

# 皱褶假丝酵母脂肪酶催化水解大豆油 工艺优化及机制研究

范修霖<sup>1</sup>,王鹏飞<sup>2</sup>,滕士奇<sup>1</sup>,张萍波<sup>1</sup>,严 琴<sup>2</sup>,范明明<sup>1</sup>

(1. 江南大学 化学与材料工程学院,合成与生物胶体教育部重点实验室,  
江苏 无锡 214122; 2. 南通金利油脂工业有限公司,江苏 南通 226017)

**摘要:**为了降低脂肪酶催化水解植物油脂的应用成本,以皱褶假丝酵母脂肪酶(CRL)为催化用酶,对比了CRL催化水解不同植物油脂的效果,同时以大豆油为研究对象,采用单因素实验考察pH、反应温度、反应时间、水油体积比和酶用量对水解率的影响,并运用响应面法优化工艺条件,进而对CRL催化甘油三酯水解的机制进行了总结。结果表明:CRL催化水解C<sub>18</sub>脂肪酸甘油酯的选择性较高;CRL催化大豆油水解的最优工艺条件为反应温度39.5℃、pH 6.7、水油体积比1:2.2、酶用量0.6%(以大豆油质量计),在此条件下反应2 h水解率可达77.21%,反应12 h水解率可达96.33%;CRL催化水解甘油三酯的反应机制主要为亲核催化三联体中的丝氨酸对甘油三酯的羰基进行亲核反应以夺取脂肪酸前体,然后水分子对该前体进行亲核反应释放脂肪酸。CRL能够在温和条件下高效催化植物油脂生产脂肪酸,是一种具有广阔应用前景的生物催化剂。

**关键词:**皱褶假丝酵母脂肪酶;大豆油;脂肪酸;水解;机制

中图分类号:TS225.1;Q814.9 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2022)10-0089-07

## Process optimization and mechanism of hydrolysis of soybean oil catalyzed by lipase from *Candida rugosa*

FAN Xiulin<sup>1</sup>, WANG Pengfei<sup>2</sup>, TENG Shiqi<sup>1</sup>, ZHANG Pingbo<sup>1</sup>,  
YAN Qin<sup>2</sup>, FAN Mingming<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Synthetic and Biological Colloids of Ministry of Education, School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. Nantong Jinli Oil Industry Co., Ltd., Nantong 226017, Jiangsu, China)

**Abstract:** In order to reduce the application cost of lipase catalyzed hydrolysis of vegetable oil, the lipase from *Candida rugosa* (CRL) was used as a catalyst, and the effect of hydrolysis of different vegetable oils with CRL was compared. Selecting soybean oil as the research object, the influence of pH, reaction temperature, reaction time, volume ratio of water to oil and dosage of enzyme on hydrolysis rate was investigated by single factor experiment, then the response surface methodology was applied to optimize the process conditions. The results indicated that the selectivity of hydrolysis of C<sub>18</sub> fatty acid glyceride catalyzed by CRL was higher. The optimal process conditions of hydrolysis of soybean oil catalyzed by CRL were obtained as follows: reaction temperature 39.5℃, pH 6.7, volume ratio of water to oil 1:2.2, and enzyme dosage 0.6% (based on soybean oil mass). Under these conditions, the hydrolysis

rate achieved 77.21% within 2 h and 96.33% within 12 h. The main reaction mechanism of CRL catalyzed hydrolysis of triglycerides was serine in the nucleophilic catalytic triad reacted nucleophilically with the carbonyl group of triglyceride to seize the fatty acid precursor, and

收稿日期:2021-07-22;修回日期:2022-04-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21978112)

作者简介:范修霖(1998),男,硕士研究生,研究方向为工业催化及油脂化工(E-mail)6200610026@stu.jiangnan.edu.cn.

通信作者:张萍波,副教授(E-mail)pingbozhang@126.com;  
范明明,教授(E-mail)fanmm2000@126.com.

then water molecule reacted nucleophilically with the precursor to release fatty acid. CRL can efficiently catalyze the production of fatty acids from vegetable oils under mild conditions, and it is a biocatalyst with broad application prospects.

