油脂体的两亲性起到重要作用, 同时为油脂体间提供空间位阻, 为防止油脂体的聚集起到一定的积极作用。

3.3 油脂体蛋白的功能

油脂体蛋白对油脂体的稳定、代谢、合成等起到十分重要的作用。稳定的油脂体在胰蛋白酶的作用下失去了稳定性, 而在磷脂酶的作用下, 仍具有稳定性^[9], 这说明蛋白的存在能够保持油脂体的稳定性。而蛋白能维持油脂体稳定的原因, Huang^[4]认为是蛋白的负电性和空间位阻。

负电性: 油脂体表面的油体蛋白、磷脂、少量游离脂肪酸和三酰基甘油之间相互作用, 形成了一个紧密、稳定的带电层。分子内的磷脂和油体蛋白之间的相互作用决定了油脂体的带电性和极性分布。带正电的油体蛋白与表面带负电的磷脂和游离脂肪酸相互作用, 维持油脂体的稳定性。

空间位阻: 油脂体在pH 7.0时带负电, 负电性的油脂体通过静电斥力阻止了聚集和聚合。调节油脂体溶液的pH 7.0~6.5时, 发生了聚集, 但是并未发生聚合, 这可能是蛋白质空间位阻作用的结果, Tzen等^[9]的酶解实验则更明确地说明油体蛋白的存在阻止了油脂体间磷脂的相互作用, 即蛋白质的结构(主要是N端和C端)提供了一定的空间位阻, 阻止了油脂体之间发生聚集、聚合等现象。

油脂体中的蛋白不仅对维持油脂体的稳定具有重要作用, 而且对种子的合成也有影响。在酵母菌中表达的拟南芥油体钙蛋白具有氧化还原酶活性, 而钙的存在对环化酶活性具有重要影响^[38], 因此, 油体钙蛋白可能与植物的生物合成有关。与油体蛋白直接结合油脂体不同, 油体钙蛋白首先在内膜中形成小囊泡, 迅速地移动到油脂体表面与之结合^[22], 钙离子在整个过程中起着调节油体钙蛋白表面性质和聚集性的作用^[31]。

此外, 油脂体蛋白上还含有脂肪酶、乙醛酸循环酶^[39]等的结合位点, 是脂肪酶的激活剂, 从而为油脂体的代谢起作用, 为种子萌发提供能量^[40]。Purkrtova等^[31]发现油体蛋白缺失型拟南芥种子胚芽中的油脂体呈不规则状, 且种子萌发缓慢。Poxleitner等^[41]研究了油体钙蛋白缺失型油脂体对种子萌发的影响, 发现两种缺失型种子, 其萌发率虽未受影响, 但萌发速率远低于野生型。此外, Schmidt等^[42]通过RNA干扰(RNAi)技术干扰种

子中油脂体的油体蛋白表达, 与野生型对照, 油体蛋白缺失型种子生长明显慢于野生型(图4)。

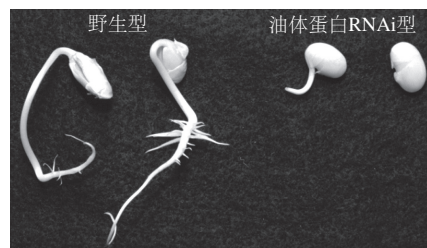


图4 野生型和油体蛋白RNAi型种子7d后的生长状况^[42]

Fig.4 Growth status of wild-type germinated seeds and germinated seeds with 24-kD oleosin knockdown after seven days^[42]

由此推断油体蛋白和油体钙蛋白都对脂肪酶等脂代谢酶类起激活作用, 从而保证种子在萌发过程中有能量来源, 当油体钙蛋白或油体蛋白缺失时, 仅油体蛋白或油体钙蛋白起作用, 因此降低了TAG的代谢速率, 从而延缓了能量供给, 导致种子萌发缓慢。同时也表明油脂体蛋白质具有维持油脂体抵抗不良环境的能力, 从而提高植物的生存能力。

