

生物工程

拟微绿球藻中二十碳五烯酸提取工艺的比较研究

朱孝晨¹, 孙利芹¹, 杨红芬², 丁珂¹, 季昱含¹

(1. 烟台大学 生命科学学院, 山东 烟台 264005; 2. 烟台海缘生物技术有限公司, 山东 烟台 264010)

摘要:以拟微绿球藻为原料, 比较不同有机溶剂体系及超临界 CO₂ (SC - CO₂) 萃取对微藻油得率和 EPA 含量的影响, 并采用响应面法对 SC - CO₂ 萃取工艺进行优化。结果表明: 有机溶剂体系石油醚 - 丙酮 - 乙醇 (体积比 2:1:0.5) 可以获得较好的萃取效果, 此条件下微藻油得率为 23.74%, EPA 含量为 31.34%; SC - CO₂ 萃取最佳夹带剂为甲醇, 最佳萃取工艺参数为萃取压力 26 MPa、萃取温度 48℃、萃取时间 168 min, 此条件下微藻油得率为 8.34%, EPA 含量为 25.66%。GC - MS 分析显示, 两种方法所得微藻油脂肪酸组成一致, 且均以不饱和脂肪酸为主。考虑到设备成本、能耗等问题, 溶剂浸提法相比于 SC - CO₂ 更具有有一定优势。

关键词:拟微绿球藻; 超临界 CO₂ 萃取; 溶剂提取; 响应面法; EPA

中图分类号: TS224.4; TQ644 文献标识码: A 文章编号: 1003 - 7969 (2018) 05 - 0095 - 05

Comparison of extraction process of eicosapentaenoic acid from *Nannochloropsis oceanica*

ZHU Xiaochen¹, SUN Liqin¹, YANG Hongfen², DING Ke¹, JI Yuhan¹

(1. College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, Shandong, China;

2. Haiyuan Biology Technology Co., Ltd., Yantai 264010, Shandong, China)

Abstract: The effects of different organic solvent systems and supercritical CO₂ (SC - CO₂) extraction on the yield and EPA content of microalgae oil were studied with *Nannochloropsis Oceanica* as the material. Response surface methodology was employed to optimize the SC - CO₂ extraction conditions. The results showed that the optimal extraction process for solvent extraction was petroleum ether - acetone - ethanol (volume ratio 2:1:0.5). Under this condition, the yield of microalgae oil was 23.74%, and the EPA content accounted for 31.34%. The best co - solvent for SC - CO₂ extraction was methanol, and the optimal extraction conditions were obtained as follows: extraction pressure 26 MPa, extraction temperature 48℃ and extraction time 168 min. Under these conditions, the yield of microalgae oil was 8.34%, and EPA content reached 25.66%. GC - MS analysis results showed that the fatty acid compositions of microalgae oils extracted by two methods had no significant difference, mainly composed of polyunsaturated fatty acids. Considering the equipment cost, energy consumption and other issues, solvent extraction method had more advantage than SC - CO₂.

Key words: *Nannochloropsis oceanica*; supercritical CO₂ extraction; solvent extraction; response surface methodology; EPA

收稿日期: 2017 - 08 - 26; 修回日期: 2017 - 09 - 15

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系建设专项资金 (SDAIT - 26 - 03); 山东省 2016 年度农业重大应用技术创新项目 (鲁财农指 [2016] 36 号)

作者简介: 朱孝晨 (1990), 男, 硕士研究生, 研究方向为藻类资源开发与利用 (E-mail) zhuxc20@163.com。

通信作者: 孙利芹, 教授, 博士 (E-mail) sliqin2005@163.com。

二十碳五烯酸 (EPA) 属于 $\omega - 3$ 系列不饱和脂肪酸, 具有防止人体代谢失调、血管硬化和心脏血管堵塞, 降低高血压和胆固醇, 抑制血小板凝结等作用, 在英、美、日等发达国家推荐每个成人 $\omega - 3$ 型多不饱和脂肪酸的摄入量应为 1.0 ~ 1.5 g/d^[1-2]。目前市场上的 EPA 产品主要来源于海洋鱼类, 微藻作为初级

生产者,在生长过程中能够积累多种不饱和脂肪酸,动物体内的不饱和脂肪酸多是从微藻中转化而来^[3]。微藻中不饱和脂肪酸的组成不含胆固醇、没有鱼腥味,且微藻具有资源丰富、生长周期短,可通过控制培养条件提高细胞内不饱和脂肪酸含量等优势^[4-5]。因此,从微藻中提取天然植物性来源的 EPA 具有更大的潜力,将成为鱼油的重要替代品^[6]。

