

生物工程

SSADH 基因调控对高山被孢霉脂质合成的影响

王春梅, 王鸿超, 陈海琴, 赵建新, 张 灏, 陈 卫, 陈永泉

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:高山被孢霉合成油脂能力很强,可合成多种 $n-3$ 和 $n-6$ 系列多不饱和脂肪酸(PUFAs)。 γ -氨基丁酸(GABA)代谢途径是由谷氨酸经过一系列反应转化至琥珀酸并产生 NADPH 的过程,同时可为产油真菌生长提供碳源和氮源。通过构建 γ -氨基丁酸途径中琥珀酸半醛脱氢酶(SSADH)基因 RNA 干扰菌株(*MA-iSSADH*),对 *MA-iSSADH* 中的脂肪酸组成、NADPH 水平及相关基因转录水平进行分析,研究 SSADH 与高山被孢霉脂质合成关系。与原养型高山被孢霉(*M. alpina*)相比,*MA-iSSADH* 中 SSADH 基因转录水平显著下调,同时脂肪酸总含量下降了 20.9%,C18:1 相对含量提高了 73.5%,表明 SSADH 在高山被孢霉脂质合成中起重要作用。尽管 *MA-iSSADH* 中 NADPH 绝对含量没有发生显著性变化,但 NADPH 合成相关基因如苹果酸酶(ME)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGD)、异柠檬酸脱氢酶(IDH)、亚甲基四氢叶酸脱氢酶(MTHFD)基因转录水平均发生了显著变化,表明 SSADH 对 NADPH 合成途径产生了重要调控,这可能是其影响脂质合成的原因之一。

关键词:高山被孢霉; γ -氨基丁酸代谢途径; SSADH 基因调控; NADPH; 脂质合成

中图分类号:TS201.3;Q812

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)10-0115-06

Effects of SSADH gene regulation on lipid synthesis of the oleaginous fungus *Mortierella alpina*

WANG Chunmei, WANG Hongchao, CHEN Haiqin, ZHAO Jianxin, ZHANG Hao, CHEN Wei, CHEN Yongquan

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: *M. alpina* has strong ability to synthesize lipid and can synthesize a variety of $n-3$ and $n-6$ series polyunsaturated fatty acids (PUFAs). γ -Aminobutyric acid (GABA) metabolism pathway is a process in which glutamate is converted to succinic acid through a series of reactions and produces NADPH, and can provide nitrogen source and carbon source for the growth of fungi for lipid synthesis. By constructing RNA recombinant strain (*MA-iSSADH*) of succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) gene in GABA metabolism pathway, the fatty acid composition of *MA-iSSADH*, the content of NADPH and the transcriptional level of related genes generating NADPH were analyzed to investigate the role of SSADH in *M. alpina* during lipid synthesis. Compared with *M. alpina*, the transcriptional level of SSADH decreased significantly and the content of total fatty acid decreased by 20.9%, while the relative content of C18:1 increased by 73.5% in *MA-iSSADH*. It indicated that the SSADH played an important role in the lipid synthesis of *M. alpina*. Although there was no obvious change in content of NADPH, the transcriptional level of related genes generating NADPH such as malic acid (ME), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD), isocitrate hydrogenase (IDH) and methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD) changed significantly, which showed that SSADH regulated the source of NADPH required for the lipogenesis, and thus

收稿日期:2018-03-02;修回日期:2018-08-14

基金项目:国家自然科学基金青年项目(31400038)

作者简介:王春梅(1993),女,硕士研究生,研究方向为食品生物技术(E-mail)chunmwang@126.com。

通信作者:王鸿超,副研究员,博士(E-mail)hewang@jiangnan.edu.cn。

phate dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD), isocitrate hydrogenase (IDH) and methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD) changed significantly, which showed that SSADH regulated the source of NADPH required for the lipogenesis, and thus

played an important role in lipid synthesis of *M. alpina*.

