

综合利用

响应面法优化提取文冠果壳中多酚类物质及其体外抗氧化能力分析

张雪春^{1,2}, 刘江¹, 吴鑫³, 沈文杰³, 张婷³, 张朝秀¹, 姚增玉⁴, 戚建华⁴, 王振兴^{1,3}

(1. 西南林业大学 轻工与食品工程学院, 昆明 650224; 2. 西南林业大学 云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 昆明 650224; 3. 江西师范大学 生命科学学院, 南昌 330022; 4. 西南林业大学 西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室, 昆明 650224)

摘要:采用超声波辅助提取文冠果壳多酚,以多酚得率为指标,在单因素实验基础上,采用 Box - Behnken 中心组合实验优化文冠果壳多酚的提取条件;以 DPPH 自由基清除能力、ABTS⁺ 自由基清除能力、铁还原能力为指标,考察文冠果壳多酚提取物的体外抗氧化能力。结果表明:超声波辅助提取文冠果壳多酚的最佳条件为料液比 1:20、超声时间 26.4 min、提取温度 47℃、超声波功率 250 W,在最佳条件下文冠果壳多酚得率为 5.64%;文冠果壳多酚提取物有较强的体外抗氧化能力,其清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 值为 13.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$,清除 ABTS⁺ 自由基的 IC_{50} 值为 23.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$,铁还原能力为 6.4 mg FeSO₄/mg DW,可开发为天然抗氧化剂。

关键词:文冠果壳;多酚;体外抗氧化;超声波

中图分类号:TS229;ST201.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)05-0117-06

Response surface methodology optimizing extraction and in vitro antioxidant activity of *Xanthoceras sorbifolia* polyphenols

ZHANG Xuechun^{1,2}, LIU Jiang¹, WU Xin³, SHEN Wenjie³, ZHANG Ting³, ZHANG Chaoxiu¹, YAO Zengyu⁴, QI Jianhua⁴, WANG Zhenxing^{1,3}

(1. College of Light Industry and Food Science, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 3. College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China; 4. Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: In order to optimize the ultrasound - assisted extraction process of *Xanthoceras sorbifolia* polyphenols, based on single factor experiment, Box - Behnken experimental design and response surface methodology were employed with polyphenols yield as response value. The in vitro antioxidant activity of *Xanthoceras sorbifolia* polyphenols (XSSC) was evaluated by DPPH free radical scavenging capacity, ABTS⁺ free radical scavenging capacity and ferric reducing ability. The results showed that the optimal

收稿日期:2018-01-05;修回日期:2018-02-07

基金项目:云南省教育厅科学研究基金资助性项目(2016ZZX150);云南省农业基础研究联合专项青年项目(2017FG001(-078));江西省产学研合作项目(KJLD13019);江西师范大学研究生创新基金项目(JYS2016006)

作者简介:张雪春(1981),女,讲师,硕士生导师,研究方向为农林资源加工利用(E-mail)xuechun_zhang@163.com。

通信作者:王振兴,助理研究员(E-mail)wangzhenxingfood@163.com。

extraction conditions were determined as follows: material - to - liquid ratio 1:20, ultrasonic time 26.4 min, extraction temperature 47℃, ultrasonic power 250 W. Under these conditions, the polyphenols yield was 5.64%. XSSC had excellent in vitro antioxidant activity, the IC_{50} values of DPPH free radical scavenging capacity and ABTS⁺ free radical scavenging capacity of XSSC were 13.36, 23.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively, and the

ferric reducing ability was 6.4 mg/mg. It had the potential to be explored as a nature antioxidant.

