

УДК 665:664.3

УДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГІДРОЛІЗУ ЖИРІВ

Дана робота присвячена дослідженню гідролізу олії під дією ферментних препаратів вітчизняного та закордонного виробництва. Створені математичні моделі процесів та оптимізовано їх параметри.

Ключові слова: гідроліз, ліпаза, оптимізація, математичне моделювання.

Данная работа посвящена исследованию гидролиза жиров под действием ферментных препаратов отечественного и зарубежного производства. Созданы математические модели процессов и оптимизированы их параметры.

Ключевые слова: гидролиз, липаза, оптимизация, математическое моделирование.

This article covers the investigation of hydrolysis of oil by domestic and foreign produced enzymes. The mathematical models of the processes were designed and process conditions were optimized.

Keywords: hydrolysis, lipase, optimization, mathematical modeling.

П. О. Некрасов
Доктор технічних наук, доцент*
E-mail: nekrasov2007@gmail.com

Ю. М. Плахотна
Аспірант*
E-mail: juliettapl@gmail.com

О. П. Некрасов
Кандидат технічних наук, професор
Кафедра фізичної хімії**
E-mail: nekrasov@kpi.kharkov.ua

*Кафедра технології жирів та продуктів бродіння**

**Національний технічний університет
«Харківський політехнічний інститут»
вул. Фрунзе, 21, м. Харків, Україна, 61002
Контактний тел.: (057) 707-63-64

Одним з основних напрямів розвитку олійно-жирової промисловості є удосконалення технологічних процесів шляхом їх інтенсифікації на основі розробки та впровадження сучасних способів виробництва жирових продуктів та їх складових. Це дозволяє підвищити продуктивність існуючих підприємств, покращити якість продукції та розширити асортимент олій та жирів.

У зв'язку з цим особлива увага приділяється розробці та впровадженню нових технологічних систем, які б відрізнялися своєю простотою, екологічністю та мало- чи безвідходністю.

Одним з крупнотонажних виробництв олійно-жирової галузі є отримання жирних кислот (ЖК) шляхом гідролізу жирової сировини. Щорічно в світі виробляють мільйони тон ЖК, які використовують як харчову добавку, стабілізатор піни, глазірувальник та піногасільник, вони також є сировиною для синтезу біодизелю та поверхнево-активних речовин [1].

Серед усіх жирних кислот особливе місце належить поліненасиченим есенціальним кислотам. Вони не можуть бути синтезовані організмом людини, тому мають надходити з їжею. Завдяки своїм унікальним властивостям вказані сполуки широко застосовуються у медицині та фармацевтиці [2], як субстрат для синтезу олії, збагаченої діацилгліцерином [3], та структурованих ліпідів [4]. Але існуючі на сьогоднішній день способи гідролізу пов'язані з використанням токсичних каталізаторів (кислоти, луки), високих температур (200–225 °С) та тиску (2,0–2,5 МПа), що не дозволяє отримувати поліненасичені жирні кислоти високого ступеня чистоти через процеси полімеризації та окислення.

Тому актуальним є заміна хімічних агентів на біокатализатори з наступною оптимізацією процесу.

Для розщеплення триацилгліцеринів можна використовувати ліпази різноманітного походження [5]. Велика кількість доступних ензимів дає можливість вибирати найбільш ефективні для кожного окремого випадку.

Гідроліз соєвої олії ліпазами *Rhizopus delemar*, *Rhizopus niveus* та *Penicillium sp.* проходить на 44 %, 42 % та 7,2 % відповідно, після 10 годин реакції. Але комбіновані системи з двох ліпаз *Penicillium sp.* + *Rhizopus niveus* та *Penicillium sp.* + *Rhizopus delemar* забезпечували конверсію 95–98 % за 10 годин при великому надлишку води [6].

В дослідженні Нура та його колег за 1,5 години вдалося досягти майже повного гідролізу пальмової олії за умов її концентрації в системі 25 г/л, температурі процесу 40 °С, рН 6,0, біокатализатором була ліпаза SP398 у кількості 100 кЛЕ/л, вміст емульгатора 25 мг/л [7].

З використанням ліпази з *Candida rugosa* було проведено повний гідроліз відпрацьованої харчової пальмової олії за 10 годин при масовому співвідношенні вода : олія 1 : 1, при цьому використовували звичайну дистильовану воду [8].