Key words: *M. alpina*; GABA metabolism pathway; SSADH gene regulation; NADPH; lipogenesis

多不饱和脂肪酸(PUFAs)是维持人体正常生理代谢不可或缺的功能性脂肪酸。高山被孢霉(*M. alpina*)能够合成多种 $n-3$ 和 $n-6$ 系列的 PUFAs^[1],并可工业化生产花生四烯酸(AA)^[2]。但高山被孢霉的产脂能力有限并受诸多因素影响,为提高高山被孢霉脂质合成的能力,探究从分子水平对脂质合成相关基因进行遗传改造。传统高山被孢霉分子的改造主要集中在 PUFAs 合成途径相关酶的基因及产 NADPH 途径相关酶的改造^[3-5]。

γ -氨基丁酸(GABA)代谢途径是由谷氨酸经过一系列反应转化至琥珀酸的过程。谷氨酸在谷氨酸脱羧酶(GAD)的作用下脱羧转化为GABA;GABA转氨酶(GABA-T)将GABA转换到琥珀酸半醛(SSA);琥珀酸半醛脱氢酶(SSADH)催化琥珀酸半醛反应生成琥珀酸(SA)^[6]。在植物中GABA可为植物抵抗应激反应和非应激反应^[7];在哺乳动物中GABA主要作为一种重要的神经递质^[8];在真菌中,GABA不仅在氮代谢过程中具有重要的作用^[9],同时也可作为细胞生长提供碳源^[10]。

NADPH是脂质合成的主要还原力^[11],通常认为磷酸戊糖途径和三羧酸循环为细胞内主要的NADPH来源,近来也有研究表明氨基酸代谢为脂肪酸的合成提供少量的NADPH^[12]。GABA代谢途径中可产生NADPH;此外在耶氏解脂酵母(*Yarrowia lipolytica*)中,SSADH的缺失或突变可影响耶氏解脂酵母的脂质合成过程^[13];SSADH属于醛类脱氢酶(ALDHs)家族^[14],OP9小鼠中ALDH4A1基因的沉默改变了脂滴的生成与积累,同时在高脂肥胖小鼠中发现ALDH4A1的表达水平与正常小鼠相比发生了明显的变化^[15],这表明SSADH可能与脂质合成存在重要关系。前期研究中对真菌通过比较基因组学分析发现SSADH存在于高山被孢霉中^[16]。本实验通过RNA干扰SSADH基因,研究SSADH与高山被孢霉脂质合成的关系,为深入探讨氨基酸与脂质合成机理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

高山被孢霉 ATCC 32222(来自美国标准生物制品收藏中心),其尿嘧啶营养缺陷型菌株 CCFM 501、*E. coli* top10 和根癌农杆菌 CCFM 834 为本研究中心保藏;pBIG2-ura5s-Its 为遗传操作载体。

Trizol (Invitrogen); Prime Script RT reagent kit (TaKaRa, 日本); 限制性内切酶 (NEB, 美国); T4 DNA 连接酶 (Promega, 美国); KOD plus 高保真 DNA 聚合酶 (TOYOBO 公司, 日本); gold star DNA 聚合酶 (康为世纪, 中国); iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 美国); NADP/NADPH 测定试剂盒 (Bio vision 公司); Biospin Fungus Genomic DNA Extraction Kit (Bio Flux); 乙腈 (色谱纯); 其他试剂均为分析纯。

Broth 培养基: 葡萄糖 20 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 磷酸二氢钾 1 g/L, 七水硫酸镁 0.25 g/L, 硝酸钾 10 g/L, pH 6.0。

MM 培养基: 磷酸氢二钾 1.74 g/L, 磷酸二氢钾 1.37 g/L, 氯化钠 0.146 g/L, 七水硫酸镁 0.49 g/L, 氯化钙 0.078 g/L, 七水硫酸亚铁 0.002 5 g/L, 硫酸铵 0.53 g/L, MES 7.8 g/L, 葡萄糖 1.8 g/L, 甘油 5 g/L, pH 6.8。

IM 培养基: MM 培养基, 乙酰丁香酮 (AS) 200 μ mol/L。

YEP 培养基: 酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 5 g/L。

SC 固体培养基: 葡萄糖 20 g/L, yeast nitrogen base without amino acids 5 g/L, 硫酸铵 1.7 g/L, 异亮氨酸 60 mg/L, 亮氨酸 60 mg/L, 苯丙氨酸 60 mg/L, 苏氨酸 50 mg/L, 赖氨酸 40 mg/L, 酪氨酸 30 mg/L, 腺嘌呤 20 mg/L, 精氨酸 20 mg/L, 组氨酸 20 mg/L, 甲硫氨酸 10 mg/L, 琼脂 20 g/L, 余量为水, pH 6.8。