已有研究报道了一些微藻种类中富含 EPA,其中报道最多的是拟微绿球藻(*Nannochloropsis* sp.),又称微绿球藻,是一种分布广泛的海水藻类,细胞大量积累不饱和脂肪酸,其中 EPA 含量可达到总脂肪酸的 30% 左右,被认为是最有潜力的 EPA 研究藻种^[7-9]。目前对于拟微绿球藻 EPA 的研究多集中在培养条件调控微藻中油脂含量,对于从拟微绿球藻中提取富含 EPA 油脂的方法研究主要涉及到索氏提取法、超临界萃取法、溶剂浸提法、酶解法等^[10-12]。但当前的方法研究多关注的是油脂的总提取率,对于不同提取方法对藻油中 EPA 含量影响的相关报道甚少。本研究以总藻油得率和 EPA 占藻油中总脂肪酸的比例为考察目标,比较优化不同有机溶剂体系以及超临界 CO₂(SC-CO₂)萃取条件对拟微绿球藻中微藻油得率和 EPA 含量的影响,并采用响应面法优化 SC-CO₂提取工艺,以期对拟微绿球藻 EPA 产品的市场开发提供重要的参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

拟微绿球藻(*Nannochloropsis oceanica*)冻干粉由烟台海融微藻养殖有限公司提供(已破壁);CO₂(食品级,纯度>99.5%);其他试剂均为分析纯。

HA220-40-12 超临界萃取设备,DZF-6050 真空干燥箱,RE-52A 旋转蒸发器,AB104-L 分析天平,GCMS-QP2010 气质联用分析仪。

1.2 实验方法

1.2.1 有机溶剂浸提法溶剂种类与配比的选择

取拟微绿球藻冻干粉(已破壁)30 g 用滤纸包好后置于烧杯中,按料液比 1:20 加入不同体系的有机溶剂,常温常压下浸提 24 h,浸提后 4 000 r/min 离心 15 min。藻渣回收再次浸提,重复 3 次,合并上清液,旋转蒸发后于 55℃ 真空干燥至恒重,备用。

根据溶剂极性大小,设置实验用的有机溶剂体系为:① 95% 乙醇(文中均为 95% 乙醇,下同);② 石油醚-乙醇(体积比 2:1);③ 石油醚-丙酮(体积比 1:1);④ 石油醚-乙酸乙酯-乙醇(体积比 1:1:0.5);⑤ 石油醚-丙酮-乙醇-水(体积比 1:1:2:0.5);

⑥ 石油醚-丙酮-乙醇(体积比 2:1:1);⑦ 石油醚-丙酮-乙醇(体积比 2:1:0.5);⑧ 石油醚-乙醇-水(体积比 1:2:0.8);⑨ 石油醚-丙酮-乙酸乙酯(体积比 2:1:1);⑩ 石油醚-丙酮-乙酸乙酯(体积比 2:1:0.5),以 Bligh-Dyer 提出的氯仿-甲醇-水混合溶剂体系(体积比 1:2:0.8)为参照,以粗藻油总得率和微藻油中 EPA 含量为考察指标进行溶剂配比和种类的优化选择。

1.2.2 超临界 CO₂ 萃取(SC-CO₂)微藻油

1.2.2.1 萃取工艺路线

拟微绿球藻藻粉→称重→装料→密封→调整实验参数到预设状态→超临界 CO₂ 萃取微藻油。

微藻油得率 = 萃取所得粗藻油质量/藻粉质量 × 100%。

1.2.2.2 不同夹带剂的选择

由于 EPA 的极性较大,因此在采用超临界 CO₂ 萃取时,需要添加夹带剂来提高 EPA 的得率。实验考察了 6 种夹带剂体系对 EPA 提取效果的影响。具体溶剂体系及配比为:Ⅰ. 乙酸乙酯;Ⅱ. 乙醇;Ⅲ. 石油醚-丙酮-乙醇(体积比 2:1:0.5);Ⅳ. 石油醚-丙酮-乙酸乙酯(体积比 2:1:1);Ⅴ. 氯仿-甲醇(体积比 2:1);Ⅵ. 甲醇。夹带剂添加量为藻粉质量的 20%,萃取条件为:萃取温度 35℃,萃取压力 30 MPa,萃取时间 120 min。

