文章编号: 1673-1689(2011)03-0427-08

响应面法优化超声-微波协同萃取蓝藻中叶绿素 a 工艺研究

尹 腾[1], 陶文沂*[1], 缪恒锋[2], 史强[1]
(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 环境与土木工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 为了探索蓝藻叶绿素 a 的最佳萃取工艺参数, 在单因素试验基础上, 选取乙醇体积分数、萃取时间以及液固体积质量比为自变量, 叶绿素 a 萃取得率为响应值, 采用中心组合设计的方法, 研究各自变量及其交互作用对响应值叶绿素 a 萃取率的影响。利用响应面分析方法, 模拟得到了 2 次多项式回归方程的预测模型, 并确定叶绿素 a 萃取工艺的最佳参数: 乙醇体积分数 86%、时间 133 s、液固体积质量比 16∶1(mL∶g), 在开启超声波、微波功率 250 w、萃取两次的条件下, 叶绿素 a 萃取率达到(2.686±0.013) mg/g。

关键词: 蓝藻; 叶绿素 a; 超声-微波协同萃取; 响应面法
中图分类号: TS 202.3 文献标识码: A

Optimization of Ultrasonie-Microwave Coordinative Extraction of Chlorophyll a from Blue Algae by Response Surface Methodology

YIN Teng[1], TAO Wen-yi*[1], MIAO Heng-feng[2], SHI Qiang[1]
(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Environment and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122 China)

Abstract: On the basis of the results of single factor experiments, the ethanol concentration, extraction time and the ratio of liquid volume to solid mass were selected as independent variables to optimize the extraction process parameters for chlorophyll-a from blue algae. by using central composite design and response surface analysis. the optimum conditions were achieved and listed as follows: 86% ethanol, extraction time 133 s and volume of liquid to solid mass ratio 16∶1 (mL/g), microwave power 250 w. Under the optimum conditions, the extraction yield of chlorophyll-a achieved at (2.686±0.013) mg/g.

Key words: blue algae, chlorophylla, ultrasonie-microwave extraction, response surface methodology

---

收稿日期: 2010-05-02
基金项目: 国家"十一五"科技支撑计划项目(2009BAC52B03); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(JUSRP20906)。
* 通信作者: 陶文沂(1946-), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物发酵工程研究。
Email: wytao1946@163.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

蓝藻(*Cyanobacteria*)俗称蓝细菌(Blue algae)、蓝绿藻(blue-green algae),是最简单、最原始的一类革兰氏阴性原核生物,能进行光合作用,富含有数种类胡萝卜素、叶黄素以及叶绿素a(Chl-a),但无叶绿素b。太湖中蓝藻主要由微囊藻(*Microcystis*)组成,其中,铜绿微囊藻(*Microcystis. aeruginosa*)约占90%,是太湖水源有毒害二次污染的主要物种,还有少量水华微囊藻(*Microcystis. flosaquae*)以及螺旋鱼腥藻(*Anabeana spirodes*)等[1]。叶绿素是绿色植物或者藻类进行光合作用的主要色素[2],其分子中的卟啉环结构与人体血红素结构类似,具有活化细胞、抗贫血、抗菌消炎、抗衰老以及护肝等功效,因此可广泛应用于食品、化妆品、医药等领域[3]。

叶绿素的提取主要以蚕沙、桑叶等为原料,采用有机溶剂提取法[4]、超声辅助萃取法[5-6]、微波辅助萃取法[7]、超临界CO_2萃取法[8-9]等。有机溶剂提取法存在溶剂消耗量大,提取时间长、提取率低等缺点;超临界CO_2萃取法对于脂溶性物质提取较好而对叶绿素提取效果不理想[10-11]。微波萃取技术具有设备简单、适用范围广、萃取效率高、重现性好、节省时间、节省试剂、污染小、重现性好等特点[12],再加上超声波的次级效应如机械振动、乳化、扩散、击碎法、化学效应等也能加速细胞内有效成分的扩散释放并使其充分与溶剂混合,可以提高萃取效率[13]。本实验采用超声-微波波萃取技术(Ultrasonic-Microwave Coordinative Extraction, U-MCE),通过响应面设计研究相关因素对叶绿素a萃取率的影响,旨在资源化利用太湖中有严重毒害作用的物种蓝藻,建立超声-微波协同萃取叶绿素a技术提供科学的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

