

补加前体 L-蛋氨酸对高密度发酵生产 S-腺苷-L-蛋氨酸的影响 Effect of Feeding Pre-L-methionine on High-cell-density Fermentation for S-adenosyl-L-methionine Production

刘沛溢,董函竹,谭天伟*

LIU Pei-Yi, DONG Han-Zhu and TAN Tian-Wei*

北京化工大学 生命科学与技术学院 北京 100029

College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

摘 要 将高密度发酵技术成功应用于 S-腺苷-L-蛋氨酸的生产。考察了补加前体 L-蛋氨酸的量以及补加策略对酿酒酵母 G14 发酵生产 S-腺苷-L-蛋氨酸的影响。实验发现补加前体 L-蛋氨酸能明显促进 S-腺苷-L-蛋氨酸的积累。同时还发现不同的补加策略对菌体浓度以及 S-腺苷-L-蛋氨酸的产量和浓度有不同的影响。确定了补加 L-蛋氨酸不应低于 0.7g/10g 菌体干重。比较了五种不同的补加前体 L-蛋氨酸的方式。结果表明在菌体干重达到高密度的情况下(120g/L)补加前体 L-蛋氨酸进行转化生产 S-腺苷-L-蛋氨酸能达到比较好的效果:一次性补加 9g L-蛋氨酸, SAM 的积累量在补加后的 18h 达到最高,为 4.31g/L;采取流加方式补加 L-蛋氨酸,流加速率为 2g/h,共流加 5h,流加结束 28h 后 SAM 达到最高积累量后者达到 4.98g/L。两者最终的生物量均可达到 130g/L 以上。

关键词 S-腺苷-L-蛋氨酸,高密度发酵,补加策略,酿酒酵母

中图分类号 TQ922 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)02-0268-05

Abstract The yield of S-adenosyl-L-methionine(SAM) by *Saccharomyces cerevisiae* fermentation was affected by the strategy of feeding L-methionine. The effects that feeding strategies and the amount of precursor L-methionine had on the production of SAM by *Saccharomyces cerevisiae* G14 were investigated. The results showed that feeding L-methionine could obviously improve the accumulation of SAM, and both the biomass and SAM yield relied heavily on different feeding strategies. In our work, it was found that total amount of L-methionine added should be no less than 0.7g per 10 grams of dry cell weight. Five different feeding strategies had been investigated in our experiment, and such comparison indicated that favorable results could be achieved as the biomass reached the status of high cell density(120g/L). If 9 grams of the precursor L-methionine was introduced once and for all, the accumulation of SAM reached maximum of 4.31g/L at the 18th hour after addition; if the precursor amino acid was fed at a rate of 2g/h in 5 h, maximum yield of 4.98g/L was achieved at the 28th hour after feeding. Thus high cell density fermentation can be successfully applied to SAM production by *Saccharomyces cerevisiae* with the consequence of over 130g/L of biomass gained using the above two strategies.

Key words S-adenosyl-L-methionine, high-cell-density fermentation, feeding strategy, *Saccharomyces cerevisiae*

Received: December 7, 2005; Accepted: January 5, 2006.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 20306002), the Hi-Tech Research and Development Program ("863" Program) of China (No. 2002AA217022).

* Corresponding author. Tel: 86-10-66416691; E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 20306002), 国家高技术研究发展计划(863)项目(No. 2002AA217022)资助

中国生物工程学会生物研究所期刊编辑部 http://journals.im.ac.cn

S-腺苷-L-蛋氨酸(S-adenosyl-L-methionine, S-AdoMet 或 SAM)是一种广泛存在于活体细胞内的生物小分子,分子量为 399。细胞内的 SAM 是由 ATP:蛋氨酸腺苷转移酶(MAT)催化等分子的 L-蛋氨酸和 ATP 合成得到的^[1]。SAM 是甲硫键型高能化合物,其合成是一个高能耗过程;ATP 既是 SAM 合成的关键性前体之一,又为 SAM 的合成提供必要能量,在 SAM 合成中起着十分关键的作用^[2]。

