

辣木籽醒酒肽的酶解制备工艺优化

彭宇航, 孙立, 杨果果, 孙爱娣, 张璐, 王雪峰

(云南农业大学 食品科学技术学院, 昆明 650201)

摘要: 旨在促进辣木籽醒酒肽的开发利用, 以辣木籽蛋白粉为原料, 蛋白水解度和辣木籽醒酒肽的乙醇脱氢酶(ADH)激活率为考察指标, 采用单因素实验和响应面法优化辣木籽醒酒肽的制备工艺。结果表明, 辣木籽醒酒肽制备的最佳酶解工艺条件为料液比 1:20、碱性蛋白酶添加量 5.0%、酶解 pH 9.0、酶解温度 63℃、酶解时间 142 min, 在此条件下辣木籽蛋白水解度为 12.23%, 辣木籽醒酒肽的 ADH 激活率为 22.16%。综上, 以辣木籽为原料制备醒酒肽具有良好的发展前景。

关键词: 辣木籽; 醒酒肽; 水解度; ADH 激活率

中图分类号: TS229; TS222+.1 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2024)06-0042-06

Optimization of enzymatic hydrolysis preparation process of *Moringa oleifera* seed sobering peptide

PENG Yuhang, SUN Li, YANG Guoguo, SUN Aidi,
ZHANG Lu, WANG Xuefeng

(College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: To promote the development and utilization of *Moringa oleifera* seed sobering peptide, *Moringa oleifera* seed protein powder was used as raw material, and the hydrolysis degree of protein and the alcohol dehydrogenase (ADH) activation rate of sobering peptide were used as indicators, single factor experiment and response surface methodology were used to optimize the preparation process of *Moringa oleifera* seed sobering peptide. The results showed that the optimum enzymatic hydrolysis conditions for the preparation of *Moringa oleifera* seed sobering peptide were as follows: solid-liquid ratio 1:20, addition amount of alkaline protease 5.0%, enzymatic hydrolysis pH 9.0, enzymatic hydrolysis temperature 63℃, and enzymatic hydrolysis time 142 min. Under these conditions, the hydrolysis degree of *Moringa oleifera* seed protein was 12.23%, and the ADH activation rate of *Moringa oleifera* seed sobering peptide was 22.16%. In conclusion, the preparation of sobering peptide from *Moringa oleifera* seed has a good prospect for development.

Key words: *Moringa oleifera* seed; sobering peptide; hydrolysis degree; ADH activation rate

辣木(*Moringa oleifera*), 又称鼓槌树, 因其根部具有辛辣味而得名^[1]。辣木原产于印度, 在我国热带和亚热带地区均有种植, 其中以云南省种植最多。

收稿日期: 2023-11-28; 修回日期: 2024-03-14

基金项目: 国家自然科学基金地区项目(31960462); 云南省农业联合专项(202101BD070001-013); 云南省科协第三届青年科技人才托举工程项目

作者简介: 彭宇航(2001), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物蛋白资源利用(E-mail)3175539207@qq.com。

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

辣木的根、茎、种子等部位均含有多种有效功能成分, 具有降胆固醇、降血压、增强机体免疫力等生理功效^[2]。辣木籽还具有丰富的营养价值^[3], 其蛋白质含量高达 37.8%^[4], 已有以辣木籽蛋白为原料制备具有抗氧化、抗菌等功能的生物活性肽的研究^[5-6]。因此, 辣木籽具有重要的开发利用价值。目前, 我国对辣木的研究还在初步阶段, 已有的辣木相关产品附加值低, 无法充分利用辣木资源, 并且关于辣木籽的研究较少^[5]。因此, 还需加大辣木籽的研发力度, 提高辣木籽蛋白资源的利用度。

