

## 深圳海域 6 株破囊壶菌的生长特性及油脂成分分析

李晶晶 刘瑛 成家杨 Maurycy Daroch\*

(北京大学 环境与能源学院 广东 深圳 518055)

**摘要:**【目的】从深圳海域分离得到 6 株破囊壶菌, 对其基本形态特征、生活史和油脂含量等进行研究, 开发其应用潜力。【方法】使用松花粉垂钓法对破囊壶菌进行分离, 通过 18S rRNA 基因测序的方法对破囊壶菌进行鉴定, 用显微镜观察其基本形态特征, 通过使用尼罗红(Nile Red)染色法对油脂含量进行定性检测, 并用 GC-MS 分析菌株的油脂含量和组成情况。【结果】18S rRNA 基因鉴定其属于 *Aurantiochytrium* sp.、*Schizochytrium* sp. 和 *Thraustochytrium* sp. 三个属。破囊壶菌的脂肪酸主要成分为十六碳饱和脂肪酸和二十二碳六烯酸(DHA), 其中 Mn11 和 Mn15 的饱和脂肪酸含量达到总脂肪酸含量的 70% 以上, Mn16 和 Sw7 的 DHA 产量分别达到 1.29 g/L 和 1.26 g/L。【结论】Mn11 和 Mn15 菌株适合用于生物柴油的生产, Mn16 和 Sw7 是 DHA 发酵生产的潜力菌株。

**关键词:** 破囊壶菌, 生活史, 脂肪酸, 生物柴油, DHA

## Growth features and fatty acid analysis of six thraustochytrid strains from Shenzhen coastal seawater

LI Jing-Jing LIU Ying CHENG Jia-Yang Maurycy Daroch\*

(School of Environment and Energy, Peking University, Shenzhen, Guangdong 518055, China)

**Abstract:** [Objective] Identified six thraustochytrid strains isolated from Shenzhen costal seawater and sediment. Morphological characteristics, life cycle and fatty acid profiles of these strains were studied. [Methods] Thraustochytrid strains were isolated using pine pollen as bait and identified based on 18S rRNA gene sequences. Morphological characteristics were observed using microscope. Nile red staining was used to qualitatively analyze oil content. While GC-MS were used to analyze specific fatty acid profile. [Results] Analysis in 18S rRNA gene revealed that they belong to three genera *Aurantiochytrium* sp., *Schizochytrium* sp. and *Thraustochytrium* sp.. Among these strains, Mn11 and Mn15 were found to produce high level of saturated fatty acid, which is more than 70% total fatty acid. While Mn16 and Sw7 showed high capacity of DHA production with 1.29 g/L and 1.26 g/L DHA yield. [Conclusion] Mn11 and Mn15 strains were suitable for biodiesel production while Mn16 and Sw7 were promising DHA producing strains.

**Keywords:** Thraustochytrid, Life cycle, Fatty acid, Biodiesel, DHA

基金项目: 海洋公益性行业科研专项经费项目(No. 201305022); 深圳市新兴产业重点项目(No. JC201104210118A)

\*通讯作者: ✉: m.daroch@pkusz.edu.cn

收稿日期: 2014-05-19; 接受日期: 2014-06-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-07-08

破囊壶菌(*Thraustochytrium*)是属于网粘菌门(Labyrinthulomycota)、网粘菌纲(Labyrinthulomycetes)、破囊壶菌目(*Thraustochytriales*)、破囊壶菌科(*Thraustochytriaceae*)的一类类藻的海洋真菌。破囊壶菌广泛分布于海洋、盐水湖和红树林区域,大多数破囊壶菌在藻类及高等植物的残渣上进行腐生,少数寄生在无脊椎动物身上。破囊壶菌的形态、繁殖方式、生态、分离培养等与真菌非常相似,目前观察到的其生活史均为无性繁殖,尚未观察到有性生殖现象。

