

青藏高原黑果枸杞果油提取工艺优化及其脂肪酸组成分析

陈莎莎^{1,3}, 王艺霖⁴, 尤进茂^{1,2}, 索有瑞^{1,2}, 胡娜^{1,2*}

¹中国科学院西北高原生物研究所 青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室, 西宁 810001; ² 省部共建三江源生态与高效农牧业国家重点实验室(青海大学), 西宁 810016; ³ 中国科学院大学, 北京 100049;

⁴青海诺蓝杞生物科技开发有限公司, 西宁 810000

摘要: 本试验研究了提取溶剂、液料比、超声功率、超声时间和超声温度对超声提取黑果枸杞果油提取率的影响。在单因素试验基础上, 选择液料比、超声时间和超声温度为自变量, 黑果枸杞果油提取率为响应值, 利用 Box-Behnken 中心组合方法进行三因素三水平的试验设计, 并进行响应面分析(RSA)。结果表明: 各因素对超声辅助提取黑果枸杞果油的影响次序为: 超声温度 > 液料比 > 超声时间。最佳提取工艺为: 液料比 12 mL/g, 超声时间 37 min, 超声温度 51 °C, 此条件下黑果枸杞果油提取率为 7.19%。高效液相色谱荧光检测结果表明: 黑果枸杞果油中主要含有不饱和脂肪酸, 约占总脂肪酸的 64.86%。其中油酸与亚油酸质量分数最高, 分别为 38.73% 和 18.75%。饱和脂肪酸主要是硬脂酸和棕榈酸, 质量分数分别为 10.80% 和 11.16%。

关键词: 响应面; 超声提取; 黑果枸杞; 脂肪酸; 成分分析

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.026

Optimization of Extraction Process of *Lycium ruthenicum* Murr Fruit Oil From Qinghai-Tibet Plateau and Fatty Acid Composition Analysis

CHEN Sha-sha^{1,3}, WANG Yi-lin⁴, YOU Jin-mao^{1,2}, SUO You-rui^{1,2}, HU Na^{1,2*}

¹Qinghai Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Biological Resources, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; ²Supported by State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture (Qinghai University), Xining 810016, China; ³University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China;

⁴Qinghai Nuolanqi Biological Technology Development Co. Ltd, Xining 810000, China

Abstract: In this study, the effect of extraction solvents, liquid solid ratio, ultrasonic power, ultrasonic time, and ultrasonic temperature on the yield of *Lycium ruthenicum* Murr fruit oil was studied. On the basis of single factor tests, the mathematical regression model was established about the response values (extraction yield of *Lycium ruthenicum* Murr fruit oil) and independent variables (liquid solid ratio, ultrasonic time and ultrasonic temperature) through Box-Behnken center composite design (three factors and three levels) and response surface analysis. The result by response surface methodology indicated that effective factor on oil yield was the order as follows: ultrasonic temperature > liquid solid ratio > ultrasonic time. The optimum factors were: liquid solid ratio 12 mL/g, ultrasonic temperature 51 °C and ultrasonic time 37 min. The extraction yield of *Lycium ruthenicum* Murr fruit oil was 7.19%. The results of HPLC fluorescence detection analysis showed that the main components of *Lycium ruthenicum* Murr fruit oil were unsaturated fatty acids, the content of which was 64.86%. The main unsaturated fatty acids were oleic and linoleic acids, and the percentages of them were 38.73% and 18.75%, respectively. The main saturated fatty acids were stearic and palmitic acids, and the percentages of them were 10.80% and 11.16%, respectively.

Key words: response surface methodology; ultrasonic-assisted extraction; *Lycium ruthenicum* Murr; fatty acids; component analysis

收稿日期: 2016-09-27 接受日期: 2016-10-25

基金项目: 青海省自然科学基金青年基金(2016-ZJ-928Q); 青海省科技支撑计划(2014-SF-142); 中国科学院“西部青年学者”B类项目; 青海省重点实验室发展建设专项(2017-ZJ-Y10)