对人工合成油脂体进行研究发现, 以油体钙蛋白作为合成底物的油脂体粒径较油体蛋白的小, 热稳定性也更高^[43]。Pei等^[44]以油体钙蛋白、磷脂和中性脂质人工合成油脂体, 得到了同样的结果; 结合二者的结构特征推测, 即油体钙蛋白是更为原始的蛋白。两者之间存在矛盾, 即油体钙蛋白具有更强的维持油脂体稳定的能力, 但是按自然选择学说, 生物体应该是向有利的方向变异、进化的, 若油体蛋白维持油脂体完整、稳定的能力不如油体钙蛋白, 说明这种进化、演变并不是向有利的方向发展。导致这种矛盾产生的原因可能是, 油体蛋白可能具有绝对优于油体钙蛋白的其他作用, 从而使得油脂体最终选择油体蛋白而非油体钙蛋白作为其主要结构功能蛋白质。

4 油脂体及油脂体蛋白的提取

油脂体的提取方法主要有: 化学试剂提取法和水提取法, 两种方法的基本步骤类似, 不同之处在于提取剂的使用。以水提取法为例: 将含油脂体的植物原材料(如玉米、大豆、花生等), 加入5倍水(m/V), 调节pH 9.0, 1 200 r/min搅拌24 h, 打浆, 过滤。调节滤液的pH 5.0、3 800×g离心30 min, 浮层即为粗油脂体。对粗油脂体进行水洗离心2次或多次, 以得到纯度较高的油脂体。化学试剂提取法采用的则是不同的缓冲液, 如50 mmol/L的三羟甲基氨基甲烷(tris aminomethane,

Tris)-HCl加0.4 mol/L果糖以及0.5 mol/L氯化钠缓冲液^[45],也有的采用0.1 mol/L Tris-HCl、1 mmol/L乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)缓冲液^[46],而提纯油脂体所使用的试剂也不同,有吐温-20^[30],离液剂(主要是尿素、硫脲等)^[30]和聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)^[23]等。水提取法的优点是安全性高,没有添加化学试剂等,因此适合于加工生产,食用性强。化学试剂提取法的优点则是纯度高、产量高,但极可能残留化学试剂,因此一般用于实验研究。

油脂体蛋白的提取:以尿素、硫脲、SDS、二巯苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)等制备缓冲液,油脂体与缓冲液按1:2比例配制,4℃保温1 h。然后转移至Tris-HCl(pH 7.4)、Triton X-100、抗坏血酸、DTT、不溶性聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVPP)、蛋白酶抑制剂配制的缓冲液中,于4℃条件下提取6 h,10 000×g离心30 min。取上清液,加入三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)、DTT、丙酮,-20℃过夜,沉淀用丙酮洗3次,每次15 min即得油脂体蛋白^[47]。

5 结 语

近年来,对油脂体的关注度不断提高,这主要是由于油脂体潜在的利用价值。目前,油脂体中的蛋白质已经被大量运用于生物技术^[48-49]中;此外,油脂体还具有应用于食品、药品、化妆品、个人洗化用品^[6,50]等中的潜在价值。但是对油脂体的应用及油脂体自身还存在许多未解决的问题,如油脂体的工业化生产应用还有待研究;油脂体蛋白的二级结构目前还存在争议;油体蛋白质、油体钙蛋白质的区别与联系也有待进一步的研究,这将有利于探讨油脂体独特的生理功能。关于油体钙蛋白的手型EF以及甾醇蛋白的功能,目前研究的也相对较少。总之,油脂体具有非常高的潜在利用价值,而对油脂体进一步的研究将有利于推动油脂体多方面的应用,促进各行业的发展。

参考文献:

