

# 产油微生物的筛选

叶思特<sup>1</sup>, 郭丽琼<sup>1,2</sup>, 刘晓蓉<sup>1,2</sup>, 陈晓阳<sup>2</sup>, 林俊芳<sup>1,2</sup>

(1 华南农业大学 食品学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 生物质能研究所, 广东 广州 510642)

**摘要:**采用苏丹黑 B 染色法、甲醇-氯仿法, 从 30 份土壤样品中筛选到 9 株产油霉菌和 4 株产油酵母。经 5.8S rDNA 序列分析, 9 株产油霉菌分别为蓝状菌 *Talaromyces trachyspermus*、嗜松青霉 *Penicillium pinophilum*、青霉 *Pe. sp.*、微紫青霉 *Pe. janthinellum*、淡紫拟青霉 *Paecilomyces lilacinus*、筒青霉 *Pe. simplicissimum*、棘孢曲霉 *Aspergillus aculeatus*、木霉 *Trichoderma sp.*、拟康宁木霉 *Tr. koningiopsis*, 4 株产油酵母分别是毕赤酵母 *Pichia caribbica*、假丝孢酵母 *Candida sp.*、季也蒙酵母 *Meyerozyma guilliermondii* 和季也蒙毕赤酵母 *Pi. guilliermondii*。通过摇瓶培养, 测定了各菌株的产油量, 结果表明: 霉菌产油量最高的是嗜松青霉, 产油量为 26.4%; 酵母产油量最高的是假丝孢酵母, 产油量为 44.3%。提取毕赤酵母的油脂, 采用气相色谱-质谱联用分析, 测得其油脂成分主要是 14~20 碳的短链脂肪酸。

**关键词:**产油微生物; 筛选; 微生物油脂

中图分类号: Q939.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2012)03-0384-04

## Screening of the Oleaginous Microorganisms

YE Si-te<sup>1</sup>, GUO Li-qiong<sup>1,2</sup>, LIU Xiao-rong<sup>1,2</sup>, CHEN Xiao-yang<sup>2</sup>, LIN Jun-fang<sup>1,2</sup>

(1 College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Institute of Biomass Energy, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Nine oleaginous moulds and four oleaginous yeasts were isolated from 30 soil samples by using Sudan Black B staining and methanol-chloroform extraction. These oleaginous microorganisms were identified by 5.8S rDNA sequence analysis. Nine oleaginous moulds were assigned to *Talaromyces trachyspermus*, *Penicillium pinophilum*, *Pe. sp.*, *Pe. janthinellum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Pe. simplicissimum*, *Aspergillus aculeatus*, *Trichoderma sp.* and *Tr. koningiopsis*. Four oleaginous yeasts were *Pichia caribbica*, *Candida sp.*, *Meyerozyma guilliermondii* and *Pi. guilliermondii*. The lipid yields of the oleaginous microorganisms were tested by cultivation in shake flasks. The highest lipid yield was up to 26.4% by *P. pinophilum* among 9 oleaginous moulds and 44% by *Candida sp.* among 4 oleaginous yeasts. The lipid extracted from *Candida sp.* was mainly composed of 14~20 short chain fatty acids by GC-MS analysis.

**Key words:** oleaginous microorganisms; screening; microbial lipids

全球石化资源日益枯竭, 国际油价强势上涨, 生态环境日渐恶化, 多渠道开发可再生油脂资源受到重视。生物柴油是性能优良、可直接替代化石柴油的生物燃料产品<sup>[1-2]</sup>, 其主要化学成分是长链脂肪酸(甲)酯。目前, 大多以动植物油脂为原料经过酯交换反应来生产。但由于动植物油脂资源非常有限, 且原

料成本极高, 因而限制了生物柴油产业的发展。科研人员长期探索和研究发现, 少数微生物能将碳水化合物、碳氢化合物和普通油脂在菌体内转化为油脂, 因此利用微生物生产油脂是一条开发新油源的好途径<sup>[3-5]</sup>。Ratledge 等<sup>[6]</sup>把油脂积累量超过细胞总量 20% 的微生物定义为产油微生物 (Oleaginous micro-