破囊壶菌细胞中积累了大量油脂,总脂肪酸含量能够达到干重的50%以上,其油脂主要成分为 $\omega$ -3 不饱和脂肪酸—DHA (Docosahexaenoic acid, C22:6)和饱和脂肪酸棕榈酸(C16:0),其他脂肪酸含量甚微。DHA 是细胞膜上磷脂的重要组成成分,对于婴儿大脑和视网膜的发育具有重要作用,对于抵抗疾病也有一定作用,尤其是冠状病<sup>[1]</sup>。DHA 还能作为前体合成类二十烷酸调节体内炎症反应,促进凝血,维持血压稳定。鱼油中 DHA 的提取受到季节、鱼类品种等诸多因素的影响,提取成本较高,而海洋真菌破囊壶菌已被证实是理想的 DHA 生产菌株<sup>[2]</sup>。此外,破囊壶菌中棕榈酸可用于生物柴油的生产,解决能源危机,使其也成为了极具潜力的能源微生物<sup>[3]</sup>。

本研究从深圳附近海域分离得到 6 株破囊壶菌,研究了其基本生长特性,并通过 18S rRNA 基因序列比对对其进行鉴定。此外,本文还研究了破囊壶菌的脂肪酸含量和组成,为后期筛选 DHA 和生物柴油生产菌株提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 1.5 g/L,酵母提取物 1 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.25 g/L,天然本海水过滤后配制。固体培养基添加 10 g/L 琼脂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品采集与分离:从深圳附近海域采集海水

和土壤样品,放入灭菌的密封袋中带回实验室,立即进行菌株分离。破囊壶菌的分离采用松花粉垂钓法:在无菌平板中加入 2 mL 海水样品和 3 mL 无菌海水,并加入少量松花粉(100 °C 烘箱处理 48 h)作为诱饵,在室温条件下培养 3–7 d。取 100  $\mu\text{L}$  转接到新鲜的海水(含有松花粉、0.075%链霉素和 0.05% 氨苄西林)平板中继续培养。培养 1 周后,取适量培养液涂布到含有链霉素和氨苄西林的固体培养基中,室温培养 1 周后,取单克隆涂布到新鲜的固体培养基中,重复纯化 2–3 次。

**1.2.2 菌种鉴定:**采用 18S rRNA 基因测序的方法进行菌种鉴定。总基因组的提取采用 Ezup 土壤 DNA 提取试剂盒(Sigma Biotech)。18S rRNA 基因的 PCR (Polymerase chain reaction)扩增使用的特异性引物为:18S001 (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3'), 18S13 (5'-CCTTGTTACGACTTCACCTTCC TCT-3')<sup>[4]</sup>。PCR 反应采用 50  $\mu\text{L}$  反应体系,其中总基因组 DNA 含量为 25 ng,引物含量分别为 5 pmol, *Taq* Mix (Generay) 25  $\mu\text{L}$ 。扩增条件:95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 20 min。PCR 产物跑琼脂糖凝胶电泳后,切胶分离纯化,并连接到 pGEM-T 载体上,转化到大肠杆菌(Promega)中扩增。挑取阳性克隆送到 BGI (深圳)测序,使用的引物为 M13 通用引物。

使用 MEGA 4.0 软件将 DNA 测序结果与 NCBI 数据库中的序列比对,设置算法自检程序 Bootstrap 为 1 000 次,用最大似然法(Likelihood)运算建树。

**1.2.3 破囊壶菌的形态及生活史观察:**观察破囊壶菌附着在松花粉周围的情况时,直接取一滴松花粉法培养的破囊壶菌培养液滴在载玻片上,盖上盖玻片,风干后在 Olympus BX53 显微镜下观察,目镜 10 $\times$ ,物镜 40 $\times$ 。观察时可先找到独立的松花粉,在松花粉四周可找到破囊壶菌。油镜(100 $\times$ )下可清晰观察到菌体形态。

定期取不同培养时期的破囊壶菌培养液在显微镜下观察并拍照,观察培养物中单细胞及群体的

生长变化及其生活史的一般过程。

**1.2.4 生长曲线测定:** 取生长到对数期的破囊壶菌培养液, 在分光光度计上进行波长扫描, 绘制吸收光谱曲线, 确定最大吸收峰波长。

将 6 株菌分别接种到 20 mL M4 液体培养基中, 28 °C、160 r/min 培养, 取生长到对数期(48 h)的破囊壶菌培养液作为种子液, 按 5% 的比例接种到 100 mL 新鲜的 M4 液体培养基中, 每个菌株设置 3 个平行, 置于 28 °C、160 r/min 摇床中培养。每隔 24 h 取出 1 mL 培养液, 稀释后测得其在最大波长处的吸光值(*OD* 值), 以 *OD* 值对应时间绘制生长曲线。

