

生物工程

我国南海硃洲岛潮间带产油真菌的脂肪酸组成分析

王洁¹, 江黎明², 崔丽娇³, 薛珊珊⁴

(1. 漯河医学高等专科学校 医学检验技术教研室, 河南 漯河 462002; 2. 广东医科大学 生物化学与分子生物学研究所, 广东 湛江 524023; 3. 香港城市大学深圳研究院, 广东 深圳 518000; 4. 泰州市人民医院, 江苏 泰州 225300)

摘要:采用尼罗红平板筛选法从我国南海硃洲岛潮间带分离鉴定出的178株海洋真菌中筛选产油菌株, 对其脂肪酸进行抽提并甲酯化, 采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术测定产油真菌的总脂肪酸含量并对其脂肪酸组成进行分析。结果表明: 筛选出89株产油真菌, 其中14株海洋真菌的总脂肪酸含量占冷冻干燥菌体质量的1.41%~7.73%, 饱和脂肪酸含量占总脂肪酸含量的42.51%~68.86%, 多不饱和脂肪酸含量占总脂肪酸含量的9.03%~36.49%。我国南海硃洲岛潮间带产油真菌资源丰富, 在生物油脂开发利用中具有较高价值, 获取的不饱和脂肪酸具有广泛应用前景。

关键词: 硃洲岛; 产油真菌; 尼罗红平板; 气相色谱-质谱联用; 脂肪酸

中图分类号: Q81; TQ646

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2018)08-0115-05

Fatty acid composition analysis of oil producing fungi from intertidal zone of Naozhou island in South China Sea

WANG Jie¹, JIANG Liming², CUI Lijiao³, XUE Shanshan⁴

(1. Department of Medical Laboratory, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan, China; 2. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, Guangdong, China; 3. Shenzhen Research Institute, City University of Hong Kong, Shenzhen 518000, Guangdong, China; 4. Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300, Jiangsu, China)

Abstract: The oil producing strains were screened from the 178 strains marine fungi isolated from intertidal zone of Naozhou island in South China Sea using Nile red plates, then the fatty acid of the strains were extracted and methylated, and the total fatty acid content and fatty acid composition were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed that 89 strains of oil producing fungi were screened. Among them, the total fatty acid content of 14 strains of oil producing fungi was 1.41% - 7.73% of the mass of freeze-dried strains. The contents of unsaturated fatty acid and polyunsaturated fatty acid were 42.51% - 68.86% and 9.03% - 36.49% respectively. The intertidal zone of Naozhou island in South China Sea was a rich resource for oil producing fungi, which had higher value in development and utilization of biolipid, and the unsaturated fatty acid obtained had wide application prospect.

Key words: Naozhou island; oil producing fungi; Nile red plate; gas chromatography-mass spectrometry; fatty acid

微生物油脂的脂肪酸多以 C₁₆、C₁₈ 为主, 主要集

中在海洋微藻、海洋细菌和陆地真菌^[1-4]。微生物油脂主要成分是甘油三酯, 还含有一些游离的脂肪酸和非极性物质。

目前发现产生不饱和脂肪酸的微生物除海洋微藻外, 主要有深海细菌和极地细菌。微生物油脂中的不饱和脂肪酸, 尤其是多不饱和脂肪酸对人体有

收稿日期: 2017-11-15; 修回日期: 2018-05-02

基金项目: 湛江市环北部湾海岸特色微藻生物资源产品研发重点实验室(2012E02)

作者简介: 王洁(1990), 女, 硕士, 研究方向为海洋微生物的活性测定(E-mail)821699212@qq.com。

重要的生理意义。多不饱和脂肪酸可调节人体脂质代谢、改善血液微循环、调节心脏功能、增强记忆力等^[5]。筛选富含不饱和脂肪酸的产油海洋微生物也可用于可再生生物柴油的生产,被认为是解决化石能源危机和降低碳排放的重要途径之一。因此,从海洋微生物中获取不饱和脂肪酸具有广泛应用前景。

通过对我国南海硃洲岛潮间带分离鉴定出的178株海洋真菌进行产油菌株的筛选分析,不仅为我国南海硃洲岛潮间带产油真菌的分布提供参考依据,更通过脂肪酸的测定筛选出多株高产油微生物,也为进一步利用这些高产油微生物奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

