

假丝酵母 YQ5 产 S-腺苷甲硫氨酸的 发酵培养基优化

葛方兰 叶 盛 陈贵英 李 维* 吴 珂 杜良俊

(四川师范大学生命科学学院 四川 成都 610068)

摘 要:利用单因子实验和正交实验对假丝酵母(*Candida* sp.)突变菌株 YQ5 摇瓶发酵产生 S-腺苷甲硫氨酸的培养基成分进行了优化。单因子实验结果表明,发酵最适 pH 值为 6.0,最佳碳源为 8%蔗糖,最佳氮源为 1.5%胰蛋白胨,酵母粉最适浓度为 2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CoCl_2 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 H_3BO_3 等作为无机离子对胞内 S-腺苷甲硫氨酸的积累均有促进作用。利用正交实验获得了最终的发酵培养基配方。在最适条件下发酵 48 h, S-腺苷甲硫氨酸含量可达 1740.0 mg/L。

关键词: 假丝酵母, S-腺苷甲硫氨酸, 发酵培养基

Optimization of Fermentation Medium for S-adenosylmethionine Production by *Candida* sp. YQ5

GE Fang-Lan YE Sheng CHEN Gui-Ying LI Wei* WU Ke DU Liang-Jun

(College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu, Sichuan 610068, China)

Abstract: The optimized cultural medium of fermentation for *Candida* sp. mutant strain YQ5 to produce S-adenosylmethionine was studied. The results of single factor experiment showed that the most favorable pH value, carbon source, nitrogen source organic nutrient is 6.0, 8% sucrose, 1.5% tryptone and 2% yeast extract, respectively. As to inorganic salts, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 could improve accumulation of the intercellular SAM. The ingredients of the culture medium are also optimized by the orthogonal experiment. Fermentation for 48 h under the optimal condition resulted in AdoMet production at 1740.0 mg/L.

Keywords: *Candida* sp., S-Adenosylmethionine, Fermentation medium

S-腺苷甲硫氨酸(S-Adenosylmethionine, SAM)是一种广泛存在于生物体内的重要生理活性物质,作为甲基供体, SAM参与了核酸、蛋白质、磷脂、多糖、多胺等的合成。这些甲基化反应能为细胞膜提供磷脂,调节或维持某些酶活性,维持高激素和神经递质的水平等^[1,2]。在临床上, SAM作为处方药物

用于治疗抑郁症、关节炎、肝功能紊乱等多种疾病^[3]。在保健和化妆品行业也有很大的应用前景。

近年来,国内外有不少研究者开展了 SAM 的发酵研究。董函竹等对诱变选育的酿酒酵母产生 SAM 的摇瓶发酵条件进行了优化,其 SAM 产量可达 0.9 g/L^[4]。陈小龙等人对土壤中筛选到的酵母菌

Q95 培养条件进行了优化,使 SAM 产量提高到 1.946 g/L^[5]。目前,SAM 价格昂贵,国内尚未实现 SAM 规模化生产,而用于积累产生 SAM 的菌株多局限于酿酒酵母,而使用其它微生物种类报道较少,尚无假丝酵母发酵产生 S-腺苷甲硫氨酸的研究报道,开展利用不同来源微生物有效生产 SAM 的研究是十分必要的。本研究小组从自然界分离得到的 572 株酵母菌中,筛选得到 1 株 SAM 高产菌,经分类鉴定为假丝酵母菌(*Candida* sp.),利用辐射诱变技术获得诱变菌株 YQ5,其 SAM 产量得到显著提高^[7]。本文报道菌株 YQ5 发酵条件优化的结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源:假丝酵母(*Candida* sp.)突变菌株 YQ5 为本实验室保存^[7]。

1.1.2 高效液相色谱仪:日本岛津 LC-6A 系列。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法:从 YPD 斜面上刮取一环突变株 YQ5 接种于 YPD 培养基中,活化 24 h 后,以 5% 的接种量转种于优化培养基中,于 30°C 下,200 r/min 振荡培养。

1.2.2 S-腺苷甲硫氨酸的测定:取 1 mL 发酵液离心,无菌水洗涤,用 1 mL 无菌水悬浮菌体,加入 2 mL 1.5 mol/L 高氯酸混匀,然后于室温下静置 1 h。4°C、4000 r/min 离心,上清液转管并加入 2 mL 1.25 mol/L NH_4OH 溶液。离心,上清液备用。取 20 μL 上清液上柱(C_{18} 柱)。色谱条件是:洗脱液为 0.01 mol/L 甲酸铵-甲酸缓冲溶液, pH 3.0;洗脱液流速为 1 mL/min。