Key words: *Xanthoceras sorbifolia* seed coat; polyphenols; in vitro antioxidant activity; ultrasound

文冠果 (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge) 是我国特有珍稀木本油料植物, 为无患子科文冠果属植物, 且单属单种, 在我国北方均有分布, 其枝、叶、树干、果实均可入药, 具有较高的食用、药用、水土保持、木材加工和景观绿化价值^[1-2]。文冠果果壳 (*Xanthoceras sorbifolia* Seed Coat, XSSC) 是文冠果种子的外壳, 约占种子质量的 50%、全果质量的 27%。作为文冠果加工的主要废弃物, 文冠果果壳常被丢弃或焚烧, 造成资源浪费和环境污染, 其价值尚未得到开发利用。

文冠果果壳中含有三萜、多酚 (包括黄酮、酚酸、香豆素等)、甾醇、生物碱等多种化学成分, 具有改善学习记忆、抗癌、抗艾滋病、抑制酪氨酸酶、治疗心脑血管疾病、抗氧化、抗炎和抑制胰脂肪酶活性等作用^[3]。王颖^[4]、Rashm^[5]等分别从文冠果果壳中分离得到 8 个已知酚类化合物和 3 种黄酮类化合物。张严磊等^[6]发现 0.2 mg/mL 文冠果壳提取物对 DPPH 自由基清除率可达 70.82%, 且具有较强的抑制 HepG₂ 细胞能力。毛迪锐等^[7]采用超声波辅助提取文冠果壳总黄酮, 发现其具有较强的还原能力和 DPPH 自由基清除能力, 对羟自由基的清除能力相对较弱。Yang 等^[8]从文冠果果壳中分离得到 37 个酚类组分, 并发现其呈现出较强的抗肿瘤活性和 ABTS⁺ 自由基清除能力。目前的研究主要集中在对文冠果果壳化学成分的分离鉴定和生物活性的评价, 对于其多酚类物质提取优化和抗氧化能力研究较少。因此, 本文研究超声波辅助提取文冠果壳多酚的最优工艺条件, 并通过体外实验评价其抗氧化能力, 以期对文冠果资源的综合利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

文冠果: 采自云南楚雄大姚县, 经西南林业大学戚建华老师鉴定为文冠果 (*Xanthoceras sorbifolia* Husks), 晒干后取壳备用; 1, 1-二苯基-2, 2-三硝基苯肼 (DPPH)、2, 2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) (ABTS)、三吡啶三吡嗪 (TPTZ)、抗坏血酸 (V_C)、2, 6-二叔丁基-4-甲基苯酚 (BHT)、槲皮素 (Quercetin, Qc)、没食子酸、Folin-Ciocalteu 等试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

BT244S 型电子天平, HH-2 型数显恒温水浴锅, SG5200HDT 型超声波清洗器, DGH-9140A 数显电热鼓风干燥箱, SHB-III 循环水式多用真空泵, RE-52 系列旋转蒸发器, SYNERGY HI 多功能酶标仪 (美国 BIOTEK 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 文冠果壳多酚的提取

文冠果壳→粉碎过 40 目筛→加入一定比例体积分数为 70% 的甲醇溶液→超声波辅助提取→抽滤→二次提取→合并滤液→50℃ 旋干→文冠果壳多酚提取物。

1.2.2 多酚得率的测定

采用 Folin-Ciocalteu 法^[9]测定, 以没食子酸为标准物绘制标准曲线, 以克没食子酸当量每毫升提取液 (g GAE/mL) 表示文冠果壳提取物中总酚含量, 按下式计算多酚得率。

$$\text{多酚得率} = \frac{V \times C \times N}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中: V 为提取液体积, mL; C 为提取液中总酚含量, g GAE/mL; N 为稀释倍数; m 为样品质量, g。

1.2.3 文冠果壳多酚提取物 DPPH 自由基清除能力的测定

参考文献^[10], 采用酶标仪在 517 nm 处测定样品吸光度值 (A_s), 以样品溶剂代替样品的反应为空白 (A_c), 用样品溶剂代替 DPPH 溶液的反应为样品空白 (A_b), 同时以 V_C、BHT、槲皮素为阳性对照, DPPH 自由基清除率按式 (2) 计算。

$$\text{清除率} = \frac{(A_c - A_b) - (A_s - A_b)}{A_c - A_b} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.4 文冠果壳多酚提取物 ATBS⁺ 自由基清除能力的测定

参考文献^[9], 以 V_C、BHT 和槲皮素为阳性对照, 清除率计算同式 (2)。

1.2.5 文冠果壳多酚提取物铁还原能力的测定

参考 Escribano 等^[11]方法, 以 FeSO₄ 为标准物绘制标准曲线, 样品的铁还原能力 (FRAP) 用毫克 FeSO₄ 当量每毫克提取物表示 (mg FeSO₄/mg DW), 同时以 V_C、BHT 和槲皮素为阳性对照。