醒酒肽,是一种具有解酒功能的生物活性肽,通常由多个氨基酸组成的寡肽构成,如二肽、环形肽以及更加复杂的结构^[7]。大量的体外试验、体内试验研究发现,醒酒肽通过直接参与酒精代谢过程,从中调节相关酶活性,以及改变酒精进入人体后的许多反应来发挥其醒酒活性^[8]。汤银红等^[9]研究发现,经常大量饮酒或者酗酒会导致乙醇脱氢酶(ADH)活性下降,使血液中乙醇浓度提高,导致乙醇对肝脏、大脑等器官的危害作用更加严重;潘兴昌等^[10]研究发现,人体摄入乙醇后其90%通过肝脏代谢,主要代谢途径为脱氢酶系统,即ADH和乙醛脱氢酶;张春红等^[11]利用脱脂豆粕研制出醒酒肽;王微星^[12]在菜籽蛋白肽制备及其酶解产物醒酒活性的研究中发现,菜籽肽具有解酒活性。近几年各种解酒药不断出现,对于具有解酒功效的天然活性成分的研究也日益增加,但多数集中于玉米中活性物质的制备与探究,而关于辣木籽醒酒肽的研究尚未涉及。

本文以辣木籽蛋白粉为原料,利用单因素实验和响应面法对辣木籽醒酒肽的酶解制备工艺条件进行优化,确定辣木籽醒酒肽最佳的酶解制备工艺条件,以期对辣木籽醒酒肽的制备提供参考,为辣木籽蛋白资源的开发利用奠定一定的研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

辣木籽,云南丽江喜马拉雅生物科技有限公司。

四硼酸钠、氢氧化钠、硫酸钾、柠檬酸、硫酸铜、氯化钠、硼酸、无水乙醇、考马斯亮蓝G-250,分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司;邻苯二甲酐(OPA)、2-巯基乙醇(2-ME),分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;乙醇脱氢酶(ADH)、氧化型辅酶I(NAD^+)、牛血清白蛋白、焦磷酸钠十水合物,分析纯,上海源叶生物科技有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS),分析纯,北京索莱宝科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

高速万能粉碎机,北京中兴伟业仪器有限公司;真空冷冻干燥机,上海比朗仪器制造有限公司;恒温水浴锅,上海尚普仪器设备有限公司;数显恒温水浴锅,国华电器有限公司;循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;电子天平,奥豪斯仪器(常州)有限公司;高速离心机,湖南可成仪器设备有限公司;磁力搅拌器,常州澳华仪器有限公司;超纯水机,南京易普易达科技发展有限公司;pH计,上海仪电科学仪器股份有限公司;紫外可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;酶标仪,赛默飞世尔科

技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 辣木籽蛋白粉的制备

参照郭其洪等^[6]的方法制备辣木籽蛋白粉。利用高速万能粉碎机将干辣木籽粉碎,称取适量辣木籽粉,通过超临界 CO_2 萃取装置在萃取压力30 MPa、分离温度 40°C 的条件下脱脂处理得到脱脂辣木籽粉(蛋白质含量为49.26%)。将脱脂辣木籽粉与 0.3 mol/L NaCl 溶液按料液比1:10混合均匀,用 0.1 mol/L NaOH 调节pH至7.15,于 50°C 水浴锅中利用电动搅拌器混合30 min,采用抽滤法去除废渣,收集滤液,真空冷冻干燥后得到辣木籽蛋白粉,放入 -40°C 冰箱备用。

1.2.2 辣木籽醒酒肽的制备

工艺流程:辣木籽蛋白粉→加水溶解→调节pH(0.1 mol/L NaOH 溶液和 0.1 mol/L HCl 溶液)→加酶→水浴酶解(酶解过程中监测酶解液pH,保持稳定)→ 95.0°C 灭酶10 min→ 8000 r/min 离心20 min→取上清液(酶解液)→ 45.0°C 旋转蒸发浓缩→调节pH为7.0→真空冷冻干燥→辣木籽醒酒肽。

