

辣木籽凝乳酶的提取分离条件优化

吴改转¹, 庄玺¹, 王雪峰^{1,2}, 黄艾祥¹

(1. 云南农业大学 食品科学技术学院, 昆明 650201; 2. 云南省畜产品加工工程技术研究中心, 昆明 650201)

摘要:为给辣木籽凝乳酶的开发利用提供理论依据,以脱脂辣木籽粉为原料,采用盐法提取、硫酸铵(AS)分级沉淀和离子交换色谱法提取分离凝乳酶。通过单因素试验和正交试验对辣木籽凝乳酶的盐法提取条件进行优化,采用单因素试验对离子交换色谱法分离纯化条件进行优化,并采用 SDS-PAGE 和 RP-HPLC 对分离得到的辣木籽凝乳酶的分子质量和纯度进行分析。结果表明:盐法提取的最佳条件为料液比 1:10、提取温度 30℃、pH 7.15、NaCl 浓度 0.3 mol/L、提取时间 0.5 h;在 20%~40% AS 饱和度下的沉淀蛋白凝乳活性最好且蛋白质总占有率达 61.71%;离子交换色谱法的最佳分离条件为进样质量浓度 30 mg/mL、流动相 pH 5.15、流速 1.68 mL/min、流动相组成为 0.05 mol/L 醋酸钠+0.05 mol/L 氯化钠,在此条件下辣木籽凝乳酶的凝乳比活力值达到 24 SU/mg;该凝乳酶的分子质量主要分布在 35~45 kDa,纯度达到 90% 以上。采用该方法能有效提取分离辣木籽凝乳酶,且能很好地保持其凝乳活性。

关键词:辣木籽;凝乳酶;硫酸铵分级沉淀;离子交换色谱法;凝乳活性;SDS-PAGE

中图分类号:TS201.2;TS222 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2023)07-0137-07

Optimization of extraction and separation conditions of milk-clotting protease from *Moringa oleifera* seeds

WU Gaizhuan¹, ZHUANG Xi¹, WANG Xuefeng^{1,2}, HUANG Aixiang¹

(1. School of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Yunnan Animal Products Processing Engineering Technology Research Center, Kunming 650201, China)

Abstract: To provide theoretical basis for the development and utilization of milk-clotting protease from *Moringa oleifera* seeds, the milk-clotting protease were extracted from defatted *Moringa oleifera* seed powder by salt method, and separated by ammonium sulfate (AS) fractional precipitation and ion exchange chromatography. The salt extraction conditions of milk-clotting protease from *Moringa oleifera* seeds were determined by single factor experiment and orthogonal experiment, and the ion exchange chromatography separation conditions were optimized by single factor experiment. The molecular weight and purity of the milk-clotting protease from *Moringa oleifera* seeds were analyzed using SDS-PAGE and RP-HPLC. The results showed that the optimal extraction conditions of salt method were obtained as follows: solid-liquid ratio 1:10, extraction temperature 30℃, pH 7.15, sodium chloride concentration 0.3 mol/L and extraction time 0.5 h. Under 20%~40% AS saturation, the precipitated protein had the

best milk coagulating activity and the total percentage of extracted protein reached 61.71%. The optimal separation conditions of ion exchange chromatography were obtained as follows: injection mass concentration 30 mg/mL, mobile phase pH 5.15, flow rate 1.68 mL/min, and mobile phase consisted of 0.05 mol/L sodium acetate and 0.05 mol/L sodium chloride. Under these conditions, the milk coagulating specific activity value of the

收稿日期:2022-04-18;修回日期:2023-04-07

基金项目:国家自然科学基金地区项目(31560431);云南省高校食品加工与安全控制重点实验室开放基金(YJK[2014]16KF03);云南省现代农业奶牛产业技术体系资助项目(2019KJTX0014)

作者简介:吴改转(1997),女,硕士研究生,研究方向为植物凝乳酶资源的挖掘与利用(E-mail)3106164507@qq.com。

通信作者:王雪峰,副教授,博士(E-mail)364135728@qq.com。

milk-clotting from *Moringa oleifera* seeds reached 24 SU/mg. The molecular weight of milk-clotting protease was mainly distributed in the range of 35–45 kDa, and the purity was over 90%. This method can effectively extract and separate milk-clotting protease from *Moringa oleifera* seeds, and maintain its milk coagulating activity well.

