

响应面法优化纤维素酶协同提取沙棘籽粕原花青素的工艺研究

欧阳健^{1,2} 金家宏³ 王洪伦^{1*}¹中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001;²中国科学院大学, 北京 100049; ³伽蓝(集团)股份有限公司, 上海 200233

摘要: 利用单因素试验及响应面法优化纤维素酶协同甲醇超声提取沙棘籽粕中原花青素的工艺。通过单因素试验筛选出提取时间、料液比、及提取液 pH 三个主要因素, 以沙棘籽粕原花青素提取得率为响应因子进行 Box-Behnken 中心组合试验计划, 建立沙棘籽粕原花青素提取得率的二次回归方程, 得到最优提取条件。响应面法分析结果表明, 最佳提取工艺参数为: 超声功率 250 W, 室温下, 酶用量为 3%, 提取时间 55 min, 料液比 1:30 g/mL, pH 值为 5.0, 提取 3 次。在此条件下, 沙棘籽粕原花青素提取得率为 3.07%。

关键词: 沙棘籽粕; 原花青素; 纤维素酶; 响应面法

中图分类号: TS255.36

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.09.014

Optimization of Cellulase-assisted Extraction Process of Proanthocyanidins from *Hippophae rhamnoides* Seed Meal Using Response Surface MethodologyOUYANG Jian^{1,2} JIN Jia-hong³ WANG Hong-lun^{1*}¹Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³JALA Group Corporation, Shanghai 200223, China

Abstract: In this study, ultrasonic-assisted extraction was developed to optimize the extraction process of proanthocyanidins (PC) presented in *Hippophae rhamnoides* seed meal. Cellulase was introduced into the process for improving the extraction efficiency. The extraction conditions were optimized using response surface methodology (RSM) while extraction yield of PC were recorded as response and three key factors including extraction duration, ratio of solid to liquid and pH value of extraction solvent were selected by single-factor tests. Box-Behnken design and a quadric regression equation for predicting the extraction yield of PC were established and the optimized extraction conditions were determined as follows: extraction duration as 55 min, ratio of solid to liquid as 1:30 (g/mL), pH value of extraction solvent as 5.0 and times of extraction as 3, while ultrasonic power was set at 250 W, extraction temperature was set at 25 °C with cellulose dosage of 3%. Under these optimized conditions, the extraction yield of PC was 3.07%.

Key words: *Hippophae rhamnoides* seed meal; proanthocyanidins; cellulase; response surface methodology

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.) 是胡颓子科沙棘属植物, 为灌木或乔木, 青藏高原是沙棘的起源地, 青海是沙棘的重要分布区。沙棘资源具有分布广、品种多和耐旱强等特点, 仅青海省内, 天然沙棘林面积 5.3 万 hm², 人工林面积 7.3 万 hm², 未成林造林面积达 7.4 万 hm², 具有很大的产业开发潜力^[1]。沙棘籽粕为沙棘籽超临界 CO₂ 萃取油脂后的工业废料, 经检测其蛋白质含量为 20%, 糖分为 11.35%, 脂肪为 10.9%, 总植物碱 2.92 mg/kg, 总

黄酮 502 mg/kg, 另外还富含氨基酸、维生素等生物活性成分^[2]。

现代药理学研究表明^[3-5], 沙棘具有抗肿瘤、抗心血管疾病和免疫调节等生物活性, 尤其是沙棘中所含的原花青素类化合物具有较强的抗氧化及免疫调节等生理功能^[6-9]。原花青素^[10] 是一类具有特殊分子结构的生物黄酮, 是由不同数量的儿茶素和表儿茶素结合形成的聚合物, 其中 2~5 倍体被称为低聚原花青素, 大于 5 倍体的称为高聚原花青素。体外药理试验表明, 原花青素是一种高效的抗氧化剂, 它的抗自由基氧化能力是维生素 E 的 50 倍, 维生素 C 的 20 倍, 并且它在体内的半衰期长达 6.67 ± 0.95 h^[11, 12]。原花青素类化合物主要存在于大多数植物

