

# 发酵生产 S-腺苷-L-蛋氨酸培养条件的优化研究\*

董函竹 刘沛溢 谭天伟\*\*

(北京化工大学生命科学与技术学院北京市生物加工过程重点实验室 北京 100029)

**摘要:** 考察了摇瓶发酵生产 S-腺苷-L-蛋氨酸过程中碳源、氮源、无机盐和生长因子以及培养过程中补加 L-蛋氨酸时间对 S-腺苷-L-蛋氨酸的产量、含量及生物量的影响。并通过均匀实验设计对培养基配方进行优化, 在 30℃、180r/min 的培养条件下, 得到最后的培养基配方为: 葡萄糖 30g, 酵母粉 11g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.09g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.14g,  $\text{MgCl}_2$  0.5g,  $\text{CaCl}_2$  0.3g,  $\text{CuSO}_4$  0.005g, 自来水定容至 1L。摇瓶中优化后的 S-腺苷-L-蛋氨酸产量可以达到 0.9g/L, 比优化前产量提高了 30%。采用优化后的培养基和培养条件在 5L 发酵罐中间歇培养, 24h 后一次性补加 24g/L 葡萄糖和 1.0g/L L-蛋氨酸, 继续培养 24h 后产量可达 2.66g/L, 生物量 23.4g/L。

**关键词:** 发酵, S-腺苷-L-蛋氨酸, 酵母, 均匀设计

**中图分类号:** X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0110-04

## Optimal Study on the Fermentation Conditions of S-adenosyl-L-methionine\*

DONG Han-Zhu LIU Pei-Yi TAN Tian-Wei\*\*

(Key lab of Bioprocess of Beijing, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)

**Abstract:** This paper focuses mainly on the study of optimal fermentation conditions of S-adenosyl-L-methionine. Effects of carbon sources, nitrogen sources, inorganic constituents, growth factors and adding time of L-methionine on the yield, the content and biomass of S-adenosyl-L-methionine are studied. And ingredients of the culture medium are also optimized by the method of uniform design. The final optimum culture medium contains: glucose 30 g, Yeast powder 11 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.09 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.14 g,  $\text{MgCl}_2$  0.5 g,  $\text{CaCl}_2$  0.3 g,  $\text{CuSO}_4$  0.005 g per liter. Using that optimum culture medium, the yield of S-adenosyl-L-methionine can reach 0.9 g/L in Erlenmeyer flask which is 30 % higher than before. Experiment on 5 L fermenter reveals that the accumulation of S-adenosyl-L-methionine can reach 2.66 g/L. Biomass is 23.4 g/L.

**Key words:** Fermentation, S-adenosyl-L-methionine, Yeast, Uniform design

S-腺苷-L-蛋氨酸, 又称活性甲硫氨酸, 英文简称: SAM。SAM 在 1953 年为 Cantoni 所发现<sup>[1]</sup>, 它是生物体内极其重要的甲基供体, 在体内由 ATP 和 L-蛋氨酸经蛋氨酸腺苷转移酶 [EC2.5.1.6] 催化合成。SAM 具有抗抑郁作用, 能改善退行性关节病的症状, 恢复多种慢性肝病所致肝功能异常<sup>[2,3]</sup>, 尤其是对酒精引起的肝损伤有很好的疗效<sup>[4]</sup>。目前 SAM 多作为药物用于临床, 美国已经将其开发成具有抗抑郁、保肝等功能的营养保健品。SAM 还被用来生产去屑、止痒、减皱、抗衰老的美容化妆品。在我国, SAM 的开发还处于起步阶段, 而随着 SAM 新功能的不断发现, SAM 的需求量也将不断

\* 国家“973”项目 (No. 2003CB716002)

国家高技术研究发展计划项目 (No. 2002AA217022)

国家自然科学基金项目 (No. 20306002)

\*\* 通讯作者 Tel: 010-64416691, E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

收稿日期: 2005-04-29, 修回日期: 2005-06-29

增加,产品的市场开发前景广阔。因此,对SAM的研究具有十分重要的意义。

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3种。文献报导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<sup>[5]</sup>。浙江大学生物工程研究所<sup>[6,7]</sup>展开了一系列对酿酒酵母发酵生产SAM的研究,通过摇瓶优化发酵条件,SAM的体积产量可以达到1.0039g/L。陈小龙等人<sup>[8]</sup>对土壤中筛到的Q95酵母菌的培养条件优化,得到的最高SAM产量为1.946g/L。李东阳等人<sup>[9]</sup>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。本实验室对其发酵培养条件进行了优化研究,在5L发酵罐中发酵48h产量达到了2.66g/L。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种与培养基

SAM-04-1, SAM-04-2 为本实验室保存的酿酒酵母;

