

医药卫生

白花菜子不同溶剂提取物总多酚、 总黄酮含量及抗氧化活性测定

张彦¹ 耿红梅^{1,2*} 陈彦芬¹ 苗庆峰³

(衡水学院应用化学系¹,衡水 053000; 麦克马斯特大学化学工程系², 加拿大 L8S 4L7;
河北医科大学药理教研室³, 石家庄 050017)

摘要 测定了白花菜子四种不同溶剂提取物的总多酚含量、总黄酮含量和体外抗氧化活性。以没食子酸为对照品,采用福林-酚试剂法测定白花菜子提取物中总多酚的含量;以芦丁为对照品,采用可见-紫外分光光度法测定白花菜子提取物中总黄酮的含量。通过测定 DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率和还原能力来评价白花菜子提取物的抗氧化活性。在四种白花菜子不同溶剂提取物中,总黄酮含量从高到低的顺序为乙酸乙酯提取物(CAEE) > 甲醇提取物(CME) > 石油醚提取物(CPEE) > 二氯甲烷提取物(CCE);总多酚含量从高到低的顺序为 CME > CAEE > CPEE > CCE。白花菜子提取物各种方法抗氧化活性从高到低的顺序为 CME > CAEE > CPEE > CCE,与总多酚含量顺序一致。结果表明白花菜子乙酸乙酯提取物总黄酮含量最高,白花菜子甲醇提取物总多酚含量最高,且甲醇提取物具有很强的抗氧化活性,可以用作抗氧化药物或食品添加剂,因此有必要对白花菜子的化学成分、体内抗氧化活性和机理进行进一步的研究。

关键词 白花菜子 总多酚含量 总黄酮含量 抗氧化活性

中图分类号 R284. 2; **文献标志码** A

随着医学、分子生物学和食品科学等的快速发展,抗氧化作用越来越显示出它的生命力,人们对抗氧化剂关注也在不断增强。研究表明,心脑血管病、癌症、衰老、帕金森症、类风湿、关节炎等疾病发生都和自由基有关^[1]。由活性氧引发的自由基会使人体内的蛋白质与脂质发生链式氧化反应,导致细胞膜、酶、组织和基因受损,以至发生衰老或疾病。适当补充外源性抗氧化剂或给予能促使机体内源性抗氧化物质恢复到一定水平的药物,可以改善这一状况。抗氧化剂也是一种重要食品添加剂,它可阻止或延缓油脂的自动氧化,用于防止食品因氧化导致营养损坏、褐变及褪色等。抗氧化剂广泛用于食品工业,且需求量逐年增加。因此,从天然食材中寻找高效安全的抗氧化物质一直是研究热点。

研究表明,植物多酚含量及种类与抗氧化性功效有关^[2]。天然多酚包括从简单结构到复杂高分子聚合物的很多物质,简单结构物质主要有酚酸类、

苯丙素、黄酮类化合物,高分子聚合物包括木质素、大分子色素及单宁等,其中以黄酮类化合物最为常见。黄酮类化合物是广泛存在于自然界的一大类化合物,在植物体中常以游离或与糖结合成苷的形式存在,是目前倍受关注的天然活性产物之一。黄酮类化合物具有清除自由基和抗应激反应的能力,临床上可以治疗多种疾病,具有抗菌、抗炎、抗病毒、抑制艾滋病病毒和提高免疫力等作用,用于治疗高血压、心肌缺血、肝炎、肝硬化等,研究进展很快。

白花菜(*Cleome gynandra* L.)为白花菜科白花菜属一年生草本植物,别名五梅草、羊角菜、臭花菜等,原产于古热带,现全球热带、亚热带都有分布。在我国也是田野路边常见的野生植物,分布广泛,资源丰富,它富含对人体有益的多种微量元素和氨基酸、粗脂肪、维生素、矿物质等,具有较高的营养价值和医疗保健作用。通常以嫩茎叶供食用,全草及种子供药用。白花菜的种子称为白花菜子,为河北省习用药材,性味苦、辛,温,具有祛风除湿、活血止痛的功效,常用于治疗风湿痹痛、跌打损伤等。白花菜子所含的成分主要为挥发油类、三萜类和多酚类物质^[3,4]。迄今为止未见关于白花菜子抗氧化活性的报道,为更好开发利用白花菜子,本文对白花菜子不同溶剂提取物的抗氧化活性进行研究。

