研究论文

DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2018.09.009

代谢工程改造毕赤酵母生产葡萄糖二酸

刘 叶[1,2]，巩 旭[1,2]，康 振[1,2]，堵国成[1,2]，陈 坚[1,2]，华兆哲[*1,2]

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122;2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122)

摘要：葡萄糖二酸是一种具有重要生物功能的有机酸，为了实现微生物合成葡萄糖二酸的高效生产，异源表达来源于小鼠基因组的 MIOX 基因及 *Pseudomonas putida* KT2440 的 *udh* 基因，在毕赤酵母中构建葡萄糖二酸合成途径，实现了葡萄糖二酸的生成。通过在摇瓶水平进行优化，确定了最适碳源为葡萄糖(初始质量浓度 60 g/L 最优)，最适初始 pH 为 5.5，最优接种龄为 24 h，最适接种体积分数为 25%，重组毕赤酵母生成的葡萄糖二酸产量从最初的(566.36±16.98) mg/L 提高至(967.60±3.90) mg/L。在此基础上，重组毕赤酵母在 3 L 发酵罐中放大培养，葡萄糖二酸的产量达到了(2.60±0.04) g/L。

关键词：葡萄糖二酸;毕赤酵母;代谢工程;发酵优化

中图分类号:Q 815　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1673—1689(2018)09—0955—07

Metabolic Engineering of *Pichia pastoris* for Production of Glucaric Acid

LIU Ye[1,2]，*GONG Xu*[1,2]，*KANG Zheng*[1,2]，*DU Guocheng*[1,2]，*CHEN Jian*[1,2]，*HUA Zhaozhe*[*1,2]

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Glucaric acid is a kind of organic acid with important biological values. In order to achieve high-yield production of glucaric acid, a glucaric acid synthetic pathway was constructed in *Pichia pastoris* by co-expression of the mouse MIOX gene and the *udh* gene from *Pseudomonas putida* KT2440, which led to accumulation of glucaric acid. By fermentation optimization in shake flasks, the results showed the optimum carbon source was glucose (60 g/L was the best initial concentration), the optimum initial pH was 5.5, the optimum seed time was 24 h, and the optimum inoculation amount was 25%. The glucaric acid production was increased from (566.36±16.98) mg/L to (967.60 ±3.90) mg/L after optimization. According to the optimized conditions, the production of glucaric acid was substantially increased to (2.60±0.04) g/L in a 3 L fermentor.

Keywords: glucaric acid, *Pichia pastoris*, metabolic engineering, fermentation optimization

收稿日期：2015-12-13

基金项目：国家 973 计划项目(2013CB733602);国家 863 计划项目(2011AA100905);江苏省博士后基金项目(1301010B);教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT1135)。

*** 通信作者**：华兆哲(1969—)，男，江苏无锡人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事生物工程与环境工程方面的研究。E-mail:huazz@jiangnan.edu.cn

引用本文：刘叶，巩旭，康振，等. 代谢工程改造毕赤酵母生产葡萄糖二酸[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(09):955-961.

葡萄糖二酸(Glucaric acid)是一种自然界存在的高附加值有机酸,在十字花科蔬菜、樱桃和柑橘类水果中含量丰富,少量存在于包括人在内的哺乳动物中[1]。葡萄糖二酸及其衍生物具有广泛的应用价值,它可以降低胆固醇[1]、治疗糖尿病[2]、预防癌症[3]等,同时,在合成生物可降解的聚合物、羟基化尼龙等新型材料方面也有大量的应用[4-5],曾被美国能源部确定为"最具价值的生物炼制产品"之一[6]。

目前,葡萄糖二酸的制备方法主要为化学法,如硝酸氧化、以2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物(TEMPO)为催化剂的共催化氧化等[7]。此方法投入高、得率低,同时产生的废气废液对环境造成一定的污染。由于化学法存在的局限性,生物法制备葡萄糖二酸越来越受到研究者的关注。葡萄糖二酸与抗坏血酸是哺乳动物中葡萄糖醛酸代谢途径的终产物,然而,从葡萄糖到葡萄糖二酸,至少需要10步反应[8]。Prather等通过在大肠杆菌中异源表达酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)来源的肌醇-1-磷酸合成酶基因(*Ino1*)、小鼠来源的肌醇氧化酶基因(MIOX)以及丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)来源的醛酸脱氢酶基因(*udh*),成功构建葡萄糖二酸合成途径,实现了葡萄糖二酸的生物合成[9-11]。通过优化途径、提高MIOX的稳定性及前体物质肌醇的转运能力,在补加肌醇的条件下,葡萄糖二酸的产量达到了4.85 g/L。但是,大肠杆菌耐酸能力弱,易受噬菌体感染,并具有潜在的致病性,因此在工业上难以推广应用。

