

激光镊子拉曼光谱技术分析圆红冬孢酵母生成 油脂和类胡萝卜素

孙美娟^{1,2} 蒋玉凌^{1,2} 来爱华¹ 陶站华² 刘军贤¹

(¹广西师范大学物理科学与技术学院, 广西 桂林 541004)
(²广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 530007)

摘要 采用激光镊子拉曼光谱(LTRS)技术对圆红冬孢酵母合成油脂和类胡萝卜素进行定量分析,考察不同碳氮比、碳磷比以及碳硫比对圆红冬孢酵母在细胞水平油脂和类胡萝卜素合成能力的影响。测定不同浓度植物油的拉曼光谱,其 1751 cm^{-1} 峰峰高与油脂浓度线性关系良好,相关系数 R^2 可达0.97349,说明激光镊子拉曼光谱法是定量分析油脂的有效手段。以 1751 cm^{-1} 峰和 1520 cm^{-1} 峰峰高定量细胞内油脂和胡萝卜素含量,分析不同样品圆红冬孢酵母细胞的拉曼光谱,结果表明,随着碳氮比、碳磷比和碳硫比的升高,圆红冬孢酵母细胞内油脂含量逐步增加,而类胡萝卜素的含量则显著降低。以上结果说明,激光镊子拉曼光谱技术是实时检测圆红冬孢酵母细胞油脂及类胡萝卜素合成和优化发酵培养基的有效工具。

关键词 光谱学;定量检测;激光镊子拉曼光谱;圆红冬孢酵母;油脂;类胡萝卜素

中图分类号 O657.37 文献标识码 A doi: 10.3788/LOP50.033001

Analysis of Lipid and Carotenoids in *Rhodospiridium toruloides* Using Laser Tweezer Raman Spectroscopy

Sun Meijuan^{1,2} Jiang Yuling^{1,2} Lai Aihua¹ Tao Zhanhua² Liu Junxian¹

(¹College of Physics and Technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China)
(²Laboratory of Biophysics of Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China)

Abstract A method is established based on laser tweezer Raman spectroscopy (LTRS) for rapid quantitation of lipid and carotenoids in *Rhodospiridium toruloides* cells, and the effect of different C/N, C/P, C/S ratios in a culture medium on synthesis capability of lipid and carotenoids is evaluated at the single-cell level. The Raman spectra of plant oil in different concentrations are determined and the high correlation between the peak intensity at 1751 cm^{-1} and lipid concentration is observed. The correlation coefficient of standard curve for lipid is 0.97349. The data demonstrate that LTRS is efficient in the quantitative analysis of lipid. Lipid and carotenoids within the *Rhodospiridium toruloides* cells cultured in different media are acquired quantificationally according to the Raman peak heights at 1751 cm^{-1} and 1520 cm^{-1} , respectively. The result shows that the lipid concentration in *Rhodospiridium toruloides* cells increases as the ratios of C/N, C/P, C/S increase, while the carotenoids concentration significantly decreases. The above results indicate that LTRS is an efficient approach to the quantitative analysis of lipid and carotenoids in microbial cells and the optimization of fermentation medium.

Key words spectroscopy; quantitative determination; laser tweezer Raman spectroscopy; *Rhodospiridium toruloides*; lipid; carotenoids

OCIS codes 300.6450; 140.3550; 180.5655

收稿日期: 2012-10-19; 收到修改稿日期: 2012-12-03; 网络出版日期: 2013-01-31

基金项目: 国家自然科学基金(31060128)和广西科学院基本科研业务费(11YJ24WL01)资助课题。

作者简介: 孙美娟(1988—),女,硕士研究生,主要从事光谱学与微生物培养等方面的研究。

E-mail: meijuansun87@gmail.com

导师简介: 陶站华(1972—),男,副研究员,主要从事光谱学方面的研究。E-mail: taozhanhua@163.com(通信联系人)