斜面培养基: 5°Bé 麦芽汁琼脂培养基,  $1 \times 10^5$  Pa 湿热灭菌 20 min。

种子培养基: 麦芽汁 10g, 酵母粉 3g, 蛋白胨 5g, 葡萄糖 10g, 自来水定容至 1L,  $0.7 \times 10^5$  Pa 湿热灭菌 20 min。

### 1.2 培养方 法

从新鲜斜面接一种一环酵母于 100 mL 种子培养基中, 摇床 (30℃, 180 r/min) 培养 24h。从种子瓶以 10% 接种量接种 250 mL 摇瓶, 装液量 25mL, 摇床 (30℃, 180r/min) 培养一段时间后, 再补加一定浓度的 L-蛋氨酸和葡萄糖溶液, 继续培养 24h。

### 1.3 分析方 法

生物量的测定: 10mL 发酵液 4,000 r/min 下离心 10min 后, 用蒸馏水洗涤菌体, 于 80℃ 烘干称重, 由烘干前后的质量差计算生物量。SAM 产量的测定: 发酵液离心 (4,000 r/min), 收集菌体, 蒸馏水洗后用 1.5 mol/L 的高氯酸于室温下破碎 1.0~1.5 h, 再离心收集上清, 适当稀释后留待分析<sup>[5]</sup>。HPLC 流动相为 0.01 mol/L 甲酸铵, 甲酸调 pH 至 3.0, 流速 0.9 mL/min, 检测波长 254 nm。进样量 5 $\mu$ L。

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养基成份对生物量、SAM 积累的影响

2.1.1 碳源的影响: 考察了 3 种基本碳源对生物量和 SAM 积累量的影响。碳源浓度均为 30g/L, 结果如表 1。

表 1 碳源对生物量、SAM 积累量的影响

碳源	葡萄糖	蔗糖	糊精
生物量/ (g/L)	15.2	14.8	16.2
SAM 产量/ (g/L)	0.71	0.63	0.23
SAM 含量/%	4.7	4.3	1.4

由表 1 可以看出, 葡萄糖做碳源时, SAM 的积累量最高, 而糊精做碳源时, 生物量虽高, 但 SAM 的产量和含量均很低。其原因可能是酵母不能够充分利用糊精这种碳源而合成 SAM。因此, 在以后实验中均采用葡萄糖做为碳源。

2.1.2 氮源的影响: 考察了 4 种不同氮源对生物量和 SAM 积累量的影响。氮源浓度均为 3g/L, 结果如表 2。

表2 氮源对生物量和SAM积累量的影响

氮源	酵母粉	玉米浆	蛋白胨	硫酸铵
生物量/(g/L)	15.6	13.6	13.2	12.8
SAM产量/(g/L)	0.70	0.51	0.55	0.40
SAM含量/%	4.5	3.7	4.2	3.1

由表2可以看出,硫酸铵、玉米浆、蛋白胨做为氮源时,生物量和产量偏低,均不如酵母粉的效果好。

**2.1.3 无机盐和生长因子的影响:**研究了在原培养基基础上添加几种无机盐和生长因子对生物量和SAM产量的影响,见表3。其中无机盐的添加量为0.004g/L,生长因子添加量为0.005%。

表3 无机盐和生长因子对生物量和SAM积累量的影响

无机盐及生长因子	对照	Fe	Cu	丝氨酸	VB <sub>1</sub>	肌醇
生物量/(g/L)	14.18	13.82	16.70	15.20	13.74	14.60
SAM产量/(g/L)	0.69	0.71	0.79	0.74	0.70	0.77
SAM含量/%	4.6	5.1	4.8	4.8	5.1	5.3

由表3可以看出,添加Cu<sup>2+</sup>时,SAM的产量和生物量均有较明显的增加,多次重复实验表明,Cu<sup>2+</sup>可以有效的促进SAM的积累(见图1)。当Cu<sup>2+</sup>浓度为0.005g/L时,产量可比不加Cu<sup>2+</sup>时提高15%。此外,Fe<sup>2+</sup>,也可促进SAM的积累,但生物量有所下降。其它各种生长因子的加入均可在不同程度上提高SAM的产量,只是在提高幅度上不如Cu<sup>2+</sup>。

## 2.2 补加L-蛋氨酸时间的影响

摇瓶考察从0到34h不同时间内补加L-蛋氨酸(1.0g/L)对SAM积累的影响(见图2)。从图2可以看出,直接在培养基中加入SAM的前体L-蛋氨酸时,SAM的积累量是较少的,这可能是因为L-蛋氨酸对菌体生长有一定的抑制作用,而随着时间的增加,SAM的积累量也逐渐增加,在23、24h后SAM的产量趋于稳定,结果表明,在24h左右补加L-蛋氨酸是比较好的培养方法。