收稿日期: 2011-08-29

作者简介: 叶思特 (1987—), 男, 硕士研究生; 通信作者: 林俊芳 (1962—), 男, 教授, 博士, E-mail: linjf@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技攻关项目 (2009A020102004); 华南农业大学“211 工程”三期项目资助 (2009C010500001)

organisms). 已知的产油微生物包括细菌、酵母菌、霉菌和微藻<sup>[7]</sup>, 其中酵母菌和霉菌类真核微生物积累的油脂具有与常规植物油更相似的脂肪酸, 如菜籽油、棕榈油和大豆油等, 并且富含饱和及低度不饱和的长链脂肪酸, 是生产生物柴油的潜在原料. 后来, 关于微生物油脂的研究主要集中于获取功能性油脂, 如富含多不饱和脂肪酸的油脂<sup>[8]</sup>. 近来人们意识到通过微生物生产油脂及相关脂肪酸代谢衍生物, 对生物柴油产业可持续发展和生物质资源利用具有重要意义<sup>[9]</sup>. 在国内外众多微生物发酵产油的研究中, 粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* 所产油脂含量最高, 达到 72%<sup>[6]</sup>; 油脂含量超过 25% 的霉菌约有 64 种, 很多霉菌油脂含量在 20% ~ 25%<sup>[10]</sup>. 这些产油微生物发酵使用的碳源主要是葡萄糖、淀粉、甘油及谷类等, 生产成本低. 因此, 针对生物柴油的微生物油脂生产技术, 需要研究来源广泛、成分稳定、价格低廉的油脂发酵原料. 本试验筛选到 4 株产油酵母和 9 株产油霉菌, 并对其中 1 株酵母所产油脂的脂肪酸组成进行了初步分析, 以期为下一步产油工程菌株的构建、废弃木质纤维素的高效利用、微生物油脂的工业化生产奠定理论基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品

泥土采自湛江、石油平台污泥、华南农业大学树木园、南京紫荆山、河南漯河、中山植物园. 采集时, 先用小铲除去表土, 取离地表 5 ~ 15 cm 处的泥土, 装入聚乙烯袋中, 样品保存于 0 °C 的保温瓶中备用.

### 1.2 培养基及主要试剂

①苏丹黑 B、甲醇、氯仿等试剂购自上海化学试剂厂. ②酵母富集培养基: 甘油 100 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, 酵母粉 0.2 g/L, pH 6.0 ~ 6.5, 121 °C 灭菌 20 min. ③酵母筛选培养基: 葡萄糖 20 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, 酵母粉 0.5 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, 琼脂 20 g/L, 临用前加入 20 mL 预先灭菌的去氧胆酸钠溶液和 3.3 mL 链霉素溶液 (10 000 U/mL), pH 6.0 ~ 6.5, 121 °C 灭菌 20 min. ④酵母菌种保藏培养基: 麦芽汁 (10° Bx) 100 mL, 琼脂 2 g, pH 自然 (约 6.4). ⑤霉菌筛选培养基: 采用 PDA 培养基, 临用前在 1 000 mL 无菌培养基中加入用少量乙醇溶解的 0.1 g 氯霉素. ⑥产油微生物的初筛培养基采用限氮培养基: 葡萄糖 40 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7 g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L, 酵母粉 1 g/L,

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.5 g/L.

### 1.3 产油酵母的筛选

1.3.1 酵母的富集培养 取土壤样品 30 份, 每份称取 25 g, 置于 225 mL 无菌生理盐水中, 充分振摇, 制成土壤悬液; 无菌操作, 分别吸取 10 mL 溶液接入 90 mL 富集培养液中, 28 °C 恒温培养 24 h 后, 分别吸取 1 mL 菌悬液转接到 99 mL 新鲜富集培养液中, 连续培养 2 ~ 3 代.

1.3.2 酵母的分离纯化 准确移取 100 μL 培养了 2 ~ 3 代的富集培养液, 涂布于酵母筛选培养基上, 培养 2 ~ 4 d, 挑取平板上菌落形态有差异的单菌落进行划线分离纯化, 获得的纯菌株转接到麦芽汁斜面, 编号保存.