1 引言

微生物油脂,又称单细胞油脂,是由酵母、霉菌和细菌等微生物在一定条件下,利用碳水化合物、碳氢化合物和普通油脂作为碳源,在细胞内产生的油脂^[1]。圆红冬孢酵母生物量和细胞内油脂含量稳定,据文献报道通过优化培养条件细胞内油脂质量分数高达 76.1%,脂肪得率系数可达 22.7^[2~5]。利用微生物生产油脂有以下优点:生产油脂周期短,不受季节和气候的影响,营养简单,易于进行工业化大规模培养^[2]。当前化石燃料的过度消耗造成其储备量日益减少,利用微生物生产油脂是开发新油脂资源的重要方向,进一步探索有关微生物积累油脂的过程具有重要的现实意义^[6]。

类胡萝卜素是圆红冬孢酵母细胞内另一种重要代谢产物,广泛用于食品、医药以及饲料的添加剂,具有防癌、抗癌、预防心脑血管疾病和抗机体衰老等功效^[7]。由于圆红冬孢酵母脂类和类胡萝卜素含量较高,因此成为利用发酵法生产上述两类物质的重要候选微生物。优化培养基和发酵条件以进一步提高圆红冬孢酵母油脂和类胡萝卜素产量,是实现其工业化生产的前提,而灵敏、高效的检测脂类和类胡萝卜素含量的方法对优化过程尤为重要。油脂和类胡萝卜素都为脂溶性物质,且生成后在细胞内不断累积而不会扩散到胞外,目前常用的检测方法需要先在低温下破碎细胞,然后用有机溶剂反复萃取,这种方法工作量大,耗时长,很难适应大量样品检测的需要。因此,开发一种高效、快捷的能同时定量细胞内油脂和胡萝卜素的方法具有重要意义。

拉曼光谱是一种分析生物细胞内分子结构和含量的有用工具^[8~10],可检测蛋白质、核酸、脂类等生物大分子。与传统生物检测技术相比,拉曼光谱检测样品快速、无损,不需要样品预处理,光谱信息可用于分析多种物质结构及其含量。激光镊子拉曼光谱技术(LTRS)将光镊与显微拉曼光谱技术相结合。光镊是由一束高度聚焦的激光微束形成的三维光学势阱^[11,12],可以俘获并长时间固定处于溶液中的单个细胞,减少细胞运动及布朗运动的干扰,在接近自然的状态下分析单个细胞,同时减弱了背景信号和荧光的强度,提高拉曼谱图的信噪比。本文首先测定不同浓度植物油的拉曼光谱并绘制用于油脂定量分析的标准曲线,证实拉曼光谱相关特征峰的强度与油脂的浓度有良好的线性关系。然后采用激光镊子拉曼光谱法定量分析不同碳氮(C/N)比、碳磷(C/P)比和碳硫(C/S)比的培养基培养的圆红冬孢酵母细胞所生成的油脂和类胡萝卜素,探索激光镊子拉曼光谱用于优化圆红冬孢酵母合成油脂和类胡萝卜素的可行性。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌株和培养基

实验用圆红冬孢酵母菌株购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(编号:CGMCC 2.1389)。

不同碳氮比优化培养基为每升固定含葡萄糖 40 g、酵母提取物 0.5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、 KH_2PO_4 1.0 g,调整 $(NH_4)_2SO_4$ 的含量分别为 7.547、1.887、0.472、0.236 g,对应的碳氮比分别为 10、40、160、320。

不同碳磷比优化培养基为每升固定含葡萄糖 40 g、酵母提取物 0.5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、 $(NH_4)_2SO_4$ 1.887 g、 KH_2PO_4 的含量分别为 1.0、0.1、0.05 g 和 0,对应的碳磷比依次为 255、2045、3398、9552,因为 KH_2PO_4 含量的减少会导致 K^+ 浓度的降低,所以补充适量 K_2SO_4 维持 K^+ 浓度的稳定。

