

生物工程

# 不同碳、氮源质量浓度对高山被孢霉脂质积累及 SNF1 复合体转录调控的影响研究

常璐璐,唐鑫,张灏,陈永泉,陈海琴,陈卫

(江南大学食品学院,江苏无锡214122)

**摘要:**高山被孢霉(*M. alpina*)是一株具有较强脂质合成能力的产油微生物,其脂质积累受培养基中碳、氮源调控。探究了不同葡萄糖和酒石酸铵质量浓度对 *M. alpina* 生长及脂质积累的影响,并进一步研究不同碳、氮源质量浓度下 *M. alpina* SNF1 复合体各亚基的转录水平。结果表明:初始酒石酸铵质量浓度一定时,*M. alpina* 脂肪酸含量随碳氮比(C/N)的增加而提高,C/N为24.6时其脂肪酸含量比C/N为4.6时提高42.6%,初始葡萄糖质量浓度一定时,氮源限制下(C/N=76.7) *M. alpina* 脂肪酸产率达到2.6 g/L,是氮源存在时的1.5~3.2倍,与葡萄糖相比氮源水平对 *M. alpina* 脂质积累影响更为显著。氮源一定时高葡萄糖质量浓度(C/N=24.6)下SNF1复合体各亚基转录水平比对照组提高13.9~20.5倍;而氮限制导致的高C/N同样可促进其转录水平的提高。高C/N和氮限制均属于营养失衡信号,说明 *M. alpina* SNF1 转录水平的变化是其对胞外营养水平的响应方式,并与脂质积累水平具有相关性。

**关键词:**高山被孢霉;SNF1复合体;脂质积累;营养信号;转录调控

**中图分类号:**TS222;TQ920.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2018)07-0113-07

## Effect of carbon and nitrogen mass concentrations on lipid production and transcriptional regulation of SNF1 complex in *Mortierella alpina*

CHANG Lulu, TANG Xin, ZHANG Hao, CHEN Yongquan,  
CHEN Haiqin, CHEN Wei

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

**Abstract:** *Mortierella alpina* is an oleaginous filamentous fungus with strong oil producing capacity, and its lipid synthesis is regulated by carbon and nitrogen in culture medium. The effects of different mass concentrations of glucose and ammonium tartrate on biomass and lipid accumulation of *M. alpina* were studied. Under different mass concentrations of carbon and nitrogen, the transcriptional levels of subunits of *M. alpina* SNF1 complex were further studied. The results showed that lipid accumulation was basically proportional to carbon to nitrogen ratio(C/N) under the same initial nitrogen mass concentration. When C/N was 24.6, the fatty acid content was 42.6%, higher than that of C/N 4.6. While under the same initial glucose mass concentration, in nitrogen limited culture medium (C/N 76.7), fatty acid yield reached 2.6 g/L, which was 1.5-3.2 times of that in nitrogen-rich medium, indicating that nitrogen mass concentration showed a greater impact on lipid production. High glucose mass concentration (C/N 24.6) led to 13.9-20.5 times higher transcriptional level of SNF1 complex compared with lower glucose

groups under the same nitrogen level, and higher C/N brought by nitrogen limitation also promoted SNF1 transcription. High C/N and nitrogen limitation were both unbalanced nutrition signal, and changes in transcriptional level might be the response of *M. alpina* SNF1 complex to nutrient

收稿日期:2017-11-29;修回日期:2018-04-23

基金项目:国家自然科学基金(31722041)

作者简介:常璐璐(1991),女,在读硕士,研究方向为食品生物技术(E-mail) jessica0412@foxmail.com。

通信作者:陈海琴,教授(E-mail) haiqinchen@jiangnan.edu.cn。

signal, which had positive relationship to lipid accumulation.

**Key words:** *Mortierella alpina*; SNF1 complex; lipid accumulation; nutrition signal; transcriptional regulation

高山被孢霉 (*M. alpina*) 是一株性状优良的产油微生物, 其脂质积累量可高达细胞干重的 50%, 还可合成花生四烯酸和二十碳五烯酸等功能性多不饱和脂肪酸, 极具工业化开发潜力<sup>[1]</sup>。碳、氮源水平是影响高山被孢霉等产油微生物脂质积累的关键因素, 当培养基中碳源过量而氮源缺乏时, 菌体不再生长, 进入脂质积累期, 将过量的碳源以甘油三酯的形式储存于胞内<sup>[2]</sup>。组学研究发现产油微生物脂质积累过程中三羧酸循环受阻, 胞内 AMP/ATP 水平失调, 参与含氮物质转运、铵的同化、糖酵解、脂肪酸从头合成及甘油酯合成途径基因转录水平提高<sup>[3]</sup>, 说明氮限制导致的脂质代谢涉及细胞全局性生理生化调控, 而非脂质合成单一通路。

