

### 3 种不同培养基对斜生栅藻生长和油脂积累的影响

王丽娟, 杨宋琪, 丁丽梅, 杨生辉, 罗光宏

(河西学院 甘肃省微藻工程技术研究中心, 甘肃省河西走廊特色资源利用重点实验室, 甘肃 张掖 734000)

**摘要:**以斜生栅藻 FACHB-12 为原料, 采用 BG11、F/2 和 SE 3 种培养基对其培养。通过对生物量、生长速率、油脂含量、油脂组分以及脂肪酸组成的测定, 比较不同培养基对斜生栅藻生长和油脂积累的影响。结果表明: BG11 培养基更有利于斜生栅藻的生长, 而 F/2 培养基更适合油脂以及中性脂的积累; 斜生栅藻在 BG11 培养基中比生长速率为 0.095, 培养 15 d 生物量为 0.36 g/L, 叶绿素 a 含量达到 1.23 mg/L; 而在 F/2 培养基中油脂含量可达细胞干重的 24.75%, 其中中性脂占总脂的 36.64%, 产率达 0.98 mg/(L·d); 并且在 F/2 培养基中斜生栅藻脂肪酸组成以 C16:0 和 C18:1 为主, 含量分别占总脂肪酸的 25.84% 和 54.47%, 更适合作为制备生物柴油的原料。

**关键词:**斜生栅藻; 培养基; 生长水平; 油脂; 脂肪酸

中图分类号: Q81; TQ646

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2018)09-0088-05

#### Effects of three different culture mediums on growth and lipid accumulation of *Scenedesmus obliquus*

WANG Lijuan, YANG Songqi, DING Limei, YANG Shenghui, LUO Guanghong

(Key Laboratory of Hexi Corridor Resources Utilization of Gansu, Gansu Engineering Technology Research Center for Microalgae, Hexi University, Zhangye 734000, Gansu, China)

**Abstract:** Three kinds of culture mediums (BG11, F/2 and SE) were used to culture *Scenedesmus obliquus* FACHB-12. The effects of different culture mediums on growth and lipid accumulation of *Scenedesmus obliquus* were investigated by determining its biomass, growth rate, lipid content, lipid fraction distribution and fatty acid composition. The results showed that BG11 medium was more conducive to the growth of *Scenedesmus obliquus*, while the F/2 medium was more suitable for the lipid and neutral lipid accumulation. The specific growth rate, biomass and chlorophyll a content of *Scenedesmus obliquus* were respectively 0.095, 0.36 g/L and 1.23 mg/L after being cultured for 15 d in BG11 medium. The lipid content of *Scenedesmus obliquus* reached 24.75% of dry cell weight in *Scenedesmus obliquus* in F/2 medium, in which the neutral lipid accounted for 36.64% and its productivity was 0.98 mg/(L·d). In addition, the C16:0 and C18:1 was main fatty acids in *Scenedesmus obliquus* in F/2 medium, which accounted for 25.84% and 54.47% of the total fatty acids respectively. Therefore, it was an ideal raw material for biodiesel.

**Key words:** *Scenedesmus obliquus*; culture medium; growth level; lipid; fatty acid

收稿日期: 2018-02-07; 修回日期: 2018-06-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(11665011); 甘肃省高校协同创新科技团队支持计划(2017C-17); 甘肃省高等学校科研项目(2017A-086); 甘肃省重点研发计划项目(18YF1WG087)

作者简介: 王丽娟(1989), 女, 研究实习员, 硕士, 主要从事微藻成分分析与检测研究工作(E-mail) wljhexi@163.com。

通信作者: 罗光宏, 教授(E-mail) 13993693452@163.com。

微藻具有光合作用效率高、环境适应能力强、生长周期短、生物质产量高、产油率高、不与农作物争水争地等特点, 是一种新型的生物柴油原料<sup>[1]</sup>。斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*) 是一种常见的淡水微藻, 可以从不同的水体中分离获得, 其油脂组成与一般植物油相似, 以 C<sub>16</sub>、C<sub>18</sub> 系脂肪酸为主, 油脂含量为 11%~55%<sup>[2]</sup>。因此, 微藻生产生物柴油具有巨大的优势。但微藻生长及油脂的积累与藻种、培养