收稿日期: 2014-11-21 接受日期: 2015-03-19

基金项目: 国家星火计划(2012GA870001); 青海省科技厅国际合作项目(2013-H-802)

* 通讯作者 E-mail: hlwang@nwipb.cas.cn

的果实、种子等组织中,对植物有着重要的保护作用^[13]。沙棘果实被工业利用后的渣粕中仍含有较高的原花青素,以沙棘籽粕为原料研究原花青素的提取工艺,对沙棘资源的开发具有一定意义。

目前,以沙棘籽粕为原料进行原花青素的提取工艺研究较少,金海英^[14]等研究了沙棘籽原花青素提取的单因素实验,张弛^[15]等对沙棘果原花青素的分离纯化进行了研究,梅金龙^[16]等研究了沙棘籽粕原花青素提取纯化工艺。此外,禹华娟^[17]等研究了莲房原花青素的酶辅助提取工艺。纤维素酶协同超声对沙棘籽粕原花青素的提取相关工艺未见报道。因此,本研究拟研究纤维素酶协同超声提取沙棘籽粕原花青素的工艺,采用香草醛-盐酸法^[18]测定原花青素的含量并计算原花青素提取得率。通过单因素及响应面法对原花青素的提取工艺进行筛选优化,为沙棘籽粕原花青素的生产利用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂

沙棘籽粕,于2013年取自青海康普生物科技股份有限公司提取籽油后籽粕;儿茶素标准品,购自成都曼思特生物科技有限公司;纤维素酶,BBL公司,酶活力15000 U/g。

UV-759型紫外-可见光分光光度计、PHS-3C型pH计,上海精密科学仪器有限公司;优普超纯水器,成都超纯水有限公司;超微粉碎机,浙江省温岭市创力药材器械厂。

甲醇、盐酸、香草醛均为分析纯,天津百世化工有限公司。

1.2 方法

1.2.1 材料制备

将沙棘籽粕粉碎过60目筛,得到试验材料,放置于冰箱冷冻备用。

1.2.2 原花青素含量的测定^[18]

1.2.2.1 标准曲线的绘制

配制儿茶素标准溶液,浓度为1.2 mg/mL。分别量取1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,然后定容至10 mL。准确量取各浓度儿茶素标准溶液1.0 mL,加入1%香草醛甲醇溶液2.5 mL和8%盐酸甲醇溶液2.5 mL,摇匀,避光,在 30 ± 1 °C下,恒温水浴保持30 min后取出,用分光光度法在500 nm波长下,测定其吸光值,得回归方程为 $y = 0.38x + 0.02$, $R = 0.9994$,线性范围为0.12~0.62 mg/mL。

1.2.2.2 样品测定

准确称取1.000 g左右沙棘籽粕粉末,加入一定体积的甲醇,按各方案进行提取后,4000 rpm离心15 min,取上清1.0 mL,按上述测定方法进行保温比色,并按标准曲线回归方程对原花青素提取得率进行计算。

1.2.3 试验设计方法

该研究通过料液比、提取时间、提取次数、酶的用量和提取液pH等因素的试验结果,筛选出对沙棘籽粕原花青素提取工艺影响较大的因素,进行Box-Behnken中心组合试验设计(见表1)。

表1 Box-Behnken设计因素与水平

Table 1 Factors and levels in Box-Behnken design

水平 Levels	因素 Factors		
	(X_1) 提取时间 Extraction duration (min)	(X_2) 料液比 Solid-to-liquid ratio (g/mL)	(X_3) pH值 pH value
-1	30	1:10	3
0	52.5	1:30	5
1	75	1:50	7

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 料液比对沙棘籽粕原花青素提取得率的影响

沙棘籽粕原花青素的提取过程中,设置不同的

料液比,在室温下,甲醇溶液超声辅助提取45 min,研究料液比对原花青素提取的影响,结果见图1A。原花青素的提取得率随着料液比的增加而呈现增加的趋势,其中料液比为1:30 g/mL时,原花青素提取得率较高,而后变化趋势不明显。因此选取料液比1:30 g/mL进行其他单因素试验。