* 通信作者 Tel: 86-971-6143857; E-mail: huna@nwipb.cas.cn

黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum* Murr.) 系茄科 (Solanaceae) 枸杞属 (*Lycium* L.) 多年生灌木植物, 是我国西北部地区一种野生物种^[1]。国内主要分布于陕西北部、宁夏、甘肃、青海、新疆和西藏, 国外在中亚、高加索、蒙古、地中海沿岸的北非和南欧各国

皆有分布。黑果枸杞耐干旱,生长于盐碱土荒地、沙地或路旁,可作为水土保持的灌木^[2]。据藏医典籍《晶珠本草》和《四部医典》记载:黑果枸杞味甘、性平、清心热、用于治疗心热病、心脏病、月经不调、停经等病症^[3]。《维吾尔药志》记载:黑果枸杞果实可治疗尿道结石、癣疥、牙龈出血等病症,民间则用做滋补强壮、明目以及降压药^[4]。近年来对黑果枸杞果实的研究颇多,但主要集中在黄酮,多糖,花色苷,维生素、氨基酸和微量元素方面^[5-7]。黑果枸杞果实中脂肪酸的研究很少,目前,黑果枸杞果实中脂肪酸的提取工艺及其所含有的脂肪酸的种类和百分比尚无人报道。

超声波是一种高频机械振荡波,利用超声波在液体中产生“空穴作用”,破坏植物细胞和细胞膜结构,从而增强细胞内容物通过细胞膜的穿透能力,以强化萃取速率和效果,缩短超声时间,减少溶剂用量,提高油脂的提取率^[8]。目前,超声辅助提取植物中的油脂技术已在如沙枣种子油^[9]、黑莓籽油^[10]和花生油^[11]等方面有了广泛的应用。

脂肪酸成分的测定目前已有报道,但方法多数是采用气相色谱或者气相色谱-质谱联用技术。相对于液相色谱来说,气相色谱有很多明显的缺点。例如:长链的不饱和脂肪酸容易在气化过程中分解,影响实验数据的精确性。在实验过程中常用的衍生试剂如三氟化硼和重氮甲烷对人体有很大的伤害,而且气相色谱衍生过程很耗时。液相色谱可以在较温和的条件下完成对样品中脂肪酸含量的测定,并且在完成检测后分析物可以被收集以进行下一步的分析,方法准确、快速且灵敏度高和选择性好。

本研究采用超声波辅助法提取黑果枸杞果油,并利用响应面设计优化其工艺参数,确定最佳的提取工艺条件。采用柱前荧光衍生高效液相荧光检测技术分析其脂肪酸组成,以期对青海柴达木地区野生黑果枸杞资源的开发利用提供理论依据。

1 材料与仪器

黑果枸杞:由青海诺蓝杞生物科技开发有限公司提供,于2014年9月采集于柴达木盆地诺木洪地区。将黑果枸杞果实置于50℃鼓风干燥箱中干燥至恒重,粉碎后过32目筛。N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)(济宁化学试剂公司,山东)经减压蒸馏后使

用;色谱纯乙腈(中国,禹王试剂公司);2-(11-H-苯-a-咪唑)乙基对甲苯磺酸酯(BCETS)于尤进茂教授课题组合成;其他试剂均为分析纯。

DFY1000C 高速万能粉碎机,温岭市林大机械有限公司;KQ-250DB 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;101-1ES 型电热鼓风干燥箱,北京市永光明医疗仪器厂;优普 UPT 系列超纯水器,成都超纯科技有限公司;N-1100 旋转蒸发器,上海爱朗仪器有限公司;SHZ-3 型循环水多用真空泵,上海亚荣生化仪器厂;ALC-110.4 型电子天平,德国 Acculab 公司;Agilent 1100 型高效液相色谱(Agilent 公司),配备四元梯度泵(G1311A),DAD 检测器(G1315B),恒温调节器(G1311A),在线真空脱气机(G1322A),100 位自动进样器。

2 实验方法

2.1 超声提取黑果枸杞果油工艺流程

黑果枸杞→粉碎→准确称量→加入溶剂,超声波辅助提取→抽滤→真空浓缩,回收溶剂→烘干至恒重→黑果枸杞果油→计算提取率

提取率 = 提取所得果油质量 / 提取所用果粉质量 × 100%

2.2 提取溶剂的选择

称取一定量的黑果枸杞果粉,分别以不同的有机试剂即石油醚、氯仿-甲醇(v:v,1:1)、甲苯、乙醇、乙酸乙酯作为提取溶剂,在一定的试验条件下对黑果枸杞果油进行提取。