蓝藻:取自太湖无锡段德林海公司脱水后的新鲜蓝藻;甲醇、二甲亚砜、无水乙醇、体积分数95%乙醇、丙酮、乙酸乙酯、正己烷、石油醚、盐酸等均为分析纯。

CW-2000型超声-微波协同萃取仪:上海新托微波溶样测试技术有限公司产品;高效粉粹机:上海淀久中药机械制造有限公司产品;TGL-20M高速冷冻离心机:上海卢湘仪离心机有限公司产品;752型紫外可见光光度计:上海光谱仪器有限公司产品;DHG-9070A型电热恒温鼓风干燥箱:上海精宏实验设备有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 叶绿素a超声-微波协同萃取工艺 将收集的蓝藻晒干,粉碎过60目筛。准确称取1.00 g干蓝藻粉及量取一定量的萃取剂装于萃取瓶中,设定萃取时间、功率、温度及开启超声系统和水循环进行萃取。

1.2.2 叶绿素a萃取率的测定 萃取完成后,将萃取液离心取上清液用95%乙醇定容,752型分光光度计于波长665 nm和750 nm处测吸光值,然后加入几滴1 mol/L盐酸酸化,于波长665 nm和750 nm处再次测吸光值,按下式计算叶绿素a含量[14]:

$$Ca_{乙醇} = 27.9 \times [(A_{665} - A_{750}) - (A_{665} - A_{750})] \times V_{乙醇}/m_{蓝藻}$$

式中:$Ca_{乙醇}$为乙醇法测定的叶绿素a质量分数(μg/g);A_{665}、A_{750}分别为乙醇萃取液于波长665 nm和750 nm的吸光值;A_{665}、A_{750}分别为乙醇萃取液酸化后于波长665 nm和750 nm的吸光值;$V_{乙醇}$为乙醇萃取液的体积(mL);$m_{蓝藻}$为干蓝藻粉的质量(g)。

1.2.3 单因素试验 以60目干蓝藻粉为试验材料,分别以萃取溶剂及乙醇体积分数、萃取时间、微波功率、液固体积质量比和萃取次数做单因素试验,重复3次。

1.2.4 响应面法优化实验 在单因素实验的基础上,以乙醇体积分数、萃取时间和液固体积质量比因素作为考察对象,以叶绿素萃取率为响应值,采用Design Expert 7.0.0统计分析软件的响应面法安排实验,以获取最优化工艺参数。

2 结果与讨论

2.1 超声-微波协同萃取叶绿素a单因素试验

2.1.1 萃取剂对叶绿素a萃取率的影响 准确称取1.00 g干蓝藻粉若干份,分别加入甲醇、二甲亚砜、无水乙醇、体积分数95%乙醇、丙酮、乙酸乙酯、正己烷、石油醚20 mL,开启超声系统,设定微波功率200 w,萃取时间120 s,萃取1次,考察不同萃取剂对叶绿素a萃取率的影响,结果见图1。

萃取溶剂,选择的重要依据在于将目标成分尽可能地萃取出来,依据叶绿素a萃取得率以及溶剂有无毒性来确定最合适的萃取溶剂。由图1可看出,选择不同极性的溶剂进行萃取时,溶剂极性越大叶绿素a的萃取得率越大。叶绿素a虽然是脂溶性物质但带有两个极性基团,因此具有一定极性,易溶于极性大的溶剂。而且微波具有选择性加热,介电常数越小的极性溶剂越容易被加热,能更好地

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

吸收微波, 提高溶剂的活性, 另外超声波的次级效应也能加速细胞内有效成分的扩散释放并使其充分与溶剂混合, 便于萃取。从图 1 中可以看出甲醇和体积分数 95% 乙醇对叶绿素 a 的萃取得率相差不大, 由于乙醇无毒性, 因此选择乙醇为最佳萃取溶剂。