1.2.3 蛋白水解度的测定

水解度参照Vásquez-Villanueva等^[13]的OPA法进行测定,并稍作修改。将 $100.0\ \mu\text{L}$ 40 mg/mL OPA溶液、 2.5 mL 0.1 mol/L 四硼酸钠溶液、 1.0 mL 体积分数5%的SDS溶液、 1.39 mL 蒸馏水、 $10.0\ \mu\text{L}$ 2-ME组成 5.0 mL 混合物,将 2.5 mL 蛋白酶解液与 $100.0\ \mu\text{L}$ 上述混合物混合,在室温下放置反应8 min,使用分光光度计在 340 nm 波长处测量吸光度,再通过由谷胱甘肽($0\sim 5\text{ mg/mL}$)作为标准品获得的标准曲线计算肽含量(C_1),对应样品蛋白粉中蛋白质含量(C_2)通过考马斯亮蓝法^[14]测定。水解度(D)计算公式如式(1)所示。

$$D = C_1 / C_2 \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4 体外ADH激活率的测定

参照文献^[15]采用瓦勒-霍赫法测定ADH的酶活力,并稍作修改。将 1.5 mL 焦磷酸钠缓冲溶液(pH 8.8)、 1.0 mL 0.027 mol/L 氧化型辅酶I(NAD^+)、 0.5 mL 体积分数11.5%的乙醇溶液、 0.1 mL 蛋白酶解液依次加入比色皿中,混合均匀, 25°C 恒温水浴5 min后,立即加入 0.1 mL 0.20 U/mL ADH,混合均匀后在 340 nm 波长下测定吸光度,然后每间隔1 min记录吸光度,记录5 min,选取线性数据。以 0.1 mL 蒸馏水代替等体积的蛋白酶解液作空白组,测定ADH的酶活力。ADH酶活力

(E)计算公式如式(2)所示。

$$E = \frac{E_{340} \times 3.2}{E_w \times 6.2} \quad (2)$$

式中: E_{340} 为340 nm处每分钟吸光度的增大值; E_w 为每毫升所用酶液中酶的含量,mg/mL;6.2为NADH的克分子吸光度系数;3.2为反应液的总体积,mL。

ADH 激活率(A)计算公式如式(3)所示。

$$A = \frac{E_{\text{样品}} - E_{\text{空白}}}{E_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (3)$$

式中: $E_{\text{样品}}$ 为样品液的酶活力; $E_{\text{空白}}$ 为空白液的酶活力。

1.2.5 数据分析

所有实验均重复测定3次,结果表示为“平均值±标准偏差”。使用 Design-Expert 8.0 软件进行响应面分析,使用 SPSS20.0、Excel 进行数据分析和图表处理。

2 结果与分析

2.1 辣木籽醒酒肽酶解工艺单因素实验

2.1.1 最适蛋白酶的筛选

在料液比1:20、酶添加量5.0%、酶解时间180 min的条件下,考察碱性蛋白酶(酶活200 U/mg,最适温度和最适pH分别为60℃、9.0)、酸性蛋白酶(酶活50 U/mg,最适温度和最适pH分别为45℃、2.5)、木瓜蛋白酶(酶活2 U/mg,最适温度和最适pH分别为60.0℃、7.0)、胰蛋白酶(酶活250 U/mg,最适温度和最适pH分别为37℃、7.5)、复合蛋白酶(酶活120 U/mg,最适温度和最适pH分别为55℃、7.5)对辣木籽蛋白水解度的影响,结果如图1所示。

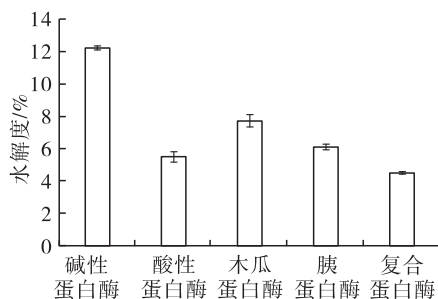


图1 不同蛋白酶酶解辣木籽蛋白的水解度

由图1可知,5种蛋白酶酶解辣木籽蛋白的水解度存在较大的差距,其中:碱性蛋白酶的水解效果最好,水解度为12.23%;复合蛋白酶水解效果最差,水解度仅为4.58%。因此,选择碱性蛋白酶为最适水解酶用于后续研究。

