

脂肪酶位置选择性的影响因素

康佳惠子^{1,2}, 王秀秀², 贾敏², 徐同成^{1,2}, 宗爱珍², 杜方岭², 黄凤洪², 尤艳莉¹

(1. 烟台大学 生命科学学院, 山东 烟台 264005; 2. 山东省农业科学院 农产品加工与营养研究所/山东省特殊医学用途配方食品工程技术研究中心/山东省农产品精深加工技术重点实验室/农业农村部新食品资源加工重点实验室, 济南 250100)

摘要:为开发高效、绿色、低成本的脂肪酶应用于结构脂质的制备, 从内源性(脂肪酶的来源、基因序列、空间位阻)和外源性(底物空间结构、反应介质、固定化条件及反应 pH)两方面讨论了脂肪酶位置选择性的影响因素。脂肪酶催化特异性由内源性因素和外源性因素共同决定。改变底物空间结构、反应介质、固定化条件和反应 pH, 常被用作提高脂肪酶催化性能的处理方式。只有充分考虑内外两方面因素的影响, 才能充分提高脂肪酶的位置选择性和催化效率。该综述有望为高选择性脂肪酶的开发开辟新的研究方向, 为后续结构脂质的高效合成提供启发性的研究思路。

关键词:脂肪酶; 位置选择性; 结构脂质

中图分类号: TQ426.97; TQ925+.6 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2023)07-0115-05

Factors affecting the regioselectivity of lipase

KANG Jiahui^{1,2}, WANG Xiuxiu², JIA Min², XU Tongcheng^{1,2}, ZONG Aizhen², DU Fangling², HUANG Fenghong², YOU Yanli¹

(1. School of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, Shandong, China; 2. Institute of Agro-Food Science and Technology/Shandong Engineering Research Center for Formulated Foods for Special Medical Purposes/Key Laboratory of Advanced and Deep Processing Technology of Agricultural Products of Shandong Province/Key Laboratory of New Food Resource Processing of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

Abstract: To develop efficient, green and low-cost lipases for the preparation of structured lipid, the factors affecting lipase regioselectivity were discussed in terms of both endogenous (source of lipase, gene sequence, spatial resistance) and exogenous (substrate spatial structure, reaction medium, immobilization conditions and reaction pH). The lipases catalytic specificity were determined by the endogenous and exogenous factors, and changing the substrate spatial structure, reaction medium, immobilization conditions and reaction pH, were often used as treatment ways to improve the catalytic performance of the lipase. Only by fully considering the effects of both internal and external factors, the regioselectivity and catalytic efficiency could be improved. The summarize is expected to develop new research directions for the development of highly selective lipase and provide enlightening research ideas for the subsequent efficient synthesis of structured lipid.

Key words: lipase; regioselectivity; structured lipid

收稿日期: 2022-04-18; 修回日期: 2023-04-08

基金项目: 泰山学者工程(黄凤洪); 山东省重点研发计划(医用食品)(2019YYSP027)

作者简介: 康佳惠子(1997), 女, 硕士研究生, 研究方向为粮油精深加工与特医食品(E-mail) 1499346847@qq.com。

通信作者: 尤艳莉, 副教授, 博士(E-mail) yanliy2002@163.com。

在当今“大健康”背景下, 结构脂质相关产品的市场前景十分广阔。脂肪酶被广泛用于结构脂质制备, 但有些脂肪酶在催化过程中的位置选择性较差, 限制了高纯度产品的开发、生产效率的提高以及生产成本的降低。经过多年的研究积累, 目前已建立了脂肪酶的立体结构设计、定向诱变等方法以改变脂肪酶

的催化特异性,拓宽了脂肪酶的应用范围。基于此,本文将从内源性和外源性两方面,系统探讨脂肪酶位置选择性的影响因素,以期后续新型脂肪酶的开发和结构脂质的高效合成提供可借鉴的研究思路。

1 脂肪酶位置选择性的内源性影响因素

1.1 脂肪酶的来源

脂肪酶的位置选择性因其来源不同而存在差异,目前工业中使用的脂肪酶大多来自于微生物。已发现的产脂肪酶的细菌属主要有假单胞菌属、芽孢杆菌属和链霉菌属,其次是毛孢子菌属、葡萄球菌属、产碱杆菌属和节杆菌属^[1],且大多数细菌产的脂肪酶具有独特的底物选择性和位置特异性^[2-3],但这种催化特异性并不十分严格。脂肪酶能够利用具有相似性的底物,这种性质有利于形成生物体内脂质结构的多样化^[4]。

