

响应面优化水酶法提取裂壶藻油的工艺

荣 辉¹, 吴兵兵^{1,2}, 杨贤庆¹, 李来好^{1,3}, 陈胜军¹, 吴燕燕¹, 马海霞¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 国家水产品加工技术研发中心, 农业部水产品加工重点实验室, 广州 510300;
2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 3. 广东省渔业生态环境重点实验室, 广州 510300)

摘要:以裂壶藻干藻粉为原料, 以清油得率为评价指标, 采用两步酶解法提取油脂。在单因素实验的基础上, 对清油得率影响较大的碱性蛋白酶的作用条件应用响应面法进行优化, 依据回归分析确定碱性蛋白酶的最适作用条件。结果表明, 水酶法提取裂壶藻油的最适工艺条件为: 料液比 1:7, 中性蛋白酶添加量 7%, 酶解温度 45 ℃, 酶解时间 3 h, 酶解 pH 6.5; 碱性蛋白酶添加量 10%, 酶解温度 68 ℃, 酶解时间 6 h, 酶解 pH 9.4。在最适工艺条件下, 裂壶藻清油得率可以达到 (91.37 ± 0.14)%。气相色谱-质谱分析裂壶藻油中不饱和脂肪酸含量为 47.43%, 其中 DHA 含量为 35.09%。

关键词:裂壶藻油; 响应面法; 水酶法; 清油得率

中图分类号: TS201.2; TQ644 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2018)02-0098-06

Optimization of aqueous enzymatic extraction of oil from *Schizochytrium* sp. by response surface methodology

RONG Hui¹, WU Bingbing^{1,2}, YANG Xianqing¹, LI Laihao^{1,3},
CHEN Shengjun¹, WU Yanyan¹, MA Haixia¹

(1. Key Lab of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, National Research and Development Center for Aquatic Product Processing, South China Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Guangzhou 510300, China)

Abstract: The oil was extracted from *Schizochytrium* sp. dry algae powder by two-step enzymatic method with clear oil extraction rate as evaluation indicator. On the basis of single factor experiment, using response surface methodology to optimize the conditions of alkaline protease that had a great influence on the clear oil extraction rate, the optimal alkaline protease conditions were determined by regression analysis. The results showed that the optimal extraction conditions were obtained as follows: solid-liquid ratio 1:7, neutral protease dosage 7%, enzymolysis temperature 45 ℃, enzymolysis time 3 h, enzymolysis

pH 6.5; alkaline protease dosage 10%, enzymolysis temperature 68 ℃, enzymolysis time 6 h, enzymolysis pH 9.4. Under these conditions, the clear oil extraction rate of *Schizochytrium* sp. reached (91.37 ± 0.14)%. GC-MS analysis results showed that the content of unsaturated fatty acids in *Schizochytrium* sp. oil was 47.43%, in which the DHA content was 35.09%.

Key words: *Schizochytrium* sp. oil; response surface methodology; aqueous enzymatic method; clear oil extraction rate

收稿日期: 2017-07-07; 修回日期: 2017-11-17

基金项目: 广东省科技计划项目(2014A010107019); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2014TS24); 农业部水产品加工重点实验室开放基金项目(NYJG201407); 国家重点研发计划项目(2016YFF0202300); 广东省农业标准化专项资金项目

作者简介: 荣 辉(1981), 男, 博士, 主要从事微藻油的提取及多不饱和脂肪酸的分离纯化研究(E-mail) ronghui8915@163.com。

通信作者: 杨贤庆, 研究员(E-mail) yxqgd@163.com。

微藻分布广泛,含有丰富的蛋白质、碳水化合物、脂肪酸等,是生产食品、药品等高价生物活性物质和生物柴油的重要来源^[1-2],高产油品种微藻的筛选及培养、微藻油的提取已经成为人们的研究热点^[3-4]。目前人们研究酶法提取微藻油,大多是利用生物酶酶解藻细胞,然后对酶解液用有机溶剂萃取,油脂提取率一般在50%左右^[5]。水酶法是一种新兴的油脂提取方法,通常使用机械来破碎油料,利用相关的生物酶酶解油料,从而使油脂从油料中被释放出来,利用蛋白质、多糖、淀粉等非油组分对油和水的双亲性以及油水相对密度的不同将非油组分与油分离^[6-7]。水酶法提油作用条件较温和,提取的油脂不与酶解产物发生反应,因此所得油的纯度高、品质好;水酶法提油工艺能耗小,污染小,可以有效保护环境^[8-9]。