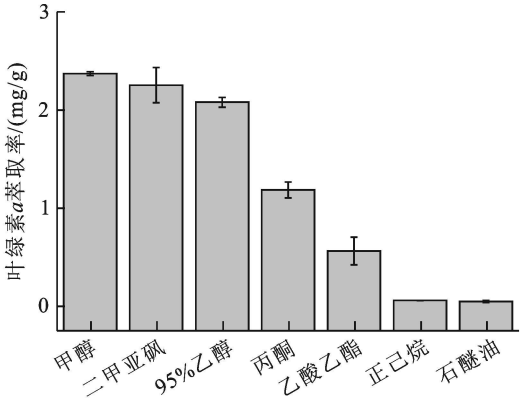


图 1　萃取溶剂对叶绿素 a 萃取率的影响

Fig. 1　Effect of extraction solvent on extraction yield of Chl-a

2.1.2　乙醇体积分数对叶绿素 a 萃取率的影响　准确称取 1.00 g 干蓝藻粉若干份, 分别加入不同体积分数的乙醇水溶液 20 mL, 开启超声系统, 设定微波功率 200 w, 萃取时间 120 s, 萃取 1 次, 考察乙醇浓度对叶绿素 a 萃取率的影响, 结果见图 2。

由图 2 可看出, 随着乙醇体积分数的增加, 叶绿素萃取率逐渐升高, 当达到 90 % 时, 叶绿素 a 萃取得率达到最大; 再增加乙醇体积分数, 叶绿素 a 萃取得率开始下降。这是由于在乙醇中加入少量的水时增加了溶剂的极性, 有利于微波加热提高溶剂活性, 从而提高萃取得率; 当乙醇中含水量增大时, 虽然溶剂活性提高了但是脂溶性叶绿素 a 在水中的溶解性较差, 从而导致萃取率下降。故选择体积分数 90% 的乙醇为最佳萃取溶剂。

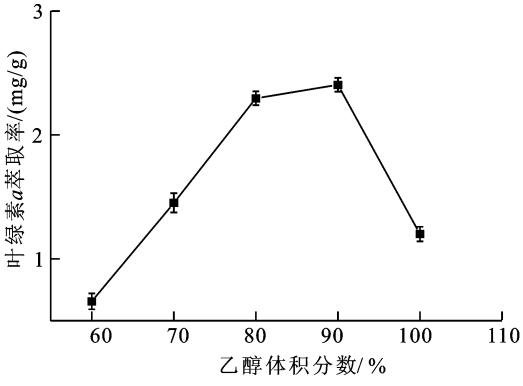


图 2　乙醇体积分数对叶绿素 a 萃取率的影响

Fig. 2　Effect of ethanol concentration on extraction yield of Chl-a

2.1.3　萃取时间对叶绿素 a 萃取率的影响　准确称取 1.00 g 干蓝藻粉若干份, 分别加入体积分数 90% 乙醇水溶液 15 mL, 开启超声系统, 设定微波功率 200 w, 萃取 1 次, 考察不同时间对叶绿素 a 萃取率的影响, 结果见图 3。

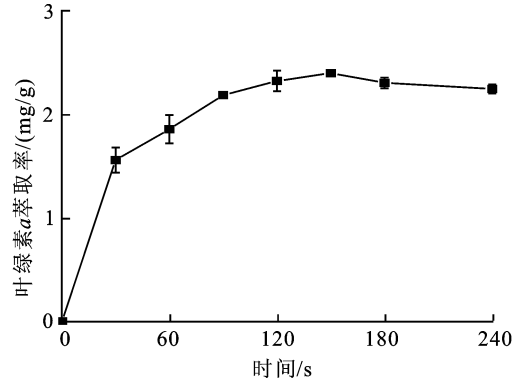


图 3　萃取时间对叶绿素 a 萃取率的影响

Fig. 3　Effect of extraction time on extraction yield of Chl-a

从图 3 可以看出, 随着超声-微波时间的增加, 叶绿素 a 的萃取得率逐渐升高, 当达到 150 s 时, 叶绿素 a 萃取得率达到最大, 再延长萃取时间叶绿素 a 有所下降, 萃取时间过长叶绿素 a 热降解或衍生化可能是导致萃取率下降的原因。

2.1.4　萃取功率对叶绿素 a 萃取率的影响　准确称取 1.00 g 干蓝藻粉若干份, 分别加入体积分数 90% 乙醇水溶液 15 mL, 开启超声系统, 设定萃取时间 150 s, 萃取 1 次, 考察不同功率对叶绿素 a 萃取率的影响, 结果见图 4。