Key words: *Moringa oleifera* seeds; milk-clotting protease; ammonium sulfate fractional precipitation; ion exchange chromatography; milk coagulating activity; SDS-PAGE

辣木(*Moringa oleifera*)又称鼓槌树,为辣木科辣木属多年生热带落叶乔木,原产于印度北部^[1]。辣木在我国也有大量种植,主要分布在云南、福建、广东等省^[2],目前,云南省辣木总种植面积约1 533 hm²,主要分布在楚雄、红河、西双版纳、临沧、保山、德宏、普洱、丽江等州(市)^[3]。辣木籽是辣木的种子,含有丰富的营养成分^[4],其中油脂含量高达40%^[5],总糖含量为6.9%~9.5%^[6],蛋白质含量为37.8%^[7]。近年来,对辣木籽的研究和开发利用主要集中在辣木籽营养成分的提取分离、化学成分分析和药理作用研究等方面。和丽等^[8]使用反胶束法提取辣木籽蛋白,提取率为58.5%;唐诗琦等^[9]采用响应面法优化辣木籽蛋白提取工艺,结果表明,最佳提取条件为pH 8.0、提取时间45 min、提取温度44℃、超声功率150 W,在此条件下辣木籽蛋白提取率为44.03%。

凝乳酶是干酪加工中的必需酶制剂,其对干酪的品质有重要影响^[10]。目前,凝乳酶可来源于动物、植物和微生物,其中,小牛皱胃酶是最为常用的商业凝乳酶,但其来源有限^[11]。随着干酪需求量的日渐增加,急需寻找新的凝乳酶替代品。植物源凝乳酶因其资源丰富、提取方便等优点,已成为国内外的研究热点^[12]。已有从辣木籽中提取凝乳酶的报道^[13],课题组前期研究也发现,辣木籽粗提物以脱脂乳为底物表现出凝乳活性,说明其含有凝乳酶,且加工成的干酪产品品质较好,因此辣木籽凝乳酶具有潜在的应用前景。

本文以脱脂辣木籽粉为原料,通过盐法提取、硫酸铵(AS)分级沉淀和离子交换色谱法提取分离辣木籽凝乳酶,并采用单因素试验和正交试验对提取分离条件进行优化,以期后续辣木籽凝乳酶的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

辣木籽,云南省德宏傣族景颇族自治州芒市天佑辣木岛云南天佑科技开发有限公司;脱脂奶粉,市

售;Q Sepharose FF 强阴离子交换树脂,北京博尔西科技有限公司。

硫酸铵、氯化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、冰乙酸、氢氧化钠、无水乙酸钠、氯化钾,分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司;酪蛋白,上海源叶生物有限公司;甲醇,色谱纯,四川西陇化工有限公司;乙腈,色谱纯,默克股份两合公司。

1.1.2 仪器与设备

FD-1A-50 真空冷冻干燥机,上海比朗仪器制造有限公司;超临界CO₂萃取装置,上海震樾机电科技发展有限公司;高速万能粉碎机,北京中兴伟业仪器有限公司;RE-52A1A 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;HH-6 数显恒温水浴锅,国华电器有限公司;电子天平,奥豪斯仪器(常州)有限公司;DT5-2 离心机,上海安亭科学仪器厂;磁力搅拌器,常州澳华仪器有限公司;EPED-ESL-10TH 超纯水机,南京易普易达科技发展有限公司;UV-6100S 分光光度计,上海元析仪器有限公司;STARTER3100 pH 计,奥豪斯仪器(上海)有限公司;SBS-100 自动部分收集器,上海沪西分析仪器厂有限公司;DYY-6C 电泳仪,北京六一仪器厂;Agilent1200 高效液相色谱仪,安捷伦(中国)科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 脱脂辣木籽粉的制备