毕赤酵母是一种单细胞真核生物,具有营养要求低、生长快、培养基廉价、可进行高密度发酵等优点[12]。相比大肠杆菌,毕赤酵母具有真核生物表达时对蛋白质的加工和修饰等功能[13],同时,毕赤酵母耐酸能力较强(pH 3~7)[14],因此是一种可用于生产功能性有机酸的优良宿主。

在本研究中,我们通过异源表达小鼠来源的MIOX基因及*Pseudomonas putida* KT2440来源的udh基因,成功在毕赤酵母内构建了葡萄糖二酸合成途径,通过对碳源、初始pH、接种龄及接种量进行摇瓶水平的优化,进一步提高了葡萄糖二酸的产量。最后,我们按照摇瓶优化的条件,对重组菌在3 L发酵罐上进行了补料分批培养的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 *Pichia pastoris* GS115:本研究中代谢工程改造的宿主菌株;*Pseudomonas putida* KT2440:用于udh基因的克隆;*Escherichia coli* JM109、*E. coli* TOP10:用于构建质粒的宿主菌;质粒pUC57-mM:含小鼠来源的MIOX基因,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,并按照毕赤酵母密码子偏好性进行了优化;质粒pPIC9K、pGAPZB:用于重组质粒的构建。

1.1.2 培养基 LB培养基(g/L):胰蛋白胨10,酵母粉5,NaCl 10。制备固体培养基时添加2%的琼脂。

YPD培养基(g/L):蛋白胨20,酵母粉10,葡萄糖20。

YPDM培养基(g/L):蛋白胨20,酵母粉10,葡萄糖20,肌醇10。

YPDS培养基(g/L):蛋白胨20,酵母粉10,葡萄糖20,山梨醇182.2。

MD固体培养基(g/L):葡萄糖20,YNB 13.4,生物素4×10^{-4},琼脂20。

改良BSM培养基(g/L):85%磷酸26.7 mL,$CaSO_4$ 0.93,K_2SO_4 18.2,$MgSO_4$ 7.275,KOH 4.125,PTM1离子液4.35 mL,葡萄糖60,肌醇13。

PTM1离子液(g/L):$CuSO_4\cdot5H_2O$ 6,KI 0.08,$MnSO_4\cdot H_2O$ 3,H_3BO_3 0.02,$MoNa_2O_4\cdot H_2O$ 0.2,$CoCl_2$ 0.5,$ZnCl_2$ 20,$FeSO_4\cdot7H_2O$ 65,生物素0.2;浓H_2SO_4 5.0 mL。

1.1.3 酶、引物、DNA Marker及相关试剂盒 Primer STAR DNA聚合酶,DNA Marker,T4 DNA连接酶,大肠杆菌感受态制备试剂盒:购自TaKaRa(大连);各种限制性内切酶:购自Thermo公司;PCR引物(见表1):由上海生工生物有限公司合成;质粒小量抽提试剂盒、细菌总DNA提取试剂盒:购自上海生工生物有限公司;酵母基因组提取试剂盒:购自天根生化科技(北京)有限公司;葡萄糖二酸钾色谱级标准品:购自Sigma-Aldrich公司。

1.2 方法

1.2.1 重组表达载体的构建 以pGAPZB质粒为模板,TU-1-F、TU-1-R为引物扩增毕赤酵母组成型启动子TEF,同时以恶臭假单胞菌(*P. putida* KT2440)基因组为模板,TU-2-F、TU-2-R为引物扩