本研究采用水酶法提取裂壶藻油,通过酶种类筛选实验,发现单一酶法提取裂壶藻油的提取率不高,为了提高油脂提取率,采用两步酶法提取裂壶藻油,在单因素实验的基础上应用响应面进行优化,得到水酶法提取裂壶藻油的最佳工艺。并利用气相色谱-质谱(GC-MS)联用仪对裂壶藻油的脂肪酸组成进行分析,为进一步分离纯化裂壶藻油中的DHA成分提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

裂壶藻(*Schizochytrium* sp.):由本实验室利用松花粉垂钓法对采自广州南沙红树林腐烂树叶进行分离纯化获得,经鉴定确定为裂壶藻,保存于本实验室藻种库中。

杰能科 Protex 6L 细菌碱性蛋白酶(580 000 U/g)、杰能科 Protex 7L 细菌中性蛋白酶(1 600 U/g),广州柏棠贸易有限公司;木瓜蛋白酶(800 U/mg),广州市齐云生物技术有限公司;柠檬酸、柠檬酸钠、氢氧化钠、氯仿、甲醇、石油醚均为分析纯,广州华屿欣实验器材有限公司。

1.1.2 仪器与设备

BS224S 分析天平,美国 Sartorius 公司;HH-4 快速恒温数显水浴箱;Wonbio-48R 高通量组织研磨仪;GCMS-QP2010 Plus 气相色谱-质谱联用仪,日本岛津公司;IS126 pH 计;IKA T25 数显匀浆机,德国艾卡仪器设备有限公司;TDZ5-WS 台式低速离心机;SQ510C 立式压力蒸汽灭菌器,日本 YAMATO 公司;ZQTY-70F 台式全温振荡培养箱;Avanti J-26XP 高效离心机,贝克曼库尔特有限公

司;DZF6050 真空干燥箱;SW-CJ-1FD 超净工作台;Alpha1-4 冷冻干燥机,德国 Christ 有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 裂壶藻的培养及收集

培养基:葡萄糖 25 g/L,酵母提取物 5 g/L,细菌学蛋白胨 10 g/L,海水晶 30 g/L。摇瓶培养条件:温度 28 ℃,转速 180 r/min,培养时间 96 h,pH 6.8。

收集培养液,在 8 000 r/min、4 ℃ 条件下离心 10 min,收集底部藻泥,经真空冷冻干燥得到裂壶藻藻粉。

1.2.2 两步酶法提油工艺

前处理:称 20 g 裂壶藻藻粉,按既定的比例加入 0.1 mol/L pH 4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,利用数显匀浆机处理 5 次,将均质后的藻液利用高通量组织研磨仪在 55 Hz 的条件下研磨 150 s。

碱提:用氢氧化钠溶液调节体系的 pH 为 9.5,在温度 60 ℃、匀速搅拌下碱提 2 h。

酶解:用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液调节体系的 pH 为 6.5,先加入一定量的中性蛋白酶,于数显恒温水浴锅中酶解一段时间,随后用氢氧化钠溶液调节体系的 pH 到一定的值,再加入一定量的碱性蛋白酶,于数显恒温水浴锅中继续酶解一段时间。

离心:酶解结束后取出酶解液,于 4 800 r/min 离心 10 min 后分层,取出上层清油。将取出的清油放入真空干燥箱中(103 ± 2)℃ 条件下处理 30 min,冷却后称重,所得结果即为清油质量。

按下式计算清油得率:

$$\text{清油得率} = \frac{\text{清油质量}}{\text{样品总油脂量}} \times 100\%$$

裂壶藻总油脂量的测定:称量 20 g 裂壶藻干藻粉,采用氯仿-甲醇法^[10]提取总油脂,经真空干燥后称重。

1.2.3 单因素条件对清油得率的影响

利用单因素实验的方法,考察各因素(固定水平:料液比 1:6;中性蛋白酶添加量 5%、酶解温度 45 ℃、酶解时间 2 h、酶解 pH 6.5;碱性蛋白酶添加量 10%、酶解温度 60 ℃、酶解时间 5 h、酶解 pH 9.5)对裂壶藻清油得率的影响,考察的因素为:料液比 1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9;中性蛋白酶影响因素为添加量 1%、3%、5%、7%、9%、11%,酶解温度 35、40、45、50、55、60 ℃,酶解时间 1、2、3、4、5、6 h;碱性蛋白酶影响因素为酶解 pH 8.5、9、9.5、10、10.5、11,添加量 4%、6%、8%、10%、12%、14%,酶解温度 50、55、60、65、70、75 ℃,酶解时间 3、4、5、6、7、8 h。对某一单因素进行考察时,其余因素均取固