Реакція гідролізу протікає на поверхні розподілу фаз ліпід-вода, фермент зазвичай водорозчинний і знаходиться у водній фазі, тому каталітична активність ферментів визначається не тільки хімічною природою субстрату (жиру) і фізичним станом системи, але й молекулярною організацією ліпідної фази, тобто ступенем дисперсності. Контакт фаз забезпечується ретельним перемішуванням [9, 10] або використанням різноманітних розчинників (октан, ізооктан, пентан, гексан та ін.) [11–14],

можливо з додаванням ПАР [11, 15], або проведенням процесу у надкритичному двооксиду вуглецю [16]. Однак використання розчинника збільшує витрати, створює необхідність додаткової операції відгонки та є пожежо-небезпечним, а додавання ПАР ускладнює подальшу очистку кінцевих продуктів.

На сьогоднішній день інформація щодо проведення процесу гідролізу з різноманітними ферментами досить розрізнена, також немає системних даних про використання ензимів вітчизняного виробництва, які можуть стати гідною заміною закордонних аналогів та здешевити технологію без втрати якості.

Метою роботи була оптимізація параметрів процесу гідролізу олії за критерієм максимального виходу жирних кислот при використанні ферментних каталізаторів. В якості останніх за результатами попередніх досліджень було обрано найбільш ефективні ліполітичні препарати Lipozyme TL 100L («Novozymes», Данія) та Солізім (БПО «Ензим», Україна).

Для реалізації задачі дослідження використано метод поверхонь відклику. При цьому було застосовано центральний композиційний рототабельний план, який дозволяє варіювати одночасно всі параметри процесу, тим самим зменшити кількість експериментів, врахувати взаємодію між всіма змінними, швидко та менш витратно отримувати інформації для статистично прийнятних результатів [18, 19].

Для математичного опису процесу було використано поліном другого порядку:

$$CG = b_0 + b_1 \cdot t + b_{11} \cdot t^2 + b_2 \cdot f + b_{22} \cdot f^2 + b_3 \cdot w + b_{33} \cdot w^2 + b_4 \cdot \tau + b_{44} \cdot \tau^2 + b_{12} \cdot t \cdot f + b_{13} \cdot t \cdot w + b_{14} \cdot t \cdot \tau + b_{23} \cdot f \cdot w + b_{24} \cdot f \cdot \tau + b_{34} \cdot w \cdot \tau, \quad (1)$$

де CG – ступінь гідролізу триацилгліцеринів, %; t – температура реакції, °C; w – співвідношення вода : олія, моль/моль; f – вміст ферменту, % мас.; τ – час реакції, години; b_0 – константа; $b_1, b_{11}, b_2, b_{22}, b_3, b_{33}, b_4, b_{44}, b_{12}, b_{13}, b_{14}, b_{34}$ – коефіцієнти для кожного елементу полінома.

Ступінь гідролізу в експериментах згідно [20] розраховували за формулою:

$$CG = \frac{KЧ}{ЧО} \cdot 100, \quad (2)$$

де КЧ – кислотне число зразка, мг КОН/г; ЧО – число омилення вихідного жиру, мг КОН/г.

Незалежні параметри та їх рівні було обрано на основі аналізу літературних даних та попередніх досліджень. Вказані рівні в кодованих та реальних значеннях представлено в табл. 1.

Таблиця 1

Умови процесу

Кодовані значення параметрів	Реальні значення параметрів			
	Температура реакції, °C	Вміст ферменту, %	Співвідношення вода : олія (моль/моль)	Час реакції, години
	t	f	w	τ
Солізім				
-1,68	20	1,0	3,0	1,0
-1	26	2,8	7,5	5,7

Закінчення табл. 1

Кодовані значення параметрів	Реальні значення параметрів			
	Температура реакції, °C	Вміст ферменту, %	Співвідношення вода : олія (моль/моль)	Час реакції, години
	t	f	w	τ
0	35	5,5	14,0	12,5
+1	44	8,2	20,5	19,3
+1,68	50	10,0	25,0	24,0
Lipozyme TL 100 L				
-1,68	40	1,0	3,0	1,0
-1	46	2,8	7,5	5,7
0	55	5,5	14,0	12,5
+1	64	8,2	20,5	19,3
+1,68	70	10,0	25,0	24,0

Матрицю планування та отримані експериментальні значення функцій відклику (середні значення 3-х паралельних досліджень) представлено в табл. 2.