2.1.2 提取时间对沙棘籽粕原花青素提取得率的影响

沙棘籽粕原花青素的提取过程中,设置不同的提取时间,在室温下,料液比为 1:30 g/mL,甲醇超声辅助提取。研究提取时间对原花青素提取的影响,结果见图 1B。原花青素的提取得率随提取时间的增加有一定的增加,45 min 前变化趋势较为明显,而后变化趋于平缓。因此,选择甲醇超声辅助提取时间 45 min、料液比 1:30 g/mL 进行其他单因素试验。

2.1.3 提取次数对沙棘籽粕原花青素提取得率的影响

沙棘籽粕原花青素的提取过程中,考虑不同的提取次数,在室温下,料液比为 1:30 g/mL,甲醇超声辅助提取 45 min,研究提取次数对沙棘籽粕原花青素提取的影响,结果见图 1C。原花青素的提取得率对提取次数的增加有一定的变化,但变化趋势较为不明显,尤其是提取 3 次以上几乎无差异,因此,甲醇超声辅助提取 3 次、每次 45 min、料液比 1:30 g/mL 进行其他单因素试验。

2.1.4 酶的用量对沙棘籽粕原花青素提取得率的影响

试验选用纤维素酶协同甲醇超声提取沙棘籽粕中的原花青素,考虑不同纤维素酶的用量,在室温下,料液比为 1:30 g/mL,甲醇超声辅助提取 45 min,研究酶的用量对沙棘籽粕原花青素提取的影响,结果见图 1D。沙棘籽粕中,原花青素需突破细胞壁的束缚才能进入提取溶剂中,细胞壁的主要成分之一即为纤维素,它在纤维素酶的催化作用下,可快速降解,使细胞壁出现裂解的现象,使原花青素更

易进入提取溶剂中,提高其提取得率^[19]。试验结果表明,在纤维素酶的作用下,原花青素的提取得率有明显的提高,但当酶的用量达到 3% (每 1 g 原料添加 0.03 g 纤维素酶,下同) 后,原花青素的提取得率无明显变化。因此,选择甲醇超声辅助提取 3 次、每次 45 min、料液比 1:30 g/mL 和酶的用量为 3% 进行其他单因素试验。

2.1.5 提取液 pH 对沙棘籽粕原花青素提取得率的影响

试验选用纤维素酶协助甲醇超声提取沙棘籽粕中的原花青素,而酶活力容易受到 pH 影响。因此,在提取过程中,考虑提取液 pH,在室温下,甲醇超声辅助提取 3 次、每次 45 min、料液比 1:30 g/mL 和酶的用量为 3%,研究提取液 pH 对沙棘籽粕原花青素提取的影响,结果见图 1E。试验表明,当 pH 小于 3 或大于 7 时,原花青素的提取得率均处于较低水平,而当 pH 为 5 时,原花青素的提取得率最高,且表明 pH 对原花青素提取得率影响较大,其原因可能与提取液 pH 对纤维素酶的影响有关,纤维素酶的最佳 pH 在 4.0~5.5 之间^[20]。当提取液 pH 过酸和过碱,均使纤维素酶不能具有较高的催化效率,而影响原花青素的提取得率。

2.2 响应面法试验设计及结果

2.2.1 分析单因素结果显示

甲醇超声辅助提取 3 次、酶的用量为 3% 时沙棘籽粕原花青素有最大的提取率。沙棘籽粕原花青素提取的响应面试验设计及试验结果见表 2,结合 Box-Behnken 中心组合实验设计原理,按照表 1 对提取时间、料液比和提取液 pH 作变换,以原花青素提