2.3 黑果枸杞果油提取的单因素试验

确定提取溶剂后,以液料比(3、6、9、12、15 mL/g),超声时间(10、20、30、40、50 min),超声功率(100、150、200、250 W)及超声温度(20、30、40、50、60℃)为单因素,考察各因素对黑果枸杞果油提取得率的影响。

2.4 响应面法设计

根据单因素试验结果,采用 Box-Behnken 设计方法,确定了液料比,超声时间和超声温度及其范围,分别以 A、B 和 C 表示,并以-1、0、1 分别代表变量的水平,以黑果枸杞果油提取得率(Y)为响应值,通过响应曲面分析(response surface analysis, RSA)进行提取条件的优化。Box-Behnken 设计试验因素和水平见表 1。

表1 响应面因素与水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiments

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
A 液料比 Liquid/solid ratio (mL/g)	9	12	15
B 超声时间 Ultrasonic time (min)	20	30	40
C 超声温度 Ultrasonic temperature (°C)	40	50	60

2.5 黑果枸杞果油成分分析

2.5.1 脂肪酸的衍生

向盛有 25 mg K_2CO_3 的 2 mL 安培瓶中依次加入 100 μ L DMF 和 200 μ L BCETS, 30 μ L 标准脂肪酸混合液或者 10 μ L 黑果枸杞果油提取液, 封口后于 90 °C 恒温水浴下震荡反应 30 min。取出冷却至室温后, 加入 400 μ L 乙腈稀释过 0.22 μ m 滤膜后进行样分析。脂肪酸与衍生试剂 BCETS 的衍生过程如图 1 所示。

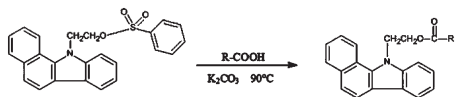


图1 脂肪酸与 BCETS 的衍生过程

Fig. 1 The derivatization scheme of fatty acids with BCETS

2.5.2 分析条件

色谱柱为 Hypersil BDS C8 柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μ m, Agilent Co.); 流动相为 A: 5% 乙腈水溶液, B: 乙腈。检测波长: 激发波长为 279 nm, 发射波长为 380 nm。洗脱梯度如下: 0 ~ 35 min, 65% ~ 83% B; 35 ~ 50 min, 83% ~ 88% B; 50 ~ 55 min, 88% ~ 100% B; 55 ~ 60 min, 100% B。流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μ L, 柱温 35 °C。

3 结果与分析

3.1 提取溶剂的确定

准确称取烘干至恒重的黑果枸杞果粉 4.0 g 5 份, 液料比为 9 mL/g, 在超声波功率为 150 W, 温度 60 °C 条件下, 超声提取 30 min。不同溶剂提取所获得的果油提取率如图 2 所示。

从图 2 中可以看出, 乙酸乙酯和乙醇对黑果枸杞果实中脂肪酸的提取率大大低于采用氯仿甲醇、甲苯和石油醚作为提取溶剂时所得提取率。考虑到氯仿、甲苯的毒性, 因此采用石油醚作为提取溶剂。

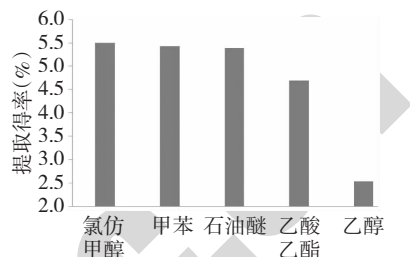


图2 不同溶剂对黑果枸杞果油提取得率的影响

Fig. 2 Effects of different solvents on extraction yield of *Lycium ruthenicum* Murr fruit oil

3.2 单因素条件的确定

3.2.1 液料比对提取得率的影响

为了确定最佳的液料比, 在相同的超声功率 150 W、超声温度 60 °C 和超声时间 30 min 的基础上, 考察液料比 3、6、9、12 和 15 mL/g 对提取得率的影响。如图 3 所示, 随着液料比的增加, 提取率开始逐渐增加, 当液料比增加到 12 mL/g 时, 提取率达到最大值。之后, 随着液料比的增加, 提取率开始下降。因此, 最佳液料比选择为 12 mL/g。