**Key words:** lipase from *Candida rugosa*; soybean oil; fatty acid; hydrolysis; mechanism

脂肪酸是指一端含有一个羧基的长碳链羧酸,通常来源于动植物油脂<sup>[1]</sup>。脂肪酸可用作表面活性剂、润滑剂、合成中间体、肥皂原料和食品添加剂等,在化工、制药、日用品和食品等领域具有广泛应用<sup>[2]</sup>。天然脂肪酸主要由动植物油脂水解得到,制备方法主要有皂化法、连续逆流水解法和酶催化水解法等。皂化法的催化剂来源广、成本低,但其所用的强碱催化剂严重腐蚀设备,而且碱的排放严重污染环境,故逐渐被淘汰<sup>[2-4]</sup>。连续逆流水解法由于工艺简单且不需要催化剂,成为目前主要的工业化方法,但高温高压的条件使高碘值或含羟基的油脂容易发生副反应而产生大量副产物<sup>[5]</sup>。酶催化水解法的优点在于条件温和、催化效率高、专一性强,然而脂肪酶的成本高、环境耐受性差、回收利用较为困难,因此大规模工业化受到限制,目前仍处于实验室研究阶段。因此,对脂肪酶水解油脂的工艺进行优化及对脂肪酶进行改性<sup>[6-11]</sup>,对拓宽脂肪酶的应用领域以及提升其催化效果具有重要意义。

皱褶假丝酵母脂肪酶(Lipase from *Candida rugosa*, CRL)的酶代码为 EC 3. 1. 1. 3,可以催化水解多种形式的长链甘油三酯。根据结构分类,CRL属于典型的 $\alpha/\beta$ 脂肪酶。 $\alpha/\beta$ 脂肪酶<sup>[12]</sup>具有典型的亲核催化三联体中心“丝氨酸(Ser) - 组氨酸(His) - 天冬氨酸(Asp)”或“丝氨酸(Ser) - 组氨酸(His) - 谷氨酸(Glu)”<sup>[13]</sup>,能够催化油脂水解为甘油二酯、甘油单酯、甘油以及脂肪酸等产物。CRL属于全水解酶,可对甘油三酯进行较为完全的水解。

目前对于CRL催化植物油脂水解的研究主要围绕条件优化进行。本研究对比CRL催化水解不同植物油脂的效果,同时以大豆油为研究对象,分析pH、反应温度、酶用量、水油体积比、反应时间等因素对水解效果的影响,采用响应面法对工艺条件进行优化,进而总结CRL催化油脂中甘油三酯水解的机制,以期对CRL催化水解植物油脂的后续研究以及工业化生产提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

皱褶假丝酵母脂肪酶(Lipase from *Candida*

*rugosa*, CRL), 货号 L1754, 购自 Sigma - Aldrich 公司; 橄榄油和蓖麻籽油, 分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 椰子油、大豆油、亚麻籽油和棕榈油实验试剂, 购自广州富飞化工有限公司; 二水合磷酸二氢钠、十二水合磷酸氢二钠、氢氧化钾、石油醚(沸程 60 ~ 90 °C)、无水乙醇, 分析纯; 邻苯二甲酸氢钾, 基准试剂; 酚酞, 指示剂; 去离子水。

#### 1.1.2 仪器与设备

AR1140 电子分析天平, 上海奥豪国际贸易有限公司; SHZ - B 恒温水浴摇床, 金坛区金城春兰实验仪器厂; PH - 3C pH 计, 上海越平科学仪器有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 脂肪酶溶液的配制

磷酸盐缓冲溶液的配制: 分别配制 0.2 mol/L 磷酸二氢钠和 0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液, 按一定比例混合得到磷酸盐缓冲溶液, 通过 pH 计调控溶液的 pH。

脂肪酶溶液的配制: 称取一定质量的脂肪酶, 均匀分散于磷酸盐缓冲溶液中, 在容量瓶中进行定容, 在 2 ~ 8 °C 下保存待用。

### 1.2.2 脂肪酶催化植物油脂水解与水解率的测定

取一定量的脂肪酶溶液, 置于恒温水浴摇床中预热 30 min; 取一定量的植物油脂于 150 mL 锥形瓶中, 置于恒温水浴摇床中预热 5 min。分别完成预热后, 将脂肪酶溶液与植物油脂按一定体积比混合, 同时开启回旋振荡, 开始反应。反应一定时间后, 取出锥形瓶, 加入 15 mL 无水乙醇停止反应, 滴加 2 ~ 3 滴 10 g/L 酚酞溶液, 用标定好的氢氧化钾乙醇溶液进行滴定, 按下式计算反应后体系的酸值( $V_{A_1}$ )。

$$V_{A_1} = M \times V \times C / m \quad (1)$$

式中:  $M$  为氢氧化钾的摩尔质量, 56.1 g/mol;  $V$  为滴定所消耗的氢氧化钾乙醇溶液体积, mL;  $C$  为氢氧化钾乙醇溶液的浓度, mol/L;  $m$  为油脂的质量, g。