2.1.2 酶解pH对辣木籽蛋白水解度和ADH激活率的影响

在料液比1:20、酶添加量5.0%、酶解时间

150 min、酶解温度60℃的条件下,考察酶解pH对辣木籽蛋白水解度和ADH激活率的影响,结果如图2所示。

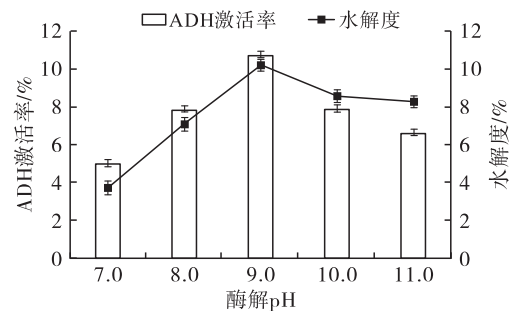


图2 酶解pH对辣木籽蛋白水解度和ADH激活率的影响

由图2可知,辣木籽蛋白水解度和ADH激活率随着酶解pH的增加均先升高后降低,且在pH9.0时均达到最大。这主要是因为酶分子是一种由一个或多个活性部位组成的蛋白质,其液化活性依赖于其特定的结构^[16],pH过高或者过低都会抑制蛋白酶的活性甚至破坏蛋白酶的结构,使得辣木籽蛋白水解度降低,使得多肽有效成分减少,从而使ADH激活率降低。综合考虑,选取pH9.0为最适酶解pH。

2.1.3 酶解时间对辣木籽蛋白水解度和ADH激活率的影响

在料液比1:20、酶解pH9.0、酶添加量5.0%、酶解温度60℃的条件下,考察酶解时间对辣木籽蛋白水解度和ADH激活率的影响,结果如图3所示。

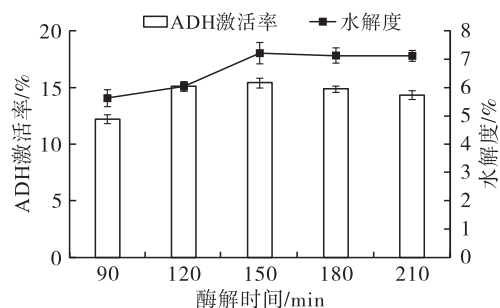


图3 酶解时间对辣木籽蛋白水解度和ADH激活率的影响

由图3可知,随着酶解时间的延长,辣木籽蛋白水解度和ADH激活率均逐渐上升,二者在150 min达到最大值后变化都较为平缓。这是因为在一定时间内蛋白质能够被充分酶解,酶制剂作用位点上的氨基酸被切开后,水解度基本不再增加^[17],相应地ADH激活率也变化较小。综合考虑,确定150 min为最适酶解时间。

2.1.4 酶解温度对辣木籽蛋白水解度和ADH激活率的影响

在料液比1:20、酶解pH9.0、酶添加量5.0%、酶解时间150 min的条件下,考察酶解温度对辣木籽蛋

白水解度和 ADH 激活率的影响,结果如图 4 所示。

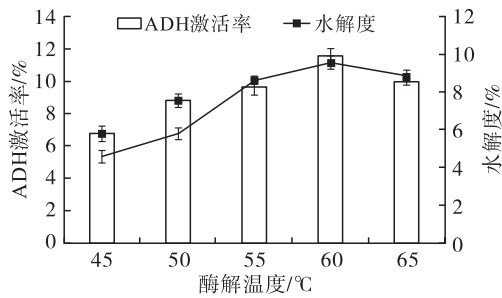


图 4 酶解温度对辣木籽蛋白水解度和 ADH 激活率的影响

由图 4 可知,随着酶解温度的上升,辣木籽蛋白水解度和 ADH 激活率均先增高后下降,均于 60 °C 时达到最大值。这可能是由于在一定温度范围内,温度的升高加快了溶液内物质的运动^[18],酶解反应进程得到加快;但温度太高,酶的结构发生改变,其活性受到抑制甚至失去活性,从而导致水解度下降^[19],还会使醒酒肽变性影响解酒效果,降低 ADH 激活率。因此,确定最适酶解温度为 60 °C。