增 *udh* 基因。使用融合 PCR 方法，将 TEF 启动子与 *udh* 基因融合。使用限制性内切酶 *Sac*I 和 *Not*I 对得到的融合片段双酶切，连接至具有相应切口的表达载体 pPIC9K 上，转化至 *E. coli* JM109 中，在确保阅读框正确的前提下鉴定出重组表达质粒 pPIC9KTEF-U，经 DNA 测序比对，重组序列正确。以 pUC57-mM 质粒为模板，mM-F、mM-R 为引物扩增小鼠来源的 MIOX 基因，使用 XhoI 和 XbaI 连接至具有相应切口的表达载体 pGAPZB 上，转化 *E. coli* TOP10 中，在确保阅读框正确的前提下，鉴定出重组表达质粒 pGAPZB-M，经测序比对，序列正确。

表 1　本文所用的引物

Table 1　Primers used in this study

引物	序列 (5′-3′)
TU-1-F	CGAGCTCCACACACCATAGCTTCAAAATGTTT
TU-1-R	GATTGAAGGGGGTAGTGGTCATACCGCCCTTAGA TTAGATTGCTAT
TU-2-F	ATAGCAATCTAATCTAAGGGCGGTATGACCACTA CCCCCTTCAATC
TU-2-R	ATAAGAATGCGGCCGCTTAGTTGAACGGGCCGGC CA
mM-F	CCGCTCGAGATGAAGGTCGACGTAGGTCCAG
mM-R	TGCTCTAGATTACCAGGACAGAGTGCCAGGG

注：下划线代表所用的限制性酶切位点。

1.2.2　毕赤酵母转化方法及转化子筛选　将质粒 pPIC9KTEF-U 经 *Sal*I 线性化之后，采用电转化方式转化至 *P. pastoris* GS115 感受态细胞中，在 MD 培养基中进行筛选，30 ℃恒温倒置培养 3~4 d。挑选 MD 平板上生长良好的单菌落分别接种至含有 1.0、2.0、3.0、4.0 mg/mL G418 的 YPD 平板中，筛选抗高质量浓度 G418(4.0 mg/mL)的重组毕赤酵母，以重组子基因组 DNA 为模板进行 PCR 验证，获得重组菌株。将质粒 pGAPZB-M 经 BspHI 线性化，转化上述重组菌感受态中，涂布于含 100 μg/mL 博莱霉素的 YPDS 平板上，30 ℃恒温倒置培养 3~4 d。挑选生长良好的单菌落接种至分别含有 500、1 000、1 500、2 000 μg/mL 博莱霉素的 YPDS 平板上，筛选抗高浓度博莱霉素(2 000 μg/mL)的重组子，以重组子基因组 DNA 为模板进行 PCR 验证，获得重组菌株。

1.2.3　重组毕赤酵母菌株培养条件

1)摇瓶培养：将重组菌单菌落接种至 25 mL(摇瓶容量为 250 mL) 种子培养基 YPD 中，30 ℃、220 r/min 培养 24 h，将种子培养液按 10%接种体积分数转接至 50 mL(摇瓶容量为 500 mL)的发酵培养基 YPDM 中发酵，培养 60 h。

2)3 L 发酵罐培养：将重组菌单菌落接种至 50 mL(摇瓶容量为 500 mL)YPD 培养基中，30 ℃、220 r/min 培养 24 h，将种子培养液按 25%的接种体积分数转接至含 1 L 改良 BSM 发酵培养基的 3 L 发酵罐中。使用 80%氨水控制 pH 为 5.5，温度 30 ℃，搅拌转速为 800 r/min，通气量为 4 vvm。当发酵液中葡萄糖质量浓度低于 5 g/L 时，流加葡萄糖维持质量浓度在 0~5 g/L 之间。

1.2.4　葡萄糖二酸的检测

1)定性检测：发酵结束后，取 1 mL 发酵液在 12 000 r/min 下离心 5 min，取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤，用于岛津离子阱飞行时间质谱仪(LCMS-IT-TOF)分析[15]。流动相：A：1 mmol/L 甲酸铵+0.01%甲酸+水；B：1 mmol/L 甲酸铵+乙腈；洗脱程序：0~12 min 30% B；12~30 min 30%~65% B；30~31 min 65%~95% B；31~35 min 95% B；35~36 min 95%~30% B；36~40 min 30% B；色谱柱：Shim-pack VP-ODS(150 L×2.0)；流速：0.15 mL/min 进样量：5 μL；离子化模式：电喷雾负离子模式；雾化气流速：1.5 L/min；CDL 温度：200 ℃，HB 温度：200 ℃；扫描范围：MS1，*m/z*：150~300。

