

抑制剂对 *Pichia* 生产 S-腺苷甲硫氨酸的作用及机制

胡晓清^{1,2}, 储 炬^{*2}, 张嗣良², 庄英萍², 王永红²

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)是市场前景广阔的高价值氨基酸。为通过削弱胞内 SAM 消耗而进一步提高其积累量, 作者在诱导型和组成型 *P. pastoris* 发酵后期添加 3 种抑制剂。首先考察其作用并比较其差异, 然后分析其机制。结果显示, 添加 S-腺苷高半胱氨酸水解酶抑制剂 Aristeromycin 有助于 SAM 积累, 但比较而言, 其在诱导型酵母中最适添加质量浓度更低, 很可能因为甲醇代谢导致的氧化胁迫使细胞对甲基化作用依赖性增强。添加多胺合成抑制剂 DFMA 有利于 SAM 积累, 但添加过多对细胞生长和抗氧化不利。组成型酵母中添加 7.5 g/L 乙酸可通过抑制多胺生成而增强 SAM 积累。3 种抑制剂均可有效提高 *P. pastoris* 中 SAM 产量。
关键词: S-腺苷甲硫氨酸; 毕赤酵母; 抑制剂; 甲醇; 氧化胁迫

中图分类号: TQ 929.1 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2012)12—1245—07

Influences of Inhibitors on S-adenosyl-L-methionine Production Employing *Pichia* and the Mechanisms

HU Xiao-qing^{1,2}, CHU Ju^{*2}, ZHANG Si-liang², ZHUANG Ying-ping², WANG Yong-hong²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: S-adenosyl-L-methionine (SAM) was high-value amino acid that had great market potential. To enhance SAM accumulation by inhibiting its consumption, three inhibitors were added during the late fermentation stage of inducible *Pichia* and constitutive *Pichia*. Firstly, their influences were investigated, and the differences were compared, and finally, the mechanisms were analyzed. The results showed that addition of Aristeromycin, an inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, contributed to SAM accumulation, but comparatively speaking, the optimum addition level for inducible *Pichia* was lower, likely because the oxidative stress resulting from methanol metabolism strengthened the dependence of *Pichia* cell on transmethylation reaction. Supplement of DFMA, an inhibitor of polyamine synthesis, improved SAM accumulation, while the excessive amount of DFMA led to reduction of cell growth and anti-oxidation ability. Addition of

收稿日期: 2012-11-30

基金项目: 国家“十二五”重点基础研究发展计划项目(2012CB725202)。

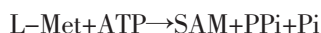
作者简介: 胡晓清(1978—)男, 湖北枝江人, 工学博士, 副教授, 主要从事生化工程方面的研究。E-mail: xiaoqinghu@jiangnan.edu.cn

* 通信作者: 储 炬(1963—), 女, 上海人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物化工方面的研究。E-mail: juchu@ecust.edu.cn

acetic acid at 7.5 g/L improved SAM accumulation, through reducing polyamine formation. The three inhibitors mentioned above were proved effective for improvement of SAM production.

Keywords: S-adenosyl-L-methionine, *Pichia pastoris*, inhibitor, methanol, oxidative stress

S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM)是细胞内重要性仅次于 ATP 的一种重要的生理活性物质,参与人体内多种生化反应,可用于肝功能紊乱、抑郁症等病症治疗,在欧美使用多年。近年我国也对注射用 SAM 药品发放了批准文号,因此 SAM 是一种需求量极大的医药原料。SAM 工业制备方法为利用微生物过表达甲硫氨酸腺苷转移酶 (methionine adenosyltransferase, MAT),将外源添加的 L-甲硫氨酸 (L-methionine, L-Met)和自身代谢产生的 ATP 酶促合成 SAM,反应式如下:



目前最有效的 SAM 生产菌株为重组巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)^[1-5]。作者所在实验室前期针对利用诱导型启动子 P_{AOX} 和组成型启动子 P_{GAP} 的两类 *P. pastoris*, 对酶促合成 SAM 进行了生物反应器水平的优化,分别发展了新型的甲醇-甘油交替流加策略^[6]和非限制性甘油补加策略^[7],SAM 合成产率分别达 13.24 g/L 和 9.24 g/L,其中诱导型菌株产率远高于其他报道水平^[8-9],仅略低于目前报道的最高水平 13.5 g/L^[3],而后的生产菌株除了过表达 MAT,还对 *cbs* 基因进行了敲除^[3]。

