

## 三液相酶催化体系水解橄榄油的研究

陈 华<sup>1</sup>,李志刚<sup>1</sup>,王永华<sup>2</sup>,杨 博<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广州 510006; 2. 华南理工大学 食品科学与工程学院, 广州 510641)

**摘要:**采用三液相酶催化体系水解橄榄油,考察构成三液相体系的物质对酶的影响;考察了硫酸铵的含量和 PEG400 的含量对酶的分配分数、回收率及催化效率的影响,研究了中下相与油的体积比对水解橄榄油的影响,并初步探究了三液相体系水解橄榄油的微观液滴结构。结果表明:在酶添加量 142.5 U/g、硫酸铵含量 15%、PEG400 含量 28%、中下相与油的体积比 3:1、转速 200 r/min 条件下,酶的分配系数达到 28.28,酶的回收率达 99.65%,水解 24 h 后,脂肪酸含量达 98.17%,在对照(油水体系)中,相同条件下产生的脂肪酸含量仅为 42.06%。显微镜下液滴观察结果表明,三液相体系中独特的液滴结构可能是该体系优于油水两相体系的原因。

**关键词:**三液相;油脂水解;橄榄油;脂肪酶

中图分类号:TQ641;TQ032

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)07-0051-06

### Hydrolysis of olive oil by lipase in three liquid phase system

CHEN Hua<sup>1</sup>, LI Zhigang<sup>1</sup>, WANG Yonghua<sup>2</sup>, YANG Bo<sup>1</sup>

(1. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China;

2. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

**Abstract:** The effects of the materials on the enzyme in three liquid phase system were investigated by hydrolyzing olive oil in three liquid phase catalytic system. The contents of ammonium sulfate and PEG400 on the partition coefficient, recovery and catalytic efficiency of the lipase were investigated. The effect of the volume ratio of middle-bottom phase to oil on the hydrolysis of olive oil and the microdroplet structure of emulsion in three liquid phase system were studied. The results showed that under the conditions of enzyme dosage 142.5 U/g, ammonium sulfate content 15%, PEG400 content 28%, volume ratio of middle-bottom phase to oil 3:1, and agitation speed 200 r/min, the partition coefficient and recovery of the lipase were 28.28 and 99.65%, respectively. And the fatty acid content was 98.17% after hydrolysis in three liquid phase system for 24 h, while in the oil-water two phase system, the fatty acid content was only 42.06%. The unique droplet structure in the three liquid phase system might be the reason that the system was superior to the oil-water two phase system.

**Key words:** three liquid phase; oil hydrolysis; olive oil; lipase

脂肪酸是一类重要的化工平台化合物,可用来生产肥皂、工业用的表面活性剂、清洗剂等,被广泛

应用于涂料、粘合剂和表面活性剂等行业<sup>[1]</sup>。目前工业上通过采用高压水解法制备脂肪酸<sup>[2]</sup>,但反应需在高温高压下进行,能耗高,并且会伴随较大副反应发生,例如脂肪酸的氧化,油脂裂解等。特别是某些特殊的脂肪酸,例如花生四烯酸和亚油酸,由于含有多个不饱和键,在高温高压下极易氧化聚合,成为相关行业发展的一个主要瓶颈。近年来,利用脂肪酶催化水解油脂生产脂肪酸受到广泛的关注,其具有反应温度低、副反应少、能耗低等优点,而且酶表现出很高的选择性,得到的产物纯度高,几乎可以

收稿日期:2017-11-28;修回日期:2018-04-22

基金项目:广州市科技计划项目(201707010391);国家自然科学基金项目(2017MS078);中央高校基本科研业务费专项资金资助(21776103)

作者简介:陈 华(1993),男,硕士研究生,研究方向为酶催化体系(E-mail)201520133906@mail.scut.edu.cn。

通信作者:杨 博,教授(E-mail)yangbo@scut.edu.cn。

适用于所有油脂的水解<sup>[3-6]</sup>。但是相比传统方法,酶法催化的速率较慢,是制约其应用的主要难点。为了提高脂肪酶的催化效率,人们尝试了不同的方法,包括微乳液体系下水解油脂<sup>[3,7]</sup>,超声协助脂肪酶水解油脂<sup>[8-9]</sup>等。但各种方法均有一定的不足,例如在微乳液体系下酶催化水解速率虽然有所提升,但酶回收困难、产物分离困难,超声同样可提高油水体系的颗粒分散度,促进反应速率提升,但超声会使酶失活,减少酶的使用寿命。