不同碳硫比优化培养基为每升固定含葡萄糖 40 g、 NH_4Cl 1.528 g、酵母提取物 0.5 g、 $MgCl_2$ 0.5 g、 KH_2PO_4 1.0 g、 Na_2SO_4 含量分别为 2.0、0.25、0.05 g 和 0,对应的碳硫比依次为 150、1180、5330、46750。

2.1.2 激光镊子拉曼光谱系统

实验所用的激光光镊拉曼光谱系统如文献^[13,14]所述,一束 780 nm 的半导体激光导入倒置生物显微镜(TE2000U, Nikon),激光经油浸物镜^[100×, 数值孔径(NA) 1.3]聚焦形成一个单光束势阱用以囚禁目标,并且这束光也用来激发被俘获目标的拉曼散射。然后拉曼散射光被聚焦进光谱仪(SpectraPro2300i, Acton)的输入狭缝,光谱仪耦合到 CCD(Spec-10, Princeton Instruments)上,用液氮冷却 CCD 温度到 $-120\text{ }^\circ\text{C}$ 。

2.2 实验方法

2.2.1 细胞培养

将生长于酵母完全培养基 YEPD 平板上的圆红冬孢酵母单菌落接种于 YEPD 液体培养基中,在 $28\text{ }^\circ\text{C}$,

200 r/min 摇床预培养 18 h 至指数生长期,再以 10% 接种量接种到装有 50 mL 不同碳氮比、碳磷比和碳硫比优化培养基的 250 mL 摇瓶内,在相同的条件下发酵培养 120 h,然后取 2 mL 用于拉曼光谱检测。

2.2.2 拉曼光谱的测定与数据处理

缓冲液里面的单个圆红冬孢酵母细胞被聚焦的激光产生的辐射压力囚禁在样品槽底部上方 10 μm 的焦点附近,以 15 mW 激发功率和 15 s 曝光时间用捕获方式采集圆红冬孢酵母细胞的拉曼光谱,每种样品各收集 100 个细胞的光谱,用同样的方法获得 10 个缓冲液的背景光谱。光谱数据预处理利用 Matlab 7.1 软件编写的程序进行,原始光谱扣除背景,基线校正以后得到单个细胞的拉曼光谱。在此基础上,统计每组细胞样品的平均光谱,定性分析不同组间的光谱差异。单个细胞内脂类的总含量通过代表脂类信息的拉曼光谱峰 1751 cm^{-1} 的强度计算,类胡萝卜素的含量通过 1520 cm^{-1} 特征峰进行计算,用 Matlab 7.1 编写程序分别计算 1751 cm^{-1} 和 1520 cm^{-1} 的峰高,然后做定量分析。

2.2.3 植物油标准曲线的绘制

将植物油溶于氯仿,分别稀释成浓度为 100,200,300,400,500,600,700,800,900,1000 mg/L 的溶液,以 10 s 曝光时间收集拉曼光谱,每个光谱扣除氯仿溶剂的背景光谱,平滑后,取 1751 cm^{-1} 特征峰峰高与溶液浓度做相关性曲线,即为植物油的定量标准曲线。

3 结果与讨论

3.1 圆红冬孢酵母细胞的拉曼光谱

为了确认圆红冬孢酵母中油脂和类胡萝卜素的存在,测定了圆红冬孢酵母细胞、植物油和 β -胡萝卜素标准品的拉曼光谱,如图 1 所示。比较圆红冬孢酵母细胞和植物油的拉曼光谱(分别为图 1 中曲线 a 和 b)可以发现油脂的主要特征峰 1082,1301,1440,1654,1751 cm^{-1} 在圆红冬孢酵母细胞的拉曼光谱中均存在且强度较高,说明圆红冬孢酵母中脂类含量较高。比较圆红冬孢酵母细胞和 β -胡萝卜素标准品的拉曼光谱(分别为图 1 中曲线 a 和 c)可以发现,圆红冬孢酵母细胞拉曼光谱中对应类胡萝卜素的特征峰 1520,1155,1002 cm^{-1} 都特别突出,说明圆红冬孢酵母细胞中含有较多的类胡萝卜素,位于 1520 cm^{-1} 的 C=C 伸缩振动峰附近没有其他物质信号的干扰,且峰形尖锐,适宜利用其峰高进行类胡萝卜素的定量分析。