根据 GB/T 5530—2005 测定植物油脂的酸值, 根据 GB/T 5534—2008 计算植物油脂的皂化值。按

下式计算植物油脂的水解率( $X$ )。

$$X = (V_{A_t} - V_{A_0}) / (V_{S_0} - V_{A_0}) \times 100\% \quad (2)$$

式中: $V_{A_0}$ 为植物油脂的酸值(KOH),mg/g; $V_{S_0}$ 为植物油脂的皂化值(KOH),mg/g。

## 2 结果与讨论

### 2.1 皱褶假丝酵母脂肪酶催化不同植物油脂的水解效果

在反应温度 35 °C、pH 6.7、酶用量 0.5% (以植物油脂质量计)、水油体积比 1:2、摇床转速 160 r/min 的条件下反应 2 h,对比皱褶假丝酵母脂肪酶催化不同植物油脂的水解率,结果如图 1 所示。

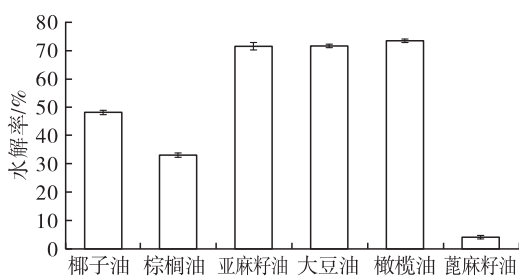


图 1 植物油脂种类对水解率的影响

由图 1 可知,CRL 对大豆油、亚麻籽油和橄榄油的水解率相对较高。脂肪酶的活性位点周围是具有特定形状的“口袋”区域,只有合适形状的底物才能与“口袋”高度契合,从而进入催化活性中心。脂肪酸碳链的长短和不饱和度直接影响相应甘油酯与酶活性位点周围“口袋”的契合程度<sup>[14]</sup>。椰子油、棕榈油、橄榄油、大豆油和亚麻籽油的主要脂肪酸组分分别为月桂酸( $C_{12:0}$ )、棕榈酸( $C_{16:0}$ )、油酸( $C_{18:1}$ )、亚油酸( $C_{18:2}$ )和亚麻酸( $C_{18:3}$ ),其中油酸、亚油酸和亚麻酸的碳链长短几乎一致,且分子结构均接近直线型。CRL 上结合位点周围的“口袋”与  $C_{18}$  脂肪酸的分子结构契合程度高,能够高效水解富含  $C_{18}$  脂肪酸的植物油脂,因此 CRL 对橄榄油、大豆油和亚麻籽油的催化水解活性较高。

虽然蓖麻籽油所含主要脂肪酸组分为蓖麻酸(含 18 个碳原子),但其水解率远低于其他植物油脂。原因在于蓖麻籽油的黏度高,液体内摩擦力强,导致传质速率低,进而影响其水解;另外,蓖麻籽油的主要脂肪酸中存在羟基,容易发生酯化等副反应,因此蓖麻籽油水解率较低<sup>[15]</sup>。

### 2.2 单因素实验

#### 2.2.1 反应温度的影响

在 pH 6.7、酶用量 0.5% (以大豆油质量计,下同)、水油体积比 1:2、摇床转速 160 r/min 的条件下反应 2 h,选取反应温度分别为 30、35、40、45 °C 和 50

°C,考察反应温度对水解率的影响,结果如图 2 所示。

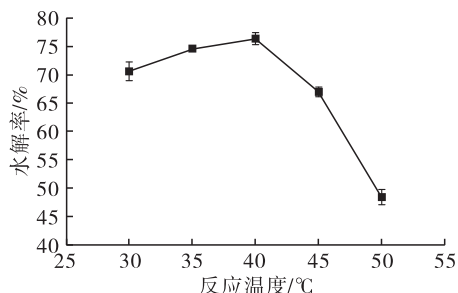


图 2 反应温度对水解率的影响

由图 2 可知,随着反应温度的升高,水解率先升高后降低,反应温度为 40 °C 时水解率最高。CRL 属于蛋白质,由肽链组成,肽链内部的折叠以及不同肽链之间的相互作用均依靠弱的非共价键,如氢键、二硫键、范德华力等。在合适的环境下,酶以断键-成键的动态平衡的方式维持肽链的三维结构,从而维持一定的蛋白质构象。温度对蛋白质中的非共价键有明显的影 响。当温度较低时,分子运动较弱,从而使酶与底物的碰撞频率低,因此相应表现形式为酶的催化活性低。温度的升高可加速酶与底物的碰撞频率,但温度过高容易破坏酶蛋白质分子内部的非共价键,从而导致酶蛋白质的构象遭到不可逆破坏,即蛋白质变性进而失活,导致水解率下降。因此,选择最佳反应温度为 40 °C。