SAM 对人体生理功能发挥着重要作用,作为基团的提供者和酶的诱导剂参与多种关键的生化反应,如脂类、核酸、蛋白质的甲基化,对保持细胞膜质的流动性以及肝脏内谷胱甘肽的水平具有重要的作用^[3]。在临床中用于肝病^[3,4]和抑郁症^[3,5]的治疗,对关节炎、纤维性肌痛和偏头疼^[3]也有很好的作用。因此具有十分广阔的市场前景。

SAM 的生产制备方法主要有化学合成法、发酵法和酶促转化法三种。文献报道酵母细胞可以有效地积累 SAM,采用发酵法通过在培养基中加入前体 L-蛋氨酸来合成是目前工业规模生产 SAM 的主要方法^[6],但酵母的发酵水平不高,一般在 1000 ~ 3000mg/L,在相对大量的 L-蛋氨酸存在条件下,酵母细胞无论生长、不生长都可积累 SAM,如 *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula* 等^[7]。其中,酿酒酵母属微生物具有较高的过量积累 SAM 的能力,是最常用的微生物。目前对 SAM 的生产研究还处于初级阶段。Schlenk 等^[6]用从富含 L-蛋氨酸的面包酵母中提取 SAM,取得了一定的进展,SAM 含量达到 50g/g(DCW),但生物量很低,无法形成可行的生产工艺。Marthews 等^[8]则利用基因工程手段,将 SAM 合成酶的基因片段克隆到 *E. coli*(met K)中表达,从中提取酶用于 SAM 的合成,尽管产物纯度高,但成本非常昂贵,不适合工业化生产。国内学者近年来也开展了有关 SAM 的研究,与国外相比,国内的研究尚处于实验室水平上。刘慧等^[9]利用啤酒厂废酵母联产 SAM 和谷胱甘肽(GSH),SAM 和 GSH 含量分别达到 45g/g(DCW)和 18g/g(DCW),生物量为 35g/L。王远山^[10]等人从土壤中筛选的酵母菌株产量达到 861mg/L。陈小龙等^[11]对培养基和发酵条件进行优化,SAM 积累量达到 1946mg/L。李东阳等人^[12]在 *Pichia pastoris* 表达酿酒酵母 *sam2* 基因,发酵 7d 后产量为 1.72g/L。但国内还尚无 SAM 规模化生产的报道,对 SAM 的研究仍是当前急需解决的问题。

本文将高密度发酵平台技术成功应用于 SAM

发酵,考察了补加前体 L-蛋氨酸的策略和补加量对 SAM 积累的影响。通过在菌体高密度的条件下以速率为 2g/h 流加前体 L-蛋氨酸 5h,SAM 的积累量可达到 4.98g/L。进一步证实了高密度发酵平台技术的通用性,并为 SAM 工业化奠定了一定的基础。

1 材料和方法

1.1 菌株

酿酒酵母 SAM-04-G14 由本实验室保藏。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基:麦芽汁 10g/L、酵母粉 3g/L、蛋白胨 5g/L、葡萄糖 10g/L、琼脂 20g/L。

1.2.2 种子培养基:葡萄糖 30g/L、酵母粉 6g/L、磷酸氢二铵 3g/L、硫酸镁 0.8g/L、磷酸氢二钾 1g/L、磷酸二氢钾 1g/L。

1.2.3 发酵培养基:葡萄糖 50g/L、酵母粉 15g/L、麦芽汁 60g/L、磷酸氢二铵 10g/L、硫酸镁 5g/L、玉米浆 16g/L、磷酸氢二钾 1g/L、磷酸二氢钾 1g/L、 Zn^{2+} 10 mg/L、 Fe^{2+} 10mg/L、 Cu^{2+} 6mg/L 和 Mn^{2+} 6mg/L。