3.2 拉曼光谱定量分析圆红冬孢酵母合成油脂

为实现圆红冬孢酵母细胞内油脂的定量分析,首先应选取适合定量的特征峰。虽然 1082,1301,1440,1654,1751 cm^{-1} 峰都与油脂的含量相关,但 1082 cm^{-1} 峰同时包含脂类和核酸;1440 cm^{-1} 峰来源于蛋白质和脂类物质的 CH_2 、 CH_3 基团,且靠近位于 1520 cm^{-1} 峰的 C=C 伸缩振动峰,该物质信号强且峰型突出会对周围物质信号产生干扰;1654 cm^{-1} 除与油脂有关外,还是表征蛋白质中酰胺 I 的特征峰;而 1301 cm^{-1} 虽然表征的是脂类物质,但该峰峰形不规则,通过峰高定量计算存在不确定性,所以以上与油脂相关的峰都不适合油脂的定量。而 1751 cm^{-1} 特征峰虽然强度不高,但附近没有其他物质信号的干扰且左右接近对称,因此选取 1751 cm^{-1} 峰对油脂含量进行定量分析。图 2 即是取不同浓度植物油拉曼光谱 1751 cm^{-1} 峰峰高所做的标准曲线。图中油脂拉曼光谱 1751 cm^{-1} 峰峰高与其浓度呈线性关系,相关系数 R^2 可达 0.97349,相关性良好,这说明激光镊子拉曼光谱系统稳定,对油脂的浓度变化敏感且测定准确,是定量分析油脂的有效手段,因此以下研究都用 1751 cm^{-1} 峰峰高来定量细胞内的油脂含量。

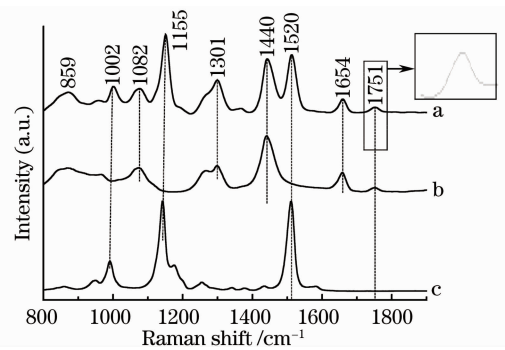


图 1 圆红冬孢酵母细胞拉曼光谱。a 乘以 5 倍系数的圆红冬孢酵母拉曼光谱; b 植物油的拉曼光谱; c β -胡萝卜素标准品溶液的拉曼光谱

Fig. 1 Raman spectra of *Rhodosporidium toruloides* cells. a Raman spectra of *Rhodosporidium toruloides* cells multiplied by 5 times; b Raman spectra of plant oil; c Raman spectra of β -carotene standard solution

