

超声波辅助脂肪酶水解 红花籽油条件优化与动力学

吕凯波, 杨文婷, 吴士筠*, 张 怡

(武汉工商学院环境与生物工程学院, 湖北武汉 430065)

摘要: 本文通过单因素实验, 分别考察超声时间、超声温度、pH、酶添加量对脂肪酸水解率的影响, 结合响应面实验优化超声波辅助脂肪酶水解红花籽油的工艺条件, 并比较超声波辅助酶解和水浴酶解中米氏常数及表观动力学的变化。结果表明: 最佳酶解条件为: 超声时间 10 h, 超声温度 28 ℃, pH7.0, 米曲霉脂肪酶添加量为 280 U/g, 水油比 1.6:1 (v/v), 此时红花籽油的水解率达到 94.47%。对其进行表观动力学研究, 测得超声波辅助脂肪酶水解红花籽油的米氏常数 $K_m = 4.63 \text{ mL/g}$, 表观活化能 $E_a = 2.05 \text{ kJ/mol}$, 比水浴酶解条件下米氏常数 $K_m = 14.93 \text{ mL/g}$ 和表观活化能 $E_a = 2.40 \text{ kJ/mol}$ 均降低, 证明超声波辅助脂肪酶能促进红花籽油的水解。

关键词: 超声波, 脂肪酶, 水解, 红花籽油, 动力学研究

Conditions Optimization and Kinetics Analysis of Lipase Hydrolysis Assisted by Ultrasonic of Safflower Seed Oil

LV Kai-bo, YANG Wen-ting, WU Shi-jun*, ZHANG Yi

(School of Environmental and Biological Engineering, Wuhan Technology and Business University, Wuhan 430065, China)

Abstract: In this paper, the effects of ultrasonic time, ultrasonic temperature, pH and enzyme addition on the hydrolysis rate of fatty acid were investigated by single factor test. The lipase hydrolysis conditions of safflower seed oil assisted by ultrasonic were optimized by the response surface test. The changes of kinetic parameters K_m and apparent kinetics in ultrasonic assisted enzymatic hydrolysis and water bath hydrolysis were compared. The optimized parameters were as follows: ultrasonic time 10 h, ultrasonic temperature 28 ℃, pH7.0, enzyme dosage of 280 U/g, water/oil ratio of 1.6:1. Under this condition, the hydrolysis rate was 94.47%. In addition, the apparent kinetic parameters K_m and E_a of safflower seed oil hydrolysis assisted by ultrasound were respectively measured as 4.63 mL/g and 2.05 kJ/mol, which were less than those of controlled trial 14.93 mL/g and 2.40 kJ/mol and suggested that ultrasonic could facilitate the lipase hydrolysis of safflower seed oil.

Key words: ultrasonic; lipase; hydrolysis; safflower seed oil; kinetics analysis

中图分类号: TS224.6 文献标识码: B 文章编号: 1002-0306(2018)13-0161-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.13.029

引文格式: 吕凯波, 杨文婷, 吴士筠, 等. 超声波辅助脂肪酶水解红花籽油条件优化与动力学[J]. 食品工业科技, 2018, 39(13): 161-166.

红花籽油又称红花油, 是以红花籽为原料提取得到的一种草本植物油^[1], 油脂中不饱和脂肪酸含量达 79.17%~91.27%^[2], 其中亚油酸($\omega-6$)含量高达 75%以上, 有“亚油酸之王”之称^[3], 具有降低血脂、软化血管、降低血压、促进微循环等作用, 特别是对

高血压、高血脂、心绞痛、冠心病、动脉粥样硬化、老年性肥胖症等疾病的防治极为有利, 具有“血管清道夫”的美誉^[4-5]。

利用脂肪酶催化天然底物油脂水解的特性, 可用于脂肪酸的生产和多不饱和脂肪酸(PUFA)的富

收稿日期: 2017-11-09

作者简介: 吕凯波(1982-), 女, 硕士研究生, 副教授, 研究方向: 食品加工与贮藏, E-mail: 32969265@qq.com。

*通讯作者: 吴士筠(1950-), 女, 高级实验师, 研究方向: 食品酶学, E-mail: 779642941@qq.com。

基金项目: 武汉工商学院校级科研课题(A2015008)。

1854-1860.

[30] 王钦德, 杨坚. 食品实验设计与统计分析[M]. 中国农业大学出版社, 2009.

