

# 海鞘中产油脂共附生真菌的筛选及脂肪酸组成成分分析

柴慧子, 黄蕴怡, 雷晓凌, 聂芳红, 杨联胜

(广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 水产品深加工广东普通高等学校重点实验室, 广东湛江 524088)

**摘要:** 从 20 株海鞘共附生真菌中筛选产油脂菌。采用苏丹混合溶液染色法初筛, 摇瓶复筛, 酸热法提取油脂, 气相色谱-质谱联用法 (GC-MS) 测定其脂肪酸组成, 形态学观察结合分子生物学鉴定产油脂真菌。结果表明: 经初筛和复筛得到 3 株油脂含量均达 20.00% 以上的菌株, 分别为菌株 P2-18、P1-17 和 P2-4, 脂肪酸组成分析不饱和脂肪酸分别占其脂肪酸组成的 93.90%、55.80% 和 65.00%。其中  $\gamma$ -C18:3( $\gamma$ ) 亚麻酸、C16:1 棕榈一稀酸和 C18:1 油酸含量最多。P2-4 含 23.2% 的  $\gamma$ -C18:3( $\gamma$ ) 亚麻酸, 约占其不饱和脂肪酸的 24.50%。3 株真菌经形态学鉴定, 结合分子生物学 ITS 区序列鉴定, 菌株 P2-4 为桔青霉 (*Penicillium citrinum*), P1-17 为青霉属 (*Penicillium* sp. 12 BRO-2013), P2-18 为土曲霉 (*Aspergillus terreus*)。因此, 该海鞘共附生真菌具备开发微生物功能性油脂的潜力, 具有良好的开发应用前景, 值得进一步研究。

**关键词:** 海鞘; 共附生真菌; 产油脂真菌; 脂肪酸

文章编号: 1673-9078(2016)12-287-291

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.044

## Screening of Oil-producing Fungi from *Ascidacea* and Analysis of Fatty Acid Composition

CHAI Hui-zi, HUANG Yun-yi, LEI Xiao-ling, NIE Fang-hong, YANG Lian-sheng

(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, Zhanjiang 524088, China)

**Abstract:** This is the first report of the screening of oil-producing endophytic fungi isolated from *Ascidacea*. A mixed solution of Sudan dyes was used in the primary screen to obtain oil-producing fungi, and the shake-flask method was performed to screen for high-yield oil-producing fungi, which were then identified by morphology and molecular biology. The oil produced by three dominant strains was extracted using the acid-heating method to determine the oil content and analyze the lipid components by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed that three fungi (P2-4, P1-17, and P2-18) had average oil contents above 20%, and these were identified as *Penicillium citrinum*, *Penicillium* sp. 12 BRO-2013, and *Aspergillus terreus*, respectively. The composition of unsaturated fatty acids from P2-18, P1-17, and P2-4 accounted for 93.9%, 55.8% and 65.0%, respectively, of total fatty acids. The main components of the oil were C18:3  $\gamma$ -linolenic acid, C16:1 palmitic acid, and C18:1 oleic acid. The highest C18:3  $\gamma$ -linolenic acid proportion was from P2-4, and was up to 24.5% of total unsaturated fatty acids. *Ascidacea* endophytic fungi have the potential for producing microbial functional oil, which deserves further research and development.

**Key words:** *Ascidacea*; endophytic fungi; oil-producing fungi; fatty acid

收稿日期: 2016-01-05

基金项目: 广东大学生科技创新培育专项 (pdjh2015a0243); 广东省科技厅 (2013B021100015)

作者简介: 柴慧子 (1993-); 黄蕴怡 (1993-), 女, 本科生, 研究方向: 食品科学, 共同第一作者

通讯作者: 雷晓凌 (1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 海洋微生物及活性物质

海鞘属脊索动物门, 尾索动物亚门, 海鞘纲, 在天然海区附着珍珠贝笼上生长<sup>[1]</sup>。研究发现, 海洋无脊椎动物滋养的共附生微生物平均每种动物达数百种, 其密度高者占宿主动物总重量的 40%, 大都属于难培养的微生物范畴。海鞘是营固着生活的动物, 体外被一层类似植物纤维素的被囊象鞘一样套着, 是动物界独一无二的。海鞘独特的摄食和滤食系统使其体