参考段琼芬等^[14]的方法,将辣木籽用粉碎机粉碎,过0.25 mm(60目)筛,称取辣木籽粉,通过超临界CO₂萃取装置在萃取压力30 MPa、分离温度40℃的条件下脱脂处理得到脱脂辣木籽粉(蛋白质含量为49.26%)。

1.2.2 辣木籽凝乳酶的提取

参考赵琼等^[15]的方法并进行部分修改。将脱脂辣木籽粉与NaCl溶液按一定比例混匀,用柠檬酸或1 mol/L的NaOH溶液调pH,在一定温度下水浴提取一定时间后,过滤得到粗酶液。按照硫酸铵饱和度为0~20%、20%~40%、40%~60%对粗酶液进

行分级沉淀^[16]:量取一定体积的粗酶液,使用磁力搅拌器在转速 500 r/min 的条件下缓慢加入干燥至恒重的硫酸铵至饱和度分别为 20%、40%、60%,分别在 4℃ 冰箱中放置 30 min。在 4 500 r/min 的高速离心机中离心 15 min,取沉淀,溶解在水中,透析 48 h(透析袋规格为 3.5 kDa),经真空冷冻干燥,获得不同硫酸铵饱和度的辣木籽凝乳酶粗提物,在 -40℃ 下保存。

1.2.3 辣木籽凝乳酶的分离纯化

参照文献[17]采用离子交换色谱法对辣木籽凝乳酶进行分离纯化,将辣木籽凝乳酶粗提物用流动相溶解,上样于强阴离子交换树脂层析柱中,经自动部分收集器收集,每管 150 滴,收集 100 管,在 280 nm 处测定吸光度,合并有吸收峰的管数,冷冻干燥,得到辣木籽凝乳酶纯化物。

1.2.4 SDS-PAGE 分析

分别称取 5 mg 辣木籽凝乳酶粗提物及纯化物于 2 mL 离心管中,超声振荡 3 min 使之溶解,得样品溶液。参照 Arbita 等^[18]的方法配制 5 × 电泳缓冲液、固定液(30% 甲醇)、染色液(G-250)、脱色液等电泳相关溶液。取一定量的样品溶液,按体积比 4:1 与上样缓冲液混合,配制成 1 mL 的溶液后摇匀,95℃ 金属浴 10 min 后,进行 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 分析条件:12% 分离胶和 4% 浓缩胶;样品上样量 10 μL;浓缩胶恒压 50 V 约 30 min,分离胶恒压 120 V 约 90 min。SDS-PAGE 完成后,依次对电泳胶片进行固定、染色、脱色,利用凝胶成像系统对凝胶拍照分析。

1.2.5 纯度测定

参照文献[19]的方法,分别将辣木籽凝乳酶粗提物和纯化物用超纯水配制成 10 mg/mL 的溶液,经 0.45 μm 微滤膜抽滤,滤液进行 HPLC 分析。HPLC 分析条件:Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 反相硅胶柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温 35℃;检测波长 280 nm;流速 0.4 mL/min;进样量 20 μL;分析时间 30 min;流动相 A 相为 0.1% 三氟乙酸 + 100% 乙腈,B 相为 0.1% 三氟乙酸 + 100% 纯水,梯度洗脱程序见表 1。根据样品峰的峰面积与总峰面积的比值计算其纯度。

表 1 流动相的梯度洗脱程序

洗脱时间/min	A 相/%	B 相/%
0~0.01	10	90
0.01~20.0	100	0
20.0~30.0	100	0

1.2.6 蛋白质含量测定

蛋白质含量根据 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中的凯氏定氮法进行测定。蛋白质提取率为样品中蛋白质质量与原料中蛋白质质量的比值。

