

## 研究报告

# 发酵法生产 S-腺苷蛋氨酸前体蛋氨酸补加策略

王杰鹏, 谭天伟

北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

**摘要:** 利用酿酒酵母菌株高密度发酵法生产 S-腺苷蛋氨酸关键的影响因素之一是前体 L-蛋氨酸的补加策略。本研究采用一支经过常规诱变处理的 S-腺苷蛋氨酸优势积累菌株酿酒酵母 SAM0801, 通过 5 L 发酵罐高密度发酵实验研究, 考察了 6 种补加策略, 最终确定了 L-蛋氨酸的加入时机为 30 h 左右, 当菌体干重达到 100 g/L 时, 补加量为每罐 40 g L-蛋氨酸, 发酵 58 h 左右达到最高生物量干重 168 g/L, 产量 14.48 g/L。

**关键词:** S-腺苷蛋氨酸, 酿酒酵母, 高密度发酵, L-蛋氨酸

## Pre-L-methionine Feeding Strategy for S-adenosyl-L-methionine Fermentative Production

Jiepeng Wang, and Tianwei Tan

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

**Abstract:** The yield of S-adenosyl-L-methionine (SAM) on high-cell-density fermentation by *saccharomyces cerevisiae* is mostly affected by the feeding strategy of pre-L-methionine. The mutant strain SAM0801 that could accumulate more SAM was used in this study. Six high-cell-density fermentation experiments in 5 L fermentor were investigated to get the optimal feeding time and amount of L-methionine. The results showed that when 40 g L-methionine was added in the fermentor after 30 h fermentation, a dry cell weight of 100 g/L was achieved. Under this condition, after 58 h fermentation, both the dry cell weight and the yield of SAM reached the maximum, 168 g/L and 14.48 g/L respectively.

**Keywords:** S-adenosyl-L-methionine, *Saccharomyces cerevisiae*, high-cell-density fermentation, L-methionine

S-腺苷蛋氨酸<sup>[1]</sup>(SAM)是生物体内重要的代谢中间物质, 作为基团供体参与多种生化反应, 临床上用于肝病<sup>[2]</sup>和抑郁症<sup>[2]</sup>等疾病的治疗。Shiozaki<sup>[3]</sup>于 1986 年率先报道了利用酿酒酵母在 10 L 发酵罐中发酵培养 7 d SAM 产量达到 10.8 g/L, 此后很长

时间内均没有文献将其超越。近年来, 国内研究机构在 SAM 发酵工艺上取得了重大突破:何俊云等<sup>[4]</sup>报道了其利用重组毕赤酵母在 5 L 发酵罐中发酵 114 h SAM 产量达到 13.5 g/L(未给出前体的浓度和利用率); 胡晓清<sup>[5]</sup>等报道了利用重组毕赤酵母在 15 L

**Received:** March 11, 2008; **Accepted:** April 25, 2008

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (No. 20576013), the HiTech Research and Development Program ("863"Program) of China (Nos. 2006AA020102, 2006AA020103 and 2006AA020201), the State Key Development Program for Basic Research ("973"Program) of China (Nos. 2007CB707804, 2007CB714304), the Natural Science Foundation of Beijing, China (No. 2071002), the Science and Technology Program of Beijing, China (No. D0205004040211).

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

国家自然科学基金项目(No. 20576013), 国家高技术研究发展计划(863)项目(Nos. 2006AA020102, 2006AA020103 and 2006AA020201), 国家重点基础研究发展计划(973)项目(Nos. 2007CB707804, 2007CB714304), 北京市自然科学基金(No. 2071002), 北京市科技计划项目(No. D0205004040211)资助。

发酵罐中发酵 119 h 时 SAM 产量达到 13.24 g/L (前体浓度为 15 g/L, 转化率 32.97%); 朱闪<sup>[6]</sup>, 邓娟娟等<sup>[7]</sup>也在其各自的文章中给与了相关报道。