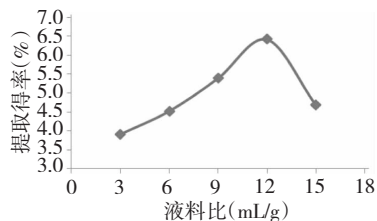


图3 液料比对黑果枸杞果油提取得率的影响

Fig. 3 Effects of liquid solid ratio on extraction yield of *Lycium ruthenicum* Murr fruit oil

3.2.2 超声功率对提取得率的影响

为了确定最佳超声功率, 在相同的液料比 9 mL/g, 超声温度 60 °C 和超声时间 30 min 的基础上, 考察超声功率 100、150、200 和 250 W 对提取得率的影响。如图 4 所示, 随着超声功率的增加, 提取得率也在逐渐的增加。当功率达到 150 W 时, 提取得率

达到最大。此后,随着超声功率的增加,提取率反而有稍微的下降趋势。因此,最佳超声功率选择为 150 W。

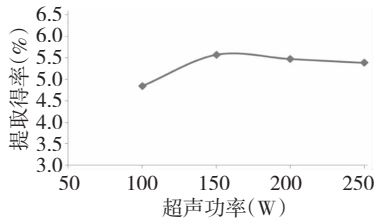


图4 超声功率对黑果枸杞果油提取得率的影响

Fig. 4 Effects of ultrasonic power on extraction yield of *Lycium ruthenicum* Murr fruit oil

3.2.3 超声时间对提取得率的影响

为了确定最佳的超声时间,在相同的液料比 9 mL/g,超声温度 60 °C 和超声功率 150 W 的基础上,考察了超声时间 10、20、30、40 和 50 min 对提取得率的影响。如图 5 所示,在 10 ~ 30 min 内,随着超声时间的增加,提取物的含量逐渐增加。超过 30 min 后即在 30 ~ 50 min 内,虽然提取得率也在增加,但增加的幅度很小,因此从节约时间,提高效率的角度出发,可以确定 30 min 为最佳超声时间。

3.2.4 超声温度对提取得率的影响

为了确定最佳的超声温度,在相同的液料比 9 mL/g,超声时间 30 min 和超声功率 150 W 的基础上,考察了超声温度对提取得率的影响。如图 6 所示,随着温度的增加,提取得率逐渐增大,当温度达到 50 °C 时,提取得率达到了最大值。当温度高于 50 °C 时,提取得率出现了下降的趋势,可能是由于

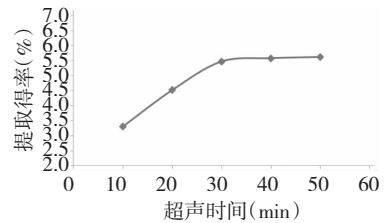


图5 超声时间对黑果枸杞果油提取得率的影响

Fig. 5 Effects of ultrasonic time on extraction yield of *Lycium ruthenicum* Murr fruit oil

温度升高导致了某些产物的分解。因此,最佳超声温度选择为 50 °C。

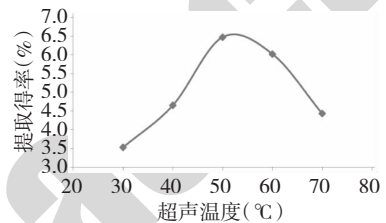


图6 超声温度对黑果枸杞果油提取得率的影响

Fig. 6 Effects of ultrasonic temperature on extraction yield of *Lycium ruthenicum* Murr fruit oil

3.3 响应面试验设计

结合单因素试验,超声功率对黑果枸杞果油提取得率的影响不是很显著,因此选择另外三个因素即液料比、超声温度和超声时间进行三因素三水平 Box-Behnken 中心组合试验设计和响应面分析,以确定黑果枸杞果油超声提取的最佳工艺条件,试验设计及结果见表 2。