1.2.7 凝乳活力值的测定

凝乳活力值的测定采用 Arima 等^[20]的方法。称取 40 mg 凝乳酶粗提物或纯化物,加入 1 mL 超纯水溶解制备凝乳酶液。称取 10 g 脱脂奶粉于 100 mL 蒸馏水中制成乳液,取 2 mL 脱脂奶粉乳液放入 60℃ 恒温水浴锅,待乳液中心温度达到 60℃ 时加入 1 mL 凝乳酶液,充分混匀后继续水浴。准确记录凝乳酶液从加入到乳液完全凝固的时间。凝乳活力值(MCA)定义为凝结 40 min 的 1 mL 脱脂乳液的酶量(凝乳酶液用量)为一个索氏单位[Soxhlet 单位(SU)],其计算见式(1)。

$$A = \frac{2400}{T} \times \frac{2}{1} \quad (1)$$

式中:A 为凝乳活力,SU;T 为凝乳时间,s。

凝乳比活力值(MCSA)为凝乳活力值与凝乳酶质量的比值。

1.2.8 数据分析

每次测定均重复 3 次,结果表示为“平均值 ± 标准偏差”,使用 SPSS 20.0、Excel 进行数据分析和图表处理。

2 结果与分析

2.1 辣木籽凝乳酶盐法提取条件的优化

2.1.1 单因素试验

以料液比 1:10、NaCl 浓度 0.3 mol/L、提取时间 0.5 h、提取温度 30℃、pH 7.15 为基础条件提取得到粗酶液,以蛋白质提取率和 MCA 为指标,选择逐步优化的方式考察料液比、NaCl 浓度、提取时间、提取温度、pH 对辣木籽凝乳酶提取效果的影响,结果如图 1 所示。

由图 1 可以看出:随着料液比的增大,蛋白质提取率和 MCA 均呈现下降的趋势,当料液比为 1:10 时蛋白质提取率和 MCA 均达到最大;随着 NaCl 浓度的增加,蛋白质提取率上升,当 NaCl 浓度为 0.15 mol/L 时,蛋白质提取率达到最大,且 MCA 较大(与 NaCl 浓度为 0.05 mol/L 时相比变化不大),为 1.37 SU,继续增加 NaCl 浓度,蛋白质提取率降低,MCA 快速下降,另外 NaCl 浓度过大会影响蛋白质的纯化,因此选取 NaCl 的最佳浓度为 0.15 mol/L,该结果与施娅楠等^[21]研究中 NaCl 浓度对辣木叶凝乳酶的提取条件优化结果一致;蛋白质提取率及 MCA 随

着提取时间的延长均先上升后下降,当提取时间为 1 h 时,蛋白质提取率和 MCA 均达到最大,但与 0.5 h 时相差不大,且考虑到长时间的提取会增大成本,降低效率,选取最佳提取时间为 0.5 h;在 15 ~ 25 °C 范围内,随着提取温度的升高,蛋白质提取率和 MCA 逐渐升高,当提取温度为 25 °C 时,蛋白质提取率和 MCA 均达到最大,但当提取温度高于 25 °C 时蛋白质提取率及 MCA 明显下降,可能由于温度过高

导致凝乳酶失活,且在奶酪的应用中较高温度下凝块硬化速度过快,以至于随后的切割也会比较困难^[22],所以确定最佳提取温度为 25 °C;蛋白质提取率和 MCA 均随着 pH 的增大而先增后减,在 pH 为 6.15 时蛋白质提取率和 MCA 达到最大,但随着 pH 进一步增大这两项指标又下降,可能原因是当 pH 大于 8.15 时,酶在碱性条件下发生构象变化造成酶的凝乳活性基本丧失^[23],故选取最佳 pH 为 6.15。