本研究考察了在 5 L 发酵罐中分批添加前体量由 10 g/罐提高到 50 g/罐时, S-腺苷蛋氨酸的积累量由 5.85 g/L 提高到 14.12 g/L, 然而发酵时间仅仅需要 67 h。通过进一步采用流加方式补加前体, 流加 40 g 前体发酵 58 h 产量达到 14.48 g/L(前体浓度约 17 g/L, 转化率约 32%)。本研究的发酵工艺水平与最新文献接近, 然而发酵时间远远短于文献中毕赤酵母所需要的 120 h 左右的时间, 酿酒酵母生产工艺<sup>[8]</sup>成熟稳定, 因此具有潜在的应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

酿酒酵母 SAM0801 由本实验室诱变保藏。

### 1.2 培养基

与文献[9]一致。

### 1.3 分析方法

#### 1.3.1 生物量的测量方法

取 1 mL 发酵液定容到 500 mL 用紫外可见分光光度计检测  $OD_{660}$ , 或取 5 mL 发酵液 8000 r/min 离心 10 min 后收集菌体, 105°C 下烘干至恒重。

#### 1.3.2 乙醇浓度的测定

乙醇检测仪(生物传感分析仪 SBA-40C, 华东理工大学)。

#### 1.3.3 SAM 含量的测定

SAM 样品的制备: 取 1 mL 发酵液 8000 r/min, 4°C 低温离心(Centrifuge 5804R, Eppendorf)10 min, 弃上清液, 之后用 1.5 mol/L 高氯酸定容到 10 mL, 振荡破碎 1.5 h 后 8000 r/min, 4°C 低温离心 10 min, 取上清液微孔滤膜过滤待测。

高效液相(检测器 SPD-20A、泵 LC-20AT, 日本岛津)检测: 流动相为 0.01 mol/L 的甲酸铵水溶液, 甲酸调 pH 至 3.0, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 进样量 10  $\mu$ L。色谱柱为反向  $C_{18}$  柱。SAM 标准品购自 Sigma 公司。

### 1.4 发酵罐培养

5 L 全自动发酵罐(上海保兴)中装液量 2 L, 接种量 15%, 温度 28°C, pH 为 5.4, 初始搅拌转速为 200 r/min, 之后每小时提高 100 r/min 到 700 r/min, 维持稳定, 通气量为 10 L/min, 外接乙醇在线测定

仪。通过监测乙醇含量来反馈控制<sup>[8,9]</sup>流加葡萄糖的速率, 以实现高密度发酵生产工艺。

## 2 结果

### 2.1 补加 10 g 前体 L-蛋氨酸

发酵 35 h, 菌体干重达到 100 g/L 左右时, 分批添加 10 g 前体 L-蛋氨酸。发酵结果如图 1 所示。

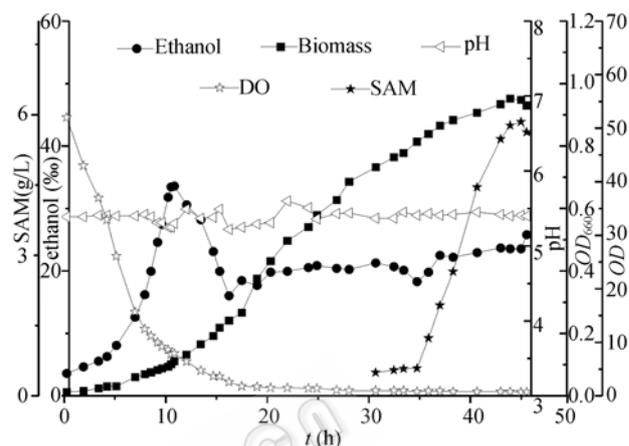


图 1 补加 10 g 前体 L-蛋氨酸的发酵

Fig. 1 Fermentation for SAM with 10 g L-methionine added

如图 1 所示, 当加入前体诱导后, S-腺苷蛋氨酸产量迅速积累。在 44 h 左右产量达到最高值 5.85 g/L, 生物量干重最高达到 124 g/L, 消耗补糖 2 L。