1.3 分析方法

1.3.1 细胞干重(Dry Cell Weight)DCW 的测量方法:取一定体积的发酵液经 4000r/min 离心 10min 后收集菌体,用去离子水洗 2 次后 105℃ 下烘 2h 后称重,计算出细胞的质量浓度。

1.3.2 葡萄糖浓度的测定:用酶膜法(生物传感分析仪 SBA-40C,山东省农科院)。

1.3.3 SAM 含量的测定:发酵液离心(4000r/min) 10min,收集菌体,蒸馏水洗后用 1.5mol/L 的高氯酸室温破碎 1.5h。离心(4000r/min) 10min 收集上清液,适当稀释后采用高效液相色谱法定量分析。HPLC 条件:Agilent C_{18} 柱(250nm × 4.6mm);流动相:0.01mol/L 的甲酸铵,用甲酸将 pH 值调至 3.0;流速 1.0mL/min;检测波长:256nm;柱温:25℃;进样量 5 μ L。标准品(购自 SIGMA 公司)峰面积与浓度关系作出标准曲线,样品在 256nm 的峰面积代入标准曲线换算得到 SAM 的含量。

1.4 发酵罐培养

全自动发酵罐 5L(上海保兴)中装液量 2 L,接种量 10%(体积分数),前 2h 搅拌转速为 200r/min,之后按每小时提高 100r/min 逐步提高到 6h 的 600 r/min,以后一直维持在 600r/min,通气量为 2 L/min,温度控制在 30℃,pH 值采用氨水控制在 5 左右,外接乙醇在线测定仪(华东理工大学,上海)。当底糖浓度低于 1g/L 时开始流加葡萄糖。底糖消耗完后

