

大孔树脂 NKA-9 负载 RML 催化高酸价油脂脱酸及制备甘油二酯

钟南京, 林少燕, 冯思婷, 李丹, 吴瑶

(广东药科大学食品科学学院, 广东中山 528458)

摘要: 本文采用了大孔树脂 NKA-9 作为载体负载脂肪酶 RML, 然后用于催化油酸含量为 25% 的大豆油脂以酶促脱酸并同时制备富含甘油二酯 (DAG) 的油脂产品。研究采用了扫描电镜 (SEM) 和 X-射线光电能谱仪 (XPS) 对 NKA-9 负载酶前后进行了结构表征, 结果表明 RML 已成功负载在 NKA-9 上。所得固定化酶 RML@NKA-9 催化油酸含量为 25% 的大豆油脱酸及 DAG 制备的优化条件为: 反应温度 50 °C 甘油用量为油脂质量的 8%, RML@NKA-9 用量为油脂质量的 3%, 在该条件下反应 8 h 后达到平衡, 此时 DAG 含量 58.95%, 游离脂肪酸 (FFA) 含量降低至 1.50%。此外研究了 RML@NKA-9 的重复利用性, 结果表明, RML@NKA-9 重复使用 4 次后其酶活几乎没有损失, 重复使用 6 次后其酶活为初始酶活的 49.10%。本研究制备的 RML@NKA-9 能有效脱除高酸价油脂中的 FFA, 并获得了可观含量的 DAG, 具有一定的重复利用性, 因此, RML@NKA-9 具有较大的应用前景。

关键词: 酶促脱酸; RML; 固定化; 大孔树脂 NKA-9; 甘油二酯

文章编号: 1673-9078(2020)08-147-152

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.8.0357

Enzymatic Deacidification of High-Acid Oil for Diacylglycerol Production Using NKA-9 Macroporous Resin-Supported *Rhizomucor miehei*

ZHONG Nan-jing, LIN Shao-yan, FENG Si-ting, LI Dan, WU Yao

(School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China)

Abstract: Macroporous resin NKA-9 was used as the support for the immobilization of lipase from the fungus *Rhizomucor miehei* (RML). The resin-supported RML (RML@NKA-9) was then used in the enzymatic deacidification of high-acid soybean oil with an oleic acid content of 25% for diacylglycerol (DAG) production. Structural characterization of the resin before and after RML loading using SEM and XPS revealed that RML had been successfully immobilized onto NKA-9. The optimized reaction conditions for enzymatic deacidification and DAG production were as follows: reaction temperature, 50°C; amount of glycerol, 8 wt% of the high-acid oil; and amount of RML@NKA-9, 3 wt% of the high-acid oil. Under these conditions, equilibrium was reached after 8 h of reaction, DAG content of 58.95% was achieved, and free fatty acid (FFA) content was reduced to 1.50%. Subsequently, the reusability of RML@NKA-9 was evaluated. Results indicated almost no activity loss after four cycles of use, and the retention of 49.10% of initial activity after six cycles of use. The RML@NKA-9 prepared in this study enabled the effective removal of FFAs from high-acid oil, achieved the production of considerable DAG content, and demonstrated a certain degree of reusability. Therefore, RML@NKA-9 possesses promising prospects for applications in oil processing.

Key words: enzymatic deacidification; *Rhizomucor miehei*; immobilization; macroporous resin NKA-9; diacylglycerol

引文格式:

钟南京, 林少燕, 冯思婷, 等. 大孔树脂 NKA-9 负载 RML 催化高酸价油脂脱酸及制备甘油二酯[J]. 现代食品科技, 2020, 36(8): 147-152

ZHONG Nan-jing, LIN Shao-yan, FENG Si-ting, et al. Enzymatic deacidification of high-acid oil for diacylglycerol production using NKA-9 macroporous resin-supported *Rhizomucor miehei* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 147-152

油脂质量与其游离脂肪酸 (FFA) 含量密切相关, 脱酸是油脂精炼的重要操作。高酸价油脂 (如米糠毛

收稿日期: 2020-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31772000); 广东药科大学 2018-2019 大学生“专创融合”项目