1.2.3 脂肪酸组成分析

甲酯化:取适量样品于具塞试管中,加入 2 mL 石油醚-苯(体积比 1:1)溶解,再加入 5 mL 0.2 mol/L 的氢氧化钾-甲醇溶液,于 50℃ 水浴 30 min,冷却,加入 2 mL 饱和 NaCl 溶液,静置 10 min 分层,取上清液,加入少量无水硫酸钠,密封,冷藏备用。

色谱条件:Rtx-5MS 色谱柱(30 m × 0.32 mm, 0.25 μm);载气为 He(99.99%);进样量 0.5 μL;进样方式为分流进样,分流比为 20:1;载气流速 1.0 mL/min;进样口温度 250℃;色谱-质谱接口温度 230℃;柱温升温程序为初温 100℃,保持 2 min,以 4℃/min 升温至 250℃ 并保持 2 min。

质谱条件:EI 离子源;电子能 70 eV,接口温度 230℃,离子源温度 200℃,质量扫描范围(*m/z*)29 ~ 450。面积归一化法计算各脂肪酸相对含量。

2 结果与讨论

2.1 不同有机溶剂体系对微藻油提取效果的影响(见表 1)

由表 1 可知,石油醚-乙醇(体积比 2:1)混合体系微藻油得率最高,为 26.92%,其次为石油醚-丙酮-乙醇(体积比 2:1:0.5)体系,微藻油得率为

23.74%。两者藻油得率均高于 Bligh - Dyer (氯仿 - 甲醇 - 水) 体系。通过 GC - MS 分析可知,石油醚 - 丙酮 - 乙醇 (体积比 2:1:0.5) 体系中 EPA 含量为 31.34%, 明显高于石油醚 - 乙醇 (体积比 2:1) 体系。综合考虑,确定石油醚 - 丙酮 - 乙醇 (体积比 2:1:0.5) 为有机溶剂浸提体系。

Ryckebosch 等^[13]发现极性溶剂与非极性溶剂混合体系可获得更多的油脂含量,并确定二氯甲烷 - 乙醇 (体积比 1:1) 为最佳浸提体系。本研究通过比

较不同极性溶剂与非极性溶剂混合体系,并确定了石油醚 - 丙酮 - 乙醇 (体积比 2:1:0.5) 体系,相比于传统的氯仿 - 甲醇 - 水体系和二氯甲烷 - 乙醇体系安全性更高,且对于极性脂肪酸有更好地萃取效果。同时发现,同一混合体系不同溶剂配比对藻油得率以及脂肪酸含量也有一定影响。Ryckebosch 等^[14]研究三角褐指藻中油脂的提取时发现,不同的氯仿 - 甲醇溶剂配比体系对油脂得率有一定影响,与本文研究结果相似。

表 1 不同溶剂体系对油脂得率和 EPA 含量的影响

溶剂体系	体积比	微藻油得率/%	EPA 含量/%
95% 乙醇	-	18.41 ± 1.18	13.24
石油醚 - 乙醇	2:1	26.92 ± 0.82	17.65
石油醚 - 丙酮	1:1	20.93 ± 0.95	18.49
石油醚 - 乙酸乙酯 - 乙醇	1:1:0.5	22.92 ± 0.97	17.28
石油醚 - 丙酮 - 乙醇 - 水	1:1:2:0.5	19.95 ± 0.88	16.70
石油醚 - 丙酮 - 乙醇	2:1:1	22.90 ± 0.42	25.87
石油醚 - 丙酮 - 乙醇	2:1:0.5	23.74 ± 0.94	31.34
石油醚 - 乙醇 - 水	1:2:0.8	20.67 ± 0.76	15.29
石油醚 - 丙酮 - 乙酸乙酯	2:1:1	20.24 ± 0.69	18.30
石油醚 - 丙酮 - 乙酸乙酯	2:1:0.5	21.36 ± 1.05	20.91
氯仿 - 甲醇 - 水	1:2:0.8	23.40 ± 1.84	23.10

2.2 超临界 CO₂ 萃取工艺

2.2.1 夹带剂的选择

由于萃取所用的超临界 CO₂ 是一种非极性物质,对极性较低脂质萃取效果较好,但对极性较大的脂质萃取效果一般^[15]。EPA 主要集中在微藻的极性脂质中,故向萃取体系中加入夹带剂,可以改变油脂的分配系数,提高油脂的得率,见图 1。