海洋真菌:178株真菌为研究组从硃洲岛(20°52'~20°56'N,110°33'~110°38'E)潮间带分离鉴定^[6]。尼罗红、14%三氟化硼-甲醇溶液、C17:0标准品,均购自美国Sigma公司;37种脂肪酸甲酯(FAME)混标,购自美国Supelco公司;无水甲醇,正己烷。

1.1.2 仪器与设备

GCMS-QP2010气相色谱-质谱联用仪,日本岛津公司;OPTIMA-WAX毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.32 μm),德国MN公司;LGJ-10型冷冻干燥机;ZF1-II紫外分析仪;智能型倒置荧光显微镜,日本尼康。

1.2 实验方法

1.2.1 分离菌株的活化

挑取斜面保存的真菌接种至PDA平板中,28℃活化培养2~3 d。

1.2.2 产油菌株的筛选

PDA培养基灭菌后添加尼罗红贮存液0.5 mg/mL(Nile/DMSO),使尼罗红的最终质量浓度达到0.5 μg/mL,倒板凝固后分别接种活化的真菌,做好标记,为了对照,不加尼罗红的PDA培养基也要接种相对应的菌株。28℃避光培养1~2 d后置于紫外灯(280~300 nm)和普通白光下观测,紫外灯下有橙红色荧光出现则为产油菌株,根据其荧光强度可粗略估计油脂含量^[7-8]。将产油菌株放在荧光显微镜420~490 nm蓝光下观察,镜检其细胞内的油脂^[9]。

1.2.3 产油菌株的发酵培养

挑取紫外灯下荧光强度相对较高的活化菌株接种于YPD液体培养基中恒温28℃,转速150 r/min,振荡培养7~10 d发酵。

1.2.4 脂肪酸组成及含量测定

1.2.4.1 产油菌株脂肪酸的抽提和甲酯化

取5 mg左右冷冻干燥的菌体,加入1 mL三氟化硼-甲醇溶液用玻璃匀浆器匀浆后,转移到甲酯化管;加1 mL正己烷、100 μL 0.2 mg/mL内标C17:0,充氮气后密封,放于沸水浴中40 min;冷却后,加1 mL三蒸水,3 000×g离心5 min,再将上清液放入另一个1.5 mL离心管中,充氮气干燥后,置于密闭的低温(-20℃)下保存^[10-11]。

1.2.4.2 GC-MS检测条件

37种脂肪酸甲酯(FAME)混标100 mg用10 mL二氯甲烷溶解,吸取1 μL进样。样品经100 μL正己烷溶解后,取2 μL进样。

GC条件:OPTIMA-WAX毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.32 μm);进样口温度230℃;载气为高纯氦气;柱流速0.7 mL/min;柱前压44.5 kPa;柱起始温度100℃,保持1 min,以15℃/min升至220℃,保持13 min,再以10℃/min升至250℃,保持15 min;分流比20:1。

MS条件:离子源温度200℃,接口温度230℃。

2 结果与讨论

2.1 产油菌株筛选

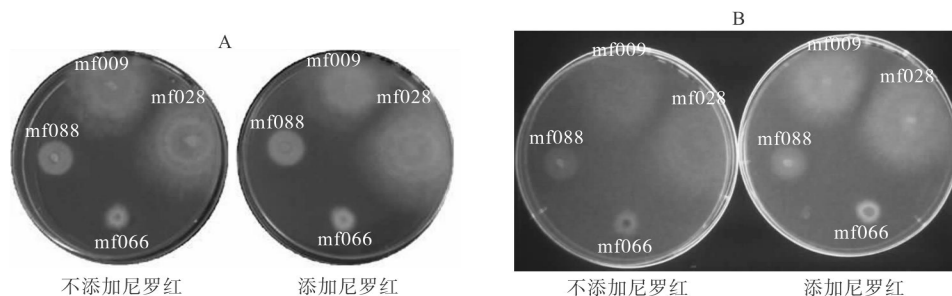
分离鉴定出的178株海洋真菌(ITS1-5.8S-ITS2序列GenBank登录号为KM277955-KM278132^[6])有89株含有油脂,其中14株海洋真菌含有的油脂由于和尼罗红染料结合,在紫外灯下橙红色荧光强度高,分别为mf009、mf018、mf020、mf028、mf054、mf062、mf066、mf071、mf088、mf094、mf097、mf112、mf115、mf176。mf009、mf028、mf066、mf088尼罗红平板筛选结果见图1,14株产油菌株基因序列BLAST比对结果及产油的筛选结果见表1。