#### 2.2.2 pH 的影响

在反应温度 40 °C、酶用量 0.5%、水油体积比 1:2、摇床转速 160 r/min 的条件下反应 2 h,选取 pH 分别为 6.1、6.4、6.7、7.0、7.3 和 7.6,考察 pH 对水解率的影响,结果如图 3 所示。

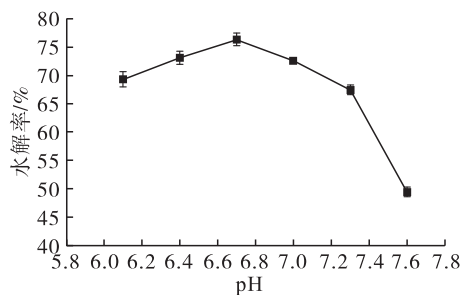


图 3 pH 对水解率的影响

由图 3 可知,随着 pH 的升高,水解率先升高后降低,pH 为 6.7 时水解率最高。水溶液中的  $H^+$  或  $OH^-$  的浓度影响酶的构象以及酶-底物复合中间体的离子化状态,从而影响酶的催化活性。离子浓度的变化对酶活性的影响类似于激活剂和抑制剂的作用<sup>[16]</sup>:当 pH 为 6.7 时,CRL 的肽链之间的氢键较为稳

定,亲核中心构象处于高活性状态,且进行亲核加成反应后所形成的酶-底物复合中间体比较稳定,从而能够快速完成催化反应,此时 $H^+$ 相当于激活剂;当pH偏离6.7时,脂肪酶的活性位点与中间体的稳定性有所降低,反应速率降低。因此,选择最佳pH为6.7。

### 2.2.3 水油体积比的影响

在反应温度 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 、pH 6.7、酶用量0.5%、摇床转速 $160\text{ r/min}$ 的条件下反应2 h,选取水油体积比分别为2:1、1:1、1:2、1:3和1:4,考察水油体积比对水解率的影响,结果如图4所示。

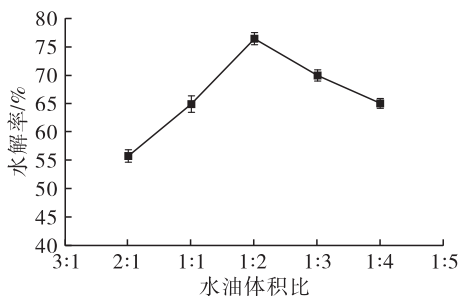


图4 水油体积比对水解率的影响

由图4可知,随着水含量的减少,水解率先升高后降低,水油体积比为1:2时水解率最高。CRL的亲核催化三联体通常埋在具有亲水-疏水性的 $\alpha$ -螺旋“盖子”下方,当脂肪酶处于水相中时,“盖子”处于闭合构象,脂肪酶不表现出催化活性;当亲脂性物质接近时, $\alpha$ -螺旋的构象重新变化,“盖子”处于开放构象,亲脂性物质进入活性中心进行反应<sup>[17]</sup>。因此,CRL处于油水界面上才能进行“界面活化”,水油体积比影响脂肪酶与油脂底物的有效接触程度<sup>[18]</sup>。水含量过高或过低时,油水界面比表面积过小,从而导致处于油水界面的脂肪酶数量低,水解率低。因此,选择最佳水油体积比为1:2。

### 2.2.4 酶用量的影响

在反应温度 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 、pH 6.7、水油体积比1:2、摇床转速 $160\text{ r/min}$ 的条件下反应2 h,选取酶用量分别为0、0.1%、0.3%、0.5%和0.7%,考察酶用量对水解率的影响,结果如图5所示。