条件密切相关<sup>[3-5]</sup>,其中培养基的影响最显著,并且不同藻种对营养元素的种类及浓度存在一定的偏好性<sup>[6-7]</sup>。张毅<sup>[6]</sup>、胡慧慧<sup>[7]</sup>等发现不同种类培养基对小球藻生长和油脂含量的影响很大。Wang等<sup>[8]</sup>研究表明不同种类培养基对黄丝藻的生长和油脂含量有重要影响。而关于不同种类培养基对斜生栅藻的生长和油脂积累影响未见相关报道。

本研究对比了斜生栅藻在BG11、F/2和SE 3种不同培养基条件下细胞生长、油脂积累和脂肪酸组成的情况,并探索3种培养基对其中性脂积累的影响,以期寻求斜生栅藻最大产油量的培养条件提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种及培养

斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus* FACHB-12),购自中国科学院水生生物研究所。斜生栅藻在人工气候箱中培养,培养温度25℃,光照强度约为50 μmol/(m<sup>2</sup>·s),光周期为12L/12D。每天定期摇瓶3~4次并变换位置。

BG11培养基:硝酸钠1.5 g/L,磷酸氢二钾0.04 g/L,硫酸镁0.075 g/L,结晶氯化钙0.036 g/L,柠檬酸0.006 g/L,柠檬酸铁铵0.006 g/L,EDTA二钠0.001 g/L,碳酸钠0.02 g/L,微量元素溶液A5 1 mL/L,调节pH至7.1。

SE培养基:硝酸钠0.25 g/L,磷酸氢二钾0.075 g/L,硫酸镁0.075 g/L,结晶氯化钙0.025 g/L,磷酸二氢钾0.175 g/L,氯化钠0.025 g/L,土壤提取液40 mL/L,三氯化铁0.005 g/L,EDTA铁钠1 mL/L,微量元素溶液A5 1 mL/L。

F/2培养基:硝酸钠75 mg/L,磷酸二氢钠5 mg/L,EDTA二钠4.36 mg/L,三氯化铁3.16 mg/L,硫酸铜0.01 mg/L,硫酸锌0.022 mg/L,氯化钴0.01 mg/L,氯化锰0.18 mg/L,钼酸钠0.006 mg/L,维生素B<sub>1</sub>0.1 mg/L,维生素B<sub>12</sub>0.000 5 mg/L,生物素0.000 5 mg/L。

注:微量元素溶液A5为硼酸2.86 g/L,氯化锰1.86 g/L,硫酸锌0.22 g/L,钼酸钠0.39 g/L,硫酸铜0.08 g/L,硝酸钴0.05 g/L。

将对数生长期的斜生栅藻分别接种到BG11、SE和F/2培养基中。藻细胞初始接种浓度 $OD_{680}$ 为 $0.10 \pm 0.02$ ,连续培养15 d,每天测定斜生栅藻的生长和生物量,每3 d测定斜生栅藻的叶绿素和油脂含量,测定第15天的油脂组分、脂肪酸组成。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 斜生栅藻生长和叶绿素含量的测定

生长速率的测定:测定波长680 nm处藻液的吸

光值。比生长速率 $\mu = (\ln OD_2 - \ln OD_1) / (T_2 - T_1)$ ,式中: $OD_1$ 是第一次取样时( $T_1$ )的吸光值, $OD_2$ 是第二次取样时( $T_2$ )的吸光值。