1.3.3 产油酵母的初筛 将分离纯化的酵母接入限氮培养基中, 于 28 °C、180 r/min 的恒温摇床上培养 3 d, 取 1 滴菌液于载玻片上, 涂片、加热固定, 用苏丹黑 B 染色 10 ~ 15 min 后, 倾去染料并用滤纸吸干, 再用二甲苯冲洗至无色, 最后用  $w$  为 0.5% 的沙黄复染 1 ~ 2 min, 水洗吸干. 显微镜下观察, 脂类能被染成蓝黑色<sup>[11]</sup>. 菌株用 PDA 斜面编号保存.

### 1.4 产油霉菌的筛选

1.4.1 霉菌的分离纯化 取土壤样品 30 份, 每份取 25 g 加入 225 mL 无菌生理盐水中, 摇匀, 制成土壤悬液; 无菌吸取 100 μL 接到平板上, 28 °C 恒温培养 5 ~ 7 d 后, 挑取平板上菌落颜色有差异的单菌落进行划线分离纯化, 获得的纯菌株转接到 PDA 斜面, 编号保存.

1.4.2 产油霉菌的初筛 将分离纯化的菌株接入限氮培养基中, 于 28 °C、180 r/min 的恒温摇床上培养 5 d, 菌丝用滤纸过滤, 轻压风干, 浸泡于苏丹黑 B 染液中 10 min, 再用  $\varphi$  为 95% 酒精漂洗, 致使滤纸呈白色, 观察菌体, 带有蓝黑色则含有脂质物质<sup>[12]</sup>. 菌种用 PDA 斜面编号保存.

### 1.5 产油微生物的初步鉴定

1.5.1 总 DNA 提取 参考王艺红<sup>[13]</sup> 的 FEDB 法.

1.5.2 5.8S rDNA PCR 扩增 分别使用 ITS1、ITS4 2 种通用引物进行 PCR 扩增, 引物序列为: ITS1 TC-CGTAGGTGAACCTGCGG; ITS4 TCCTCCGCTTATT-GATATGC. 反应条件为: 94 °C 5 min; 按 94 °C 40 s, 53 ~ 49 °C 40 s, 72 °C 90 s 进行 30 次循环; 72 °C 7 min; 4 °C 保存. PCR 产物由生工生物工程 (上海) 有限公司进行序列测定, 得到的序列在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 上进行 blast, 并使用遗传进化树做分析, 从而初步鉴定菌株.

## 1.6 油脂的提取

1.6.1 酸热法破碎细胞 产油微生物通过限氮培养法获得的发酵液在常温、5 000 r/min 下离心 6 min, 收集菌体到 50 mL 离心管中. 在离心管中加入 4 mol/L 的盐酸 10 mL, 浸泡过夜, 沸水浴 15 ~ 20 min.

1.6.2 甲醇-氯仿法抽提油脂 在酸热法破碎所得液体冷却后加入 10 mL 甲醇和 10 mL 氯仿, 充分振荡后离心, 取氯仿层, 加入等体积  $w$  为 0.1% 的氯化钠溶液, 混匀, 离心, 去氯仿层, 真空旋转蒸发即得油脂.

1.6.3 产油率计算 产油率 = 油脂质量/菌体干质量  $\times 100\%$ .

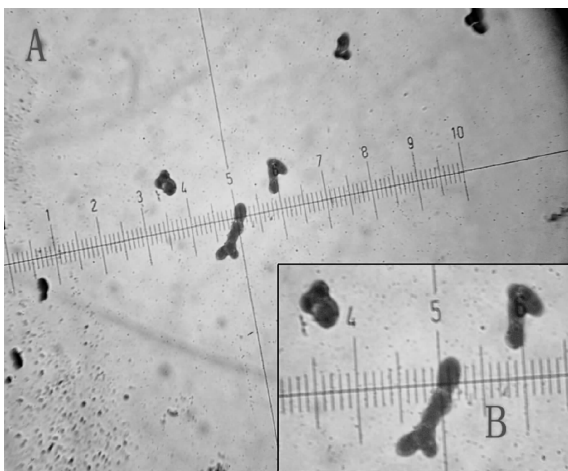
## 1.7 油脂成分的分析

选取产油率最高的菌株, 采用限氮培养法, 发酵液 pH 始终维持 6.5, 于 28 °C、180 r/min 的恒温摇床培养 7 d 后, 提取油脂. 油脂先经甲酯化前处理, 再用气相色谱-质谱联用 (Gas chromatography and mass spectrometry, GC-MS) 分析测定各成分及含量.