文献报道不同 C/N 比对圆红冬孢酵母产油发酵有很大的影响,Somashekar 等^[5]报道圆红冬孢酵母在

C/N 比为 160:1 的条件下油脂产量为细胞干重的 55%，而 C/N 比为 10:1 时油脂产量仅为 25%。李永红等^[2]的研究表明圆红冬孢酵母油脂含量的变化趋势跟 C/N 比的变化趋势是一致的，在一定比例下随 C/N 比的增大其油脂含量也增大。图 3 即是在不同 C/N 比培养基中培养 120 h 的圆红冬孢酵母细胞从 1600 cm^{-1} 到 1900 cm^{-1} 的拉曼光谱，由图可见，不同样品的圆红冬孢酵母细胞拉曼光谱 1751 cm^{-1} 峰峰高存在明显差异，可直观地反映出不同 C/N 比培养基条件对圆红冬孢酵母细胞内油脂的积累具有显著影响。通过计算 1751 cm^{-1} 峰高，可定量反映培养基中 C/N 比升高时，圆红冬孢酵母在细胞水平的油脂合成能力也随之增加[图 4(a)]，说明在高 C/N 比条件下能够获得较高的细胞油脂含量。为了减少生物油脂生产的成本，各种天然的或者废弃的材料，如菊芋块茎、下水道污泥、谷氨酸钠废水等常被开发作为碳源^[15,16]，但是这些天然材料同样富含氮源，致使 C/N 比降低，从而生物油脂的产量受到影响。有研究显示磷限制及硫限制可使圆红冬孢酵母即使在较低 C/N 比条件下也可在细胞内

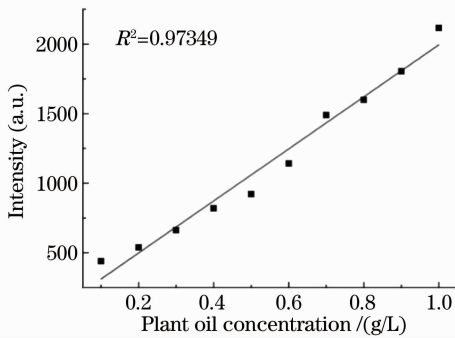


图 2 植物油定量标准曲线

Fig. 2 Standard curve for plant oil

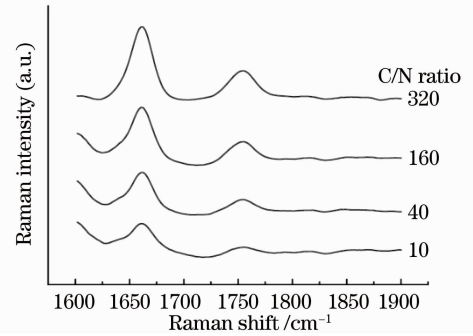
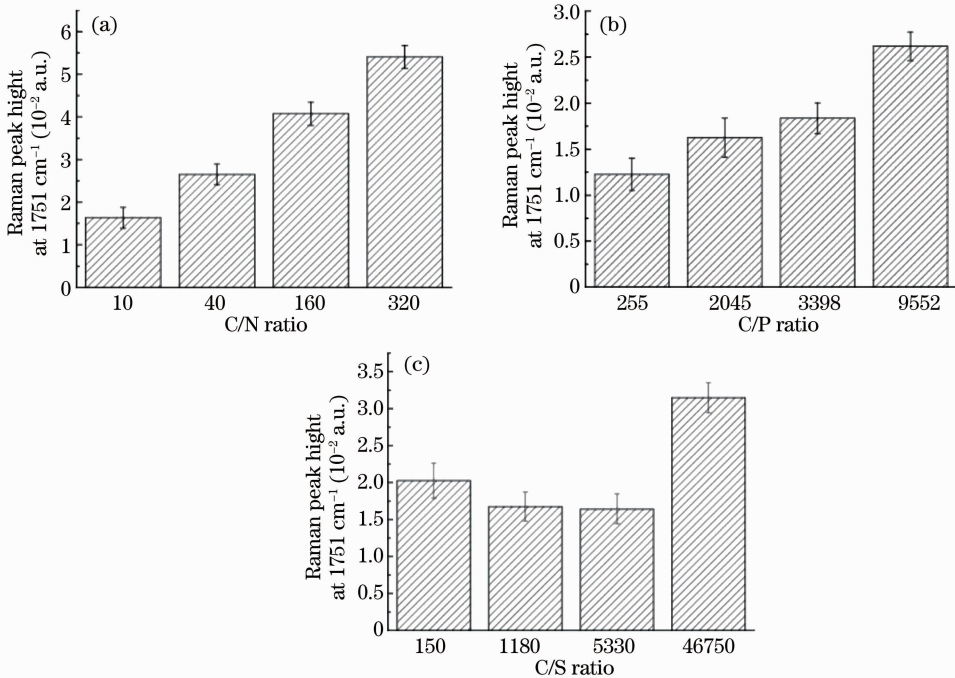


