

## 利用重组 *Pichia pastoris* 生产腺苷甲硫氨酸

李东阳 于健 田露 吉鑫松 袁中一\*

(中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所,上海 200031)

**摘要** 为改造甲醇利用型酵母 *Pichia pastoris* 来生产腺苷甲硫氨酸(SAM, S-adenosyl-L-methionine),我们将一个带有 SAM 合成酶基因的胞内表达质粒转化入 *Pichia pastoris* 菌株 GS115 经过 G418 抗性筛选得到一株有两个基因拷贝的转化子。该菌在含有甲醇和甲硫氨酸的培养基中生长 5d 后,其细胞内的 SAM 的产量比原始菌株提高了 30 余倍。对该菌生产 SAM 的培养基中的碳源与氮源进行了优化,结果显示碳源的控制对该菌 SAM 产量的影响很大。在试管水平,该菌在含有 0.75% 的 L-methionine 并且碳源和有机氮源经过一定程度优化的培养基中,生长 6d 后 SAM 产量达到 1.58g/L。

**关键词** 腺苷甲硫氨酸高产菌,重组,SAM 合成酶,*Pichia pastoris*

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0295-05

腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)是细胞内的主要甲基供体,是一种有着重要生理活性的中间代谢物质。在美国与欧洲,SAM 已被用于多种临床疾病的治疗<sup>[1-3]</sup>。

SAM 的生物合成是由底物 L-甲硫氨酸和 ATP 经 SAM 合成酶 EC 2.5.1.6 酶促合成。SAM 的生产一直以 *Saccharomyces* 属的酵母发酵为主<sup>[4,5]</sup>。Shiozaki 通过筛选 300 多株不同种属的菌株,分离到 1 株 *Saccharomyces sake* K-6 菌<sup>[6]</sup>,在 10 mL 培养基少量发酵时可以产出 1.55 g/L 的 SAM,进一步优化培养条件,该菌在 10L 发酵罐中培养 7d 后的 SAM 产量高达 10.8 g/L(菌体达到 53g/L)<sup>[7]</sup>。这是目前从各种专利和期刊上所查到的最高的产量。Pajares Maria Angeles 等通过在细菌中表达大鼠肝脏来源的 SAM 合成酶,使得细胞内的 SAM 含量大大提高,但其单位发酵体积中的 SAM 产量仍然很低,只有 28nmol/mL 发酵液<sup>[8]</sup>。国内一些研究机构对 SAM 已有初步的研究,但未见明确的 SAM 产量数据<sup>[9]</sup>。

甲醇酵母 *Pichia pastoris* 相比较于传统的酿酒酵母具有培养基成本低、生物累积量高的特点,大规模发酵可得到极高的细胞密度(>130g/L)的细胞干重和生物转化率<sup>[10]</sup>。这个特性使得它具备以极低的价格生产细胞内中间代谢产物的潜力。我们在 *Pichia pastoris* 的细胞内表达外源的 SAM 合成酶,使

细胞内能够产生出大量 SAM 合成酶,从而使重组菌在培养基中外源甲硫氨酸存在下,在细胞内合成大量的 SAM。

### 1 材料和方法

#### 1.1 主要材料

菌株和主要试剂:甲醇酵母 *Pichia pastoris* 宿主菌 GS115 (*his4*) 表达质粒 pPIC3.5K 均为 Invitrogen 公司产品。*S. cerevisiae* 菌株 YPH499 为本所陆长德老师提供,克隆质粒 pBluscriptSK+, pUC18 为本室保存。*E. coli* 菌株 TG1, XL-Blue 用以进行克隆步骤。

所有分子克隆用酶均为 GIBCO BRL 公司产品。质粒抽提和胶回收试剂盒购自 Promega 公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 常规分子生物学操作参照文献[11]有关 *Pichia pastoris* 的实验方法按照 Invitrogen 公司的 *Pichia* Expression Kit 操作手册进行。

1.2.2 *S. cerevisiae* 来源的 SAM2 基因的克隆和质粒构建:根据 GenBank 中的 *Saccharomyces cerevisiae* 来源的 S-adenosylmethionine synthetase 2 (SAM2) 基因(登录号为 M23368),设计 2 条专一引物:

5' primer CAGGATCCACCATGGCCAAGAGCAAACCT

3' primer GCGGCCGGAATTCAGCCTAGCATAAAGAAA

以 *S. cerevisiae* 菌株 YPH499 的染色体组 DNA 为模板,PCR 扩增 *SAM2* 基因,得到的 PCR 产物经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切后,与 *Bam*HI/*Eco*RI 双酶切的 pUC18 相连。得到的质粒 pUC-SAM,经测序确证后,以 *Bam*HI 和 *Eco*RI 将 *SAM2* 基因切出,装配入 pPIC3.5K 中。