**1.2.5 尼罗红(Nile Red)荧光染色:** 尼罗红是一类苯吩噻嗪酮类化合物, 能够与脂类物质结合并在 570 nm 波长的激发光下发出荧光, 快速地将类脂类物质与其他储藏物分离开来<sup>[5]</sup>。尼罗红是一类脂溶性染料, 难溶于水, 需要借助丙酮、乙醇等有机溶剂, 故尼罗红染色液配制成 0.01% (质量体积比)丙酮溶液。

取 1 mL 不同生长时间的破囊壶菌培养液, 5 000 r/min 离心收集菌体, 无菌水清洗 2 次, 1 mL 体积无菌水重悬。加入 100  $\mu$ L 尼罗红染色液于暗处染色 20 min, 280–300 nm 紫外光下观察。

**1.2.6 细胞油脂的提取与脂肪酸甲酯的制备:** 收集 50 mL 处于平台期的菌体培养液, 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 冷冻干燥后用于油脂提取。菌体油脂的提取与转酯化采用一步法<sup>[6]</sup>: 称取 50–100 mg 冷冻干燥后的菌体, 加入 2 mL 4% 硫酸甲醇溶液, 振荡混匀 20 s, 在 80 °C 水浴 1 h。待溶液冷却至室温后, 加入水和正己烷各 1 mL, 混匀后离心, 脂肪酸甲酯即溶于上层正己烷中。取上层有机相用于气相色谱分析。

**1.2.7 气相色谱分析:** 使用 7890-5975 气相色谱仪(安捷伦), FID 检测器, DB-5ms 毛细管柱(60 m $\times$ 250  $\mu$ m $\times$ 0.25  $\mu$ m)。载气为 He, 流速 3 mL/min, 进样量 1  $\mu$ L; 进样口温度 280 °C, 检测器温度 290 °C,

升温程序: 70 °C 保持 2 min, 然后以 10 °C/min 升温至 230 °C, 再以 3 °C/min 升温至 290 °C, 保持 5 min。通过对比标准样品并计算峰面积来确定各组分的含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 破囊壶菌的形态特征及分子生物学鉴定

显微镜下可观察到一个松花粉周围附着一至多个破囊壶菌。破囊壶菌的大小一般在 2–40  $\mu$ m 之间, 菌体形态随着菌体的增殖方式不同而不同。MV 培养基上的菌体形态一般为圆形至椭圆形, 而在液体培养基通气培养时, 可见形态多样的类似变形虫的形态。一般年轻的菌体直径 4–5  $\mu$ m, 成熟的菌体直径 15–30  $\mu$ m, 在营养丰富的 MV 培养基中还可达到 50  $\mu$ m。海水中破囊壶菌个体很小, 直径约为 2–5  $\mu$ m, 在 10 $\times$ 100 倍镜下, 可见其为中间透亮的圆球形, 有明显的细胞壁(图 1)。破囊壶菌在 MV 培养基上的菌落为乳白色, 近似圆形, 直径约为 1–5 mm, 表面光滑湿润, 边缘不平整(图 2)。