图 3 不同 C/N 比培养基培养的圆红冬孢酵母细胞的平均拉曼光谱

Fig. 3 Average Raman spectra of *Rhodospiridium toruloides* cells cultured in media with different C/N ratios图 4 不同发酵培养基对圆红冬孢酵母细胞内油脂合成的影响。(a)不同 C/N 比圆红冬孢酵母 1751 cm^{-1} 峰高；(b)不同 C/P 比圆红冬孢酵母 1751 cm^{-1} 峰高；(c)不同 C/S 比圆红冬孢酵母 1751 cm^{-1} 峰高Fig. 4 Effect of different culture media on synthesis capability of lipid of *Rhodospiridium toruloides* cells. (a) Raman peak height at 1751 cm^{-1} of *Rhodospiridium toruloides* cells cultured in media with different C/N ratios; (b) different C/P ratios; (c) different C/S ratios

积累较高含量的脂类^[3,4],图 4(b)、(c)分别显示随着磷和硫的含量的降低,圆红冬孢酵母细胞拉曼光谱 1751 cm^{-1} 峰峰高总体呈现增高趋势,表明圆红冬孢酵母细胞内油脂含量增多。当两组培养基中 KH_2PO_4 和 Na_2SO_4 分别降至 0 时,油脂含量均达到最高值。

3.3 拉曼光谱定量分析类胡萝卜素的合成

类胡萝卜素富含 C=C 结构,这种结构具有高度的不稳定性,对外界光、热特别敏感,传统的提取过程会造成类胡萝卜素的降解和构象的变化。本课题组之前的研究表明微生物细胞内类胡萝卜素的含量可通过其拉曼光谱的 1520 cm^{-1} 特征峰峰高进行定量,且所测拉曼光谱数据和紫外光谱数据具有良好的相关性,采用激光镊子拉曼光谱法直接分析细胞内的类胡萝卜素提高了分析效率和分析结果的可靠性^[7,17]。计算上述不同 C/N 比、C/P 比和 C/S 比培养基培养的圆红冬孢酵母细胞平均拉曼光谱的 1520 cm^{-1} 峰峰高,即可得到图 5。从图 5 可以看出:当培养基中 C/N 比、C/P 比和 C/S 比较低时类胡萝卜素的含量差异不大,但当 C/N 比、C/P 比和 C/S 比分别高达 320,9552,46750 时,类胡萝卜素的含量显著降低,因此从总体上看圆红冬孢酵母细胞内类胡萝卜素的含量随着细胞内 C/N 比、C/P 比和 C/S 比的升高而降低。