**1.2.3 多拷贝转化子的筛选和拷贝数的鉴定** 将表达质粒 pPIC3.5K-SAM2 用 *Sac*I 线性化后,用原生质体法转化 GS115 菌,待转化子在 MD 平板上长出可见的菌落后,加入 1 mL 无菌水,混合、重悬菌液,离心。倾去上清,0.5 mL 无菌水再重悬菌体。适当稀释后取 100  $\mu$ L 涂布 G418 (0, 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL) 平板。30 $^{\circ}$ C 培养 4~6 d。将筛选出的 G418 抗性菌株,接种于 96 孔板中的 YPD 培养基中,30 $^{\circ}$ C 培养 2 d。抽提总 DNA,定量后调整各样品浓度相同后,将 DNA 样品点在尼龙膜上,用<sup>32</sup>P 标记的 *SAM2* 做探针杂交。具体操作参见文献 [12]。

**1.2.4 SAM 产生菌的培养** 将筛选出的 *Pichia pastoris* 转化子接种 3 mL YPD 液体培养基中,于 30 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜(转速 300 r/min)。过夜培养物以 1% 接种量接入含 10 mL 发酵培养基的 50 mL 塑料离心管中。于 30 $^{\circ}$ C 摇床培养(300 r/min),并从第 48h 开始每 24h 补加甲醇到 0.5%。发酵培养基 A 的组成为 10 g/L 酵母膏,10 g/L 蛋白胨,0.05 mol/L 磷酸钾缓冲液 pH6.0,13.4 g/L YNB A  $\times 10^{-4}$  g/L 生物素,2 g/L 甘油,20 g/L 甲醇,7.5 g/L 的 L-甲硫氨酸。其他培养基除特别表明成分外,与培养基 A 相同。

**1.2.5 细胞内 SAM 的定量** 已知细胞浓度的细胞离心收集,加入等体积的 10% 三氯乙酸于 4 $^{\circ}$ C 抽提 1h 以上,12 000g  $\times$  10min 离心后,将上清过滤从中取 20  $\mu$ L,进行 HPLC 分析。强阳离子型离子交换柱 Hypercil 10 SCX(4.6  $\times$  250mm),流动相为:0.5mol/L 甲酸铵(pH4.0),流速 2.0mL/min,检测波长为 254nm。SAM 保留时间为 25.4min,由于室温和洗脱液 pH 的轻微波动,前后偏差 1min 左右。采用外标法,根据不同浓度的 SAM 标准品的峰面积所做的标准曲线来定量。

**1.2.6 细胞内 SAM 合成酶活力的测定** 于 4 $^{\circ}$ C 离心收集菌体(3 000g  $\times$  10min),并用裂解缓冲液——含有 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.4),5% 甘油(V/V),5mmol/L 的巯基乙醇和 1mmol/L 的 EDTA(加入 1mmol/L 的苯甲咪和 1mmol/L 的 PMSF 作为蛋白酶抑制剂),清洗 1 次。加入菌体 1 倍体积的酸洗玻璃珠和 4 倍体积的裂解缓冲液,用 Branson Sonifier 450

超声波仪(在功率输出档 6,50% 的工作周期)于 0~4 $^{\circ}$ C 处理 10min,裂解细胞。10 000g  $\times$  15min 离心除去玻璃珠和细胞残片。粗抽提液进一步经 12 000g  $\times$  30min 离心,保留上清。

设定 1mL 的反应混合物,其中含有 20mmol/L 的 L-甲硫氨酸,20mmol/L 的 ATP,8mmol/L 的还原型谷胱甘肽,20mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub>,100mmol/L 的 KCl,150mmol/L 的 pH7.4 的 Tris-HCl 和适量的细胞裂解液,在 37 $^{\circ}$ C 温育 60min。不加入 L-甲硫氨酸的反应作为空白对照。反应结束后,加入 0.5 mL 的 20% 高氯酸溶液,离心除去沉淀。上清通过 HPLC 分析 SAM 的含量。酶活测定反应做 4 份,取其平均值。

**1.2.7 其他方法** 将一系列不同浓度的菌液在 560 nm 处测定光密度,然后经 5000g  $\times$  10min 离心后收集菌体,并用无菌水洗涤 1 次,将再次离心收集的菌体于 80 $^{\circ}$ C 烘箱中干燥过夜,称量菌体作出菌体干重与 OD<sub>560</sub> 的标准曲线。以后菌体的干重都根据测定的菌液 OD<sub>560</sub> 值由标准曲线读出。