定水平值,以裂壶藻清油得率作为考察指标。

1.2.4 响应面对碱性蛋白酶提取条件的优化

在单因素实验的基础上,根据 Box - Behnken 的中心组合实验设计原理,利用 Design Expert 8.0.6 软件设计响应面实验方案并进行实验。

1.2.5 裂壶藻油脂脂肪酸组成的分析

甲酯化:取 500 mg 裂壶藻油,加入 2 mL 14% 三氟化硼 - 甲醇溶液,进行甲酯化反应 30 min (60 °C 水浴),冷却至室温,分别加入 1 mL 正己烷和蒸馏水,振荡 1 min,静置分层后,吸取上层有机层,挥干溶剂,用正己烷定容,过 0.22 μm 有机滤膜后,用 GC - MS 进行分析测定。

GC 条件:DB - 5MS 色谱柱 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm);进样口温度 230 °C;升温程序为 110 °C 保持 4 min,以 10 °C/min 升温到 160 °C,保持 1 min,最后以 5 °C/min 升到 240 °C,保持 15 min;载气为氦气,流量为 1.52 mL/min;采用恒线速度,分流比 30:1;进样量 1 μL。

MS 条件:离子源温度 200 °C;电子能量 70 eV;质量扫描范围 (m/z) 40 ~ 550;溶剂切除时间 3 min。

1.2.6 数据处理

每组实验做 3 次,结果以平均值表示。表格以及单因素结果分析图用 Excel 软件绘制,显著性分析用 SPSS 20 软件,响应面实验设计以及分析用 Design Expert 8.0.6 软件。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 料液比对清油得率的影响

采用 1.2.2 的工艺流程进行提取油脂的实验。料液比对两步酶法提取油脂的清油得率影响见图 1。由图 1 可知,料液比从 1:4 ~ 1:7 递变时,清油得率逐渐增加,料液比由 1:7 ~ 1:9 递变时,清油得率

降低。这是因为料液比过低时,体系黏度过大,流动性较差,不利于酶与底物充分反应;料液比过高时,底物浓度还有酶浓度都被稀释,相互碰撞的概率降低,进而影响清油得率^[11]。因此,选择合适的料液比为 1:7。

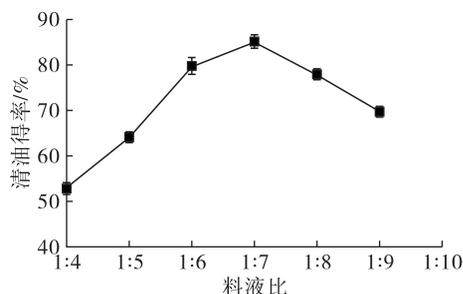


图 1 料液比对清油得率的影响

2.1.2 中性蛋白酶作用条件对清油得率的影响

中性蛋白酶作用条件对清油得率的影响因素主要有 3 个:中性蛋白酶添加量、中性蛋白酶酶解时间和中性蛋白酶酶解温度,结果见图 2。由图 2A 可知,中性蛋白酶添加量在 1% ~ 7% 范围内递增时,清油得率逐渐增加,中性蛋白酶添加量超过 7% 时,清油得率变化不大,所以中性蛋白酶的最适添加量为 7%;由图 2B 可知,初期随着酶解时间延长清油得率不断增加,3 h 时清油得率最高,为 89.63%,此时中性蛋白酶酶解反应完全;继续延长酶解时间,清油得率变化不大,酶解时间延长不仅会影响油的品质,而且会导致成本上升,所以中性蛋白酶的最适酶解时间为 3 h;由图 2C 可知,酶解温度低于 45 °C 时,随着酶解温度的升高,清油得率不断增加,超过 45 °C 后,随着酶解温度升高,清油得率有所降低,这是因为中性蛋白酶有最适温度,超过最适温度后酶活性会降低甚至部分或全部失去^[12],因此中性蛋白酶最适温度为 45 °C。