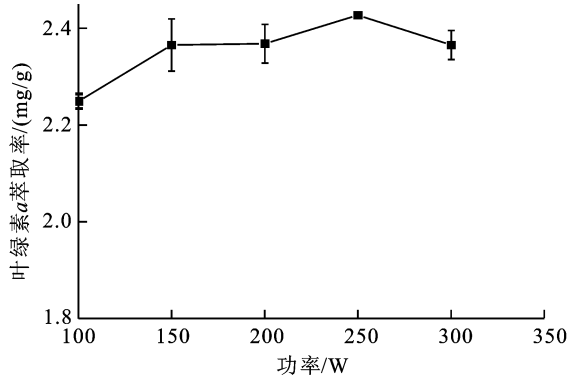


图 4　微波功率对叶绿素 a 萃取率的影响

Fig. 4　Effect of microwave power on extraction yield of Chl-a

由图 4 可知, 微波功率对叶绿素 a 的萃取率影响不显著, 随着微波功率的增加, 由于超声波次级作用, 加速细胞内有效成分的扩散释放并使其充分与溶剂混合, 叶绿素 a 的萃取率有一定提高, 但提高幅度不明显, 再加上微波作用使物质均匀受热, 两者的协同作用使得单独改变微波功率时, 对叶绿素 a 的萃取影响不明显; 当功率达到 250 W 时, 叶绿素

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

a的萃取率达到最大,再增大功率叶绿素a的萃取率反而下降,这与过高的微波功率可能破坏叶绿素a的结构有关,从而使得萃取物中叶绿素a的含量降低,因此选择微波功率在250 W左右较好。

2.1.5 液固体积质量比对叶绿素a萃取率的影响 准确称取1.00 g干藻粉若干份,分别加入不同体积分数90%乙醇水溶液,开启超声系统,设定微波功率250 W,萃取时间150 s,萃取1次,考察不同液固体积质量比对叶绿素a萃取率的影响,结果见图5。

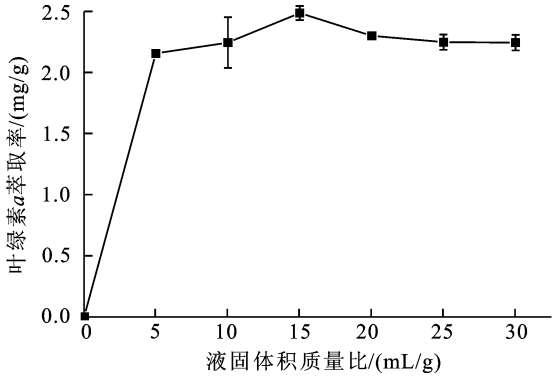


图5 液固体积质量比对叶绿素a萃取率的影响

Fig.5 Effect of volume of liquid to solid mass ratio on extraction yield of Chl-a

由图5可知,随着液固体积质量比增加叶绿素a质量分数也逐渐增大,当液固体积质量比达到15∶1以后,叶绿素a的萃取得率变化不大。这是由于溶剂中叶绿素a浓度很低,溶剂量越大,与物料及溶剂边界层的叶绿素a浓度差也越大,扩散推动力增大,所以萃取率增大,当溶剂量增加到一定量后,叶绿素a萃取率的增幅会很快降到一个很小的值,从经济上考虑,溶剂比增大,会增加原料成本及后续浓缩工艺的成本,所以选择液固比在15左右较好。

2.1.6 萃取次数对叶绿素a萃取率的影响 由图6可以看出,叶绿素a的萃取得率随萃取次数增加增大,当萃取2次后,叶绿素a的萃取率随萃取次数的增加变化不大,因此萃取次数可以根据液固比的大小选择萃取1~2次。

2.2 叶绿素a萃取工艺响应面法优化

2.2.1 因素的选取以及试验方案 根据Box-Benhnken的中心组合试验设计原理,结合单因素试验结果,固定功率250 w,开设超声系统,萃取1次,选取乙醇体积分数、萃取时间、液固体积质量比三个因素(分别以X_1、X_2与X_3表示),每个因素的低、中、高水平分别以-1、0、1进行编码,采用三因素三水平的响应面分析方法求取优化的工艺参数,