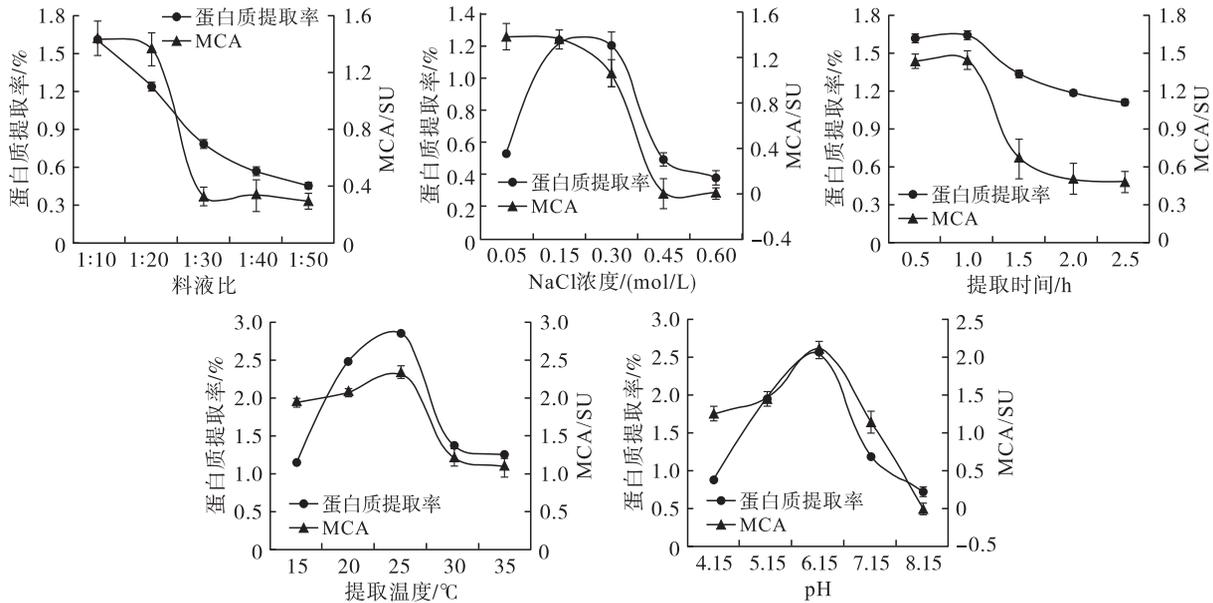


图1 料液比、NaCl 浓度、提取时间、提取温度、pH 对蛋白质提取率及 MCA 的影响

2.1.2 正交试验

根据单因素试验结果,固定提取时间为 0.5 h,以料液比、提取温度、pH、NaCl 浓度为考察因素,以蛋白质提取率和 MCA 为指标,采用正交试验对辣木籽凝乳酶的盐法提取条件进行优化,正交试验因素水平见表 2,正交试验设计及结果见表 3。

表 2 正交试验因素水平

水平	A 料液比	B 提取温度/°C	C pH	D NaCl 浓度/(mol/L)
1	1:10	20	5.15	0.05
2	1:20	25	6.15	0.15
3	1:30	30	7.15	0.30

表 3 正交试验设计与结果

试验号	A	B	C	D	蛋白质提取率/%	MCA/SU
1	1	1	1	1	1.46	2.30
2	1	2	2	2	3.14	1.17
3	1	3	3	3	3.51	2.50
4	2	1	2	3	1.71	1.25
5	2	2	3	1	1.16	0.73
6	2	3	1	2	1.81	1.31

续表 3

试验号	A	B	C	D	蛋白质提取率/%	MCA/SU
7	3	1	3	2	0.93	0.51
8	3	2	1	3	1.41	0.57
9	3	3	2	1	0.55	0.58

蛋白质提取率

k_1	2.70	1.37	1.56	1.06
k_2	1.56	1.90	1.80	1.96
k_3	0.96	1.96	1.87	2.21
R	1.74	0.59	0.31	1.15

MCA

k_1	1.99	1.35	1.39	1.20
k_2	1.09	0.82	1.00	1.00
k_3	0.55	1.46	1.25	1.44
R	1.44	0.64	0.39	0.44

由表 3 可知:各因素对蛋白质提取率的影响大小依次为 A > D > B > C,即料液比 > NaCl 浓度 > 提取温度 > pH,最佳提取工艺条件为 A₁B₃C₃D₃;各因素对 MCA 的影响大小依次是 A > B > D > C,即料液比 > 提取温度 > NaCl 浓度 > pH,最佳提取工艺条件为 A₁B₃C₁D₃。从 R 值来看,pH 对蛋白提取率及