[31] 何贝, 王学东, 叶鹏, 等. 几种品牌酵母耐性生长曲线对

比研究[J]. 中国酿造, 2014, 33(12): 63-67.

[32] 华琳. 纤维素降解菌地衣芽孢杆菌 CMC-4 的分离鉴定、诱变、产酶条件及酶学特性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.

集^[6-7]。甘争艳等对红花油无溶剂体系中脂肪酶的催化水解反应进行了优化^[8]。刘自琴^[9]、徐怀德^[10]、向小乐^[11]等在脂肪酶催化的基础上,采用超声波辅助酶解并对动力学研究发现,超声波具有较好的空化、乳化效应,可降低溶液黏度和张力、增加油水两相乳化体系的有效接触面积,从而加速油脂水解,降低活化能^[12-13],说明超声波能促进油脂的酶解。国内外暂无有关超声波辅助红花籽油酶解制备脂肪酸的研究报道。

本文在对脂肪酶催化水解红花籽油工艺条件进行优化的基础上,比较超声波辅助酶解和水浴酶解中米氏常数及表观动力学的变化,以期对红花籽油及相关产品的研发利用提供理论基础和参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

红花籽 市售;胰脂肪酶 24.4 U,梯希爱化成工业发展有限公司;米曲霉脂肪酶 300000 U,阿拉丁公司;假丝酵母脂肪酶 10000 U/g,北京高瑞森科技有限公司;石油醚、氢氧化钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钠、氢氧化钠、酚酞、邻苯二甲酸氢钾、无水乙醇 分析纯,武汉市华顺生物科技有限公司。

ZT-2000 型高速多功能粉碎机 永康市展帆工贸有限公司;JM2002 电子分析天平 上海轩澄仪器有限公司;旋转蒸发器 RE52CS,上海亚荣生化仪器厂;SHB-III S 循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司;TDZ5-WS 台式多管自动平衡离心机 湘麓离心机仪器有限公司;5810R 艾本德高速冷冻离心机 德国艾本德股份有限公司;KQ-100E 型超声波清洗机 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 红花籽油的提取 采用石油醚料液比为 1:9 (g/mL)提取,在超声温度为 35 ℃,超声时间为 20 min 条件下进行提取^[14]。

1.2.2 红花籽油的酶解及水解率的计算 向 50 mL 锥形瓶中加入所需配比的红花籽油、脂肪酶和磷酸盐缓冲液混匀,调节超声波发生器中水浴温度,在搅拌速度 300 r/min 条件下酶解^[15];或同等条件下放在水浴锅中酶解。对红花籽油水解产物进行酸值和皂化值的测定,并按照如下公式计算水解率^[16-17]:水解率(%) = $(AV_x - AV_0) / (SV - AV) \times 100$,式中: AV_x 为水解后样品的酸值; AV_0 为空白对照酸值; AV 、 SV 分别为原料红花籽油的酸值和皂化值。

1.2.3 脂肪酶的筛选 脂肪酶(胰脂肪酶、假丝酵母脂肪酶、米曲霉脂肪酶),根据生产厂家提供数据,以同样酶添加量、最适温度及 pH 下水解红花籽油,超声波辅助酶解时超声时间 10 h^[8],比较水浴酶解和超声波酶解条件下水解率,确定最佳脂肪酶。

1.2.4 单因素实验 在初始 pH 为 7.0,超声温度 35 ℃,水油比 3:1 (v/v,下同),超声功率 100 W,酶添加量为 300 U/g,考察不同超声时间(5、10、15、20、25 h)对水解率的影响;在初始 pH 为 7.0,超声时间 10 h,水油比 3:1,酶添加量为 300 U/g,考察不同超声温度(15、25、35、45、55 ℃)对水解率的影响;在初

表 1 不同脂肪酶酶解条件

Table 1 Different conditions of enzymatic hydrolysis of Lipase

条件	种类		
	假丝酵母脂肪酶	米曲霉脂肪酶	胰脂肪酶
酶添加量($U \cdot g^{-1}$)	300	300	300
pH	7.2	7.0	8.0
水浴温度(℃)	40	36	37

始 pH 为 7.0,超声温度 35 ℃,超声时间 10 h,酶添加量为 300 U/g 的情况下,考察不同水油比(1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1)对水解率的影响;在超声温度 35 ℃,超声时间 10 h,水油比 3:1,酶添加量为 300 U/g 的情况下,考察不同初始 pH(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)对水解率的影响;在初始 pH 为 7.0,超声温度 35 ℃,水油比 3:1,超声时间 10 h 的情况下,考察不同酶添加量(140、220、300、380、460 U/g)对水解率的影响。