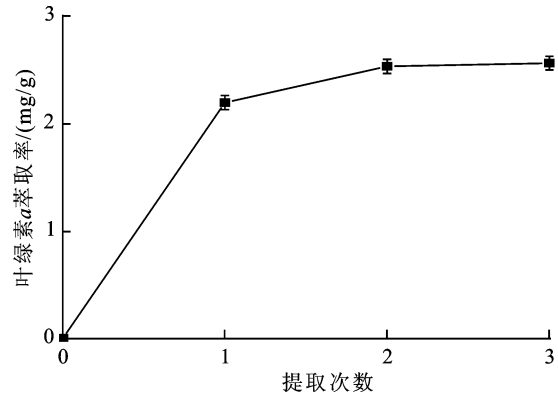


图6 萃取次数对叶绿素a萃取率的影响

Fig.6 Effect of extraction times on extraction yield of Chl-a

试验因素与水平设计见表1;以叶绿素a得率为响应值(Y)进行实验优化,实验方案及结果见表2。

2.2.2 响应面分析结果 表2为不同条件下所测的叶绿素a的得率,利用Design-expert 7.0.0软件对表2中所测得的数据进行多元回归拟合,由表3回归分析结果表明该模型回归显著。各因素经回归拟合后,得到叶绿素a萃取率对乙醇体积分数、温度和液固体积质量比(编码值)的二次多项回归方程为:

$$Y=2.34-0.47X_1+0.099X_2-0.033X_3+0.037X_1X_2-0.13X_1X_3+0.031X_2X_3-0.64X_{12}-0.20X_2^2-0.12X_3^2$$

从方差分析可以看出,模型P值小于0.000 1,表明该模型是高度显著的。同时模型中的参数A、B、AC、A^2、B^2、C^2都是显著的(P值小于0.05)。模型失拟项(Lack of Fit)表示模型预测值与实际值不拟合的概率[15]。表3中模型失拟项的P值为0.596 7,表示有59.67%的概率使得模型偏差由噪音产生,因此模型失拟项不显著。同时,模型的相关系数R^2为0.989 0大于0.9,模型相关度非常好。所以,可以使用该模型来分析响应值的变化。

表1 响应面分析因素与水平

Tab.1 Variables and levels in response surface design

水平	因素		
	X_1(乙醇体积分数)/%	X_2(时间)/s	X_3(液固体积质量比)/(mL∶g)
-1	80	60	59
0	120	15	
1	100	180	25

为了进一步研究相关变量之间的交互作用以及确定最优点,通过绘制响应面曲线图来进行可视化的分析。图7中分别显示了3组以叶绿素a得率

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为响应值的趋势图,每组图中均有 2 个变量,第 3 个变量设定在优化水平上。从等高线图可以直观地反映出两变量交互作用的显著程度。图 7a 和 7b 中的等高线呈椭圆形,表明两者交互作用显著;图 7c 中等高线接近圆形,表明两者交互作用不显著。进一步对实验模型进行典型性分析,以获得最大叶绿素-a 得率时的各萃取条件。通过对二次多项回归方程 $X_1X_2X_3$ 分别求偏导,建立方程组得到 $X_1 = -0.38$, $X_2 = 0.22$, $X_3 = 0.09$,即在乙醇浓度为 86.20%,萃取时间为 133.32 s,液固比为 15.92∶1 时,可以取得叶绿素 a 萃取得率理论最大值 2.436 mg/g。

表 2　响应面分析方案及试验结果

Tab.2　Arrangement and experimental results of response surface central composite design

实验编号	编码值			真实值			叶绿素 a 质量分数/(mg/g)
	A	*B*	*C*	乙醇体积分数/%	时间/s	液固体积质量比/(mL∶g)	
1	-1	-1	0	80	60	15	1.873
2	1	-1	0	100	60	15	0.837
3	-1	1	0	80	180	15	2.082
4	1	1	0	100	180	15	1.193
5	-1	0	-1	80	120	5	1.939
6	1	0	-1	100	120	5	1.262
7	-1	0	1	80	120	25	2.145
8	1	0	1	100	120	25	0.959
9	0	-1	-1	90	60	5	2.030
10	0	1	-1	90	180	5	2.079
11	0	-1	1	90	60	25	1.883
12	0	1	1	90	180	25	2.058
13	0	0	0	90	120	15	2.260
14	0	0	0	90	120	15	2.249
15	0	0	0	90	120	15	2.448
16	0	0	0	90	120	15	2.354
17	0	0	0	90	120	15	2.395