Таблиця 2

Матриця планування та функції відклику у випадку гідролізу, що каталізується ферментами Солізім та Lipozyme TL 100L

Номер досліджу	t	f	w	τ	Ступінь гідролізу (CG), %	
					Солізім	Lipozyme TL 100L
1					50,1	58,2
2	1	1	-1	-1	25,6	32,5
3	1	-1	1	1	57,5	72,9
4	-1	1	-1	1	66,9	73,4
5	1	-1	-1	1	35,3	49,6
6	-1	-1	1	-1	52,6	56,3
7	-1	1	1	1	87,0	83,1
8	-1	-1	-1	-1	20,1	32,6
9	-1,68	0	0	0	58,7	64,4
10	1,68	0	0	0	19,3	42,5
11	0	-1,68	0	0	58,5	60,1
12	0	1,68	0	0	91,6	84,5
13	0	0	-1,68	0	33,4	46,3
14	0	0	1,68	0	74,2	80,8
15	0	0	0	-1,68	27,2	36,4
16	0	0	0	1,68	87,1	90,8
17	0	0	0	0	73,2	78,7
18	0	0	0	0	72,4	79,6

У реакціях, які здійснювали згідно матриці планування, в якості субстратів використано соняшникову олію та дистильовану воду (pH 7). Усі експерименти проведено при постійному перемішуванні під шаром азоту для запобігання окиснення.

Обробку даних, наведених в табл. 2, було виконано за допомогою пакета Statistica 9 (StatSoft, Inc.).

Отримана при цьому математична модель процесу гідролізу під дією ферменту Солізім має наступний вигляд:

$$CG = 77,777 - 11,820 \cdot t - 12,152 \cdot t^2 + 9,930 \cdot f - 0,826 \cdot f^2 + 12,263 \cdot w - 6,619 \cdot w^2 + 17,710 \cdot \tau - 5,457 \cdot \tau^2 + 5,422 \cdot t \cdot f - 0,738 \cdot t \cdot w + 1,918 \cdot t \cdot \tau - 1,263 \cdot f \cdot w - 4,558 \cdot f \cdot \tau - 1,838 \cdot w \cdot \tau. \quad (3)$$

При використанні ензиму Lipozyme TL 100L модель процесу гідролізу описується рівнянням:

$$CG = 78,800 - 6,570 \cdot t - 9,017 \cdot t^2 + 7,320 \cdot f - 2,231 \cdot f^2 + 10,255 \cdot w - 5,223 \cdot w^2 + 16,083 \cdot \tau - 5,212 \cdot \tau^2 + 3,658 \cdot t \cdot f + 1,950 \cdot t \cdot w + 2,845 \cdot t \cdot \tau - 1,450 \cdot f \cdot w - 2,545 \cdot f \cdot \tau - 2,050 \cdot w \cdot \tau. \quad (4)$$

Для оцінки значущості окремих параметрів та їх взаємодії для кожного з поліномів було побудовано діаграми Парето, які представлено на рис. 1 (L – лінійний ефект, Q – квадратичний ефект).

Аналіз діаграм (рис. 1) вказує на те, що всі коефіцієнти регресії та всі взаємодії факторів є значущими, тому

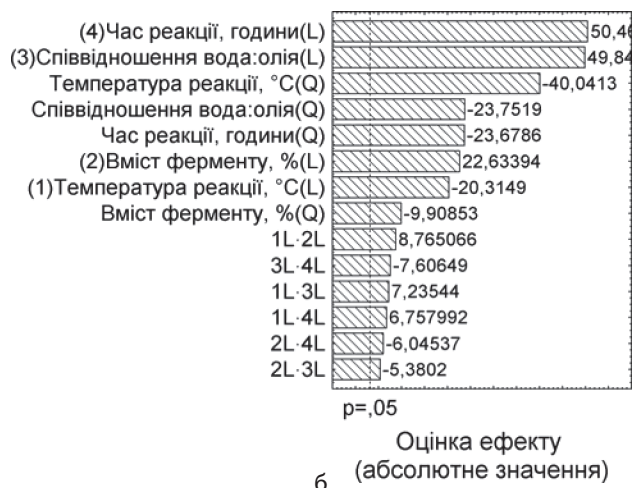
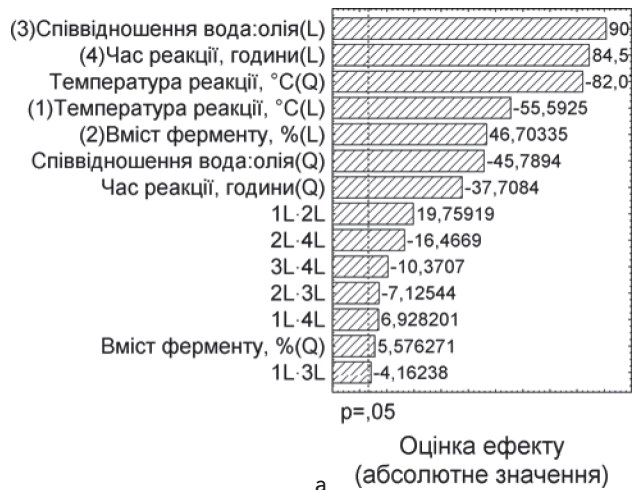


Рис. 1. Діаграми Парето для гідролізу під дією ферментного препарату: а — Солізіму, б — Lipozyme TL 100L

що їх рівень достовірності перевищує 95 %. При цьому найбільший вплив на ступінь гідролізу мають мольне співвідношення води та олії, час реакції та температура.