## 2 结果与分析

### 2.1 产油微生物的初筛

2.1.1 产油酵母的粗筛 酵母菌经过限氮培养后, 取菌液进行苏丹黑 B 染色并在显微镜下观察, 结果见图 1. 酵母细胞内呈现明显的黑色斑, 说明该酵母细胞已有脂肪积累. 这是因为酵母积累油脂后其胞内存在的脂肪体可被苏丹黑 B 染色, 在光学显微镜下可清晰地观测到. 根据这个原理可利用镜检法对酵母油脂积累表型进行快速初筛, 本研究筛选出 4 株产油酵母, 分别编号为 J2-2A、J2-2B、J3-2A、J3-2B.



A: 10  $\times$  10; B: 10  $\times$  40

图 1 J2-2A 菌株细胞苏丹黑 B 染色后的显微照片

Fig. 1 Micrograph of yeast J2-2A stained by Sudan Black B

2.1.2 产油霉菌的初筛 由于霉菌菌丝体发达, 光学显微镜制片过程繁琐, 且不利于限氮发酵培养, 而滤纸能吸附受挤压菌体的油脂, 因而采用滤纸法对筛选霉菌菌丝进行苏丹黑 B 染色, 结果见图 2.



图 2 M2B 菌株细胞的苏丹黑 B 染色图

Fig. 2 Picture of mould M2B stained by Sudan Black B

菌体经过苏丹黑 B 染色后呈现蓝黑色, 油脂含量越多, 染色越深, 说明供试霉菌经过限氮培养后菌丝细胞中有脂肪积累. 依此法, 本研究筛选获得了 9 株产脂肪的霉菌, 分别编号为 M1C、M2B、M2C、M2E、M3C、M4C、M5A、M5B、M5D.

### 2.2 产油微生物的相似性比对

使用 ITS (Internally transcribed spacer) 法对产油微生物进行相似性比对, 结果见表 1.

表 1 产油酵母和产油霉菌相似性比对结果

Tab. 1 Results of oleaginous yeasts and oleaginous moulds by blast

序号	生物名	相似度/ 覆盖率/	
		%	%
M1C	篮状菌 <i>Talaromyces trachyspermus</i>	99	97
M2B	嗜松青霉 <i>Penicillium pinophilum</i>	98	97
M2C	青霉 <i>Penicillium</i> sp.	95	95
M2E	棘孢曲霉 <i>Aspergillus aculeatus</i>	99	99
M3C	微紫青霉 <i>Penicillium janthinellum</i>	99	97
M4C	淡紫拟青霉 <i>Paecilomyces lilacinus</i>	99	95
M5A	拟康宁木霉 <i>Trichoderma kongingiopsis</i>	99	97
M5B	木霉 <i>Trichoderma</i> sp.	99	97
M5D	筒青霉 <i>Penicillium simplicissimum</i>	99	98
J2-2A	毕赤酵母 <i>Pichia caribbica</i>	99	100
J2-2B	假丝孢酵母 <i>Candida</i> sp.	99	97
J3-2A	季也蒙酵母 <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99	98
J3-2B	季也蒙毕赤酵母 <i>Pichia guilliermondii</i>	99	100

### 2.3 产油率的测定

把获得的初筛菌株进一步经过限氮扩大培养,收集菌体并通过酸热法、甲醇氯仿法抽提获得油脂,计算其产油率,结果见表2.

表2 产油酵母和产油霉菌的产油率

Tab.2 Lipid yields of oleaginous yeasts and oleaginous moulds

序号	产油率/%	序号	产油率/%
M1C	21.6	M5B	25.4
M2B	26.4	M5D	18.6
M2C	22.8	J2-2A	23.1
M2E	20.6	J2-2B	44.3
M3C	19.3	J3-2A	21.0
M4C	17.6	J3-2B	17.0
M5A	24.4		

由表1可知,所有初筛的菌株均可产油,表明初筛方法准确可行.霉菌的产油率在17%~27%,其中产油最高的菌株为M2B,产油率达到26.4%;酵母的产油率在17%~45%,其中菌株J2-2B的产油率最高,达44.3%.所以选择酵母菌株J2-2B用于后期发酵生产、油脂鉴定试验.