2014年6月3日收到 河北省自然科学基金(B2009000966)、
2012年河北省专家出国培训项目资助

第一作者简介:张彦(1981—),硕士,讲师。研究方向:有机化合物的分离分析。E-mail:zyhx2008@163.com。

*通信作者简介:耿红梅(1968—),博士,教授。研究方向:中药分析与分析、食品分析、生物分离。E-mail:108437905@qq.com。

1 材料与方 法

1.1 材料

白花菜子购于河北省安国药材市场,经衡水市药品检验所蔡咏梅主任中药师鉴定为白花菜科植物白花菜 *Cleome gynandra* L. 的成熟种子。

DPPH 自由基,2,6-二叔丁基对甲苯酚(BHT)购于 Sigma-Aldrich 公司;抗坏血酸(Vc)对照品(中国药品生物制品检定所,批号 021225),没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 120563-200412),芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100080-200707),其他化学试剂均为国产分析纯或生化试剂。

仪器:TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);FZ102 微型植物试样粉碎机(北京永光明仪器有限公司);KQ-400KDB 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DZF-6021 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司);BS210S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);FZ102 微型植物试样粉碎机(北京永光明仪器有限公司);ABORTATA-4000 旋转薄膜蒸发器(Heidolph 公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 白花菜子不同溶剂提取物制备

取自然干燥的白花菜子 5 kg,以石油醚为溶剂置于索氏提取器中进行提取,石油醚提取液减压回收石油醚后,干膏加入 95% 乙醇溶解,再加入等量水混合均匀,放置过夜,减压过滤,滤液加活性炭脱色,减压浓缩,浓缩液经恒温(60 ℃)水浴浓缩后,真空干燥(65 ℃)至恒重,得石油醚部分提取物(CPEE);索氏提取后的白花菜子用 95% 乙醇室温浸提 3 次,每次 48 h,过滤,滤液合并,减压回收乙醇,浓缩提取液置于 60 ℃ 恒温水浴至几乎无乙醇味,稠膏于干燥恒重的蒸发皿中真空恒温干燥至接近恒重。将所得膏状物悬浮于水中(1:2),分别依次用二氯甲烷(200 mL × 5)、乙酸乙酯(200 mL × 4)、甲醇(200 mL × 3)萃取。各部分萃取液减压回收溶剂至干,用少量 95% 乙醇溶解并移入干燥恒重的蒸发皿中,经恒温(60 ℃)水浴浓缩后,真空干燥(65 ℃)直至恒重,分别为二氯甲烷部分提取物(CCE)、乙酸乙酯部分提取物(CAEE)、甲醇部分提取物(CME),备用。用水或乙醇稀释制备下面实验所需提取液。

1.2.2 总多酚含量测定

采用福林-酚法(Folin-Ciocalteu)测定各提取物

总多酚的含量^[5]。取 1.0 mL 提取液依次加入 10 mL 去离子水、1.0 mL 福林-酚试剂,5 min 后加入 20% 的碳酸钠溶液 2.0 mL,蒸馏水定容至刻度,混匀,暗处放置 1 h,于波长 760 nm 处分别测定吸光度值。

取没食子酸对照品 2.89 mg,精密称定,置 50 mL 棕色容量瓶中,蒸馏水溶解定容至刻度,作为对照品储备液。吸取上述没食子酸对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mL 于 25 mL 棕色容量瓶中,加适量蒸馏水,依次加入 10 mL 去离子水、1.0 mL 福林-酚试剂,5 min 后加入 20% 的碳酸钠溶液 2.0 mL,蒸馏水定容至刻度,混匀,暗处放置 1 h,在波长 760 nm 处分别测定吸光度值,求回归方程和线性关系。