2.1.5 料液比对辣木籽蛋白水解度和 ADH 激活率的影响

在酶解 pH 9.0、酶添加量 5.0%、酶解温度 60 °C、酶解时间 150 min 的条件下,考察料液比对辣木籽蛋白水解度和 ADH 激活率的影响,结果如图 5 所示。

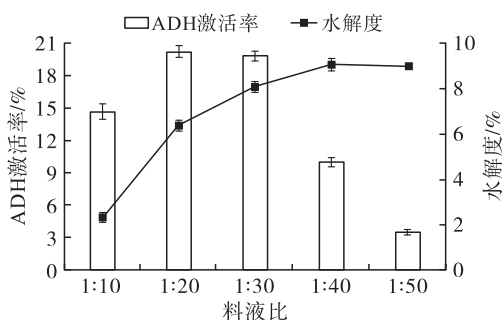


图 5 料液比对辣木籽蛋白水解度和 ADH 激活率的影响

由图 5 可知,随着料液比的降低,辣木籽蛋白水解度及 ADH 激活率均先升高,之后水解度趋于平缓,而 ADH 激活率下降。在料液比为 1:40 时辣木籽蛋白水解度最大,在料液比为 1:20 时 ADH 激活率最大。这可能是因为溶液体积增加有利于辣木籽蛋白的溶解,使蛋白酶与底物能充分接触,从而加速酶解反应进程,使水解度升高^[20]。综合考虑,确定 1:20 为最适料液比。

2.1.6 酶添加量对辣木籽蛋白水解度和 ADH 激活率的影响

在料液比 1:20、酶解 pH 9.0、酶解温度 60 °C、酶

解时间 150 min 的条件下,考察酶添加量对辣木籽蛋白水解度和 ADH 激活率的影响,结果如图 6 所示。

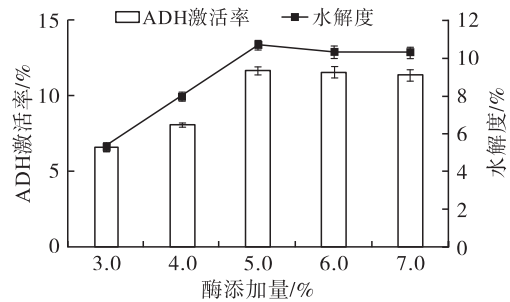


图 6 酶添加量对辣木籽蛋白水解度和 ADH 激活率的影响

由图 6 可知,随着酶添加量的增加,辣木籽蛋白水解度和 ADH 激活率均先快速升高而后趋于平缓,在酶添加量为 5.0% 时辣木籽蛋白水解度和 ADH 激活率最大。酶添加量的增加可以使酶与底物的接触面积加大,促使蛋白质水解得更加完全;当酶与底物充分接触后,酶添加量的加大不能形成更多的酶-底物复合物,即已经达到了酶解的饱和状态,水解度不再进一步增加^[21]。因此,确定 5.0% 为最适酶添加量。

2.2 辣木籽醒酒肽酶解工艺响应面法优化

根据单因素实验结果,确定了酶解 pH、酶添加量在一定范围内对水解度和 ADH 激活率的影响较小,所以固定酶解 pH 为 9.0,酶添加量为 5.0%,着重选择影响更大的酶解温度、酶解时间、料液比进行响应面实验。以 ADH 激活率 (Y) 为响应值,采用 Design-Expert 8.0 软件,通过 Box-Behnken 实验设计原理,设计响应面优化实验,以确定辣木籽醒酒肽最佳的酶解制备工艺条件。响应面实验因素水平见表 1,响应面实验设计方案及结果见表 2,回归模型方差分析见表 3。