SAM 作为一种重要的中间代谢产物,主要参与了胞内 3 种作用:转甲基、转硫和转氨丙基,见图 1。SAM 的甲基转移到其他生物分子后,生成产物 S-腺苷高半胱氨酸 (S-adenosyl-L-homocysteine, SAH)^[10],因此 SAM/SAH 常被表征为甲基化势能。转硫作用生成重要的抗氧化剂还原型谷胱甘肽 (GSH)^[11],GSH 的氧化产物为氧化型谷胱甘肽 (GSSG)。近年有学者提出,GSSG/2GSH 可用于表征环境中氧化还原势^[12]。在氧还电位较高的环境中,GSSG/2GSH 也高,反之则低。对于正常代谢活性的细胞,该比值维持在稳定水平,但对于产生较多过氧化物的细胞,其比值将升高。SAM 的第三种胞内作用为脱羧后,其氨丙基转移到腐胺和亚精胺等形成多胺,多胺具有促进细胞生长、代谢和胁迫响应的生理功能:正常生长与分裂均需要多胺参与,细胞生长越活跃,所需多胺物质越多^[13]。SAM 在胞内的积累量为合成

量与转化量的差值,因此,SAM 的上述三大转化作用强弱势必影响着 SAM 的产量。



图 1 胞内 SAM 三大转化途径

Fig.1 Three main pathways of SAM conversion

目前关于 *P. pastoris* 生产 SAM 的优化研究,大部分着眼于促进 SAM 的酶促合成,即“开源”^[14];仅有少数研究通过减少 SAM 消耗来提高其产率,即“节流”^[3]。He 等报道通过敲除 *cbs* 基因构建高产菌^[3]。笔者对 *P. pastoris* 生产 SAM 进行了长期研究^[4-7,15-16]。在前期工作中发现,对于 P_{AOX} 和 P_{GAP} 控制的 *P. pastoris*,SAM 积累量提高后,其主要转化产物如 SAH、GSH 和各种多胺如亚精胺 (Spermidine, Spd) 等也随之提高,但是幅度在不同转化途径中有差别,而且在不同类型酵母中也不相同。这些下游产物和细胞的生长繁殖、代谢及胞内氧化水平休戚相关。因此,作者拟通过适度抑制 SAM 转化以提高 SAM 积累量。

本研究主要切入点包括:1)抑制 SAH 降解以减少 SAM→SAH;2)抑制 SAM→多胺,以上两点分别通过添加 3 种抑制剂实现。由于上述反应是细胞满足较高代谢活力和应对外界胁迫所必需,因此抑制剂的添加选择在发酵后期,且其添加量进行了优化。此外,结合诱导型和组成型 *P. pastoris* 不同生理特性,对 3 种抑制剂作用机制进行了探究。

1 材料与方法

1.1 菌株

过表达酿酒酵母来源 *sam2* 基因的诱导型

P. pastoris^[2]及组成型 *P. pastoris*^[1],也是目前用于生长的优势生产菌株。

1.2 培养基

1.2.1 BMGY 培养基 酵母膏 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 100 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.0) 20 g/L, YNB 13.4 g/L, 硫酸铵 5 g/L, 生物素 400 μg/L, 甘油 10 g/L。其中 YNB: 生物素 0.1 mL/L, 泛酸钙 10 mL/L, 叶酸 0.1 mL/L, 肌醇 10 mL/L, 烟酸 10 mL/L, 对氨基苯甲酸 10 mL/L, VB6-HCl 10 mL/L, 核黄素 10 mL/L, 盐酸硫胺素 1 mL/L, 硼酸 5 mL/L, 硫酸铜 0.5 mL/L, 氯化钾 0.5 mL/L, 氯化铁 0.2 mL/L, 硫酸锰 5 mL/L, 钼酸钠 5 mL/L, 硫酸锌 5 mL/L, 磷酸二氢钾 10 g/L, 硫酸镁 5 g/L, 氯化钠 1 g/L, 氯化钙 1 g/L, 硫酸铵 50 g/L。