表 3　叶绿素 a 得率的响应面的方差分析

Tab.3　ANOVA of RSM for Chl-a yield

项目	Model	*A*	*B*	*C*	*AB*	*AC*	*BC*	A_2	B_2	C_2	Lack of Fit
平方和	4.05	1.79	0.078	8.778E-3	5.402E-3	0.065	3.969E-3	1.73	0.18	0.065	0.016
自由度	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
均方	0.45	1.79	0.078	8.778E-3	5.402E-3	0.065	3.969E-3	1.73	0.18	0.065	5.215E-3
F 值	69.61	277.74	12.05	1.36	0.84	10.03	0.61	267.56	27.23	10.08	0.71
P 值	< 0.000 1	< 0.000 1	0.010 4	0.281 8	0.390 8	0.015 8	0.458 8	< 0.000 1	0.001 2	0.015 6	0.596 7

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

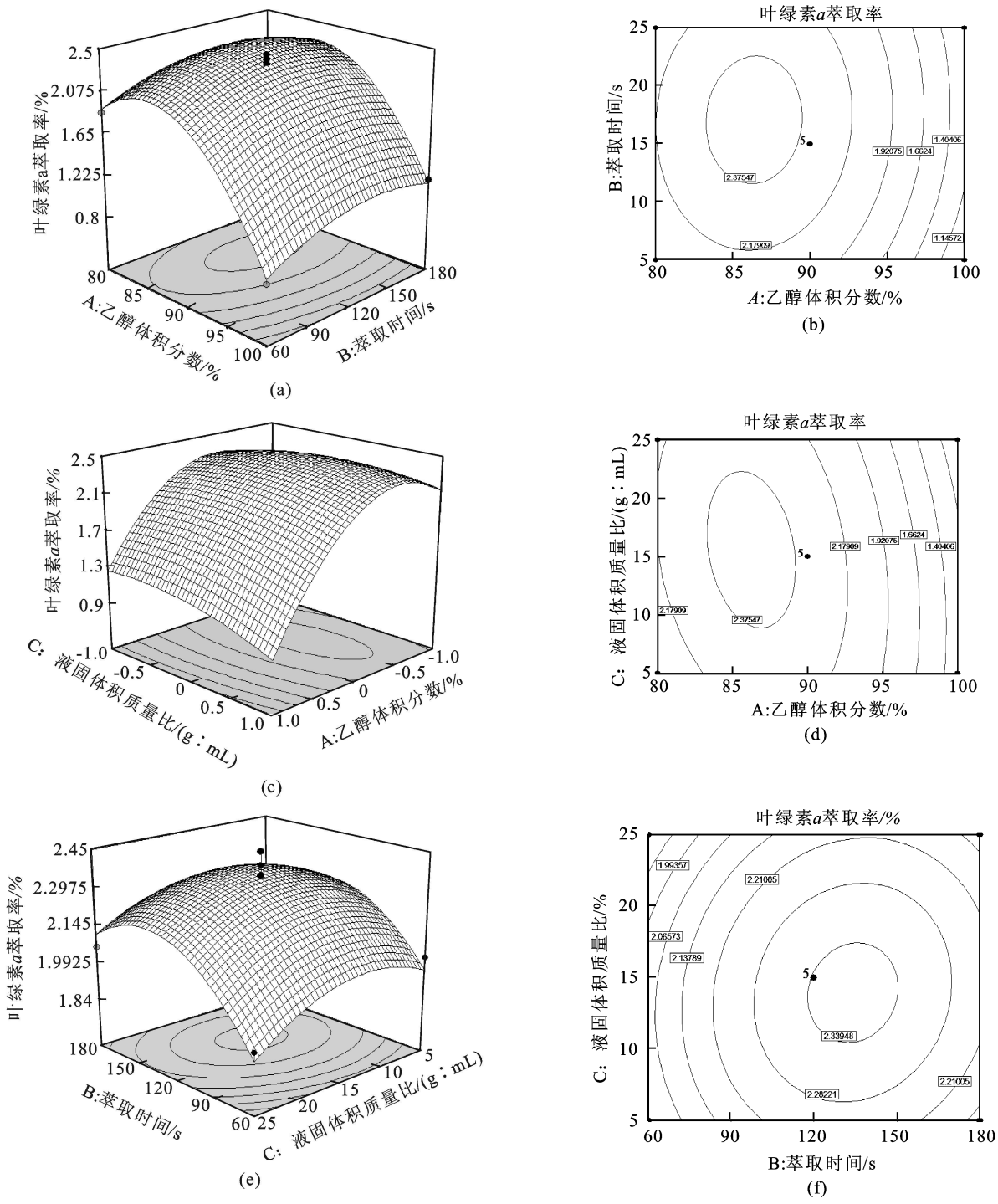


图 7 各变量两两相互作用对叶绿素 a 得率影响的响应面趋势图

Fig. 7 3D surface and contour plots showing the effect of different variables on Chl-a yield