表1 响应面试验设计方案及试验结果

Table 1 Optimization of extraction conditions and results of experimental design

试验号 No.	A (mL/g)	B (min)	C (°C)	R ₁ 提取得率 Extraction rate (%)
1	-1	0	-1	4.86
2	1	1	0	6.12
3	1	0	-1	4.63
4	0	-1	1	5.65
5	1	0	1	5.13
6	0	-1	-1	5.23
7	-1	0	1	5.49
8	1	-1	0	5.85
9	0	1	-1	5.87
10	-1	1	0	6.27
11	-1	-1	0	6.42

试验号 No.	A (mL/g)	B (min)	C (°C)	R ₁ 提取得率 Extraction rate (%)
12	0	1	1	6.02
13	0	0	0	7.01
14	0	0	0	6.87
15	0	0	0	7.08
16	0	0	0	7.05
17	0	0	0	7.06

根据表 2 的结果,以提取得率为响应值采用 Design-Expert 8.0.7.1 软件进行分析,得到的回归方程为: $R_1 = +7.01 - 0.17A + 0.14B + 0.21C + 0.11AB - 0.035AC - 0.0687BC - 0.76A^2 - 0.091B^2 - 1.23C^2$ 。

对模型进行方差分析,分析结果见表 3。从表 3

中可以看出,用上面的方程描述因子回归的 $P < 0.0001$,方程回归显著。失拟项 P 为 $0.0514 > 0.05$,表明失拟项不显著。同时相关系数 $R^2 = 0.9839$,说明这种试验方法是可靠的,能够很好地描述试验结果,使用该方程代替真实的试验点进行分析是可行的。

表 3 回归模型的方差分析表

Table 3 ANOVA of regression analysis

变异来源 Sources of variance	自由度 Freedom	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型	9	10.21	1.13	47.52	<0.0001	**
A	1	0.22	0.22	9.12	0.0194	*
B	1	0.16	0.16	6.68	0.0362	*
C	1	0.36	0.36	14.95	0.0062	**
AB	1	0.044	0.044	1.85	0.2163	不显著
AC	1	0.0049	0.0049	0.21	0.6643	不显著
BC	1	0.018	0.018	0.76	0.4113	不显著
A ²	1	2.42	2.42	101.38	<0.0001	**
B ²	1	0.035	0.035	1.45	0.2673	不显著
C ²	1	6.38	6.38	267.100	<0.0001	**
残差	7	0.17	0.024			
失拟相	3	0.14	0.046	6.48	0.0514	不显著
纯误差	4	0.029	0.00713			
总和	16	10.38				
R ²		0.9883				

注: ** 表示极显著, $P < 0.01$; * 表示显著, $P < 0.05$ 。

Note: ** very significant, $P < 0.01$; * Significant, $P < 0.05$.

在表 3 的方差分析结果中,一次项 A 和 B 项 P 值均小于 0.05,差异显著,说明液料比和超声时间对提取得率的影响显著。C 项 P 值小于 0.01,差异极显著,说明超声温度对提取得率的影响极为显著。三个因素对超声辅助提取黑果枸杞果油的影响次序为:超声温度 > 液料比 > 超声时间。交互项中 AB、AC 和 BC 的 P 值均大于 0.05,说明三个因素之间没有交互作用,对提取得率的影响不显著。二次项中液料比和超声温度的平方对提取得率的影响极为显著,超声时间的平方对提取得率的影响不显著。

根据回归方程,做出响应曲面图及其等高线图(图 7-图 9),所拟合的响应曲面和等高线图能比较直观的反应各因素和各因素间的交互作用。3 个图中的等高线均为比较圆的形状,同时在两个因子中一个因子低编码值和高编码值时,响应值 R_1 随着另一因子的变化趋势相同。说明两因子交互效应不显著,这与方差分析的结果相吻合。