内和体表富集了大量的微生物<sup>[2]</sup>。目前对海鞘共附生细菌有研究报道,但对海鞘共附生真菌的研究国内还未见报道。相对于陆地真菌而言海洋真菌能够耐受海洋特有的如高盐、高压、低氧与低光照等多种极端条件,因此形成了独特的代谢生理特性,产生了化学结构独特的次级代谢产物<sup>[3]</sup>。微生物油脂(microbial oils),是由酵母、霉菌、细菌和藻类等微生物在一定条件下利用碳源和氮源、辅以无机盐生产的油脂。霉菌作为一类主要的产脂真菌如深黄被孢霉、高山被孢霉和拉曼被孢霉等<sup>[4]</sup>。油酸、棕榈酸和亚油酸含量最高,其他脂肪酸如亚麻酸、花生酸、花生四烯酸、二十二碳六烯酸及一些特殊脂肪酸存在于变异菌株中,且含量差异较大,不饱和脂肪酸因其具有重要的生理功能和较高经济价值已经成为当今产油脂微生物定向育种发展方向。有些菌株的油脂在脂肪酸组成上同植物油相似,富含饱和和低度不饱和的长链脂肪酸,是生产生物柴油的潜在原料。

目前对海鞘共附生真菌中筛选产油脂真菌及其脂肪酸成分分析还未有报道。本文对采自湛江市徐闻虾塘的海鞘,分离共附生真菌,筛选产油脂真菌并分析其脂肪酸组成,以期能够获得产油脂含量较高和不饱和脂肪酸含量高的菌株,作为功能性油脂微生物被开发利用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

海鞘,于2014年3月15日采自广东省雷州市流沙虾塘。

#### 1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基,购自于北京陆桥技术有限公司;淀粉培养基配方(g/L):可溶性淀粉 2.00 g,琼脂 25.00 g,牛肉膏 5.00 g,蛋白胨 10.00 g,氯化钠 5.00 g;发酵培养基(g/L):葡萄糖 150.00 g,酵母膏 0.50 g,磷酸二氢钾 2.00 g,硫酸铵 2.00 g,柠檬酸钠 0.10 g,70%的人工海水,pH值 5.80 以上。以上培养基均由采自湛江东海岛的海水配制,115℃下蒸汽灭菌 25 min。

$$\text{干菌体得率(g/L)} = \frac{\text{带干菌体培养皿} - \text{培养皿净重}}{\text{发酵液总体积}} (\text{g/L}) \quad (1-1)$$

$$\text{油脂含量(\%)} = \frac{\text{油脂质量}}{\text{干菌体质量}} \times 100\% \quad (1-2)$$

### 1.1.3 试剂

苏丹II染色液:按0.20%(m/V)称取苏丹II试剂溶于95%乙醇中;苏丹IV染色液:按0.20%(m/V)称取苏丹IV试剂溶于95%乙醇中;苏丹混合液:苏丹II染色液和苏丹IV染色液1:1混合。氯仿-甲醇溶液:氯仿-甲醇溶液按体积比2:1经行配比,用棕色容量瓶定容。

### 1.1.4 仪器设备

ZQ-F160 振荡培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);CF16RX 低温离心机(日本日立公司);LS-B50L 立式压力蒸汽灭菌锅(上海华线医用核子仪器有限公司);SPX-150B-Z 型生化培养箱(上海博讯实业有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 海鞘共附生真菌的分离

样品处理 在无菌环境下先用无菌水清洗海鞘表面,再分别取海鞘的外壳、内脏各10.00 g,用均质机均质后,放入90.00 mL 无菌水中,充分震荡混匀。从中准确量取1.00 mL 于装有9.00 mL 无菌水的玻璃管中,再进行梯度稀释,制成 $10^{-1}$ 和 $10^{-2}$ 梯度的稀释液。吸取100  $\mu\text{L}$  样品中稀释度为 $10^{-1}$ 和 $10^{-2}$ 的稀释液,用灭菌涂布棒将其均匀涂布到培养基平板上,于28℃培养4-5 d。

### 1.2.2 产油脂菌的筛选

(1)摇瓶染色法初筛产油脂菌:挑取部分菌株接种到装有50.00 mL 发酵培养基的250.00 mL 锥形瓶中,于28℃,180 r/min 摇床培养5 d。发酵液进行抽滤得到菌丝体,烘干,滴加1.00~2.00 mL 苏丹染液于室温将其染色2 min,再将染色后的菌丝于水中洗涤5 min,最后挑取菌丝制作临时装片,镜检观察。根据油滴颗粒大小及密集程度对产油脂量进行评价。