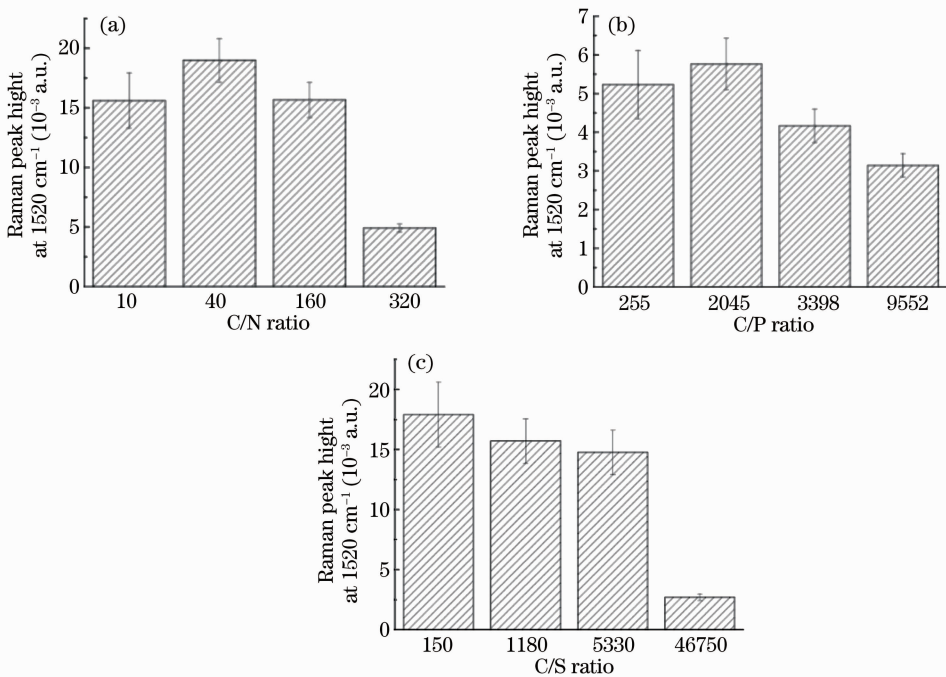


图 5 不同发酵培养基对圆红冬孢酵母内类胡萝卜素合成的影响。(a)不同 C/N 比圆红冬孢酵母 1520 cm^{-1} 峰高;
(b)不同 C/P 比圆红冬孢酵母 1520 cm^{-1} 峰高;(c)不同 C/S 比圆红冬孢酵母 1520 cm^{-1} 峰高

Fig. 5 Effect of different culture media on synthesis capability of carotenoids of *Rhodospiridium toruloides* cells. (a) Raman peak height at 1520 cm^{-1} of *Rhodospiridium toruloides* cells cultured in media with different C/N ratios; (b) different C/P ratios; (c) different C/S ratios

4 结 论

用激光镊子拉曼光谱法测不同浓度植物油的拉曼光谱,其 1751 cm^{-1} 峰峰高与油脂浓度线性关系良好,相关系数 R^2 可达 0.97349,说明激光镊子拉曼光谱法是定量分析油脂的有效手段。分别计算不同样品的圆红冬孢酵母细胞拉曼光谱 1751 cm^{-1} 峰和 1520 cm^{-1} 峰峰高表明:随着 C/N 比、C/P 比和 C/S 比升高,圆红冬孢酵母体内油脂含量逐步增加,而类胡萝卜素的含量则显著降低。激光镊子拉曼光谱法高效、灵敏,且可同时检测细胞中多种代谢产物,是细胞内物质分析和细胞培养条件优化的理想方法。

参 考 文 献

1 Xing Dahui, Pan Anlong, Xue Donghua *et al.*. Biomass carbohydrates assimilation and lipid accumulation by *Mortierella*