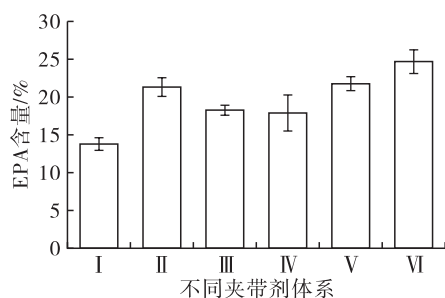


图 1 不同夹带剂体系对 EPA 含量的影响

由图 1 可知,乙酸乙酯体系中 EPA 含量最低,为 13.79%;甲醇作为夹带剂,EPA 含量最高,为 24.68%。因此,本研究确定以甲醇为夹带剂进行后续实验。

2.2.2 响应面萃取工艺优化

2.2.2.1 Box - Behnken 实验设计及结果

超临界萃取体系中压力、温度和时间通常是决定得率的主要因素,因此本实验选取萃取压力、萃取

温度、萃取时间为因素,以甲醇为夹带剂 (用量为藻粉质量的 20%),萃取釜的容积为 2 L,每次装料量为 400 g,以微藻油得率 (Y) 为响应值。按 Design - Expert 8.0.6 软件进行实验设计,选择三因素三水平的 Box - Behnken 设计,并对结果进行统计分析。因素水平见表 2,Box - Behnken 实验设计及结果见表 3。

表 2 Box - Behnken 实验因素水平

水平	X ₁ 萃取压力/ MPa	X ₂ 萃取温度/ °C	X ₃ 萃取时间/ min
-1	20	35.0	120
0	25	42.5	150
1	30	50.0	180

表 3 Box - Behnken 实验设计及结果

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	Y/%	
				测定值	预测值
1	-1	0	-1	6.16	6.13
2	-1	-1	0	5.48	5.60
3	1	0	1	7.80	7.83
4	1	0	-1	6.70	6.72
5	0	0	0	7.69	7.81
6	-1	1	0	7.56	7.49
7	0	1	1	8.07	8.16
8	0	1	-1	7.28	7.38

续表 3

实验号	X_1	X_2	X_3	Y/%	
				测定值	预测值
9	0	0	0	7.82	7.81
10	1	1	0	7.89	7.77
11	-1	0	1	7.17	7.15
12	1	-1	0	6.50	6.57
13	0	0	0	7.76	7.81
14	0	-1	1	7.00	6.90
15	0	0	0	7.91	7.81
16	0	0	0	7.88	7.81
17	0	-1	-1	5.64	5.55

2.2.2.2 模型建立与显著性检验

根据实验结果,利用 Design-Expert 8.0.6 软件对所得数据进行分析,得到二次回归方程: $Y = 7.81 + 0.32X_1 + 0.77X_2 + 0.53X_3 - 0.17X_1X_2 + 0.02X_1X_3 - 0.14X_2X_3 - 0.50X_1^2 - 0.46X_2^2 - 0.36X_3^2$ 。

对回归方程进行方差分析,结果见表 4。

表 4 回归模型的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	10.78	9	1.20	77.39	<0.000 1 **
X_1	0.79	1	0.79	51.29	0.000 2 **
X_2	4.77	1	4.77	308.49	<0.000 1 **
X_3	2.27	1	2.27	146.58	<0.000 1 **
X_1X_2	0.12	1	0.12	7.69	0.027 6 *
X_1X_3	0.002	1	0.002	0.13	0.728 2
X_2X_3	0.08	1	0.08	5.25	0.055 7
X_1^2	1.04	1	1.04	67.27	<0.000 1 **
X_2^2	0.88	1	0.88	56.88	0.000 1 **
X_3^2	0.54	1	0.54	34.72	0.000 6 **
残差	0.11	7	0.016		
失拟项	0.076	3	0.025	3.20	0.145 5
纯误差	0.032	4	0.008		
总和	10.89	16			

注: $R^2 = 0.990 1$, $R^2_{Adj} = 0.977 3$; * $P < 0.05$, 差异显著; ** $P < 0.01$, 差异极显著。

由表 4 可知,该二次回归模型 $F = 77.39$, $P < 0.000 1$ 表明模型高度显著,不同处理间的差异极显著;失拟项 $F = 3.20$, $P = 0.145 5 > 0.05$, 不显著。模型的调整确定系数 $R^2_{Adj} = 0.977 3$, 说明该模型能解释 97.73% 响应值的变化,因而该模型的拟合度良好,可以用该模型对 SC-CO₂ 萃取微藻油进行分析与预测。同时由表 4 回归方程显著性检验可知: X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对响应值影响极显著 ($P < 0.01$); X_1X_2 影响显著 ($P < 0.05$)。说明萃取压力、萃取时间、萃取温度对微藻油的提取影响极显著,萃取压力与萃取温度交互作用影响显著。