由图1可知,不添加尼罗红贮存液的培养基中,由于菌株内的油脂无法和尼罗红染料结合,故在紫外灯下不会发出橙红色荧光,相反则会发出橙红色荧光。由表1可知,14株产油菌株中,镰孢属(*Fusarium*)3株,粗糙孔菌属(*Subulicystidium*)、*Trametes*均2株,木霉属(*Trichoderma*)、拟青霉属(*Paecilomyces*)、间座壳属(*Diaporthe*)、炭团菌属(*Hypoxylon*)、赤霉菌属(*Gibberella*)、*Gliomastix*、*Nigrospora*均只有1株。

尼罗红平板筛选方法操作简便,灵敏度高,适用于大量初筛,但也有一定的局限性,尼罗红平板筛选方法是以是否有橙红色荧光为依据来观察的,一些菌体本身带有的颜色如红色、橙色等会对荧光观察

造成一定的干扰。所以一般还需要显微镜下观察、细胞染色等方法辅助筛选。将尼罗红筛选出的产油菌株如 mf020、mf094 放在荧光显微下 420 ~ 490 nm 蓝光下观察,含有油脂的菌株受到蓝光激发后可以看到橙色的脂滴,进一步验证菌株含有油脂。但本

实验在粗略判断油脂含量的方法上有欠缺,应该以指示菌如深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*) 3.3410 (含油量 66.4%)、皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*) 2.571 (含油量 65%) 辅助粗略判断油脂含量^[12-15]。



注:A 为普通白光下观察的结果;B 为在紫外灯下观察的结果。

图1 mf009、mf028、mf066、mf088 尼罗红平板筛选的结果

表1 14 株产油菌株的基因序列 BLAST 比对结果及产油筛选结果

| 菌株号 | 最相似菌种名称 | 序列号 | 最高相似度/% | 油脂 |
|-------|------------------------------------|------------|---------|------|
| mf062 | <i>Diaporthe phaseolorum</i> | GU066628.1 | 98 | +++ |
| mf020 | <i>Fusarium chlamydosporum</i> | EU214561.1 | 100 | +++ |
| mf112 | <i>Fusarium chlamydosporum</i> | EU214561.1 | 99 | +++ |
| mf066 | <i>Fusarium decemcellulare</i> | HM775326.1 | 99 | +++ |
| mf009 | <i>Gibberella moniliformis</i> | GU723435.1 | 99 | ++++ |
| mf028 | <i>Gliomastix</i> sp. HSAUP063167 | FJ946481.1 | 86 | ++++ |
| mf094 | <i>Hypoxyton investiens</i> | JN979428.1 | 99 | +++ |
| mf054 | <i>Nigrospora oryzae</i> | KF192823.1 | 98 | +++ |
| mf176 | <i>Paecilomyces formosus</i> | FJ389929.1 | 99 | +++ |
| mf088 | <i>Subulicystidium longisporum</i> | JQ905612.1 | 99 | +++ |
| mf115 | <i>Subulicystidium longisporum</i> | JQ905612.1 | 97 | +++ |
| mf071 | <i>Trametes versicolor</i> | JQ886402.1 | 99 | +++ |
| mf018 | <i>Trametes versicolor</i> | JQ886402.1 | 99 | +++ |
| mf097 | <i>Trichoderma harzianum</i> | JX232597.1 | 98 | +++ |

注:根据肉眼观察橙红色荧光的强度粗略估计油脂含量,分别用“+”、“++”、“+++”、“++++”表示。

2.2 产油真菌的 GC-MS 分析

选择 14 株油脂含量高的海洋真菌进行 GC-

MS 分析,14 株海洋真菌的总脂肪酸含量见表 2,14

株海洋真菌脂肪酸组成和相对含量见表 3。

表2 14 株海洋真菌总脂肪酸的含量

| 菌株号 | 总脂肪酸质量/ μg | 总脂肪酸含量/% | 菌株号 | 总脂肪酸质量/ μg | 总脂肪酸含量/% |
|-------|-----------------------|----------|-------|-----------------------|----------|
| mf009 | 300.20 | 6.00 | mf071 | 233.33 | 4.67 |
| mf018 | 259.64 | 5.19 | mf088 | 141.98 | 2.84 |
| mf020 | 219.18 | 4.38 | mf094 | 203.83 | 4.08 |
| mf028 | 293.90 | 5.88 | mf097 | 299.95 | 6.00 |
| mf054 | 104.38 | 2.09 | mf112 | 110.33 | 2.21 |
| mf062 | 356.51 | 7.13 | mf115 | 386.26 | 7.73 |
| mf066 | 191.20 | 3.82 | mf176 | 70.59 | 1.41 |