通讯作者: 钟南京 (1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 油脂改性

油) 的脱酸并不适合采用传统的化学或物理脱酸法。化学碱炼法油脂损耗大, 一般中性油脂的损耗是 FFA 含量的 3 倍, 而且强碱的大量使用将给环境造成很大的污染; 物理脱酸采用的高温 (200~270 °C 蒸汽, 一方面耗能大, 另一方面也易使不饱和脂肪酸产生异构化反应^[1,2])。相比而言, 酶促酯化脱酸反应条件温和,

过程绿色环保,且可将 FFA 转化为中性甘油酯,提高中性甘油酯的含量^[3]。尤其是高酸价油脂,采用酶促酯化脱酸是其发展方向。

酶促酯化脱酸常采用甘油作为酰基受体,如图 1 所示,酯化产物有甘油一酯(MAG),甘油二酯(DAG)和甘油三酯(TAG)。也有采用 MAG、植物甾醇、乙醇胺和乙醇作为酰基受体进行酯化脱酸,均能有效降低 FFA 的含量^[4-7]。

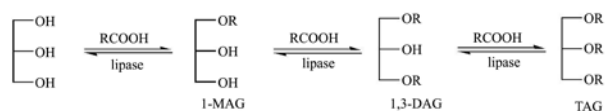


图 1 酶促甘油与脂肪酸酯化反应路线

Fig.1 Reaction scheme for the enzymatic esterification of glycerol with FFA

在以甘油或 MAG 为酰基受体的酶促脱酸过程中,通过控制反应条件可获得不同组成的甘油酯产品。DAG 是一种功能性油脂,是甘油中的两个羟基与脂肪酸酯化的产物,包括 1,2-DAG 和 1,3-DAG,其中 1,3-DAG 是主要成分。DAG 的代谢途径与普通 TAG 不同,其在人体内摄入后不会产生脂肪堆积,具有减肥的功效^[8,9]。Song 等和 Schweiggert-Weisz 等采用 MAG 作为酰基受体,酯化脱酸制备 DAG,分别获得 DAG 含量为 27.98%和 23.00%,脂肪酸含量分别降低至 0.28%和 0.30%^[10,11]。本课题采用 Novozym 435 催化高酸价大豆油脂酯化脱酸,以甘油作为酰基供体,可获得 DAG 含量 60%~62%,脂肪酸含量降低至 0.36%~0.66%^[3]。

脂肪酶 *Rhizomucor miehei* (RML)稳定性好,1,3-选择性强,酶活性高,是催化性能良好的一种脂肪酶^[12]。RML 的商业化固定化酶 Lipozyme RM IM 在催化 FFA 与甘油酯化制备高纯度 1,3-DAG 过程中体现了良好的催化活性,1,3-位选择性和稳定性^[13,14]。本文采用大孔树脂 NKA-9 作为载体,负载 RML 用于催化高酸价油脂脱酸并同时制备富含 DAG 的油脂产品。对负载酶 RML@NKA-9 进行了形貌和元素分析表征,详细研究了 RML@NKA-9 催化反应条件对脱酸和 DAG 制备的影响,同时研究了其重复利用性。

1 材料与方 法

1.1 原料与试剂

甘油酯标准品 1-油酸甘油一酯(1-O)、1,3-油酸甘油二酯(1,3-OO)、三油酸甘油三酯(OOO)购于 Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司,纯度 $\geq 99\%$; RML

(Palatase®) 购于 Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司,酶活 ≥ 20000 U/g; 流动相乙腈、正己烷和异丙醇购于德国 Merck 公司,均为色谱纯;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、甘油等试剂购于国药化学试剂公司,均为分析纯;油酸购于阿拉丁试剂(上海)有限公司,分析纯;大孔树脂 NKA-9 购于武汉力博瑞生物科技有限公司;大豆油购于当地超市。

1.2 仪器与设备

加热磁力搅拌器,德国 IKA 公司; PHSJ-4A 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;真空干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;电子分析天平 Sartorius BSA-224S,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;反相液相色谱柱 Purospher® STAR RP-18e (250×4.6 mm; 5 μ m),德国 Merck 公司;岛津 LC-2010AHT 高效液相色谱仪,日本岛津公司;蒸发光散射检测器 ELSD-LTII,日本岛津公司;扫描电镜 GeminiSEM500,德国 ZEISS 公司;K-Alpha+X 射线光电能谱仪(XPS),美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 大孔树脂 NKA-9 的活化