2)定量检测：取样品发酵液上清液，经 Affi-Gel 凝胶处理[16]后，用高效液相色谱仪(HPLC)分析。流动相：5 mmol/L 稀硫酸；色谱柱：Aminex HPX-87H；流速 0.5 mL/min；柱温：55 ℃；进样量：10 μL；检测器：UV(检测波长：210 nm)。

1.2.5　MIOX 及 Udh 的活性测定　发酵结束后，将发酵液在 12 000 r/min、4 ℃下离心 5 min，弃上清液。将菌体用 Tris-HCl 缓冲液(10 mmol/L，pH 8.0)清洗两遍后，重悬在清洗缓冲液中。在重悬菌体加入 1.0 mm 硅珠，采用 FastPrep-24 均质破碎仪破碎，破壁后离心，上清液用来检测途径酶活性。MIOX 及 Udh 的活性检测方法见文献[10]。

MIOX 单位酶活定义：1 min 内生成 1 nmol/L 醛酸所需要的酶量；Udh 单位酶活定义：1 min 内生成 1 μmol/L NADH 所需要的酶量。

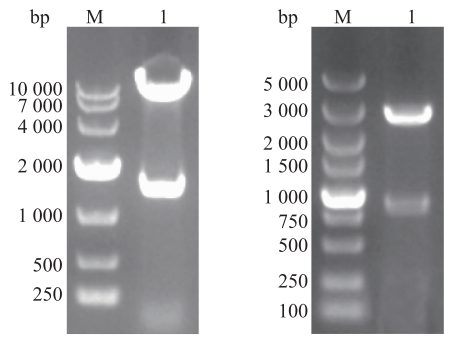
2　结果与讨论

2.1　重组表达载体的鉴定及重组菌的构建

将重组表达质粒 pPIC9KTEF-U 用 *Sac*I 和 *Not*I

双酶切,得到约 8.3 kb 与 1.2 kb 的两条可见特异性 DNA 条带,见图 1(a),分别对应于切除 AOX 启动子的线性化 pPIC9K 和融合片段 TEF-Udh。重组表达质粒 pGAPZB-M 经 *Xho*I、*Xba*I 双酶切,得到约 2.9 kb 与 858 bp 的两条可见特异性 DNA 条带,见图 1(b),分别对应于线性化的 pGAPZB 和目的基因 MIOX。上述结果表明,重组表达质粒 pPIC9KTEF-U 及 pGAPZB-M 均构建成功。

将重组质粒 pPIC9KTEF-U 采用电转的方式转化 *P. pastoris* GS115 感受态细胞中,获得重组菌,命名为 *P. pastoris* GS115-TU,进一步将重组质粒 pGAPZB-M 转化 *P. pastoris* GS115-TU 感受态细胞中,获得相应的重组菌,命名为 *P. pastoris* GS115-TUM。



(a) pPIC9KTEF-U酶切片段　(b) pGAPZB-M酶切片段

图 1　双酶切验证重组质粒

Fig. 1　Confirmation of recombinant plasmids by digestion

2.2　重组毕赤酵母发酵生产葡萄糖二酸

将重组菌 *P. pastoris* GS115-TUM 及对照菌 *P. pastoris* GS115 在摇瓶中培养 60 h 后,取 1 mL 上清液进行 LCMS-IT-TOF 质谱分析,结果见图 2。在 *P. pastoris* GS115-TUM 发酵上清液中成功检测到葡萄糖二酸(*m/z* =209),而对照菌 *P. pastoris* GS115 并未检测到葡萄糖二酸。该结果表明,通过引入 MIOX 基因及 *udh* 基因,在重组菌 *P. pastoris* GS115-TUM 中已成功实现葡萄糖二酸的合成,而原始菌株并不具有生成葡萄糖二酸的能力。为了进一步分析途经,我们对途经酶 MIOX 及 Udh 的活性进行了检测,结果见图 3。MIOX 并未检测到明显的活性,推测原因为表达量较低或不稳定,但 Udh 酶活性较高,后面的研究工作将进一步分析并提高 MIOX 的活性。