表 1 响应面实验因素水平

水平	A 酶解温度/°C	B 酶解时间/min	C 料液比
-1	55	120	1:10
0	60	150	1:20
1	65	180	1:30

表 2 响应面实验设计方案及结果

实验号	A	B	C	ADH 激活率/%
1	1	1	0	19.18 ± 1.34
2	1	-1	0	20.86 ± 0.46
3	-1	0	-1	15.29 ± 0.39
4	1	0	1	17.22 ± 0.78
5	0	0	0	20.35 ± 0.62
6	-1	-1	0	16.29 ± 1.69
7	0	-1	1	16.38 ± 0.85

续表 2

实验号	A	B	C	ADH 激活率/%
8	0	1	-1	16.73 ± 0.61
9	0	0	0	20.63 ± 0.43
10	0	0	0	19.83 ± 0.49
11	0	1	1	16.44 ± 0.45
12	1	0	-1	17.85 ± 0.43
13	-1	1	0	14.37 ± 0.34
14	0	0	0	20.34 ± 0.41
15	-1	0	1	13.32 ± 0.49
16	0	-1	-1	17.54 ± 0.55
17	0	0	0	21.09 ± 0.51

表 3 回归模型方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F	p	显著性
模型	89.84	9	9.98	22.58	0.000 2	**
A	31.36	1	31.36	70.94	<0.000 1	**
B	2.37	1	2.37	5.35	0.054 0	
C	2.05	1	2.05	4.64	0.068 3	
AB	0.01	1	0.01	0.03	0.861 9	
AC	0.45	1	0.45	1.02	0.347 2	
BC	0.19	1	0.19	0.43	0.533 9	
A ²	13.84	1	13.84	31.29	0.000 8	**
B ²	3.88	1	3.88	8.78	0.021 0	*
C ²	31.04	1	31.04	70.21	<0.000 1	**
残差	3.09	7	0.44			
失拟项	2.25	3	0.75	3.53	0.127 3	
纯误差	0.85	4	0.21			
总误差	92.94	16				

注: * 表示差异显著 ($p < 0.05$); ** 表示差异极显著 ($p < 0.01$)

使用 Design-Expert 8.0 软件对表 2 数据进行拟合分析,得到回归模型: $Y = 20.45 + 1.98A - 0.54B - 0.51C + 0.06AB + 0.34AC + 0.22BC - 1.81A^2 - 0.96B^2 - 2.72C^2$ 。由表 3 可知,3 个因素对 ADH 激活率影响大小排序为酶解温度 > 酶解时间 > 料液比。模型的 p 值(0.000 2)小于 0.01,差异极显著,失拟项 p 值(0.127 3)大于 0.05,差异不显著,说明该模型成立,能够预测辣木籽蛋白酶解过程中酶解温度、酶解时间和料液比对 ADH 激活率的影响。一次项 A 和二次项 A²、C² 对 ADH 激活率的影响极显著,二次项 B² 影响显著,说明这几个因素都是辣木籽醒酒肽制备过程中重要的影响因素。

通过响应面法优化得到最佳工艺条件为酶解温度 62.68 °C、酶解时间 141.77 min、料液比 1:19.28,在此条件下 ADH 激活率预测值为 21.070 3%。根据实际操作将该工艺条件调整为酶解温度 63 °C、酶

解时间 142 min、料液比 1:20,在此条件下进行验证实验,辣木籽醒酒肽 ADH 激活率为 22.16%,辣木籽蛋白水解度为 12.23%,ADH 激活率优于宁庆鹏^[15]制备的花生醒酒多肽的(ADH 激活率 18.25%)。本研究中 ADH 激活率的实测值与预测值接近,表明通过响应面法优化得到的回归模型能较好地模拟各个因素对 ADH 激活率的影响。