### 2.4 油脂成分的测定

菌株J2-2B发酵所得油脂经过GC-MS分析,其成分及质量比见表3.

表3 产油酵母J2-2B的油脂成分及质量比分析

Tab.3 Lipid analysis data of yeast J2-2B

$t_{\text{保留}}/\text{min}$	化学式	名称	$w/\%$
15.44	$C_{14}H_{28}O_2$	肉豆蔻酸	0.62
16.87	$C_{15}H_{30}O_2$	十五碳酸	0.67
18.34	$C_{16}H_{30}O_2$	棕榈油酸	4.74
18.94	$C_{16}H_{32}O_2$	棕榈酸	17.21
20.62	$C_{17}H_{32}O_2$	环甲基十六碳酸	5.60
21.19	$C_{17}H_{34}O_2$	十七碳酸	4.00
22.73	$C_{18}H_{32}O_2$	亚油酸	1.41
23.28	$C_{18}H_{34}O_2$	油酸	54.04
23.69	$C_{18}H_{34}O_2$	反式油酸	9.55
25.17	$C_{19}H_{36}O_2$	十九碳烯酸	0.51
25.92	$C_{19}H_{38}O_2$	十九碳酸	0.99
28.10	$C_{20}H_{38}O_2$	二十碳烯酸	0.43
29.03	$C_{20}H_{40}O_2$	二十碳酸	0.23

由表3可知,油脂的主要成分为 $C_{14}$ ~ $C_{20}$ 脂肪酸,其中 $C_{16}$ 脂肪酸(棕榈酸)和 $C_{18}$ 脂肪酸(油酸)质量比较高,分别为17.21%和54.04%.

## 3 讨论与结论

目前关于产油微生物的筛选方法很多<sup>[4,14-15]</sup>,但是实际操作复杂、繁琐.本试验研究出一套操作简

易、效果优良的产油微生物筛选体系与方法:选用以甘油为唯一碳源的富集培养,能有效排除杂菌、大量保留和富集酵母菌,再配合链霉素以及脱氧胆酸钠的复合筛选,从而快速初筛出产油酵母;对于产油霉菌的筛选,采用滤纸碾压的方法对霉菌染色,简单、便捷而有效,避开了霉菌用光学显微镜观察时制片过程中的繁杂手续.

本研究筛选出一株高油脂菌株假丝孢酵母,产油率高达44.3%;其他菌株的产油率大多为17%~27%,文献报道的产油率大多为20%~25%<sup>[1,4]</sup>,本试验与前人研究结果基本一致.这为下一步高产油菌株的改造、产油发酵条件的研究提供了理论基础.

刘淑君等<sup>[16]</sup>以废糖液为碳源,用*Lipomyces starkey*发酵得菌体油脂质量比为53.6%,其油脂的脂肪酸组成主要有软脂酸、油酸、棕榈油酸、硬脂酸、亚麻酸.本试验中,假丝孢酵母发酵所产的油脂成分与已报道的比较一致,即主要为 $C_{16}$ 和 $C_{18}$ 脂肪酸,其总质量比占70%以上,其中油酸质量比最高,达54.04%;棕榈酸次之,为17.21%.

试验过程中,产油微生物的细胞破碎-油脂提取采用酸热法和甲醇氯仿法,此法具有操作简单、细胞破碎完全、提取速度快、得油率高等优点,但是一次性批量生产的量少,盐酸、甲醇和氯仿等试剂的消耗量大,导致提取成本高、环境污染大,因此,提取工艺的改进还有待深入研究.