2 2 3 回归模型的实验验证 为了便于操作, 将响应面优化的萃取条件取整为: 乙醇浓度 86 %, 萃取时间为 133 s, 液固比为 16: 1, 萃取 1 次, 采用优化后的实验条件对回归模型所得出的叶绿素 a 萃取得率进行实验验证, 经 3 次重复实验, 所得叶绿素 a 得率为(2 392±0 09) mg/g, 该实验结果与模型预测结果没有显著性差异, 在 95 %置信区间内。在最佳单因素条件下萃取 2 次所得叶绿素 a 得率为(2 521±0 065) mg/g, 而在采用优化后的实验条件下萃取 2 次, 所得叶绿素 a 得率为(2 686±0 013) mg/g, 也有明显提高。

2 3 超声-微波协同萃取与有机溶剂萃取、超声辅助萃取、微波辅助萃取和超临界 CO_2 萃取工艺比较

现有工业化叶绿素的提取主要采用有机溶剂萃取法、超声辅助萃取法、微波辅助萃取法、超临界 CO_2 萃取法等, 比较超声-微波协同萃取法与这些方

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

法的优缺点见表 4。

表 4 结果表明: 超声-微波协同萃取叶绿素 a 萃取率最高, 萃取时间最短, 从而可以缩短萃取周期, 降低成本; 溶剂萃取法萃取时间较长, 能耗大, 并且选择的溶剂大多都对人体伤害较大, 因此也不宜采用; 超临界 CO_2 萃取法是一种零污染最理想的萃取方式, 但其只对于极性较弱的脂溶性物质萃取较好, 而对极性较强的叶绿素 a, 其萃取率将大大降低, 并且萃取时间相对较长, 导致能耗和成本增加; 超声辅助萃取主要是超声波可以加速细胞内有效成分的扩散释放并使物料与溶剂充分混合, 但由于超声功率较低, 萃取速率下降, 所以在有限时间内叶绿素 a 萃取得率相对较低; 微波辅助萃取叶绿素 a 时, 能在短时间内使局部溶液温度升高, 从而使得整个溶液体系受热不均匀, 形成热对流, 导致溶液与物料接触受到阻碍, 而且在高温区叶绿素 a 会有一定降解; 超声-微波协同萃取时, 超声起到搅拌和翻腾的作用, 使溶液受热均匀以及使整个体系充分混合, 再加上微波的高能作用, 从而使得萃取率要高于超声和微波辅助萃取。经过对几种萃取工艺的比较, 超声-微波协同萃取叶绿素 a 是一种较理想的萃取方式。

表 4　几种萃取工艺比

Tab. 4　Comparison of several extraction methods

萃取方式	时间/min	溶剂	提取次数	叶绿素-a 得率/mg/g
溶剂萃取	180	甲醇-丙酮	2	2.411±0.008
超临界 CO_2 萃取	180	CO_2-乙醇	2	0.420±0.104
超声辅助萃取	60	甲醇-丙酮	2	0.897±0.044
微波辅助萃取	3	乙醇-水	2	2.274±0.020
超声-微波协同萃取	2.3	乙醇-水	2	2.686±0.013

3　结　语

在单因素试验基础上, 选取显著性因素乙醇体积分数、时间和液固体积质量比为变量, 叶绿素 a 萃取率为响应值, 进行响应面设计, 试验结果表明: 超声-微波萃取叶绿素 a 的最佳工艺参数: 乙醇体积分数为 86%、萃取时间 133 s、液固体积质量比 16, 在超声开微波功率为 250 w, 萃取 2 次时, 叶绿素 a 萃取得率为(2.686±0.013) mg/g。

不同萃取方式的对比试验结果表明, 超声波-微波协同萃取叶绿素 a 效果最好, 与传统萃取方法相比, 除了速度快、能耗小等优点外, 还有利于极性和热不稳定性组分的萃取, 避免长时间高温高压条件下萃取时, 导致叶绿素 a 的分解, 而且它克服了常规超声波和微波萃取之不足, 实现了低温常压条件下, 对固体样品进行快速、高效、可靠的预处理。

参考文献(References):

[1] 李克朗. 太湖蓝藻培养单细胞蛋白的可行性[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(4): 569-572.
LI ke-lang. Study on the single-cell protein production by taihu cyanobacteria[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2009, 28(4): 569-572. (in Chinese)

[2] A A M Farag. Optical absorption of sodium copper chlorophyllin thin films in UV-vis-NIR region[J]. **Spectrochimica Acta Part A,** 2006, 65(3): 667-672.