1.2.5 响应面实验设计 在单因素实验的基础上,每个因素选取三个对提取率影响较大的水平,以水解率为指标,建立三因素三水平中心组合实验。各因素的水平用-1、0、1 进行编码,如表 2。

表 2 响应面实验因素水平表

Table 2 Factors and levels table of response surface experiment

水平	因素		
	A 超声温度(℃)	B 酶添加量($U \cdot g^{-1}$)	C 水油比
-1	25	140	1.0
0	35	220	1.5
1	45	300	2.0

1.3 动力学特性参数的测定

1.3.1 米氏常数 K_m 测定 根据米氏方程进行测定,公式为:

$$v = \frac{V[S]}{K_m + [S]}$$

式中: v 为反应初速度; V 为最大反应初速度; $[s]$ 为底物浓度; K_m 米氏常数,主要反映酶与底物结合能力, K_m 值越小说明酶与底物结合能力越强;反之亦然^[10]。

用双倒数作图法测定米氏常数 K_m 值。通过测定不同底物初始浓度所对应的反应初速度,作 $1/v$ 对 $1/[s]$ 的双倒数图,可知拟合直线的纵截距 = $1/V_m$,斜率 = K_m/V_m ,得出米氏常数 $K_m = \text{斜率}/\text{纵截距}$ 。公式为:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[s]} + \frac{1}{V_m}$$

1.3.2 表观活化能测定 根据阿伦乌斯公式进行测定:

$$\lg K = -\frac{E_a}{2.303RT} + \lg A$$

由速率常数 $K \propto$ 反应初速度 $V \propto$ 水解率 DH ,上式转变为:

$$\lg DH = -\frac{E_a}{2.303RT} + C$$

式中: A、C 为常数, 相当于频率因子。在特定的温度范围内 25~45 ℃, 测定优化条件下各热力学温度点所对应的水解率, 作 1/T 对应于 lgS(水解率%) 的关系图, 拟合直线斜率 K, 即求得表观活化能 E_a (气体常数 $R = 8.314 \text{ kJ/mol}$)^[11]。

1.4 数据处理

实验数据以 $\bar{x} \pm SD$, 采用 Microsoft Excel 作图、Design Expert 8.0.6 程序设计软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 脂肪酶的筛选

由图 1 可知, 同等条件下超声波辅助酶解水解率高于水浴酶解, 其中米曲霉脂肪酶水解率最高, 达到 90.32%, 与水浴酶解相比提高将近 7%; 其次为假丝酵母脂肪酶, 水解率达到 88.12%, 与水浴酶解相比提高将近 6%。这说明超声波的能量能够促使甘油三酯中的酯键断开, 从而提高水解率^[10]。考虑水解效率及酶成本, 故选择米曲霉脂肪酶作为最佳脂肪酶。

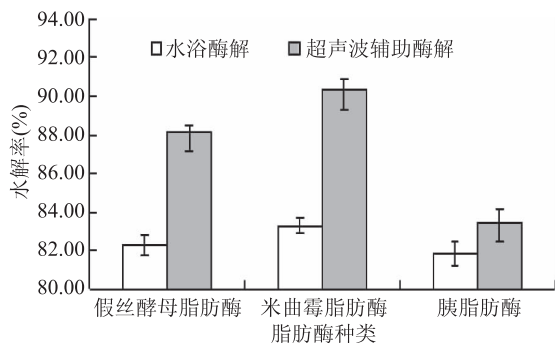


图 1 不同脂肪酶对水解率的影响

Fig.1 Effect of different lipases on hydrolysis rate

2.2 单因素实验

2.2.1 超声时间对水解率的影响 由图 2 所知, 红花籽油的水解率随超声时间的增加而增加, 这是由于在反应初期, 反应速度较快, 水解率增加幅度较大。超声时间为 10 h 后, 水解率达到 90% 以上后基本保持缓慢增长, 在反应时间为 25 h 时水解率达到 92.49%, 但反应时间的延长, 油脂长时间暴露在空气中容易氧化影响产物的品质, 而且造成资源能源浪费。故本实验选择的超声时间为 10 h。