## 2 结 果

### 2.1 表达外源 SAM 合成酶的 *Pichia pastoris* 重组菌的构建和筛选

通过 PCR 的方法,我们克隆了 *S. cerevisiae* 的 *SAM2* 基因,测序后表明与 GenBank 中的发表序列完全相同。为方便筛选高拷贝,我们选用了 pPIC3.5K 质粒作为在 *Pichia pastoris* 中胞内表达 *SAM2* 的载体,该质粒含有 G418 抗性基因,从而使得转化了该质粒的菌株具有剂量依赖的 G418 抗性。将该质粒用 *Sac*I 线性化后转化宿主菌,这样得到的转化子主要为外源基因插入于 5'*AOX1* 位点的转化子,其营养型为 Mut<sup>+</sup>(即甲醇利用快速型)。

将经过 G418 抗性筛选的重组菌,进一步用斑点杂交(Dot-blot)的方法,确定其细胞内的外源基因拷贝数(见图 1)。杂交结果一方面说明了 SAM 合成酶表达框已经整合入宿主菌的染色体 DNA,另一方面对杂交结果进行光密度扫描后,可以确定外源基因在染色体上的整合后的拷贝数。其中 G4、H5 为 3 拷贝,E3、E6、E10、G4、G8、H3 等为 2 拷贝;E1、E11、F6、G6、G10 等为单拷贝。

### 2.2 外源 SAM 合成酶的表达促进了细胞内 SAM 累积量的增加

在 10 mL 培养基 A 中发酵 5d,每天补加甲醇与适量甘油的情况下,重组菌和空载体转化的 GS115 对照菌相比较,细胞内的 SAM 合成酶活力和 SAM

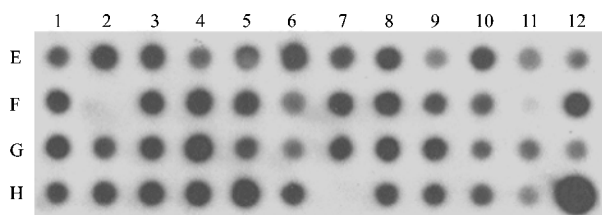


图1 点杂交分析 pPIC3.5K-SAM2 的转化子

Fig.1 Quantitative dot-blot analysis of pPIC3.5K-SAM2 transformants

F11 was negative control of GS115 ; H12 was positive control ; G12 and H11 were single copy transformants ; F2 and H7 were blank

产量都明显地提高了,其中 G8 菌提高了 30 倍左右(每次 2 管,重复 3 次以上)。同样的重组菌在没有甲醇诱导时,也就是说没有重组的 SAM 合成酶被诱导表达的情况下,细胞内 SAM 的量同宿主菌比较接近(表 1)。这说明正是由于外源 SAM 合成酶的表达,直接促进了细胞内 SAM 累积量的大幅度提高。

表 1 重组菌和对照菌 SAM 产量与 SAM 合成酶活力比较

Table 1 Comparison of SAM production and SAM synthetase activity of wildtype and recombinant strains of *Pichia pastoris*

	Control strain GS115/pPIC3.5K	Recombinant G8 with induction	Recombinant G8 without induction
SAM production ( $\mu\text{g/mL}$ )	$0.031 \pm 0.012$	$1.185 \pm 0.173$	$0.106 \pm 0.021$
Enzyme activity ( $\mu\text{mol/h/mg}$ )	$0.24 \pm 0.02$	$8.87 \pm 0.24$	$0.53 \pm 0.15$

### 2.3 拷贝数对 SAM 产量的影响

将不同基因拷贝数的转化子在培养基 A (20 g/L 酵母膏, 10 g/L 蛋白胨, 其余成分与培养基 A 相同) 中培养,并从 48h 开始每 24h 补加 0.5% 甲醇和 0.2% 甘油。30℃ 培养 5d 后,测定各菌株的 SAM 产量和 SAM 合成酶活力,结果如表 2 所示。

实验结果显示基因拷贝数与细胞内 SAM 合成酶活力间并没有明显的关系,G4 和 H5 的拷贝数最高为 3,但却比 2 拷贝的 G8 和单拷贝的 E11 及 F6 的酶活力还低。酶活力最高的是 2 拷贝的 G8,同时它的 SAM 产量也较其他菌株的高。