GY 固体培养基: 葡萄糖 20 g/L, 酵母提取物 10 g/L, 硝酸钾 2 g/L, 磷酸二氢钠 1 g/L, 七水硫酸镁 3 g/L, 琼脂 20 g/L, 余量为水, pH 6.8。

GY-U 固体培养基: GY 固体培养基, 尿嘧啶 0.1 g/L。

热电冷冻离心机; Bio-rad RT-qPCR 荧光定量 PCR 仪; Eppendorf 电转化仪; 凝胶成像 Bio-rad UVP CDS-8000 分析系统; Nano Drop ND-1000 微量紫外分光光度计; ABI9700 PCR 仪。

1.2 实验方法

1.2.1 高山被孢霉的培养

高山被孢霉在 100 mL Broth 液体培养基中生长 7 d 后, 收集菌丝体, 部分冷冻干燥用于生物量的测定和脂肪酸的提取。其余冻存 -80°C , 用于 RNA 提取、基因表达水平的分析以及 NADPH 分析。

1.2.2 RNA 干扰表达载体的构建

将菌丝体在液氮中研磨破碎后,采用 Trizol 试剂提取高山被孢霉总 RNA,用 Prime Script RT reagent kit 根据说明书进行反转录,得到 cDNA。根据高山被孢霉 ATCC 32222 SSADH 基因的序列信息,设计表 1 的 SSADH 基因引物,引物对为 SSADH - FF/SSADH - FR 和 SSADH - RF/SSADH - RR,分别通过 PCR 反应得到 SSADH - F 和 SSADH - R 基因片段。PCR 扩增的反应条件为:94 °C 3 min,94 °C 30 s,55 °C 30 s,68 °C 1 min,30 个循环,68 °C 5 min。

用限制性内切酶 Hind III 和 Nhe I 分步酶切 pBIG2 - ura5s - ITs 和 SSADH - F,连接后获得载体 pBIG2 - ura5s - ITSSADH - F。再用限制性内切酶 Xma I 和 Sac I 分步酶切 SSADH - R 和 pBIG2 - ura5s - ITSSADH - F,连接后将获得的载体电击转化导入感受态细胞 *E. coli* top10 中,筛选出阳性转化子进行 PCR 验证,得到 RNA 干扰载体 pBIG2 - ura5s - SSADHSilent。表 1 中 HisproF1 和 TrpCR1 为 PCR 验证和测序引物。再将 RNA 干扰载体 pBIG2 - ura5s - SSADHSilent 电转入根癌农杆菌 CCFM 834。