Адекватність отриманих моделей перевірялась методом дисперсійного аналізу, результати якого представлені в табл. 3 та 4.

Таблиця 3

Дисперсійний аналіз моделі гідролізу, що каталізується ферментним препаратом Солізім

Фактор	Сума квадратів, SS	Ступінь свободи, df	Середнє значення квадрата, MS	F-критерій	Рівень значущості, p
(1) Температура реакції, °C (L)	776,180	1	776,180	3090,526	0,0013
Температура реакції, °C (Q)	1692,009	1	1692,009	6737,095	0,0004
(2) Вміст ферменту, % (L)	547,805	1	547,805	2181,203	0,0022
Вміст ферменту, % (Q)	7,809	1	7,809	31,095	0,0114
(3) Співвідношення вода : олія (L)	2064,454	1	2064,454	8220,063	0,0003
Співвідношення вода : олія (Q)	526,575	1	526,575	2096,670	0,0023
(4) Час реакції, години (L)	1794,005	1	1794,005	7143,214	0,0004
Час реакції, години (Q)	357,114	1	357,114	1421,926	0,0041
1L · 2L	98,055	1	98,055	390,426	0,0003
1L · 3L	4,351	1	4,351	17,325	0,0252
1L · 4L	12,055	1	12,055	48,000	0,0062
2L · 3L	12,751	1	12,751	50,772	0,0057
2L · 4L	68,101	1	68,101	271,159	0,0005
3L · 4L	27,011	1	27,011	107,551	0,0019
Похибка	0,753	3	0,251		
Загальна сума квадратів	9584,503	17			
Коефіцієнт кореляції				R ² = 0,993	

Дані, які приведені в табл. 3 та 4, дозволяють зробити висновок, що в обох випадках моделі адекватно описують факторний простір експериментів, та спостерігається високий ступінь зв'язку між вхідними параметрами та відкликом.

На основі розрахунків оптимальними умовами для отримання найбільш глибокого ступеня розщеплення жиру при використанні Солізіму є наступні: мольне співвідношення вода : олія 19 : 1, температура 31 °C, вміст ензиму 5,3 %, тривалість процесу 22 години. За цих умов ступінь гідролізу 92,3 %. При використанні ліпази Lipozyme TL 100L оптимальні параметри такі: температура 55 °C, вміст ферменту 7,6 %, мольне співвідношення та час реакції відповідно 18 : 1 та 21 година, при цьому вказаний вихідний параметр становить 94,7 %.

Таблиця 4

Дисперсійний аналіз моделі гідролізу, що каталізується ферментним препаратом Lipozyme TL 100L

Фактор	Сума квадратів, SS	Ступінь свободи, df	Середнє значення квадрата, MS	F-критерій	Рівень значущості, p
(1) Температура реакції, °C (L)	239,805	1	239,805	412,695	0,0003
Температура реакції, °C (Q)	931,633	1	931,633	1603,302	0,0003
(2) Вміст ферменту, % (L)	297,680	1	297,680	512,295	0,0002
Вміст ферменту, % (Q)	57,049	1	57,049	98,179	0,0023
(3) Співвідношення вода : олія (L)	1443,807	1	1443,807	2484,733	0,0002
Співвідношення вода : олія (Q)	327,813	1	327,813	564,153	0,0016
(4) Час реакції, години (L)	1479,680	1	1479,680	2546,469	0,0017
Час реакції, години (Q)	325,792	1	325,792	560,676	0,0002
1L · 2L	44,642	1	44,642	76,826	0,0031
1L · 3L	30,420	1	30,420	52,352	0,0054
1L · 4L	26,538	1	26,538	45,670	0,0066
2L · 3L	16,820	1	16,820	28,947	0,0126
2L · 4L	21,236	1	21,236	36,547	0,0091
3L · 4L	33,620	1	33,620	57,859	0,0047
Похибка	1,743	3	0,581		
Загальна сума квадратів	6196,036	17			
Коефіцієнт кореляції	$R^2 = 0,995$				

Для вивчення впливу кожного з факторів та їх взаємодії на функцію відклику математичні моделі гідролізу було представлено в графічному вигляді (рис. 2–5). Наведені на вказаних рисунках поверхні відклику відображають залежність ступеня гідролізу від двох перемінних, при цьому інші два параметри зафіксовано в оптимальних значеннях.