1.2.2 发酵罐培养基 硫酸钙 1 g/L, 七水硫酸镁 14.9 g/L, 氢氧化钾 4.13 g/L, 硫酸钾 18.2 g/L, 85% 磷酸 26.7 mL/L, 甘油 40 g/L, 消泡剂 1 g/L, PTM1 12 mL/L。其中 PTM₁: 硫酸铜 6 g/L, 碘化钾 0.08 g/L, 水合硫酸锰 3 g/L, 钼酸钠 0.2 g/L, 硼酸 0.02 g/L, 氯化钴 0.5 g/L, 硫酸锌 20 g/L, 硫酸亚铁 65 g/L, 生物素 0.2 g/L, 硫酸 5 mL/L。

1.3 主要仪器与设备

Agilent 1200 高效液相色谱仪: 装配有紫外-可见检测器, 分析柱强阳离子型离子交换柱 Hypercil 10 SCX (4.6 mm×250 mm); UV-2000 紫外分光光度计: 上海优尼柯有限公司; GC-920 气相色谱仪: 上海海欣色谱仪器有限公司; 15 L 自控高级发酵罐: 华东理工大学国家生化工程技术研究中心 (上海) 制造, 控制系统为 Tophawk Fermentation Control System。

1.4 分析方法

SAM 和 SAH 分析: 参照 Wang 等报道方法^[17]; GSH 和 GSSG 测定: 参照 Sian 等报道方法^[18]; 乙酸测定: 采用气相色谱法^[19]; ATP 抽提和测定: 参照前期方法^[20]; 胞内 H₂O₂ 测定: 参照 Patterson 方法^[21]。

1.5 发酵

摇瓶和发酵罐培养控制分别参照前期方法^[6-7, 22], 此外, 3 种抑制剂添加策略如下。

1.5.1 添加 SAH 水解酶抑制剂 Aristeromycin SAH 水解酶抑制剂较多, 但商品化产品较少, 且大多与 SAM 结构类似, 对后续纯化不利, 因此作者选用了 Aristeromycin。在摇瓶培养 80 h 添加

Aristeromycin, 考察不同添加量 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L 对胞内 SAH 及 SAM 的影响。以不添加 Aristeromycin 为对照组, 将实验组 SAH 和 SAM 含量分别与前者求比值得相对含量。测定胞内 H₂O₂ 含量, 分析 GSH 及 GSSG, 计算 GSSG/2GSH。

1.5.2 添加多胺合成抑制剂 DFMA 选用 DFMA 在摇瓶培养 80 h 添加, 考察不同质量浓度 10、20、30、40、50 mg/L 对胞内 Spd 和 SAM 的相对含量的影响。针对诱导型酵母, 测定胞内 H₂O₂ 含量。

1.5.3 控制不同浓度乙酸 较低浓度的乙酸会对细胞代谢强度产生抑制作用。针对组成型酵母, 在 15 L 反应器水平采用非限制性甘油补加策略 E^[7], 从发酵 60 h 开始, 添加 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 g/L 乙酸, 考虑到乙酸消耗和挥发损失, 每 2 h 测定一次乙酸残留, 并补加适量乙酸以控制其质量浓度在初始值, 考察其对胞内 Spd 和 SAM 的影响。

2 结果与讨论

2.1 Aristeromycin 的作用及机制

选用不同质量浓度 Aristeromycin, 考察其对 SAM 及 SAH 积累量的影响。将添加 Aristeromycin 后 SAM 含量与添加前 SAM 含量相比较, 得 SAM 的相对含量, 类似得 SAH 的相对含量, 结果见图 2。首先, 添加 SAH 水解酶抑制剂后, SAH 和 SAM 均有变化, 但在较低添加剂量下, 二者变化幅度大致相同, 这是因为细胞内甲基化势能相对稳定, 因此其表征参数 SAM/SAH 也相对恒定。低质量浓度的 Aristeromycin 对 SAH 水平改变较小, 但高质量浓度时 SAM 和 SAH 积累量反而下降, 且 SAM 下降更为显著, 表现为 SAM/SAH 逐渐变小。这是因为转甲基化作用为细胞内众多生化过程所必需, 高质量浓度 Aristeromycin 使转甲基作用受抑制, 导致细胞代谢活力降低, 反过来对 SAM 的合成速率产生不利影响, 从而减少 SAM 和 SAH 积累, 因此维持适度的 SAH 水解酶活力仍是必要的。