2.2.2 超声温度对水解率的影响 由图 3 所知, 红花籽油的水解率随超声温度的增加, 呈先增大后降低的趋势, 超声温度为 35 ℃ 时, 水解率达到最大, 为 91.33%, 之后随超声温度的增大而迅速下降。米曲霉脂肪酶学特性表明, 最适作用温度为 40 ℃^[18], 实验结果显示最佳温度为 35 ℃。这表明超声波在料液中可产生乳化作用, 剧烈刺激以及局部温度瞬时升高使油脂的结构形态改变, 利于底物的流通与交换, 酶的活性中心更加暴露, 促进酶与底物结合, 使最适温度降低^[19]。但当温度持续升高超过了 40 ℃, 导致脂肪酶变性, 部分或全部失去催化活性, 提取率急剧下降。故本实验选择的超声温度为 35 ℃。

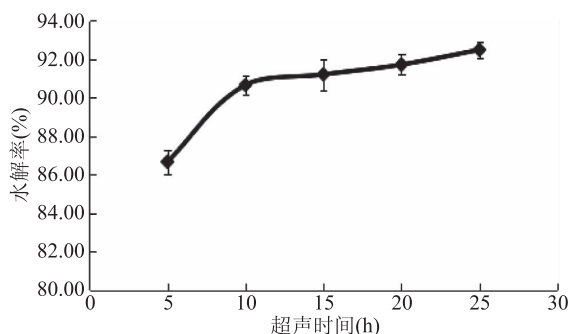


图 2 超声时间对水解率的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic time on hydrolysis rate

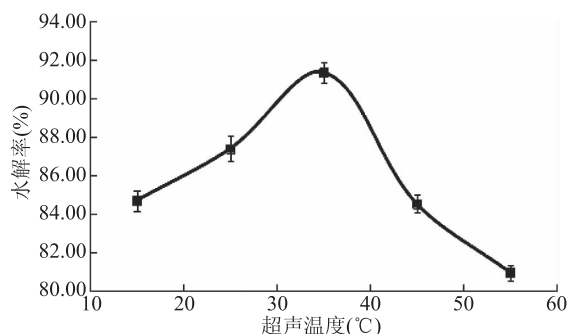


图 3 超声温度对水解率的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic temperature on hydrolysis rate

2.2.3 水油比对水解率的影响 由图 4 所知, 水解率随水油比的增加呈先增大后降低的趋势, 当水油比为 1.5:1 时, 油脂的水解率达到最大为 91.33%, 之后随水油比的增大而迅速下降。脂肪酸催化油脂水解是发生在水油界面上的, 改变反应体系的水油比可以有效改变脂肪酶和油脂的接触即反应面积, 从而影响反应结果。但水油比过高会稀释酶浓度, 使水解率下降。故本实验选择的水油比为 1.5:1。

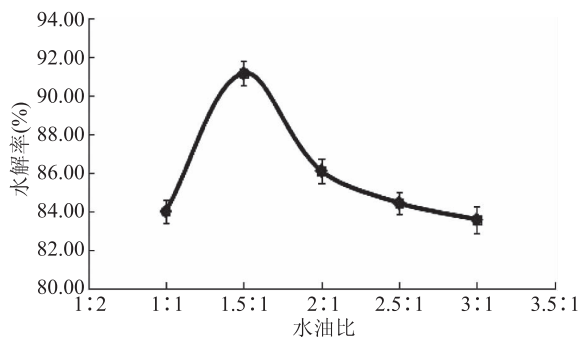


图 4 水油比对水解率的影响

Fig.4 Effect of water/oil on hydrolysis rate

2.2.4 pH 对水解率的影响 由图 5 所知, pH 在 6.0~7.0 时, 红花籽油的水解率随着 pH 的增高而增加; 在 pH 7.0 时, 红花籽油的水解率达到最大, 为 92.69%; pH 高于 7.0 后呈下降趋势, 其原因是偏酸或偏碱环境均能破坏脂肪酶空间结构, 从而影响其活性部位基团、油-水-酶复合物等的离子化状态, 进而导致酶蛋白失活, 水解率降低^[11]。故本实验选择的最佳 pH 为 7.0。