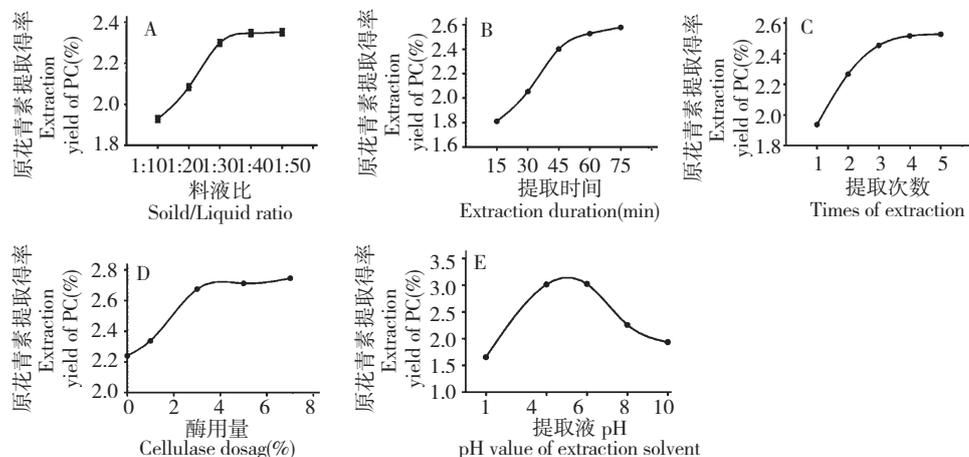


图 1 料液比 (A)、提取时间 (B)、提取次数 (C)、酶用量 (D) 及提取液 pH (E) 对沙棘籽粕原花青素提取得率的影响

Fig. 1 Effects of solid/liquid ratio (A), extraction duration (B), times of extraction (C), cellulase dosage (D) and pH value of extraction solvent (E) on the extraction yield of PC

取得率为响应值(Y) 共 17 个试验点 其中 1~12 组为 析因试验 13~17 组为中心试验 用来分析试验误差。

表 2 原花青素提取得率试验设计及结果

Table 2 Design and results of response surface analysis for the optimization of extraction conditions of PC

试验号 No.	因素 Factors			原花青素得率 Yield(%)
	X ₁	X ₂	X ₃	
1	-1	-1	0	2.03
2	1	-1	0	2.21
3	-1	1	0	2.16
4	1	1	0	2.35
5	-1	0	-1	1.78
6	1	0	-1	1.97
7	-1	0	1	2.11
8	1	0	1	2.19
9	0	-1	-1	1.99
10	0	1	-1	2.13
11	0	-1	1	2.35
12	0	1	1	2.48
13	0	0	0	3.08
14	0	0	0	3.05
15	0	0	0	3.10
16	0	0	0	3.07
17	0	0	0	3.09

采用 Design Expert 8.05b 软件对沙棘原花青素 0.16X₃ + 2.5 × 10⁻³X₁X₂ - 0.027X₁X₃ - 2.5 × 10⁻³X₂X₃ -
提取得率数据进行回归拟合分析 得回归方程: 原花 0.56X₁² - 0.33X₂² - 0.51X₃²。
青素提取得率 Y = 3.08 + 0.080X₁ + 0.068X₂ +

表 3 方差分析结果

Table 3 ANOVA of regression analysis

变异来源 Source	平方和 Sum of Squares	自由度 df	均方 Mean Square	F 值 F Value	P 值 P value (Prob > F)
X ₁	0.05	1	0.05	60.44	0.0001
X ₂	0.04	1	0.04	43.03	0.0003
X ₃	0.20	1	0.20	234.26	< 0.0001
X ₁ X ₂	2.50 × 10 ⁻⁵	1	2.50 × 10 ⁻⁵	0.03	0.8685
X ₁ X ₃	3.03 × 10 ⁻³	1	3.03 × 10 ⁻³	3.57	0.1007
X ₂ X ₃	2.50 × 10 ⁻⁵	1	2.50 × 10 ⁻⁵	0.03	0.8685
X ₁ ²	1.31	1	1.31	1546.18	< 0.0001
X ₂ ²	0.47	1	0.47	550.32	< 0.0001
X ₃ ²	1.09	1	1.09	1281.38	< 0.0001
模型 Model	3.47	9	0.39	454.82	< 0.0001
残差 Residual	5.93 × 10 ⁻³	7	8.47 × 10 ⁻⁴		
失拟项 Lack of Fit	4.45 × 10 ⁻³	3	1.48 × 10 ⁻³	4.01	0.1066
纯误差 Pure Error	1.48 × 10 ⁻³	4	3.70 × 10 ⁻⁴		
总离差 Cor Total	3.47	16			