称取 50 g 大孔树脂置于 250 mL 烧杯中,加入 150 mL 乙醇(95%纯度),封上保鲜膜,避光浸泡 24 h。之后,布氏漏斗进行抽滤,然后反复多次地用超纯水冲洗至树脂没有乙醇味;然后分别用 150 mL 盐酸溶液(5%浓度)和 150 mL 氢氧化钠溶液(5%浓度)浸泡,封上保鲜膜放置于避光处,静置浸泡 4 h 后,布氏漏斗抽滤,用超水洗反复冲洗至中性(pH=7.0)。接下来用 pH=7.0 的磷酸缓冲溶液浸泡 2 h 抽滤,直至浸泡液与原磷酸缓冲液 pH 相同。

1.3.2 大孔树脂 NKA-9 负载 RML

取 30 mL 磷酸缓冲液(pH 为 5.0,浓度为 25 mmol/L),加入 1.00 g 大孔树脂,然后加入 600 mg RML(Palatase®)酶液,水浴振荡 4 h(转速为 180 r/min);之后抽滤,在 30 $^{\circ}$ C 真空干燥 6 h,即得到固定化酶,记为 RML@NKA-9。其酶活经测定为 1200.00 ± 115.47 U/g。

1.3.3 SEM 和 XPS 表征

SEM 表征测试主要技术指标:加速电压 0.02~30 kV,连续可调放大倍数范围 20~500000。XPS 表征测试条件:单色化的 Al-K α 光源,能量 1486.68 eV,12 kV;扫描模式 CAE;分析室工作时的真空度约为 5×10^{-9} Pa。

1.3.4 固定化酶 RML@NKA-9 催化高酸价油脂脱酸及 DAG 的制备

称取油酸含量为 25% 的高酸值大豆油 10 g, 加入一定量的甘油, 置于 150 mL 三口圆底烧瓶, 搅拌, 温度达到预定值后, 加入一定量的 RML@NKA-9 引发反应。期间通入氮气, 反应一定时间后, 取样分析。

1.3.5 产物甘油酯的 HPLC-ELSD 分析

产物的甘油酯成分分析采用 HPLC-ELSD, 等梯度洗脱, 流动相为乙腈/正己烷/异丙醇=27/8/10; 色谱柱温度 40 °C; ELSD 漂移管温度 35 °C; 氮气气压 350 kPa。甘油酯组分的定性和定量根据我们之前建立的方法进行^[15]。

1.3.6 RML@NKA-9 重复利用性研究

称取油酸含量为 25% 的高酸值大豆油 10 g, 甘油 0.80 g, 置于 150 mL 三口圆底烧瓶, 搅拌, 温度达到 50 °C; 加入 0.30 g 固定化酶 RML@NKA-9 引发反应。期间通入氮气, 反应 8 h 后, 取样分析, 同时对产物离心, 取出固定化酶, 用 10 mL 叔戊醇洗涤, 然后用于催化下一次反应。RML@NKA-9 的相对酶活性定义为每个循环的脱酸率与第一次使用时的脱酸率的比值。脱酸率和相对活性的计算如下:

$$\text{脱酸率} = \frac{25\% - \text{FFA}\%}{25\%} \times 100\%$$

$$\text{相对活性(Relative activity)} = \frac{\text{每个循环所得的脱酸率}}{\text{首次催化时的脱酸率}} \times 100\%$$

1.4 数据分析

实验数据采用 SPSS 13.0 进行分析, 结果以平均值±标准偏差表示, 显著性水平 $p < 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 载体 NKA-9 及固定化酶 RML@NKA-9 的 SEM 和 XPS 表征

对载体 NKA-9 及其负载 RML 进行了 SEM 分析, 结果如图 2 所示。a、b 为 NKA-9 的 SEM 图, c、d 为 NKA-9 负载 RML 之后 (RML@NKA-9) 的 SEM 图。由图可见, 大孔树脂 NKA-9 负载脂肪酶之前其表面较光滑, 而负载 RML 之后, 其表面有突起附着物, 表明 RML 酶分子被树脂成功吸附^[16]。该研究结果与刘宁研究结果相一致, 其采用大孔树脂 DA-201 负载磷脂酶 Lecitase® Ultra, DA-201 负载磷脂酶之前的 SEM 图像是光滑的, 负载之后其表面有明显的突起附着物, 表明磷脂酶 Lecitase® Ultra 有效吸附在