脂肪酶在传统的油水体系中催化水解油脂,水解产物甘油与催化剂脂肪酶同处于一相中,高浓度甘油抑制了酶的水解行为,并且在油水体系下,油脂的分散性过小,乳液粒径过大。基于以上问题,本文设计了一种新型的催化体系——三液相催化体系。该体系由底物油脂和两互不相溶的水相组成。该体系中,酶倾向于分配至中间相,产物甘油分配于下相,实现了催化剂和产物的分离,减轻了产物抑制效应。水解橄榄油是用来表征酶的催化活力的一种经典方法,在本文的研究中,采用水解橄榄油来评价三液相酶催化体系的催化效率,并考察了脂肪酶及产物甘油在三液相体系中的分配情况,从成相盐及亲水性溶剂的种类、含量等方面研究了脂肪酶催化水解橄榄油的特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

橄榄油(含棕榈酸 11.47%,硬脂酸 4.27%,油酸 25.98%,亚油酸 52.84%,亚麻酸 5.44%),购自 Sigma 公司。脂肪酶 AY30,购自日本天野公司,经检测,人工底物酶活 5 000 U/g。PEG400, PEG600, PEG1000, 硫酸钠,硫酸铵,离子液体,正己烷,异丙醇,甲酸,1,4-二氧六环,1,4-丁二醇,1,2-丙二醇,甘油试剂盒,对硝基苯酚(纯度 >99%),对硝基苯酚辛酸酯(纯度 >99%)。

Waters-2695 高效液相色谱仪,ELX800 全自动酶标仪,BSA224S 电子天平,Axio Observer A1 倒置荧光显微镜,H1650-W 台式高速离心机,THZ-82 恒温振荡器。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 体系组成对酶的影响

取 1 g 酶粉溶解在 100 mL 水中,振荡混匀,制得酶液,待用。分别称取一定量的成相盐,亲水性溶剂,加入酶液,使其含量分别为:硫酸钠 30%,硫酸铵 30%,其余为 50%,室温(25℃)下存放 24 h,考察酶活力的变化,按下式计算酶活保留率  $R$ 。

$$R = E_t/E_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: $E_t$  为  $t$  时刻酶活; $E_0$  为初始时刻水溶液中的酶活。

#### 1.2.2 体系筛选

称取 2 g 的成相盐,加入上述酶液,待盐溶解后加入 3 g 亲水性溶剂,然后 4 000 r/min 离心 3 min,记录各相体积。取上层和下层溶液各 20  $\mu$ L,测定酶活。加入 2 g 橄榄油,37℃ 下水浴摇床 200 r/min 反应,定时取样,测定脂肪酸含量。按下式计算酶的分配系数  $K$  和回收率  $Y$  以及选择系数  $\beta$ 。

$$K = K_m/K_b \quad (2)$$

$$Y = 1/(1/K \times K_v + 1) \times 100\% \quad (3)$$

$$\beta = K/K_c \times 100\% \quad (4)$$

式中: $K_m$ ,  $K_b$  分别为中相酶活,下相酶活; $K_v$ ,  $K_c$  分别为中相与下相体积比,甘油的分配系数。

#### 1.2.3 成相盐和亲水性溶剂含量对反应的影响

固定成相盐的含量分别为 15% 和 20%,改变亲水性溶剂的含量,使其含量分别为 22% ~ 36%, 15% ~ 35%;固定亲水性溶剂的含量为 20% 和 30%,改变成相盐的含量,使其含量分别为 18% ~ 26%, 12% ~ 24%,加入酶液溶解成相盐和亲水性溶剂,然后加入占总体积质量 20% 的底物橄榄油构成三液相体系;上述条件下反应 3 h,测定不同组分含量下酶的活力以及脂肪酸的生成量。计算酶的分配系数、选择系数及回收率,确定最佳的反应参数。

#### 1.2.4 油量的影响

在最佳的成相盐和亲水性溶剂含量下,改变中下相和油的体积比,使其体积比分别为 4:1 ~ 1:1,测定不同体积比下脂肪酸的生成量。

#### 1.2.5 脂肪酶水解酶活的测定

脂肪酶的水解酶活采用 pNP 法测定<sup>[10]</sup>。定义在 37℃ 下,每分钟内水解对硝基苯酚辛酸酯生成 1  $\mu$ mol 对硝基苯酚所需酶量为一个酶活单位。