注:总脂肪酸含量 = 总脂肪酸质量/冷冻干燥菌体质量(5 mg) \times 100%。

由表 2 可知,14 株海洋真菌总脂肪酸含量在 1.41% ~ 7.73% 之间,其中 mf115、mf062 含量比较

高,分别达到冷冻干燥菌体质量的 7.73% 和 7.13%。

由表 3 可知, 14 株海洋真菌饱和脂肪酸以 C16:0、C18:0 为主, 不饱和脂肪酸则以 C18:1*n*9*c* 或 C18:1*n*9*t*、C18:2*n*6*c* 或 C18:2*n*6*t* 为主, 不饱和脂肪酸占总脂肪酸含量的 42.51% ~ 68.86%, 其中 mf020、mf088、mf094 和 mf112 不饱和脂肪酸占总脂肪酸含量的比例较高, 分别为 66.84%、61.10%、68.86% 和 64.05%。单不饱和脂肪酸占总脂肪酸含量的 18.68% ~ 42.94%, 其中 mf094、mf097 分别占

42.94%、39.46%。多不饱和脂肪酸则以亚油酸为主, 占总脂肪酸含量的 9.03% ~ 36.49%, 其中 mf088、mf112、mf115、mf009 分别占 36.49%、35.58%、31.20%、31.34%。14 株海洋真菌中, *n*-6 PUFA 占总脂肪酸含量的 9.03% ~ 36.49%, 其中 mf088 和 mf112 的 *n*-6 PUFA 占总脂肪酸含量的比例分别达到 36.49% 和 35.58%。

表 3 14 株海洋真菌脂肪酸组成和相对含量

| 脂肪酸 | mf009 | mf018 | mf020 | mf028 | mf054 | mf062 | mf066 | mf071 | mf088 | mf094 | mf097 | mf112 | mf115 | mf176 | % |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| C12:0 | 0.30 | 0.35 | - | - | - | 0.22 | 0.51 | - | - | - | - | - | - | - | |
| C13:0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.50 | - | |
| C14:0 | 1.81 | 1.78 | 1.64 | 2.31 | 2.63 | 1.64 | 2.39 | 1.31 | 3.42 | 1.56 | 0.93 | - | 2.12 | 2.27 | |
| C15:0 | 0.30 | - | 0.41 | - | - | 0.26 | 0.32 | - | - | 0.27 | 0.42 | - | 0.18 | - | |
| C16:0 | 18.68 | 21.62 | 17.34 | 33.93 | 26.70 | 22.34 | 22.55 | 23.18 | 27.57 | 22.08 | 16.93 | 21.87 | 27.25 | 23.67 | |
| C16:1 | 1.74 | 0.59 | 2.14 | 2.15 | 1.94 | 0.69 | 2.01 | 0.60 | 2.58 | 0.69 | 0.78 | 1.23 | 2.23 | 2.38 | |
| C18:0 | 14.96 | 25.97 | 12.22 | 20.63 | 16.27 | 20.25 | 17.09 | 22.05 | 7.91 | 7.25 | 21.84 | 14.08 | 16.61 | 20.77 | |
| C18:1 <i>n</i> 9 <i>c</i> 或 C18:1 <i>n</i> 9 <i>t</i> | 26.84 | 22.28 | 35.54 | 16.53 | 37.10 | 20.15 | 28.05 | 30.24 | 22.03 | 42.25 | 38.68 | 27.24 | 16.96 | 25.00 | |
| C18:2 <i>n</i> 6 <i>c</i> 或 C18:2 <i>n</i> 6 <i>t</i> | 22.35 | 13.04 | 28.78 | 19.36 | 9.03 | 15.53 | 18.48 | 21.49 | 36.49 | 22.18 | 13.70 | 35.58 | 23.24 | 13.44 | |
| C18:3 <i>n</i> 6 | - | - | - | - | - | 0.27 | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| C18:3 <i>n</i> 3 | 0.86 | 0.73 | 0.38 | 0.73 | - | 1.42 | 1.68 | - | - | 3.74 | 0.83 | - | 0.61 | - | |
| C20:0 | 0.62 | 1.12 | 0.65 | 0.62 | 3.16 | 1.78 | 0.86 | 0.63 | - | - | 0.84 | - | 0.44 | 1.52 | |
| C22:0 | 0.57 | 0.55 | 0.89 | - | 3.16 | 2.04 | 0.86 | 0.50 | - | - | 0.42 | - | - | - | |
| C22:1 <i>n</i> 9 | - | 0.76 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.50 | - | |
| C22:2 | 8.13 | 9.44 | - | 3.74 | - | 9.99 | - | - | - | - | - | - | 7.35 | 5.37 | |
| C24:0 | 2.84 | 1.77 | - | - | - | 3.41 | 5.19 | - | - | - | 4.64 | - | 2.00 | 5.57 | |
| SFA | 40.08 | 53.16 | 33.15 | 57.49 | 51.92 | 51.94 | 49.77 | 47.67 | 38.90 | 31.16 | 46.02 | 35.95 | 49.10 | 53.80 | |
| UFA | 59.92 | 46.84 | 66.84 | 42.51 | 48.07 | 48.05 | 50.22 | 52.33 | 61.10 | 68.86 | 53.99 | 64.05 | 50.89 | 46.19 | |
| MUFA | 28.58 | 23.63 | 37.68 | 18.68 | 39.04 | 20.84 | 30.06 | 30.84 | 24.61 | 42.94 | 39.46 | 28.47 | 19.69 | 27.38 | |
| PUFA | 31.34 | 23.21 | 29.16 | 23.83 | 9.03 | 27.21 | 20.16 | 21.49 | 36.49 | 25.92 | 14.53 | 35.58 | 31.20 | 18.81 | |
| <i>n</i> -6 PUFA | 22.35 | 13.04 | 28.78 | 19.36 | 9.03 | 15.80 | 18.48 | 21.49 | 36.49 | 22.18 | 13.70 | 35.58 | 23.24 | 13.44 | |
| <i>n</i> -3 PUFA | 0.86 | 0.73 | 0.38 | 0.73 | - | 1.42 | 1.68 | - | - | 3.74 | 0.83 | - | 0.61 | - | |