- isabellina[J]. *Chinese J. Biotechnology*, 2010, **26**(2): 189~193
- 邢大辉, 潘安龙, 薛冬桦 等. 深黄被孢霉利用不同碳源产油脂比较[J]. *生物工程学报*, 2010, **26**(2): 189~193
- 2 Li Yonghong, Liu Bo, Zhao Zongbao *et al.*. Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Chinese J. Biotechnology*, 2006, **22**(4): 650~656
- 李永红, 刘波, 赵宗保 等. 红冬孢酵母菌发酵产油脂培养基及发酵条件的优化研究[J]. *生物工程学报*, 2006, **22**(4): 650~656
- 3 Siguo Wu, Cuimin Hu, Guojie Jin *et al.*. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Bioresource Technology*, 2010, **101**(15): 6124~6129
- 4 Siguo Wu, Xin Zhao, Hongwei Shen *et al.*. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2011, **102**(2): 1803~1807
- 5 D. Somashekar, R. Joseph. Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2000, **16**(5): 491~493
- 6 Zhao Zongbao. Toward cheaper microbial oil for biodiesel oil[J]. *China Biotechnology*, 2005, **25**(2): 8~11
- 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
- 7 Tao Zhanhua, Wang Guiwen, Xu Xiaodong *et al.*. Monitoring and rapid quantification of total carotenoids in *Rhodotorula glutinis* cells using laser tweezers Raman spectroscopy[J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2011, **314**(1): 42~48
- 8 Tao Zhanhua, Yao Huilu, Wang Guiwen *et al.*. Using Raman spectroscopy to analyze apoptosis of gastric cancer cells induced by cisplatin[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2009, **29**(9): 2442~2445
- 陶站华, 姚辉璐, 王桂文 等. 利用拉曼光谱分析顺铂诱导的胃癌细胞凋亡[J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, **29**(9): 2442~2445
- 9 Meng Lingjing, Ji Xiaolu, Li Zida *et al.*. Mono-hepatocellular carcinoma by Raman mapping[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2011, **48**(2): 021703
- 孟令晶, 纪晓露, 李自达 等. 单个肝癌细胞的拉曼成像研究[J]. *激光与光电子学进展*, 2011, **48**(2): 021703
- 10 Chen Xiuli, Wang Guiwen, Tao Zhanhua *et al.*. Raman spectral discrimination of thalassemia erythrocytes based on PCA arithmetic and BP network model[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(9): 2448~2454
- 陈秀丽, 王桂文, 陶站华 等. 基于 PCA 和 BP 网络的地中海贫血红细胞拉曼光谱判别[J]. *中国激光*, 2009, **36**(9): 2448~2454
- 11 Li Yinmei. Optical Tweezers: Principles, Techniques and Applications[M]. Hefei: University of Science and Technology of China Press, 1996. 1~10
- 李银妹. 光镊原理、技术和应用[M]. 合肥: 中国科技大学出版社, 1996. 1~10
- 12 Cheng Qin, Dong Rong, Huang Dalin *et al.*. Raman spectrum of germinated spores of *Bacillus subtilis* in response to formaldehyde stress[J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(10): 1015002
- 程琴, 董荣, 黄大林 等. 枯草芽孢杆菌萌发后孢子响应甲醛胁迫过程的拉曼光谱研究[J]. *中国激光*, 2011, **38**(10): 1015002
- 13 C. Xie, J. Mace, M. A. Dinno *et al.*. Identification of single bacterial cells in aqueous solution using confocal laser tweezers Raman spectroscopy[J]. *Anal. Chem.*, 2005, **77**(14): 4390~4397
- 14 C. Xie, D. Chen, Y. Q. Li. Sorting and identification of single living micro-organisms with optical Raman tweezers[J]. *Opt. Lett.*, 2005, **30**(14): 1800~1802
- 15 C. Angerbauer, M. Siebenhofer, M. Mittelbach *et al.*. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production[J]. *Bioresource Technology*, 2008, **99**(8): 3051~3056
- 16 Hua Yanyan, Zhao Xin, Zhao Jin *et al.*. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* using Jerusalem artichoke tubers [J]. *China Biotechnology*, 2007, **27**(10): 59~63
- 华艳艳, 赵鑫, 赵金 等. 圆红冬孢酵母发酵菊芋块茎产油脂的研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, **27**(10): 59~63
- 17 Yuan Yufeng, Tao Zhanhua, Liu Junxian *et al.*. Raman tweezers-based analysis of carotenoid synthesis in *Rhodotorula glutinis*[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2011, **31**(4): 1001~1005
- 袁玉峰, 陶站华, 刘军贤 等. 拉曼镊子分析红酵母合成类胡萝卜素[J]. *光谱学与光谱分析*, 2011, **31**(4): 1001~1005