#### 1.2.6 甘油含量的测定

甘油含量由甘油试剂盒测定。

#### 1.2.7 脂肪酸含量的测定

脂肪酸的含量由 HPLC 测定。Waters-2695 高效液相色谱仪配备示差检测器,色谱柱为 Phenomenex Luna Silica(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m)。检测条件:流动相为正己烷-异丙醇-甲酸(体积比 21:1:0.003),流速 1 mL/min,柱温 30℃,进样量 10  $\mu$ L。产物组分利用标准品进行定性,含量采用面积归一化法计算。

## 2 结果与讨论

### 2.1 三液相体系的筛选

构成体系的物质对酶活力及稳定性的影响至关

重要,是保持该酶催化体系高效、长期稳定运转的先决条件。基于上述考量,首先考察了构成三液相的不同物质形成的溶液对酶活保留率的影响(25℃, 24 h)。结果如表1所示。

表1 脂肪酶在不同亲水性溶剂或成相盐下的

酶活保留率		%	
成相物质	R	成相物质	R
PEG400	164.43	[DMIM]Cl	21.38
PEG600	157.96	[EMIM]Br	14.15
PEG1000	166.01	[AMIM]Cl	172.65
硫酸钠	49.11	[EMIM]EtSO <sub>4</sub>	108.84
硫酸铵	113.25	1,4-二氧六环	150.30
[BMIM]Cl	125.77	1,4-丁二醇	34.81
[BMIM]Br	118.30	1,2-丙二醇	26.77
[BMIM]BF <sub>4</sub>	131.45		

由表1可知,酶在大部分亲水性溶剂中比较稳定,其中酶在聚乙二醇(PEG)溶液活性能得到很大程度的保留,这与之前的报道一致<sup>[11]</sup>,而在短链醇中,活性损失严重,24 h后,只保留不到35%的活

性。而离子液体对脂肪酶的影响与离子液体中阳离子类型具有很大的相关性,当阳离子为[BMIM]时,脂肪酶在其溶液中的酶活均较为稳定,而当阳离子为其他类型的离子时,其酶活损失通常较严重,不同阳离子类型的离子液体对酶的影响不同<sup>[12-13]</sup>。根据上述试验结果,选定硫酸钠、硫酸铵作为成相盐,亲水性溶剂分别为PEG400、PEG600、部分离子液体,分别构成三液相体系以考察脂肪酶AY30在中下相的分配系数及其催化效率。结果如表2、表3所示。

表2 不同体系下脂肪酶AY30的分配系数

亲水性溶剂	分配系数	
	硫酸铵	硫酸钠
PEG400	4.65	1.44
PEG600	1.45	0.85
[BMIM]Br	1.21	0.18
[BMIM]BF <sub>4</sub>	1.14	0.88
[EMIM]EtSO <sub>4</sub>	1.75	1.22

表3 不同体系下脂肪酶催化水解橄榄油的各组分含量

组分	硫酸钠体系下的含量						硫酸铵体系下的含量				%
	PEG400		PEG600		[BMIM]BF <sub>4</sub>		[BMIM]Br				
	PEG400*	PEG600*	PEG400*	PEG600*	PEG400*	PEG600*	PEG400*	PEG600*			
TAG	27.44	41.10	93.61	66.38	4.42	23.16	30.38	43.88	5.51	19.03	
FFA	54.47	40.74	1.92	15.86	91.03	64.92	54.67	39.69	91.73	69.02	
1,3-DAG	9.81	10.13	1.47	6.87	3.16	6.69	6.96	8.30	1.97	7.41	
1,2-DAG	8.28	8.03	3	10.86	1.39	4.16	7.99	8.14	0.8	3	