通过控制流加葡萄糖的速率,维持乙醇含量逐步下降,葡萄糖积累量不高于 1g/L 来达到高密度发酵^[13]。实验结果由 3 次的平均值得到。

2 结果

2.1 不补加前体 L-蛋氨酸的发酵

不补加前体 L-蛋氨酸考察 SAM 的积累,通过维持乙醇的低积累率^[12]来达到高密度发酵。实验结果见图 1。

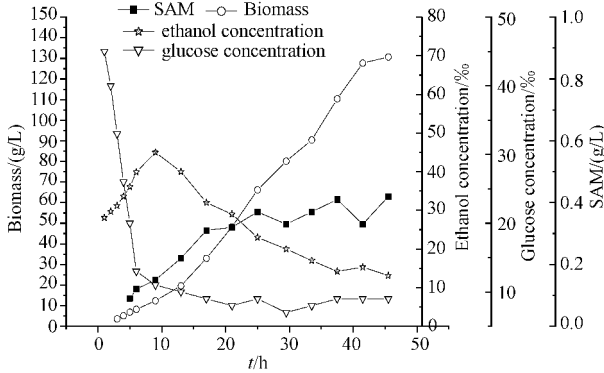


图 1 无前体 L-蛋氨酸高密度发酵生产 SAM

Fig. 1 High cell density fermentation for SAM production without L-methionine

在没有前体 L-蛋氨酸的条件下, SAM 的积累量很低,最高为 0.42g/L。生物量可以达到很高,发酵结束时为 130.3g/L。

2.2 前体补加量对 SAM 积累量的影响

在摇瓶培养 24h 后,对于每 10g 干重菌体的发酵液分别加入 0.1~1.5g L-蛋氨酸,转化 24h 后测量 SAM 积累量,见图 2。

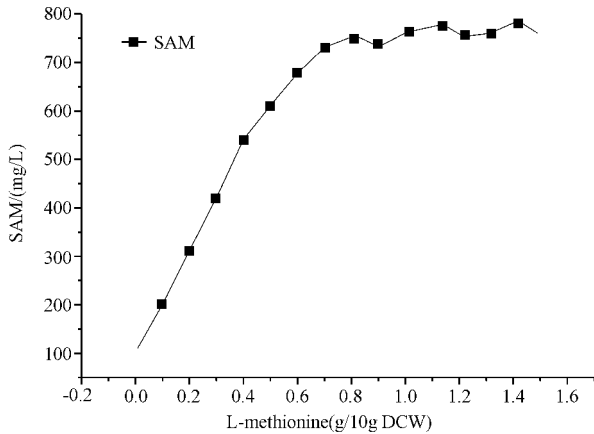


图 2 补加前体的量对 SAM 积累的影响

Fig. 2 Effect of L- methionine concentration on SAM production

从图 2 可以看到,不同补加量对 SAM 积累的影响

在补加 L-蛋氨酸的量达到 0.7g/10g 菌体干重时, SAM 积累量基本不变。考虑到高密度发酵干重达到 130g/L。所以补加 L-蛋氨酸总量量不应低于 9g。

2.3 前体补加时间对生物量, SAM 积累量和 SAM 含量的影响

摇瓶考察 0~30h 内不同时间补加前体 L-蛋氨酸(0.7g/10g 菌体干重)对 SAM 积累量的影响。结果见图 3。

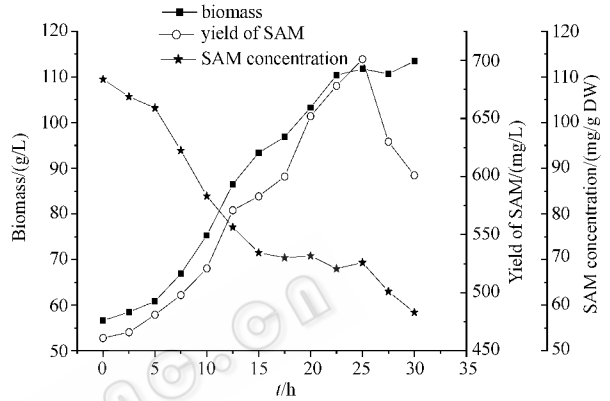


图 3 不同时间补加前体 L-蛋氨酸对生物量, SAM 积累量和含量的影响

Fig. 3 Effect of the addition time of L-methionine on biomass, SAM yield and SAM concentration

由图 3 可以得到:生物量随着补加时间的后移而明显增加,这是由于 L-蛋氨酸影响细胞生长和增殖所造成的。而 SAM 积累量随着补加时间的后移先呈明显增加趋势,在 25h 时补加 L-蛋氨酸 SAM 积累量达到最高,25h 后有明显的下降趋势,原因可能是 SAM 合成酶总量随细胞数量增加而增加,而后期酶活下降。SAM 含量随补加时间后移呈下降趋势。

由图 3 的信息,提出下面 5 种在发酵罐上的补加策略 (1)在培养基中加入 L-蛋氨酸 (2)在发酵前期(底糖耗尽后)流加 L-蛋氨酸 (3)在菌体达到高密度时一次性补加(0.7g/10g 干菌体) (4)在菌体密度达到比较高水平(60g/L)时进行流加 (5)在高密度菌体条件下进行流加。

2.4 在培养基中加入 L-蛋氨酸

在培养基中加入 5g L-蛋氨酸。至 50h 发酵结束。图 4 表示了培养基中加入 L-蛋氨酸后的实验结果。

由图 4 可以看到 SAM 的积累量是逐渐升高又缓慢下降的,原因可能是生物量的增加与 SAM 的积累都是耗能过程,所以当菌体生长能量不足时会分解 SAM,而释放其中的能量。最高产量达到