### 参考文献:

- [1] TYSON K S. Biodiesel research progress 1992 - 1997: NREL/TP-580-24443 [R/OL]. National Renewable Energy Laboratory. NREL technical report. Denver West Parkway Golden; NREL, 1998 [2010-11-22]. <http://www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24433.pdf>.
- [2] 郭平银,肖爱军,郑现和,等.能源植物的研究现状与发展前景[J].山东农业科学,2007,4:126-129.
- [3] EVANS C T, SCRAGG A H, RATLEDGE C. Regulation of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeasts by adenine nucleotides[J]. Eur J Biochem, 1983, 132(3):609-615.
- [4] BOTHAM P A, RATLEDGE C. A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous micro-organisms [J]. Microbiology, 1979, 114(2):361-375.
- [5] PALMIERI L, PALMIERI F, RUNSWICK M J, et al. Identification by bacterial expression and functional reconstitution of the yeast genomic sequence encoding the mitochondrial dicarboxylate carrier protein[J]. FEBS Letters, 1996, 399(3):299-302.

- [8] MANKERTZ A, MANKERTZ J, WOLF K, et al. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus[J]. J Gen Virol, 1998, 79(2):381-384.
- [9] NAWAGITGUL P, MOROZOV I, BOLIN S R, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein[J]. J Gen Virol, 2000, 81(9):2281-2287.
- [10] LEKCHAROENSUK P, MOROZOV I, PAUL P S, et al. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1, PCV2[J]. J Virol, 2004, 78(15):8135-8145.
- [11] LIU Qiang, TIKOO S K, BABIUK L A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2[J]. Virology, 2001, 285(1):91-99.
- [12] TRUNDOVA M, CELER V. Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimized *E. coli* cells[J]. Virus Genes, 2007, 34(2):199-204.
- [13] LOU Zhong-zi, LI Xue-rui, LI Zhi-yong, et al. Expression and antigenicity characterization for truncated capsid protein of porcine circovirus type 2[J]. Can J Vet Res, 2011, 75(1):61-64.
- [14] KONG Wen-tao, KONG Jian, HU Shu-min, et al. Enhanced expression of PCV2 capsid protein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis* by codon optimization[J]. World J Microbiol and Biotechnol, 2011, 27(3):651-657.
- [15] 赵玲, 朱玲, 郭万柱, 等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的表达及在 ELISA 中的初步应用[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(6):808-814.
- [16] 姜媛媛, 尹成凯, 李晋南, 等. 利用 SUMO 融合系统高效表达可溶性重组蛋白的研究[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(10):57-62.
- [17] GAGNON C A, MUSIC N, FONTAINE G, et al. Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): a type 1 and type 2 PCV recombinant[J]. Vet Microbiol, 2010, 144(1/2):18-23.
- [18] MAHE D, BLANCHARD P, TRUONG C. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes[J]. J Gen Virol, 2000, 81(7):1815-1824.
- [19] TRUONG C, MAHE D, BLANCHARD P, et al. Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection[J]. Arch Virol, 2001, 146(6):1197-1211.
- [20] BUTT T, EDAVETAL S, HALL J. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. [J]. Protein Expr Purif, 2005, 43(1):1-9.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 387 页)

- [6] RATLEDGE C, WYNN J P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms[J]. Adv Appl Microbiol, 2002, 51:1-51.
- [7] RATLEDGE C. Lipid biotechnology: A wonderland for the microbial physiologist [J]. J Am Oil Chem Soc, 1987, 64(12):1647-1656.
- [8] COHEN Z, RATLEDGE C. Single Cell Oils[M]. Campaign: AOCS Press, 2005:1-20.
- [9] 赵宗保. 加快微生物油脂研究为生物柴油产业提供廉价原料[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(2):8-11.
- [10] 朱丹实, 刘贺, 吕艳芳. 产油脂霉菌的研究进展[J]. 粮油加工, 2009(6):54-57.
- [11] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983:32-34.
- [12] 杨虹, 林娟, 欧阳瑞珍. 产油微生物的培养[J]. 福州大学学报, 1997, 25(5):103-106.
- [13] 王艺红. 食用菌 DNA 提取方法研究[J]. 食用菌, 2008, 30(3):18-20.
- [14] THAKUR M S, PRAPULLA S G, KARANTH N G. Estimation of intracellular lipid by the measurement of absorbance of yeast cells stained with Sudan Black B[J]. Enzyme Microb Technol, 1989, 11(4):252-254.
- [15] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37:911-917.
- [16] 刘淑君, 杨文博, 施安辉. 酵母菌 HL 的批次发酵及发酵动力学初探[J]. 微生物学通报, 2000, 27(1):8-11.

【责任编辑 李晓卉】