由以上三个响应面图可以看出其图形均为开口向下的凸形曲面,同时等高线最小圆的中心在所选的 -1-1 范围内,说明响应值 R_1 在 3 个因子设计的范

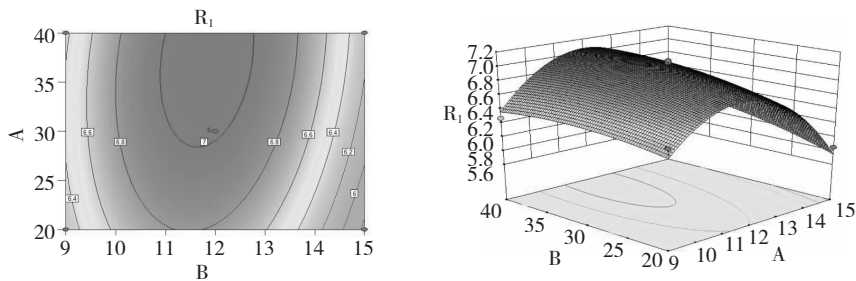


图7 $R_1 = f(A, B)$ 的响应面图和等高线图

Fig. 7 Responsive surfaces and contours of $R_1 = f(A, B)$

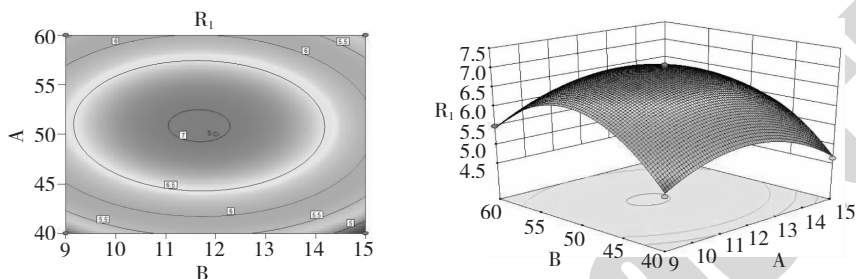


图8 $R_1 = f(A, C)$ 的响应面图和等高线图

Fig. 8 Responsive surfaces and contours of $R_1 = f(A, C)$

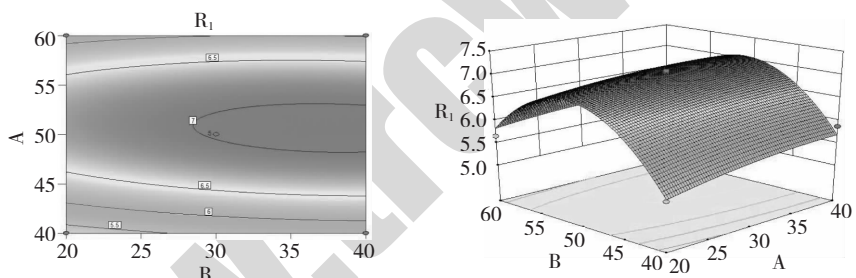


图9 $R_1 = f(B, C)$ 的响应面图和等高线图

Fig. 9 Responsive surfaces and contours of $R_1 = f(B, C)$

围内存在最大值。依据模型,最佳的提取条件为:液料比为 11.82 mL/g,超声时间为 37.19 min,超声温度为 50.67 °C,在此条件下预测得到的提取得率为 7.21%。考虑到实际操作的便利,将最佳工艺调整为液料比 12 mL/g,超声时间 37 min,超声温度 51 °C,在此实验条件下进行 3 次平行验证试验,实验结果为 7.19%,与预测值接近,相对误差小于 5%。

3.4 脂肪酸成分分析

采用柱前衍生,柱后荧光检测的高效液相色谱方法(HPLC-FLD)对所提取的果油进行了脂肪酸成分分析。色谱图如图 10 所示,对荧光相应信号作面积归一化,得到各个峰的面积以及相对百分含量,黑果枸杞果油中脂肪酸组成见表 4。

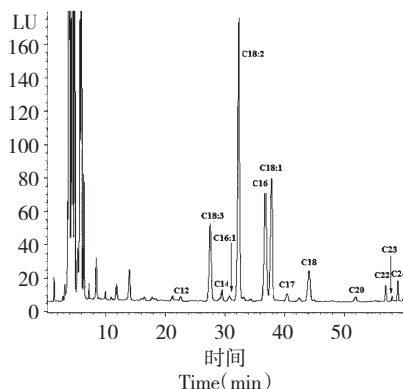


图 10 黑果枸杞果油中脂肪酸的 HPLC-FLD 分析图

Fig. 10 The HPLC-FLD chromatogram of *Lycium ruthenicum* Murr fruit oil

由表 4 可知,采用 HPLC-FLD 方法检测出黑果枸杞果实中主要含有 12 种脂肪酸,主要是不饱和脂肪酸油酸、亚油酸和亚麻酸,质量分数分别为 38.73%、18.75% 和 7.38%。另外,还含有少量的棕榈油酸。饱和脂肪酸主要是以硬脂酸和棕榈酸为主,质量分数分别为 10.80% 和 11.16%。此外,还含有少量的月桂酸、肉豆蔻酸、珠光脂酸、花生酸、山嵛酸和二十三酸。