生物量的测定:取一定体积藻液,用混合纤维滤膜(0.45 μm)真空抽滤,于105℃烘箱中烘至恒重。用单位体积藻体的干重( $DW$ )表示: $DW = (W_2 - W_1) / V$ 。式中: $W_1$ 为混合纤维滤膜烘至恒重后的质量; $W_2$ 为滤膜和藻样烘至恒重后的总质量; $V$ 为藻液体积。

叶绿素的测定:参照文献[9]方法进行。

#### 1.2.2 斜生栅藻油脂及其组分的测定

采用Bligh等<sup>[10]</sup>方法提取斜生栅藻油。油脂含量=油脂的质量/冻干藻粉的质量×100%。

总脂分级:参照文献[11]的方法,用硅胶柱(Agela Technologies; Cleanert silica-SPE; 500 mg)进行柱层析将总脂进一步分离。洗脱顺序为:氯仿洗脱中性脂(NL),丙酮和甲醇(体积比9:1)洗脱糖脂(GL),甲醇洗脱磷脂(PL),然后将分离的各组分用氮气吹干至恒重。

单位体积油脂产率= $DW \times$ 油脂含量 $\times 1000 /$ 培养天数。

#### 1.2.3 藻油脂脂肪酸组成的分析

油脂甲酯化:取一定量的藻油加入2 mL含1%浓硫酸的甲醇,迅速混匀,于70℃水浴反应30 min。冷却至室温后,加入2 mL正己烷和2 mL饱和氯化钠,充分振荡并静置分层,加入50 μL内标十九烷酸甲酯,离心后取上层进行气相色谱分析。

气相色谱条件:Thermo TR-35MS色谱柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm);柱温100℃,保留2 min,以10℃/min速度升到250℃,保持3 min。进样口温度250℃,检测器温度280℃。以面积归一化法得到各脂肪酸组分的相对含量。脂肪酸标准为Sigma公司产品。

#### 1.2.4 数据处理

采用Origin 8.0和Excel进行数据分析,每组设置3个平行。 $p < 0.05$ 表示有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基对斜生栅藻生长和叶绿素积累的影响

斜生栅藻在BG11、F/2和SE培养基中的生长曲线和生物量变化如图1所示,叶绿素a含量的变化如图2所示。

由图1可知,斜生栅藻在BG11培养基中生长最快,比生长速率达0.095,生物量从开始的0.04 g/L积累到15 d时的0.36 g/L,显著高于F/2和SE

培养基( $p < 0.05$ )。在 F/2 和 SE 培养基中生长速度较缓慢,接种 12 d 后进入生长平台期,比生长速率分别为 0.065 和 0.062,培养 15 d 生物量分别为 0.162、0.142 g/L。