Залежність виходу цільових продуктів від температури пов'язана з двома аспектами: інактивацією ліпази та швидкістю гідролізу. Швидкість реакції зі збільшенням температури зростає до певної межі, поки не відбувається термічна інактивація ферменту. Аналіз поверхонь відклику (рис. 2) свідчить про те, що при температурі вище 45 °C для Солізіму та вище 70 °C для Lipozyme TL 100L відбувається поступова денатурація білкової структури ензиму.

Згідно графічних даних, представлених на рис. 3, при оптимальних значеннях температури та співвідношенні реагентів ступінь гідролізу 90 % досягається через 18 годин з Солізімом та через 15 годин з Lipozyme TL 100L. Вказану глибину гідролізу з ферментним препаратом вітчизняного виробництва можна отримати при його кількості більше 4 % від маси олії, у випадку з ліпазою компанії Novozymes концентрація ензиму має бути більше 5 %. Згідно розрахунків оптимальний вміст Солізіму 5,3 % від маси олії, Lipozyme TL 100L – 7,6 %. Як видно

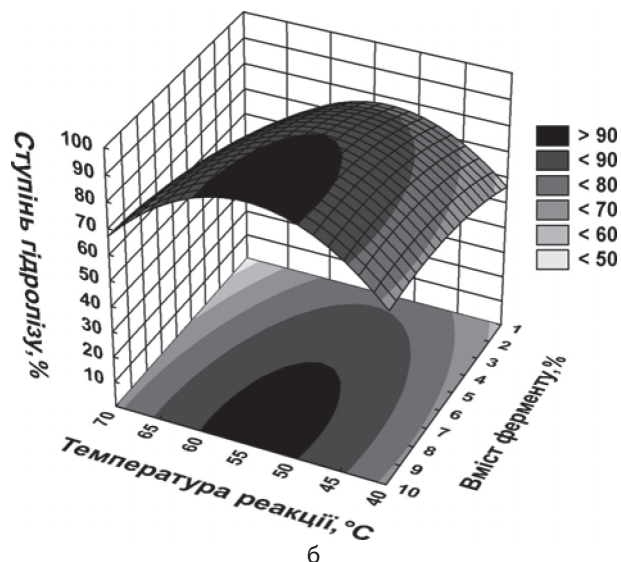
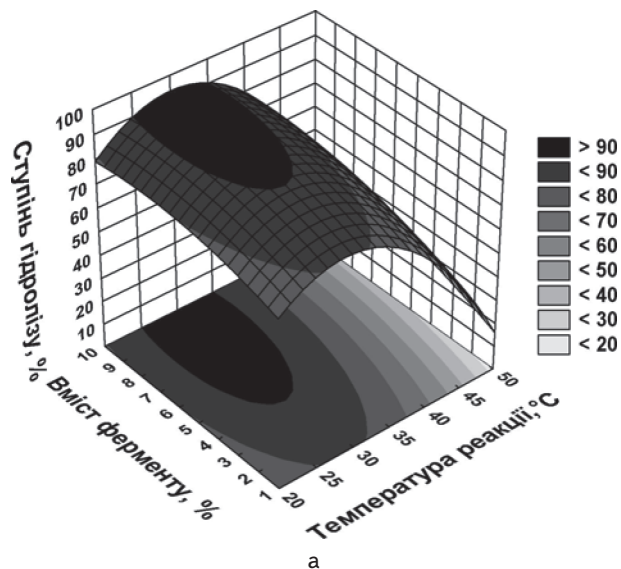


Рис. 2. Залежність ступеня гідролізу від вмісту ферменту та температури: а — під дією ферменту Солізім, б — під дією ферменту Lipozyme TL 100L

з графіків, збільшення вмісту ензиму до 10 % майже не впливає на ступінь гідролізу. Це пояснюється тим, що при певній концентрації біокатализатор насичує поверхню розділу фаз, і тому подальше збільшення його кількості не має значного впливу на вихід цільового продукту.

Аналіз даних рис. 4 свідчить про те, що при зміні мольного співвідношення води до олії від 3 : 1 до 16 : 1 у випадку використання Солізіму та до 13 : 1 з Lipozyme TL 100L відбувається стрімке зростання ступеня гідролізу. Це пояснюється тим, що ензими мають майже однакову спорідненість до продуктів гідролітичної реакції та до субстратів, тому підвищення концентрації води дозволяє зсунути рівновагу в бік утворення продуктів прямої реакції.