在我们的实验中,重组菌的 SAM 合成酶活力比对照菌的 SAM 合成酶活力提高了 10~30 倍,SAM 的产量也提高了 10~35 倍。从这一点来说,提高细胞内的 SAM 合成酶活力的确可以促进 SAM 产量的增加。但另一方面,从表 2 中可看出,E11 的 SAM 合成酶活力比 G4 和 H5 的都要高,但后两者的 SAM 产量却都比它的高。因此,只能说在一定程度上 SAM 合成酶活力对 SAM 的产量是主要因素,还有其他因

素也会影响 SAM 的累积。

表 2 重组菌的 SAM 产量与 SAM 合成酶活力及基因拷贝数的关系

Table 2 The relationship between expression cassette copy number and recombinant SAM synthetase activity and SAM production

Strains	Copy number	SAM production ( $\mu\text{g/mL}$ )	SAM synthetase activity ( $\mu\text{mol/h/mg}$ )
G8	2	$1.15 \pm 0.12$	$8.87 \pm 0.16$
E6	2	$1.06 \pm 0.13$	$5.57 \pm 0.09$
E11	1	$0.61 \pm 0.09$	$6.42 \pm 0.08$
F6	1	$0.95 \pm 0.12$	$6.25 \pm 0.14$
F9	1	$1.05 \pm 0.09$	$7.01 \pm 0.12$
G4	3	$0.78 \pm 0.06$	$3.68 \pm 0.07$
G6	1	$0.95 \pm 0.14$	$5.21 \pm 0.11$
H5	3	$0.88 \pm 0.13$	$5.46 \pm 0.13$
GS115	0	$0.04 \pm 0.01$	$0.23 \pm 0.01$

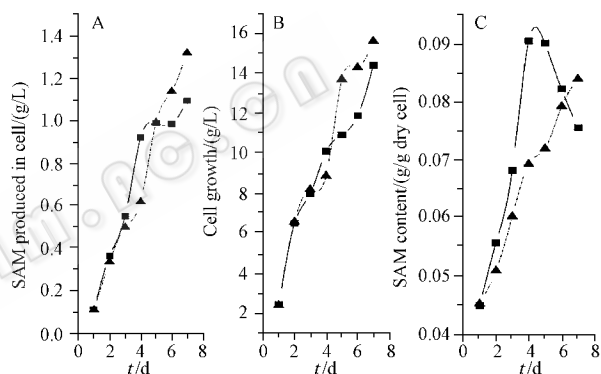


图 2 补充甘油对重组菌 SAM 产量的影响

Fig.2 Glycerol supplementation stimulated increase of SAM production of recombinant strain

Two sets of *P. pastoris* G8 were cultured in Medium C. One of them (G8F, shown in solid line) was supplemented glycerol in the 72nd hour to a final concentration of 0.2%, and the other (G8G, shown in dash dot line) was supplemented glycerol in the 96th hour to a final concentration of 0.5%. Both of them were supplemented glycerol once more in the 144th hour to 0.5%. SAM production, cell growth and SAM content of these two sets of culture's were shown in graph A, B and C.

### 2.4 碳源对 SAM 积累量的影响

从图 2 可以看出,在重组菌培养中后期补加甘油,会对 SAM 的产量有较明显的刺激。在培养基 A 中培养两组 G8 菌,每组 3 管,分别标注为 G8F 和 G8G。在没有补加甘油前,两组菌的 SAM 累积量基本相同,但当第 3 天补充了 0.2% 甘油后,G8F 较之未补加甘油的 G8G,SAM 产量的增速提高。而当第 4 天 G8G 补充了 0.5% 甘油后,SAM 的量增长明显,补加甘油 24h 后基本与 G8F 的 SAM 产量持平。当第 6 天 G8F 的 SAM 产量已开始下降后,再补加 0.5% 的甘油,依然刺激了 SAM 产量的提高。比较

两者的 SAM 在细胞干重中所占的比例可以看出,第 3 天加的效果要比第 4 天加的效果好。

比较 G8 菌在培养基 A 中培养时,不补加甘油和从第 48h 开始每天补加 0.2% 甘油的 SAM 累积曲线(图 3)来看,补加甘油加快了 SAM 的增长速度,延长了 SAM 产量增长的时间,使得菌体内的 SAM 产量持续增长至第 7 天才开始降低,而不加甘油的菌在第 6 天即开始下降。持续补加甘油的菌 SAM 产量比不补加甘油的菌高出 1 倍多,在第 6 天达到最高值 1.58g/L。但将第 48h 以后补加的甘油浓度增至 0.5% 时, SAM 的产量不升反降,同样的现象也发生于从第 48h 以后补加 0.4% 的葡萄糖的情况(图 4)。