注:“\*”表示反应时间为36 h,其余反应时间为3 h。

由表2可知,在大部分体系中,脂肪酶AY30更易于富集于中相,其中在硫酸铵/PEG400体系中的分配系数为4.65,90%以上的酶均富集于中相,有利于酶的重复利用,减少底物抑制效应。针对脂肪酶回收率较高的三液相体系,考察了其对橄榄油的水解效果,结果如表3所示。由表3可知,在PEG400、PEG600构成的聚合物型三液相体系中,脂肪酶的催化效率远高于其他物质组成的体系。其中,PEG400所组成两类体系中,脂肪酶催化反应3 h后,脂肪酸的含量均超过54%,反应36 h后,脂肪酸的含量均超过90%,而在离子液体组成的体系中,脂肪酸含量低于20%,例如[BMIM]BF<sub>4</sub>构成的体系,反应3 h后,脂肪酸的含量仅为1.92%,几乎未发生水解。尽管酶在离子液体中的活性损失较低,但构成三液相体系后,酶在其中的催化能力显著下降。可能的原因是离子液体虽然没有使酶失活,但其溶液的其他性质抑制了酶的水解催化,例如黏度大,导致颗粒分散度低,从而极大地降低了酶的催

化效率。成相盐的种类对催化效率的影响不大,但之前的研究表明97%的硫酸铵可被回收<sup>[14]</sup>,综合考虑酶在体系中的分配及富集效果,油脂的水解效率以及盐回收的情况,选定硫酸铵/PEG400体系为较优体系,进行后续研究。

## 2.2 PEG400含量的影响

不同含量的PEG400会影响体系的各相组成及性质,进而改变酶在体系中不同相间的分配以及酶的催化环境,最终酶的催化效率也会随之发生改变。为了研究亲水性溶剂含量对催化反应的影响,首先固定成相盐含量,改变PEG400含量,考察酶的分配情况及催化效率,结果如表4、表5所示。

由表4可知,当硫酸铵含量固定为15%时,随着PEG400含量的增加,酶的分配系数先增加,当PEG400含量为28%时,酶的分配系数达到峰值,为28.28,回收率为99.65%。随着PEG400含量增加,酶活分配系数增加,可能的原因是随着PEG400含量增加中相极性变化接近酶的极性,酶被更多萃取

至中相,而进一步增加 PEG400 含量,酶的分配系数降低,但回收率却未降低,是因为增加 PEG400 的含量,中间相的体积也会增加。当硫酸铵含量固定为 20% 时,随着 PEG400 含量增加,酶的分配系数和回收率都逐渐下降,可能的原因是在较高盐含量的情况下,中相的极性偏离酶的极性,酶被更多地分配到下相。在硫酸铵含量为 15% 时,选择系数  $\beta$  随着 PEG400 含量增加先上升后下降,PEG400 的含量为

28% 时,其值超过 60,表明该条件下,脂肪酶与甘油分配于不同相中。由表 5 可知,当固定硫酸铵含量为 15% 时,增加 PEG400 含量,脂肪酸含量先增加后下降,PEG400 含量为 24%、28%、32% 时,对应生成的脂肪酸含量分别为 54.68%、55.81%、54.18%。而当硫酸铵含量为 20% 时,随着 PEG400 含量增加,脂肪酸的含量降低。

表 4 PEG400 含量对酶的分配及回收的影响

成相盐	PEG400 含量/%	分配系数 $K$	选择系数 $\beta$	回收率 $Y/\%$
15% 硫酸铵	22	22.00 ± 1.00	4.37 ± 0.85	89.11 ± 2.75
	24	24.73 ± 1.96	19.91 ± 1.43	97.01 ± 3.72
	28	28.28 ± 1.72	60.99 ± 3.30	99.65 ± 2.58
	32	26.12 ± 2.43	0.10 ± 0.01	99.61 ± 3.21
	36	23.34 ± 1.77	1.00 ± 0.07	99.47 ± 2.78
20% 硫酸铵	15	46.70 ± 2.95	48.64 ± 0.06	95.86 ± 3.93
	20	32.06 ± 3.44	37.12 ± 1.42	95.13 ± 4.18
	25	4.55 ± 0.02	4.93 ± 0.28	80.08 ± 5.03
	30	0.30 ± 0.30	0.40 ± 0.43	25.61 ± 1.58
	35	0.12 ± 0.00	0.15 ± 0.16	14.98 ± 0.71