Аналіз поверхонь відклику, наведених на рис. 5, вказує на те, що для Солізіму межі ефективної температури 25–35 °C та мольного співвідношення вода : олія від 16 : 1 до 25 : 1. При цьому ступінь гідролізу за 22 години реакції є більшим за 90 %. При використанні Lipozyme TL 100L ефективний температурний діапазон є ширшим, а саме

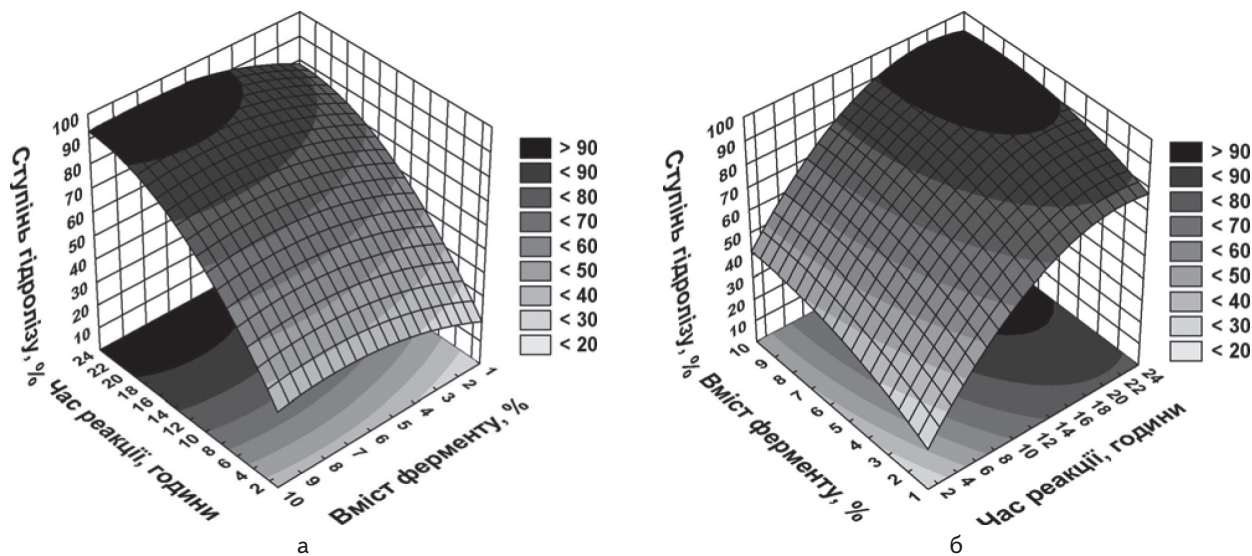


Рис. 3. Залежність ступеня гідролізу від вмісту ферменту та часу реакції: а — під дією ферменту Солізім, б — під дією ферменту Lipozyme TL 100L