对于诱导型 *P. pastoris*, 1 mg/L 的 Aristeromycin 添加量最合适, SAM 积累量提高 6.6%, 对于组成型 *P. pastoris*, 最佳抑制剂添加量为 2 mg/L, SAM 增幅为 25.7%。两类酵母对 Aristeromycin 剂量敏感度的差异可归结于二者的细胞生理学差异, 其中诱导型酵母细胞中存在过氧化胁迫, 从而对 SAM 代谢流产生影响。

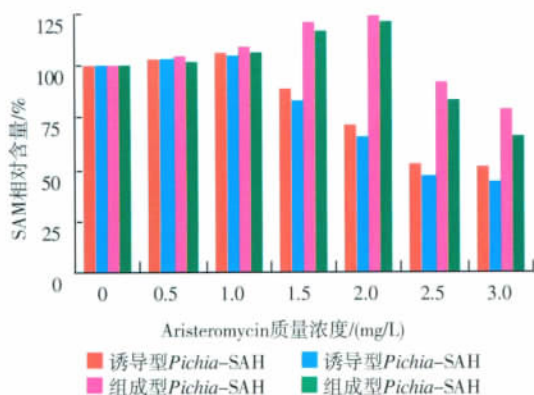


图2 Aristeromycin 质量浓度对 SAH 和 SAM 相对含量的影响

Fig.2 Effects of Aristeromycin levels on relative contents of SAH and SAM

两类酵母中经由 SAM 生成的 (GSH+GSSG) 相对含量见图 3a。在 SAM 达到峰值时,诱导型 *Pichia* 中(GSH+GSSG)含量占 SAM 的 7.6%,而组成型酵母中仅为 2.9%。诱导型酵母培养过程中胞内氧化还原电位逐渐上升,而组成型酵母则变化很小(图 3b)。导致该差异的原因是诱导型 *Pichia* 细胞中,甲醇代谢产生 H_2O_2 ,而且过量 H_2O_2 还会经由 $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$ 和 $H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \rightarrow O_2 + \cdot OH + OH^-$ 反应,生成更高活性的 $\cdot OH$,这些过氧化物对细胞造成了氧化损伤(图 3c)。由于 GSH 是胞内重要的抗氧化剂,因此,细胞基于氧化胁迫的响应机制,必然驱动更多的 SAM 流向 GSH 合成。

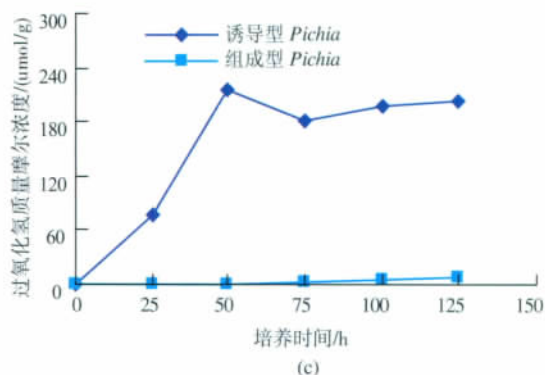
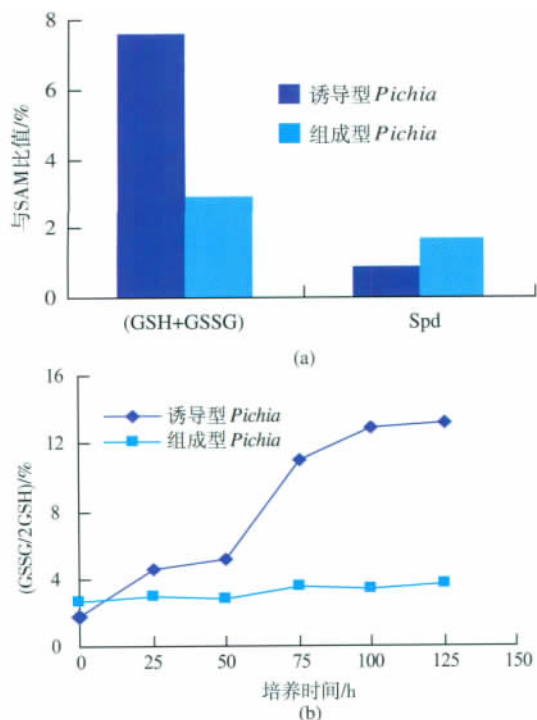