表 1 本文所用引物

引物名称	序列 (5' - 3')	用途
HisproF1	GTGTTCACCTCGCATCCCGC	PCR 验证转化
TrpCR1	AGGCACTCTTTGCTGCTTGG	
SSADH - FF	CCCAAGCTTGTGACCAGCCACAGTAACACAA	SSADHSF amplification
SSADH - FR	CGGGGTACCACCGCTTGACCTGAACTTTG	
SSADH - RF	CGAGCTCGGTGACCAGCCACAGTAACACAA	SSADHSR amplification
SSADH - RR	TCCCCCGGGACCGCTTGACCTGAACTTTG	
SSADHRTF	GTGACCAGCCACAGTAACACAA	SSADH RT - qPCR
SSADHRTR	ACCGCTTGACCTGAACTTTG	
18SRTF	CGTACTACCGATTGAATGGCTTAG	RT - qPCR 内参
18SRTR	CCTACGGAAACCTTGTTACGACT	
PGDRTF	AAGTTGCCTGTCCGCCATC	PGD RT - qPCR
PGDRTR	TAGTGCCAGCCGTTCTCCTT	
G6PD1RTF	TGGCTATCCCGCCTATTGC	G6PD1 RT - qPCR
G6PD1RTR	TTTCGTGCTGCCTTTGGG	
G6PD2RTF	CCTAAGGACTGGTGCCTGTGG	G6PD2 RT - qPCR
G6PD2RTR	CTTGGCTTGCTGTCTGCGT	
G6PD3RTF	CGTATGCTGGGTCTGGTTAGG	G6PD3 RT - qPCR
G6PD3RTR	AGAAGGCTAGGTCTCCCGATG	
ME1RTF	GGCTGTTGCCGAAGGGACT	ME1 RT - qPCR
ME1RTR	GGCAAAGGTGGTGTGATTTTC	
ME2RTF	CCTTGCAGGACCGTAACGAGA	ME2 RT - qPCR
ME2RTR	CCTGGAGCCGACGATAAATGGA	
IDH1RTF	CGCCCAGATGCTCAAGTCCT	IDH1 RT - qPCR
IDH1RTR	CCATCGGGCGTCAACAGAA	
IDH2RTF	CCCCAAGACGGAGACAGGAC	IDH2 RT - qPCR
IDH2RTR	ACAGGGCGCACAACGGATA	
IDH3RTF	CTCGTCCCTGGGTGGACAG	IDH3 RT - qPCR
IDH3RTR	CCATCAGCGGGCGTAAAA	
MTHFD1RTF	TCCTGGTAGTCGCAATCGG	MTHFD1 RT - qPCR
MTHFD1RTR	GCGGCGCTATACTCAACGT	
MTHFD2RTF	GCAAGCAGGCTGGGATT	MTHFD2 RT - qPCR
MTHFD2RTR	CAAAGTCAGGCATGCTCGA	
MTHFDLRTF	GTTTACAACGGCATCCTTCCC	MTHFDL RT - qPCR
MTHFDLRTR	CCTCAACCTTCAGCGTCTCT	

1.2.3 根癌农杆菌 CCFM 834 转化及 RNA 干扰菌株的筛选鉴定

将含有 RNA 干扰载体 pBIG2 - ura5s - SSADHSilent 的根癌农杆菌 CCFM 834 在含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rifampicin 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin 的 YEP 培养基上划线。28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置避光培养 36 ~ 48 h。从 YEP 固体平板中挑取单克隆至液体 YEP 中接种活化, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 避光生长 24 ~ 48 h。根癌农杆菌 CCFM 834 转接至 IM 培养基中, 调至浓度为 $OD_{600}0.2$, 10 h 左右之后至菌液浓度为 $OD_{600}0.8$ 。CCFM501 在 Broth - U 培养基中传至三代待其性状稳定后, 取 50 μL 菌液浓度为 $OD_{600}0.8$ 的根癌农杆菌 CCFM 834 与 100 μL CCFM501 菌液共培养于 IM 培养基中。23 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 24 h 后转移至 16 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 ~ 36 h, 观察根癌农杆菌 CCFM 834 和高山被孢霉的生长情况。转移至 SC 中于 16 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 24 h, 随后转移至 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养。4 d 后挑选出 SC 平板上的转化子, 接种于新的 SC 平板。采用试剂盒 Biospin Fungus Genomic DNA Extraction Kit 提取遗传稳定转化菌株的基因组 DNA, 并进行验证。

1.2.4 高山被孢霉中 SSADH 基因转录水平的分析

按照 iTaq Universal SYBR Green Supermix 的说明进行 RT - qPCR 反应。PCR 程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s 进行 36 个循环。18S rDNA 作为管家基因。引物序列见表 1。

1.2.5 脂肪酸的提取与分析

采用盐酸破除高山被孢霉细胞壁, 氯仿甲醇法提取脂肪酸, 再使用盐酸甲醇甲酯化, 具体参照 Bligh 等^[17]的方法。

1.2.6 高山被孢霉 NADPH 提取与检测

称取 0.1 g 菌体于研钵中, 加入液氮破碎后, 再加入 1 mL NADP/NADPH Extraction buffer 研磨至融化后转移液体于 EP 管中, 离心 (1 000 g, 10 min), 根据 NADP/NADPH 测定试剂盒方法提取并测定 NADPH。

2 结果与讨论

2.1 RNA 干扰载体构建

按照 1.2.2 所述步骤, 构建了 SSADH 的 RNA 干扰载体 pBIG2 - ura5s - SSADHSilent。载体经过 ABI PRISM 3730 测序验证, 载体酶切验证如图 1 所