1.2.3 总黄酮含量测定

以芦丁为对照品,采用可见-紫外分光光度法测定白花菜子提取物总黄酮的含量。取 2.0 mL 提取液和不同浓度的芦丁对照品溶液,分别置 10 mL 量瓶中,加入水使成 5 mL,再精密加 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min;加 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min;加 10% 氢氧化钠溶液 4.0 mL,再加水至刻度,摇匀,放置 15 min,在 510 nm 的波长处测定吸光度。以芦丁浓度(X)为横坐标,以吸光度(Y)为纵坐标,求标准曲线的回归方程,计算白花菜子提取物的总黄酮含量。

1.2.4 抗氧化活性测定

(1)对 DPPH 自由基清除能力的测定^[6,7]。

制备 DPPH 自由基溶液:精确称取 0.010 8 g DPPH 自由基样品,无水乙醇溶解并定容至 250 mL 容量瓶中,即得到浓度为 0.043 mg/mL 的 DPPH 自由基溶液。

将不同浓度白花菜子提取物乙醇溶液与 DPPH 自由基等体积混合,摇匀,放置于黑暗中 30 min 后,于 518 nm 下测定吸光度值(A_i)。将不同浓度白花菜子提取物乙醇溶液与无水乙醇进行等体积混合于试管中,摇匀,放置于黑暗处 30 min 后于 518 nm 下测定吸光度值为(A_j)。取蒸馏水与 DPPH 自由基溶液等体积相混合于试管中测定其吸光度值(A_0)。以 Vc 作阳性对照,按下列公式进行计算,得到 DPPH 自由基清除率,求出 IC_{50} 值。

$$W = \frac{A_0 - A_i - A_j}{A_0} + 100\%$$

式中, W 为 DPPH 自由基清除率%; A_0 为 DPPH 自由基吸光度值; A_i 为不同浓度白花菜子提取物与 DPPH 自由基作用后吸光度值; A_j 为不同浓度白花菜子提取物的吸光度值。

(2)对羟基 OH 清除率的测定^[6,7]。

将白花菜子四种不同溶剂提取物配成质量浓度为 2 mg/mL 的溶液,取 7 支试管,依次加入 1 mL 浓度为 0.75 mmol/L 的邻菲罗啉溶液,15 mL 浓度为 150 mmol/L 的磷酸缓冲液,充分混匀,加入 1 mL 浓度为 0.75 mmol/L 的硫酸亚铁,立即混匀,然后向 5 支试管中加入一定量的白花菜子提取液,混匀,另外两支试管中不添加白花菜子提取液,一支中添加 1 mL 0.01% 双氧水,一支中不添加,用纯净水定容至 10 mL,37 °C 恒温培养箱中保温培养 1 h,在 536 nm 波长处测定吸光度值,计算公式如下

$$Z = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_2}$$

式中,Z 为羟基清除率,% ; A_1 为添加白花菜子提取物样品吸光度值; A_2 为添加双氧水空白吸光度值; A_3 为未添加双氧水空白吸光度值。

(3)还原能力的测定^[8]。

将白花菜子提取物配制成不同浓度的乙醇溶液,各取溶液 1.0 mL,加入浓度为 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH = 6.6)2.5 mL,再加入 10 mg/mL 的铁氰化钾溶液 2.5 mL,混匀,在 50 °C 水浴下作用 30 min 后加入 100 mg/mL 的三氯乙酸 2.5 mL,混匀后于 3 000 r/min 下离心 10 min,取上清液 2.5 mL 与浓度为 0.1% 的氯化铁水溶液 0.5 mL 混合,室温反应 10 min 后在 700 nm 波长下测定吸光度值(以溶剂代替样品做空白),求吸光度平均值。

(4)数据分析。

所有数据均重复测定三次,用平均数 \pm 标准偏差(SD)来表示。

2 结果与讨论

2.1 总多酚含量

以吸光度值(A)对没食子酸含量(C)进行线性回归,回归方程为 $A = 0.1125C + 0.3807$, $r = 0.9998$, 没食子酸浓度在(1.16 ~ 8.09) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