图3 两类 *P. pastoris* 中 (GSH+GSSG)/SAM、Spd/SAM (a)、GSSG/2GSH(b)和 H_2O_2 (c)

Fig.3 Contents of (GSH+GSSG)/SAM, Spd/SAM (a), GSSG/2GSH (b) and H_2O_2 (c) in two types of *P. pastoris*

GSH 在谷胱甘肽过氧化酶作用下将 $ROOH$ 还原为 ROH ,自身被氧化为 GSSG,GSSG 可在谷胱甘肽还原酶催化下,由 NADPH 供氢重新还原为 GSH,这是胞内 GSH 再生的最基本途径。但当细胞内过氧化物过多时还原力不足(图 3c),一方面导致 GSSG/2GSH 逐渐攀升(图 3b),另外一方面,基于某种调控机制,胞内过量 SAM 易转化成 GSH,以缓解胞内氧化胁迫。

由于 SAH 水解酶是 SAM 经由转甲基和转硫作用生成 GSH 途径中的关键酶,在诱导型酵母中更重要,因此,诱导型酵母细胞对 SAH 水解酶抑制剂更为敏感,而细胞活力的降低直接影响到 SAM 的合成,这很可能是两类 *P. pastoris* 中最佳 Aristeromycin 添加量不一样的最关键原因。

2.2 DFMA 的作用及机制

选用多胺合成途径的抑制剂 DFMA,在摇瓶水平考察 Spd 的合成是否受到影响。将添加 DFMA 后 Spd 和 SAM 水平与添加前相比较,得 SAM 和 Spd 相对含量,结果见图 4。当添加量较低时,DFMA 质量浓度越高,Spd 抑制越明显,而 SAM 则提高越显著。但当添加量超过 30 mg/L (组成型酵母)或 40 mg/L (诱导型酵母)时,Spd 的进一步降低不利于 SAM 积累。当 DFMA 添加量最佳时,诱导型酵母 SAM 提高 12.6%,组成型酵母 SAM 提高 34.1%。这也与两类酵母中碳源种类和胞内胁迫导致的细胞生理状态差异有关。

组成型 *P. pastoris* 碳源为易利用的甘油,具有更高的碳源摄取和氧气消耗速率,其代谢活力较诱

导型 *P. pastoris* 旺盛,因此对多胺需求量更大,从而导致组成型 *P. pastoris* 对 DFMA 敏感度更高。如图 5 所示,当 DFMA 质量浓度尚未达到 30 mg/L 时,ATP 降幅不大;而当质量浓度超过 30 mg/L 时,细胞代谢强度陡然降低,引起了 ATP 的急剧下降,见图 5,这直接导致 SAM 合成速率降低。此外还造成大量细胞死亡,这些因素均不利于 SAM 合成与积累。

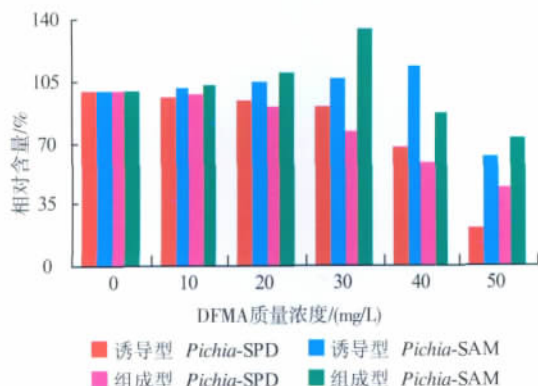


图 4 DFMA 质量浓度对 Spd 和 SAM 相对含量的影响

Fig.4 Effects of DFMA levels on relative contents of Spd and SAM

对于诱导型 *P. pastoris* 而言,其碳源为代谢较慢的甲醇,因此其细胞代谢活力较低,细胞对多胺的直接需求较组成型 *P. pastoris* 低,因此其对 DFMA 敏感度更低。但过度减少多胺合成会削弱细胞的代谢活性和氧化胁迫抗性,从而削弱 SAM 的合成及积累。这是因为多胺代谢关键酶可通过调节胞内多胺水平影响 H_2O_2 酶,从而调节细胞内活性氧^[23]。从图 5 可知,当 DFMA 补加量超过 40 mg/L 时,诱导型 *P. pastoris* 细胞中 H_2O_2 骤然升高,同时伴随着多胺的大幅降低,这导致胞内过氧化氢迅速积累并引起细胞死亡,最终对 SAM 生产不利。