表 5 PEG400 含量对脂肪酶水解橄榄油的影响

成相盐	PEG400 含量	TAG	FFA	1,3 - DAG	1,2 - DAG
15% 硫酸铵	22	34.43 ± 1.32	49.18 ± 0.84	9.49 ± 0.76	6.90 ± 0.41
	24	30.47 ± 2.99	54.68 ± 3.84	8.40 ± 0.59	6.45 ± 0.78
	28	28.58 ± 1.33	55.81 ± 3.33	7.54 ± 1.46	7.87 ± 0.63
	32	26.96 ± 2.17	54.18 ± 1.23	10.99 ± 0.37	7.87 ± 0.00
	36	38.46 ± 2.84	43.68 ± 2.85	8.90 ± 0.30	8.96 ± 0.58
20% 硫酸铵	15	27.71 ± 3.04	58.19 ± 3.80	7.86 ± 0.79	5.87 ± 0.90
	20	27.32 ± 2.82	58.03 ± 2.90	7.62 ± 2.05	6.32 ± 1.01
	25	39.70 ± 1.28	42.26 ± 2.93	8.21 ± 0.08	9.09 ± 0.86
	30	55.00 ± 3.83	27.42 ± 3.79	8.04 ± 1.21	9.54 ± 0.51
	35	48.66 ± 4.80	31.69 ± 2.58	8.92 ± 0.29	9.94 ± 0.72

### 2.3 成相盐含量的影响

与亲水性溶剂类似,成相盐的含量改变也会影响酶在体系中的分布,从而影响整个体系的反应速

率。将 PEG400 含量分别固定在 20%、30%,改变成相盐的含量,考察酶在体系中的分配及催化情况。结果如表 6、表 7 所示。

表 6 成相盐含量对酶的分配及回收的影响

亲水性溶剂	硫酸铵含量/%	分配系数 $K$	选择系数 $\beta$	回收率 $Y/\%$
20% PEG400	18	21.02 ± 2.20	9.09 ± 1.15	95.27 ± 4.64
	20	16.36 ± 1.70	8.37 ± 0.10	92.23 ± 5.19
	22	5.36 ± 0.06	6.55 ± 0.22	76.97 ± 4.29
	24	1.52 ± 0.09	5.42 ± 0.33	50.62 ± 3.93
	26	0.76 ± 0.04	0.72 ± 0.01	31.43 ± 3.21
30% PEG400	12	57.63 ± 2.44	8.21 ± 0.91	96.91 ± 2.48
	15	20.43 ± 1.77	7.90 ± 1.30	99.20 ± 5.57
	18	16.45 ± 2.58	8.08 ± 1.32	88.77 ± 4.01
	21	10.94 ± 2.10	3.19 ± 0.28	47.51 ± 2.41
	24	10.46 ± 1.11	1.11 ± 0.25	24.33 ± 2.84

表7 PEG400含量对脂肪酶水解橄榄油的影响

亲水性溶剂	硫酸铵含量	TAG	FFA	1,3-DAG	1,2-DAG
20% PEG400	18	30.14 ± 2.33	54.87 ± 2.59	8.06 ± 0.49	6.93 ± 0.82
	20	30.79 ± 3.01	51.94 ± 3.50	9.50 ± 0.47	7.77 ± 1.22
	22	32.76 ± 2.96	50.75 ± 2.22	8.78 ± 0.64	7.71 ± 0.81
	24	33.15 ± 2.17	50.04 ± 3.51	8.80 ± 1.19	8.01 ± 0.83
	26	26.45 ± 3.11	57.64 ± 1.78	8.06 ± 1.76	7.85 ± 1.19
30% PEG400	12	46.74 ± 2.45	42.84 ± 3.94	5.46 ± 1.19	4.26 ± 0.41
	15	54.36 ± 3.19	27.31 ± 2.48	9.05 ± 1.38	9.28 ± 0.19
	18	54.83 ± 2.94	27.58 ± 2.30	8.57 ± 0.31	9.02 ± 0.31
	21	40.10 ± 3.16	41.15 ± 2.06	8.97 ± 1.67	9.78 ± 0.66
	24	49.60 ± 1.69	30.19 ± 2.40	8.44 ± 1.55	11.77 ± 1.38

由表6可知,增加硫酸铵含量,酶的回收率以及选择系数 $\beta$ 均下降,可能的原因是随着盐含量的增加,下相的极性加大,酶被萃取到下相。由表7可知,当PEG400含量固定在30%时,其水解生成的脂肪酸含量均低于50%,而当PEG含量固定在20%时,在所考察的成相盐含量范围内水解生成的脂肪酸的含量均大于50%。