蔗糖非发酵型蛋白激酶 (SNF1) 是哺乳动物中 AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK) 的同系物, 是真核生物中广泛存在的能量调控中枢和压力感受器<sup>[4]</sup>, 可根据胞内外营养及能量水平调节合成代谢与分解代谢的平衡<sup>[5]</sup>, 如对脂质代谢进行调控维持胞内能量稳态<sup>[6]</sup>。SNF1 复合体可在蛋白修饰水平影响脂肪酸合成过程中关键限速酶乙酰 - CoA 羧化酶 (ACC1) 的活性<sup>[7]</sup> 以及脂肪酸合成的还原力——NADPH 的平衡<sup>[8]</sup>。此外, SNF1 复合体还可响应胞外碳源水平影响转录调控因子 Gln3 的定位, 继而调控碳、氮源代谢。目前, SNF1 复合体响应营养信号调控产油丝状真菌脂质积累的机制仍不清晰, 通过分析不同碳、氮源质量浓度下 *M. alpina* 生长及脂质积累情况, 结合 SNF1 复合体各亚基转录水平变化, 寻找该复合体在营养信号与脂质积累间的调控规律, 对进一步研究产油微生物脂质合成机理、寻找突破产油微生物脂质积累瓶颈具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

*M. alpina* ATCC 32222, 购自美国菌种保藏中心。

葡萄糖试剂盒 (F006), 购自南京建成生物公司; 反转录试剂盒 (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser RR047A), 购自 Takara 大连宝生物试剂公司; RT - qPCR 所用试剂 (BIO - RAD iTAQ™ Universal SYBR Green Supermix), 购自 Bio - Rad 公司。

酵母提取物, 购自 Oxoid 公司; 酒石酸铵, 购自阿拉丁公司; 正十五烷酸 (C15:0)、盐酸 - 甲醇, 购

自 Sigma 公司; Trizol (TRIzol Reagent, CAS # 15596018), 购自 Thermo Scientific 公司。实验所有其他试剂购自国药集团; 引物由上海桑尼公司合成。

Broth 发酵培养基<sup>[9]</sup>及 Kendrick 培养基<sup>[10]</sup>参考文献进行配制。使用 Kendrick 培养基时根据表 1 改变葡萄糖和酒石酸铵添加量以配制不同碳、氮源质量浓度的培养基。

表 1 不同培养条件培养基葡萄糖及酒石酸铵添加量

初始葡萄糖质量浓度/(g/L)	初始酒石酸铵质量浓度/(g/L)	碳氮比(摩尔比)(C/N)
15	10	4.6(限碳)
30	10	9.2(低碳)
80	10	24.6(高碳)
50	10	15.3(平衡)
50	2	76.7(限氮)
50	5	30.7(低氮)
50	20	7.7(高氮)

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 基因序列比对

以 *M. alpina* 基因组数据建立 BLAST 本地库, 根据 NCBI 中已提交并验证功能的酿酒酵母 SNF1 复合体<sup>[11]</sup>各亚基 (GeneBank:  $\alpha$  亚基 YDR477W;  $\beta$  亚基 YER027C;  $\gamma$  亚基 YGL115W) 和耶氏解脂酵母 SNF1 复合体<sup>[6]</sup>各亚基 (GeneBank:  $\alpha$  亚基 YALI0D02101g;  $\beta$  亚基 YALI0E13926g;  $\gamma$  亚基 YALI0C03421g<sup>b</sup>) 氨基酸序列进行比对, 通过建立基因进化树、综合分析 *M. alpina* SNF1 复合体各亚基备选序列与已知酵母中 SNF1 序列的同源性、相似性、评分、亲缘关系以及 *M. alpina* 氮源耗尽前后相关基因转录水平变化等数据, 确定最终序列, 选定的 *M. alpina* SNF1 复合体  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  3 个亚基分别命名为 SNF1 $\alpha$ 1、SNF1 $\beta$ 1、SNF1 $\gamma$ 。

#### 1.2.2 菌株培养

取保藏于甘油管中的 *M. alpina* ATCC 32222 孢子液接入 Broth 发酵培养基, 28 °C、200 r/min 培养 48 h 后, 用组织分散器打碎, 将打碎液以 1% 的接种量接于 Kendrick 活化培养基 (葡萄糖 30 g/L, 酒石酸铵 3.3 g/L), 28 °C、200 r/min 培养 48 h 后, 再次用组织分散器打碎, 将打碎液以 1% 的接种量接于添加不同质量浓度葡萄糖或酒石酸铵的 Kendrick

培养基,28℃、200 r/min 发酵培养。

### 1.2.3 培养基残糖、残氮测定

每24 h取培养基上清液,用0.22 μm 针头式滤器(水系)过滤。上清液中NH<sub>4</sub><sup>+</sup>测定使用靛酚测试方法<sup>[10]</sup>,上清液中葡萄糖测定根据F006试剂盒说明书进行。