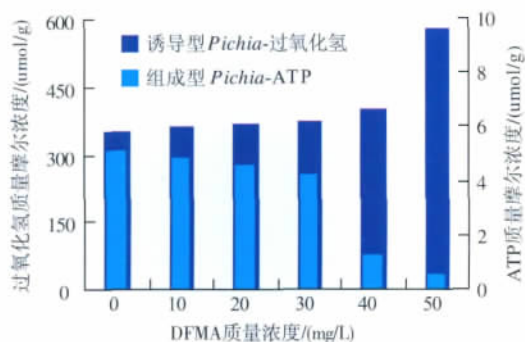


图 5 DFMA 质量浓度对 *P. pastoris* 中 H_2O_2 和 ATP 的影响

Fig.5 Effects of DFMA levels on H_2O_2 and ATP contents in *P. pastoris*

2.3 乙酸的作用及机制

组成型 *P. pastoris* 胞内较高的 Spd 消耗与其细胞代谢强度有关,因此作者考察了另外一种生长抑制剂乙酸的作用。如图 6 所示,其添加具有类似 DFMA 的效果,在低于 7.5 g/L 时,乙酸可通过抑制生长和 Spd 水平而提高 SAM 产率;在添加 7.5 g/L 时,SAM 产率提高幅度达 16.7%;而高于 7.5 g/L 时,乙酸添加导致细胞“中毒”和 Spd 的急剧下降,最终使 SAM 的产率下跌。乙酸对 SAM 的作用机制也与 DFMA 类似。值得注意的是,相对于 DFMA,乙酸更为安全,不会加大下游纯化负担,且成本更低,因此极具应用潜力。

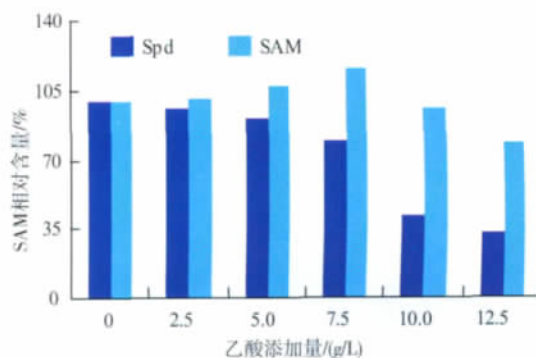


图 6 乙酸对组成型酵母胞内 SAM 相对含量的影响

Fig.6 Effects of acetic acid levels on relative SAM yield in constitutive *Pichia*

近年来,*P. pastoris* 已广泛用于生产异源蛋白或进行生物催化,众多研究者对其发酵优化策略也进行了深入研究^[24-25]。作者基于不同启动子类型的 *P. pastoris* 的细胞生理学特征,首次探讨了 3 种抑制剂的作用及机制,不仅对 SAM 合成具有显著促进作用,而且对于其他产物合成也具有借鉴意义,是一种简单有效的 *P. pastoris* 发酵调控方式。

3 结语

发酵后期添加 3 种抑制剂均可有效提升 *P. pastoris* 中 SAM 产率,作者比较其在两类 *P. pastoris* 中作用差异及机制,结果显示:

1) 添加一定 Aristeromycin 有利于 SAM 积累,其最佳添加量在诱导型 *P. pastoris* 中为 1 mg/L, SAM 积累提高 6.6%,在组成型 *P. pastoris* 中为 2 mg/L, SAM 增幅为 25.7%。诱导型 *P. pastoris* 中甲醇代谢引发的氧化胁迫很可能使细胞对甲基化势能的变化更为敏感,导致其最适添加量较低。

2)添加多胺合成抑制剂 DFMA 有利于 SAM 积累,最佳添加量分别为 30 mg/L(组成型酵母)和 40 mg/L(诱导型酵母)。其原因在于组成型酵母中代谢活力较强,对多胺需求更大;而诱导型酵母中多胺