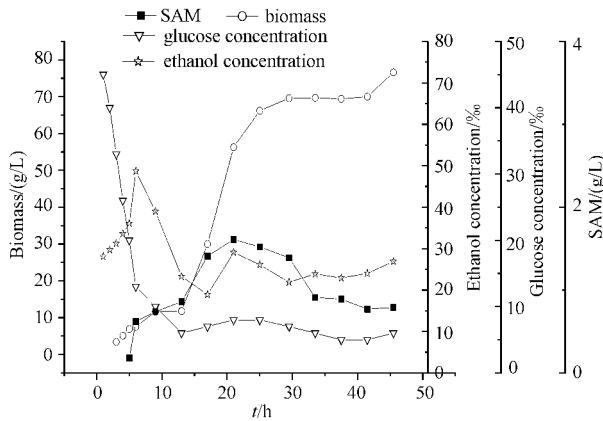


图4 培养基中加入 L-蛋氨酸

Fig. 4 Fermentation with L-methionine in cultural media

g/L, 此时生物量为 58g/L。生物量仅有不补加 L-蛋氨酸实验的 44.6%, 可见蛋氨酸对于菌体生长有很大的抑止作用。

2.5 在发酵初期(底糖耗尽时)流加 L-蛋氨酸

由图 3 可以看到, 发酵初期补加 L-蛋氨酸, SAM 含量较后期高 40% 左右。考虑到 L-蛋氨酸对菌体生长的抑止, 选择发酵初期流加低浓度的 L-蛋氨酸。在底糖低于 1g/L 时, 以 0.1g/h 流加 L-蛋氨酸至发酵结束, 实验结果见图 5 所示。

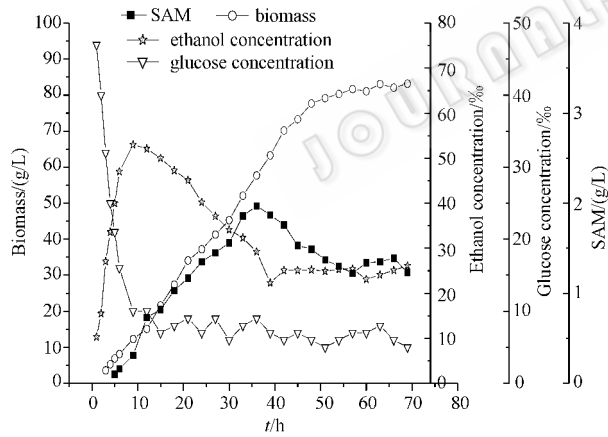


图5 在发酵初期流加 L-蛋氨酸

Fig. 5 L-methionine was fed at a rate of 0.1g/h in the initial period of fermentation

从图 5 看到, 发酵 36h 后, SAM 最高产量达到 1.97g/L, 此时生物量为 57.7g/L, 与图 1 相比, 生长滞后 12h。最终生物量比不补加 L-蛋氨酸的实验低 38.1%。SAM 积累量达到最高后也有比较明显的分解趋势。

2.6 在菌体达到高密度时一次性补加前体 L-蛋氨酸

在菌体密度达到 120g/L 时, 按每 10g 菌体补加

0.7g L-蛋氨酸计, 一次性补加 9g L-蛋氨酸。实验结果如图 6 所示。

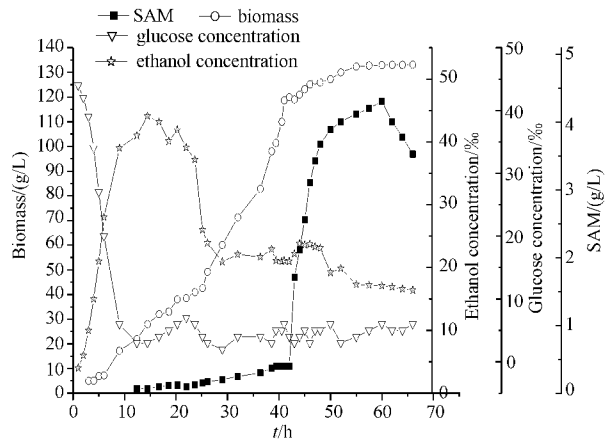


图6 高密度条件下一次性补加 L-蛋氨酸

Fig. 6 L-methionine added once for all under the condition of high cell density

在补加前体 L-蛋氨酸前, SAM 积累量增长很缓慢, 当生物量达到 120g 干菌体时, SAM 积累量仅有 0.4g/L。加入前体 L-蛋氨酸后, SAM 积累量迅速增长, 补加 L-蛋氨酸 18h 后, SAM 积累量达到最高点 4.31g/L, 生物量最终达到 130g/L。达到最高点后有明显下降的趋势, 原因可能是菌体达到生长极限, SAM 合成酶数量不再增加, 而 SAM 转甲基酶开始起主导作用^[3, 14]。