经高效液相色谱(HPLC)定量检测,重组菌 *P. pastoris* GS115-TUM 在 500 mL 三角摇瓶中培养 60 h 后,葡萄糖二酸产量为(566.36±16.98) mg/L。

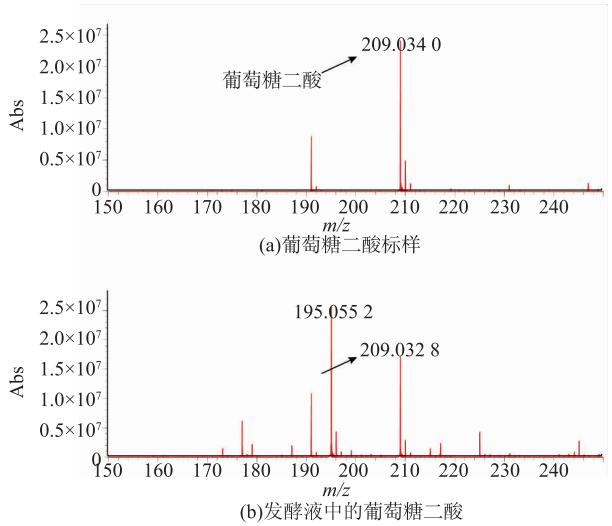


图 2　发酵液中葡萄糖二酸的质谱检测

Fig. 2　Mass spectrum of glucaric acid in the culture supernatant

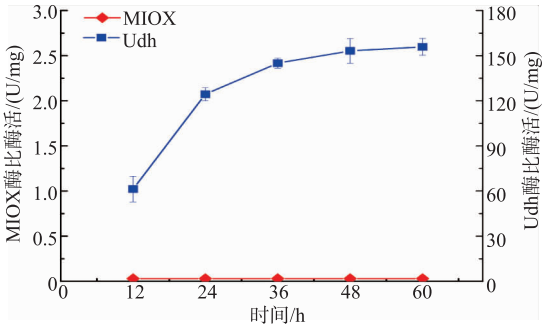


图 3　MIOX 及 Udh 酶活性检测

Fig. 3　Specific activities of MIOX and Udh

2.3　摇瓶水平优化培养条件提高葡萄糖二酸产量

2.3.1　不同碳源对葡萄糖二酸产量的影响　选择甘油和葡萄糖作为碳源,分别以不同初始质量浓度(20、40、60、80、100 g/L)在 500 mL 摇瓶中培养重组菌 *P. pastoris* GS115-TUM,结果见图 4。不同的碳源对菌体细胞生长及葡萄糖二酸的产量影响较大,与底物甘油相比,虽然以葡萄糖为碳源获得的菌体量较低,但是葡萄糖二酸产量明显高于甘油。由图 4 可以看出,初始葡萄糖质量浓度为 60 g/L 时葡萄糖二酸产量最高,为(830.08±32.60) mg/L,因此选择葡萄糖作为后期培养的碳源。

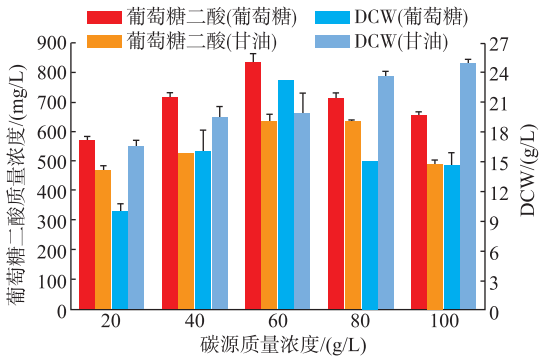


图 4　碳源对菌体生长及产量的影响

Fig. 4　Effect of carbon sources on recombinant strain and glucaric acid production

2.3.2　不同初始 pH 对葡萄糖二酸产量的影响　配制初始 pH 分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 的 YPDM 发酵培养基,初始葡萄糖质量浓度为 60 g/L,将培养 24 h 的种子培养液以 10%的接种体积分数转接到发酵培养基中,培养 60 h,结果见图 5。不同初始 pH 对菌体量影响不大。pH 值为 4.0~5.5 时,葡萄糖二酸的产量逐渐增大;当 pH 大于 5.5 时,葡萄糖二酸产量略有下降。因此,选择培养基最适初始 pH 为 5.5。