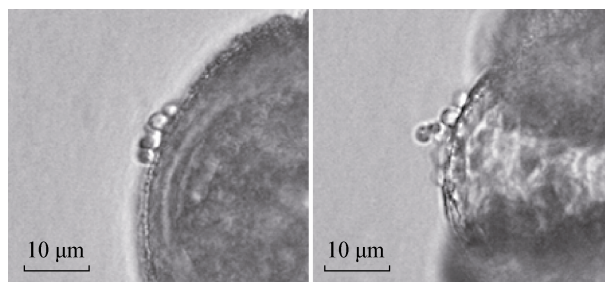


图 1 附着在松花粉周围的破囊壶菌  
Figure 1 Thraustochytrid attached to pine pollen

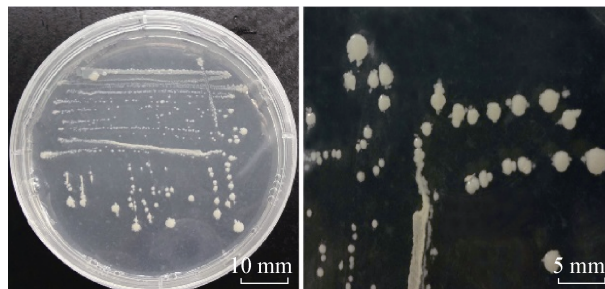


图 2 固体培养基上破囊壶菌的菌落  
Figure 2 Thraustochytrid strain in solid medium

破囊壶菌以孢子的形式繁殖,成熟营养体可以直接通过向心分裂的方式产生孢子,成为一个游动孢子囊,为Ⅰ型方式。也可能先经过变形阶段,再向心分裂产生孢子,称为Ⅱ型方式<sup>[7]</sup>。变形阶段经历的时间很短,大概 1 min。这两种方式都是破囊壶菌比较常见的繁殖方式。在营养条件较丰富的培养基中,破囊壶菌主要以向心分裂为主,而在营养贫乏时会出现短暂的形变阶段,形变阶段一般很短,显微镜下很难捕捉到。

破囊壶菌的孢子为规则的圆形,具有很厚的细胞壁包裹(图 3A),在条件适宜的环境下可长成为营养体,生长过程中,菌体内部会逐渐出现圆而透亮的类似水滴状圆形结构。经过一段时间的生长,可成为成熟的营养体。营养体细胞为圆形至椭圆形,

直径大小约为 10–15  $\mu\text{m}$ ,边缘平整清晰,较小的营养体内几乎不含颗粒状内含物,长大的过程中颗粒状内含物逐渐增多,细胞壁逐渐变薄,成熟的营养体内充满颗粒物,为规则的圆形。处在成熟期菌体的特征是具有薄而清晰的细胞壁,细胞内部为密密麻麻的颗粒状,内质边缘光滑平整(图 3B)。菌体开始产生孢子的特征是内质的边缘开始有小的凹陷,变得不平整(图 3C,箭头所指处为产生凹陷处),继而开始快速向心分裂,可见清晰的孢子的轮廓(图 3D)。在孢子释放时,孢子囊裂开一个口子,孢子开始释放,随后细胞壁开始溶解,孢子释放完成(图 3F)。

经分子生物学鉴定显示,6 株菌主要属于 3 个属: *Aurantiochytrium* sp.、*Schizochytrium* sp. 和 *Thraustochytrium* sp.。其中 Mn15 和 Mn35 从属于 *Schizochytrium* sp., Mn11 和 Sw7 从属于 *Aurantiochytrium* sp., 而 Mn16 和 Sw8 从属于 *Thraustochytrium* sp.。利用 MEGA 4.0 软件分析绘制系统进化树(图 4),可见本实验分离得到的 6 株菌都属于破囊壶菌,根据其亲缘关系的远近,可将其分为两组,第一组中包括 Mn11 和 Mn16,第二组则包括 Mn15、Mn35、Sw7 和 Sw8。

## 2.2 尼罗红染色法检测破囊壶菌生长过程中的油脂积累情况

使用尼罗红荧光染色的方法对破囊壶菌生长过程中油脂积累情况进行定性检测,所得结果见图 5。接种后第 1 天,破囊壶菌仍处于对数生长期(图 6),细胞以分裂生长为主,油脂的积累量较少。尼罗红染色显示荧光较弱,细胞内的油脂粒呈现微弱的黄色荧光,数量较少,细胞壁呈现红色荧光,边缘较厚且清晰可见。第 2 天开始细胞逐渐进入平台期,细胞开始积累油脂,尼罗红染色可见细胞内油脂粒的数量明显增多,细胞内黄色荧光强度增加,细胞壁的红色荧光减弱。第 3 天细胞中油脂粒的荧光强度继续增强,至第 4 天,细胞中的油脂积累量达到最大,整个细胞都呈现亮黄色,细胞内不可见单个的脂肪粒,不可见明显的细胞壁。Morita 等<sup>[8]</sup>