1.2.6 数据分析

所有实验平行测定3次,实验结果以“平均值±标准偏差”表示。采用SPSS 22.0软件进行单因素方差分析(ANOVA),采用Design Expert 8.05b软件进行响应面实验设计和数据分析,采用Origin 2016软件进行曲线拟合计算 IC_{50} 。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 料液比对多酚得率的影响

在提取温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、超声时间 30 min 、超声波功率 250 W 条件下,考察料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30)对多酚得率的影响,结果见图1。

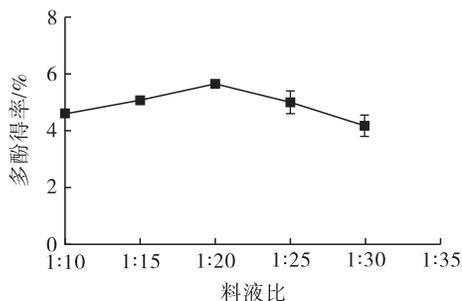


图1 料液比对多酚得率的影响

由图1可知,文冠果壳多酚得率随料液比的增大而呈现先上升后下降趋势,当料液比为1:20时,多酚得率最高,达 5.56% ,这和郭婕等^[12]的报道一致,主要是因为增大溶剂用量,有利于多酚物质由原料向溶剂扩散,增加其得率,但溶剂用量过大,半纤维素等其他成分的溶出量增多,影响多酚物质的提取,导致得率下降,且回收溶剂处理的时间更长,酚类物质更容易降解。

2.1.2 超声时间对多酚得率的影响

在料液比1:20、提取温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、超声波功率 250 W 条件下,考察超声时间(10、20、30、40、50 min)对多酚得率的影响,结果见图2。

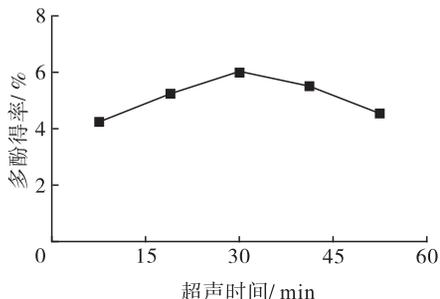


图2 超声时间对多酚得率的影响

由图2可知,多酚得率随超声时间的延长而呈现先上升后下降趋势,当超声时间为 40 min 时达到最高 5.48% ,这是由于超声波引起的“空化效应”,有助于酚类物质的渗透。但超声时间过长,可能会破坏多酚的结构,导致多酚得率下降。

2.1.3 提取温度对多酚得率的影响

在料液比1:20、超声时间 30 min 、超声波功率 250 W 条件下,考察提取温度(30、40、50、60、 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$)对多酚得率的影响,结果见图3。

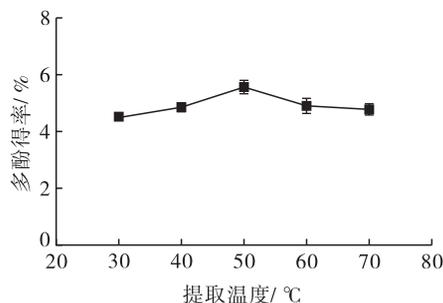


图3 提取温度对多酚得率的影响

由图3可知,随着提取温度的升高,多酚得率先增大后减小的趋势,在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时达到最大值 5.56% 。这可能是因为温度的适当升高可使多酚溶出率提高,而过高温则破坏多酚的结构,使提取溶剂甲醇挥发,导致多酚得率下降^[13]。

2.1.4 超声波功率对多酚得率的影响

在料液比1:20、超声时间 30 min 、提取温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,考察超声波功率(150、200、250、300、 350 W)对多酚得率的影响,结果见图4。