CPEE、CCE、CAEE、CME 的总多酚含量分别为 3.42, 2.12, 14.43, 19.05 mg/g, 测定结果表明,白花菜子甲醇提取物 CBE 的总多酚含量最高。

2.2 总黄酮含量

以吸光度值(A)对芦丁含量(C)进行线性回归,得回归方程为 $A = 12.21C - 0.1852$, $r = 0.9999$, 芦丁浓度在(10.3 ~ 51.5) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

CPEE、CCE、CAEE、CME 的总黄酮含量分别为 0.75, 0.52, 3.02, 1.53 mg/g, 测定结果表明,白花菜

子乙酸乙酯提取物 CAEE 的总黄酮含量最高。

2.3 抗氧化活性

2.3.1 对 DPPH 自由基清除能力的测定

DPPH 自由基清除法是测定抗氧化活性最常用的一种方法。对 DPPH 自由基清除率的高低是天然抗氧化剂筛选的指标之一。通常用 IC_{50} 值表示对自由基的清除能力, IC_{50} 值越小,表明抗氧化活性越高。从表 1 可以看出,在试验浓度范围内, Vc 溶液和四种白花菜子提取物对 DPPH 自由基都具有比较强的清除效果,并且随着浓度的增加,其抗氧化能力也相应提高。对 DPPH 自由基的清除率顺序为: CME > Vc > CAEE > CPEE > CCE。在相同的浓度下,四种白花菜子不同溶剂提取物中,甲醇提取物对 DPPH 自由基的清除效果略强于 Vc,说明白花菜子甲醇提取物对 DPPH 自由基的具有很好的清除能力。

表 1 白花菜子不同提取物对 DPPH 自由基的清除作用

Table 1 The DPPH scavenging activity of various extracts of *Cleome gynandra* L. seeds

浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.025	0.05	0.1	0.2	0.3
CPEE	10.49 \pm 0.01	35.02 \pm 0.02	55.81 \pm 0.01	76.98 \pm 0.01	79.56 \pm 0.01
CCE	4.50 \pm 0.03	31.52 \pm 0.01	54.63 \pm 0.06	72.85 \pm 0.05	74.80 \pm 0.02
CAEE	17.05 \pm 0.02	40.12 \pm 0.02	60.37 \pm 0.01	74.62 \pm 0.02	80.68 \pm 0.01
CME	70.87 \pm 0.01	75.79 \pm 0.02	79.79 \pm 0.03	83.60 \pm 0.02	90.79 \pm 0.01
Vc	61.24 \pm 0.01	62.31 \pm 0.03	69.75 \pm 0.02	75.93 \pm 0.01	83.61 \pm 0.03

2.3.2 对羟基清除率的测定

活性氧自由基在自然界普遍存在,生物体内物质在代谢过程中和受到外界射线或有毒物质作用后,也可产生各种自由基。自由基化学性质比较活泼,自由基产生过多和(或)清除能力下降,容易和体内的其他一些基团反应,从而造成体内细胞损伤,引发一些疾病。羟基自由基的化学性质比较活泼,极易和一些分子基团发生反应,因此,清除羟基是机体抵御疾病有效的手段之一。白花菜子四种不同溶剂提取物及 BHT 对羟基的清除效果见表 2。从表 2 可以看出,随着几种物质浓度的增加,对羟基的清除作用明显增强,四者都呈现量效关系,但在相同的浓度下,白花菜子的四种溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除效果均不及 BHT,在四种白花菜子不同溶剂提取物中,甲醇提取物对羟基自由基的清除能力最强,对 OH 自由基的清除率顺序为: BHT > CME > CAEE > CPEE > CCE。

2.3.3 还原能力的测定

测定物质的还原力就是测定该物质将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} 的能力,这是一种快速间接的测定被测物