3 结论

本实验以辣木籽蛋白粉为研究对象,采用单因素实验结合响应面法进行辣木籽醒酒肽的酶解制备工艺优化,获得最佳工艺条件为碱性蛋白酶添加量 5.0%、酶解 pH 9.0、酶解温度 63 °C、酶解时间 142 min、料液比 1:20,在此条件下 ADH 激活率为 22.16%,辣木籽蛋白水解度为 12.23%。本研究为后续辣木籽醒酒肽相关产品的研发提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 杜同同,孙朋,鄢庆祥,等.辣木籽的综合研究[J].大众科技,2017,19(12):46-48.
- [2] 王丽虹,许悦,刘阳.辣木籽中活性物质及其生理功能研究进展[J].食品研究与开发,2019,40(4):190-195.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 王雪峰,陈越,赵琼,等.响应面法优化酶法制备辣木籽多肽工艺及其抑菌活性分析[J].现代食品科技,2019,35(1):173-181,214.
- [6] 郭其洪,李兴丽,范江平,等.辣木籽抗氧化肽的分离鉴定及其稳定性分析[J].食品工业科技,2022,43(5):41-47.
- [7] 贾兵洋,岳程程,王艺靠,等.醒酒肽的制备及其研究[J].《中文科技期刊数据库(全文版)农业科学》,2018(8):44-45.
- [8] 曾凡珂,李伟,陈运娇,等.玉米醒酒肽构效关系及机理研究进展[J].中国粮油学报,2019,34(3):133-140.
- [9] 汤银红,丁斌如.枳椇子水提物对乙醇脱氢酶活性的影响[J].中药药理与临床,2004,20(2):24.
- [10] 潘兴昌,曾瑜,刘文颖,等.玉米低聚肽和姜黄素对小鼠的醒酒功能研究[J].食品与发酵工业,2016,42(11):25-34.

(下转第 75 页)

- [37] WEI W, FENG Y, ZHANG X, et al. Synthesis of structured lipid 1, 3 - dioleoyl - 2 - palmitoylglycerol in both solvent and solvent - free system[J]. LWT - Food Sci Technol, 2015, 60(2): 1187 - 1194.
- [38] 曹江, 邹孝强, 金青哲, 等. 改性巴沙鲮鱼油制备 1, 3 - 二油酸 - 2 - 棕榈酸甘油三酯的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(22): 216 - 220, 324.
- [39] 高亮, 余旭伟, 邹凤, 等. 酶法合成 1 - 油酸 - 2 - 棕榈酸 - 3 - 亚油酸甘油三酯结构脂的研究[J]. 中国油脂, 2020, 45(8): 66 - 70.
- [40] 孙聪, 张浩, 敖小惠, 等. 酶促酸解制备 1 - 油酸 - 2 - 棕榈酸 - 3 - 亚油酸甘油三酯[J]. 中国油脂, 2021, 46(4): 92 - 98.
- [41] CHEN M L, VALI S R, LIN J Y, et al. Synthesis of the structured lipid 1, 3 - dioleoyl - 2 - palmitoylglycerol from palm oil[J]. J Am Oil Chem Soc, 2004, 81(6): 525 - 532.
- [42] ZHENG M, WANG S, XIANG X, et al. Facile preparation of magnetic carbon nanotubes - immobilized lipase for highly efficient synthesis of 1, 3 - dioleoyl - 2 - palmitoylglycerol - rich human milk fat substitutes [J]. Food Chem, 2017, 228: 476 - 483.
- [43] HE L, ZENG C, WEI L, et al. Fabrication of immobilized lipases for efficient preparation of 1, 3 - dioleoyl - 2 - palmitoylglycerol [J/OL]. Food Chem, 2023, 408: 135236[2023 - 08 - 31]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135236>.
- [44] GHIDE M K, LI K, WANG J, et al. Effective production of human milk fat substitutes rich in 1, 3 - dioleoyl - 2 - palmitoyl glycerol (OPO) via a new strategy [J]. Food Biophys, 2022, 17(4): 495 - 507.
- [45] 李阳. Sn - 1, 3 专一性脂肪酶的固定化及其在结构油脂 OPO 合成中的应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [46] SCHMID U, BORNSCHEUER U T, SOUMANOU M M, et al. Optimization of the reaction conditions in the lipase - catalyzed synthesis of structured triglycerides[J]. J Am Oil Chem Soc, 1998, 75(11): 1527 - 1531.
- [47] PFEFFER J, FREUND A, BEL - RHLID R, et al. Highly efficient enzymatic synthesis of 2 - monoacylglycerides and structured lipids and their production on a technical scale [J]. Lipids, 2007, 42(10): 947 - 953.
- [48] 张艳. *Candida* sp. 99 - 125 脂肪酶催化合成高纯人乳脂替代品的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2016.
- [49] LI Y, ZHANG Y, ZHOU Y, et al. A novel and controllable method for simultaneous preparation of human milk fat substitutes (OPL, OPO and LPL): Two - step enzymatic ethanolsis - esterification strategy [J/OL]. Food Res Int, 2023, 163: 112168 [2023 - 08 - 31]. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112168>.
- [50] GAO L, CHENG X, YU X, et al. Lipase - mediated production of 1 - oleoyl - 2 - palmitoyl - 3 - linoleoylglycerol by a two - step method [J/OL]. Food Biosci, 2020, 36: 100678[2023 - 08 - 31]. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100678>.
- [51] 张浩. 富含 OPL 结构酯的人乳替代脂的制备及其体外消化研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2021.
- [52] 吕晓雅, 齐玉堂, 张维农, 等. 1, 3 - 二油酸 - 2 - 棕榈酸甘油三酯的合成[J]. 中国油脂, 2023, 48(2): 117 - 122, 152.
- [53] SUN D, LI S, SHANG J, et al. Process optimization of simultaneous enzymatic production of 1, 3 - dioleoyl - 2 - palmitoylglycerol and 1 - oleoyl - 2 - palmitoyl - 3 - linoleoylglycerol [J]. J Am Oil Chem Soc, 2021, 98(12): 1167 - 1176.