(2)摇瓶复筛高产油脂菌:选择胞内脂肪粒大且多的菌株进行复筛。按同样方法将菌株接入发酵培养基内,28℃、180 r/min 摇床培养5 d,发酵液抽滤得到菌体,烘干,称重,计算其油脂含量,从中筛选出油脂含量高的菌株。

其中,干菌体得率和油脂含量计算公式分别见(1-1)和(1-2)。

1.2.3 油脂的提取和不饱和脂肪酸组成分析

油脂的提取：酸热法，对油脂含量高的菌株的干菌体进行称重，然后每 1.00 g 干菌体添加 4.00 mol/L 的盐酸 6.00 mL，室温下放置 30 min 后，再于沸水浴加热 10 min，-20 ℃速冷，以此重复 2~3 次。之后加入 2 倍体积的氯仿-甲醇(2:1, V/V)混合液，充分振荡，2 000 r/min 条件下离心 10~15 min，挥发除去氯仿即得油脂。

1.2.4 气象色谱-质谱联用分析脂肪酸组成

0.20 g 油脂加入皂化液（0.50 mol/L KOH-甲醇）2.00 mL，混匀，于 60 ℃水浴皂化至油珠消失，冷却后加入甲酯化液（14%三氟化硼-甲醇）2.00 mL，于 60 ℃水浴甲酯化 30 min，冷却后加入正己烷 1.00 mL，饱和氯化钠 1.00 mL，离心后取上清液，即可用 AutosystemXL 气相色谱仪(美国 Perkin-Elmer 公司)分析油脂组成。气相色谱条件：FAMEwax 石英毛细管色谱柱（30×0.32×0.25）；检测器为氢火焰离子检测器（FID）；进样口温度 225 ℃；检测器温度 250 ℃；分流比 10:1；线速 30 cm/min；衰减 16。程序升温条件为：柱温 190 ℃，维持 1 min，以 0.3 ℃/min 升至 191 ℃，再以 4 ℃/min 升至 225 ℃，维持 15 min。

2 结果与分析

2.1 海鞘共附生真菌的分离

采用 2 种培养基分别对海鞘外壳和内脏中的菌株进行分离纯化，最终得到 20 株共附生真菌，结果见表 1。真菌在内脏中的分离出来的数量较多，与外壳相比有某些更适合微生物生长的因素，如微量元素等。由表 1 可知，PDA 培养基分离效果较好，说明 PDA 培养基模拟的真菌生长环境比较适于海鞘共附生真菌的生长。

表 1 海鞘共附生真菌分离

Table 1 Isolation of Ascidiacea symbiotic fungi

宿主/株	培养基/株		合计
	PDA/株	淀粉培养基/株	
外壳	3	0	3
内脏	15	2	17
合计	18	2	20

2.2 产油脂真菌的筛选

2.2.1 产油脂菌株的初筛

对 20 株海鞘共附生真菌恒温摇床培养 5 d，通过苏丹混合染色法对其染色，苏丹混合液能使菌丝中的油滴着橙色至深红色，油滴的着色的深浅跟真菌菌丝

的油脂含量呈近似的正比关系。根据每株菌产油脂颗粒和密集程度作为指标判断产油脂能力。染色镜检观察结果如图 1 所示，图中 a、b 和 c 颜色逐步加深，脂肪颗粒依次增加，说明其油脂含量依次增加。

根据染色镜检结果筛选产油脂真菌，结果见表 2。根据镜检脂肪粒的个数，评价产油脂量，共分为 5 个档次，用“+”表示，“+”越多油脂含量越高，最终筛选出“+++++”真菌 3 株。

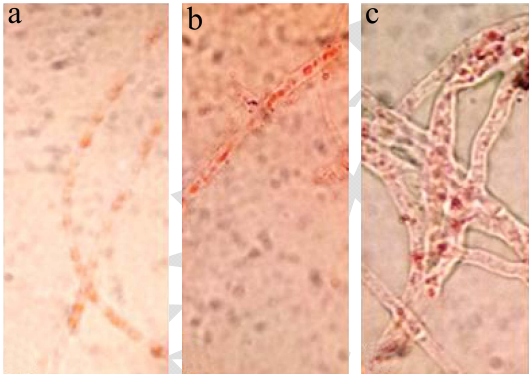


图 1 菌株苏丹混合液染色油脂粒显微图(10×40)