清除自由基能力的方法。从表3的测定结果可以看出,白花菜子提取物的还原能力与提取物的浓度呈一定的线性关系,随物质浓度的增加,还原能力不断增加。四种不同溶剂提取物中,石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯提取物的还原能力均低于对照 BHT,只有甲醇提取物的还原能力强于对照 BHT。几种提取物的还原能力大小顺序为:CME > BHT > CAEE > CPEE > CCE。

表2 白花菜子不同提取物对 OH 自由基的清除作用

Table 2 The OH scavenging activity of various extracts of *Cleome gynandra L.* seeds

浓度/ (mg · mL ⁻¹)	0.05	0.1	0.2	0.3
CPEE	20.82 ± 0.03	31.77 ± 0.01	42.02 ± 0.03	46.28 ± 0.06
CCE	19.69 ± 0.02	30.83 ± 0.02	36.50 ± 0.03	43.80 ± 0.04
CAEE	24.19 ± 0.05	35.15 ± 0.02	45.22 ± 0.02	53.62 ± 0.03
CME	25.65 ± 0.04	36.90 ± 0.04	49.00 ± 0.01	61.98 ± 0.03
BHT	29.02 ± 0.05	41.05 ± 0.03	56.28 ± 0.02	72.77 ± 0.02

表3 白花菜子不同提取物的还原能力

Table3 The reducing power of various extracts of *Cleome gynandra L.* seeds

浓度/ (mg · mL ⁻¹)	0.025	0.05	0.1	0.2	0.3
CPEE	0.155 ± 0.003	0.173 ± 0.002	0.241 ± 0.006	0.359 ± 0.002	0.492 ± 0.003
CCE	0.160 ± 0.003	0.183 ± 0.008	0.249 ± 0.002	0.350 ± 0.005	0.455 ± 0.007
CAEE	0.167 ± 0.008	0.189 ± 0.006	0.319 ± 0.009	0.462 ± 0.008	0.808 ± 0.004
CME	0.205 ± 0.003	0.243 ± 0.002	0.415 ± 0.003	0.578 ± 0.002	0.947 ± 0.001
BHT	0.184 ± 0.005	0.205 ± 0.003	0.388 ± 0.005	0.568 ± 0.007	0.914 ± 0.001

3 结论

(1) 通过对白花菜子四种不同溶剂提取物总多酚含量、总黄酮含量、DPPH 自由基清除率、OH 自由基清除率和还原能力的测定可见,总黄酮含量从高到底的顺序为乙酸乙酯提取物 > 甲醇提取物 > 石油醚提取物 > 二氯甲烷提取物,总多酚含量从高到底的顺序为甲醇提取物 > 乙酸乙酯提取物 > 石油醚提取物 > 二氯甲烷提取物。白花菜子提取物各种方法抗氧化活性的顺序与总多酚含量顺序一致。结果表明在四种白花菜子不同溶剂提取物中,白花菜

子乙酸乙酯提取物总黄酮含量最高,白花菜子甲醇提取物总多酚含量最高且具很强的抗氧化活性,估计与各部分含有的黄酮类化合物和单宁等成分有关。

(2) 白花菜子不同溶剂提取物表现出了不同程度的抗氧化活性,相比之下,白花菜子甲醇提取物具有很强的抗氧化活性,这可能和它含有的多酚类化合物有关。提示白花菜子提取物可以用作抗氧化药物或食品添加剂,有必要对它的化学成分、体内抗氧化活性和抗氧化机理进行进一步的研究。