MCA的影响都较小,为了保证较高的蛋白质提取率,综合考虑选取盐法提取辣木籽凝乳酶的最佳工艺条件为 $A_1B_3C_3D_3$,即料液比 1:10、提取温度 30℃、pH 7.15、NaCl 浓度 0.3 mol/L,在该条件下蛋白质提取率和 MCSA 分别为 3.51%、2.50 SU。但该工艺条件下蛋白质提取率仍较低,有待进一步优化。

2.2 硫酸铵饱和度的确定

硫酸铵沉淀法沉淀蛋白质不易使蛋白质变性。在料液比 1:10、提取温度 30℃、pH 7.15、NaCl 浓度 0.3 mol/L、提取时间 0.5 h 条件下提取得到粗酶液,测定不同饱和度硫酸铵沉淀的辣木籽凝乳酶粗提物的凝乳活力和蛋白质占有率,结果见表 4。

由表 4 可知:硫酸铵饱和度为 0~20% 时,蛋白质占有率为 22.30%,但 MCSA 为 0;当硫酸铵饱和度为 20%~40% 时,蛋白质占有率最大,为 61.71%,MCSA 最高,为 12.50 SU/mg;当硫酸铵饱和度为 40%~60% 时,蛋白质占有率为 15.99%,MCSA 为 11.54 SU/mg。综上,选择硫酸铵饱和度

为 20%~40% 沉淀的辣木籽凝乳酶粗提物进行后续分离纯化。

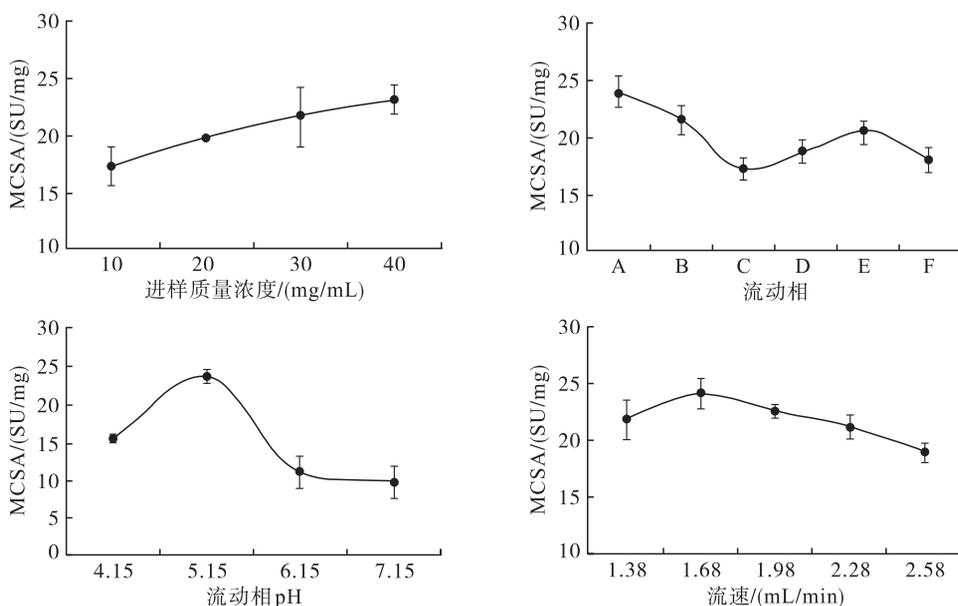
表 4 不同硫酸铵饱和度下辣木籽凝乳酶粗提物的蛋白质占有率和 MCSA

硫酸铵饱和度/%	蛋白质占有率/%	MCSA/(SU/mg)
0~20	22.30±0.56 ^b	0
20~40	61.71±0.83 ^a	12.50±0.51 ^a
40~60	15.99±0.76 ^c	11.54±0.33 ^a

注:同列上标相同字母表示差异不显著($p > 0.05$),不同字母表示差异显著($p < 0.05$)

2.3 辣木籽凝乳酶分离条件的优化

以 MCSA 为指标,以初始进样质量浓度 10 mg/mL、流动相为 0.1 mol/L 的醋酸钠+0.05 mol/L 氯化钠、流动相 pH 5、流速 1 mL/min 为基础条件,采用步步优化的方式考察进样质量浓度、流动相组成、流动相 pH 及流速对辣木籽凝乳酶分离效果的影响,结果见图 2。