由于间接参与了细胞氧化胁迫应激,因此也不宜过度抑制。

3)添加 7.5 g/L 乙酸可通过抑制组成型酵母代谢活力和多胺需求,最终增强 SAM 积累。

参考文献:

- [1] Yu Z L, Wu X J, Li D Y, et al. Enhancement of the production of SAM by overexpression of SAM synthetase in *Pichia pastoris*[J]. **Acta Biochem Biophys Sin**, 2003, 35: 127-132.
- [2] Li D Y, Yu J, Tian L, et al. Production of SAM by recombinant *Pichia pastoris*[J]. **Chin J Biotechnol**, 2002, 3: 295-299.
- [3] He J, Deng J, Zheng Y, et al. A synergistic effect on the production of S-adenosyl-L-methionine in *Pichia pastoris* by knocking in of S-adenosyl-L-methionine synthase and knocking out of cystathionine-beta synthase[J]. **J Biotechnol**, 2006, 126: 519-527.
- [4] Hu H, Qian J, Chu J, et al. DNA shuffling of methionine adenosyltransferase gene leads to improved S-adenosyl-L-methionine production in *Pichia pastoris*[J]. **J Biotechnol**, 2009, 141: 97-103.
- [5] Qin X, Qian J, Yao G, et al. GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2011, 77: 3600-3608.
- [6] Hu X Q, Chu J, Zhang S L, et al. A novel feeding strategy during the production phase for enhancing the enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-methionine by methylotrophic *Pichia pastoris*[J]. **Enzyme Microb Technol**, 2007, 40: 669-674.
- [7] Hu X Q, Chu J, Zhang Z, et al. Effects of different glycerol feeding strategies on S-adenosyl-L-methionine biosynthesis by PGAP-driven *Pichia pastoris* overexpressing methionine adenosyltransferase[J]. **J Biotechnol**, 2008, 137: 44-49.
- [8] Huang Y, Gou X, Hu H, et al. Enhanced S-adenosyl-L-methionine production in *Saccharomyces cerevisiae* by spaceflight culture, overexpressing methionine adenosyltransferase and optimizing cultivation[J]. **J Appl Microbiol**, 2011, 112: 683-694.
- [9] Lee S W, Park B S, Choi E S, et al. Overexpression of ethionine resistance gene for maximized production of S-adenosylmethionine in *Saccharomyces cerevisiae* sake kyokai No. 6[J]. **Korean J Chem Eng**, 2010, 27: 587-589.
- [10] Mato J M, Alvarez L, Ortiz P, et al. S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications [J]. **Pharmacol Ther**, 1997, 73: 265-280.
- [11] Stipanuk M H. Metabolism of sulfur-containing amino acids[J]. **Annu Rev Nutr**, 1986, 6: 179-209.
- [12] Schafer F Q, and Buettner G R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple[J]. **Free Radic Biol Med**, 2001, 30: 1191-1212.
- [13] Bistulfi G, Diegelman P, Foster B A, et al. Polyamine biosynthesis impacts cellular folate requirements necessary to maintain S-adenosylmethionine and nucleotide pools[J]. **FASEB J**, 2009, 23: 2888-2897.
- [14] Hu X, Quinn P J, Wang Z, et al. Genetic modification and bioprocess optimization for S-Adenosyl-L-methionine biosynthesis[J]. **Subcell Biochem**, 2012, 64: 327-341.
- [15] Hu H, Qian J, Chu J, et al. Optimization of L-methionine feeding strategy for improving S-adenosyl-L-methionine production by methionine adenosyltransferase overexpressed *Pichia pastoris*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2009, 83: 1105-1114.
- [16] 胡晓清. 诱导型和组成型重组毕赤酵母转化生产 S-腺苷甲硫氨酸的发酵表达优化和发酵行为比较[D]. 上海: 华东理工大学, 2007.
- [17] Wang W, Kramer P M, Yang S, et al. Reversed-phase high-performance liquid chromatography procedure for the simultaneous determination of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine in mouse liver and the effect of methionine on their concentrations[J]. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, 2001, 762: 59-65.
- [18] Sian J, Dexter D T, Cohen G, et al. Comparison of HPLC and enzymatic recycling assays for the measurement of oxidized glutathione in rat brain[J]. **J Pharm Pharmacol**, 1997, 49: 332-335.
- [19] Wittman G Y, Van Langenhove H, and Dewulf J. Determination of acetic acid in aqueous samples, by water-phase derivatisation, solid-phase microextraction and gas chromatography[J]. **J Chromatogr A**, 2000, 874: 225-234.
- [20] Di Pierro D, Tavazzi B, Perno C F, et al. An ion-pairing high-performance liquid chromatographic method for the direct simultaneous determination of nucleotides, deoxynucleotides, nicotinic coenzymes, oxypurines, nucleosides, and bases in