2.2.2.3 最佳工艺条件确定与实验验证

为确定响应面最佳工艺条件,运用响应面寻优方法对回归方程进行最优解分析,得到最佳工艺参数为:萃取压力 26.04 MPa, 萃取温度 47.83 °C, 萃取时间 168.32 min。在最佳条件下,微藻油得率为 8.28%。考虑到实际可操作性,将工艺参数修正为萃取压力 26 MPa、萃取温度 48 °C、萃取时间 168 min。为检验结果的可靠性,采用修正后的工艺参数进行 3 次平行验证实验,得出微藻油的平均得率为 8.34%, 与理论预测值基本吻合。

从最后的油脂得率看,在优化的 SC-CO₂ 条件下得到的微藻油得率相对于溶剂提取法偏低,但结果与已有的部分文献报道类似。如 Cardoso 等^[16] 在萃取压力 40 MPa、温度 60 °C 时,通过 SC-CO₂ 法从聚球藻中萃取获得油脂含量分别为 0.75% (无夹带剂) 和 3.39% (5% 乙醇为夹带剂); 而 Andrich 等^[17] 研究 SC-CO₂ 萃取微绿球藻中油脂时发现在萃取温度 40 °C、时间 1.4 h, 当压力为 40 MPa 时,油脂得率为 13.5%, 压力升高到 70 MPa 时油脂得率为 22%。从文献报道结合本实验结果可以发现, SC-CO₂ 法对于微藻油的得率普遍较低,且萃取压力对得率的影响较大。

2.3 两种提取工艺的比较

2.3.1 总提取效率比较(见表 5)

表 5 两种提取方法的比较

方法	时间/h	温度/°C	油脂得率/%	EPA 含量/%
溶剂浸提法	24	25	23.74	31.34
SC-CO ₂ 萃取	2.8	48	8.34	25.66

由表 5 可知,本研究优化的有机溶剂体系可以获得较高的微藻油得率(23.74%), 高于 Bligh-Dyer 的氯仿-甲醇-水体系; 同时也高于 SC-CO₂ 优化条件下的得率 8.34%。从萃取时间来看, SC-CO₂ 萃取所用时间较短为 2.8 h, 低于溶剂浸提法。Couto 等^[7] 利用 SC-CO₂ 从隐甲藻中萃取微藻油, 并同 Bligh-Dyer 提取法作比较, 发现 SC-CO₂ 萃取微藻中油脂得率也低于溶剂浸提法, 这与本研究的结论一致。同时, 由于 SC-CO₂ 工艺需要较高的操作压力, 设备成本昂贵、能耗较高; 由于藻粉较细, 极易堵塞设备滤网, 因此在萃取前往往需要造粒, 增加了萃取的工序; 且为了提高极性脂肪酸的萃取率, 需要添加夹带剂。相比之下溶剂浸提法操作简单, 对设备要求低、投资小, 更具有有一定优势。但由于藻油产品通常被用作食品、保健品、药品等功能原料, 因此采用有机溶剂提取需要规避毒性大的溶剂, 采

取安全性相对较高的溶剂体系。

2.3.2 微藻油脂脂肪酸组成及相对含量

对两种方法提取的微藻油进行脂肪酸组成分析,结果见表6。

表6 微藻油脂脂肪酸组成及相对含量

脂肪酸	相对含量/%	
	SC-CO ₂	溶剂浸提
十四烷酸(肉豆蔻酸)	5.68	2.67
9-十六烯酸(棕榈油酸)	42.58	40.31
十六烷酸(棕榈酸)	12.84	6.32
9,12-十八碳二烯酸(亚油酸)	3.63	4.29
9-十八碳烯酸(油酸)	4.94	9.0
十八酸(硬脂酸)	1.24	1.4
5,8,11,14-二十碳四烯酸(AA)	3.43	4.66
5,8,11,14,17-二十碳五烯酸(EPA)	25.66	31.34

由表6可知,SC-CO₂萃取和溶剂提取两种方法所得微藻油中脂肪酸组成没有明显的不同,均含有肉豆蔻酸、棕榈油酸、棕榈酸、亚油酸、油酸、硬脂酸、AA、EPA,脂肪酸中PUFAs含量较高,且微藻油中脂肪酸主要以C₁₆、C₁₈为主,两者含量分别占总脂肪酸的65.23%、61.32%。溶剂提取法EPA含量为31.34%,高于SC-CO₂萃取法中EPA含量(25.66%)。