研究表明,真菌中的樟绒枝霉(*Malbranchea cinnamomea*)^[5]、米根霉(*Rhizopus oryzae*)^[6]、丝孢酵母菌(*Trichosporon* sp. F1-2)^[7]以及细菌中热嗜淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans* NB501)^[8]、沙雷氏菌属(*Serratia* sp. W3)^[9]合成的脂肪酶能够在甘油三酯(TAG)的Sn-1,3位催化特异性水解反应。腐皮镰孢霉菌(*Fusarium solani* FSL)^[10]表现出Sn-1位特异性。即使有一部分脂肪酶的催化特异性不强,但它们仍能对特定底物或反应位点表现出倾向性,比如来自真菌属的*Candida antarctica*脂肪酶A^[11]、来自*Geotrichum*的脂肪酶^[12]和来自*Staphylococcal*的脂肪酶^[13],虽然它们对TAG上的3个酰基位点都有水解作用,但对Sn-2位的脂肪酸水解效率最高。

1.2 脂肪酶的基因序列

Tong等^[5]首次在巴斯德毕赤酵母中异源表达来自嗜热子囊真菌*Malbranchea cinnamomea*的*MclipA*基因,得到重组蛋白rMclipA,该蛋白在水解TAG时表现出高的Sn-1,3位选择性。Robles-Machuca等^[14]对比了脂肪酶UMLA(PDB ID:3ZPX)和脂肪酶CALA(PDB ID:2VEO)的酶学性质,发现二者具有相似的底物选择性,均对TAG的Sn-2位有明显的选择性。氨基酸序列比对结果显示,二者的序列同源率为67%。Jallouli等^[10]建立同源模型,以禾谷镰刀菌分泌型脂肪酶(FGL,与FSL有67%序列同源性)的3D结构作为最佳模板结构,建立包含该序列的316个残基中的268个残基的模型,结果表明,FSL与FGL有相同的Sn-1位特异性^[15],并发现Ser83和Asp265对酶的Sn-1位催化活性起关键作用。

1.3 脂肪酶的空间位阻

脂肪酶的空间位阻又称立体效应,指分子中某些原子或基团彼此接近而引起的空间阻碍作用,是决定脂肪酶催化活性的关键因素。Yuan等^[16]研究发现,脂肪酶MAJ1和MAS1的序列同源率为41%,但MAS1对于酰基甘油没有位置选择性,MAJ1表现出Sn-1,3位选择性。进一步的氨基酸序列比对和结构分析表明^[17],保守序列中不同氨基酸残基形成了不同的空间位阻,最终影响了脂肪酶的位置选择性。

综上所述,内源性影响因素的本质是编码脂肪酶的基因序列不同,导致脂肪酶种类、空间位阻不同。目前,对于多种脂肪酶基因的克隆表达,已有大量翔实的研究^[18],对这些研究数据进行分析归纳有助于筛选出决定脂肪酶催化特异性的关键基因序列,从而简化新脂肪酶的开发过程。比如,Daniela等^[19]从芽孢杆菌基因组中筛选出潜在的脂肪酶编码序列,并将相应的基因在酵母中过表达,以此得到的脂肪酶Alip2催化效率得到显著提高,且副产物生成量少。另一方面,对于现有的脂肪酶,也可以通过编码关键基因进行定点突变来优化脂肪酶的催化特性。例如,Gai等^[20]对编码脂肪酶(PEL)活性位点附近的环状区域的基因序列进行突变,使底物结合袋的结构发生显著改变,从而提高了对Sn-1,3位的选择性。

2 脂肪酶位置选择性的外源性影响因素

2.1 底物空间结构

Scheib等^[21]对Sn-1,3位选择性米根霉脂肪酶(ROL)结合位点进行改造,通过分子模拟发现,底物Sn-2位基团可以填充到ROL活性位点上的His间隙。当Sn-2位上取代基的柔性较大时,底物与His间隙紧密结合且更易在Sn-1位发生水解反应;当Sn-2位上的取代基是刚性结构时,底物与His间隙的结合程度下降且更易在Sn-3位发生水解反应。由此可见,Sn-2位上取代基的柔性直接影响了ROL对底物的位置选择性。