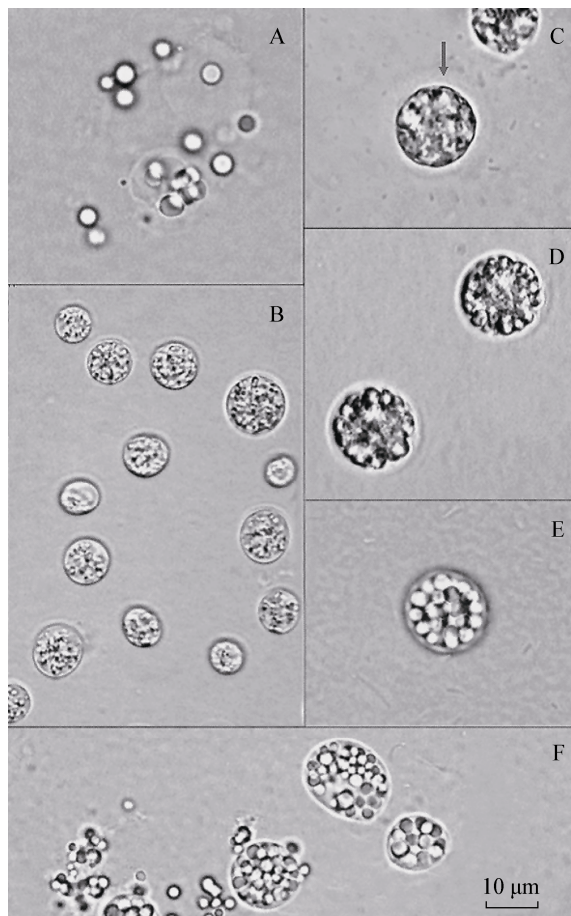


图 3 破囊壶菌生活史

Figure 3 Life cycle of thraustochytrid



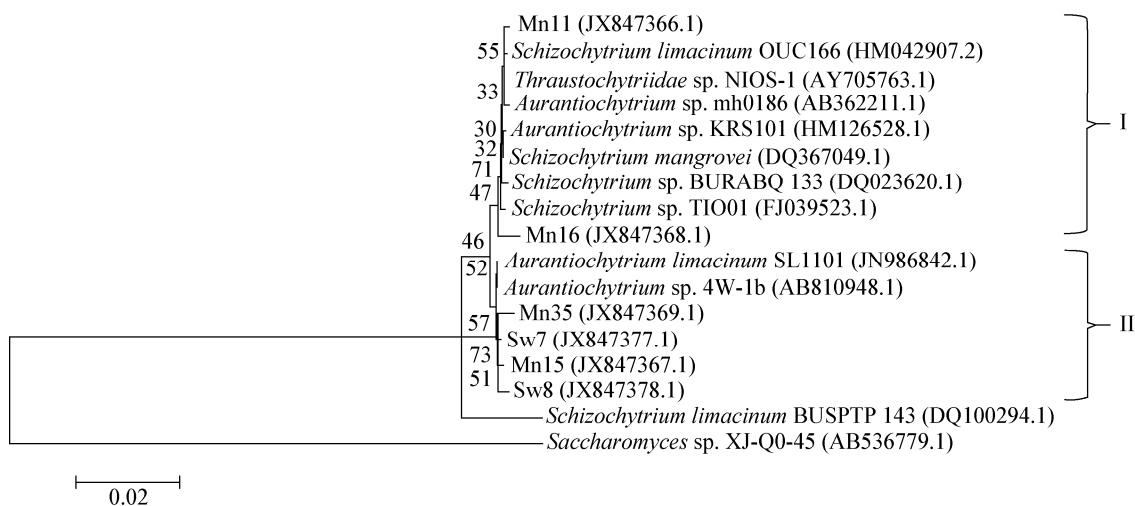


图 4 6 株破囊壶菌的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of six thraustochytrid strains

注：括号内序号为该物种序列在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上的序列号，分支点上的数字表示该分支的支持率，标尺为该长度所表示的物种序列间核苷酸变化率。

Note: Numbers in brackets are serial numbers in NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Numbers on branch points are approval ratings of each branch. Scaleplate means changes observed between two sequences.