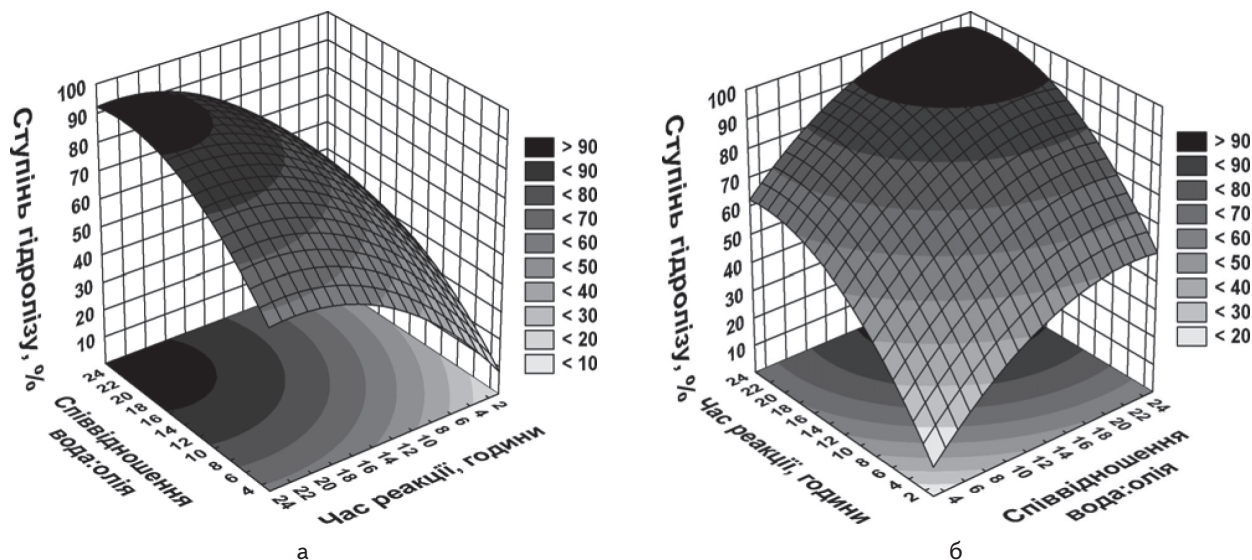


Рис. 4. Залежність ступеня гідролізу від часу реакції та співвідношення вода : олія: а — під дією ферменту Солізім, б — під дією ферменту Lipozyme TL 100L

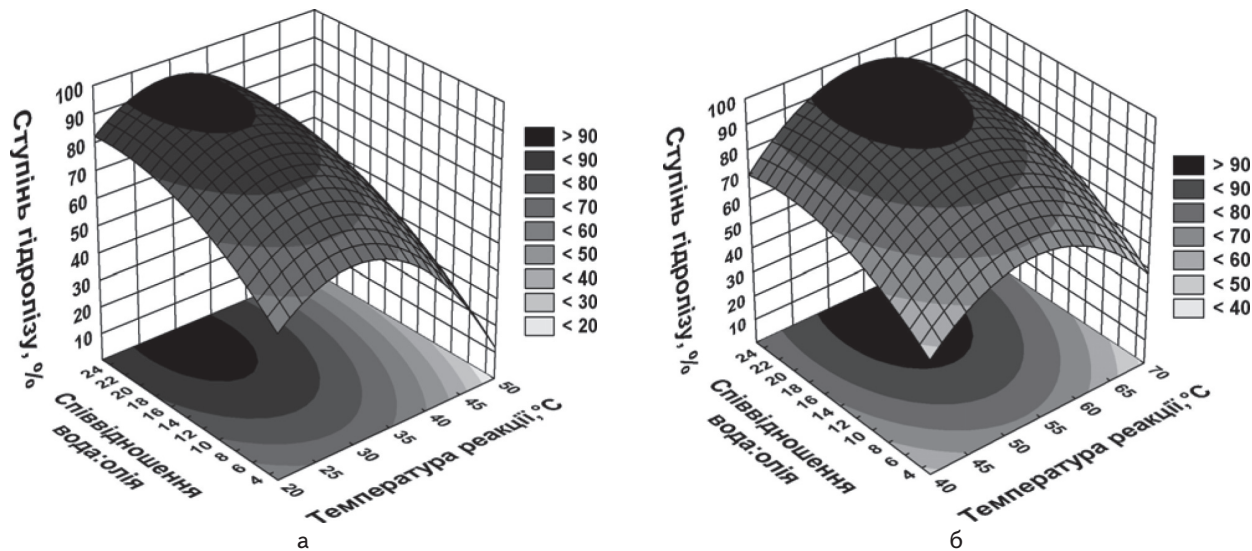


Рис. 5. Залежність ступеня гідролізу від температури та співвідношення вода : олія: а — під дією ферменту Солізім, б — під дією ферменту Lipozyme TL 100L

47–62 °С, що пов'язано з більшою термічною стабільністю ферментного препарату. Більшими є також і межі раціонального мольного співвідношення реагентів: вже при значенні вказаного параметра 13 : 1 можна отримати більше 90 % жирних кислот у суміші за 21 годину.

зуме TL 100L для глибокого розщеплення жиру. Оптимізовано основні параметри процесів та розроблено математичні моделі, які дозволяють прогнозувати значення функції відклику, а саме вихід цільових продуктів, при заданих значеннях предикторів: температури і часу процесу, мольного співвідношення субстратів та вмісту ферменту. Результати роботи можуть бути використані для розробки ефективної технології гідролізу жирів.

Висновки

В ході дослідження показана можливість використання двох ферментних препаратів Солізім та Ліро-