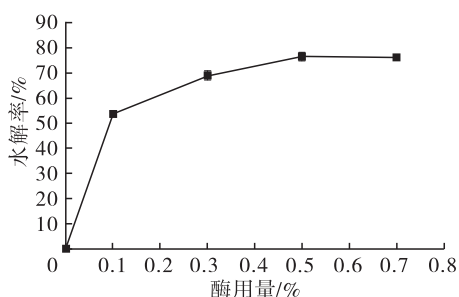


图5 酶用量对水解率的影响

由图5可知,随着酶用量的增大,水解率逐渐增大,但随着酶用量不断增加,水解率增大的速率逐渐减小。在CRL催化油脂水解反应中,只有位于油水界面上的脂肪酶才能对底物进行有效催化水解。因此,油水界面上酶的浓度决定了水解率的大小。当水油体积比一定时,油水界面的面积也一定,此时酶溶液中CRL的浓度直接影响油水界面上CRL的浓度,而酶用量的增大使得酶在水油界面上的吸附趋于饱和,水解率随酶用量的增大而增大趋势逐渐减缓。因此,在实际生产应用中,需要综合考虑酶的成本以及水解率选取合适的酶用量。

### 2.2.5 反应时间的影响

在反应温度 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 、pH 6.7、酶用量0.5%、水油体积比1:2、摇床转速 $160\text{ r/min}$ 条件下,分别反应2、4、8 h和12 h,考察反应时间对水解率的影响,结果如图6所示。

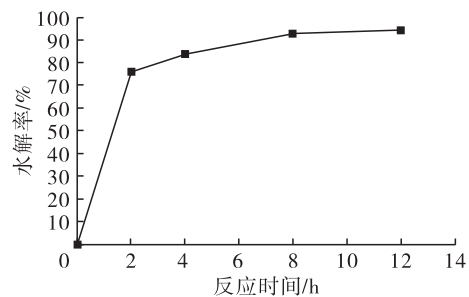


图6 反应时间对水解率的影响

由图6可知,随着反应时间的延长,水解率先迅速增大,反应2 h时水解率为76.31%,2 h后水解率增长速度变缓,然后逐渐趋于平缓。原因是随着反应的进行,油相与油水界面上的脂肪酸浓度逐渐升高,甘油酯的浓度逐渐降低,导致脂肪酸与酶的碰撞频率上升,而甘油酯与酶的碰撞频率下降,不利于反应的进行,反应速率降低。在实际生产应用中,需要结合设备运行成本与目标产物选取合适的反应时间。

## 2.3 响应面优化实验

### 2.3.1 响应面实验设计与结果

在单因素实验的基础上,以反应温度(A)、pH(B)、水油体积比(C)和酶用量(D)为因素,固定反应时间为2 h,以水解率(Y)为响应值,建立Box-Behnken模型,采用响应面实验对CRL催化水解大豆油的工艺条件进行优化。响应面实验因素与水平见表1,响应面实验设计与结果见表2。

表1 响应面实验因素与水平

水平	反应温度/℃	pH	水油体积比	酶用量/%
1	45	7.0	1:3	0.7
0	40	6.7	1:2	0.5
-1	35	6.4	1:1	0.3

表2 响应面实验设计与结果

实验号	A	B	C	D	Y/%
1	-1	-1	0	0	70.55
2	1	-1	0	0	67.83
3	-1	1	0	0	70.98
4	1	1	0	0	67.16
5	0	0	-1	-1	63.91
6	0	0	1	-1	62.63
7	0	0	-1	1	66.20
8	0	0	1	1	74.45
9	-1	0	0	-1	70.01
10	1	0	0	-1	63.73
11	-1	0	0	1	71.69
12	1	0	0	1	71.34
13	0	-1	-1	0	65.93
14	0	1	-1	0	66.52
15	0	-1	1	0	70.30
16	0	1	1	0	67.45
17	-1	0	-1	0	67.00
18	1	0	-1	0	66.21
19	-1	0	1	0	67.97
20	1	0	1	0	66.20
21	0	-1	0	-1	65.82
22	0	1	0	-1	63.53
23	0	-1	0	1	69.61
24	0	1	0	1	70.66
25	0	0	0	0	75.39
26	0	0	0	0	76.14
27	0	0	0	0	76.29
28	0	0	0	0	77.57
29	0	0	0	0	77.40

利用 Expert - Design X8 软件对表 2 结果进行二次多项回归拟合,得到回归方程模型: $Y = 76.56 - 1.31A - 0.31B + 1.10C + 2.86D - 0.28AB - 0.24AC + 1.48AD - 0.86BC + 0.83BD + 2.38CD - 3.52A^2 - 4.06B^2 - 5.50C^2 - 4.40D^2$ 。