- [1] HUANG A H C. Oleosins and oil bodies in seeds and other organs[J]. Plant Physiology, 1996, 110: 1055-1061.
- [2] QU R D, HUANG A H. Oleosin KD 18 on the surface of oil bodies in maize. Genomic and cDNA sequences and the deduced protein structure[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265: 2238-2243.
- [3] JIANG P L, TZEN J T. Caleosin serves as the major structural protein as efficient as oleosin on the surface of seed oil bodies[J]. Plant Signaling & Behavior, 2010, 5(4): 447-449.
- [4] HUANG A H C. Oil bodies and oleosins in seeds[J]. Annual Review of Plant Biology, 1992, 43: 177-200.
- [5] ROSS J H E, SANCHEZ J, MILLAN F, et al. Differential presence of oleosins in oleogenic seed and mesocarp tissues in olive (*Olea europaea*) and avocado (*Persea americana*)[J]. Plant Science, 1993, 93: 203-210.
- [6] DECKERS H M, GIJS V R, JOSEPH B, et al. Oil body based personal care products: United States, US 6183762 B1[P]. 2001-02-06.
- [7] BERRY M, ANDREW C, KEENAN R, et al. Ice confection and its manufacturing process: United States, US 20050037111 A1[P]. 2005-02-17.
- [8] ANISHA D, SUNITA Y, BHATLA S C. Bionanotechnology, plant oil bodies and oleosins: structure, function and biotechnological applications[M]. Norfolk: Caister Academic Press, 2013: 187-204.
- [9] 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.
- [10] SLACK C R, WILLIAM S B, BRIAN D, et al. Some studies on the composition and surface properties of oil bodies from the seed of safflower (*Carthamus tinctorius*) and linsed (*Linum usitatissimum*)[J]. The Biochemical Society, 1980, 190: 551-561.
- [11] ORY R L. Acid lipase of castor bean[J]. Lipids, 1969, 4: 177-185.
- [12] LIN Y H, MOREAU R A, ANTHONY H C H. Involvement of glyoxysomal lipase in the hydrolysis of storage triacylglycerols in the cotyledons of soybean seedlings[J]. Plant Physiology, 1982, 70: 108-112.
- [13] TZEN J T C, PENG C, CHENG D J, et al. A new method for seed oil body purification and examination of oil body integrity following germination[J]. The Biochemical Society, 1997, 121: 762-768.
- [14] HSIEH K, HUANG A H C. Endoplasmic reticulum, oleosins, and oils in seeds and tapetum cells[J]. Plant Physiology, 2004, 36: 3427-3434.
- [15] MOREAU R A, LIU K D F, HUANG A H C. Spherosomes in castor bean endosperm. Membrane components, formation, and degradation[J]. Plant Physiology, 1980, 65: 1176-1180.
- [16] HERMAN E M. Immunogold localization and synthesis of an oil body membrane protein in developing soybean seeds[J]. Planta, 1987, 172: 336-345.
- [17] CHEN E C F, TSAI S S K, PENG C C, et al. Identification of three novel unique proteins in seed oil bodies of sesame[J]. Plant Cell Physiology, 1998, 39: 935-941.
- [18] FRANDSEN G I, MÜLLER U F, NIELSEN M, et al. Novel plant Ca²⁺-binding protein expressed in response to abscisic acid and osmotic stress[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271: 343-348.
- [19] CHEN J C F, TSAI C C Y, TZEN J T C. Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seeds[J]. Plant Cell Physiology, 1999, 40: 1079-1086.
- [20] LIN L J, SORGAN S K T, PENG C C, et al. Steroleosin, a sterol-binding dehydrogenase in seed oil bodies[J]. Plant Physiology, 2002, 128: 1200-1211.
- [21] LIN L J, LIAO P C, YANG H H, et al. Determination and analyses of the N-termini of oil-body proteins, steroleosin, caleosin and oleosin[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, 43: 770-776.
- [22] NÆSTED H, FRANDSEN G I, GUANG Y J, et al. Caleosins: Ca²⁺-binding proteins associated with lipid bodies[J]. Plant Molecular Biology, 2000, 44: 463-476.
- [23] LIN I P, JIANG P L, CHEN C S, et al. A unique caleosin serving as the major integral protein in oil bodies isolated from *Chlorella* sp. cells cultured with limited nitrogen[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 61: 80-87.
- [24] VANCE V B, HUANG A H C. The major protein from lipid bodies of maize. Characterization and structure based on cDNA cloning[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1987, 262: 1275-1279.
- [25] MURPHY D J, KEEN J N, O'SULLIVAN J N, et al. A class of amphipathic proteins associated with lipid storage bodies plants.