Fig. 1 Three micrographs under mixed Sudan staining (10×40)

注：a，染色较浅，脂肪颗粒分布较少；b，染色较深，脂肪颗粒分布较密集；c，染色很深，脂肪颗粒分布很密集。

表 2 苏丹混合染色筛选产油脂真菌

Table 2 Screening of oil-producing fungi by mixed Sudan staining

菌株编号*	脂肪粒镜检状况	镜检评价
P2-18	脂肪粒大，分布密集	+++++
P2-4	脂肪粒大，分布密集	+++++
P1-17	脂肪粒大，分布密集	+++++
P2-13	脂肪粒中，分布较密集	+++
D2-4	脂肪粒中，分布较密集	+++
P2-8	脂肪粒中，分布较密集	+++
D2-2	脂肪粒中，分布较密集	+++
P2-14	脂肪粒中，分布较密集	+++
P2-15	脂肪粒较大，分布较疏松	++
P2-9	脂肪粒小，分布疏松	+
P2-1	脂肪粒小，分布疏松	+
P2-2	脂肪粒小，分布疏松	+
P1-7	脂肪粒小，分布疏松	+
D2-1	脂肪粒小，分布疏松	+
P2-12	无	-
P2-7	无	-
P1-2	无	-
P2-5	无	-
P2-7	无	-
P1-6	无	-

注：+：脂肪粒小，分布较少；++：脂肪粒较大，分布较疏松；+++：脂肪粒中，分布较密集；++++：脂肪粒大，分布密集；-：无脂肪粒；菌株编号为 P/Dx-y；P/D 分别为 PDA 或淀粉培养基；x 为 1 和 2，分别表示从外壳和内脏分离菌株；y 表示分离菌株编号。

2.2.2 高产油脂菌株的摇床复筛

将前面筛选出的 P2-4、P1-17 和 P2-18 三株菌的产油脂能力相对较强，分别对其进行摇床复筛，并进行生物量的测定，结果见表 3。P2-4 和 P2-18 油脂层金黄色，粘稠状。P1-17 油脂层浅黄色，较稀薄。P2-18 干菌体得率 7.20 g/L，油脂含量为 21.50%；P1-17 和 P2-4 干菌体得率较低，油脂含量分别为 20.10%和 20.70%。

表 3 3 株产油脂菌株油脂粗含量分析

Table 3 Determination of crude oil content of three oil-producing fungi

菌体	干菌体得率/(g/L)	油脂含量/%
P2-18	7.20	21.50
P1-17	4.56	20.10
P2-4	4.45	20.70

3 株高产菌株经形态观察初步鉴定，并经 ITS 区序列鉴定，菌株 P2-4 为桔青霉 (*Penicillium citrinum*) (序列号 KF624801.1)，P1-17 为青霉属 (*Penicillium* sp. 12 BRO-2013) (*Penicillium* sp.12 BRO-2013) (GenBank 序列号 KF624801.1)，P2-18 为土曲霉 (*Aspergillus terreus*) (GenBank 序列号 KR610363.1)。

2.2.3 3株真菌中油脂不饱和脂肪酸的含量分析

表 4 3 株真菌油脂的脂肪酸成分分析

Table 4 Analysis of fatty acid compositions of three

油脂脂肪酸组成	P2-4	P1-17	P2-18
C14:1	0.25	0.20	1.80
C15:1	0.16	-	-
C16:1	17.86	22.01	25.34
C17:1	0.39	1.07	1.62
C18:1	16.28	21.46	28.41
C18:2 (t)	33.89	6.76	4.48
C18:3 (γ)	23.16	4.26	3.34
C18:3	0.67	-	-
C20:1	0.59	-	-
C20:2	0.06	-	-
C20:3n6	0.05	-	-
C22:1	0.22	-	-
C24:1	0.30	-	-

C4:0	5.06	0.47	0.43
C6:0	0.06	1.01	1.12
C8:0	0.05	0.28	0.18
C10:0	0.15	0.44	0.62
C11:0	0.39	2.15	2.51
C12:0	0.20	0.28	0.32
C13:0	0.03	0.41	0.43
C14:0	0.04	0.69	-
C16:0	-	0.92	1.41
C17:0	-	-	0.92
C18:0	0.06	0.62	0.96
C20:0	0.04	-	-
C23:0	0.04	-	-
未知组分	-	35.10	26.13
饱和脂肪酸含量	0.61%	9.10%	8.90%
不饱和脂肪酸含量	93.90%	55.80%	65.00%