(上接第 46 页)

- [11] 张春红, 张鹏, 陈丹, 等. 大豆蛋白醒酒肽的研制[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(5): 71 - 72.
- [12] 王微星. 菜籽蛋白的制备及其酶解产物的醒酒功效[D]. 浙江金华: 浙江师范大学, 2012.
- [13] VÁSQUEZ - VILLANUEVA R, MARINA M L, GARCÍA M C. Revalorization of a peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) byproduct: Extraction and characterization of ACE - inhibitory peptides from peach stones [J]. J Funct Foods, 2015, 18: 137 - 146.
- [14] 雷海容, 刘雷, 梁洪祥. 超声辅助提取豆粕水溶性蛋白质工艺优化[J]. 粮食与油脂, 2023, 36(4): 36 - 39.
- [15] 宁庆鹏. 花生粕功能多肽的研究[D]. 太原: 山西大学, 2016.
- [16] 郭刚军, 邹建云, 胡小静, 等. 液压榨澳洲坚果粕酶解制备多肽工艺优化[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 173 - 178.
- [17] 于栋, 高洋, 何新蕾. 酶法制备黑豆粕粉多肽的工艺研究[J]. 中国酿造, 2021(4): 143 - 147.
- [18] 吕小京, 操德群, 徐年军. 响应面法优化酶解法制备海洋微藻微拟球藻抗氧化肽工艺[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 183 - 188.
- [19] 汤海霞, 张艳, 葛武鹏, 等. 酶解法制备绵羊乳酪蛋白 ACE 抑制肽的工艺优化及其抑制机制[J]. 中国食品学报, 2022, 22(6): 220 - 231.
- [20] 张海, 冯成利, 屈春利, 等. 多菌种速酿发酵辣椒的研制[J]. 中国调味品, 1992, 17(7): 18 - 20.
- [21] 郝晓华, 郑凯南, 刘可心. 碱性蛋白酶酶解藜麦芽制备多肽工艺的研究. 中国饲料, 2022(9): 104 - 107, 112.