注:A. 0.05 mol/L 醋酸钠+0.05 mol/L 氯化钠;B. 0.1 mol/L 醋酸钠+0.05 mol/L 氯化钠;C. 0.1 mol/L 醋酸钠+0.1 mol/L 氯化钠;D. 0.2 mol/L 醋酸钠+0.05 mol/L 氯化钠;E. 0.2 mol/L 醋酸钠+0.1 mol/L 氯化钠;F. 0.2 mol/L 醋酸钠+0.2 mol/L 氯化钠

图 2 进样质量浓度、流动相、流动相 pH 及流速对 MCSA 的影响

离子交换色谱是依据待测样品各组分所带电荷不同,并与固定相上的离子交换基团相互作用的程度不同而实现各组分分离^[24]。由图 2 可知:进样质量浓度增加时,MCSA 也相应增大,在保持较好的 MCSA 前提下,还要保证良好的分离效果,故选取进样质量浓度为 30 mg/mL 作为最佳进样质量浓度;不同的流动相组成对 MCSA 有一定影响,流动相为 0.05 mol/L 醋酸钠+0.05 mol/L 氯化钠时,MCSA

最高;流动相 pH 对 MCSA 的影响较大,随着流动相 pH 的增加,MCSA 先增后减,当流动相 pH 为 5.15 时 MCSA 达到最大;流速同样对凝乳酶的分离效果产生影响,随着流速的增加 MCSA 先增后减,在流速为 1.68 mL/min 时,MCSA 达到最大。因此,确定强阴离子交换色谱纯化辣木籽凝乳酶的最佳条件为进样质量浓度 30 mg/mL、流动相 pH 5.15、流速 1.68 mL/min 和流动相为 0.05 mol/L 醋酸钠+0.05 mol/L

氯化钠,在该条件下所得辣木籽凝乳酶的 MCSA 达到 24 SU/mg,相较于 20% ~ 40% 饱和度硫酸铵沉淀的辣木籽凝乳酶粗提物的有明显提高(见表 2)。

2.4 SDS-PAGE 分析

采用 SDS-PAGE 分析辣木籽凝乳酶粗提物和纯化物的蛋白质分布情况,结果如图 3 所示。由于进行的是大分子凝胶电泳,发现电泳图底部有大量蛋白堆积,其主要原因是存在一些小分子蛋白或蛋白肽。从图 3 可以看出,辣木籽凝乳酶粗提物有 3 个主要条带及 10 kDa 以下的小分子蛋白,而经过离子交换色谱分离得到的凝乳酶只有 1 个主要条带及 10 kDa 以下的小分子蛋白,其 10 kDa 以上分子质量主要介于 35 ~ 45 kDa 之间。因此,可以确定由离子交换色谱分离的凝乳酶分子质量主要集中在 35 ~ 45 kDa 之间。