### 1.2.4 基因转录水平分析

取培养36、96 h和168 h菌体样品,使用Trizol

法提取*M. alpina*总RNA,具体操作见试剂说明书。提取后使用Nanodrop测定浓度及纯度,跑琼脂糖凝胶验证RNA样品完整度。RNA样品按照Takara反转录试剂盒说明书进行反转录获得cDNA,之后按照SYBR Green SuperMix说明书进行样品配制并进行RT-qPCR分析。对照组为营养平衡组,内参基因为*M. alpina* 18S rDNA。*M. alpina* SNF1 3个亚基及内参基因的qPCR引物设计如表2所示。

表2 RT-qPCR所需引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	用途
SNF1α1 F	TTCTCTATGTGATGCTCTG	SNF1 复合体α亚基 RT-qPCR 分析
SNF1α1 R	AGTATATGCCTCCATTGATT	
SNF1β1 F	ATGTCTATGTCACTGGAA	SNF1 复合体β亚基 RT-qPCR 分析
SNF1β1 R	CGGAAGGTTAAGAATAGTC	
SNF1γ F	GGTGGATATGGACTCTGA	SNF1 复合体γ亚基 RT-qPCR 分析
SNF1γ R	AATGAACTTGAGGATTCTGTA	
Ma18S rDNA F	CGTACTACCGATTGAATGGCTTAG	高山被孢霉内参基因
Ma18S rDNA R	CCTACGGAAACCTTGTTACGACT	

### 1.2.5 脂肪酸提取与分析

培养7 d的菌体样品用水冲洗后在滤纸上挤干水分,置于真空冷冻干燥机中冻干,称量干重后充分研磨至粉碎。脂肪酸提取具体操作步骤见文献<sup>[9]</sup>。

### 1.2.6 数据分析

采用SPSS 24.0数据处理系统进行单因素方差分析,数据上标有不同字母表示具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 高山被孢霉在不同营养条件下碳、氮源消耗情况(见图1)

根据文献报道和本实验室前期研究,认为葡萄糖可促进产油微生物脂质积累,酒石酸铵适合产油丝状真菌生长并常用于其脂质积累研究<sup>[10]</sup>,因此选择葡萄糖和酒石酸铵作为培养基中碳、氮源进行实验。

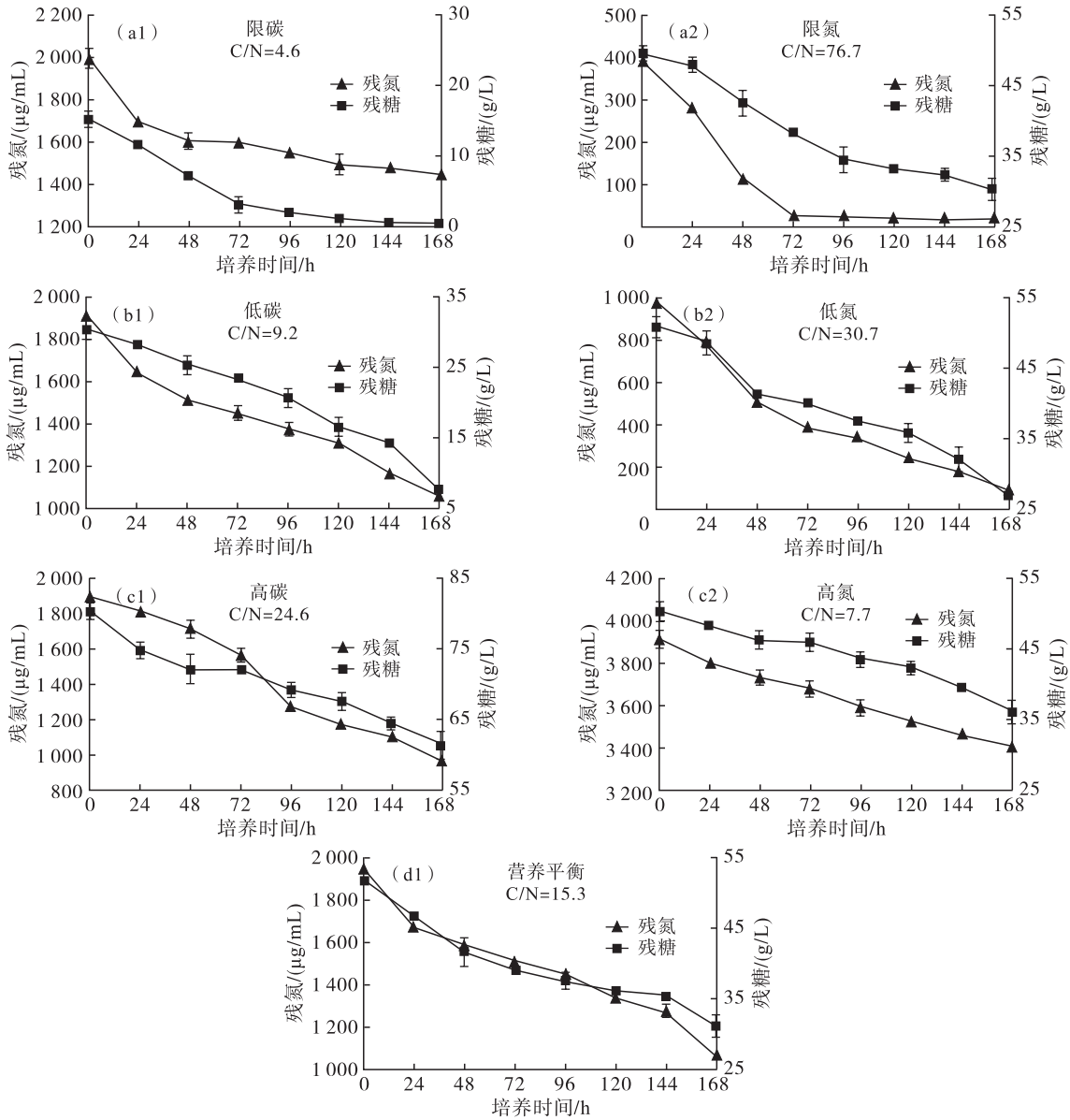
由图1可知,在0~48 h内,各实验组*M. alpina*处于对数生长期,碳、氮源消耗速率较快,当菌体生长进入稳定期后,培养基中碳、氮源消耗速率减缓,用于维持细胞基本生长或合成脂质。在初始酒石酸铵为10 g/L条件下,限碳组(图1(a1))葡萄糖在96 h时已处于极低水平(2.1 g/L),此后菌体处于葡萄糖饥饿状态;在初始葡萄糖质量浓度为50 g/L条件下,由图1(a2)可以看出,氮源在72 h后基本耗尽(7.4 μg/mL),此后菌体处于氮饥饿状态。