1.2.3 菌体生物量的测定:取 5 mL 发酵液离心 5 min,菌体经无菌水洗涤后,于 85°C 烘干后称重。

2 结果与讨论

2.1 碳源对生物量和 SAM 产量的影响

考察了 6 种不同碳源对菌体生长和 SAM 产量的影响,碳源添加量均为 5%。碳源优化的基本培养基为(g/L):酵母粉 3,尿素 3, KH_2PO_4 1, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, L-甲硫氨酸 1.5, pH 6.0。结果如图 1 所示,可溶性淀粉对菌体生长最为有利,其次为葡萄糖;对胞内 SAM 积累最为有利的是麦芽糖,其次是蔗糖。由于麦芽糖价格高出蔗糖许多,而它们对 SAM 积累量的影响相差不大,因

此,选择蔗糖为碳源进行氮源优化。

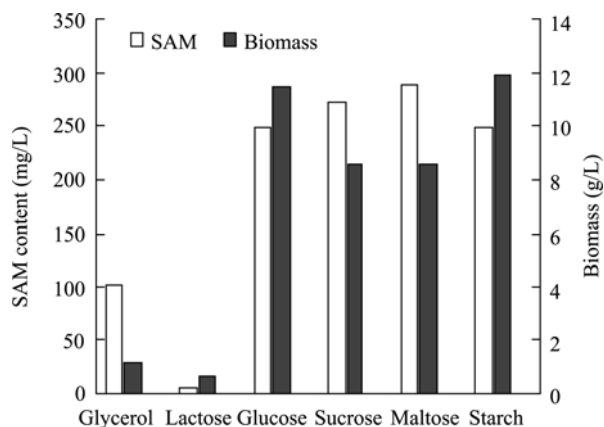


图 1 不同碳源对胞内 S-腺苷甲硫氨酸积累和菌体生长的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources on the intracellular accumulation of SAM and the growth of cell

2.2 氮源对生物量和 SAM 产量的影响

考察了 5 种不同氮源对生物量和 SAM 产量的影响,氮源添加量均为 1%。以 5% 的蔗糖为碳源进行氮源的优化。基本培养基为(g/L):酵母粉 3,蔗糖 50, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, L-甲硫氨酸 1.5, pH 6.0。结果如图 2 所示,以尿素作氮源时,菌体的生物量达到最高,但 SAM 的胞内积累量却最低;4 种无机氮源中, NH_4NO_3 对 SAM 的积累最为有利,但不利于细胞的生长;胰蛋白胍对 SAM 的胞内积累和细胞的生长都是十分有利的。因此, NH_4NO_3 和胰蛋白胍分别被选作以后正交实验的无机氮源和有机氮源。

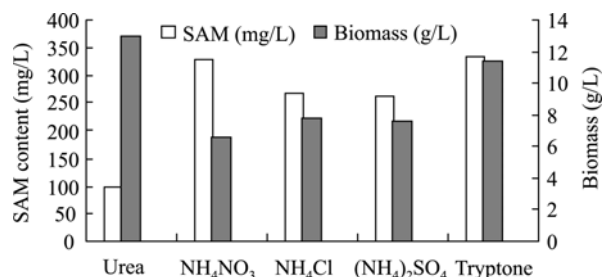


图 2 不同氮源对胞内 S-腺苷甲硫氨酸积累和菌体生长的影响

Fig. 2 Effect of different nitrogen sources on the intracellular accumulation of SAM and the growth of cell

2.3 无机离子的优化

2.3.1 无机离子对胞内 SAM 积累的影响:由于胰蛋白胍成份十分复杂,对无机离子的考察可能造成一定干扰,因此以 NH_4NO_3 为唯一氮源,基本培养

基成份为(g/L): 酵母粉 3, 蔗糖 50, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1, KH_2PO_4 1, NH_4NO_3 10, L-甲硫氨酸 1.5, pH 6.0。在基本培养基中以 0.01%的量分别加入 11 种不同的无机离子。结果如图 3 所示, 与空白对照比较, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CaCl_2$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CoCl_2$ 、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 和 H_3BO_3 等 6 种化合物对胞内SAM的积累有明显的促进作用。 H_3BO_3 的效果最为明显, 其次是 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 。