- Possible similarities with animal serum apolipoproteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*, 1991, 1088: 86-94.
- [26] ALEXANDER L G, RICHARD B S, ANTHONY R C, et al. Characterization and modelling of the hydrophobic domain of a sunflower oleosin[J]. *Planta*, 2002, 214: 546-551.
- [27] YANN G, VINDIGNI J D, PALLIER A, et al. High water solubility and fold in amphipols of proteins with large hydrophobic regions: oleosins and caleosin from seed lipid bodies[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1808: 706-716.
- [28] HERMAN E M. Cell and molecular biology of seed oil body proteins[M]. New York: Marcel Dekker, 1995: 195-214.
- [29] SADEGHIPOUR H R, BHATLA S C. Differential sensitivity of oleosins to proteolysis during oil body mobilization in sunflower seedlings[J]. *Plant Cell Physiology*, 2002, 43(10): 1117-1126.
- [30] BUNTORA P, CHUNG T Y, CHEN C S, et al. Identification of caleosin and two oleosin isoforms in oil bodies of pine megagametophytes[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 82: 142-150.
- [31] PURKRTOVA Z, d'ANDREA S, JOLIVET P, et al. Structural properties of caleosin: a MS and CD study[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 464: 335-343.
- [32] CHEN D H, CHYAN C L, JIANG P L, et al. The same oleosin isoforms are present in oil bodies of rice embryo and aleurone layer while caleosin exists only in those of the embryo[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 60: 18-24.
- [33] CHAPMAN K D, DYER J M, MULLEN R T. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants[J]. *Journal of Lipid Research*, 2012, 53: 215-226.
- [34] HSIAO E S L, TZEN J T C. Ubiquitination of oleosin-H and caleosin in sesame oil bodies after seed germination[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2011, 49(1): 77-81.
- [35] PAVAN U. Comparative genomics of the lipid-body-membrane proteins oleosin, caleosin and steroleosin in magnoliophyte, lycophyte and bryophyte[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2012, 10: 345-353.
- [36] LIN L J, JASON T C T. Two distinct steroleosins are present in seed oil bodies[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, 42: 601-608.
- [37] ABELL B M, LARRY A H, MALLEVA A, et al. Role of the proline knot motif in oleosin endoplasmic reticulum topology and oil body targeting[J]. *The Plant Cell*, 1997, 9: 1481-1493.
- [38] HANANO A, MICHEL B, MARTINE F, et al. Plant seed peroxygenase is an original hemeoxygenase with an EF-hand calcium binding motif[J]. *The Biochemical Society*, 2006, 281: 33140-33151.
- [39] HAYASHI Y, HAYASHI M, HAYASHI H, et al. Direct interaction between glyoxysomes and lipid bodies in cotyledons of the *Arabidopsis thaliana* ped1 mutant[J]. *Protoplasma*, 2001, 218: 83-94.
- [40] FRANDSEN G I, MUNDY J, JASON T C T. Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin[J]. *Physiologia Plantarum*, 2001, 112: 301-307.
- [41] POXLEITNER M, SALLY W R, SAMUELS A L, et al. A role for caleosin in degradation of oil body storage lipid during seed germination[J]. *The Plant Journal*, 2006, 47: 917-933.
- [42] SCHMIDT M A, ELIOT M H. Suppression of soybean oleosin produces micro-oil bodies that aggregate into oil body/ER complexes[J]. *Molecular Plant*, 2008, 1(6): 910-924.
- [43] CHEN M C M, CHYAN C L. Constitution of stable artificial oil bodies with triacylglycerol, phospholipid, and caleosin[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 3982-3987.
- [44] PEI L J, JEFF C F C, SHAU T C, et al. Stable oil bodies sheltered by a unique caleosin in cycad megagametophytes[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47: 1009-1016.
- [45] WU Nana, YANG Xiaoquan, TENG Zi, et al. Stabilization of soybean oil body emulsion using κ , ι , λ -carrageenan at different pH values[J]. *Food Research International*, 2011, 44: 1059-1068.
- [46] NANTIYAKUL N, SAMUEL F, FISK I D, et al. Isolation and characterization of oil bodies from *Oryza sativa* bran and studies of their physical properties[J]. *Journal of Cereal Science*, 2013, 57: 141-145.
- [47] ZIENKIEWICZ K, CASTRO A J, ALCHE JDE D, et al. Identification and localization of a caleosin in olive (*Olea europaea* L.) pollen during *in vitro* germination[J]. *Journal of Experiment Botany*, 2010, 61(5): 1537-1546.
- [48] MOLONEY M M, HAMID R H. Expression of somatotropin in plant seeds: United States, US 62 88304B1[P]. 2001-09-11.
- [49] BHATLA S C, KAUSHIK V, YADAV M K. Use of oil bodies and oleosins in recombinant protein production and other biotechnological applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28: 293-300.
- [50] DECKERS H M, GIJS V R, JOSEPH B, et al. Uses of oil bodies: United States, US 6146645[P]. 2000-11-14.