由高山被孢霉在不同培养基中碳、氮源消耗情

况可以看出,初始酒石酸铵质量浓度一定时碳氮比(C/N)对葡萄糖消耗量无明显影响;初始葡萄糖质量浓度一定时,低浓度酒石酸铵可促进葡萄糖利用。根据培养基内残NH<sub>4</sub><sup>+</sup>质量浓度可知,当培养基中碳、氮源充足时,培养基中NH<sub>4</sub><sup>+</sup>消耗量基本一致;当酒石酸铵质量浓度达到20 g/L时(图1(c2)),菌体生长受限,碳、氮源消耗量明显低于其他组别,说明高质量浓度酒石酸铵抑制了菌体生长。基于不同营养条件下菌体葡萄糖消耗量有所不同,需对菌体生物量和脂肪酸进行分析,以确定不同碳、氮源质量浓度下葡萄糖的流向。

### 2.2 不同碳、氮源质量浓度对高山被孢霉生长及脂质积累的影响(见图2)

由图2可知,氮源一定时,高碳氮比(C/N)可促进*M. alpina*脂质积累(图2(c))。高碳、营养平衡和低碳条件下脂肪酸含量分别比限碳时提高42.6%、18.5%和16.6%。限碳条件下菌体生物量和脂肪酸含量显著低于其他组别,原因是发酵中后期碳源耗尽(图1(a1)),菌体生长和脂质积累受限。研究表明,长期葡萄糖饥饿会启动细胞自噬,在一些分解酶的作用下降解部分细胞器、脂肪酸和部分蛋白质等成分,为生物体提供能量和碳骨架,是生物体在营养胁迫下维持自身生存的应激反应<sup>[12]</sup>。另外,尽管高碳组发酵末期脂肪酸含量很高,但通过耗糖、耗氮情况(图1(c1))可知其在36 h前生长缓慢,说明一定范围内较高的C/N有利于产油微生物脂质积累,但是高渗透压会抑制菌体生长。



注:a1 ~ c1 为氮源质量浓度一定时不同葡萄糖质量浓度的培养条件;d1 为营养平衡对照组;a2 ~ c2 为碳源质量浓度一定时不同酒石酸铵质量浓度的培养条件;残氮是指培养基中  $\text{NH}_4^+$  的质量浓度。