表 1 黑果枸杞果油脂肪酸组成

Table 4 The composition of *Lycium ruthenicum* Murr fruit oil

序号	成分名称	相对质量分数(%)
1	月桂酸 C12	0.23
2	亚麻酸 C18:3	7.38
3	肉豆蔻酸 C14	0.94
4	棕榈油酸 C16:1	0.53
5	亚油酸 C18:2	38.73
6	棕榈酸 C16	11.16
7	油酸 C18:1	18.75
8	珠光脂酸 C17	1.04
9	硬脂酸 C18	10.80
10	花生酸 C20	5.89
11	山嵛酸 C22	3.14
12	二十三酸 C23	1.42

4 结论

本研究通过响应面法对超声提取黑果枸杞果油工艺进行了优化,得到了最佳提取工艺:液料比为 12 mL/g,超声温度 51 °C,超声时间 37 min,在此条件下提取得率为 7.19%。通过 HPLC-FLD 方法分析了黑果枸杞果油脂肪酸的组成,结果表明黑果枸杞果油中主要含有不饱和脂肪酸,比例占总脂肪酸的 64.86%。其中油酸与亚油酸质量分数最高,分别为 38.73% 和 18.75%。饱和脂肪酸主要是硬脂酸和棕榈酸,质量分数分别为 10.80% 和 11.16%。

参考文献

- Gan QM(甘青梅),Luo GF(骆桂法),Li ZY(李曾衍),*et al.* Research of exploitation and utilization of Tibetan medicine *Lycium ruthenicum* Murr. *Qinghai Sci Technol* (青海科技),1997,4(1):17-19.
- Chinese academy of sciences,China flora editorial board (中国科学院中国植物志编辑委员会). *Flora of China*(中国植物志),1999,61(1):10.
- Gan QM(甘青梅). Preliminary Investigation on Tibetan Medicine Herb. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2001,32:371-373.
- Liu YM(刘永民). *Uygur Medicine Tzu*(维吾尔药志). Urumqi: Xinjiang Health Science and Technology Press, 1999.478-485.
- Li SZ(李淑珍). Optimization preparing technology and activities of anti-oxidation, hypolipidemic and compositions of the total flavonoids from *Lycium ruthenicum*. Xinjiang: Xinjiang normal university, MSc. 2009.
- Lv XP(吕晓鹏). Studies on purification and structural characterization of the polysaccharide from *Lycium ruthenicum* Murr. Xi'an: Northwest University(西北大学), MSc. 2012.
- Li J(李进). Study on pigment of *Lycium ruthenicum* Murr. Shanghai: East China Normal University(华东师范大学), MSc. 2006.
- Lou QM(楼乔明), Wang YM(王玉明), Xu J(徐杰), *et al.* Fatty acids composition of scallop viscera and scallop skirt oil. *J Chin Instit Food Sci Technol*(中国食品学报),2012,12:198-203.
- Zhang N(张娜), Bao DD(包东东), Yang CH(杨春华), *et al.* Ultrasound-assisted extraction of *Elaeagnus angustifolia* seeds oil and its physical-chemical properties. *J Chin Cereals Oils Assoc* (中国粮油学报),2013,28(9):82-85.
- Zhu HY(朱红叶), Ma YK(马永昆), Wei BX(魏本喜). Ultrasound-assisted extraction of blackberry seed oil and analysis of its fatty acids. *China Oils Fats*(中国油脂),2010,6:5-8.
- Li Y(李杨), Jiang LZ(江连洲), Qi BK(齐宝坤), *et al.* Extraction of peanut oil with ultrasonic-assisted aqueous enzymatic method. *China Oils Fats*(中国油脂),2012,37(3):10-13.