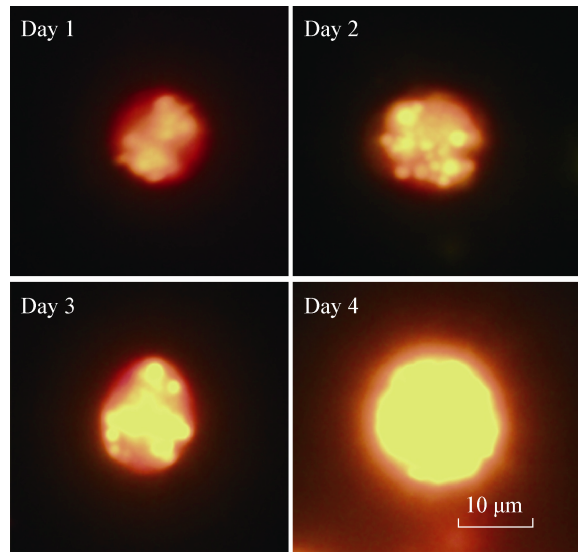


图 5 尼罗红荧光染色结果

Figure 5 Nile Red staining result

对破囊壶菌不同生长时期细胞内脂肪粒的数量进行研究，发现其在生长的最初 4 h 内，细胞直径逐渐变大，但是细胞内的脂肪粒数目却逐渐变少甚至消失，随后细胞内才开始重新形成脂肪粒。这可能是由于细胞在最初生长时需要消耗体内储存的脂

肪粒作为能量来源，随后才能重新积累脂肪粒。

2.3 脂肪酸含量与成分分析

破囊壶菌是一类脂肪酸含量较高的微生物，其脂肪酸主要包括饱和脂肪酸(C14:0，C15:0，C16:0，C17:0，C18:0，C20:0)、单不饱和脂肪酸(C16:1，C18:1)和长链多不饱和脂肪酸(C20:4，C20:5，C22:6)(图 7)。其中 DHA (C22:6)的含量占总脂肪酸(TFA)的 15%到 42%不等，与 Gupta 等<sup>[9]</sup>从澳大利亚分离得到的破囊壶菌的 DHA 含量相当。Sw7 是 6 株菌中 DHA 含量最高的菌株(42.01% TFA)，其次是 Mn35 和 Mn16，DHA 含量分别为 39% TFA 和 37% TFA (图 8)。目前用于商业化生产 DHA 的 *Schizochytrium limacinum* SR21 菌株的 DHA 含量仅为 30% TFA<sup>[10]</sup>，而 Chang 等<sup>[3]</sup>分离获得的 *Aurantiochytrium* sp.经优化后 DHA 含量则达到了 57.4% TFA。经摇瓶扩大培养后，Mn16 的 DHA 产量最高，达到 1.29 g/L，Sw7 次之，为 1.26 g/L。Kumon 等<sup>[11]</sup>从日本濑户内海分离得到的两株高产 DHA 破囊壶菌(*Labyrinthula* sp.)经优化后 DHA 产量仅为 0.67 g/L。

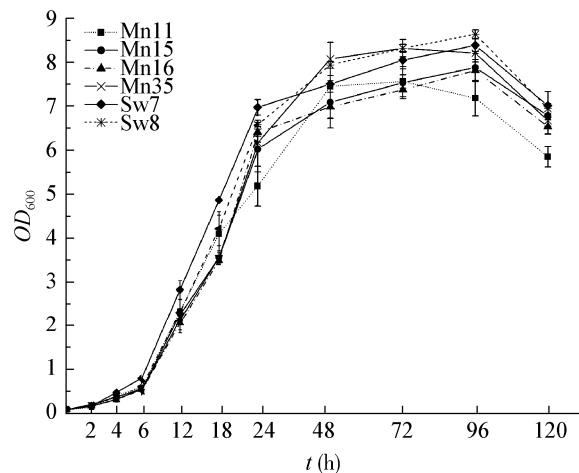


图 6 6 株破囊壶菌在液体培养基中的生长曲线  
Figure 6 Growth curve of six thraustochytrid strains in liquid medium