图1 不同碳、氮源质量浓度培养基中残糖、残氮含量

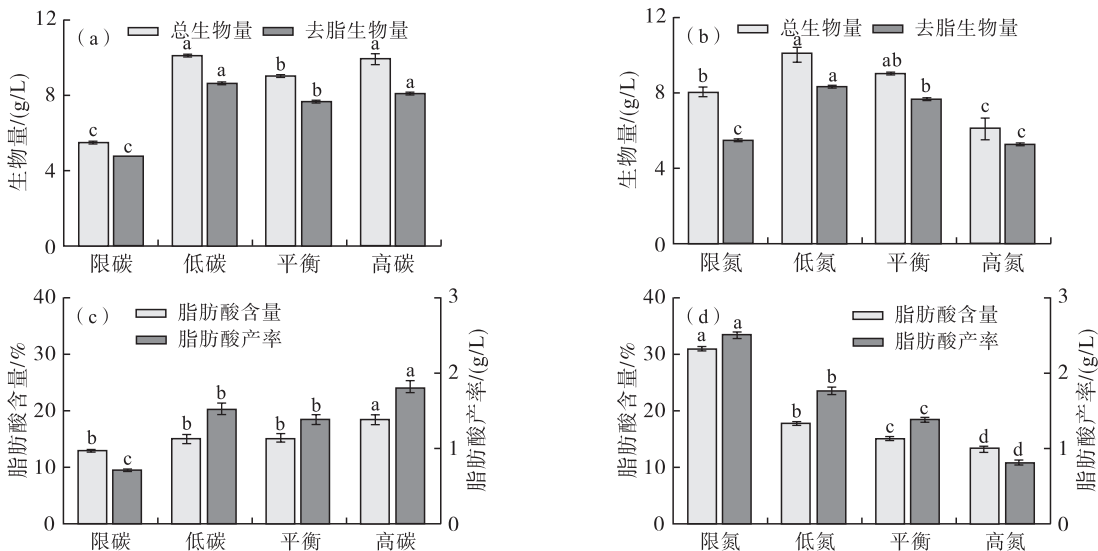


图2 不同碳、氮源质量浓度下 *M. alpina* 生长和脂质积累情况

碳源一定时, *M. alpina* 脂质积累与氮源质量浓度呈负相关(图2(d))。限氮条件下菌体脂肪酸产率达到 2.6 g/L, 分别是低氮、营养平衡和高氮时的 1.5、1.9 倍和 3.2 倍, 但该条件下菌体生物量降低(图2(b)), 证明氮源虽是菌体生长的必要条件, 但其过量存在会抑制脂质积累, 导致营养物质主要用于菌体生长而非脂质合成。此外, 高氮条件下菌体生物量和脂肪酸含量均低于其他组, 原因是高质量浓度酒石酸铵抑制了菌体生长和脂质积累。

综上, 提高培养基中 C/N 或限制氮源均可促进 *M. alpina* 脂质积累, 使葡萄糖更多地流向脂肪酸合成途径。为探究外界碳、氮源水平是否会通过 *M. alpina* SNF1 复合体影响其脂质积累, 对该复合体各亚基在不同营养条件下转录水平进行分析, 以研究 SNF1 复合体在转录水平对营养信号的应答规律。

### 2.3 高山被孢霉 SNF1 复合体比对及筛选

首先, 根据 1.2.1 所述方法对 *M. alpina* SNF1 复合体各亚基进行比对, 一般认为蛋白质同源性达到 30% 即具有相似的功能。在 *M. alpina* 中, 与耶氏解脂酵母 (*Y. lipolytica*) 及酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) SNF1 复合体各亚基同源性大于 30% 的  $\alpha$  亚基有 172 个,  $\beta$  亚基有 86 个, 而  $\gamma$  亚基有且仅有 1 个编码序列, 同源性为 50%。根据 1.2.1 所述筛选方法选定最终序列, 并分别命名为 SNF1 $\alpha$ 1、SNF1 $\beta$ 1、SNF1 $\gamma$ , 各基因信息见表 3。

表 3 高山被孢霉 SNF1 复合体各亚基序列比对结果

基因名称	长度/bp	同源性/%、评分	
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>Y. lipolytica</i>
SNF1 $\alpha$ 1	2 370	44、470	42、435
SNF1 $\beta$ 1	1 401	42、103	47、82
SNF1 $\gamma$	1 593	50、324	ND、ND

注: ND 表示无比对结果。

由表 3 可知, *M. alpina* SNF1 复合体是一个庞大的蛋白家族, 其  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基具有很多亚型, 从而形成多种组合形式的 SNF1 复合体。Ross 等<sup>[13]</sup>指出哺乳动物 AMPK 复合体各亚基分别存在 2~3 个亚型, 这些亚型可以形成至少 12 种不同组合的 AMPK 复合体, 每一种复合体都具有不同的亚细胞定位和底物特异性。在模式生物拟南芥中, SNF1 复合体同系物 SnRK1 存在至少 7 个编码  $\beta$  亚基的基因<sup>[14]</sup>。这一现象也存在于其他具有异源多聚体结构的蛋白质中, 如哺乳动物体内的蛋白磷酸酶 PP2A<sup>[15]</sup> 和起信号转导作用的 G 蛋白<sup>[16]</sup> 都是由 3 个亚基组成的异源三聚体, 各亚基具有多种亚型并可组合成多样的 PP2A 全酶和 G 蛋白。AMPK/SNF1 复合体、