### 2.3.2 方差分析

对大豆油水解率的回归方程进行方差分析,结果见表 3。

表3 回归方程的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	p
模型	505.16	14	36.08	24.25	<0.000 1 **
A	20.62	1	20.62	13.86	0.002 3 **
B	1.17	1	1.17	0.78	0.391 1
C	14.59	1	14.59	9.80	0.007 4 **
D	98.16	1	98.16	65.96	<0.000 1 **
AB	0.30	1	0.30	0.20	0.659 0
AC	0.24	1	0.24	0.16	0.694 0
AD	8.79	1	8.79	5.91	0.029 1 *
BC	2.96	1	2.96	1.99	0.180 4
BD	2.79	1	2.79	1.87	0.192 6
CD	22.71	1	22.71	15.26	0.001 6 **
A <sup>2</sup>	80.15	1	80.15	53.86	<0.000 1 **
B <sup>2</sup>	106.74	1	106.74	71.73	<0.000 1 **
C <sup>2</sup>	196.41	1	196.41	131.99	<0.000 1 **
D <sup>2</sup>	125.66	1	125.66	84.45	<0.000 1 **
残差	20.83	14	1.49		
失拟项	17.49	10	1.75	2.09	0.248 4
纯误差	3.34	4	0.84		
总误差	525.99	28			

注: \* 表示显著( $p < 0.05$ ), \*\* 表示高度显著( $p < 0.01$ )

由表 3 可知:模型的  $p$  值小于 0.000 1,说明模型高度显著;失拟项的  $p$  值为 0.248 4,大于 0.05,说明失拟项不显著;模型相关系数( $R^2$ )为 0.960 4,调整相关系数( $R^2_{Adj}$ )为 0.920 8,说明回归方程对实验结果具有较好的拟合性,可用于优化 CRL 催化水解大豆油的工艺条件。对回归方程模型系数的显著性检验结果表明,各个因素对大豆油水解率的影响大小依次为酶用量( $D$ ) > 反应温度( $A$ ) > 水油体积比( $C$ ) > pH( $B$ )。

通过响应面模型分析得到 CRL 催化水解大豆油的最佳工艺条件为反应温度 39.42℃、pH 6.69、水油体积比 1:2.18、酶用量 0.57%,在此条件下反应 2 h,预测水解率达到 77.24%。考虑实际操作调控,将最佳工艺条件修正为反应温度 39.5℃、pH 6.7、水油体积比 1:2.2、酶用量 0.6%,在此条件下反应 2 h,水解率为 77.21%,接近预测值,说明该模型能够用于优化 CRL 催化水解大豆油工艺。另外,在上述修正条件下反应 12 h,水解率可达 96.33%,说明 CRL 能够有效水解大豆油生产脂肪酸。

### 2.4 CRL 催化甘油三酯水解的机制

CRL 的亲核三联体(triad)由 Ser<sub>209</sub>、His<sub>449</sub> 和

Glu<sub>341</sub>组成<sup>[19]</sup>,组氨酸(His)吡唑环上的一个氮原子与丝氨酸(Ser)羟基上的氢离子形成氢键,另一个氮原子与天冬氨酸(Asp)或谷氨酸(Glu)上的羧基形成氢键,三者相互靠近构成催化活性位点。CRL亲核催化中心三联体催化油脂水解的机制如图7所示。

如图7所示:第一步,甘油三酯进入活性位点,同时丝氨酸的羟基氧负离子首先进攻甘油三酯中的 $\alpha$ 位羰基,形成复合中间体;第二步,复合中间体进

一步反应释放甘油二酯,此时 $\alpha$ 位的脂肪酸与丝氨酸通过化学键相连;第三步,游离水分子进入活性位点,进攻脂肪酸前体的羰基,形成复合中间体;第四步,复合中间体进一步反应释放脂肪酸。

该机制显示 $\alpha$ 位脂肪酸的水解路径, $\beta$ 位脂肪酸的水解受空间位阻作用,因此在 $\alpha$ 位脂肪酸全部释放后,再按照同样的路径进行水解反应,这也是2.2.5中反应2 h内时水解率迅速达到76.31%,而 $\beta$ 位脂肪酸释放需要更长反应时间的原因。