注:“-”为未检出。

3 结论

通过对我国南海硇洲岛潮间带分离鉴定出的 178 株海洋真菌进行脂肪酸的筛选分析, 得到 89 株产油真菌, 14 株海洋真菌总脂肪酸含量在 1.41% ~ 7.73% 之间, 不饱和脂肪酸含量占总脂肪酸含量的 42.51% ~ 68.86%, 单不饱和脂肪酸含量占总脂肪酸含量的 18.68% ~ 42.94%, 多不饱和脂肪酸含量占总脂肪酸含量的 9.03% ~ 36.49%, *n*-6 多不饱和脂肪酸含量占总脂肪酸含量的 9.03% ~ 36.49%。海洋微生物资源的开发利用, 不仅可以带来较高的经济效益, 也为环境保护、生物能源的开发提供了新的方向。

参考文献:

[1] 吴清平, 吴军林, 张菊梅, 等. 微生物源功能性食品的

研究新进展[J]. 食品科学, 2005, 26(9):609.

[2] 易绍金, 郑义平. 产油微生物的研究及其应用[J]. 中外能源, 2006, 11(2): 90-94.

[3] MERCEDES B, TERESA M M, JORDI F B, et al. Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats[J]. Int Microbiol, 2006, 9:95-102.

[4] 卞曙光, 张晓昱, 张磊, 等. 海洋真菌多不饱和脂肪酸的快速检测[J]. 微生物学通报, 2001, 28(1):73-76.

[5] 王萍, 张银波, 江木兰, 等. 多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 中国油脂, 2008, 33(12):42-46.

[6] WANG J, CUI L J, LAN L B, et al. Diversity of culturable extracellular proteases producing marine fungi isolated from the intertidal zone of Naozhou island in South China Sea[J]. Microbiol Chin, 2015, 42(2): 238-253.

(下转第 126 页)

的技术,并投入到了实际的运用中^[14]。本文所述可食性油墨为专色油墨,不能用于调色,如果选用其他可调色色料,可参照 CMYK 颜色模型,从而配制四原色的单色油墨^[15]。同时,对于某些需要特殊保护的产品,还可在可食性油墨中定向加入功能性助剂,如抗菌可食性油墨,可加入壳聚糖制得。可食性油墨能满足人们日益增长的对生活品质的追求,将来必将得到更深入的研究^[16]。