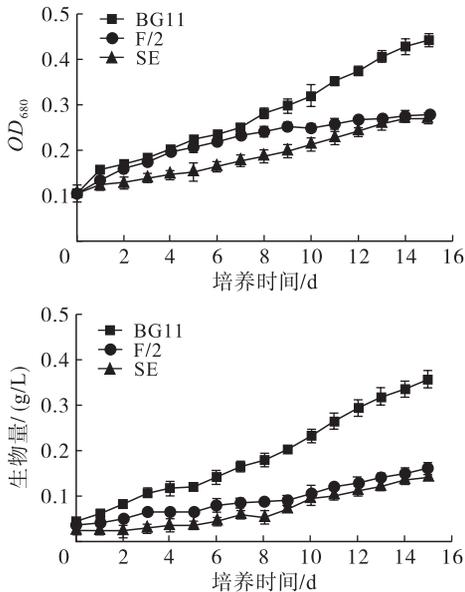


图 1 斜生栅藻在不同培养基中生长和生物量曲线

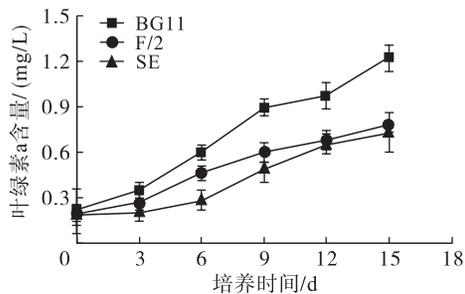


图 2 斜生栅藻在不同培养基中叶绿素 a 积累曲线

由图 2 可知,叶绿素 a 的增长与斜生栅藻生物量的增长同步,在第 15 天时 BG11 培养基的叶绿素 a 含量达到 1.23 mg/L, F/2 和 SE 培养基中由于斜生栅藻生长相对缓慢,叶绿素 a 含量仅为 0.79、0.73 mg/L。

### 2.2 斜生栅藻在不同培养基中油脂积累和总脂组分含量变化

斜生栅藻在 3 种培养基中油脂含量和总脂组分含量变化如图 3 所示。

由图 3a 可见,在培养周期中,斜生栅藻的油脂含量在 F/2 和 SE 培养基中不断上升。F/2 培养基中油脂积累最高,培养 15 d 时达到 24.75%,显著高于 SE 和 BG11 培养基。SE 培养基中培养 9 d 后油脂含量上升较快,在培养 15 d 时达到 19.01%。而 BG11 培养基中油脂积累较低,油脂含量先缓慢上升,当积累到最高峰后趋于稳定,培养 12 d 后油脂含量有所下降,培养 15 d 时达到 17.82%。由图 3b 可见,

3 种培养基中磷脂含量始终很高。中性脂含量在 F/2 培养基中最高,占总脂的 36.64%,是 BG11 和 SE 培养基的 4.11 倍和 1.84 倍。由图 3b 也可知, F/2 培养基积累的中性脂含量可达细胞干重的 9.08%,而 SE 和 BG11 积累的中性脂分别为细胞干重的 3.78% 和 1.59%。与总脂含量分析结果相吻合。同时 F/2 培养基积累的中性脂产率达 0.98 mg/(L·d),显著高于 SE 培养基的 0.36 mg/(L·d) 以及 BG11 培养基的 0.38 mg/(L·d)。可见斜生栅藻在 F/2 培养基中更有利于积累中性脂。

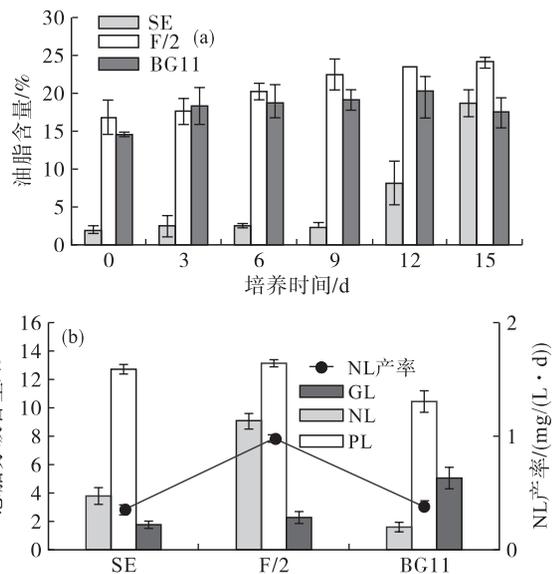


图 3 斜生栅藻在不同培养基中总脂、中性脂、磷脂和糖脂含量的变化

斜生栅藻在 3 种培养基中培养 15 d 时生物量、油脂含量和油脂产率如图 4 所示。

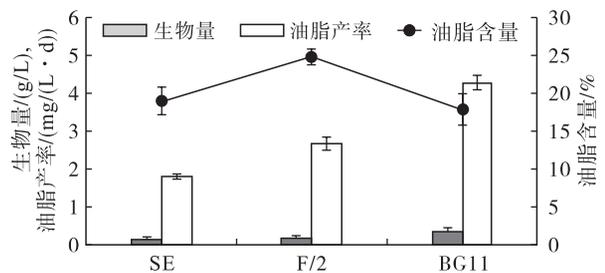


图 4 斜生栅藻在不同培养基中的生物量、油脂含量和产率的变化

由图 4 可知,虽然斜生栅藻在 F/2 培养基中油脂和中性脂含量高于 SE 和 BG11 培养基,但培养 15 d 后 BG11、F/2 和 SE 培养基的油脂产率分别为 4.27、2.67、1.79 mg/(L·d)。可见斜生栅藻在 BG11 培养基中具有最高的油脂产率。