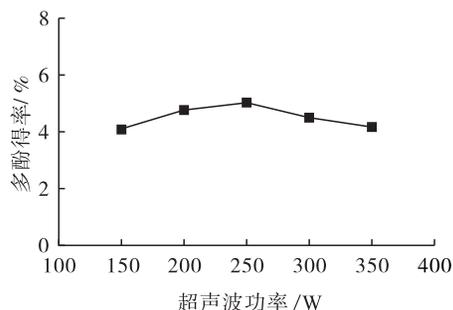


图4 超声波功率对多酚得率的影响

由图4可知,当超声波功率为 250 W 时,多酚得率达到最高,为 5.03% ,之后随着超声波功率的增大,多酚得率呈下降趋势。原因是增大功率,“空化效应”增强,同时使得提取液的温度不断上升,使酚类物质渗透速率加快,但超声波功率过大,提取液的温度过高,使酚类物质结构遭到破坏,导致多酚得率下降。

2.2 响应面实验

2.2.1 响应面实验设计及结果

根据单因素实验结果,选择料液比、超声时间、提取温度和超声波功率为因素,以多酚得率(Y)为响应值,设计四因素三水平响应面进行优化试验,响应面因素水平和响应面实验设计及结果分别见表1、表2。

表1 响应面因素水平

水平	A 料液比	B 超声时间/ min	C 提取温度/ ℃	D 超声波 功率/W
1	1:15	20	40	200
0	1:20	30	50	250
-1	1:25	40	60	300

表2 响应面实验设计及结果

实验号	A	B	C	D	Y/%
1	-1	-1	0	0	4.85
2	-1	0	0	1	4.57
3	-1	0	1	0	4.84
4	0	0	1	-1	4.23
5	1	0	-1	0	5.12
6	0	1	0	-1	5.03
7	0	0	1	1	4.58
8	0	-1	-1	0	5.45
9	0	0	0	0	5.62
10	0	0	0	0	5.60
11	-1	0	-1	0	4.82
12	0	1	1	0	5.06
13	0	0	0	0	5.62
14	0	1	-1	0	4.56
15	-1	1	0	0	4.60
16	1	-1	0	0	4.80
17	0	-1	0	-1	4.07
18	0	0	-1	1	4.35
19	0	0	-1	-1	5.07
20	0	1	0	1	3.62
21	1	0	1	0	4.58
22	-1	0	0	-1	4.18
23	1	0	0	-1	4.66
24	1	0	0	1	3.93
25	0	0	0	0	5.64
26	0	-1	1	0	4.54
27	1	1	0	0	4.57
28	0	-1	0	1	5.24
29	0	0	0	0	5.66

2.2.2 响应面实验结果分析及回归方程

通过 Design Expert 8.05b 软件对表 2 中实验结果进行响应面回归分析,得到该实验的回归模型方程: $Y = 5.63 - 0.017A - 0.13B - 0.13C - 0.079D + 4.425E - 05AB - 0.14AC - 0.28AD + 0.35BC - 0.64BD + 0.27CD - 0.51A^2 - 0.4B^2 - 0.3C^2 - 0.76D^2$ 。模型系数显著性和方差分析结果见表 3。

根据表 3 结果,对方程进行优化,剔除不显著项 A、AB,优化后的方程为: $Y = 5.63 - 0.13B - 0.13C - 0.079D - 0.14AC - 0.28AD + 0.35BC - 0.64BD + 0.27CD - 0.51A^2 - 0.4B^2 - 0.3C^2 - 0.76D^2$ 。由表 3

可知,此模型极显著($P < 0.0001$), $R^2 = 0.9958$,表明该方程能较好地反映各因素与响应值的关系并预测最佳条件,失拟项不显著,表明模型拟合程度较好,可用此模型对超声辅助提取文冠果壳多酚类物质进行分析和预测。

表3 模型系数显著性和方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	8.278	14	0.591	235.932	<0.0001**
A	0.004	1	0.004	1.418	0.2535
B	0.190	1	0.190	75.661	<0.0001**
C	0.195	1	0.195	77.972	<0.0001**
D	0.075	1	0.075	29.731	<0.0001**
AB	7.83E-05	1	7.83E-05	0.031	0.8622
AC	0.077	1	0.077	30.922	<0.0001**
AD	0.308	1	0.308	122.983	<0.0001**
BC	0.497	1	0.497	198.465	<0.0001**
BD	1.660	1	1.660	662.197	<0.0001**
CD	0.287	1	0.287	114.398	<0.0001**
A ²	1.703	1	1.703	679.665	<0.0001**
B ²	1.060	1	1.060	423.001	<0.0001**
C ²	0.588	1	0.588	234.762	<0.0001**
D ²	3.756	1	3.756	1498.670	<0.0001**
残差	0.035	14	0.003		
失拟项	0.033	10	0.003	5.409	0.059
纯误差	0.002	4	0.000		
总和	8.313	28			