2.7 在菌体密度达到比较高水平(60g/L)时进行流加

菌体密度达到 60g/L 时流加 L-蛋氨酸, 速率为 0.7g/h。流加直至发酵结束, 维持过量的 L-蛋氨酸以防止 SAM 的分解。发酵结果如图 7 所示。

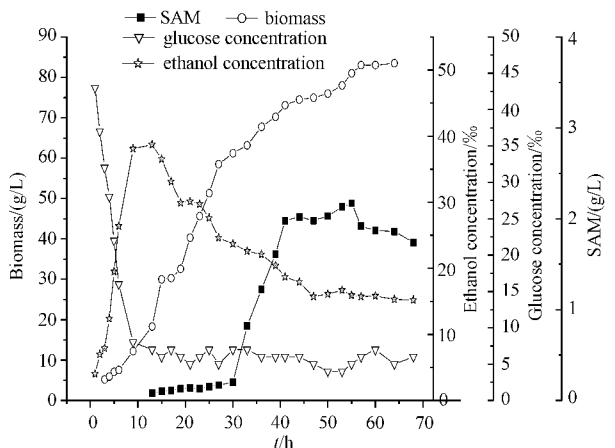


图7 在菌体密度达到比较高水平(60g/L)时进行流加

Fig. 7 L-methionine was fed at a rate of 0.7g/h when the cell density reached 60g/L

在菌体密度达到比较高水平(60g/L)时进行流加 SAM 最高积累量达到 2.13g/L,生物量达到 83 g/L。可以看到,当 L-蛋氨酸流加后的 30h 到 60h, SAM 积累量很快提升至 2.13g/L,生物量增长很缓慢,从 62g/L 提升至 81g/L,蛋氨酸对细胞增殖的限制作用也比较明显。

2.8 在高密度条件下进行流加

当菌体密度达到 120g/L,流加 L-蛋氨酸,速率为 2g/h,流加 5h。发酵结果如图 8 所示。

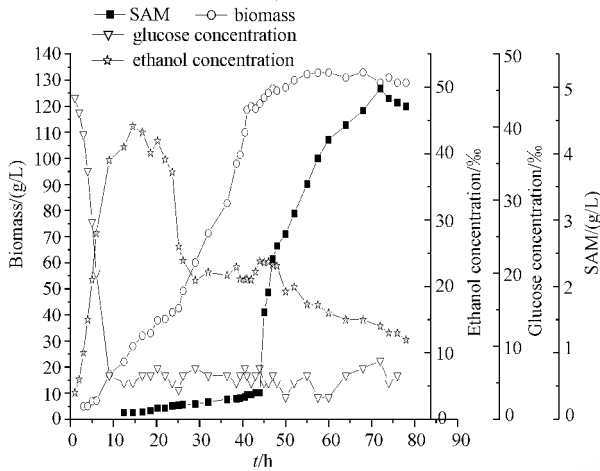


图 8 高密度条件下流加 L-蛋氨酸的发酵结果

Fig. 8 L-methionine was fed at a rate of 2g/h in 5 hours under the condition of high cell density

补加前体时已经达到很高的菌体密度(120 g/L),L-蛋氨酸加入后 SAM 快速积累,在开始流加后的 28h 后达到最高值。在流加后,菌体基本停止生长,最终生物量为 132g/L, SAM 积累量达到 4.98g/L。达到最高点后,分解趋势比较缓慢。