### 2.3 斜生栅藻在不同培养基中的藻油脂肪酸组成

表 1 是斜生栅藻在 3 种培养基中的藻油脂肪酸组成。

表1 不同培养基中藻油脂肪酸组成比较

| 脂肪酸   | 脂肪酸含量/% |       |       |
|-------|---------|-------|-------|
|       | F/2     | SE    | BG11  |
| C14:0 | 0.37    | 0.55  | 0.54  |
| C16:0 | 25.84   | 20.23 | 24.18 |
| C16:2 | 1.07    | nd    | nd    |
| C16:3 | 3.21    | 5.09  | 3.66  |
| C18:0 | 3.17    | 4.75  | 7.19  |
| C18:1 | 54.47   | nd    | nd    |
| C18:2 | nd      | 4.36  | nd    |
| C18:3 | nd      | 40.53 | 44.39 |
| C20:1 | 0.46    | nd    | nd    |
| C20:5 | 4.53    | 1.38  | 1.39  |
| C22:6 | 6.32    | 23.01 | 18.45 |
| SFA   | 29.38   | 25.53 | 31.91 |
| MUFA  | 54.93   | nd    | nd    |
| PUFA  | 15.13   | 74.37 | 67.89 |

注:nd 为未检出。

由表1可知,在斜生栅藻中共检测出11种脂肪酸,其中饱和脂肪酸(SFA)3种、单不饱和脂肪酸(MUFA)2种、多不饱和脂肪酸(PUFA)6种。其中饱和脂肪酸主要是C16:0(棕榈酸)和C18:0(硬脂酸);单不饱和脂肪酸主要是C18:1(油酸);多不饱和脂肪酸主要含有C18:2(亚油酸)、C18:3(亚麻酸)、C20:5(EPA)和C22:6(DHA)。

斜生栅藻饱和脂肪酸在F/2、SE、BG11培养基中含量分别为29.38%、25.53%和31.91%。单不饱和脂肪酸在F/2培养基中最多,占54.93%,并且在其他2种培养基中均未检测出。多不饱和脂肪酸在3种培养基中含量分别为15.13%、74.37%和67.89%。且C18:2仅在SE培养基中检出;而C18:3仅在F/2培养基中未检出。可见斜生栅藻在F/2培养基中更有利于单不饱和脂肪酸的积累,而SE和BG11培养基中更有利于多不饱和脂肪酸的积累。

### 3 讨论

斜生栅藻在3种培养基中生长的差异与不同培养基的组成相关。3种培养基中最大差异是N、P质量浓度的不同(见表2)。斜生栅藻在接种到BG11培养基中具有较高的比生长速率和生物量,这可能是因为BG11培养基中N、P的质量浓度更适宜于斜生栅藻的生长。而斜生栅藻在F/2培养基中油脂含量较高可能是因为培养基中N、P的质量浓度较低更有利于油脂的积累。研究表明,缺氮和缺磷培养有利于微藻油脂的积累<sup>[12]</sup>。除此之外,3种培养基中其他营养盐浓度的差异对斜生栅藻生长和油脂积累也会有影响。

表2 3种培养基中N、P的质量浓度

| 项目       | BG11   | F/2   | SE    |
|----------|--------|-------|-------|
| N/(mg/L) | 247.06 | 12.35 | 41.18 |
| P/(mg/L) | 5.44   | 1.12  | 50.08 |