2.2.5 酶添加量对水解率的影响 由图 6 所知, 酶添加量在 140~220 U/g 时, 红花籽油的水解率随酶添

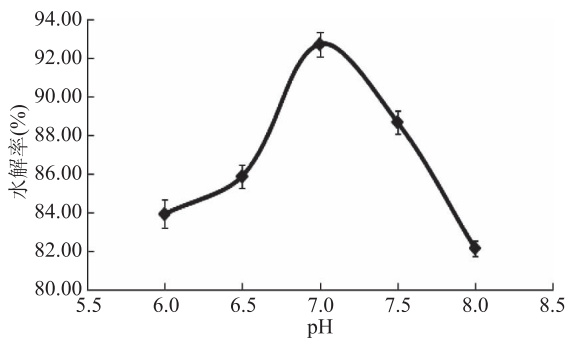


图5 pH对水解率的影响

Fig.5 Effect of pH on hydrolysis rate

加量的增加而上升,在酶添加量为 220 U/g 时,红花籽油的水解率达到最大,为 91.56%。当酶添加量超过 220 U/g 时,红花籽油的水解率呈现下降的趋势,其原因在于酶催化油脂水解达到饱和后会发发生逆反应催化甘油酯的合成^[19],从而降低了水解率。综合考虑,本实验选择酶添加量 140、220、300 U/g 进行响应面优化实验。

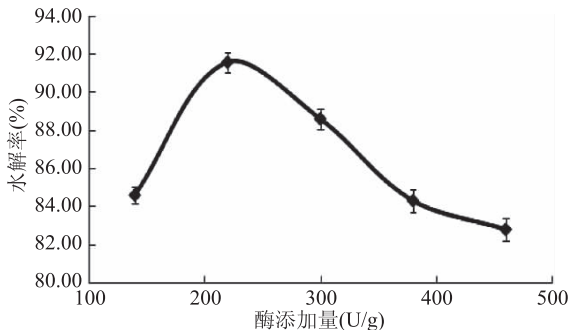


图6 酶添加量对水解率的影响

Fig.6 Effect of amount of lipases on hydrolysis rate

2.3 响应面实验设计结果及数据分析

2.3.1 响应面设计方案及结果 根据单因素结果,由 Design Expert 软件程序,根据表 2 选取出对整个实验相对有影响的三个因素:超声温度、酶添加量、

水油比,设计响应面实验,响应面实验结果见表 3。

表3 响应面实验结果

Table 3 Results of response surface experiment

实验号	A	B	C	水解率 (%)
1	0	0	0	90.57
2	0	-1	-1	84.26
3	0	-1	0	90.54
4	0	-1	0	95.64
5	-1	+1	0	85.22
6	0	0	0	93.22
7	-1	0	+1	89.69
8	0	-1	+1	80.00
9	0	0	+1	86.65
10	+1	-1	0	80.91
11	+1	0	+1	85.67
12	+1	0	-1	87.61
13	+1	+1	0	84.53
14	0	0	0	91.30
15	-1	-1	0	83.50
16	0	+1	-1	85.98
17	-1	0	-1	79.95

2.3.2 回归方程拟合及方差分析 经 Design Expert 软件对所得数据进行回归分析,结果见表 4,对各因素进行回归拟合后得到回归方程:水解率 (%) = $92.25 + 0.045A + 1.71B + 0.53C + 0.48AB - 2.92AC + 1.23BC - 3.60A^2 - 5.11B^2 - 2.92C^2$ 。最佳水解率工艺为:超声温度为 28.15 °C,水油比为 1.6:1,酶添加量为 280.9 U/g,预测水解率最大值为 95.64%。

回归方程模型的 $R^2 = 95.3\%$,由方差分析得到 p 值,为 0.0194 ($p < 0.05$),说明该模型拟合性能较好,实验方法可靠;失拟项不显著 ($p > 0.05$),说明所得方程与实际拟合中非正常误差所占比例小。其中酶添加量二次项 (B^2) 对响应值影响极显著 ($p < 0.01$),超声温度与水油比交互项 (AC)、超声温度二次项

表4 回归模型方差分析

Table 4 Analysis of variance of regression equation

来源	方差和	自由度	均方	F 值	Prob > F	显著性
模型	289.20	9	32.13	5.30	0.0194	*
A	0.016	1	0.016	2.673E-003	0.9602	
B	23.50	1	23.50	3.88	0.0897	
C	2.22	1	2.22	0.37	0.5645	
AB	0.90	1	0.90	0.15	0.7111	
AC	34.11	1	34.11	5.63	0.0495	*
BC	6.08	1	6.08	1.00	0.3501	
A ²	54.67	1	54.67	9.02	0.0199	*
B ²	109.98	1	109.98	18.14	0.0037	**
C ²	35.92	1	35.92	5.93	0.0451	*
残差	42.43	7	6.06			
失拟项	23.35	3	7.78	1.63	0.3164	
纯误差	19.08	4	4.77			
总离差	331.63	16				