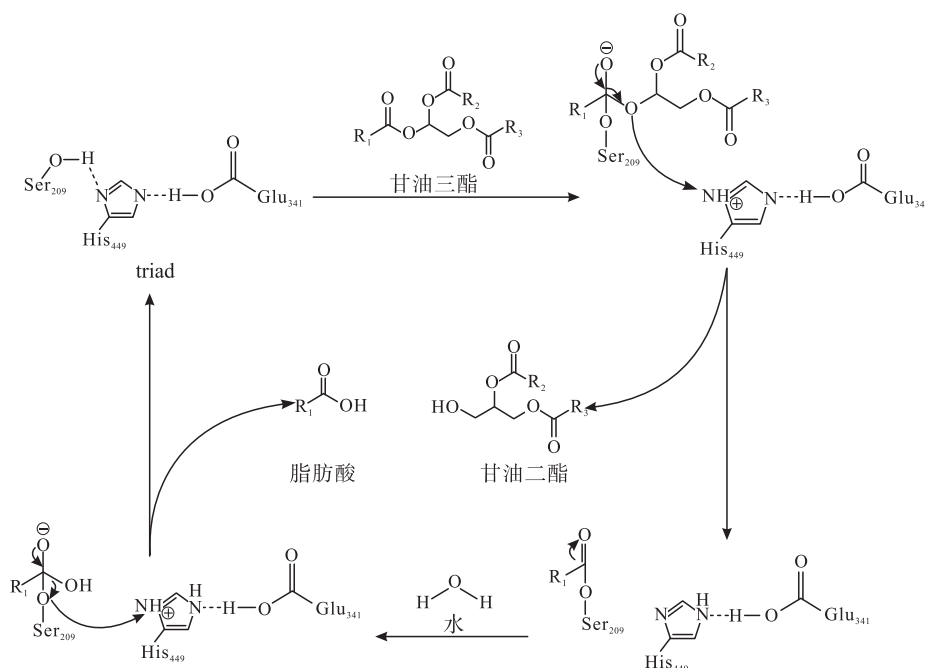


图7 CRL中亲核三联体催化甘油三酯水解的机制

### 3 结论

本研究对比了皱褶假丝酵母脂肪酶(CRL)对不同种类植物油脂的催化效果,发现CRL对C<sub>18</sub>脂肪酸的植物油脂水解率较高。在单因素实验的基础上,采用响应面法优化了CRL催化水解大豆油的工艺条件,得到最佳工艺条件为反应温度39.5℃、pH 6.7、水油体积比1:2.2、酶用量0.6%(以大豆油质量计),在该条件下反应2 h,水解率可达77.21%,反应12 h水解率可达96.33%。总结了CRL催化水解甘油三酯的反应机制,主要为亲核催化三联体中的丝氨酸对甘油三酯的羰基进行亲核反应以夺取脂肪酸前体,然后水分子对该前体进行亲核反应释放脂肪酸。CRL在上述优化条件下能够高效催化植物油脂生产脂肪酸,有望替代传统水解植物油脂工艺,具有广阔的应用前景。

### 参考文献:

[1] WANG P, KE Z D, YI J J, et al. Effects of  $\beta$ -cyclodextrin on the enzymatic hydrolysis of hemp seed oil by lipase

*Candida* sp. 99 - 125 [J]. *Ind Crops Prod*, 2019, 129: 688 - 693.

[2] YANG G L, TONG T, YANG Y Y, et al. Amano lipase PS-catalyzed hydrolysis of pine nut oil for the fatty acids production using deep eutectic solvent as co-solvent [J]. *J Oleo Sci*, 2019, 68(10): 977 - 988.

[3] 张松松, 苏良佳, 吴阳, 等. 山茶油碱催化水解工艺研究 [J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 35(4): 44 - 49.

[4] 吕微, 蒋剑春, 徐俊明. 植物油脂水解工艺及不饱和脂肪酸组成研究 [J]. *食品工业科技*, 2011, 32(9): 76 - 79.

[5] 范子昌. 油脂高压连续水解工艺 [J]. *山东化工*, 2013, 42(2): 111 - 112.

[6] MORAIS W G, FERNANDEZ - LORENTE G, GUIBAN J M, et al. Production of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids through hydrolysis of fish oil by *Candida rugosa* lipase immobilized and stabilized on different supports [J]. *Biocatal Biotransfor*, 2017, 35(1): 63 - 73.

[7] ZHAO K, CHEN B, LI C, et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @

- chitosan as a magnetically separable catalyst for hydrolysis of castor oil[J/OL]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2018, 120(1): 1700373 [2021-07-22]. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700373>.
- [8] WONG W K L, WAHAB R A, ONOJA E. Chemically modified nanoparticles from oil palm ash silica-coated magnetite as support for *Candida rugosa* lipase-catalysed hydrolysis: kinetic and thermodynamic studies[J]. *Chem Pap*, 2020, 74(4): 1253-1265.
- [9] 叶棋锋, 王挥, 赵松林, 等. 固定化酶催化椰子油水解工艺研究[J]. *中国油脂*, 2016, 41(11): 36-40.
- [10] 唐克华, 成江, 张小勇, 等. 桐油酶水解制备桐酸的工艺研究[J]. *中国油脂*, 2021, 46(1): 85-88.
- [11] GOSWAMI D, SEN R, BASU J K, et al. Surfactant enhanced ricinoleic acid production using *Candida rugosa* lipase [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(1): 6-13.
- [12] OLLIS D L, CHEAH E, CYGLER M, et al. The  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold[J]. *Protein Eng*, 1992, 5(3): 197-211.
- [13] NARDINI M, DIJKSTRA B W.  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzymes: the family keeps growing[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1999, 9(6): 732-737.
- [14] PLEISS J, FISCHER M, SCHMID R D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site [J]. *Chem Phys Lipids*, 1998, 93(1/2): 67-80.
- [15] 杨威, 杜伟, 刘德华. 游离脂肪酶催化蓖麻油制备蓖麻油酸[J]. *生物技术进展*, 2014, 4(5): 373-378.
- [16] TIPTON K F, DIXON H. Effects of pH on enzymes [J]. *Method Enzymol*, 1979, 63: 183-234.
- [17] PETERS G H, VAN AALTEN D M, SVENDSEN A, et al. Essential dynamics of lipase binding sites: the effect of inhibitors of different chain length [J]. *Protein Eng*, 1997(2): 149-158.
- [18] HERMANSYAH H, KUBO M, SHIBASAKI - KITAKAWA N, et al. Mathematical model for stepwise hydrolysis of triolein using *Candida rugosa* lipase in biphasic oil-water system [J]. *Biochem Eng J*, 2006, 31(2): 125-132.
- [19] BENJAMIN S, PANDEY A. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology [J]. *Yeast*, 1998, 14(12): 1069-1087.
- .....
- (上接第53页)
- [11] KHAN K, HUANG H, ZHENG Y S. Design, synthesis, and transport potential of a new family of nonionic amphiphilic dendro-calix[4]arene [J]. *Curr Org Chem*, 2012, 16(22): 2745-2751.
- [12] SIMOES S M N, REY - RICO A, CONCHEIRO A, et al. Supramolecular cyclodextrin-based drug nanocarriers [J]. *Chem Commun*, 2015, 46(22): 1-16.
- [13] HANNA T A, LIU L, ANGELES - BOZA A M, et al. Synthesis, structures, and conformational characteristics of calixarene monoanions and dianions [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2003, 125(20): 6228-6238.
- [14] 杨辉, 张少飞, 陈香李, 等. 杯[4]芳烃羧酸衍生物的合成及其胶凝行为 [J]. *应用化学*, 2016, 33(6): 633-640.
- [15] HAASE C H W. Path to industrial production of calix[8 and 4]arenes [J]. *J Org Chem*, 2020, 85(2): 603-611.
- [16] NASEER M M, AHMED M, HAMEED S. Functionalized calix[4]arenes as potential therapeutic agents [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2017, 89(2): 243-256.
- [17] LEE M, LEE S J, JIANG L H. Stimuli-responsive supramolecular nanocapsules from amphiphilic calixarene assembly [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2004, 126(40): 12724-127245.
- [18] XIAO Z, YANG W, YAN F, et al. Assembly of calix[4]arene carboxylic acid derivatives by hydrogen bonding [J]. *Cryst Eng Comm*, 2019, 21(3): 439-448.
- [19] YILMAZ M, VURAL U S. Synthesis of new substituted calix[4]arenes and their complexes with iron(III) [J]. *Chem Inform*, 2010, 21(8): 1231-1241.
- [20] MANNAI S, LASÂAD D, BAKLOUTI L, et al. Synthesis and cation complexation of *p-tert-butyl-calix[4]arene* bearing two 8-hydroxyquinoline units [J]. *J Incl Phenom Macro*, 2019, 94: 257-261.
- [21] CHATE A V, RATHOD U B, KSHIRSAGAR J S, et al. Ultrasound assisted multicomponent reactions: a green method for the synthesis of *N*-substituted 1,8-dioxo-decahydroacridines using  $\beta$ -cyclodextrin as a supramolecular reusable catalyst in water [J]. *Chin J Catal*, 2016, 37(1): 146-152.
- [22] 杨晓琴, 黄元波, 郑云武, 等. 水红木果油的超声辅助提取与脂肪酸组成研究 [J]. *西南林业大学学报*, 2018, 38, 143(1): 169-174.
- [23] 谢东, 陶云凤, 和宇娟, 等. 橡胶籽油皂脚制备端环氧基脂肪酸酯的研究 [J]. *中国油脂*, 2019, 44(5): 38-42.