注:模型 $R^2 = 0.9958$, $R_{Adj}^2 = 0.9916$, * 代表显著 ($P < 0.05$), ** 代表极显著 ($P < 0.001$)。

除料液比和超声时间的交互作用影响不显著外,其他因素的交互作用影响均为极显著,各因素二次项的影响也为极显著,各因素对多酚得率的影响次序为:提取温度 > 超声时间 > 超声波功率 > 料液比。

2.2.3 最优条件的验证

对回归方程求导,可得到当料液比 1:19.49、超声时间 26.42 min、提取温度 46.42℃、超声波功率 248.92 W 时,多酚得率最高,其理论值为 5.66%。对该优化条件进行验证实验,为方便操作,选取料液比 1:20、超声时间 26.4 min、提取温度 47℃、超声波功率 250 W,实验平行 3 次,在该条件下文冠果壳多酚得率为 5.64%,接近理论值,证明该模型可行,且该得率显著高于李媛等^[14]采用回流法提取文冠果壳多酚得率 2.14%。

2.3 文冠果壳多酚提取物体外抗氧化能力

2.3.1 DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基是一种以氮为中心的稳定自由基,常用于反映样品抗氧化能力强弱^[10]。图 5 为文

冠果壳多酚(XSSC)与对照对DPPH自由基的清除能力。由图5可知,文冠果壳多酚提取物具有较强的DPPH自由基清除能力,且清除能力随着样品质量浓度的增大而增强。文冠果壳多酚提取物对

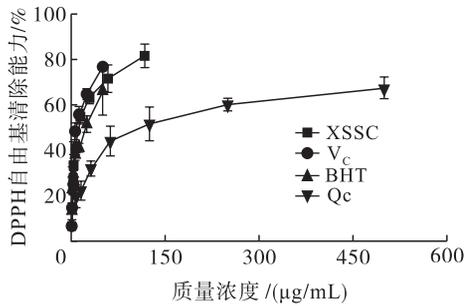


图5 文冠果壳多酚与对照对DPPH自由基的清除能力

2.3.2 ATBS⁺自由基清除能力

ABTS法是使用最广泛的抗氧化能力间接检测方法,可用于亲水性和亲脂性物质抗氧化能力测定。ABTS溶液可释放稳定的有机自由基,样品中的还原性物质可提供电子,与该有机自由基反应,通过测定反应体系吸光度的变化,来反映样品抗氧化能力的大小。图6为文冠果壳多酚与对照对ABTS⁺自

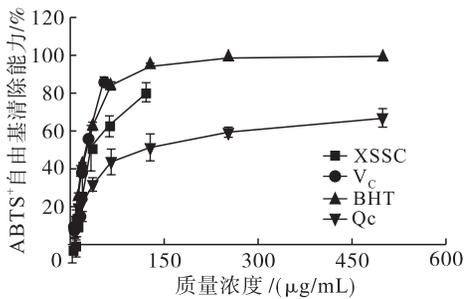


图6 文冠果壳多酚与对照对ABTS⁺自由基的清除能力

2.3.3 铁还原能力(见图7)

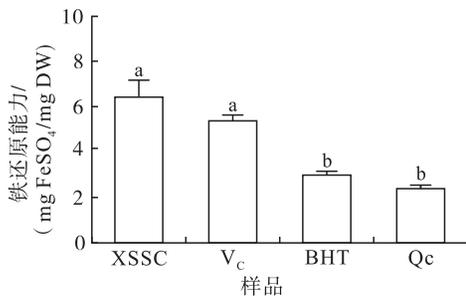
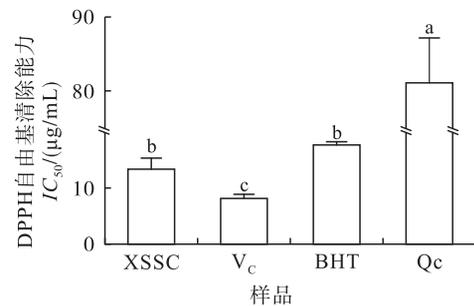