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

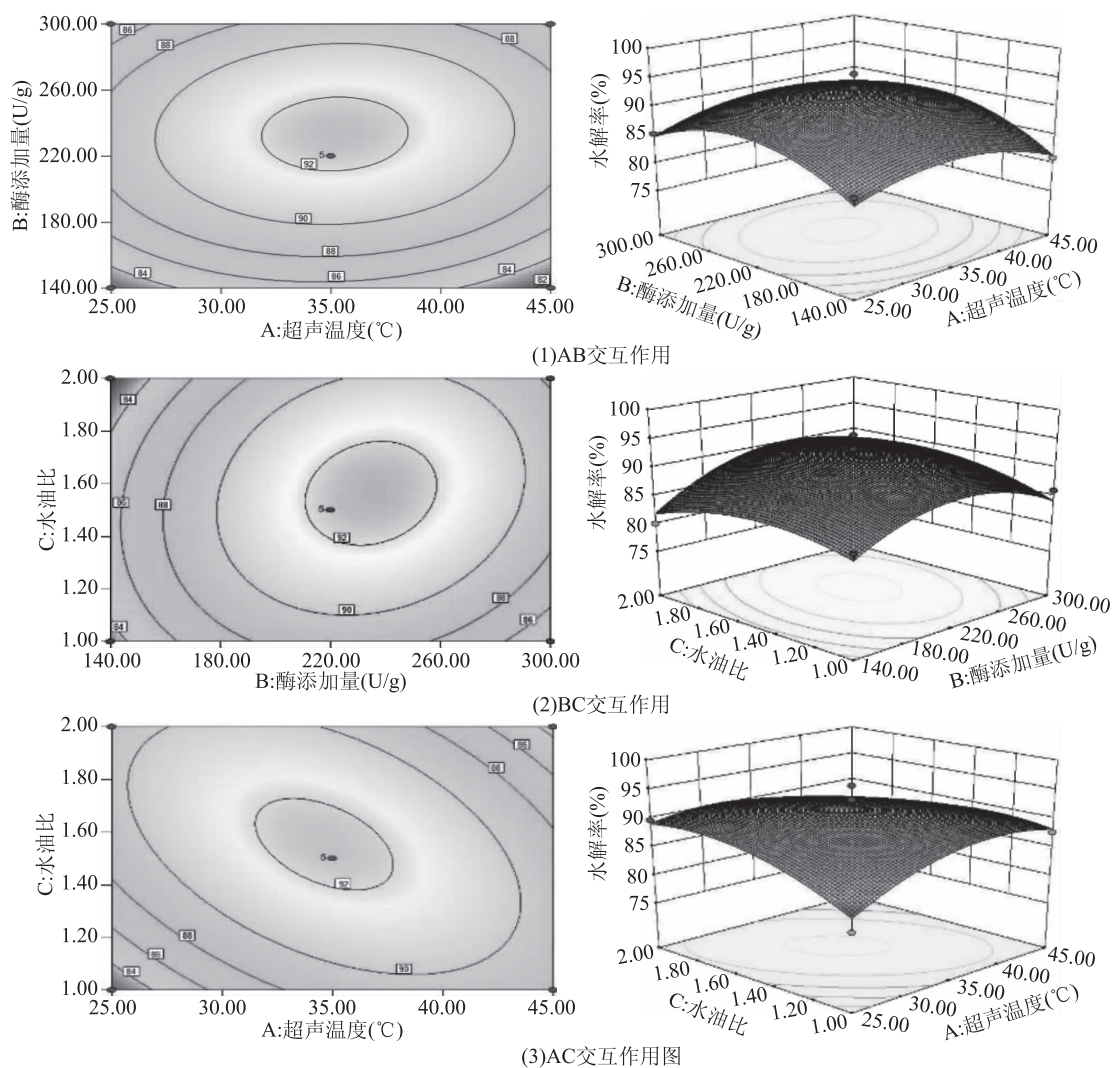


图7 响应面交互作用影响

Fig.7 The response surface graph of interaction effect on hydrolysis rate

(A^2)、水油比二次项 (C^2) 对响应值影响显著 ($p < 0.05$)。各影响因素对响应值影响性的排序为 $B > C > A$, 即酶添加量 $>$ 水油比 $>$ 超声温度。