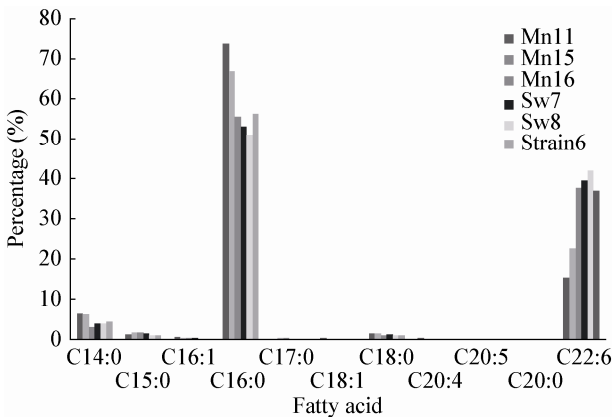


图 7 6 株破囊壶菌的脂肪酸分布  
Figure 7 Fatty acid profile of six thraustochytrid strains

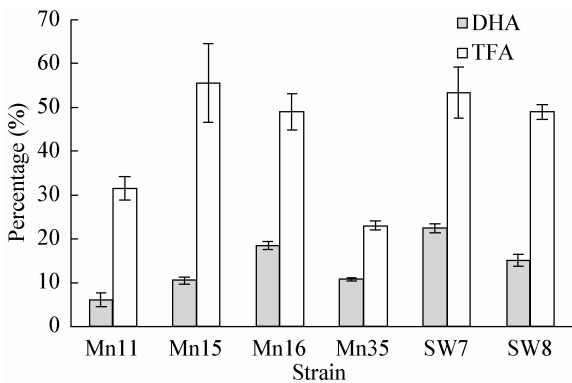


图 8 6 株破囊壶菌的总脂肪酸和 DHA 占细胞干重的百分比  
Figure 8 TFA and DHA percentages of six thraustochytrid strains

DHA 作为重要的婴儿食品添加剂和成人保健品<sup>[12]</sup>，具有很大的市场需求，是一种高附加值的代谢产物。除此之外，破囊壶菌中的单不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸还可成为生物柴油的原料。相比于多不饱和脂肪酸，单不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸的氧化稳定性使得其更适合用来生产生物柴油<sup>[13]</sup>。由图 7 可见，破囊壶菌中除 DHA 以外的多不饱和脂肪酸的含量甚微。C20:5 与 C20:4 的含量之和均少于 1% TFA，Mn35 和 Sw8 甚至不含有这两种多不饱和脂肪酸(表 1)。棕榈酸(C16:0)是破囊壶菌中最主要的饱和脂肪酸，其占据了总脂肪酸的 50%以上，Mn11 的棕榈酸含量甚至高达 73% TFA，与 Gupta 等<sup>[9]</sup>获得的生物柴油生产菌株相似。

表 1 6 株破囊壶菌的脂肪酸组成和产量 Table 1 Fatty acid profile and production of six thraustochytrid strains						
Fatty acid	Mn11	Mn15	Mn16	Mn35	Sw7	Sw8
C14:0	6.530±0.500	6.190±0.850	3.090±0.020	4.100±0.020	4.080±0.170	4.490±0.160
C15:0	1.350±0.250	1.750±0.190	1.630±0.090	1.560±0.090	1.130±0.070	1.060±0.030
C16:1	0.530±0.090	0.330±0.050	0.440±0.050	0.270±0.050	0.240±0.030	0
C16:0	73.650±3.550	66.930±3.950	55.514±1.700	53.140±1.700	51.070±1.880	56.320±3.360
C17:0	0.250±0.040	0.330±0.100	0.410±0.060	0.200±0.060	0.250±0.010	0.210±0.040
C18:1	0.300±0.030	0.110±0.090	0	0	0	0
C18:0	1.510±0.090	1.400±0.230	1.120±0.060	1.160±0.060	1.070±0.040	1.010±0.140
C20:4	0.470±0.320	0	0	0	0	0
C20:5	0.150±0.070	0.190±0.040	0.130±0.040	0	0.150±0.010	0
C20:0	0.120±0.030	0.080±0.080	0	0.160±0.000	0	0
C22:6	15.270±4.030	22.700±3.500	37.680±1.760	39.400±1.760	42.010±1.960	36.920±3.500
TFA (mg/g Dry weight)	315.530±27.360	556.330±90.750	489.770±41.390	230.400±10.140	533.600±58.080	490.060±17.650
DHA (g/L)	0.400±0.140	0.540±0.080	1.290±0.060	0.780±0.080	1.260±0.060	0.700±0.070