综合以上结果,考虑到脂肪酸的生成量,酶的分配系数以及选择系数 $\beta$ 值,最终选定15%的硫酸铵、28%的PEG400作为反应体系的参数进行后续的研究,此时酶的添加量为142.5 U/g(相对于底物橄榄油)。

#### 2.4 油量的影响

油脂水解过程中,油量会影响反应的效率,为了考察油量对水解反应的影响,固定酶的加入量为142.5 U/g,设置不同的中下相与油的体积比,分别为4:1、3:1、2:1、1:1,结果见图1。

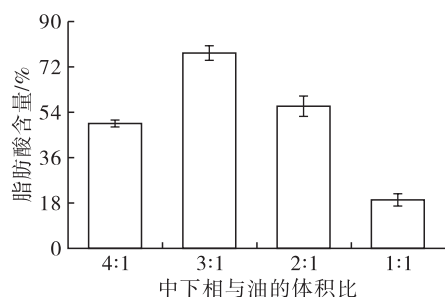


图1 不同中下相与油的体积比对脂肪酸生成量的影响

由图1可知,当中下相与油的体积比逐渐减小时,水解生成的脂肪酸含量先增加再逐渐减小。当体积比为3:1时,其水解效率最高,水解3 h脂肪酸含量达到77%。最终选定中下相与油的体积比为3:1进行水解反应。

#### 2.5 三液相体系与传统油水两相体系的比较

为了比较油水体系与三液相体系的差异,在上述最优条件下,分别考察了油水体系与三液相体系

在水解油脂方面的效率,中下相与油的体积比为3:1,酶添加量与三液相体系酶添加量相同为142.5 U/g,在37℃下反应,结果见图2。

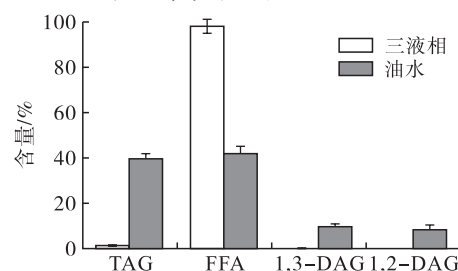


图2 三液相体系与传统油水体系对脂肪酶水解橄榄油的影响

由图2可知,在三液相体系下,油脂经过水解24 h后,其脂肪酸含量达98.17%,而在油水体系中,相同的加酶量情况下,水解24 h后,脂肪酸的含量仅为42.06%。

传统的油水体系中,油分散在水相中,而在三液相体系下,油的分散更为复杂,将油和PEG400分别用尼罗红和溴甲基蓝染色,高速搅拌下,取样在显微镜下观察到油滴被富含酶的聚乙二醇相包裹。这可能是三液相体系水解效率高于油水体系的原因,一方面,酶被萃取至富含聚乙二醇相,提高了局部反应的酶的含量,另一方面,生成的产物甘油被分配至下相,解除了产物抑制效应,从而大大加快并促进反应的进行。

### 3 结论

不同的亲水性溶剂对脂肪酶的活性影响不同,在构建的三液相体系中,硫酸铵/PEG400体系具有最佳的催化效果,当加酶量为142.5 U/g,硫酸铵和PEG400的含量分别为15%、28%,中下相与油体积比为3:1时,该条件下反应24 h后,脂肪酸的含量达到98.17%,而对照(油水体系)脂肪酸含量仅为42.06%。成相盐和亲水性溶剂的含量对催化效率有较大影响,较高含量的成相盐或者较高含量的