2.2 反应介质

脂肪酶的“界面激活”模拟图如图1所示。由图1可知,脂肪酶的活性中心通常被一个由 α -螺旋组成的盖子结构所覆盖,当脂肪酶位于油-水界面,盖子结构就会被打开,暴露催化三联体的活性中心,这是脂肪酶独特的“界面激活”性质。脂肪酶所处催化环境通过影响“盖子”的开放程度而影响酶的催化活性^[22-25]。Duan等^[24]研究了溶剂对Novozym 435(固定化的CALB)位置选择性的影响,结果发现,

随着溶剂 $\log P$ (油水分配系数) 的增加, 脂肪酶的水解活力增强, 但对甘油分子中 Sn-1 位羟基的选择性减弱, 对 Sn-2 位羟基的选择性有所增强。

De Lima 等^[25] 使用微乳液液滴作为反应体系, 利用来自洋葱假单胞菌的脂肪酶 (PS, 非特异脂肪酶) 对三辛酸甘油酯进行水解和甘油解, 结果表明, PS 在微乳液体系中, 受水解反应和甘油解反应平衡的影响, 表现出了 Sn-2 位特异性。离子液体是生

物催化的反应介质之一, 可以通过改变液体中阳离子、阴离子和取代基的性质, 来改变脂肪酶的催化水解特性。Guo 等^[26] 研究了南极假丝酵母脂肪酶 B 在离子液体中催化的水解反应, 发现两亲性的四铵基离子液体通过内部传质限制作用和部分相分离影响脂肪酶的催化效果。此外, 离子液体还能够增加反应体系中的水活性, 导致初始反应速率降低, 诱导期延长, 最终使甘油酯的组成比例发生改变。

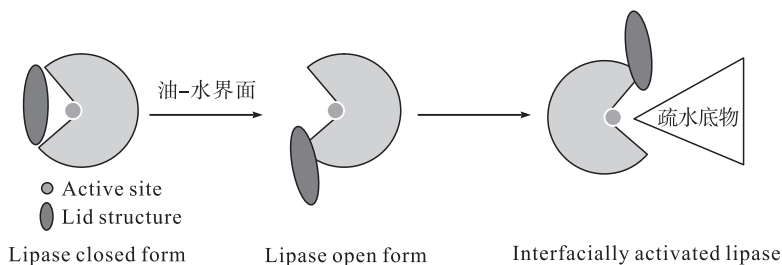


图 1 脂肪酶的“界面激活”模拟图

2.3 固定化条件

目前, 固定化处理已被证明是改进脂肪酶催化特性的有效方法。固定化方法的选择应基于生物催化剂的整体活性、再生特性、固定化试剂的毒性、操作稳定性和固定化处理的成本等因素。针对不同的应用场景应设计不同的固定化方法, 主要包括吸附法、共价法、包埋法和交联法。在固定化过程中, 不同的处理条件对脂肪酶活性中心会产生不同的影响, 影响酶与底物或反应介质之间的相互作用, 进而改变脂肪酶的性质, 例如稳定性、活性、位置选择性等^[27-28]。

Silveira 等^[29] 研究发现, 在不同的固定化条件下, 脂肪酶 TLL 在载体表面表现出不同的活性构型, 导致催化性质发生改变。Wilson 等^[30] 研究发现, 表面活性剂 Triton 存在时, 脂肪酶 QL 以单体的形式被固定化, 当固定化处理过程中不添加 Triton 时, QL 以二聚体的形式被固定化, 而 QL 不同的存在状态使其在载体表面暴露的活性中心不同, 从而在水解反应中表现出不同的对映选择性。

固定化处理不仅能够调控酶的催化性质, 还能够提高脂肪酶的可回收性、稳定性和活性, 具有降低生产成本、提高生产效率的优点, 已经成为酶工业化应用过程中非常重要的一步。

2.4 反应 pH

Cai 等^[31] 使用树脂作为载体固定米曲霉脂肪酶, 探索了酶催化棕榈油硬脂酸与油酸合成 OPO 过程中反应时间、pH、水含量等反应条件对合成效果的影响, 结果发现, 固定化液的 pH 为碱性时会使脂肪酶的区域特异性和合成活性有所增加。可