3 结论

在发酵法生产 SAM 的过程中,L-蛋氨酸是必需的前体,其补加量对 SAM 的产量、含量以及生物量都有很大的影响。本文首先确定了补加 L-蛋氨酸的量不应低于 0.7g/10g 菌体干重。然后对五种补加策略的比较发现 L-蛋氨酸在菌体达到高密度以后再加入发酵体系,进行转化生产 SAM,可以避免 L-蛋氨酸对菌体生长的抑止。在菌体达到高密度条件下一次性补加蛋氨酸效果比较好, SAM 积累量达到 4.31g/L,菌体干重达到 130g/L。在高密度条件下流加效果最为明显, SAM 最高积累量为 4.98g/L,生物量 132g/L。比较图 6 和图 8,可以发现,同样是高密度发酵,一次性补加前体 L-蛋氨酸 SAM 积累量增高很迅速,在补加 18h 后即达到最高点,达到最高点后

分解趋势很明显。而流加前体 L-蛋氨酸, SAM 积累量增高缓慢,在流加结束后 28h 达到最高点,达到最高点后分解也比较缓慢,原因可能是采用流加方式, SAM 积累比较慢,细胞对 SAM 有比较好的适应能力。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Schlenk F, Zydek CR, Ehninger DJ *et al.* The production of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-ethionine by yeast. *Enzymologia*, 1965 **29**: 283
- [2] Shiomi N, Fukuda H, Murata K *et al.* Improvement of S-adenosylmethionine production by integration of the ethionine-resistance gene into chromosomes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995 **42**: 730 - 733
- [3] Lu SC. Review article: S-Adenosylmethionine. *Inter J Biochem cell Bio*, 2000 **32**: 391 - 395
- [4] Charles SL. Role of S-adenosyl-L-methionine in the treatment of liver diseases. *J Hepatology*, 1999 **30**(6): 1155 - 1159
- [5] Gobbi J, Janiri L, Cianconi P *et al.* Antidepressant activity of S-adenosyl-L-methionine (SAMe): Effects on neural responses to excitatory amino acids. *Biological Psychiatry*, 1997 **42**(1): 68
- [6] Schlenk F, Zydek CR, Ehninger DJ *et al.* The production of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-ethionine by yeast. *Enzymologia*, 1965 **29**: 283
- [7] Shiozaki S, Shimizu S, Yamada H. S-Adenosyl-L-methionine production by *Saccharomyces sake*: optimization of the culture conditions for the production of cells with high S-Adenosyl-L-methionine content. *Agricultural Biological Chemistry*, 1989, **53**: 3269 - 3274
- [8] Marthews RG, Neidhardt FC. Abnormal induction of heat shock proteins in an *Escherichia coli* mutant deficient in Adenosylmethionine synthetase activity. *J Bacteriol*, 1988, **170**(4): 1582 - 1588
- [9] Liu H, Lin JP, Cen PL *et al.* Co-production of S-adenosyl-L-methionine and glutathione from spent brewer's yeast cells. *Process Biochemistry*, 2004, **39**(12): 1993 - 1997
- [10] Wang YS(王远山), Chen XI(陈小龙), Hu ZC(胡中策) *et al.* Screening and cultivation of SAM producing microorganism strain. Proceedings of the Tenth National Conference on Biochemical Engineering (第十届全国生物化学学术会议论文集), 2002, pp. 174 - 176
- [11] Chen XI(陈小龙), Wang YS(王远山), Zhen YG(郑裕国) *et al.* Optimization of fermentation conditions and cultural media for S-Adenosylmethionine production. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志) 2004, **11**(24): 65 - 69
- [12] Li DY(李东阳), Yu X(于健), Tian I(田露) *et al.* S-adenosyl-L-methionine high production strain recombinant SAM synthetase *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2002, **18**(3): 295 - 299
- [13] Wang X(王峥), Tan TW(谭天伟), Wen SH(温少红). Ethanol controlling method in fermentation of glutathione(GSH). *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*(生物加工过程) 2004, **2**(2): 64 - 67
- [14] Martinov Michael V, Vitvitsky *et al.* A substrate switch: A new mode of regulation in the methionine metabolic pathway. *J*