2.3.2 正交实验: 为了确定每一种无机离子的最适浓度及配比, 对上述 6 种化合物进行 $L_{18}(3^7)$ 正交实验。正交的因素水平表和正交的结果及其分析表分别如表 1 和表 2 所示。

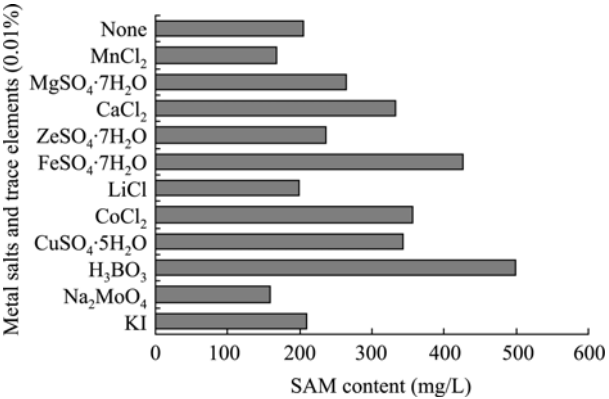


图 3 不同无机离子对胞内 S-腺苷甲硫氨酸积累的影响
Fig. 3 Effect of metal salts and trace elements on the intracellular accumulation of SAM

表 1 $L_{18}(3^7)$ 的因素水平表 Table 1 The factor-level table of $L_{18}(3^7)$						
Factor Level	A $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	B $CaCl_2$	C $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	D $CoCl_2$	E $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	F H_3BO_3
1	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%
2	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%
3	0.03%	0.03%	0.03%	0.03%	0.03%	0.03%

Table 2 Orthogonal design experiments for the effects of metal salts and trace elements							
Sample number	A	B	C	D	E	F	SAM content (mg/L)
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	CaCl ₂	FeSO ₄ ·7H ₂ O	CoCl ₂	CuSO ₄ ·5H ₂ O	H ₃ BO ₃	
1	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	471.8
2	0.01%	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	342.6
3	0.01%	0.03%	0.03%	0.03%	0.03%	0.03%	324.2
4	0.02%	0.01%	0.01%	0.02%	0.02%	0.03%	642.4
5	0.02%	0.02%	0.02%	0.03%	0.03%	0.01%	421.0
6	0.02%	0.03%	0.03%	0.01%	0.01%	0.02%	411.8
7	0.03%	0.01%	0.02%	0.01%	0.03%	0.02%	434.9
8	0.03%	0.02%	0.03%	0.02%	0.01%	0.03%	610.1
9	0.03%	0.03%	0.01%	0.03%	0.02%	0.01%	374.9
10	0.01%	0.01%	0.03%	0.03%	0.02%	0.02%	559.4
11	0.01%	0.02%	0.01%	0.01%	0.03%	0.03%	670.1
12	0.01%	0.03%	0.02%	0.02%	0.01%	0.01%	508.7
13	0.02%	0.01%	0.02%	0.03%	0.01%	0.03%	517.9
14	0.02%	0.02%	0.03%	0.01%	0.02%	0.01%	476.4
15	0.02%	0.03%	0.01%	0.02%	0.03%	0.02%	494.9
16	0.03%	0.01%	0.03%	0.02%	0.03%	0.01%	462.5
17	0.03%	0.02%	0.01%	0.03%	0.01%	0.02%	564.0
18	0.03%	0.03%	0.02%	0.01%	0.02%	0.03%	614.8
K1	2876.8	3088.9	3218.1	3079.8	3084.3	2715.3	T=8902.4
K2	2964.4	3084.2	2839.9	3061.2	3010.5	2936.8	
K3	3061.2	2729.3	2844.4	2761.4	2807.6	3379.5	
k1	479.5	514.8	536.4	513.3	514.1	452.6	
k2	494.1	514.0	473.3	510.2	501.8	489.5	
k3	510.2	454.9	474.1	460.2	467.9	563.3	
R	-30.7	59.9	63.1	53.1	46.2	-110.7	

由表 2 的极差分析可知, 几个因素对胞内SAM 积累的影响依次是: $F > C > B > D > E > A$, 该结果与单因子实验的结果($F > C > D > E > B > A$)略有不同, 这可能是由于各化合物相互影响的结果。因而, 各无机离子的最佳组合方案为 $A_3B_1C_1D_1E_1F_3$ 。