见反应时的 pH 会影响脂肪酶的位置选择性和活性。

除本文讨论的几种常见影响因素外, 一些新的理论使得脂肪酶催化选择性的研究不再局限于传统思路。例如有研究表明, 利用手性分子印迹纳米颗粒构筑的手性微环境有助于提高催化剂的活性和立体选择性^[32]; 将纳米材料与酶构建成为复合材料, 利用纳米材料的表面拓扑结构、独特的光学、电学性质等, 可以调控酶的催化特性^[33]; 另外, 通过化学修饰, 改变脂肪酶表面的带电性质或亲疏水性, 也可改变酶的对映选择性^[34-35]。

3 总结与展望

脂肪酶的催化特异性由内源性和外源性因素共同决定。其中, 内源性因素是决定脂肪酶位置选择性和催化效率的本质因素, 而调节反应介质、酸碱环境等外源性因素是改善脂肪酶催化特异性的有效手段。因此, 在后续研究过程中, 若要利用脂肪酶制备特定脂肪酸组成的结构脂质, 应充分考虑脂肪酶的种类及催化条件对其位置选择性的影响。另外, 精细可控的合成技术和先进表征手段的开发和进步, 使得脂肪酶研究与其他学科之间的交叉发展成为可能, 有望为高选择性脂肪酶的开发开辟新的研究方向。

在未来发展过程中, 应充分利用蛋白质定向进化技术、计算机模拟及蛋白质工程等技术手段, 在开发新的脂肪酶种类的同时从分子水平揭示决定脂肪酶催化特异性的关键因素, 进而建立一个载有脂肪酶催化特异性信息的“代码库”, 简化高选择性脂肪酶的开发过程, 从而实现突破性的进展。

参考文献:

- [1] GEOFFRY K, ACHUR R N. Optimization of novel halophilic lipase production by *Fusarium solani* strain NFFCL 4084 using palm oil mill effluent[J]. J Genet Eng Biotechnol, 2018, 16(2): 327–334.
- [2] RMILI F, ACHOURI N, SMICHI N, et al. Purification and biochemical characterization of an organic solvent-tolerant and detergent-stable lipase from *Staphylococcus capitis*[J/OL]. Biotechnol Progr, 2019, 35(4): e2833 [2022-04-18]. <https://doi.org/10.1002/btpr.2833>.
- [3] ESTUPI N M, BURUAGA C, PASTOR F I J, et al. Shift in *Bacillus* sp. JR3 esterase LipJ activity profile after addition of essential residues from family I.5 thermophilic lipases[J]. Biochem Eng J, 2019, 144: 166–176.
- [4] HARAYAMA T, RIEZMAN H. Understanding the diversity of membrane lipid composition[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(5): 281–296.
- [5] TONG X, BUSK P K, LANGE L. Characterization of a new sn-1,3-regioselective triacylglycerol lipase from *Malbranchea cinnamomea*[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2016, 63(4): 471–478.
- [6] FERNANDEZ J L, BENAIGES M D, VALERO F. *Rhizopus oryzae* lipase, a promising industrial enzyme: biochemical characteristics, production and biocatalytic applications [J/OL]. Catalysts, 2020, 10(11): 1277 [2022-04-18]. <https://doi.org/10.3390/catal10111277>.
- [7] CAO X, LIAO L, FENG F. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Trichosporon* sp. and its application in enrichment of ω -3 polyunsaturated fatty acids[J/OL]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 118: 108692 [2022-04-18]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108692>.
- [8] YAMADA C, SAWANO K, IWASE N, et al. Isolation and characterization of a thermostable lipase from *Bacillus thermoamylovorans* NB501 [J]. J Appl Microbiol, 2016, 62(6): 313–319.
- [9] EDDEHECH A, RAHIER R, SMICHI N, et al. Heterologous expression, kinetic characterization and molecular modeling of a new sn-1,3-regioselective triacylglycerol lipase from *Serratia* sp. W3[J]. Process Biochem, 2021, 103: 87–97.
- [10] JALLOULI R, OTHMAN H, AMARA S, et al. The galactolipase activity of *Fusarium solani* (phospho) lipase [J]. BBA-Mol Cell Biol L, 2015, 1851(3): 282–289.
- [11] MONTEIRO R R, VIRGEN-ORTIZ J J, BERENQUER-MURCIA Á, et al. Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*[J]. Catal Today, 2021, 362: 141–154.
- [12] OTA Y, SAWAMOTO T, HASUO M. Tributyrin specifically induces a lipase with a preference for the sn-2 position of triglyceride in *Geotrichum* sp. FO401B[J]. Biosci, Biotech Biochem, 2000, 64(11): 2497–2499.
- [13] HORCHANI H, SALEM N B, CHAARI A, et al. *Staphylococcal* lipases stereoselectively hydrolyse the sn-2 position of monomolecular films of diglyceride analogs. Application to sn-2 hydrolysis of triolein[J]. J Colloid Interf Sci, 2010, 347(2): 301–308.
- [14] ROBLES-MACHUCA M, DEL CAMPO M M, CAMACHO-RUIZ M Á, et al. Comparative features between recombinant lipases CALA-like from *U. maydis* and CALA from *C. antarctica* in thermal stability and selectivity [J]. Biotechnol Lett, 2019, 41(2): 241–252.
- [15] LOU Z, LI M, SUN Y, et al. Crystal structure of a secreted lipase from *Gibberella zeae* reveals a novel "double-lock" mechanism [J]. Protein Cell, 1(8): 760–770.
- [16] YUAN D, LAN D, XIN R, et al. Biochemical properties of a new cold-active mono- and diacylglycerol lipase from marine member *Janibacter* sp. strain HTCC2649 [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(6): 10554–10566.
- [17] ZHAO Z, HOU S, LAN D, et al. Crystal structure of a lipase from *Streptomyces* sp. strain W007-implications for thermostability and regiospecificity [J]. FEBS J, 2017, 284(20): 3506–3519.
- [18] 张飞,高秀清,张靖洁,等. 种子特异表达异源 *DGAT1* 基因提高大豆种子含油量和营养品质[J]. 生物工程学报, 2018, 34(9): 1478–1490.
- [19] DANIELA N, R DIGER B, GOTTHARD K, et al. A new lipase (Alip2) with high potential for enzymatic hydrolysis of the diester diethyladipate to the monoester monoethyladipate [J/OL]. Enzyme Microb Technol, 2022, 153: 109898 [2022-04-18]. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109898>.
- [20] GAI Y Z, BAI Q Y, YANG L F, et al. Substitution and mutation of the C-terminal loop domain of *Penicillium expansum* lipase significantly changed its regioselectivity and activity[J/OL]. Biochem Eng J, 2022, 179: 108313 [2022-04-18]. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108313>.
- [21] SCHEIB H, PLEISS J, STADLER P, et al. Rational design of *Rhizopus oryzae* lipase with modified stereoselectivity toward triacylglycerols[J]. Protein Eng, 1998, 11(8): 675–682.
- [22] JAKUB Z, ANNE M, TEOFIL J, et al. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility [J/OL]. Catalysts, 2018, 8(2): 92 [2022-04-18]. <https://doi.org/10.3390/catal8020092>.
- [23] RODRIGUES R C, VIRGEN-ORTIZ J J, SANTOS J D, et