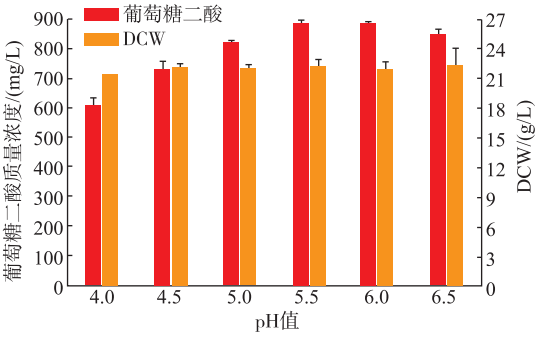


图 5　初始 pH 对菌体生长及产量的影响

Fig. 5　Effect of initial pH on recombinant strain and glucaric acid production

2.3.3　不同接种龄对葡萄糖二酸产量的影响　分别取培养 12、16、20、24、28、32 h 的种子培养液以 10%的接种体积分数转接到初始 pH 为 5.5 的发酵培养基中,发酵培养 60 h,见图 6。在 24 h 之前,随着接种龄的增加,葡萄糖二酸产量及菌体量逐渐增加,在 24 h 之后,菌体量变化不大,但是葡萄糖二酸产量有所下降。因此,选择最适接种龄为 24 h。

2.3.4　不同接种体积分数对葡萄糖二酸产量的影响　取培养 24 h 的种子培养液分别以 5%、10%、15%、20%、25%、30%的接种体积分数转接至初始 pH 为 5.5 的发酵培养基中,发酵培养 60 h,见图 7。在 5%~25%范围内,菌体量、葡萄糖二酸产量与接种体积分数成正相关关系;当大于 25%时,菌体量、葡萄糖二酸产量均略有下降。因此,最优接种体积分数确定为 25%。

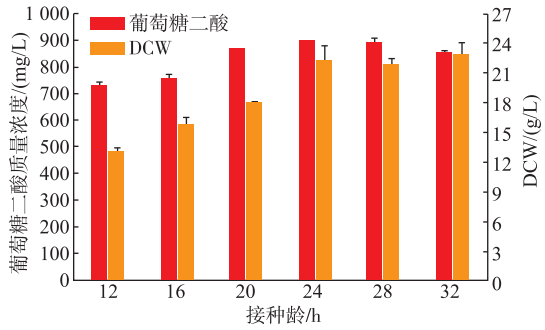


图 6　接种龄对菌体生长及产量的影响

Fig. 6　Effect of seed time on recombinant strain and glucaric acid production

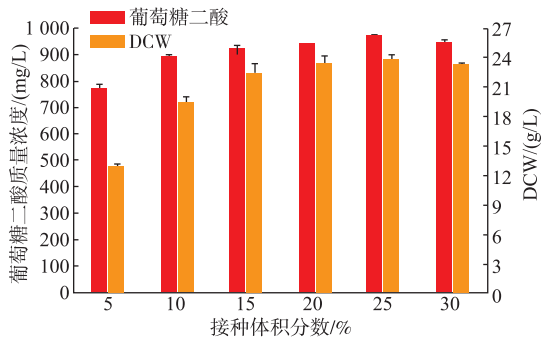


图 7　接种体积分数对菌体生长及产量的影响

Fig. 7　Effect of inoculation amount on recombinant strain and glucaric acid production

2.3.5　不同初始肌醇质量浓度对葡萄糖二酸产量的影响　配制初始肌醇质量浓度分别为 2、4、6、8、10 g/L 和 12 g/L 的发酵培养基,初始葡萄糖质量浓度 60 g/L,初始 pH 为 5.5,将培养 24 h 的种子培养液以 25%的接种体积分数转接到发酵培养基中,培养 60 h,见图 8。不同初始肌醇质量浓度对菌体量的影响不大。在肌醇质量浓度 2~10 g/L 范围内,葡萄糖二酸产量随初始肌醇质量浓度的增加而增加,当大于 10 g/L 时,葡萄糖二酸产量则趋于平稳。因此,初始肌醇质量浓度确定为 10 g/L。