2.2.2 模型的显著性检验

从回归模型方差分析(表3)可见,试验选用的模型极显著($P < 0.0001$),失拟项不显著 $P = 0.1066 > 0.05$,说明模型是适合的;模型的校正决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9961$,说明该模型能解释99.61%响应值的变化,仅有总变异大约0.39%不能用该模型进行解释;相关系数 $R^2 = 0.9983$,说明该模型拟合程度较好,预测值与实测值之间有良好的相关性,试验误差小,可以用该模型来分析和预测沙棘籽粕原花青素的提取得率。

由表3方差分析结果可知,在此试验设计中,一次项 X_1 、 X_2 、 X_3 均极显著($P < 0.01$),二次项 X_1X_2 、

X_2X_3 、 X_1X_3 均不显著($P > 0.05$), X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均极显著($P < 0.01$)。

2.2.3 响应面交互作用分析

回归模型的响应面及其等高线见图2,3组图直观地反映了各因素对响应值的影响。由三组图对比可知,提取液pH(X_3)对沙棘籽粕原花青素提取得率影响最为显著,表现为图2B1、2C1的曲面较陡。等高线的形状可反映出交互效应的强弱,椭圆表示两因素交互作用显著,圆形则相反。由图2B2、2C2等高线可得知,提取时间与pH值和料液比与pH值的交互作用较为明显,表现为等高线略成椭圆形。相比而言,提取时间与料液比之间的交互作用稍弱。