参 考 文 献

- 刘畅,周家春. 植物多酚抗氧化性研究. 粮食与油脂, 2011; (2): 43—45
Liu Chang, Zhou Jiachun. Research on antioxidation of plant polyphenols. *Cereals & Oils*, 2011; (2): 43—45
- Petkovsek M M, Slatnar A, Stampar F, *et al.* The influence of organic/integrated production on the content of phenolic compounds in apple leaves and fruits in four different varieties over a 2—year period. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010; 90 (14): 2366—2378
- Jain A C, Gupta S M. Minor phenolic components of the seeds of *Gynandropsis gynandra*. *Journal of Natural Products*, 1985; 48 (2): 332—334
- Lwande W, JNdakala A, Hassanali A, *et al.* *Gynandropsis gynandra* essential oil and its constituents as tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) repellents. *Phytochemistry*, 1999; 50(3): 401—403
- Ghasemzadeh A, Jaafar H Z E, Rahmat A. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*, 2010; (15): 4324—4333
- 朱会霞. 覆盆子黄酮抗氧化活性研究. 广州食品工业科技, 2012; (10): 1302—1305
Zhu Huixia. Study on the antioxidant activity of raspberry flavones. *Modern Food Science and Technology*, 2012; 28(10): 1302—1304
- Shukla S, Mehta A, Mehta P, *et al.* Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2012; (64): 807—811
- Singh R, Ali A, Jeyabalan G, *et al.* Antioxidant activity of four different solvent extracts of the bark of *Ficus arnottiana* Miq. (M). *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 2013; 4 (5): 889—892

Determination of Total Phenolics Contents, Total Flavonoids Contents and Antioxidant Activities of Four Different Solvent Extracts of *Cleome gynandra* L. Seeds

ZHANG Yan¹, GENG Hong-mei^{1,2*}, CHEN Yan-fen¹, MIAO Qing-feng³

(Chemistry Department of Hengshui University¹, Hengshui 053000, P. R. China;

Department of Chemical Engineering, McMaster University², Hamilton L8S 4L7, Canada;

Department of Pharmacology, Hebei Medical University³, Shijiazhuang 050017, P. R. China)

[**Abstract**] Total phenolics contents, total flavonoids contents and antioxidant activities of four different solvent extracts of *Cleome gynandra* L. seeds were determined. Total phenolics contents of the extracts prepared were determined with Folin-Ciocalteu reagent according to the method using gallic acid as a standard phenolic compound. The total flavonoids contents of the extracts prepared were determined by UV spectrophotometry and rutin was used to make the calibration curve. Antioxidant activities of the extracts prepared were evaluated applying DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging, total reducing power and hydroxyl ion scavenging assay. The decreasing order of total flavonoids contents is acetate ethyl extract(CAEE) > methanol extract(CME) > petroleum ether extract(CPEE) > dichloromethane extract(CCE) in four different solvent extracts. The decreasing order of total phenolics contents is CME > CAEE > CPEE > CCE. The decreasing order of antioxidant activities is CME > CAEE > CPEE > CCE in all the methods which is in conformity with total phenolic content. The results clearly demonstrate that acetate ethyl extract has highest total flavonoids content, but methanol extract has highest total phenolics content and strongest antioxidant activities. It can be used to prevent oxidative stress related diseases and can be stored as food supplement. So further investigation of individual isolated compounds and their antioxidant activities in vivo and different antioxidant mechanisms is needed.

[**Key words**] *Cleome gynandra* L. seeds total phenolics content total flavonoids content antioxidant activity

(上接第 124 页)

Optimization of High Density Fermentation Medium for *Acinetobacter junii* 5-6

GUO Han-qing, WANG Xue-mei, XIONG Xiao-hui, LU Li-xia, LIU Yang

(College of Food Science and Light Industry, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, P. R. China)

[**Abstract**] The purpose of the research was to optimize the carbon source, initial pH of the microorganism *Acinetobacter junii*. 5-6 fermentation medium. At last these trace elements including K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaMoO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and $CaCl_2$ were respectively added into the most suitable medium, each kind of trace elements was 1 g/L, the best was K_2HPO_4 . However, the concentration of bacteria was not significantly improved, and the higher cost. So trace elements were not considered to add in the subsequent fermentation. Ultimately the optimal initial pH determined was 5.5. Optimal medium composition was Sunflower oil 2% (v/v), molasses 0.2% (m/v), NaCl 5 g/L, $NaNO_3$ 10 g/L and beef extract 5 g/L.

[**Key words**] MEOR high-density culture carbon source *Acinetobacter junii*