DA-201 表面上^[16]。

同时对 NKA-9 和 RML@NKA-9 进行了 XPS 元素分析, 结果见表 1。大孔树脂 NKA-9 的主要结构为苯乙烯型共聚体 PDVB。从表中可以看出, 其负载 RML 之后, 氮元素的含量增加。酶的本质为蛋白质, 增加氮元素的来源是脂肪酶 RML, 再次表明 RML 已成功负载于大孔树脂 NKA-9 上。本课题组在采用有机功能化 SBA-15 负载 RML 时, XPS 表征也得到了类似的结果。其中, 正十二烷基功能化 SBA-15 在负载 RML 之前, 其氮元素的含量仅为 0.33%, 而负载 RML 之后, 氮元素的含量增加至 5.54%; 该氮元素的增加表明 RML 已成功负载在 SBA-15 载体上^[17]。

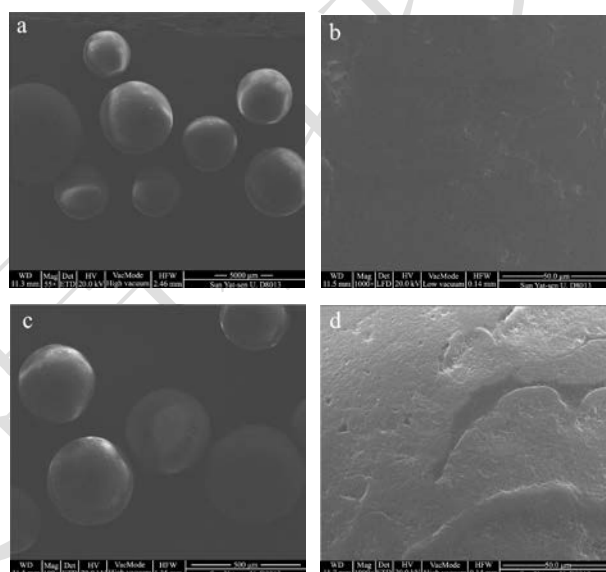


图 2 NKA-9 (a、b) 及 RML@NKA-9 (c、d) 的 SEM 图

Fig.2 SEM images of the NKA-9 (a, b) and the RML@NKA-9 (c, d)

表 1 NKA-9 及 RML@NKA-9 的 XPS 元素分析

Table 1 XPS elemental concentrations of the NKA-9 and

样品	RML@NKA-9			
	C _{1s} /%	N _{1s} /%	O _{1s} /%	Na _{1s} /%
NKA-9	89.13	6.31	4.31	0.25
RML@NKA-9	74.68	10.84	14.25	0.23

2.2 反应条件对酶促脱酸及产物组成的影响

2.2.1 反应温度对酶促脱酸及产物组成的影响

酶促反应中, 温度是一个重要的因素。在一定范围内, 温度升高有利于促进反应速率加快; 温度升高也有利于反应底物的相互接触从而加快反应。但是温度不能无限制提高, 酶在较高的温度下容易失活^[18]。本文研究了温度 40~80 °C 对反应的影响, 结果见表 2。本反应体系中所涉及的反应包括油酸与甘油的酯化反应, 以及甘油与 TAG 的甘油解反应。从表中可以看出,

在所研究的温度范围内,经 12 h 反应后,均能大幅降低 FFA 的含量,可获得较高的 DAG 含量。表明 RML@NKA-9 在较低的温度下(40~50 °C)也保持高的催化酯化反应和甘油解反应活性。我们在采用 Lipozyme RM IM 催化酯化反应制备高纯度 1,3-DAG

过程中,也发现温度在 50 °C 时, Lipozyme RM IM 能有效催化酯化反应^[13]; Rosu 等在 1,3-DAG 制备过程中发现 RML 在 35~50 °C 范围内均具有较高的催化酯化反应活性^[14];表明 RML 酶在相对较低的温度下具有较高的反应活性。本文选取 50 °C 作为优化温度。

表 2 反应温度对酶促脱酸及产物组成的影响

Table 2 Effects of reaction temperature on the deacidification and the composition of the reaction products

反应温度/°C	MAG/%	DAG/%	TAG/%	FFA/%
40	13.80±0.29	54.48±2.47	30.03±2.87	1.69±0.69
50	11.94±0.66	58.28±0.14	28.70±1.26	1.08±0.47
60	14.27±1.72	57.19±1.97	26.90±2.74	1.64±0.96
70	13.47±1.26	59.44±1.35	25.65±0.37	1.43±0.47
80	15.50±0.66	59.06±4.73	23.11±4.34	2.33±0.27