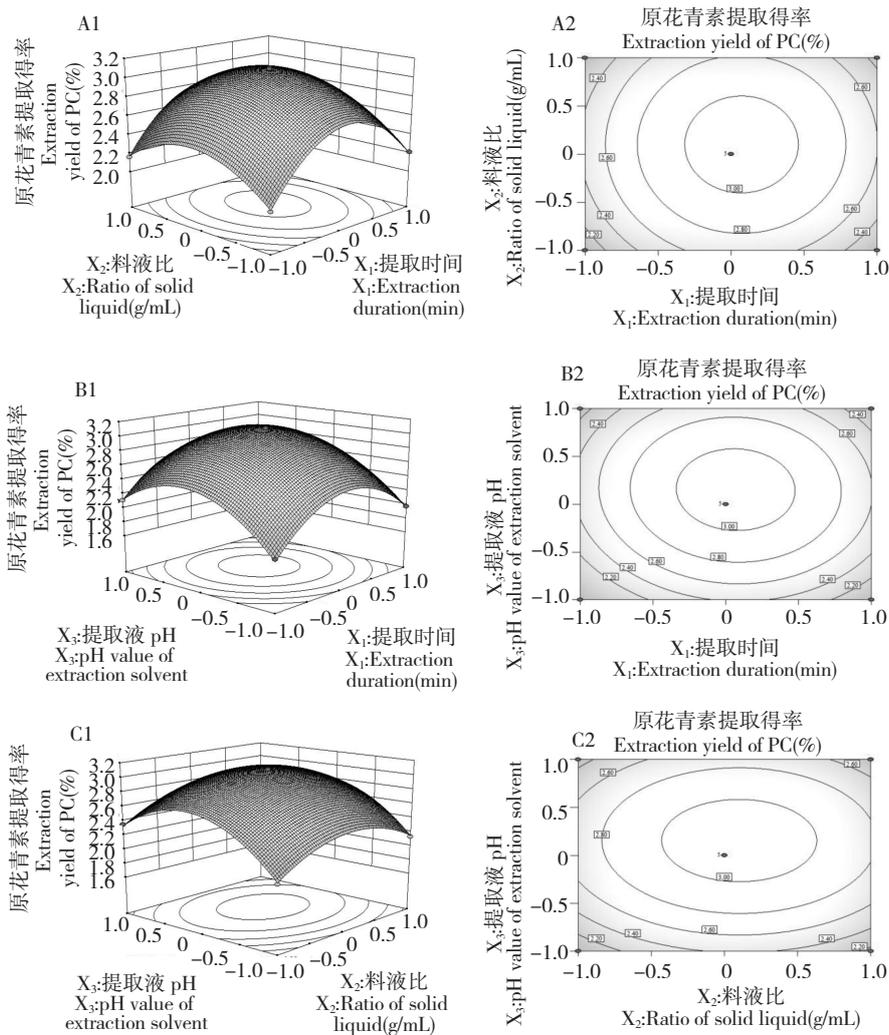


图2 提取时间(X_1)与料液比(X_2)、提取时间(X_1)与提取液pH(X_3)及提取时间(X_1)与提取液pH(X_3)交互作用响应面图(A1、B1、C1)与等高线图(A2、B2、C2)

Fig. 2 Responsive surface plots (A1、B1、C1) and contour plots (A2、B2、C2) showing the mutual effects of extraction duration (X_1) and ratio of solid to liquid (X_2), extraction duration (X_1) and pH value of extraction solvent (X_3), ratio of solid to liquid (X_2) and pH value of extraction solvent (X_3) on the yield of PC

2.2.4 最优提取工艺参数

通过 Design-Expert8.05b 软件求解回归方程得出的最佳提取工艺参数为: 纤维素酶协同甲醇超声提取, 超声功率 250 W, 室温下, 酶的用量为 3%, 提取时间 54.02 min, 料液比 32.01 g/mL, pH 值为 5.31, 提取 3 次, 测定并计算原花青素提取得率。综合考虑试验的操作性、效率和成本等, 将沙棘籽粕原花青素提取工艺参数修正为: 纤维素酶协同甲醇超声提取, 超声功率 250 W, 室温下, 酶的用量为 3%, 提取时间 55 min, 料液比 1:30 g/mL, pH 值为 5.0, 提取 3 次, 此条件下, 沙棘籽粕原花青素提取得率的理论值达到 3.09%。

2.2.5 试验模型的验证和比较

按照模型得到的最优提取参数与实践过程中的简便性得到的最终条件验证试验模型。试验结果表明, 模型提取参数按实际操作简化后实际提取得率为 $(3.07 \pm 0.0080)\%$, 与理论最大值非常接近, 说明该模型可以较好的反映沙棘籽粕原花青素的提取参数, 也说明用响应面法对原花青素提取得率进行参数优化是可行的。

3 结论

利用纤维素酶协同甲醇超声辅助提取沙棘籽粕原花青素, 通过单因素试验筛选出料液比、提取时间和提取液 pH 值对原花青素提取得率的影响较为明显, 进一步根据 Box-Behnken 原理进行响应面设计, 优化沙棘籽粕原花青素提取的最佳工艺参数, 并进行稳定性的检验。根据响应面分析模型方程 $Y = 3.08 + 0.080X_1 + 0.068X_2 + 0.16X_3 + 2.510 \times 10^{-3} X_1 X_2 - 0.027X_1 X_3 - 2.5 \times 10^{-3} X_2 X_3 - 0.56X_1^2 - 0.33X_2^2 - 0.51X_3^2$, 得出沙棘籽粕原花青素的最佳提取工艺参数: 纤维素酶协同甲醇超声提取, 超声功率 250 W, 室温下, 酶的用量为 3%, 提取时间 55 min, 料液比 1:30 g/mL, pH 值为 5.0, 提取 3 次。在此条件下, 沙棘籽粕原花青素提取得率为 3.07%。该研究通过单因素及响应面法对原花青素的提取工艺参数进行优化筛选, 为沙棘籽粕中原花青素的生产利用提供一定的理论基础。

参考文献

1 Chen XW(陈修文), Zhao HL(赵宏利). Development and utilization of sea buckthorn resources in qinghai province. *Nat Res(自然资源)*, 1992, 6: 47-51.