图7 文冠果壳多酚与对照的FRAP能力

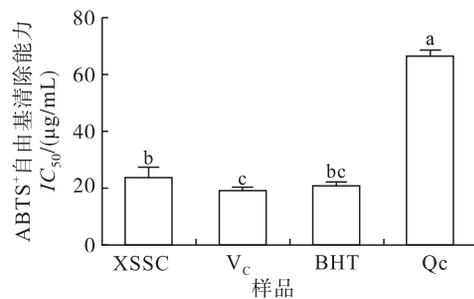
铁还原能力又称总抗氧化能力,代表了体系内所有具有抗氧化能力的因子总水平,其原理是在酸性条件下,样品中的还原性物质可将TPTZ中的Fe³⁺还原为Fe²⁺,随后在593 nm处测定蓝色的Fe²⁺,结果记为FRAP值,以FeSO₄为标准物质,FRAP值越大,表明该样品的铁还原能力越强^[15]。

由图7可知,文冠果壳多酚提取物FRAP值为6.4

DPPH自由基清除的IC₅₀为13.36 μg/mL,高于V_c(8.13 μg/mL),低于BHT(17.7 μg/mL),显著低于槲皮素(81.1 μg/mL)。



由基的清除能力。由图6可知,随着文冠果壳多酚提取物质量浓度的增大,其对ABTS⁺自由基的清除能力不断增强,在质量浓度为29.25 μg/mL时清除率达到58.37%。文冠果壳多酚清除ABTS⁺自由基的IC₅₀为23.7 μg/mL,略高于V_c(19.15 μg/mL)和BHT(20.81 μg/mL),但显著低于槲皮素(66.47 μg/mL)。



mg FeSO₄/mg DW,高于V_c(5.37 mg FeSO₄/mg DW)、BHT(3.0 mg FeSO₄/mg DW)和槲皮素(2.39 mg FeSO₄/mg DW)。说明文冠果壳多酚具有很强的铁还原能力。

3 结论

通过单因素实验和响应面实验确定文冠果壳多酚的最佳提取条件为料液比1:20、超声时间26.4 min、提取温度47℃、超声波功率250 W,该条件下文冠果壳多酚得率为5.64%。通过响应面建立的模型合理可靠,可用于文冠果壳多酚提取的实际预测。体外抗氧化实验表明,文冠果壳多酚具有较强的体外抗氧化能力,其对DPPH自由基、ATBS⁺自由基的清除能力接近或者超过常用的商业化抗氧化剂V_c和BHT,显著高于槲皮素,其铁还原能力高于V_c、BHT和槲皮素,文冠果壳可作为天然抗氧化剂的原料进行开发。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 文冠果[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 72.
- [2] 戚建华, 姚增玉. 生物柴油原料树种文冠果的化学成分与综合利用研究进展[J]. 林产化学与工业, 2012, 32(2): 47-54.
- [3] 杨春艳, 杨军丽, 哈伟, 等. 文冠果果壳化学成分与生物活性研究进展[J]. 中草药, 2016, 17(8): 1418-1424.
- [4] 王颖, 潘英, 邢亚超, 等. 文冠果种皮化学成分的分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志, 2013, 23(5): 397-399.
- [5] RASHM I, NAGATSU A. New flavonoids from seed skin of *Xanthoceras sorbifolia* [J]. Med Plants Res, 2011, 5(6): 1034-1036.
- [6] 张严磊, 肖鸿飞, 施欢贤, 等. 文冠果壳抗氧化活性及抑制人 HepG₂ 细胞增殖活性部位筛选[J]. 中国现代中药, 2017, 19(11): 1572-1574.
- [7] 毛迪锐, 姜贵全, 张卓睿, 等. 超声波辅助提取文冠果壳总黄酮的工艺及其抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(19): 237-242.
- [8] YANG C Y, HA W, LIN Y, et al. Polyphenols isolated from *Xanthoceras sorbifolia* husks and their anti-tumor and radical-scavenging activities [J]. Molecules, 2016, 21(12): 1694.
- [9] XIE X, TU Z C, ZHANG L, et al. Antioxidant activity, α -glucosidase inhibition, and phytochemical fingerprints of *Anoectochilus roxburghii* formula tea residues with HPLC-QTOF-MS/MS [J]. J Food Biochem, 2017, 41(6): e12402.
- [10] 王笑晴. 基于 DPPH 自由基清除能力的姜黄提取物抗氧化活性评价 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 360-363.
- [11] ESCRIBANO J, CABANES J, JIMÉNEZ - ATIÉNZAR M, et al. Characterization of betalains, saponins and antioxidant power in differently colored quinoa (*Chenopodium quinoa*) varieties [J]. Food Chem, 2017, 234: 285-294.
- [12] 郭婕, 崔桂友. 加拿大一枝黄花总酚超声提取工艺 [J]. 光谱实验室, 2010, 27(1): 335-339.
- [13] 陈晨, 胡文忠, 田沛源, 等. 超声辅助提取香蕉皮多酚工艺优化及其抗氧化性的分析 [J]. 食品科学, 2014, 35(2): 12-17.
- [14] 李媛, 施欢贤. 文冠果壳总多酚的含量测定 [J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(16): 13-14.
- [15] BENZIE I F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay [J]. Anal Biochem, 1996, 239(1): 70-76.