2.3.3 响应面交互作用影响分析 等高线的形状可反映出交互效应的强弱, 椭圆形表示两因素作用显著, 而圆形则与之相反呈椭圆形。由图7可知, 超声温度与水油比交互作用显著, 对红花籽油提取率有显著影响, 这与方差分析结果相一致。

2.3.4 响应面验证实验 根据回归方程得出的最佳条件, 为了方便实验操作, 将条件定为: 超声温度 $28\text{ }^\circ\text{C}$, 酶添加量 280 U/g , 水油比 $1.6:1$, 得出红花籽油水解率分别为 $94.47\% \pm 0.33\%$ 。结果表明, 经过响应面回归方程拟合出的理论值和实际值相吻合, 证明用响应面法可以有效地优化红花籽油脂肪酶水解工艺。

2.4 动力学参数测定

2.4.1 米氏常数 K_m 测定 根据图8所知, 由拟合直线斜率和纵截距之比, 求得水浴酶解和超声波辅助脂肪酶水解红花籽油的米氏常数 K_m 为 20.44 mL/g 、 4.63 mL/g 。说明超声波辅助脂肪酶水解红花籽油的米氏常数降低, 即参加反应的活化分子数量增多, 反应

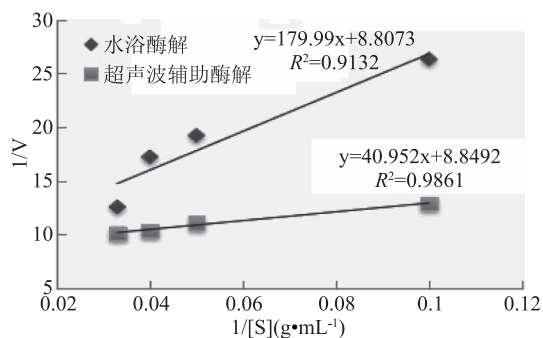


图8 两种不同酶解方式底物浓度与初速度的双倒数图

Fig.8 Lineweaver-Burk diagram between initial velocity and substrate concentration of two enzymatic hydrolysis methods 速率加快。超声波辅助效果显著优于水浴酶解, 在超声波辅助条件下, 可以增大受力面积, 提高红花籽油与磷酸缓冲液的相互作用, 使其之间的接触面积最大, 反应速率升高, 提高了不饱和脂肪酸的提取率^[20]。

2.4.2 表观活化能 E_a 测定 表观活化能测定实验数据及作图求解分别见表6和图9。

由拟合直线斜率求得水浴酶解和超声波辅助脂肪酶水解的表观活化能 E_a 分别为 2.40 kJ/mol 和

表5 米氏常数的测定数据

Table 5 The datas of Michaelis constant determination

[S]底物水含量 (mL·g ⁻¹)	V ₁	V ₂	1/[S]	1/V ₁	1/V ₂
10	0.038	0.0775	0.100	26.316	12.903
20	0.052	0.0900	0.050	19.231	11.111
25	0.058	0.0965	0.040	17.241	10.363
30	0.066	0.0985	0.033	12.579	10.152

2.05 kJ/mol。比较两种处理方式,超声波辅助酶解的表现活化能低于水浴酶解,温度是对表现活化能有影响的,活化能大的反应,其反应速率常数对温度的变化较为敏感。

表6 表现活化能实验数据

Table 6 The datas of activation energy determination

T (°C)	T (K)	1/T (1/K)	S1	logS1	S2	logS2
30	303.15	0.003299	84.590	1.9273	87.060	1.9398
35	308.15	0.003245	85.630	1.9326	88.610	1.9475
40	313.15	0.003193	87.610	1.9426	89.230	1.9505
45	318.15	0.003143	88.230	1.9456	90.640	1.9573