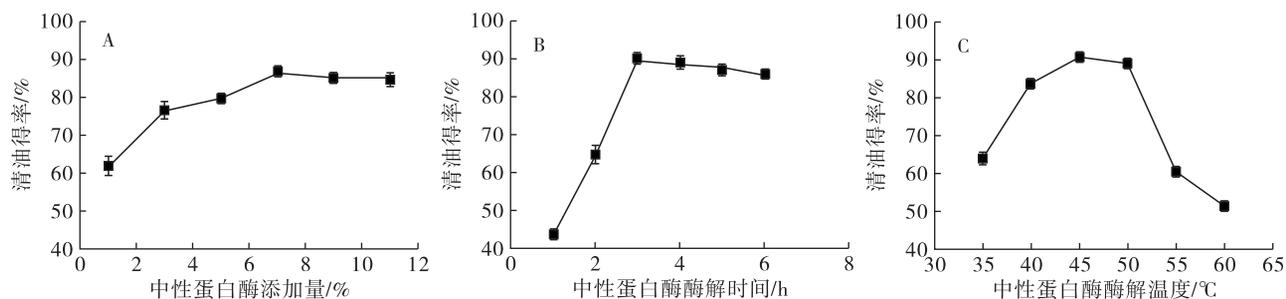


图 2 中性蛋白酶作用条件对清油得率的影响

2.1.3 碱性蛋白酶作用条件对清油得率的影响

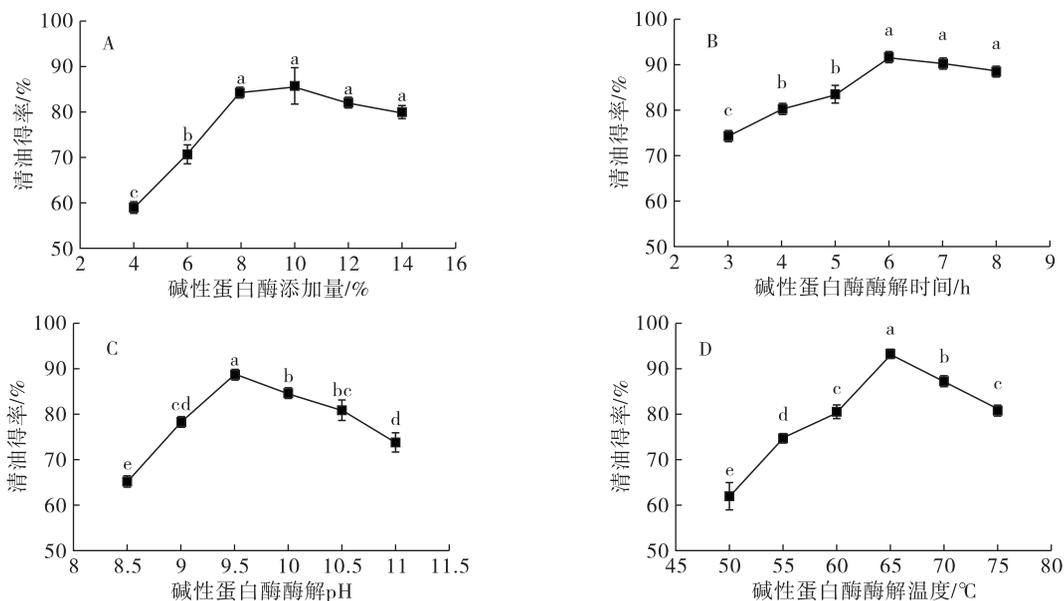
碱性蛋白酶作用条件对清油得率的影响因素主要有 4 个:碱性蛋白酶添加量、碱性蛋白酶酶解时间、碱性蛋白酶酶解温度和碱性蛋白酶酶解 pH,结

果见图 3。由图 3A 可知,随着碱性蛋白酶添加量的增大,清油得率不断增加,添加量达 10% 时清油得率最高,为 85.61%,随后增大碱性蛋白酶的添加量,清油得率几乎不变,因此从成本方面考虑,碱性