(上接第 112 页)

3 结论

利用流式细胞仪筛选高含油若夫小球藻 (*Chlorella zofingensis*)。通过紫外线对小球藻进行诱变, 对诱变 40 min 藻株进行流式细胞仪分选, 最终筛选到 1 株藻株 S16, 柱式反应器培养 15 d 后总脂产量为 2.4 g/L, 比野生对照株提高了 50%。

参考文献:

- [1] KOSARIC N, VELIKONJA J. Liquid and gaseous fuels from biotechnology: challenge and opportunities [J]. Fems Microbiol Rev, 1995(16): 111-142.
- [2] 刘长斌, 佟少明, 侯和胜. 利用叶绿素荧光快速筛选紫外诱变高含油小球藻 [J]. 激光生物学报, 2016, 26(2): 126-131.
- [3] 刘婷婷, 王涛, 杨翼, 等. 低场核磁共振技术快速检测小球藻油脂含量及其在高通量选育中的应用 [J]. 生物工程学报, 2016, 32(3): 385-396.
- [4] HYKA P, LICKOVA S, PRIBYL P, et al. Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae [J]. Biotech Adv, 2013, 31(1): 2-16.
- [5] DOAN T T Y, OBBARD J P. Enhanced lipid production in *Nannochloropsis* sp. using fluorescence-activated cell sorting [J]. GCB Bioenergy, 2011, 3: 264-270.
- [6] 陈涵, 李小妹, 蔡钊, 等. 诱变结合流式细胞仪筛选栅藻高产油脂藻株 [J]. 中国油脂, 2016, 41(5): 65-68.
- [7] 杨鹭生, 李国平, 陈林水. 蛋白核小球藻粉的蛋白质、氨基酸含量及营养评价 [J]. 亚热带植物学, 2003, 32(1): 36-38.
- [8] LIU J, HUANG J C, SUN Z, et al. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingensis*: assessment of algal oils for biodiesel production [J]. Bioresour Technol, 2011, 102(1): 106-110.
- [9] 孟振, 张学成, 时艳侠. 光照与温度对紫外筛选盐生杜氏藻藻株的生长及色素积累的影响 [J]. 海洋科学, 2008, 32(7): 20-29.
- [10] 胡小文, 马帅, 付莉莉, 等. 紫外诱变热带微藻选育高油脂藻株 [J]. 热带农业科学, 2011, 31(7): 25-28.
- [11] DEMETS R, TOMSON A M, RAN E T H, et al. Synchronization of the cell division cycle of *Chlamydomonas eugametos* [J]. J General Microbiol, 1985, 131: 2919-2924.
- [12] KHOZIN - GOLDBERG I, SHRESTHA P, COHEN Z. Mobilization of arachidonyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incise* [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2005, 1738(1/2/3): 63-71.