总脂可分为中性脂、糖脂和磷脂。其中糖脂和磷脂是细胞膜与细胞器膜的重要组成结构。中性脂作为能量储存物质,是生产生物柴油的理想原料。本研究发现,在BG11培养基下糖脂约占总脂的28.4%,而F/2和SE培养基下分别占总脂的9.16%和9.19%。糖脂是组成叶绿体膜以及类囊体膜的重要结构,所占比例高说明藻细胞的光合活性较强<sup>[13]</sup>。这与本研究中生物量和叶绿素a的实验结果一致。叶绿素a作为植物光合作用的基础,能够直接或间接地反映植物生理状态的变化。F/2和SE培养基中随着培养时间的延长,胞内油脂逐渐积累,此时藻细胞的光合作用逐渐减弱,故叶绿素a的含量逐渐趋于稳定。而BG11培养基中叶绿素a含量逐渐增长,故光合作用增强,从而油脂积累较少。研究表明,多数绿藻遇到逆境时细胞分裂停止,将自身代谢模式由先前的营养生长主动切换到次生代谢物如油脂的积累,这属于一种抗逆生理反应,以积累储能物质渡过不利环境<sup>[14]</sup>。在F/2培养基培养条件下,细胞生长缓慢,当进入稳定期后藻细胞由于受营养限制,以细胞分裂为主的生长方式开始转化以储存油脂维持能量供给的生长方式,所以开始积累油脂。故斜生栅藻在F/2培养基中油脂积累水平高于SE和BG11培养基,同时积累的作为生物柴油原料的中性脂含量也高于SE和BG11培养基。

作为理想生物柴油替代品应具有分子结构为:拥有较长的碳直链;双键的数目尽可能少,最好只有一个双键;含有一定量的O元素;分子结构尽可能没有或只有很少的碳支链;分子中不含有芳香烃结构<sup>[15]</sup>。本研究所检测的F/2培养基中脂肪酸主要以C16:0和C18:1为主,含量分别为25.84%和54.47%。而SE和BG11培养基中脂肪酸主要以C16:0(20.23%、24.18%)、C18:3(40.53%、44.39%)和C22:6(23.01%、18.45%)存在。可见F/2培养基培养的斜生栅藻培养的斜生栅藻从分子结构上更符合生物柴油的要求,而SE和BG11培养基培养的斜生栅藻更有利于应用于医疗和保健品中。

### 4 结论

本研究对比了3种培养基对斜生栅藻生长和油脂积累的影响。结果表明BG11培养基更有利于斜生栅藻生长和生物量的积累。在BG11培养基中培养15d后,斜生栅藻的比生长速率和生物量分别为

0.095 和 0.36 g/L。而 F/2 培养基更有利于斜生栅藻总脂和中性脂的积累。总脂含量可达细胞干重的 24.75%，中性脂占总脂的 36.64%，产率达 0.98 mg/(L·d)。同时 F/2 培养基中 C16:0 和 C18:1 含量占总脂肪酸的 25.84% 和 54.47%。但油脂产率不及 BG11 培养基。因此，斜生栅藻采用 F/2 培养基培养更适宜于生产生物柴油，但如何协调其生长与油脂积累的一致性有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] HSIEH C H, WU W T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation [J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100(17): 3921–3926.
- [2] LIANG Y, SARKANY N, CUI Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions [J]. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(7): 1043–1049.
- [3] LI Y, HORSMAN M, WANG B, et al. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81(4): 629–636.
- [4] 杨秀霞, 于浩, 曾晓起. 影响微藻脂肪酸组成因素概述 [J]. *海洋湖沼通报*, 2001(1): 76–82.
- [5] XU N J, ZHANG X C, FAN X, et al. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion* sp. (Eustigmatophyta) [J]. *J Appl Phycol*, 2001, 13(6): 463–469.
- [6] 张毅, 费晓雯, 彭世清, 等. 4 种不同培养基对小球藻 *Chlorella* spp. 生长和油脂积累的影响 [J]. *热带作物学*

报, 2010, 31(8): 1340–1345.