蛋白酶最适添加量为 10%。由图 3B 可知,在酶解时间 6 h 以内,随着酶解时间的延长,清油得率不断增加,这是因为碱性蛋白酶不断与底物反应,底物反应完全;6 h 后,延长碱性蛋白酶酶解时间,清油得率变化不大,这是因为随着酶解时间的延长,酶解反应逐渐完全,物料中流出来的油脂的量逐渐减少,已提取出来的游离态的油在搅拌以及温度的作用下发生部分乳化现象,使清油得率略有减小,同时时间过长也会使油的品质降低,成本升高。因此,碱性蛋白酶最适酶解时间为 6 h。由图 3C 可知,当酶解 pH 小于 9.5 时,随着酶解 pH 的升高清油得率不断增加,酶解 pH 为 9.5 时清油得率最高为 88.85%,随后增大酶解 pH,清油得率不断降低,这是因为酶都有最适 pH,过高或过低对酶的活性都有抑制作用^[13],甚至会使酶失去活性。因此,碱性蛋白酶的最适 pH 为 9.5。由图 3D 可知,酶解温度在 50 ~ 65 °C 范围内,随着酶解温度升高清油得率不断增

加,超过 65 °C 后,继续升高酶解温度清油得率不断降低,这是因为酶都有最适的温度,当温度低于该温度时会抑制酶的活性,温度高于该温度时也会使酶的活性降低且温度过高时甚至会使蛋白质变性从而使酶失去活性^[14],因此碱性蛋白酶的最适温度为 65 °C。

利用 SPSS 软件对碱性蛋白酶作用条件对清油得率影响的显著性差异进行分析。从图 3 可以看出,4 个因素对于清油得率的影响均显著 ($P < 0.05$),对于碱性蛋白酶添加量,在 10% 时清油得率最高,之后继续增大添加量对清油得率的影响差异不显著;碱性蛋白酶在 6 h 时清油得率最高,之后延长酶解时间对清油得率的影响差异不显著;酶解 pH 为 9.5 时清油得率最高,酶解 pH 为 9 和 10 时清油得率与 pH 为 9.5 时清油得率差异显著;碱性蛋白酶在温度为 65 °C 时清油得率最高,温度为 60 °C 和 70 °C 时清油得率与温度为 65 °C 时清油得率差异显著。



注: $P < 0.05$, 差异显著, $a > b > c > d > e$ 。

图 3 碱性蛋白酶作用条件对清油得率的影响

2.2 响应面分析

2.2.1 实验设计及结果

料液比是水酶法提取油脂的重要影响因素,因为料液比不仅影响着底物浓度,同时也影响添加的酶的浓度,从而影响清油得率。通过两步酶法提取裂壶藻油的清油得率与前期酶筛选中只用中性蛋白酶提取裂壶藻油的清油得率相比可知,碱性蛋白酶对破壁后的裂壶藻的作用较大,破乳效果较好,因此该工艺的关键一步是添加碱性蛋白酶继续酶解增大清油得率。通过 SPSS 软件对碱性蛋白酶的作用条件的单因素结果进行显著性分析,在单因素实验结果的

基础上,以碱性蛋白酶酶解 pH、料液比、碱性蛋白酶酶解温度为自变量,以清油得率 (Y) 作为响应值,采用三因素三水平响应面实验对碱性蛋白酶提取裂壶藻油的提取条件进行优化。响应面实验因素水平见表 1,响应面实验设计及结果见表 2。

表 1 响应面实验因素水平

水平	A 碱性蛋白酶酶解 pH	B 料液比	C 碱性蛋白酶酶解温度/°C
-1	9.0	1:6	60
0	9.5	1:7	65
1	10.0	1:8	70

表2 响应面实验设计及结果

实验号	A	B	C	Y/%
1	-1	-1	0	85.73
2	0	0	0	90.91
3	0	-1	1	89.11
4	1	0	-1	84.27
5	-1	0	1	88.35
6	-1	1	0	85.79
7	1	0	1	86.93
8	0	0	0	90.37
9	-1	0	-1	83.10
10	0	-1	-1	83.21
11	0	0	0	90.85
12	0	1	1	89.27
13	0	0	0	91.15
14	0	1	-1	85.35
15	0	0	0	91.21
16	1	1	0	85.83
17	1	-1	0	86.05

2.2.2 回归方程及参数分析

利用 Design Expert 8.0.6 软件对表 2 的实验结果进行多元回归拟合分析,得到二次回归模型为:
 $Y = 90.90 + 0.014A + 0.27B + 2.22C - 0.070AB - 0.65AC - 0.50BC - 3.06A^2 - 1.99B^2 - 2.18C^2$ 。