2 Wu AH(武挨厚), Mi L(米拉), Dong QJ(董交其) et al. Nutritive value of *Hippophae rhamnoides* fruit residue and its application. *J Inner Mongolia Instit Agric Animal Husb(内蒙古农牧学院学报)*, 1993, 1: 50-54.

3 Gao X, Ohlander M, Jeppsson N et al. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *J Agric Food Chem* 2000, 48: 1485-1490.

4 Suryakumar G, Gupta A. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J Ethnopharmacol* 2011, 138: 268-278.

5 Panossian A, Wagner H. From traditional to evidence-based use of *Hippophae rhamnoides* L.: chemical composition, experimental and clinical pharmacology of sea buckthorn berries and leaves extracts. *Evid Rational Based Res Chin Drugs* 2013: 181-236.

6 Al-malki AL, Sayed AAR, El Rabey HA. Proanthocyanidin attenuation of oxidative stress and NF- κ B protects apolipoprotein E-deficient mice against diabetic nephropathy. *Evid-Based Comple Alter Med* 2013, 2013: 1-8.

7 Gentile C, Allegra M, Angileri F, et al. Polymeric proanthocyanidins from Sicilian pistachio (*Pistacia vera* L.) nut extract inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Eu J Nutri* 2012, 51: 353-363.

8 A-sowayan NS, Kishore U. Prophylactic efficacy of a combination of proanthocyanidin and vitamin E on hepatotoxicity induced by doxorubicin in rats. *Int J Pharm* 2012, 2: 161-169.

9 Shin MO, Yoon S, Moon JO. The proanthocyanidins inhibit dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *Arch Pharmacol Res* 2010, 33: 167-173.

10 Hummer W, Schreier P. Analysis of proanthocyanidins. *Mole Nutri Food Res* 2008, 52: 1381-1398.

11 Bagchi D, Garg A, Krohn R, et al. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*. *Res Commun Mole Pathol Pharmacol*, 1997, 95: 179-189.

12 Stoupi S, Williamson G, Viton F et al. *In vivo* bioavailability, absorption, excretion and pharmacokinetics of [¹⁴C] procyanidin B2 in male rats. *Drug Metabol Dispos* 2010, 38: 287-291.

13 Deprez S, Brezillon C, Rabot S, et al. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J Nutri*, 2000, 130: 2733-2738.

14 Jin HY(金海英). Single-factor tests extraction of proanthocyanidins from *Hippophae rhamnoides* seed. *Hippophae(沙棘)* 2006, 18(4): 29-32.

(下转第 1563 页)