3 结论

本文比较研究了溶剂浸提法和SC-CO₂萃取法对拟微绿球藻藻油EPA的提取效果,综合考虑微藻油得率及EPA含量筛选适宜溶剂体系,并利用响应面法优化SC-CO₂萃取条件。确定了石油醚-丙酮-乙醇(体积比2:1:0.5)为优化的溶剂浸提体系,此条件下微藻油得率为23.74%,EPA含量为31.34%;SC-CO₂萃取法确定了以甲醇为夹带剂,且最佳萃取工艺参数为萃取压力26 MPa、萃取温度48℃、萃取时间168 min,此条件下的微藻油得率为8.34%,EPA含量为25.66%。考虑设备成本、能耗及工艺放大的难易程度,溶剂浸提法相比于SC-CO₂具有一定优势,但需规避毒性大的溶剂,采取安全性相对较高的溶剂体系。该研究可为微藻资源的高附加值利用及藻油EPA产品的开发提供实验参考。

参考文献:

[1] LIM C S, BACHOK Z, HII Y S. Effects of supplementary polyunsaturated fatty acids on the health of the scleractinian coral *Galaxea fascicularis* (Linnaeus, 1767) [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2017, 491: 1-8.

[2] PIEBER S, SCHÖBER S, MITTELBACH M. Pressurized fluid extraction of polyunsaturated fatty acids from the microalga *Nannochloropsis oculata* [J]. *Biomass Bioenergy*, 2012, 47(4): 474-482.

[3] GUIL - GUERRERO J L, BELARBI E H, REBOLLOSO - FUENTES M M. Eicosapentaenoic and arachidonic acids purification from the red microalga *Porphyridium cruentum* [J]. *Bioseparation*, 2000, 9(5): 299-306.

[4] 陆向红, 贾俊乾, 张秋红, 等. 响应面法优化眼点拟微绿球藻酶法提油工艺研究[J]. *中国油脂*, 2015, 40(9): 13-17.

[5] ALIEY A M, ABDULAGATOY I M. The study of microalga *Nannochloropsis salina* fatty acid composition of the extracts using different techniques. SCF vs conventional extraction [J]. *J Mol Liq*, 2016, 239: 96-100.

[6] 张荣灿, 王一兵, 柯珂, 等. 海藻多不饱和脂肪酸研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(3): 111-115.

[7] COUTO R M, SIMOES P C, REIS A, et al. Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* [J]. *Eng Life Sci*, 2010, 10(2): 158-164.

[8] 厉剑剑, 张文焕, 黄惠华. 超临界CO₂萃取小球藻精油及其抗氧化分析[J]. *现代食品科技*, 2011, 27(8): 938-941.

[9] 余桂兰, 胡哈华, 李秀波, 等. 海洋富油微拟球藻 *Nannochloropsis gaditana* CCAP849/5 的转化及外源基因整合方式[J]. *热带海洋学报*, 2014, 33(2): 72-77.

[10] 杜晓凤, 邹宁, 孙东红, 等. 微绿球藻油脂提取方法的优化[J]. *中国油脂*, 2012, 37(5): 10-12.

[11] SANTOS R R, MOREIRA D M, KUNIGAMI C N, et al. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass [J]. *Ultrason Sonochem*, 2015, 22: 95-99.

[12] HALIM R, GLADMAN B, DANQUAH M K, et al. Oil extraction from microalgae for biodiesel production [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(1): 178-185.

[13] RYCKEBOSCH E, BERMUDEZ S P C, TERMOTE - VERHALLE R, et al. Influence of extraction solvent system on the extractability of lipid components from the biomass of *Nannochloropsis gaditana* [J]. *J Appl Phycol*, 2014, 26(3): 1-10.

[14] RYCKEBOSCH E, MUYLAERT K, FOUBERT I. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2012, 89(2): 189-198.

[15] YEN H W, YANG S C, CHEN C H, et al. Supercritical fluid extraction of valuable compounds from microalgal biomass [J]. *Bioresour Technol*, 2015, 184: 291-296.

[16] CARDOSO L C, SERRANO C M, RODRIGUEZ M R, et al. Extraction of carotenoids and fatty acids from microalgae using supercritical technology [J]. *J Anal Chem*, 2012, 3(12A): 877-883.

[17] ANDRICH G, NESTI U, VENTUR F, et al. Supercritical fluid extraction of bioactive lipids from the microalga *Nannochloropsis* sp. [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2005, 107(6): 381-386.