回归模型的方差分析结果见表 3。由表 3 可知,失拟项($P = 0.1151 > 0.05$)不显著,模型的 P 小于 0.0001,表明该回归模型极显著;该模型 $R^2 = 0.9868$, $R_{Adj}^2 = 0.9698$,表明该模型的拟合程度良好,实验误差小,能较好地反映出裂壶藻清油得率与料液比、酶解温度、酶解 pH 之间的关系^[15],因此可以用此模型进行分析和预测。根据表 3 中 F 值的大小,可以知道各因素对清油得率的影响顺序为 $C > B > A$;根据 P 值变化可以知道 C 、 A^2 、 B^2 、 C^2 对清油得率的影响极显著, AC 对清油得率的影响显著。

表3 回归模型的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	127.01	9	14.11	58.07	<0.0001
A	1.513E-0.03	1	1.513E-0.03	6.224E-0.03	0.9393
B	0.57	1	0.57	2.36	0.1687
C	39.29	1	39.29	161.70	<0.0001
AB	0.02	1	0.02	0.08	0.7846
AC	1.68	1	1.68	6.90	0.0341
BC	0.98	1	0.98	4.03	0.0846
A ²	39.43	1	39.43	162.27	<0.0001
B ²	16.64	1	16.64	68.46	<0.0001
C ²	19.92	1	19.92	81.99	<0.0001
残差	1.70	7	0.24		
失拟项	1.26	3	0.42	3.80	0.1151
纯误差	0.44	4	0.11		
总和	128.71	16			

注: $P < 0.05$, 差异显著; $P < 0.01$, 差异极显著。

2.2.3 最佳提取工艺的确定

通过 Design Expert 8.0.6 软件进行预测分析,并考虑到实际的操作,最终得到水酶法提取裂壶藻油的工艺条件为:料液比 1:7,中性蛋白酶添加量 7%,酶解时间 3 h,酶解温度 45℃,酶解 pH 6.5;碱性蛋白酶添加量 10%,酶解时间 6 h,酶解温度 68℃,酶解 pH 9.4。在优化条件下进行 3 次验证性实验,得到的裂壶藻清油得率为 $(91.37 \pm 0.14)\%$,与预测值 91.47% 相接近,表明优化后所得出的参数条件是可靠的。

2.3 裂壶藻油脂肪酸组成

对裂壶藻油脂肪酸组成进行了 GC-MS 分析,根据 GC-MS 联用仪获得质谱信息经数据库检索与

标准谱图对照,并分别对色谱图进行面积归一化定量各种脂肪酸含量,结果见表 4。由表 4 可知,裂壶藻油不饱和脂肪酸含量为 47.43%,其中 DHA 含量为 35.09%。

表4 裂壶藻油脂肪酸组成及含量 %

脂肪酸	含量	脂肪酸	含量
十二烷酸	0.21	硬脂酸	1.86
十三烷酸	0.22	油酸	1.40
十四烷酸	4.18	亚麻酸	0.96
十四碳烯酸	0.66	花生四烯酸	6.85
十五烷酸	10.50	二十碳五烯酸(EPA)	0.91
肉豆蔻酸	32.56	二十二碳烷酸	0.14
十六碳烯酸	1.56	二十二碳六烯酸(DHA)	35.09
十七烷酸	2.73		

3 结论

以裂壶藻藻粉作为原料,采用水酶法提取裂壶藻油。通过单因素实验和响应面实验确定了水酶法提取裂壶藻油的最佳工艺条件。最终得到水酶法提取裂壶藻油的最佳工艺条件为:料液比 1:7,中性蛋白酶添加量 7%,酶解时间 3 h,酶解温度 45℃,酶解 pH 6.5;碱性蛋白酶添加量 10%,酶解时间 6 h,酶解温度 68℃,酶解 pH 9.4。在最佳工艺条件下裂壶藻清油得率为(91.37 ± 0.14)%。应用该方法提取裂壶藻油清油得率高,乳化程度低,乳油产量低,具有较高的工业推广应用价值。

通过 GC-MS 对裂壶藻油的脂肪酸组成进行分析,结果表明裂壶藻油不饱和脂肪酸含量为 47.43%,其中 DHA 含量为 35.09%,藻油的营养价值高。

参考文献:

- [1] SPOLAORE P, JOANNIS - CASSAN C, DURAN E, et al. Commercial applications of microalgae [J]. J Biosci Bioeng, 2006, 101(2): 87-96.
- [2] CHENG J, HUANG R, YU T, et al. Biodiesel production from lipids in wet microalgae with microwave irradiation bio-crude production from algal residue through hydrothermal liquefaction [J]. Bioresour Technol, 2014, 151(1): 415-418.
- [3] 杨勋, 郝宗娣, 张森, 等. 营养元素和 pH 对若夫小球藻生长和油脂积累的影响 [J]. 南方水产科学, 2013, 9(4): 33-38.
- [4] 王蒙, 李纯厚, 戴明. 以海洋微藻为原料提取生物燃料的研究进展与发展趋势 [J]. 南方水产, 2009, 5(1): 74-80.
- [5] 刘颖. 产油微藻酶法提取油脂 [D]. 北京: 北京化工大学, 2012.
- [6] 郭兴凤, 陈定刚, 孙金全, 等. 水酶法提油技术概述 [J]. 粮油加工, 2007(5): 70-72.
- [7] ZHANG W G, ZHANG D C, CHEN X Y. A novel process for extraction of tea oil from *Camellia oleifera* seed kernels by combination of microwave puffing and aqueous enzymatic oil extraction [J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2012, 114(3): 352-356.
- [8] LAMSAL B P, MUPHY P A, JOHNSON L A. Flaking and extraction as mechanical treatments for enzyme-assisted aqueous extraction of oil from soybeans [J]. J Am Oil Chem Soc, 2006, 83(11): 973-979.
- [9] 王瑛瑶, 贾照宝, 张霜玉. 水酶法提油技术的应用进展 [J]. 中国油脂, 2008, 33(7): 24-26.
- [10] 杨钦. 裂殖壶菌脂肪酸合成相关蛋白过表达菌株的构建和酶法破壁提取油脂工艺的研究 [D]. 山东: 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- [11] 李静, 姚茂君, 李俊, 等. 响应面法优化牡丹籽油的水酶法提取工艺 [J]. 中国油脂, 2014, 39(10): 14-18.
- [12] JULIANA M M, LAWRENCE A J. Two-stage counter-current enzyme-assisted aqueous extraction processing of oil and protein from soybeans [J]. J Am Oil Chem Soc, 2009, 86(3): 283-289.
- [13] ZHANG Y L, LI S, YIN C P, et al. Response surface optimisation of aqueous enzymatic oil extraction from bayberry (*Myrica rubra*) kernels [J]. Food Chem, 2012, 135(1): 304-308.
- [14] 张志伟, 王素梅. 水酶法提取玉米胚芽油-酶解工艺参数优化 [J]. 食品研究与开发, 2015, 36(9): 115-118.
- [15] 王胜男, 江连洲, 李杨, 等. 响应面法优化碱性蛋白酶提取榛子油工艺 [J]. 中国油脂, 2011, 36(12): 66-69.
- (上接第 97 页)
- [3] 钱学射, 张卫民, 顾龚平, 等. 鳄梨资源的开发利用 [J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(5): 23-25.
- [4] 王萍, 张银波, 江木兰. 多不饱和脂肪酸的研究进展 [J]. 中国油脂, 2008, 33(12): 42-46.
- [5] 岳琳, 丁春瑞. 新疆南瓜子营养成分及脂肪酸组成分析 [J]. 中国油脂, 2016, 41(7): 57-59.
- [6] 陈敏. 膳食单不饱和脂肪酸的营养意义 [J]. 实用营养杂志, 1995(3): 63-66.
- [7] 吾买尔夏提·塔汗, 南蓬, 艾尔买克. 新疆野扁桃种仁油脂脂肪酸成分的 GC-MS 分析 [J]. 中国油脂, 2009, 34(11): 77-79.
- [8] 王伟, 张伟敏. 单不饱和脂肪酸的功能特性 [J]. 中国食物与营养, 2005, 4(3): 44-46.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 大豆油: GB 1535—2003 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 花生油: GB 1534—2003 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 芝麻油: GB 8233—2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 橄榄油、油橄榄果渣油: GB 23347—2009 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [13] 张东生, 薛雅琳, 金青哲, 等. 精炼过程对油茶籽油品质影响的研究 [J]. 中国油脂, 2014, 39(9): 18-22.
- [14] 傅红, 赵霖, 杨琳, 等. 中国市售食品中反式脂肪酸含量的现状研究 [J]. 中国食品学报, 2010, 8(4): 48-52.