示, 重组质粒大小为 12.1 kbp。

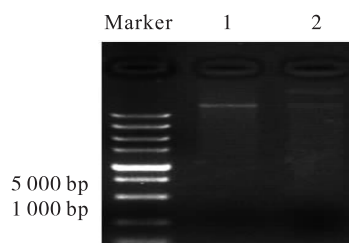


图 1 载体酶切验证 (1) 和质粒 (2) 电泳图

2.2 RNA 干扰菌株的筛选与鉴定

采用根癌农杆菌 CCFM 834 与尿嘧啶营养缺陷型高山被孢霉 CCFM501 在 IM 培养基中共培养, 将干扰载体导入 CCFM501, 在 SC 平板上筛选出含有干扰载体的 CCFM501 即干扰菌株, 将其保藏于 GY 斜面培养基上。以干扰菌株的基因组 DNA 为模板, 以引物对 HisproF1 和 TrpCR1 进行 PCR 反应验证。电泳结果如图 2 所示。由图 2 可看出, MA - iSSADH 条带为 ura5 (818 bp), 野生型 (B2) 没有相应条带, 表明干扰载体成功导入高山被孢霉基因组中。经 RT - qPCR 分析 (见图 3), MA - iSSADH 中 SSADH 基因转录水平下降了 60% 左右, 说明干扰 SSADH 基因完成了转录水平的抑制, 成功获得 RNA 干扰菌株 MA - iSSADH。

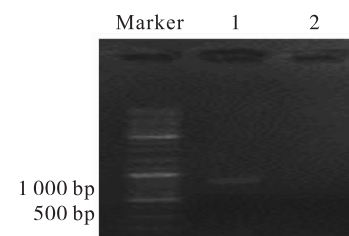
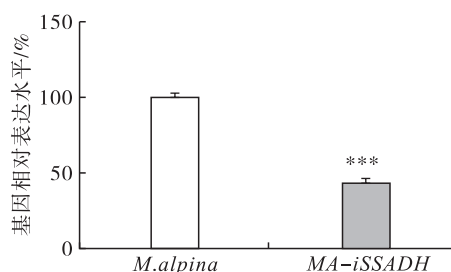


图 2 RNA 干扰载体转入 CCFM 501 的 PCR 鉴定



注: ***, $P < 0.001$ 。

图 3 MA - iSSADH 菌株中 SSADH 基因的表达水平

2.3 干扰 SSADH 基因对高山被孢霉脂肪酸含量的影响 (见表 2)

表 2 MA - iSSADH 中脂肪酸含量

菌株	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:3	C20:4	TFA
<i>M. alpina</i>	15.9 \pm 0.4	16.1 \pm 0.4	8.3 \pm 0.3	8.1 \pm 0.7	5.3 \pm 0.2	4.2 \pm 0.3	42.2 \pm 1.2	34.5 \pm 1.9
MA - iSSADH	16.4 \pm 0.4**	13.5 \pm 1.8	14.4 \pm 1.8***	8.3 \pm 1.1	4.9 \pm 0.6	3.6 \pm 0.2	38.9 \pm 3.5	27.3 \pm 1.5

注: **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$ 。

由表2可看出, RNA干扰SSADH基因后, 总脂肪酸(TFA)降低了20.9%, C18:1相对含量提高了73.5%, 总脂肪酸占菌体干重的比例从34.5%下降到27.3%。结果表明, SSADH在高山被孢霉脂质合成过程起重要作用。

2.4 SSADH对脂质合成还原力的调控

为了研究SSADH对高山被孢霉脂质合成还原力的影响, 本文分析了MA-iSSADH中NADPH含量以及产NADPH相关基因转录水平变化, 结果见图4、图5。

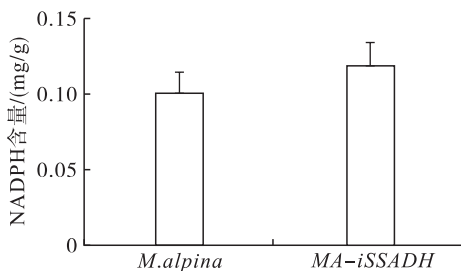
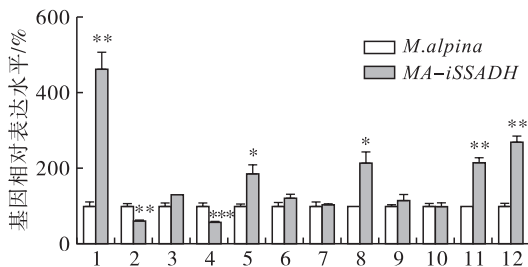