3株真菌油脂的脂肪酸组成分析结果见表4，分别列出3株真菌产油脂中各饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸的名称及含量。将P2-18中各不饱和脂肪酸含量相加计算得到P2-18油脂中不饱和脂肪酸占其脂肪酸成分93.90%，P1-17油脂中不饱和脂肪酸含量达到55.80%，P2-4油脂中不饱和脂肪酸含量达到65.00%。表明该3株真菌具有较强的合成功能性油脂的能力。其中含量较高的不饱和脂肪酸如C16:1棕榈一稀酸、C18:1油酸和γ-C18:3(γ)亚麻酸等具有较高的利用价值。

3 讨论

本研究从海鞘中分离产油脂共附生真菌，得到菌株 P2-4、P1-17 和 P2-18 油脂含量为 21.50%、20.70% 和 20.10%。Ratledge<sup>[5]</sup>等把油脂含量超过 20.00%的定义为产油脂微生物，目前研究较多的有嗜松青霉 26.40%，棘孢曲霉 20.60%等霉菌的油脂含量多在 20.00%~25.00%之间<sup>[6]</sup>。从产油脂量看，3 株真菌因其未通过发酵条件优化和诱变育种与已发现的通过发酵条件优化和诱变育种的青霉菌生产油脂含量最高为 64.15%<sup>[7]</sup>相比，油脂含量较低，但通过发酵条件优化和变异育种后油脂含量能大幅提高。周翠霞<sup>[8]</sup>等研究通了紫外线和亚硝基胍联合诱变和乙酰水杨酸推理筛选，获得高产菌株 N0.1-112，油脂含量量为 20.02g/L，比原始出发菌株提高了 580.06%且遗传稳定。P2-4、P1-17 和 P2-18 油脂中不饱和脂肪酸含量分别为 93.90%、55.80%和 65.00%。在以往的相关报道中脂肪酸中不饱和脂肪酸含量达到 90%以上的报道尚少，尤其是 P2-4 不饱和脂肪酸含量达 93.9%，比已发现的青霉和曲霉生产油脂得到的不饱和脂肪酸含量高很多

[9]. 3 株真菌  $\gamma$ -C18:3( $\gamma$ )亚麻酸、C16:1 棕榈一烯酸和 C18:1 油酸含量最多。P2-4 含 23.20%的  $\gamma$ -C18:3( $\gamma$ )亚麻酸, 约占其不饱和脂肪酸的 24.50%。Fakas<sup>[10]</sup>研究了不同碳源、氮源含量下发酵刺孢小克银汉霉, 其脂肪酸中( $\gamma$ )亚麻酸含量为 16.70%, R Maali-Amiri<sup>[11]</sup>等通过基因重组诱导深黄被孢霉( $\gamma$ )亚麻酸含量从 16.10% 提高到 31.60%。(  $\gamma$ )亚麻酸是组成人体各组织生物膜的结构材料, 也是合成前列腺素的前体。另有研究表明,  $\gamma$ -亚麻酸可抑制人肝癌细胞生长。抑制人结肠癌、胃癌和胰癌细胞 DNA 的合成,  $\gamma$ -亚麻酸加 Fe(II)对治疗乳腺癌效果显著<sup>[12]</sup>。

目前研究曲霉和青霉产油脂的脂肪酸组成成分主要有油酸、棕榈油酸和亚麻酸等。与本试验的 2 株青霉, 1 株曲霉结果基本一致。在真菌产油脂过程中碳氮比、温度、pH 和紫外诱变等都会影响油脂的脂肪酸组成。郭小宇<sup>[13]</sup>等人研究霉菌合成脂质由多种脂肪酸组成, 以油酸、棕榈酸和亚油酸含量最高, 其他脂肪酸如亚麻酸, 花生四烯酸, EPA 和 DHA 存在于一些变异株中, 且含量差异大。本文用酸热法提取 3 株真菌 C16-C18 系脂肪酸含量超过 50%, 二十碳以上的长链不饱和脂肪酸几乎没有。李植峰<sup>[14]</sup>等人研究酸热法提取的油脂中, 必须脂肪酸的含量较索氏法及 SCF-CO<sub>2</sub> 法提取的油脂高, 对 C16-C18 系脂肪酸提取效果最好, 但油脂中缺少 C20:3 是否提示该 3 株真菌油脂中未知成分可能为二十碳以上的长链不饱和脂肪酸, 尚需进一步实验研究。