- machia clethroides*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011 42: 38-41.
- 8 Chen Y (陈玥), Shi PP (石萍萍) *et al.* The flavonoid glycosides from Rwandan *Calendula officinalis* L. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报) 2014 31: 179-183.
 - 9 Liu B (刘斌), Lu YR (陆蕴如). Chemical constituents of the pollen of *Typha orientalis*. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1998 33: 587-590.
 - 10 Nørhæk R, Kondo T. Flavonol glycosides from flowers of *Crocus speciosus* and *Crocus antalyensis*. *Phytochemistry*, 1999, 51: 1113-1119.
 - 11 Marina DG, Lorenzo M, Antonio M *et al.* 5 β 8 β -Epidioxyergosta-6 22-dieol from *Typha Latifolia*. *Gazz Chim Ital*, 1990, 120: 391-392.
 - 12 Yun XG (韵小娟), Shu HM (舒火明) *et al.* Chemical constituents from the bark of *Lannea coromandelica*. *Chem Res Appl* (化学研究与应用) 2012 24: 610-613.
 - 13 Liu XY (刘旭阳), Xie YF (谢郁峰) *et al.* Chemical Constituents from *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn. Var. *microphylla* (Wedd.) W. T. Wang. *China J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志) 2014 20(6): 43-47.
 - 14 He P (何萍), Li S (李帅) *et al.* Chemical constituents in Rhizome of *Pinellia ternate*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志) 2005 30: 671-674.
 - 15 Wein Y (危英), Yang XS (杨小生), Hao XJ (郝小江). Studies on chemical constituents from the root of *Mirabilis jalapa*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志) 2003 28: 1151-1152.
 - 16 Yu DQ (于德泉) *et al.* Handbook of Analytical Chemistry-NMR Spectroscopy (化学分析手册-核磁共振波谱分析). Beijing: Chemical Industry Press, 1999. 743-745.
 - 17 Tang H (汤华), Cheng P (程萍), Lin HW (林厚文). Studies on chemical constituents of *Bugula neritina* L. *J Chin Med Mater* (中药材) 2007 30: 655-657.
 - 18 Qin C (秦淳), Lin XP (林秀萍), Ai W (艾文) *et al.* Secondary metabolites from mangrove *Sonneratia apetala* endophytic fungus *Neofusicoccum* sp. SaBA3. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2014 26: 1212-1215.
 - 19 Jiang B (姜北), Zhao QS (赵勤实) *et al.* Studies on the chemical constituents of *Hypoestes triflora*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2001 13: 12-15.
 - 20 Zou GA (邹国安), Wang Y (王媛) *et al.* Chemical constituents of *Croton caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook. *Chin Pharm J* (中国药学杂志) 2009 44: 819-821.
 - 21 Liu FJ (刘法锦), Liao HC (廖汉成) *et al.* Studies on the chemical constituents of *Typha angustata* Bory et Chaub. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1985 16: 48.
 - 22 Huang KY (黄开毅), He L (何乐), Qu Y (曲杨) *et al.* Isolation and identification of chemical constituents from roots of *Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell. *Acta Pharm Univ Shenyang* (沈阳药科大学学报) 2009 26(2): 112-115.
 - 23 Yang MH (杨明惠), Yang XQ (杨雪琼), Zhang FM (张凤梅) *et al.* Studies on the chemical constituents of *Woodwardia unigemmata* (Mak.) Nakai. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药) 2009 40: 1546-1549.
 - 24 Jia SS (贾世山), Ma CM (马超美), Zhao LF (赵立芳) *et al.* The lipophilic ingredients in the pollen of *Typha angustifolia* L. *Chin Bull Bot* (植物学报), 1990 32: 465-468.
 - 25 Yu JY (于江泳), Zhang SJ (张思巨), Liu L (刘丽). Studies on the chemical constituents of *Heterosmilax japonica*. *Chin Pharm J* (中国药学杂志) 2005 40: 91-93.
 - 26 Zhong HT (钟汉庭), Zhang XQ (张小强), Wang MK (王明奎). Chemical constituents from the bark of *Broussonetia papyrifera* L. Vent. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2011 23: 611-663.

(上接第 1594 页)

- 15 Zhang C (张驰), Xu XY (徐晓云), Pan SY (潘思轶). Study on isolation and purification of procyanidins from sea-buckthorn Fruit. *Food Sci* (食品科学) 2005 26: 183-185.
- 16 Mei JL (梅金龙), Hu CY (胡长鹰) *et al.* Extraction and purification of procyanidine from sea buckthorn seed meal. *China Oils Fats*(中国油脂) 2010 7(35): 50-53.
- 17 Yu HJ (禹华娟), Sun ZD (孙智达), Xie BJ (谢笔钧). Enzyme assistant extraction of procyanidins from seedpod of lotus and the comparison of antioxidant activity. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2010 22: 154-158.
- 18 Li CY (李春阳), Xu SY (许时婴), Wang Z (王璋). Vanillin-HCl assay for the proanthocyanidins content of grape seed and stem. *Food Sci* (食品科学) 2004 35: 157-161.
- 19 Pettersson G. Structure and function of a cellulase from *Penicillium notatum* as studied by chemical modification and solvent accessibility. *Arch Biochem Biophys*, 1968, 126: 776-784.
- 20 Ingram L, Gomez P *et al.* Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 58: 204-214.