PP2A 和 G 蛋白都是细胞内具有重要调控功能的蛋白质, 多种组合形式能保证这些复合体具有丰富的底物特异性、亚细胞定位和组织特异性, 从而赋予其广泛而准确的调控功能<sup>[17]</sup>。

2.4 高山被孢霉 SNF1 复合体在不同碳、氮源质量浓度下的转录情况(见图 3)

由图 3(a1、b1、c1) 可看出, 高质量浓度葡萄糖可显著促进该复合体各亚基的转录。96 h 时, 高碳组中  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  亚基相对转录水平分别是对照组(营养平衡组)的 13.9、20.5、17.8 倍。而在发酵末期, 限碳组中碳源已完全耗尽, 此时高山被孢霉 SNF1 复合体各亚基的相对转录水平是对照组和低碳组的 1.8~6.1 倍。对于高山被孢霉而言, 高碳和限碳都是营养失衡的信号, 因此这种转录水平的调整是高山被孢霉 SNF1 复合体对营养水平失衡的响应方式。

由图 3(a2、b2、c2) 可知, 限氮和低氮条件可促进高山被孢霉 SNF1 复合体转录水平的提高, 这一影响由 C/N 调控。限氮组在 96 h 时氮源耗尽, 此时 C/N 接近无穷大, 在发酵末期, 限氮组 SNF1 复合体各亚基相对转录水平是对照组的 6.2~16.7 倍; 低氮组在发酵末期氮源质量浓度仅为 87.5  $\mu\text{g/mL}$ , 此时 C/N(摩尔比)为 142.9, 各亚基转录水平比对照组提高 6.0~12.4 倍, 对比碳源变化组实验结果, 说明限氮和低氮条件下 SNF1 复合体转录水平的变化是由 C/N 的提高导致的, 且与脂质积累具有相关性。此外, 由图 3 及发酵过程中菌体生长情况观察看出, 高氮组菌体生长状况较差, 可能是高质量浓度酒石酸铵导致的低 pH 影响菌体生长, 因此该实验组 SNF1 复合体各亚基转录水平与其他组别有较大区别。