注:反应条件:反应时间 12 h, NKA-9-RML 用量 0.50 g, 油酸含量 25% 的油脂 10 g, 甘油 0.80 g。

表 3 脂肪酶用量对酶促脱酸及产物组成的影响

Table 3 Effects of the RML@NKA-9 amount on the deacidification and the composition of the reaction products

脂肪酶用量/%	MAG/%	DAG/%	TAG/%	FFA/%
2	12.11±0.65	48.25±4.21	37.36±4.17	2.27±0.61
3	11.16±4.10	59.63±0.38	27.44±5.32	1.76±0.83
4	13.81±0.82	55.73±2.52	28.96±2.10	1.51±0.40
5	11.94±0.66	58.28±0.14	28.70±1.26	1.08±0.47
6	13.25±3.61	54.27±2.99	30.20±5.82	2.28±0.77
7	11.65±3.00	59.54±0.30	28.29±3.36	0.52±0.07

注:反应条件:反应温度 50 °C 时间 12 h, 油酸含量 25% 的油脂 10 g, 甘油 0.80 g。

2.2.2 RML@NKA-9 用量对酶促脱酸及产物组成的影响

脂肪酶的用量影响反应速率,在一定范围内,酶用量增加,反应速率加快。本文研究了酶用量 2%~7% (基于油脂的质量)对脱酸及产物组成的影响,结果见表 3。可以看出,酶用量 3% 时, DAG 含量达到较高值,进一步增加酶的用量, DAG 含量不会随着增加,而 FFA 的含量则在酶用量为 7% 时达到最低。我们前期采用 Novozym 435 作为催化剂,其用量为 5% 时能有效降低 FFA 的含量,同时也获得了 60%~62% 含量的 DAG^[3]; Song et al 研究发现, Lipozyme RM IM 用量为 4.77% 是其优化酶用量,可将 FFA 降低至 0.28%, 并可获得 27.98% 的 DAG 含量^[10]。本文选取 3% 作为

优化酶用量。

2.2.3 甘油用量对酶促脱酸及产物组成的影响

甘油用量影响反应产物的组成,从反应平衡的角度看,甘油用量增加有利于生成更多的 MAG, 因此以 DAG 为目标产物需要适当控制甘油的用量。此外,从反应速率的角度看,甘油用量增加会延缓反应的进行,因为甘油与 TAG 和 FFA 的互溶性低,甘油量的增加会阻碍脂肪酶与底物(TAG 和 FFA)的接触;但是,反应一旦进行,生成的 MAG 和 DAG 具有乳化作用,将大大促进酶与反应底物的接触,从而加快反应的进程^[3]。本文研究了甘油用量 6%~10% (基于油脂的质量)对脱酸及产物组成的影响,结果见表 4。

表 4 甘油用量对酶促脱酸及产物组成的影响

Table 4 Effects of glycerol amount on the deacidification and the composition of the reaction products

甘油用量/%	MAG/%	DAG/%	TAG/%	FFA/%
6	6.05±2.32	53.59±1.34	39.45±4.09	0.92±0.43
7	7.77±1.95	52.79±3.82	38.45±5.57	0.99±0.20
8	11.16±4.10	60.26±0.54	27.44±5.32	1.13±0.67
9	15.40±0.01	49.69±1.37	32.08±1.25	2.82±0.13
10	14.50±3.79	55.78±2.34	28.22±2.12	1.51±0.67

注：反应条件：反应温度 50 °C 时间 12 h，油酸含量 25% 的油脂 10 g，NKA-9-RML 用量 0.30 g。

从表中可以看出，甘油用量较低时（6%~7%），MAG 和 DAG 含量均略微较低，但是 FFA 含量能降低至 1% 左右；当甘油用量为 8% 时 DAG 含量达到最高，进一步增加甘油用量，DAG 的含量下降，且 FFA 的含量也没有随之而降低。我们前期采用 Novozym 435 作为催化剂，详细研究了甘油用量与酸价的关系，得出 8% 用量时可获得较好的脱酸及 DAG 制备效果^[3]，本研究结果与此相一致。因此，选取 8% 作为优化甘油用量。