通过对碳源、初始 pH、接种龄、接种体积分数及初始肌醇质量浓度摇瓶水平的优化,葡萄糖二酸的产量达到了(967.60±3.90) mg/L,相比优化前的产量(566.36±16.98) mg/L,提高了 70.85%。

2.4 发酵罐补料分批培养的研究

依据摇瓶优化的结果，将重组菌 *P. pastoris* GS115-TUM 在 3 L 发酵罐中进行放大实验。以改良 BSM 为发酵培养基，初始葡萄糖质量浓度 60 g/L，肌醇质量浓度 13 g/L。发酵培养过程中，为保证碳源的充足，实现菌体高密度培养，当残糖质量浓度低于 5 g/L 时，流加 800 g/L 葡萄糖母液（含 12 mL/L PTM1），维持残糖质量浓度在 0~5 g/L 之间，结果见图 9。葡萄糖二酸的生成与菌体的生长呈正相关关系，因此可以判断为生长偶联型。在发酵 60 h 之前，肌醇的质量浓度下降明显，此时葡萄糖二酸快速积累。发酵 60 h 之后，肌醇的质量浓度不再有明显下降，而葡萄糖二酸的产量也趋于稳定。由此可以看出，培养基中添加肌醇有助于葡萄糖二酸的生成，且葡萄糖二酸的积累与肌醇的消耗成正相关关系。发酵培养 96 h 后，葡萄糖二酸的产量达到了(2.60±0.04) g/L。

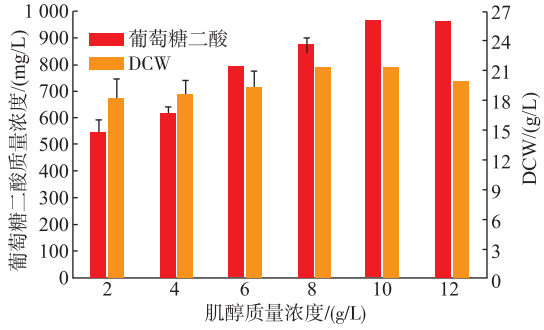


图 8 初始肌醇质量浓度对菌体生长及产量的影响

Fig. 8 Effect of initial concentration of myo-inositol on recombinant strain and glucaric acid production

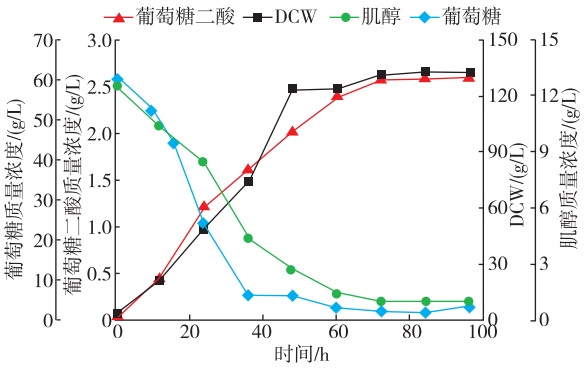


图 9 重组菌 3 L 发酵罐补料分批发酵过程曲线

Fig. 9 Fed-batch fermentation of recombinant strain in a 3 L fermenter

3 结 语

葡萄糖二酸作为一种自然界存在的高附加值有机酸，具有重要的生物功能。作者通过在毕赤酵母内异源表达小鼠来源的 MIOX 基因及 *Pseudomonas putida* KT2440 来源的 *udh* 基因，成功构建葡萄糖二酸合成途径，在添加肌醇的摇瓶培养基中，葡萄糖二酸产量为(566.36±16.98) mg/L。通过对碳源、初始 pH、接种龄及接种体积分数的优化，葡萄糖二酸产量达到(967.60±3.90) mg/L。按照摇瓶优化的条件，我们将重组菌在 3 L 发酵罐上进行补料分批培养，在补加葡萄糖及肌醇的情况下，葡萄糖二酸的产量达到(2.60±0.04) g/L。

本研究提出的重组毕赤酵母生产葡萄糖二酸的方法，具有广阔的发展前景，为生物法合成葡萄糖二酸提供了新的思路。今后工作将通过对毕赤酵母内葡萄糖二酸代谢途径进行分子层面的改造及优化，以期进一步提高葡萄糖二酸的产量。

参考文献：

[1] WALASZEK Z,SZEMRAJ J,HANAUSEK M,et al. Glucaric acid content of various fruits and vegetables and cholesterol-lowering effects of dietary glucarate in the rat[J]. **Nutrition Research**,1996,16(4):673-681.