PEG400 均不利于酶的催化反应。相比油水体系,三液相体系反应更为快速和彻底的原因可能是酶被富集在中相,局部酶含量高,并且产物被分配至下相,解除了产物抑制。

#### 参考文献:

- [1] GOSWAMI D, BASU J K, DE S. Lipase applications in oil hydrolysis with a case study on castor oil: a review [J]. Crit Rev Biotechnol, 2013, 33(1):81-96.
- [2] MURTY V R, BHAT J, MUNISWARAN P K A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review [J]. Biotechnol Bioproc E, 2002,7(2):57-66.
- [3] 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.
- [4] PAN X X, XU L, ZHANG Y, et al. Efficient display of active *Geotrichum* sp. lipase on *Pichia pastoris* cell wall and its application as a whole-cell biocatalyst to enrich EPA and DHA in fish oil [J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(38):9673-9679.
- [5] YANG F, RUSSELL A J. A comparison of lipase-catalyzed ester hydrolysis in reverse micelles, organic solvents, and biphasic systems [J]. Biotech Bioeng, 1995,47(1):60-70.
- [6] 臧佳辰,陶莎,薛颀怡,等. 大麻油脂肪酶水解条件的优化研究[J]. 中国油脂,2013,38(7):56-59.
- [7] LOPEZ F, CINELLI G, COLELLA M, et al. The role of microemulsions in lipase-catalyzed hydrolysis reactions [J]. Biotechnol Prog, 2014, 30(2):360-366.
- [8] AWADALLAK J A, VOLL F, RIBAS M C, et al. Enzymatic catalyzed palm oil hydrolysis under ultrasound irradiation: diacylglycerol synthesis [J]. Ultrason Sonochem, 2013, 20(4):1002-1007.
- [9] MULINARI J, VENTURIN B, SBARDELOTTO M, et al. Ultrasound-assisted hydrolysis of waste cooking oil catalyzed by homemade lipases [J]. Ultrason Sonochem, 2017, 35:313-318.
- [10] 曾朝喜. 天然低共熔溶剂理化性质及其在脂肪酶催化转化应用中的研究[D]. 广州:华南理工大学,2016.
- [11] ZAMAN M M, HAYASHI Y, TALUKDER M M R, et al. Activity of acetone-treated *Chromobacterium viscosum*, lipase in AOT reverse micelles in the presence of low molecular weight polyethylene glycol [J]. Biochem Eng J, 2006,29(2):46-54.
- [12] GANSKE F, BORNSCHEUER U T. Lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in ionic liquids [J]. Org Lett, 2005, 7(14):3097-3098.
- [13] LIU B K, WU Q, XU J M, et al. *N*-methylimidazole significantly improves lipase-catalyzed acylation of ribavirin [J]. Chem Commun, 2007(3):295-297.
- [14] LI Z G, BO J, ZHANG D, et al. Aqueous two-phase extraction of 1,3-propanediol from glycerol-based fermentation broths [J]. Sep Purif Technol, 2009,66(3):472-478.
- [15] HINDARSO H A, AYLIANAWATI A, SIANTO M E. Biodiesel production from the microalgae nannochloropsis by microwave using CaO and MgO catalysts [J]. Int J Renew Energ Dev, 2015, 4(1):72-76.
- [16] CHEN G Y, SHAN R, LI S Y, et al. A biomimetic silicification approach to synthesize CaO-SiO<sub>2</sub> catalyst for the transesterification of palm oil into biodiesel [J]. Fuel, 2015, 153:48-55.
- [17] KESIC Z, LUKIC I, ZDUJIC M, et al. Assessment of CaTiO<sub>3</sub>, CaMnO<sub>3</sub>, CaZrO<sub>3</sub> and Ca<sub>2</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>5</sub> perovskites as heterogeneous base catalysts for biodiesel synthesis [J]. Fuel Process Technol, 2016, 143:162-168.
- [18] OUANJI F, KHACHANI M, ARSALANE S, et al. Synthesis of biodiesel catalyst CaO·ZnO by thermal decomposition of calcium hydroxylzincate dehydrate CaZn<sub>2</sub>(OH)<sub>6</sub>·2H<sub>2</sub>O: kinetic studies and mechanisms [J]. Monatsh Chem, 2016, 147:1693-1702.
- [19] ZHANG P B, SHI M, LIU Y L, et al. Sr doping magnetic CaO parcel ferrite improving catalytic activity on the synthesis of biodiesel by transesterification [J]. Fuel, 2016, 186:787-791.
- [20] ESKANDARI M, KIA A, AFRASIABI S, et al. Experimental study of biodiesel fuel production from Euphorbiaceae using a Ca-Al-CO<sub>3</sub> hydrotalcite catalyst [J]. Energ Sour Part A, 2017, 39(2):225-231.
- [21] 李晓红,邵长涛,芦鑫,等. 金属复合氧化物催化制备生物柴油重复使用性能比较 [J]. 中国油脂, 2017, 42(7):88-91,96.

(上接第 50 页)