### 2.2 补加 20 g 前体 L-蛋氨酸

发酵 34 h, 菌体干重达到 100 g/L 左右时, 分批添加 20 g 前体 L-蛋氨酸。发酵结果如图 2 所示。

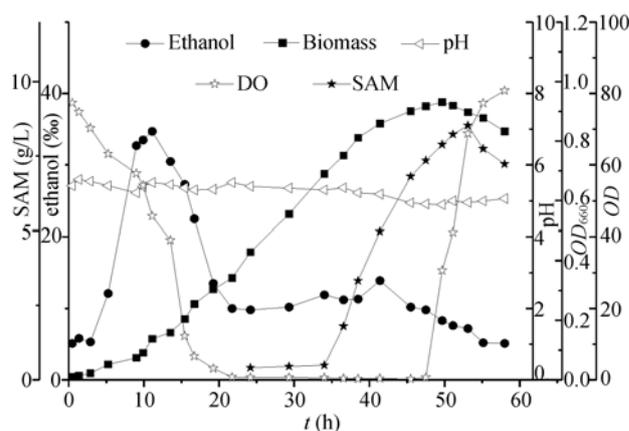


图 2 补加 20 g 前体 L-蛋氨酸的发酵

Fig. 2 Fermentation for SAM with 20 g L-methionine added

如图 2 所示, 当加入前体诱导后, S-腺苷蛋氨酸产量迅速积累。诱导前期积累比较快, 后期溶氧急剧上升,

积累速度减慢, 在 53 h 左右产量达到最高值 8.52 g/L, 生物量干重最高达到 130 g/L, 消耗补糖 2.8 L。

### 2.3 补加 30 g 前体 L-蛋氨酸

发酵 32 h, 菌体干重达到 100 g/L 左右时, 分批添加 30 g 前体 L-蛋氨酸。发酵结果如图 3 所示。

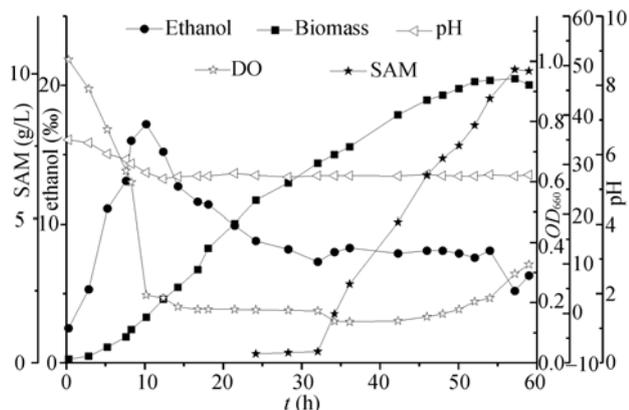


图 3 补加 30 g 前体 L-蛋氨酸的发酵  
Fig. 3 Fermentation for SAM with 30 g L-methionine added

如图 3 所示, 当加入前体诱导后, S-腺苷蛋氨酸产量迅速积累。诱导后产物稳步积累, 积累后期前体补加完毕, 溶氧上升, 发酵终止。在 57 h 左右产量达到最高值 10.15 g/L, 生物量干重最高达到 133 g/L, 消耗补糖 3 L。

### 2.4 补加 40 g 前体 L-蛋氨酸

发酵 33 h, 菌体干重达到 100 g/L 左右时, 分批添加 40 g 前体 L-蛋氨酸。发酵结果如图 4 所示。

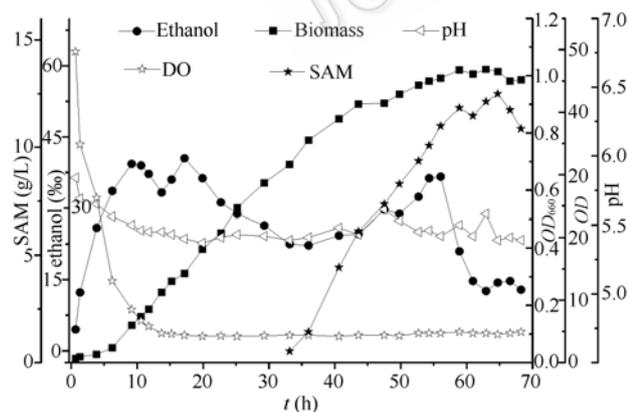


图 4 补加 40 g 前体 L-蛋氨酸的发酵  
Fig. 4 Fermentation for SAM with 40 g L-methionine added