- perchloric acid cell extracts[J]. **Anal Biochem**, 1995, 231:407-412.
- [21] Patterson B D, MacRae E A, Ferguson I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV) [J]. **Anal Biochem**, 1984, 139:487-492.
- [22] Chen H, Chu J, Zhang S, et al. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves S-adenosylmethionine production in a recombinant *Pichia pastoris* [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2007, 74:1205-1212.
- [23] Cona A, Rea G, Angelini R, et al. Functions of amine oxidases in plant development and defence [J]. **Trends Plant Sci**, 2006, 11: 80-88.
- [24] 高敏杰, 詹晓北, 郑志永, 等. 基于自联想神经网络的毕赤酵母发酵过程两阶段故障诊断[J]. **食品与生物技术学报**, 2012, 31(6):592-598.
- GAO Min-jie, ZHAN Xiao-bei, ZHENG Zhi-yong, et al. Two-stage fault diagnosis of *Pichia pastoris* fermentation based on an auto-associative neural network [J]. **J Food Sci Biotechnol (China)**, 2012, 31(6):592-598. (in Chinese)
- [25] 许哲军, 何云, 郭美锦, 等. 重组毕赤酵母表达期菌体浓度的软测量模型[J]. **食品与生物技术学报**, 2006, 25(5):28-34.
- XU Zhe-jun, HE Yun, GUO Mei-jin, et al. Soft sensor modeling for predicting biomass concentration at recombinant *Pichia pastoris* expression phase [J]. **J Food Sci Biotechnol (China)**, 2006, 25(5):28-34.

科 技 信 息

国家标准《酱腌菜》、行业标准《松肉粉》、《调味食品配料精膏》征求意见稿公示

按照标准化工作程序,国家标准《酱腌菜》、行业标准《松肉粉》、《调味食品配料精膏》征求意见稿已经完成。现予以公示征求意见。希望各企业和专家提出意见和建议,填写意见反馈表,并于2012年12月20日前反馈到中国调味品协会秘书处。

地 址:北京市海淀区复兴路47号天行建商务大厦605室 邮 编:100036

联 系 人:李慧丽 电 话:010-51921726/28 51921215/59/73 分机 802

传 真:010-51921087 邮 箱:kejibu@chinacondiment.com.cn

[信息来源]中国调味品协会. 国家标准《酱腌菜》、行业标准《松肉粉》、《调味食品配料精膏》征求意见稿公示 [EB/OL]. (2012-11-21). http://www.chinacondiment.com/news/news_xhhd/bzhgz/20121121102713.htm.

欧盟制定非供人消费类畜产品及其派生产品的相关条例

据欧盟网站消息,11月24日欧盟委员会发布(EU) No 1097/2012号法规,制定非供人食用类畜产品及其派生产品的相关条例,并实施理事会指令97/78/EC有关成员国之间部分畜产品及其派生产品豁免检查的规定。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟制定非供人消费类畜产品及其派生产品的相关条例[EB/OL]. (2012-11-24). <http://www.foodmate.net/news/daodu/2012/11/218867.html>.

澳新批准对柿子进行辐照处理

据澳新食品标准局(FSANZ)消息,11月15日澳新食品标准局发布No. 136号修正案,批准对柿子进行辐照处理。

按照最新规定,当采用辐照的手段对柿子进行处理时,最低辐照剂量为150 Gy,最高剂量为1k Gy。

[信息来源]食品伙伴网. 澳新批准对柿子进行辐照处理 [EB/OL]. (2012-11-20). <http://www.foodmate.net/news/yujing/2012/11/218502.html>