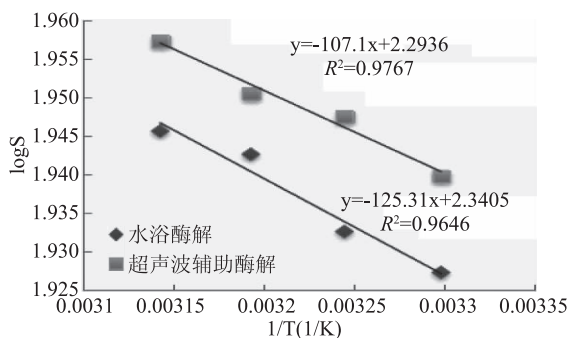


图9 两种不同酶解方式的 logS/T 图

Fig.9 log S/T diagram of two enzymatic hydrolysis methods

3 结论

采用响应面法对超声波辅助脂肪酸酶解红花籽油的工艺参数进行优化,建立了水解率的回归模型,由该模型优化的水解率最大时,工艺参数为超声时间 10 h,超声温度 28 °C, pH7.0,酶添加量为 280 U/g,水油比 1.6:1,在此条件下红花籽油的水解率达到 94.47% ± 0.33%,与模型预测结果相近,进一步验证了该模型的可靠性。通过米氏方程测定计算出水浴酶解反应的米氏常数 K_m 和表现活化能 E_a 分别为 20.44 mL/g 和 2.40 kJ/mol;超声波辅助酶解反应的米氏常数 K_m 和表现活化能 E_a 分别为 4.63 mL/g 和 2.05 kJ/mol。以上说明,超声波辅助脂肪酶酶解能有效地促进红花籽油的水解。

参考文献

[1] 赵秀玲. 红花在食品工业中的应用现状与展望[J]. 江苏调

味副食品, 2011, 28(3): 12-14.

[2] 冯棋琴. 超声对红花籽油性质影响及其提取与分离研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2010.

[3] 李彩云, 康健. 红花籽油的研究进展[J]. 食品工业, 2016, 37(6): 218-222.

[4] 李杨, 冯红霞, 王欢. 超声波辅助水酶法提取红花籽油的工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(7): 63-67.

[5] 冯棋琴. 超声对红花籽油性质影响及其提取与分离研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2010.

[6] 向小乐, 余信, 杨万根, 等. 响应曲面法优化茶叶籽油超声辅助 LVK 脂肪酶酶解工艺[J]. 食品工业科技, 2015, 18(37): 238-243.

[7] 刘书成, 章超桦, 洪鹏志, 等. 酶法制备 n-3 多不饱和脂肪酸甘油酯的研究进展[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(5): 98-103.

[8] 甘争艳. 无溶剂及微乳液体系中脂肪酶催化油脂水解反应研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2006.

[9] 刘自琴, 黄惠华. 响应面法优化脂肪酶的固定化条件及其水解橄榄油的特性研究[J]. 食品科学, 2012, 33(3): 184-189.

[10] 徐怀德, 唐菊, 刘立芳. 猪胰脂肪酶水解花椒籽油动力学及条件优化[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 55-59.

[11] 向小乐, 黄群, 杨万根, 等. 超声波辅助脂肪酶水解茶叶籽油条件的优化与动力学研究[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(2): 141-146.

[12] Ramachandran K B, Al-Zuhair S, Fong C S, et al. Kinetic study on hydrolysis of oils by lipase with ultrasonic emulsification[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 32(1): 19-24.

[13] Meenal S P, Virendra K R, Aniruddha B P. Enzymatic hydrolysis of castor oil process intensification studies[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 31(1): 31-41.

[14] 吕凯波, 王晶, 李香香, 等. 超声波辅助提取红花籽油的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(20): 44-46.

[15] 臧佳辰, 陶莎, 薛璟怡, 等. 大麻油脂脂肪酶水解条件的优化研究[J]. 中国油脂, 2013, 38(7): 56-59.

[16] GB/T 5530-2005, 动植物油脂酸值和酸度测定[S]. 北京: 中国国家标准化管理委员会, 2005.

[17] GB/T 5534-2008, 动植物油脂皂化值的测定[S]. 北京: 中国国家标准化管理委员会, 2008.

[18] 王开萍, 李红卫, 吴误, 等. 米曲霉 As-W6 脂肪酶的分离纯化及酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(18): 37-39.

[19] Eng - Tong Phuah, Oi - Ming Lai, Thomas Shean - Yaw Choong, et al. Kinetic study on partial hydrolysis of palm oil catalyzed by Rhizomucor miehei lipase[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2012, 78: 91-97.

[20] Oumpanioti M, Stamatis H, Xenakis A. Microemulsion-based organogels as matrices for lipase immobilization[J]. Biotechnology Advances, 2010, 28(3): 395-406.