## 4 结论

本研究从海鞘中分离共附生真菌 20 株, 从中筛选出 P2-4、P1-17 和 P2-18 等 3 株产油脂真菌, 油脂含量分别为 21.50%、20.70%和 20.10%, 不饱和脂肪酸含量分别为 93.90%、55.80%和 65.00%。特别是 P2-4 不饱和脂肪酸含量达 93.90%, 不饱和度极高。三株真菌不饱和脂肪酸成分中 C16:1 棕榈一烯酸和 C18:1 油酸含量居多, 可望通过诱变和发酵条件优化获得高产不饱和脂肪酸的优良菌种。尤其是菌株 P2-4 中  $\gamma$ -C18:3( $\gamma$ )亚麻酸含量达到 23.20%, 约占其不饱和脂肪酸总量的 24.50%, 可作为选育高产  $\gamma$ -亚麻酸的优良菌种, 具有良好的开发应用前景。

## 参考文献

- [1] 郑成兴. 中国沿海海鞘物种多样性[J]. 生物多样性, 1995, 3(4):201-205  
ZHENG Cheng-xing. Species diversity of Ascidian in the coastal China seas [J]. Biodiversity Science, 1995, 3(4): 201-

205

- [2] Abedi E, Sahari M A. Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties [J]. Food Sci. Nutr., 2014, 2: 443-463  
[3] Papanikolaou S, Beopoulos A, Koletti A, et al. Importance of the methyl-citrate cycle on glycerol metabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. J. of Biotechnol., 2013, 168(4): 303-314  
[4] Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G. Single cell oil(SCO) production by *Mortierella isallina* grown on high-sugar contain media [J]. Bioresource Technology, 2004, 95(3): 287-291  
[5] Zhang V, Adams I P, Ratledge C. Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloids* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation [J]. Microbiology, 2007, 153(7): 2013-2025  
[6] Papanikolaous, M Komaitis, G Aggelis. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabe* nin grown on higt-sugar content media [J]. Bioresoue Technol., 2004, 95(3): 287-291  
[7] 李元森. 产油脂丝状真菌的筛选及其产油脂条件的优化 [D]. 济南: 山东轻工业学院, 2009  
LI Yuan-sen. Screening of *Oleaginous Filamentous* fungi and the optimization of its fermentation conditions [D]. Jinan: Shandong Institute of Light Industry, 2009  
[8] 周翠霞, 朱传合, 王超, 等. 深黄被孢霉高产多不饱和脂肪酸菌株的诱变育种[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(11): 32-36  
ZHOU Cui-xia, ZHU Chuan-he, WANG Chao, et al. Breeding of a high polyunsaturated fatty acids yield with *Mortierella Isabellina* by mutation [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2013, 28(11): 32-36  
[9] Abedi E, Sahari M A. Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties [J]. Food Sci. Nutr., 2014, 2(5): 443-463  
[10] S Fakas, S Papanikolaou, M Galiotou - Panayotou, et al. Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(4): 1062-1070  
[11] R Maali-Amiri, I V Goldenkova-Pavlova, N O Yur'eva, et al. Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with the  $\Delta 12$ -desaturase gene from cyanobacterium [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2007, 54(5): 600-606  
[12] 周同永, 任飞, 邓黎, 等.  $\gamma$ -亚麻酸生理生化功能研究进展[J]. 贵州农业科学[J]. 2011, 39(3): 53-58

- ZHOU Tong-yong, REN Fei, DENG Li, et al. Research progress in physiological and biochemical function of  $\gamma$ -linolenic acid [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2011, 39(3): 53-58
- [13] 郭小宇,杨兰,李宪臻,等.提高微生物油脂生产能力的研究进展[J].微生物学通报,2013,40(12):2295-2305
- GUO Xiao-yu, YANG Lan, LI Xian-zhen, et al. Advance in enhancing production of microbial lipids [J]. Microbiology China, 2013, 40(12): 2295-2305
- [14] 李植峰,张玲,沈晓京,等.四种真菌油脂提取方法的比较研究[J].微生物学通报,2001,28(6):72-75
- LI Zhi-feng, ZHANG Ling, SHEN Xiao-jing, et al. A comparative study on four method of fungi lipid extraction [J]. Microbiology China, 2001, 28(6): 72-75