4 结 论

黄原胶用量为 0.35 g,水油质量比为 1:1 时加热混合制备得到的可食用性油墨的综合性能最佳。研究表明,可食性油墨在 23℃ 时具有最好的黏度系数和流动性能,且其耐摩擦度和光泽度也很优秀,具有良好的气味和色度,能满足印刷要求。但研究过程中发现,在环境温度低于 10℃,可食性油墨体系会被破坏,变为悬浊液,原因可能是低温使得分子间运动降低,由于体系物质极具黏性,因此极易抱团成为悬浮物,产生分层现象变为悬浊液;同时证明水油质量比为 1:1 时能保证油墨体系乳化完全。但在实验过程中也必须控制好温度,温度过高,会导致在制备油墨过程中,体系中水分大量丢失,导致体系含水量降低,水油比降低,使水油体系难以乳化完全,导致可食性油墨性能受损。

参考文献:

- [1] GOTOH T. Environmental friendly ink in the commercial printing field [J]. *J Print Sci Technol*, 2004, 41 (2): 7-12.
- [2] RUSSELL J, CANDLER A, WRIAGHT A. Printing process with edible inks; US20070087095 A1 [P]. 2007-04-19.
- (上接第 118 页)
- [7] 秦艳红,叶德赞. 海洋产油真菌的简便初筛[J]. 台湾海峡, 2010, 29(1):128-134.
- [8] 林义,钟添华,骆祝华,等. 尼罗红染色法筛选产油酵母及定量检测胞内油脂含量的研究[J]. 微生物学通报, 2012, 39(1):125-137.
- [9] 王敬国. 尼罗红在测定细菌细胞中聚- β -羟基丁酸和其他脂类贮存物质的应用[J]. 微生物学报, 1994, 34(1):71-75.
- [10] 元冬娟,蔡春,周克元,等. 广东湛江地区几种海洋微藻中的脂肪酸检测[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(4):721-722.
- [11] 付松,徐先顺,向奋飞. 保健油脂中多不饱和脂肪酸的 GC/MS 分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15

- [3] 赫健强,马永胜. 浅谈喷墨印刷用可食性油墨[J]. 印刷杂志, 2011, 2(5):52-54.
- [4] FERRA A, SCHULTE E, ESTEVES W, et al. Minor constituents of vegetable oils during industrial processing[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1996, 73(5):587-592.
- [5] 苏羽航. 可食性油墨的研制及其性能的研究[D]. 天津:天津科技大学, 2009.
- [6] 唐中山,苏红军,徐世艾. 黄原胶流变学性质的实验研究[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2008, 21(2):130-133.
- [7] 麻建国. 黄原胶对 O/W 乳状液稳定性的影响[J]. 食品与发酵工业, 1998, 24(1):26-33.
- [8] 李清春,张景强. 卵磷脂的特性及其在食品中的应用[J]. 保鲜与加工, 2001, 1:23-25.
- [9] 苏羽航. 油墨研制新亮点——可食性油墨[J]. 印刷技术, 2010(12):64-65.
- [10] ELLIS A, HARTLEY L, HOPKINSON N. Effect of print density on the properties of high speed sintered elastomers [J]. *Metall Mater Trans A*, 2015, 46(9):3883-3886.
- [11] 康启来. 油墨细度与印刷品质量[J]. 印刷世界, 2002, 29(2):11.
- [12] 栾存富. 油墨的物理性能对印品质量的影响[J]. 印刷杂志, 2000, 12(9):40.
- [13] 程君. 可食性油墨印刷的研究现状及趋势探讨[J]. 印刷质量与标准化, 2013(3):11-13.
- [14] 方燕,朱克永,姚瑞玲,等. 可食性油墨在食品包装印刷的研究与应用[J]. 食品与发酵科技, 2013, 49(1):85-90.
- [15] SPURGEON S L, KAMMER R B. Decorating system for edible items; US 6903841 [P]. 2005-06-07.
- [16] 田海英. 可食性油墨开辟油墨新天地[J]. 今日印刷, 2014(2):56-58.
- (9):1042-1043.
- [12] PHILLIP G, EUGENE P M, STANLEY D F. Nile red; a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets [J]. *J Cell Biol*, 1985, 100:965-973.
- [13] PATRICIA S, BERND H A R, RAINER K, et al. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds[J]. *Arch Microbiol*, 1999, 171:73-80.
- [14] 朱国胜,刘作易,雷邦星,等. 被孢霉 γ -亚麻酸高产菌株选育[J]. 菌物学报, 2005, 24(1):85-92.
- [15] 黄建忠,施巧琴,周晓兰,等. 深黄被孢霉高产脂变株的选育及其发酵的研究[J]. 微生物学通报, 1998, 25(4):187-191.