Література

1. Сарафанова Л. А. Пищевые добавки. Энциклопедия [Текст] / Л. А. Сарафанова. — ЗАО «ГИОРД», 2004. — 809 с.
2. Гаврисюк В. К. Применение Омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в медицине [Текст] / В. К. Гаврисюк // Укр. пульмон. журн. — 2001. — № 3. — С. 5–10.
3. Watanabe T. Optimization of Reaction Conditions for the Production of DAG Using an Immobilized 1,3-Regiospecific Lipozyme RM IM [Текст] / T. Watanabe, M. Shimizu, M. Sugiura and other // J. Am. Oil Chem. Soc. — 2003. — Vol. 80. — P. 1201–1207.
4. Sahin N. Enzymatic Production of Human Milk Fat Substitutes Containing g-Linolenic Acid: Optimization of Reactions by Response Surface Methodology [Текст] / Nese Sahin, Casimir C. Akoh, Artemis Karaali // JAOCS. — 2005. — Vol. 82. — P. 549–557.
5. Докучаева Г. Рынок ферментов: в ожидании перемен [Текст] / Г. Докучаева // Формула Бизнес пищевых ингредиентов. — 2009. — № 2. — С. 15–17.
6. Park Y. K. Hydrolysis of soybean oil by a combined lipase system [Текст] / Y. K. Park, G. M. Pastore, M. M. Almeida // Journal of the American Oil Chemists' Society. — 1988. — Vol. 65. — P. 252–254.
7. Noor I. M. Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase [Текст] / I. M. Noor, M. Hasan, K. B. Ramachandran // Process Biochemistry. — 2003. — Vol. 39, № 1. — P. 13–20.
8. Talukder Md. M. R. Conversion of waste cooking oil to biodiesel via enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification [Текст] / Md. M. R. Talukder, J. C. Wu, L. P.-L. Chua // Energy and Fuels. — 2010. — Vol. 24, № 3. — P. 2016–2019.
9. Goswami D. Optimization of process variables in castor oil hydrolysis by *Candida Rugosa* lipase with buffer as dispersion medium [Текст] / D. Goswami, J. K. Basu, S. De // Biotechnology and Bioprocess Engineering. — 2009. — Vol. 14. — P. 220–224.
10. Serri N. A. Preliminary Studies for Production of Fatty Acids from Hydrolysis of Cooking Palm Oil Using *C. rugosa* Lipase [Текст] / N. A. Serri, A. H. Kamarudin, S. N. Abdul Rahaman // Journal of Physical Science. — 2008. — Vol. 19, № 1. — P. 79–88.
11. Зиновьева М. Е. Гидролиз оливкового масла панкреатической липазой в неводных средах [Текст] / М. Е. Зиновьева, Н. В. Калачева, В. С. Гамаюрова // Биотехнология. — 1998. — № 2. — С. 64–67.
12. H-Kittikum A. Continuous production of fatty acids from palm olein by immobilized lipase in a two-phase system [Текст] / A. H-Kittikum, P. Prasertsan, C. Sungpud // JAOCS. — 2000. — Vol. 77, № 6 — P. 599–603.
13. Talukder Md. M. R. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel [Текст] / Md. M. R. Talukder, J. C. Wu, N. M. Fen, Y. L. S. Melissa // Biochemical Engineering Journal. — 2010. — Vol. 49, № 2. — P. 207–212.
14. Goswami D. Surfactant enhanced ricinoleic acid production using *Candida rugosa* lipase [Текст] / Debajyoti Goswami, Ramkrishna Sen, Jayanta Kumar Basu, Sirshendu De // Bioresource Technology. — 2010. — Vol. 101, № 1. — P. 6–13.
15. Rezaei K. Lipase-catalyzed hydrolysis of canola oil in supercritical carbon dioxide [Текст] / K. Rezaei, F. Temelli // JAOCS. — 2000. — Vol. 77, № 8. — P. 903–909.
16. Fabio M. Enzymatic hydrolysis of babassu oil in a membrane bioreactor [Текст] / Mergon Fabio, Sant'Anna Geraldo Lippel (Jr.), Nobrega Ronaldo // JAOCS. — 2000. — Vol. 77, № 10. — P. 1043–1048.
17. Арутюнян Н. С. Технология переработки жиров [Текст] / Н. С. Арутюнян, Е. П. Корнена, А. И. Янова. — 3-е изд. — М. : Пищепромиздат, 1999. — 452 с.
18. Basri M. Comparison of estimation capabilities of response surface methodology (RSM) with artificial neural network (ANN) in lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester [Текст] / M. Basri, R. N. Z. R. A. Rahman, A. Ebrahimipour // BMC Biotechnol. — 2007. — Vol. 7. — P. 53–59.
19. Montgomery D. C. Response Surface Methods and Other Approaches to Process Optimization [Текст] / D. C. Montgomery // Design and Analysis of Experiments, 5th ed. / D. C. Montgomery. — New York, John Wiley & Sons, 2001, P. 427–500.
20. Virto M. D. Enzymatic hydrolysis of animal fats in organic solvents at temperatures below their melting points [Текст] / M. D. Virto, J. M. Lascaray, R. Solozabal, M. de Renobales // JAOCS. — 1991. — Vol. 68, № 5. — P. 324–327.