[3] 杨桂枝. 从海藻中提取、制备叶绿素铜钠盐工艺及稳定性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2005.

[4] 朱晶晶, 朱明远, 杨桂朋. 浮游植物光合色素的提取方法[J]. 山东科学, 2006, 19(4): 1-4.
ZHU Jing-jing, ZHU Ming-yuan, YANG Gui-peng. The extraction methods of phytoplankton pigments[J]. **ShangDong Science,** 2006, 19(4): 1-4. (in Chinese)

[5] 杨洪芳, 丁峰元, 陈德辉. 乙醇-超声法在浮游植物叶绿素-a 含量测定中的应用[J]. 海洋渔业, 2006, 28(4): 309-313.
YANG Hong-fang, DING Feng-yuan, CHEN De-hui. Application of ethanol-sonication methods to the determination of phytoplankton chlorophyll-a content[J]. **Marine Fisheries,** 2006, 28(4): 309-313. (in Chinese)

[6] M.D. Macias-Sanchez et al. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlo-

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

rophyll a from Dunaliella salina[J]. **Talanta,** 2009, 77(3): 948- 952.

[7] 王红丽等. 苜蓿叶绿素微波萃取的最佳工艺条件[J]. 甘肃农业大学学报, 2007, 42(6): 134- 137.
WANG Hong-li et al. Screening of technique parameter on chlorophyll with microwave extraction in Alfalfa[J]. **Journal of GanSu Agricultural University,** 2007, 42(6): 134- 137. (in Chinese)

[8] 吴浩等. 超临界CO2萃取毛竹叶中的叶绿素[J]. 北京化工大学学报, 2007, 34(1): 92- 94.
WU Hao et al. Extraction of chlorophyll from phyllostachys pubescens foliage with supercritical carbon dioxide[J]. **Journal of Beijing University Chemical Technology,** 2007, 34(1): 92- 94. (in Chinese)

[9] 王戈等. 超临界CO_2萃取绿竹叶中叶绿素的实验研究[J]. 北京化工大学学报, 2007, 34(Ⅱ): 36- 38.
WANG Ge et al. Experimental study of the extraction of chlorophyll from Dendrocalamopsis oldhami foliage with supercritical carbon dioxid[J]. **Journal of Beijing University Chemical Technology,** 2007, 34(Ⅱ): 36- 38. (in Chinese)

[10] M.D. Macias-Sanchez et al. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylla from Nannochloropsis gaditana. **Journal of Food Engineering,** 2005, 66(2): 245- 251.

[11] M.D. Macias-Sanchez et al. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Synechococcus* sp[J]. **J. of Supercritical Fluids,** 2007, 39(3): 323- 329.

[12] 孙夏容, 王建花. 微波萃取技术[J]. 中外医疗, 2009(19): 172- 173.
SUN Xia-rong, WANG Jian-hua. Technology of microwave assisted extraction[J]. **China Foreign Medical Treatment,** 2009(19): 172- 173. (in Chinese)

[13] 马利华, 秦卫东, 戴晓娟. 超声波-微波协同提取牛蒡中类胡萝卜素[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(1): 81- 82.
MA Li-hua, QIN Wei-dong, DAI Xiao-juan. Studies on the ultrasonic-microwave assisted extraction to extraction of capsorubin from arctium lappal [J]. **Food Research and Development,** 2007, 28(1): 81- 82. (in Chinese)

[14] 王建, 王骥. 浮游植物叶绿素与脱镁叶绿素的测定方法. 武汉植物学研究, 1984, 2(2): 321- 328.
WANG Jian, WANG Ji. The method for the determination of chlorophyll and phaeopigments in phytoplankton[J]. **Wu-Han Botanical Research,** 1984, 2(2): 321- 328. (in Chinese)

[15] Lin XL, Hezari M, Koepp AE, et al. Mechanism of taxadiene synthase, a diterpenecyclase that catalyzes the first step of taxol biosynthesis in Pacific Yew[J]. **Biochemistry,** 1996, 35(9): 2968-2977.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net