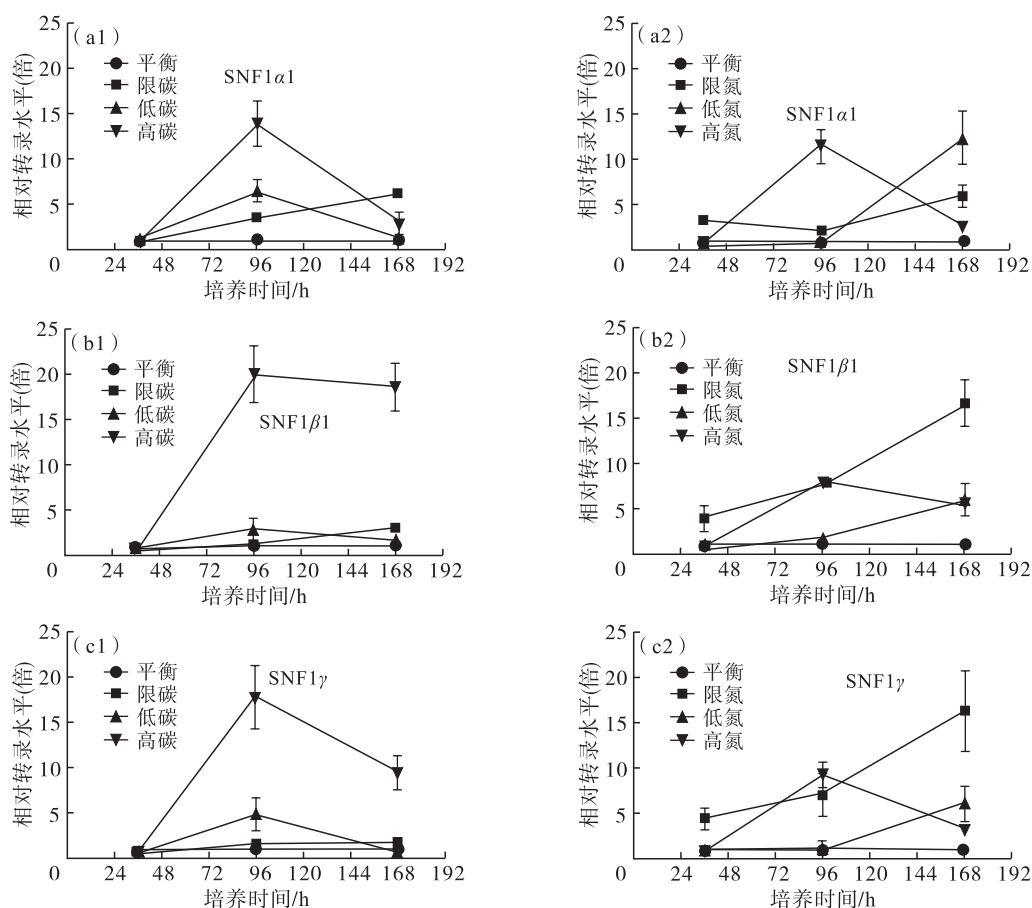
## 3 结论

本文通过对不同碳、氮源质量浓度下 *M. alpina* 生长和脂质积累进行分析, 结合 SNF1 复合体各亚基转录水平, 发现 *M. alpina* 脂质积累受培养基碳氮比和氮源质量浓度调控, 其中氮源限制对其脂质积累的影响更为显著。此外, *M. alpina* SNF1 复合体在营养信号与脂质积累间具有一定的调控作用, 其可通过感知外界营养状况调节自身转录水平, 进而调节分解代谢相关基因。

经过对 *M. alpina* SNF1 复合体各亚基编码序列比对, 发现其与酵母 SNF1 复合体具有较高的同源性, 其中  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基具有较多亚型, 而  $\gamma$  亚基有且仅有 1 个编码基因, 因此 *M. alpina* SNF1 复合体可能存在多种组合形式和广泛的调控功能。通过对不同碳、氮源质量浓度下高山被孢霉生长、产脂和转录情

况分析,发现高碳、氮源限制可显著促进其脂质积累和 SNF1 复合体转录水平的提高,这一影响主要由 C/N 调控。由于高碳和氮源限制都是营养失衡的表现,转录水平的提高可能是 SNF1 复合体对这一环境压力的响应,初步论证 *M. alpina* SNF1 复合体在胞外碳、氮源水平响应及脂质积累间具有一定的调控作用。

为进一步了解高山被孢霉 SNF1 复合体的功能,后续还需通过基因工程手段在高山被孢霉中对该复合体进行干预,研究其对脂质代谢和相关基因的调控规律,为研究营养信号调控产油微生物脂质积累的分子机制奠定基础,也为提高产油微生物脂质积累量提供生物学信息和遗传操作靶点,进一步提升微生物油脂的经济效益和工业化发展水平。



注:相对转录水平是指不同实验组相对于营养平衡组的转录水平。

图3 不同碳、氮源浓度下 *M. alpina* SNF1 复合体各亚基相对转录水平

#### 参考文献:

- [1] SAKURADANI E, SHIMIZU S. Single cell oil production by *Mortierella alpina* [J]. J Biotechnol, 2009, 144(1): 31-36.
- [2] WYNN J P, HAMID A A, LI Y, et al. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina* [J]. Microbiology, 2001, 147(10):2857-2864.
- [3] ZHU Z, ZHANG S, LIU H, et al. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides* [J]. Nat Commun, 2012, 3(1112):1112.
- [4] POLGE C, THOMAS M. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? [J]. Trends Plant Sci, 2007, 12(1):20-28.
- [5] RAAB A M, HLAVACEK V, BOLOTINA N, et al. Shift-ing the fermentative/oxidative balance in *Saccharomyces cerevisiae* by transcriptional deregulation of Snf1 via overexpression of the upstream activating kinase Sak1p. [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(6):1981-1989.
- [6] SEIP J, JACKSON R, HE H, et al. Snf1 is a regulator of lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* [J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(23):7360-7370.
- [7] SHI S, CHEN Y, SIEWERS V, et al. Improving production of malonyl coenzyme A-derived metabolites by abolishing Snf1-dependent regulation of Acc1 [J]. MBio, 2014, 5(3):1-8.
- [8] J JEON S M, CHANDEL N S, HAY N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. [J]. Nature, 2012, 485(7400): 661-665.

(下转第 140 页)