- [7] 胡慧慧, 徐年军. 不同培养基及组成对 2 种小球藻生长和油脂的影响 [J]. *生物学杂志*, 2012, 29(4): 12–16.
- [8] WANG H, ZHOU W J, CHENG W T, et al. Strategy study on enhancing lipid productivity of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* [J]. *Bioresour Technol*, 2016, 218: 161–166.
- [9] WELLBURN A R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution [J]. *J Plant Physiol*, 1994, 144(3): 307–313.
- [10] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Canad J Biochem Physiol*, 1959, 37(8): 911–917.
- [11] ALONZO F, MAYZAUD P. Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red [J]. *Marine Chem*, 1999, 67(3): 289–301.
- [12] BOUSSIBA S. Carotenogenesis in the green alga *Haemato-coccus pluvialis*: cellular physiology and stress response [J]. *Physiol Plantar*, 2000, 108(2): 111–117.
- [13] 朱顺妮, 王亚杰, 黄伟, 等. 缺氮培养对小球藻碳水化合物和油脂积累的影响 [J]. *太阳能学报*, 2016, 37(8): 2118–2122.
- [14] HARRINGTON K J. Chemical and physical properties of vegetable oil esters and their effect on diesel fuel performance [J]. *Biomass*, 1986, 9(1): 1–17.
- [15] 高利飞, 王昌禄, 陈勉华, 等. 酶法催化蓖麻油生产生物柴油的研究 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(16): 6950–6952.

(上接第 81 页)

- [5] JEONG W Y, JIN J S, CHO Y A. Determination of polyphenols in three *Capsicum annuum* L. (bell pepper) varieties using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: their contribution to overall antioxidant and anticancer activity [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(11): 2967–2974.
- [6] OI N, JEONG C H, NADAS J. Resveratrol, a red wine polyphenol, suppresses pancreatic cancer by inhibiting leukotriene a hydrolase [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9755–9764.
- [7] 王齐明. 绿茶多酚 EGCG 增强动脉粥样硬化斑块稳定性及其相关机制研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2017.
- [8] ZHU X X, WANG J J, OU Y. Polyphenol extract of *Phyllanthus emblica* (PEEP) induces inhibition of cell proliferation and triggers apoptosis in cervical cancer cells [J]. *Eur J Med Res*, 2013, 18(1): 1–5.
- [9] 王彩云. 石榴叶多酚的提取富集工艺及其药理作用研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
- [10] 杨婉, 葛学惠, 赵晨伟, 等. 大孔树脂纯化美藤果壳酚类物质的研究 [J]. *中国油脂*, 2018, 43(2): 120–123, 128.

- [11] 罗永会, 张翠香, 徐春萍. 大理野生橄榄多糖、总黄酮和总多酚的含量测定 [J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(7): 88–91.
- [12] 丁宁. 红松松子壳多糖的提取纯化、组成分析及抗氧化活性研究 [D]. 山东 青岛: 青岛科技大学, 2014.
- [13] 侯丽丽, 于常乐, 胡洋. 人参皂苷微波超声辅助提取工艺研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2017, 5(9): 124–128.
- [14] 霍宗庆, 徐婉晴, 刘言娟. 响应面法优化白玉菇多糖的提取工艺 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(21): 145–149.
- [15] 郭彩霞, 任晓婷, 张万生, 等. 响应面法优化超声波辅助提取猕猴桃果皮多酚工艺研究 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(11): 244–250.
- [16] 向莉, 胡艳, 王月慧, 等. 响应面法优化黑粒小麦麸皮多酚提取工艺 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(21): 173–183.
- [17] CHEW K, KHOO M, NG S, et al. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts [J]. *Int Food Res J*, 2011, 18(4): 571–578.