- al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions[J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(5): 746 – 770.
- [24] DUAN Z Q, DU W, LIU D H. The mechanism of solvent effect on the positional selectivity of *Candida antarctica* lipase B during 1,3 – diolein synthesis by esterification [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102 (23): 11048 – 11050.
- [25] DE LIMA A P D, ASCHENBRENNER E M, OLIVEIRA S D N, et al. Towards regioselective enzymatic hydrolysis and glycerolysis of tricaprylin in miniemulsion and the direct preparation of polyurethane from the hydrolysis products[J]. *J Mol Catal B – Enzym*, 2013, 98: 127 – 137.
- [26] GUO Z, XU X. Lipase – catalyzed glycerolysis of fats and oils in ionic liquids: a further study on the reaction system [J]. *Green Chem*, 2006, 8(1): 54 – 62.
- [27] BILAL M, ASGHER M, CHENG H, et al. Multi – point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2019, 39(2): 202 – 219.
- [28] LÓPEZ – GALLEGO F, FERNANDEZ – LORENTE G, ROCHA – MART N J, et al. Multi – point covalent immobilization of enzymes on glyoxyl agarose with minimal physico – chemical modification: stabilization of industrial enzymes [M]// GUISAN J, BOLIVAR J, LÓPEZ – GALLEGO F, et al. Immobilization of enzymes and cells. *Methods in molecular biology*. New York: Humana Press, 2020: 93 – 107.
- [29] SILVEIRA E A, MORENO – PEREZ S, BASSO A, et al. Modulation of the regioselectivity of *Thermomyces lanuginosus* lipase via biocatalyst engineering for the ethanolysis of oil in fully anhydrous medium [J]. *BMC Biotechnol*, 2017, 17(1): 1 – 13.
- [30] WILSON L, PALOMO J M, FERN NDEZ – LORENTE G, et al. Effect of lipase – lipase interactions in the activity, stability and specificity of a lipase from *Alcaligenes* sp. [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39 (2): 259 – 264.
- [31] CAI H, LI Y, ZHAO M, et al. Immobilization, regiospecificity characterization and application of *Aspergillus oryzae* lipase in the enzymatic synthesis of the structured lipid 1, 3 – dioleoyl – 2 – palmitoylglycerol [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133857 [2022 – 04 – 18]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133857>.
- [32] LI X, ZHAO Y. Chiral gating for size – and shape – selective asymmetric catalysis [J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(35):13749 – 13752.
- [33] LIN Y, CHEN Z, LIU X Y. Using inorganic nanomaterials to endow biocatalytic systems with unique features [J]. *Trends Biotechnol*, 2016, 34(4):303 – 315.
- [34] 徐超, 薛誉, 陈虹月, 等. 手性脯氨酸类离子液体化学修饰猪胰脂肪酶催化性能研究 [J]. *化工学报*, 2019 (6): 2221 – 2228.
- [35] KACZMAREK M B, STRUSZCZYK – SWITA K, LI X, et al. Enzymatic modifications of chitin, chitosan, and chitooligosaccharides [J/OL]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 243 [2022 – 04 – 18]. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00243>.

(上接第 102 页)

- [2] 张文君, 孙文早, 胡绍波, 等. 恩格列净、利拉鲁肽与二甲双胍治疗新发 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝的临床疗效及对血清炎症因子、D – 二聚体及肝功能的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2021, 20(8): 834 – 838.
- [3] 史子敏. 脂肪肝发病率的调查与病因分析 [J]. *山东医药*, 2009, 49(44): 110.
- [4] 脂肪肝发病率 5 年增加 50 倍 [J]. *中国社区医师*, 2010, 26(20): 10.
- [5] 余双彬, 俞梦璐, 陈曦, 等. 四川省绵阳市成人脂肪肝流行现况及其代谢异常情况分析 [J]. *中国医学科学院学报*, 2019, 41(3): 323 – 330.
- [6] 陈植. *观赏树木学* [M]. 增订版. 北京: 中国林业出版社, 1984: 425.
- [7] 丁玉杰. 中药丹参联合陈皮、柴胡治疗脂肪肝的效果 [J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2019, 7(21): 159.
- [8] 中国科学院植物研究所. *中国植物志: 47 卷 1 分册* [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 54.
- [9] 吴亮, 付佳佳. 栎树属植物种质资源研究进展 [J]. *河北农机*, 2016(6): 22 – 23.
- [10] 曹丽敏, 骆金艳, 贺金, 等. 复羽叶栎树种仁的脂肪酸及氨基酸组成分析 [J]. *中国油脂*, 2020, 45(4): 134 – 137.
- [11] 杨占奎. 柴胡三合汤治疗脂肪肝疗效分析 [J]. *世界临床医学*, 2016, 10(6): 174.
- [12] 林嘉荣, 郑慰武, 曾贵兴, 等. 金花清感颗粒治疗新型冠状病毒肺炎网络药理学研究 [J]. *中药材*, 2020, 43(8): 2070 – 2076.
- [13] 王辉敏, 李冠文, 杨金梅, 等. 多不饱和脂肪酸降脂作用机理的研究进展 [J]. *中国油脂*, 2023, 48(5): 82 – 86, 93.