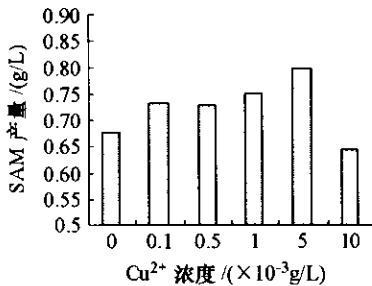
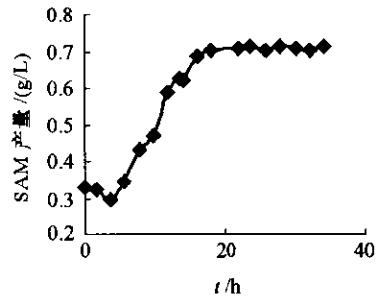
图1 Cu<sup>2+</sup>浓度对SAM产量的影响

图2 补加时间对SAM产量的影响

## 2.3 培养基配方的均匀设计法优化

对培养基中8个因素进行考察,采用8因素16水平的均匀设计表,各因素水平为:葡萄糖0~150g,酵母粉0~15g,硫酸铵0~15g,MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0~0.15g,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0~0.3g,MgCl<sub>2</sub> 0~1g,CaCl<sub>2</sub> 0~0.3g,柠檬酸三钠0~3g,自来水定容至1L。实验设计表及实验结果见表4。

用SPSS软件对实验数据进行回归分析,得到如下回归模型:

$$Y = 0.703 + 0.0305X_2 - 0.00409X_1 - 0.0149X_3 \times X_8 + 0.0002849X_1 \times X_3$$

方差分析结果中 F 检验值为 24.366, 显著性水平  $\text{Sig.} = 0 < 0.1$ , 通过显著性水平检验。从方程系数来看, 氮源对结果影响最为显著。适当增加氮源的量可以有效的提高 SAM 产量 (表 4)。直观实验结果表明 SAM 的最高产量可以达到 0.952g/L, 比原始配方提高 30%。采用优化后的培养基配方在 5L 发酵罐中间歇培养, 底糖浓度在 8h 左右就基本上消耗完全, 在 24h 之前 SAM 的产量只有 0.03g/L。在 24h 后补加葡萄糖和 L-蛋氨酸, 继续培养 48h, SAM 的产量达到了 2.66 g/L, 生物量 23.4 g/L。SAM 的含量达到了 11.4%, 与目前国内 SAM 的发酵水平相当。

表 4 均匀设计实验及结果

实验号	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	SAM 产量 (g/L)
1	1	5	11	4	13	3	9	6	0.629
2	13	16	6	2	11	7	14	8	0.795
3	7	7	4	11	15	1	12	13	0.788
4	9	14	9	12	16	13	2	5	0.826
5	10	3	8	3	6	5	1	14	0.286
6	6	1	16	15	10	8	3	9	0.331
7	2	15	7	13	3	9	8	15	0.894
8	3	11	2	5	9	16	4	11	0.855
9	16	4	3	9	12	10	6	2	0.294
10	15	13	12	8	2	2	5	10	0.684
11	11	9	1	16	5	4	10	4	0.389
12	8	8	14	1	4	14	7	3	0.851
13	5	2	5	7	1	12	13	7	0.614
14	12	10	15	6	14	11	11	16	0.332
15	14	6	10	14	7	15	15	12	0.271
16	4	12	13	10	8	6	16	1	0.952

注: X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8 分别代表葡萄糖, 酵母粉, 硫酸铵,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ , 柠檬酸三钠)

### 3 结论

通过摇瓶考察了碳源、氮源、无机盐和生长因子、补加 L-蛋氨酸的时间对 SAM 积累的影响。并设计了均匀实验优化培养基配方, 得到了最优的培养条件。在 24h 后补加 L-蛋氨酸摇瓶产量比优化前提高了 30%。采用 5L 发酵罐间歇培养 48h, SAM 含量达到了目前国内发酵水平。

### 参考文献

- [1] Cantoni G L J Bio Chem, 1953, 204 (1): 403~416.
- [2] 杨 静, 王 旻, 韦平和. 药学进展, 2001, 25 (3): 164~167.
- [3] 景 沛. 生命的化学, 1995, 15 (2): 49~50.
- [4] Vishnudutt P, Denise R. Alcohol, 2002, 27 (3): 151~154.
- [5] Schlenk F, Zydek C R, Ehninger D J, et al. Enzymologia, 1965, 29: 283~298.
- [6] 刘 惠, 林建平, 吴坚平, 等. 化学反应工程与工艺, 2002, 18 (4): 310~314.
- [7] 刘 惠, 吴坚平, 林建平, 等. 中国生化药物杂志, 2002, 23 (6): 284~287.
- [8] 陈小龙, 王远山, 郑裕国, 等. 中国生物工程杂志, 2004, 24 (1): 65~69.
- [9] 李东阳, 平 健, 田 露, 等. 生物工程学报, 2002, 183 (3): 295~299.