2.2.4 反应时间对酶促脱酸及产物组成的影响

研究了反应时间对脱酸及产物组成的影响，反应条件为：温度 50 °C，甘油 0.80 g，油酸含量 25% 的油脂 10 g，NKA-9-RML 用量 0.30 g；结果见图 3a，可以看出，反应 8 h 后，基本达到平衡，此时 DAG 含量 $58.95\% \pm 1.51\%$ ，FFA 含量降低至 $1.50\% \pm 0.13\%$ 。

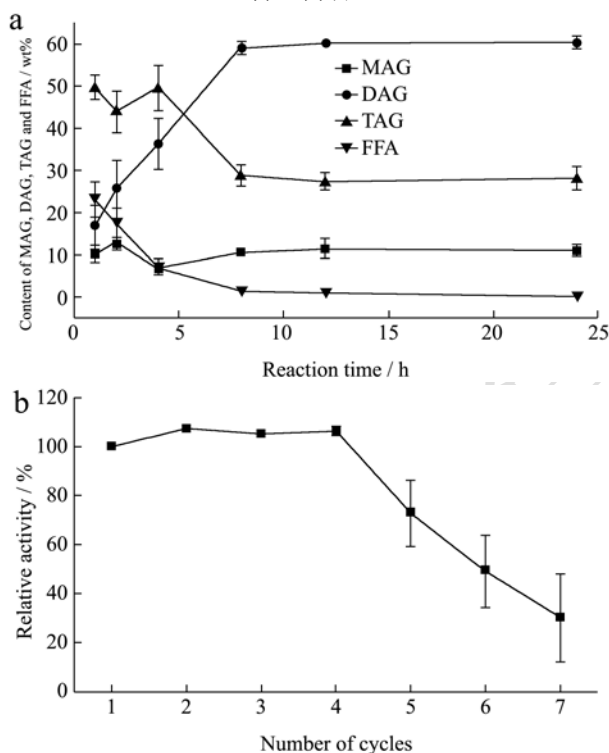


图 3 反应时间对脱酸及产物组成的影响 (a)；RML@NKA-9 的重复利用性 (b)

Fig.3 Effects of time on the deacidification and the composition of the reaction products (a); Reusability of the RML@NKA-9 (b)

2.3 固定化酶 RML@NKA-9 的重复利用性

固定化酶的重复利用性在实际过程中具有重要的意义。稳定性好、重复利用性高，则有利于降低生产成本。本文得到的固定化酶 RML@NKA-9 的重复利用性结果见图 3b，从图中可见，RML@NKA-9 重

复使用 4 次后其酶活几乎没有损失；从重复使用的第五次开始其酶活开始下降，重复使用 6 次后，其酶活是初始酶活的 49.10%，表明该固定化酶具有一定的重复利用性。有趣的是，Novozym 435 催化高酸价油脂体系时，重复利用 10 之后，其酶活并没有损失^[3]。

3 结论

SEM 和 XPS 表征结果表明 RML 已成功负载于 NKA-9 上。所得固定化酶 RML@NKA-9 催化含油酸 25% 的大豆油的优化条件为：反应温度 50 °C，甘油用量为油脂质量的 8%，RML@NKA-9 用量为油脂质量的 3%，在该条件下反应 8 h 后达到平衡，此时 DAG 含量 $58.95\% \pm 1.51\%$ ，FFA 含量降低至 $1.50\% \pm 0.13\%$ 。RML@NKA-9 重复使用 4 次后其酶活几乎没有损失，重复使用 6 次后其酶活为初始酶活的 49.10%。

参考文献

- [1] Ghosh M. Review on recent trends in rice bran oil processing [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2007, 84: 315-324
- [2] Sengupta R, Bhattacharyya D K. A comparative-study between biorefining combined with other processes and physical refining of high-acid mohua oil [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1992, 69: 1146-1149
- [3] Zhong N, Kou M, Zhao F, et al. Enzymatic production of diacylglycerols from high acid soybean oil [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2019, 96: 967-974
- [4] De B K, Bhattacharyya D K. Deacidification of high-acid bran oil by reesterification with monoglyceride [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1999, 76: 1243-1246
- [5] Wang X, Lu J, Liu H, et al. Improved deacidification of high-acid rice bran oil by enzymatic esterification with phytosterol [J]. Process Biochemistry, 2016, 51: 1496-1502
- [6] Wang X, Wang X, Wang T. An effective method for reducing free fatty acid content of high-acid rice bran oil by enzymatic amidation [J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2017, 48: 119-124
- [7] Li D, Liu P, Wang W, et al. An innovative deacidification approach for producing partial glycerides-free rice bran oil [J]. Food and Bioprocess Technology, 2017, 10: 1154-1161
- [8] Phuah E T, Tang T K, Lee Y Y, et al. Review on the current state of diacylglycerol production using enzymatic approach [J]. Food and Bioprocess Technology, 2015, 8: 1169-1186
- [9] Lee W J, Zhang Z, Lai O M, et al. Diacylglycerol in food