- olive oils[J]. *J Agric Food Chem*, 2002,20:3090 – 3093.
- [5] 李桂华. 食用油中痕量镉含量的测定[J]. *中国油脂*, 2004,29(11):61 – 62.
- [6] SAHAN Y, BASOGLU F, GUCER S. ICP – MS analysis of a series of metals (namely: Mg, Cr, Co, Ni, Fe, Cu, Zn, Sn, Cd and Pb) in black and green olive samples from Bursa, Turkey[J]. *Food Chem*, 2007,105:395 – 399.
- [7] LIORIENT – MARTINEZ E J, ORTEGA – BARRALES P, CORDOVA M L F, et al. Investigation by ICP – MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain[J]. *Food Chem*, 2011,127:1257 – 1262.
- [8] 林凯, 姜杰, 黎雪慧, 等. 食用油中铅含量的石墨炉原子吸收光谱测定法[J]. *职业与健康*, 2014,30(5):622 – 623,625.
- [9] MENDILA D, ULUÖZLÜA Ö D, TÜZENA M, et al. Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry[J]. *J Hazard Mater*, 2009,165:724 – 728.
- [10] 倪张林, 汤富彬, 屈明华, 等. 湿法消解 – 石墨炉原子吸收光谱法测定山茶油中的镉[J]. *中国无机分析化学*, 2011,1(3):66 – 68.
- [11] 刘玉兰, 吴晓云, 向国强. 植物油料和食用油中铅含量检测的研究[J]. *中国油脂*, 2011,36(8):74 – 77.
- [12] 王琳琳, 林立, 陈玉红. ICP – MS 法直接进样分析食用油中的铅、砷、锰、镉、铬、铜等元素[J]. *环境化学*, 2011,30(2):571 – 573.
- [13] 李咏梅, 李人宇, 施鹏飞. 共振光散射法测定食用油中铁含量[J]. *中国粮油学报*, 2013,28(4):103 – 107.
- [14] BAKIRCIOGLU D, KURTULUS Y B, YURTSEVER S. Comparison of extraction induced by emulsion breaking, ultrasonic extraction and wet digestion procedures for determination of metals in edible oil samples in Turkey using ICP – OES[J]. *Food Chem*, 2013,138:770 – 775.
- [15] LOPEZ – GARCIA I, VICENTE – MARTINEZ Y, HERNANDEZ – CORDOBA M. Determination of cadmium and lead in edible oils by electrothermal atomic absorption spectrometry after reverse dispersive liquid – liquid micro-extraction[J]. *Talanta*, 2014,124:106 – 110.
- [16] 卢丽, 刘二龙, 韦晓群, 等. 超级微波消解 – 直接定容 – 石墨炉原子吸收光谱法测定食用油中总砷[J]. *中国油脂*, 2016,41(6):88 – 91.
- [17] 吴宜青, 莫欣欣, 孙通, 等. 基于内定标法的大豆油中铬含量的 LIBS 定量分析[J]. *核农学报*, 2016,30(7):1351 – 1357.
- [18] 蒋丽, 姚浔平, 孔令威. 石墨炉原子吸收法测定食用油中铅含量前处理方法比较[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011,21(5):1127 – 1128, 1131.
- [19] 李辉. 北京市场植物油料及油中重要金属指标分析与现状[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
- [20] 佟馨, 吴冬, 郝克非, 等. 微波消解石墨炉原子吸收法测定食用油中铬和镉[J]. *粮食与食品工业*, 2015,22(2):100 – 103.
- [21] 孙林超. 微波消解 – 原子吸收光谱法在食用油铅含量测定中的应用[J]. *中国酿造*, 2008(22):89 – 91.
- .....
- (上接第 118 页)
- [9] 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.
- [10] KENDRICK A, RATLEDGE C. Desaturation of polyunsaturated fatty acids in *Mucor circinelloides* and the involvement of a novel membrane – bound malic enzyme[J]. *Febs J*, 1992,209(2):667 – 673.
- [11] WOODS A, MUNDAY M R, SCOTT J, et al. Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP – activated protein kinase and regulates acetyl – CoA carboxylase in vivo[J]. *J Biol Chem*, 1994,269(30):19509 – 19515.
- [12] MADEIRA J B, MASUDA C A, MAYA – MONTEIRO C M, et al. TORC1 inhibition induces lipid droplet replenishment in yeast[J]. *Mol Cell Biol*, 2014,35(4):737 – 746.
- [13] ROSS F A, MACKINTOSH C, HARDIE D G. AMP – activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours[J]. *FEBS J*, 2016,283(16):2987 – 3001.
- [14] LI X F, LI Y J, AN Y H, et al. AKINβ1 is involved in the regulation of nitrogen metabolism and sugar signaling in *Arabidopsis* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2009,51(5):513 – 520.
- [15] HINO H, TAKAKI K, MOCHIDA S. Inhibitor – 1 and – 2 of PP2A have preference between PP2A complexes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015,467(2):297 – 302.
- [16] ROSSKOPF D, MANTHEY I, HABICH C, et al. Identification and characterization of G *beta* 3s2, a novel splice variant of the G – protein *beta* 3 subunit[J]. *Biochem J*, 2003,371(1):223 – 232.
- [17] RAMANATHAN L, SHETH P R, OGAS P, et al. Purification and characterization of truncated human AMPK  $\alpha 2\beta 2\gamma 3$  heterotrimer from baculovirus – infected insect cells[J]. *Protein Express Purif*, 2010,70(1):13 – 22.