如图 4 所示, 当加入前体诱导后, S-腺苷蛋氨酸产量迅速积累。诱导前期积累比较快, 积累后期乙醇冲高被调控回落时, 产量也出现短暂回落, 后经调节, 乙醇与产量再次冲高回落, 发酵终止。在 65 h

左右产量达到最高值 12.48 g/L, 生物量干重最高达到 142 g/L, 消耗补糖 3.3 L。

### 2.5 补加 50 g 前体 L-蛋氨酸

发酵 31 h, 菌体干重达到 100 g/L 左右时, 分批添加 50 g 前体 L-蛋氨酸。发酵结果如图 5 所示。

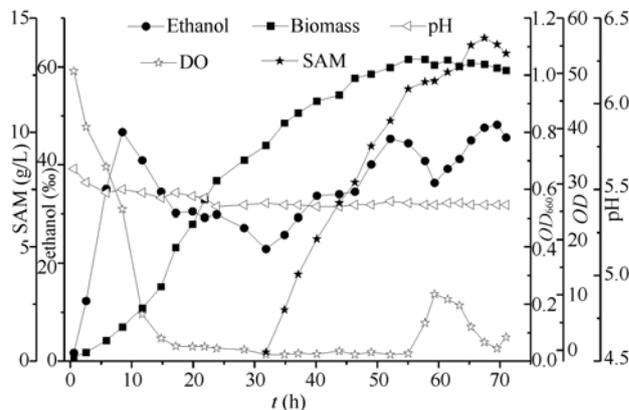


图 5 补加 50 g 前体 L-蛋氨酸的发酵  
Fig. 5 Fermentation for SAM with 50 g L-methionine added

如图 5 所示, 当加入前体诱导后, S-腺苷蛋氨酸产量迅速积累。诱导前期积累迅速且稳定, 53 h 左右出现拐点, 溶氧上升, 乙醇下降, 产量积累减慢, 后经调控产量再度冲高, 补加完毕, 发酵结束。在 67 h 左右产量达到最高值 14.12 g/L, 生物量干重最高达到 145 g/L, 消耗补糖 3.6 L。

### 2.6 40 g 前体 L-蛋氨酸的流加发酵

通过对上述实验的总结, 设计了前体的流加发酵实验。发酵 34 h, 菌体干重达到 100 g/L 以上时, 以约 1.7 g/h 的速率连续流加 40 g 前体 L-蛋氨酸。发酵结果如图 6 所示。

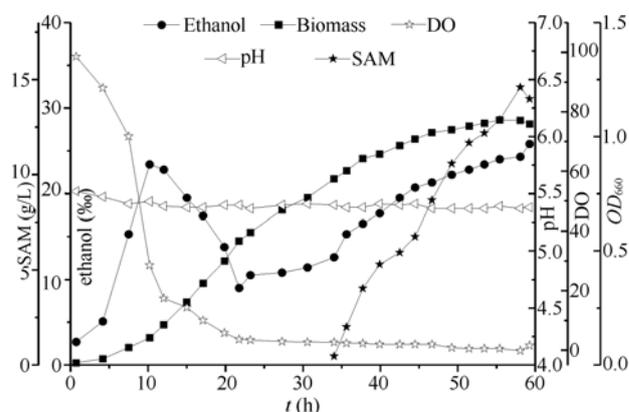


图 6 40 g 前体 L-蛋氨酸的流加发酵  
Fig. 6 Fed-batch fermentation for SAM with 40 g L-methionine

如图 6 所示, 当加入前体诱导后, S-腺苷蛋氨酸产量迅速积累, 之后产量积累呈现阶段上升趋势。生物量, 乙醇, pH, 溶氧等在转化期间比较稳定。在 58 h 左右产量达到最高值 14.48 g/L, 生物量干重最高达到 168 g/L, 消耗补糖 3 L。