- industry: synthesis methods, functionalities, health benefits, potential risks and drawbacks [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 97
- [10] Song Z, Liu Y, Jin Q, et al. Lipase-catalyzed preparation of diacylglycerol-enriched oil from high-acid rice bran oil in solvent-free system [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 168: 364-374
- [11] Haar D, Stäbler A, Wichmann R, et al. Enzyme-assisted process for DAG synthesis in edible oils [J]. Food Chemistry, 2015, 176: 263-270
- [12] Rodrigues R C, Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process [J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2010, 64: 1-22
- [13] Zhong N, Gui Z, Xu L, et al. Solvent-free enzymatic synthesis of 1,3-diacylglycerols by direct esterification of glycerol with saturated fatty acids [J]. Lipids in Health and Disease, 2013, 12: 65-71
- [14] Rosu R, Yasui M, Iwasaki Y, et al. Enzymatic synthesis of symmetrical 1,3-diacylglycerols by direct esterification of glycerol in solvent-free system [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1999, 76: 839-843
- [15] Zhong N, Li L, Xu X, et al. An efficient binary solvent mixture for monoacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2009, 86: 783-789
- [16] 刘宁.无溶剂体系固定化磷脂酶Lecitase® Ultra催化合成甘油二酯的研究[D].广州:华南理工大学,2013
LIU Ning. Synthesis of diacylglycerol catalyzed by immobilized Phospholipase Lecitase® Ultra in solvent-free system [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013
- [17] Zhong N, Chen W, Liu L, et al. Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase onto the organic functionalized SBA-15: their enzymatic properties and glycerolysis efficiencies for diacylglycerols production [J]. Food Chemistry, 2019, 271, 739-746
- [18] Zhao X, Zhao F, Zhong N. Production of diacylglycerols through glycerolysis with SBA-15 supported *Thermomyces lanuginosus* lipase as catalyst [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 100: 1426-1435

(上接第101页)

- [20] 范方宇,吴长萃,刘代现.海藻酸钠固定化碱性蛋白酶的研究[J].农业机械,2013,3:67-70
FANG Fang-yu, WU Chang-ping, LIU Dai-xian. Study on sodium alginate immobilized alkaline protease [J]. Agricultural Machinery, 2013, 3: 67-70
- [21] 李杨,江连洲,李丹丹,等.氨基硅烷修饰的磁性纳米粒子固定化碱性蛋白酶[J].食品科学,2012,33(9):202-205
LI Yang, Jiang Lian-zhou, LI Dan-dan, et al. Aminosilane modified magnetic nanoparticles immobilized alkaline protease [J]. Food Science, 2012, 33(9): 202-205
- [22] 董守利.交联脂肪酶聚集体体系构建及其性质研究[D].广州:华南理工大学,2013
DONG Shou-li. Construction and properties of crosslinked lipase aggregates [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013
- [23] Kamik D, Jung J, Hawking S, et al. Sugar beet pectin fractionated using isopropanol differs in galacturonic acid, protein, ferulic acid and surface hydrophobicity [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 60: 179-185
- [24] Demir P, Onde S, Severcan F. Phylogeny of cultivated and wild wheat species using ATR-FT-IR spectroscopy [J]. Spectrochimica Acta Part A-molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2015, 135: 757-763
- [25] Gnanasambandam R, Proctor A. Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy [J]. Food Chemistry, 2000, 68(3): 327-332
- [26] Arastoo Badoei-dalfard, Saeid Malekabadi, Zahra Karami, et al. Magnetic cross-linked enzyme aggregates of Km12 lipase: a stable nanobiocatalyst for biodiesel synthesis from waste cooking oil [J]. Renewable Energy, 2019, 141
- [27] Butler M F, NG Y F, Pudney P D A. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin [J]. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2003, 41(24)
- [28] Aytar B S, Bakir U. Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates [J]. Process Biochemistry, 2008, 43: 125-131
- [29] Sangeetha K, Abraham T E. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of subtilisin for controlled release applications [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 43: 314-319