图4 MA-iSSADH中NADPH含量



注: 1. G6PD1; 2. G6PD2; 3. G6PD3; 4. ME1; 5. ME2; 6. 6PGD; 7. IDH1; 8. IDH2; 9. IDH3; 10. MTHFD1; 11. MTHFD2; 12. MTHFDL; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。

图5 MA-iSSADH产NADPH相关基因表达水平

由图4可看出, RNA干扰SSADH基因后, MA-iSSADH中NADPH的含量无显著性变化。

由图5可以看出, MA-iSSADH中产NADPH相关基因如苹果酸酶(ME1/2)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD1/2/3)、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGD)、异柠檬酸脱氢酶(IDH1/2/3)、亚甲基四氢叶酸脱氢酶(MTHFD1/2/L)等基因的转录水平均发生了变化。苹果酸/丙酮酸循环的ME是产生NADPH的关键酶^[5], MA-iSSADH中ME1基因转录水平下调了44.82%, 而ME2上调了约80%。在MA-iSSADH中G6PD2基因的转录水平发生了明显下调, 为原养型的58%, 但G6PD1的表达水平提高了约3.4倍。IDH2以及MTHFD2/L分别上调了1.2、1.2、1.7倍。这表明RNA干扰SSADH基因在降低SSADH基因转录水平的同时, 虽然NADPH的绝对含量没有发生显著性变化, 但改变了其他产

NADPH基因的转录水平。

3 结论

为了研究SSADH基因调控对高山被孢霉脂质合成的影响, 本文构建了RNA干扰SSADH载体pBIG2-ura5s-SSADHSilent, 成功筛选鉴定出RNA干扰菌株MA-iSSADH。与原养型高山被孢霉相比, SSADH的转录水平下调了60%左右, MA-iSSADH菌株的脂肪酸含量降低了20.9%, 但脂肪酸的不饱和度得到了显著提高; 尽管NADPH的含量无显著性变化, 但脂质合成途径中ME、G6PD、MTHFD等基因的转录水平发生了变化。这表明SSADH对NADPH的绝对含量不会产生影响, 但其改变了三羧酸循环和磷酸戊糖途径中产NADPH相关基因的转录水平, 调节了脂质合成所需还原力NADPH的来源, 对高山被孢霉脂质合成过程产生了重要调控。虽然SSADH对高山被孢霉脂质的积累有影响, 但其影响机制并不是通过NADPH调控, 因此未来可从以下几个方面分析SSADH对脂质合成的调控机制, 为进一步解析氨基酸代谢与脂质合成的关系奠定基础。

首先, 氨基酸代谢可为细胞生长、脂质合成提供碳源和氮源, 可通过同位素标记法分析重组菌株中氮源和碳源的流向来分析脂质合成过程的变化。其次, 氨基酸代谢可得到产物乙酰辅酶A, 而乙酰辅酶A作为脂质合成的重要前体, 可对重组菌株中的乙酰辅酶A的含量进行分析, 进一步解析氨基酸代谢关键酶影响脂质合成的机制。此外, 氨基酸可作为信号因子调控mTOR、AMPK等代谢过程进而调控脂质, 可从这些方面解析氨基酸代谢关键酶影响脂质合成的机制。

同时可继续在分子水平解析脂质代谢通路, 使高山被孢霉获得高产脂的能力, 这对于其产品开发及工业应用均具有重要的意义。

参考文献:

- [1] SAKURADANI E, ABE T, IGUCHI K, et al. A novel fungal ω 3-desaturase with wide substrate specificity from arachidonic acid-producing *Mortierella alpina* 1S-4 [J]. *Appl Microbiol Biotech*, 2005, 66(6): 648-654.
- [2] SAKURADANI E, ANDO A, OGAWA J, et al. Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous fungus *Mortierella alpina* breeding [J]. *Appl Microbiol Biotech*, 2009, 84(1): 1-10.
- [3] 杜恺. 高山被孢霉 ω 9脂肪酸脱饱和酶的同源表达及其作用[D]. 江苏无锡: 江南大学, 2014.
- [4] 史海粟. Δ 6脂肪酸脱饱和酶底物选择性研究及其在高山被孢霉中的应用[D]. 江苏无锡: 江南大学, 2016.