2.4 正交实验优化培养基主要组成成份

综合上述实验结果, 确定正交试验基本培养基成份为(g/L): KH_2PO_4 1, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3, $CaCl_2$ 0.1, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, $CoCl_2$ 0.1, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.1, H_3BO_3 0.3, L-甲硫氨酸 1.5, pH 6.0, 选取影响

SAM积累和细胞生长的主要因素: 作为碳源的蔗糖、作为无机氮源的 NH_4NO_3 、作为有机氮源的胰蛋白胨、作为有机营养物的酵母粉、培养时间, 进行 $L_{16}(4^5)$ 正交实验。正交的因素水平表和正交的结果及其分析表分别如表 3 和表 4 所示。

由表 4 的极差分析可知, 几个因素对胞内SAM 积累的影响依次是: $A > D > B > E > C$, 最佳组合方案为 $A_1B_2C_3D_3E_2$ 。 NH_4NO_3 对胞内SAM积累的影响最小, 且在氮源优化部分中发现, NH_4NO_3 对菌体的生长有一定的抑制作用, 因此有必要对其作进一步

表 3 $L_{16}(4^5)$ 的因素水平表
Table 3 The factor-level table of $L_{16}(4^5)$

Level	Factor	A	B	C	D	E
		Sucrose	Tryptone	NH_4NO_3	Yeast extract	Incubation time
1		8%	1%	0.5%	1%	24 h
2		10%	1.5%	1%	1.5%	48 h
3		12%	2%	1.5%	2%	72 h
4		15%	2.5%	2%	3%	96 h

表 4 不同化合物及培养时间的正交实验的结果及其分析
Table 4 Orthogonal design experiments for the effects of various compounds and cultivation time

Sample number	A	B	C	D	E	SAM content (mg/L)
	Sucrose	Tryptone	NH_4NO_3	Yeast extract	Incubation time(h)	
1	8%	1%	0.5%	1%	24	1029.8
2	8%	1.5%	1%	1.5%	48	1417.1
3	8%	2%	1.5%	2%	72	1241.9
4	8%	2.5%	2%	3%	96	1338.7
5	10%	1%	1%	2%	96	1163.5
6	10%	1.5%	0.5%	3%	72	1297.2
7	10%	2%	2%	1%	48	951.4
8	10%	2.5%	1.5%	1.5%	24	743.9
9	12%	1%	1.5%	3%	48	877.6
10	12%	1.5%	2%	2%	24	1255.7
11	12%	2%	0.5%	1.5%	96	19.8
12	12%	2.5%	1%	1%	72	167.4
13	15%	1%	2%	1.5%	72	121.3
14	15%	1.5%	1.5%	1%	96	826.9
15	15%	2%	1%	3%	24	877.6
16	15%	2.5%	0.5%	2%	48	1126.6
K1	5027.5	3192.2	3473.4	2975.5	3907.0	T=14456.4
K2	4156.0	4796.9	3625.6	2302.1	4372.7	
K3	2320.5	3090.7	3690.3	4787.7	2827.8	
K4	2952.4	3376.6	3667.1	4391.1	3348.9	
k1	1256.9	798.1	868.4	743.9	976.8	
k2	1039.0	1199.2	906.4	575.5	1093.2	
k3	580.1	772.7	922.6	1196.9	707.0	
k4	738.1	844.2	916.8	1097.8	837.2	
R	676.8	426.6	-38.1	-621.4	386.2	

考察。将 $A_1B_2D_3E_2$ 同 $A_1B_2C_3D_3E_2$ 比较发现: $A_1B_2D_3E_2$ 产量为 1426.2 mg/L, 高于正交表中的最高实验号 2; $A_1B_2C_3D_3E_2$ 产量为 1177.3 mg/L。说明 $A_1B_2D_3E_2$ 才是最佳组合。酵母粉的最佳浓度为 2%, 而当浓度为 3% 时, SAM 的产量将会降低。说明提高酵母粉浓度虽然有利于菌体的生长, 但对于胞内 SAM 的积累来说, 其浓度不宜太高^[6]。