### 3 讨论

国外 S-腺苷蛋氨酸生产工艺已经相当成熟, 文献研究多集中在药理应用上面; 国内生产工艺还不完善, 尚处在研究阶段。近年来, 国内机构将重点放在对毕赤酵母的基因改造上面<sup>[4, 5]</sup>, 取得了很好的效果。前体 L-蛋氨酸的补加策略决定了酵母菌株发酵法生产 S-腺苷蛋氨酸的结果。本研究首先考察了在 5 L 发酵罐中 L-蛋氨酸的补加量对发酵结果的影响: 发酵产量由每罐添加 10 g 前体时的 5.85 g/L 提高到每罐添加 50 g 前体时的 14.12 g/L, 提高了 141%; 生物量干重也从 124 g/L 提高到 145 g/L, 提高了 17%。随着前体和补糖的增加, 发酵体积增加, 传质阻力增强, 前体相对稀释, 前体的转化效率随之降低, 同时为缓解发酵体系氮源补料的匮乏, 大量前体作为氮源被菌体吸收转化为生物量, 细胞得率 0.2 g/g 葡萄糖左右。之后考察了不同补加方式的影响: 比较图 4 和图 6 可以发现, 采用流加方式补加 40 g 前体时发酵 58 h 产量达到 14.48 g/L, 生物量干重 168 g/L, 分别比分批补加方式提高 16%、18%。采用流加策略时前体补加均匀持续, 使发酵过程更加稳定, 提高了前体和糖的利用效率, 获得更高的产量和生物量, 但是发酵液体积小于分批补加, 因此总的细胞得率小幅提高。

### REFERENCES

[1] Cantoni GL, Baddiley J, Jamieson GA. Structural

- observations on 'active methionine'. *Bio Chem*, 1953, **204**(1): 403-416.
- [2] Lu SC. Review article: S-Adenosylmethionine. *Inter J Biochem cell Bio*, 2000, **32**: 391-395.
- [3] Shiozaki S, Shimizu S, Yamada H. Production of S-adenosyl-L-methionine by *Saccharomyces sake*. *J Biotechnol*, 1986, **4**: 345-354.
- [4] He JY, Deng JJ, Zheng YH, 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-synthase. *J Biotechnol*, 2006, **126**: 519-527.
- [5] Hu XQ, Chu J, Zhang SL, et al. A novel feeding strategy during the production phase for enhancing the enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-methionine by methylotrophic *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol*, 2007, **40**: 669-674.
- [6] Zhu S, Chu J, Hu XQ, et al. Medium optimization for S-adenosyl-L-methionine Production by recombinant *Pichia pastoris* using statistics- based experimental design. *High Technol Lett*, 2006, **16**(2): 181-185.  
朱闪, 储炬, 胡晓清, 等. 中心组合优化重组毕赤酵母生产 S-腺苷甲硫氨酸用发酵培养基. 高技术通讯, 2006, **16**(2): 181-185.
- [7] Deng JJ. Study on the Production of S-Adenosylmethionine by Recombinant *Pichia Pastoris*. Hua Zhong Agricultural University.  
邓娟娟. 利用重组毕赤酵母发酵生产 S-腺苷甲硫氨酸工艺的研究. 论文, 华中农业大学.
- [8] Wang Z, Tan TW, Wen SH. Ethanol controlling method in fermentation of glutathione (GSH). *Chin J Biopr Eng*, 2004, **2**(2): 64-67.  
王峥, 谭天伟, 温少红. 谷胱甘肽发酵过程中的乙醇控制. 生物加工过程, 2004, **2**(2): 64-67.
- [9] Liu PY, Dong HZ, Tan TW. Effect of feeding pre-L-methionine on high-cell-density fermentation for S-adenosyl-L-methionine production. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(2): 268-272.  
刘沛溢, 董函竹, 谭天伟. 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. 生物工程学报, 2006, **22**(2): 268-272.