- [5] 郝光飞. 高山被孢霉脂肪酸合成过程转录水平调控和还原力来源研究 [D]. 江苏 无锡:江南大学, 2014.
- [6] RAMOS F, ELGUEZZAR M, GRENSON M. Mutations affecting the enzymes involved in the utilization of 4 - aminobutyric acid as nitrogen source by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Eur J Biochem, 1985, 149(2): 4.
- [7] SHELP B J, BOWN A W, MCLEAN M D. Metabolism and functions of *gamma* - aminobutyric acid [J]. Trends Plant Sci, 1999, 4(11): 446 - 452.
- [8] MUZIO G, MAGGIORA M, PAIUZZI E, et al. Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation [J]. Free Radical Biol Med, 2012, 52(4): 735 - 746.
- [9] KANWAL S, INCHAROENSAKDI A. Characterization of glutamate decarboxylase from *Synechocystis* sp. PCC6803 and its role in nitrogen metabolism [J]. Plant Phys Biochem, 2016, 99:59 - 65.
- [10] TALIBI D, GRENSON M, ANDRE B. *cis* - Acting and *trans* - acting elements determining induction of the genes of the *gamma* - aminobutyrate (Gaba) utilization pathway in *saccharomyces cerevisiae* [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(4): 550 - 557.
- [11] ZHANG Y, ADAMS I P, RATLEDGE C. Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Over expression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5 - fold increase in lipid accumulation [J]. Microbiology, 2007, 153:2013 - 2025.
- [12] WANG H C, CHEN H Q, HAO G F, et al. Role of the phenylalanine - hydroxylating system in aromatic substance degradation and lipid metabolism in the oleaginous fungus *Mortierella alpina* [J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(10): 3225 - 3233.
- [13] LIU L, PAN A, SPOFFORD C, et al. An evolutionary metabolic engineering approach for enhancing lipogenesis in *Yarrowia lipolytica* [J]. Metabolic Eng, 2015, 29: 36 - 45.
- [14] ANDRIAMAMPANDRY C, SIFFERT J C, SCHMITT M, et al. Cloning of a rat brain succinic semialdehyde reductase involved in the synthesis of the neuromodulator *gamma* - hydroxybutyrate [J]. Biochem J, 1998, 334: 43 - 50.
- [15] 刘媛. 肥胖小鼠及脂肪细胞模型中脂质合成所需还原力的来源探究 [D]. 江苏 无锡:江南大学, 2017.
- [16] 王鸿超. 产油真菌高山被孢霉的脂质合成机理研究 [D]. 江苏 无锡:江南大学, 2013.
- [17] BLIGH E L G, DYER W J A. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. Can J Biochem Phys, 1959, 37(8): 911 - 917.

· 广告 ·

粮油市场报
/ 刊号: CN41-0072 / 邮发代号: 35-17

《粮油市场报》自1985年创刊以来, 密切关注中国粮食流通体制改革进程, 及时反映世界粮食经济格局及变化, 全方位反映中国粮食生产、流通、加工、消费图景, 服务于国家粮食战略, 传递政府主张, 为企业解惑, 为农民引路, 为消费导航, 以其不可替代的权威性、公信力和专业度, 确立了粮油媒体领导品牌。

《粮油市场报》将进一步深耕粮油领域, 拓展并洞察粮油上下游市场, 以更专业更独立的采编理念, 以更权威更独到的新闻品质, 致力服务中国涉粮、涉农领域的主流人群, 全方位反映中国粮油市场运行图景。

欢迎订阅《粮油市场报》

粮报微信 粮报微博

发行热线: 0371-68107972 68107966
新闻热线: 0371-86029111 新媒体热线: 0371-68107650
网址: www.grainnews.com.cn(中国粮油网)
微博: http://weibo.com/lyscb