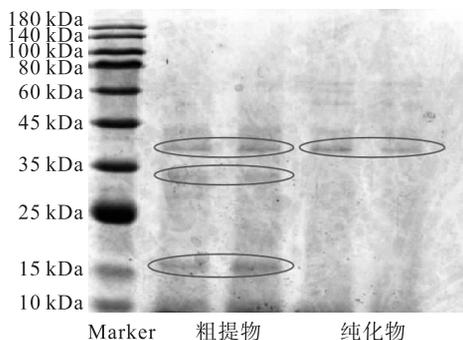


图 3 辣木籽凝乳酶粗提物和纯化物的 SDS-PAGE 图

2.5 RP-HPLC 分析

辣木籽凝乳酶粗提物和纯化物的 RP-HPLC 图见图 4。

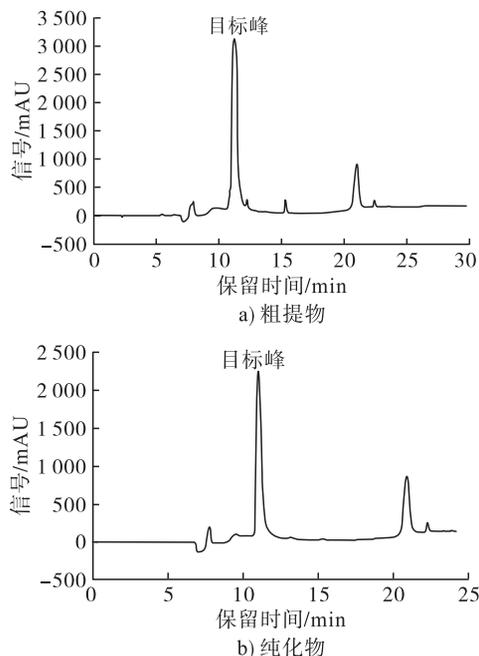


图 4 辣木籽凝乳酶粗提物和纯化物的 RP-HPLC 图

从图 4 可以看出,在辣木籽凝乳酶粗提物的 RP-HPLC 图中,除了溶剂峰以外,在目标峰的两侧还有杂峰,且有部分杂峰与目标峰相连,说明杂蛋白较多,需要继续分离。辣木籽凝乳酶纯化物的 RP-HPLC 图中目标峰附近几乎没有杂峰,与 SDS-PAGE 分析结果吻合,说明辣木籽凝乳酶分离效果较好。经测定,辣木籽凝乳酶纯化物的纯度达到 90% 以上。

3 结论

本试验以脱脂辣木籽粉为原料,通过盐法提取、硫酸铵分级沉淀和离子交换色谱法分离纯化获得具有良好凝乳活性的凝乳酶。通过单因素试验及正交试验优化得到最佳的盐法提取工艺条件为料液比 1:10、提取温度 30℃、pH 7.15 和 NaCl 浓度 0.3 mol/L、提取时间 0.5 h,在此条件下得到的辣木籽凝乳酶粗提物蛋白质提取率为 3.15%,凝乳活力为 2.50 SU;将最佳盐法提取条件下得到的粗酶液,用饱和度为 20% ~ 40% 的硫酸铵进行沉淀蛋白后用于分离纯化,离子交换色谱最佳分离纯化条件为进样质量浓度 30 mg/mL、流动相 pH 5.15、流速 1.68 mL/min 和流动相成分为 0.05 mol/L 醋酸钠 + 0.05 mol/L 氯化钠,在该条件下所得辣木籽凝乳酶的 MCSA 达到 24 SU/mg,分子质量主要分布在 35 ~ 45 kDa,纯度达到 90% 以上。

参考文献:

- [1] 刘昌芬,李国华. 辣木的营养价值[J]. 热带农业科技, 2004(1):4-7,29.
- [2] 杨豪,刘晓雪,苏海冉,等. 响应面法优化辣木叶蛋白提取工艺及凝集活性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(6):150-157.
- [3] 黄洁. 云南省辣木产业发展现状及趋势[J]. 农村实用技术, 2018(12):24-25.
- [4] WANG X F, HE L, ZHAO Q, et al. Structural analysis of a novel aspartic-type endopeptidase from *Moringa oleifera* seeds and its milk-clotting properties[J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(26):7377-7387.
- [5] 樊建麟,邵金良,叶艳萍,等. 辣木籽营养成分含量测定[J]. 中国食物与营养, 2016, 22(5):69-72.
- [6] 苏瑶,赵一鹤,冯武,等. 云南引种辣木籽营养成分分析与评价[J]. 西部林业科学, 2015, 44(4):142-145, 149.
- [7] 杨东顺,樊建麟,邵金良,等. 辣木不同部位主要营养成分及氨基酸含量比较分析[J]. 山西农业科学, 2015, 43(9):1110-1115.
- [8] 和丽,吴君瑞,王雪峰,等. 反胶束法提取辣木籽蛋白工艺优化[J]. 中国油脂, 2021, 46(7):80-85, 98.
- [9] 唐诗琦,刘小玲,林莹,等. 响应面法优化辣木籽蛋白质提取工艺的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2020(2):34-41.

(下转第 152 页)