本次实验分离得到的 6 株破囊壶菌中, Mn11 和 Mn15 具有较高的饱和脂肪酸含量, 但 Mn11 的总脂肪酸含量偏低。Mn15 不仅总脂肪酸含量很高, 而且饱和脂肪酸的含量也远远高于其他菌株, 故 Mn15 最适合作为生物柴油生产菌株。Mn16 和 Sw7 在总脂肪酸和 DHA 含量方面均具有较高的优势, 适合用于 DHA 的生产。此外, 通过进一步优化培养条件和菌种, 如发酵条件优化、添加诱导因子、诱变育种等方法, 可改变或调控破囊壶菌的代谢, 使其代谢过程向着有利于目的产物积累的方向改变, 成为特定的生物柴油或 DHA 生产菌株。

破囊壶菌作为自养微生物, 与异养的藻类相比具有诸多优势。首先, 破囊壶菌的生长速度比藻类快很多, 在发酵条件下, 破囊壶菌 48 h 即可达到平台期, 而藻类的生长周期一般需要一周时间<sup>[14]</sup>; 其次, 破囊壶菌细胞结构与组成比藻类简单, 在提取发酵产物时更方便快捷。此外, 破囊壶菌还能利用粗甘油<sup>[15]</sup>等有机废料作为碳源, 节约生产成本。因此, 本实验中得到的 6 株破囊壶菌具有进一步研究利用的价值。

## 参 考 文 献

- [1] Ackman RGSM, Stanby ME. Nutritional Evaluation of Long-chain Fatty Acids in Fish Oil[M]. London: Academic Press, 1982: 25
- [2] Mao GN, Zhang JT. Production of EPA and DHA by fungal fermentation[J]. Food Research and Development, 2005, 26(2): 95-98 (in Chinese)  
毛跟年, 张俊涛. 真菌发酵法生产 EPA 和 DHA[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(2): 95-98
- [3] Chang KJL, Dunstan GA, Abell GCJ, et al. Biodiscovery of new Australian thraustochytrids for production of biodiesel and long-chain omega-3 oils[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 5(93): 2215-2231
- [4] Honda D, Yokochi T, Nakahara T, et al. Molecular phylogeny of labyrinthulids and thraustochytrids based on the sequencing of 18S ribosomal RNA gene[J]. Eukaryot Microbiology, 1999, 46(6): 637-647
- [5] Kranz RG, Gabbert KK, Madigan MT. Positive selection systems for discovery of novel polyester biosynthesis genes based on fatty acid detoxification[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3010-3013
- [6] Kamlangdee N, Fan KW. Polyunsaturated fatty acids production by *Schizochytrium* sp. isolated from mangrove[J]. Science Technology, 2003(25): 643-650
- [7] Bongiorno L, Jain R, Raghukumar S, et al. *Thraustochytrium gaertnerium* sp. nov: a new thraustochytrid stramenopilan protist from mangroves of Goa, India[J]. Protist, 2005, 156(3): 303-315
- [8] Morita E, Kumon Y, Nakahara T, et al. Docosahexaenoic acid production and lipid-body formation in *Schizochytrium limacinum* SR21[J]. Marine Biotechnology, 2006, 8(3): 319-327
- [9] Gupta A, Wilkens S, Adcock JL, et al. Pollen baiting facilitates the isolation of marine thraustochytrids with potential in omega-3 and biodiesel production[J]. Industrial Microbiology Biotechnology, 2013, 40(11): 1231-1240
- [10] Yokochi T, Honda D, Higashihara T, et al. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 49(1): 72-76
- [11] Kumon Y, Yokoyama R, Haque Z, et al. A new Labyrinthulid isolate that produces only docosahexaenoic acid[J]. Marine Biotechnology, 2006, 8(2): 170-177
- [12] Takahata K, Monobe KI, Tada M, et al. The benefits and risks of n-3 polyunsaturated fatty acids[J]. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 1998, 62(11): 2079-2085
- [13] Atadashi I, Aroua M, Aziz AA. High quality biodiesel and its diesel engine application: A review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, 14(7): 1999-2008
- [14] Zheng HL, Zhang Q, Ma XC, et al. Research progress of biodiesel producing microalgae[J]. China Biotechnology, 2009, 29(3): 110-116 (in Chinese)  
郑洪立, 张齐, 马小琛, 等. 产生物柴油微藻培养研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(3): 110-116
- [15] Scott SD, Armenta RE, Berryman KT, et al. Use of raw glycerol to produce oil rich in polyunsaturated fatty acids by a thraustochytrid[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 8(3): 267-272