2.5 L-甲硫氨酸浓度的确定

L-甲硫氨酸是 SAM 胞内合成的前体物质, 在培养基中添加 L-甲硫氨酸将会对胞内 SAM 的积累有促进作用, 但高浓度的 L-甲硫氨酸将会抑制菌体的生长^[8,9]。为了考察 L-甲硫氨酸对 YQ5 细胞生长和 SAM 积累的影响, 利用基本培养基成份为(g/L): KH_2PO_4 1, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3, $CaCl_2$ 0.1, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, $CoCl_2$ 0.1, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.1, H_3BO_3 0.3, 酵母粉 20, 蔗糖 80, 胰蛋白胍 15, pH 6.0, 分别添加 0.15%、0.75%、1.5% L-甲硫氨酸, 其实验结果如图 4 所示, 当 L-甲硫氨酸浓度为 0.75% 时, 胞内 SAM 含量是 1740.0 mg/L, 为 L-甲硫氨酸所有浓度中的最高值。菌体的生物量随着 L-甲硫氨酸浓度的升高逐步降低。说明 L-甲硫氨酸的最佳浓度为 0.75%。

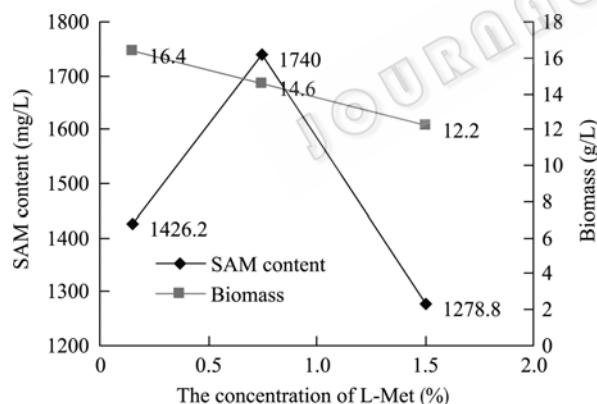


图 4 L-甲硫氨酸对胞内 S-腺苷甲硫氨酸积累和菌体生长的影响

Fig. 4 Effect of L-methionine on the intracellular accumulation of SAM and the growth of cell

3 结论

1) 本研究利用摇瓶发酵考察了碳源、氮源、无

机离子和微量元素、酵母粉等对胞内 SAM 积累的影响。单因子实验表明, 最佳碳源和氮源分别是蔗糖和胰蛋白胍。正交优化的最佳组合为: 2% 酵母粉, 8% 蔗糖, 1.5% 胰蛋白胍, 培养 48 h。

2) 假丝酵母菌(*Candida* sp.)突变株 YQ5 摇瓶发酵培养基的最佳成份为: 0.1% KH_2PO_4 , 0.1% $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01% $CaCl_2$, 0.01% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01% $CoCl_2$, 0.01% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.03% H_3BO_3 , 2% 酵母粉, 8% 蔗糖, 1.5% 胰蛋白胍, 0.75% L-甲硫氨酸。最适起始 pH 值为 6.0, 最佳发酵时间为 48 h。

参考文献

- [1] Shelly C Lu. S-adenosylmethionine. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, **32**: 391–395.
- [2] Bottiglieri T, Hyland K. S-adenosylmethionine levels in psychiatric and neurological disorders: a review. *Acta Neurol Scand Suppl*, 1994, **154**: 19–26.
- [3] 罗赞星, 赵辅昆, 罗贵民, 等. S-腺苷甲硫氨酸的细胞生物化学功能及其开发应用研究. *工业微生物*, 2006, **36**(1): 54–59.
- [4] 董函竹, 刘沛溢, 谭天伟. 发酵生产 S-腺苷-L-蛋氨酸培养条件的优化研究. *微生物学通报*, 2006, **33**(1): 110–113.
- [5] 陈小龙, 王远山, 郑裕国, 等. 腺苷蛋氨酸发酵条件及发酵培养基的优化. *中国生物工程杂志*, 2004, **24**(11): 65–69.
- [6] Holcomb ER, Shapiro SK. Assay and regulation of S-adenosylmethionine synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. *J Bacteriol*, 1975, **121**: 267–271.
- [7] Li W, Sheng Ye, Fanglan G, *et al*. Isolation and characterisation of *Candida* sp. mutants enriched in S-adenosylmethionine (SAM). *Annals of Microbiology*, 2007, **57**(3): 383–388.
- [8] Takahashi T, Fujii Y, Takahashi H. Inhibition of yeast growth by methionine. Part I. Nature of the inhibition. *Agric Biol Chem*, 1967, **31**: 73–76.
- [9] Takahashi T, Takahashi H. Inhibition of yeast growth by methionine. Part III. Methionine as an inhibitor of conversion from fermentative to respiratory processes. *Agric Biol Chem*, 1968, **32**: 1448–1452.