[2] BHATTACHARYA S,MANNA P,GACHHUI R,et al. Saccharic acid 1,4-lactone protects diabetic rat kidney by ameliorating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via NF-kappa B and PKC signaling[J]. **Toxicology and Applied Pharmacology**,2013,267(1):16-29.

[3] HANAUSEK M,WALASZEK Z,SLAGA T J. Detoxifying cancer causing agents to prevent cancer[J]. **Integrative Cancer Therapies**,2003,2(2):139-144.

[4] DIJKGRAAF P J M,VERKUYLEN M E C G,van der Wiele K. Complexation of calcium ions by complexes of glucaric acid and boric acid[J]. **Carbohydrate Research**,1987,163(1):127-131.

[5] KIELY D E,CHEN L,LIN T H. Hydroxylated nylons based on unprotected esterified glucaric acid by simple condensation-reactions[J]. **Journal of the American Chemical Society**,1994,116(2):571-578.

[6] POON R,VILLENEUVE D C,CHU I,et al. HPLC determination of glucaric aicd in human urine[J]. **Journal of Analytical Toxicology**,1993,17(3):146-150.
[7] YU Zuolong,MIAO Jiangyue,CAO Fei,et al. Research progress in preparation and application of bio-refined glucaric acid[J]. **Chemical Industry and Engineering Progress**,2011,30(11):2502-2508,2535.(in Chinese)
[8] LINSTER C L,VAN Schaftingen E. Glucuronate,the precursor of vitamin C,is directly formed from UDP-glucuronate in liver[J]. **Febs Journal**,2006,273(7):1516-1527.
[9] MOON T S,DUEBER J E,SHIUE E,et al. Use of modular,synthetic scaffolds for improved production of glucaric acid in engineered *E. coli*[J]. **Metabolic Engineering**,2010,12(3):298-305.
[10] MOON T S,YOON S H,LANZA A M,et al. Production of glucaric acid from a synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2009,75(3):589-595.
[11] SHIUE E,PRATHER K L J. Improving glucaric acid production from myo-inositol in *E. coli* by increasing MIOX stability and myo-inositol transport[J]. **Metabolic Engineering**,2014,22:22-31.
[12] ZHANG Huimin,LI Jianfang,WU Minchen,et al. Expression of a thermostable xylanase gene in *Pichia pastoris* and its enzymatic characterization[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(2):124-128.(in Chinese)
[13] YANG Min,YU Xiaowei,WU Houjun,et al. Glycosylation identification of Rhizopus chinensis lipase (r27RCLC) expressed in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(10):1018-1024.(in Chinese)
[14] GOODRICK J C,XU M,FINNEGAN R,et al. High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2001,74(6):492-497.
[15] FABREGAT A,POZO O J,MARCOS J,et al. Use of LC-MS/MS for the open detection of steroid metabolites conjugated with glucuronic acid[J]. **Analytical Chemistry**,2013,85(10):5005-5014.

会 议 消 息

会议名称(中文):中国生物化学与分子生物学会 2018 年全国学术会议

所属学科:生物物理学、生物化学及分子生物学,细胞生物学

开始日期:2018-10-25

结束日期:2018-10-28

所在城市:重庆市 南岸区

具体地点:重庆国际会议展览中心

主办单位:中国生物化学与分子生物学会

承办单位:重庆市生物化学与分子生物学学会 重庆医科大学 上海市王应睐生物化学与分子生物学发展基金会 中科院生物化学与细胞生物学研究所

联系电话:021-54921088/54922818

E-MAIL:csbmb@sibs.ac.cn

会议网站:http://www.csbmb.org.cn/newsmore.asp?id=1351

会议背景介绍:为促进我国生物化学与分子生物学领域专家的交流与合作,中国生物化学与分子生物学会第十二届全国会员代表大会暨 2018 年全国学术会议将于 2018 年 10 月 25-28 日在重庆召开。