### 2.5 不同的氮源量对 SAM 产量的影响

在菌生长的中后期同时补加甘油与甲醇的情况下,比较了 G8 菌分别在含有不同的氮源的培养基中 SAM 的产量,如表 3 所示。

表 3 不同氮源浓度对 SAM 产量的影响

Table 3 The effect of organic nitrogen on SAM production

	Cell growth (g/L)	SAM content (mg/g dry cell)	SAM production (g/L)
Medium A: 1% Peptone, 1% yeast extract	10.11	133	1.34
Medium B: 1% peptone, 0.3% yeast extract	9.04	55.6	0.51
Medium C: 1% peptone, 2% yeast extract	12.35	93.1	1.15
Medium E: 2% peptone, 1% yeast extract	11.86	73.7	0.87

G8 were cultured in different media for 5d with 0.2% glycerol and 0.5% methanol supplementation every 24 h since the 48th hour

G8 菌在不同培养基中发酵后的 SAM 产量,以培养基 A 中的产量最高(表中数据全部为发酵 144h 后的数值),而且菌体中 SAM 的含量也最高,在第 6 天时达到 1.58g/L, SAM 含量达每克干细胞 0.14 克。在第 6 天补加 0.15% 的甲硫氨酸后, SAM 的产量在第 8 天达到了 1.72g/L。

## 3 讨 论

对酵母中含硫物质代谢的研究,为有目的地改造代谢途径来提高 SAM 产量提供了基础<sup>[13]</sup>。我们通过在 *Pichia pastoris* 中高效表达酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 来源的 SAM2 基因,得到了比野生菌细胞内 SAM 含量高 30 多倍的重组菌。酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 细胞中有 2 种 SAM 合成酶的同功酶,分别由 SAM1 和 SAM2 基因编码。由于已有的酶法合成研究显示 SAM2 编码的合成酶没有产物抑制现象<sup>[14]</sup>。因此我们选择在 *Pichia pastoris* 中

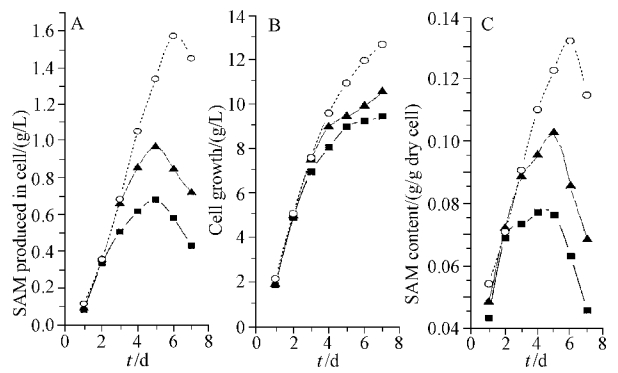


图 3 补加甘油天数对 SAM 产量的影响

Fig. 3 The effect of continuous glycerol supplementation on the SAM production

G8 was cultured in Medium A without glycerol supplementation (G8A, shown in solid square), or with 0.2% glycerol supplementation only in the 48th hour (G8A1, shown in solid triangle), or with 0.2% glycerol supplementation every 24 h since the 48th hour (G8A2, shown in open circle). The SAM production, cell growth and SAM content of G8 in different conditions are shown in graph A, B and C

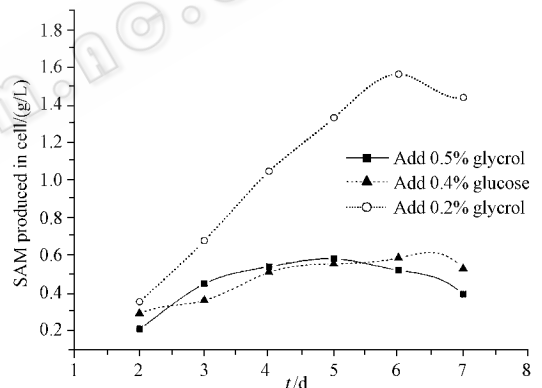


图 4 过量补充碳源对 SAM 产量的影响

Fig. 4 Excessive supplemented noninductive carbon source had negative effect on SAM production

G8 was cultured in Medium A, and separately supplemented glucose to 0.4% (dash line) or glycerol to 0.2% (dot line), or 0.5% (solid line) every day since the 48th hour

外源表达 SAM2 基因。由于外源的 SAM 合成酶基因的表达是受 AOX1 强启动子调控,而不受细胞含硫氨基酸代谢的代谢调控,在细胞内的甲硫氨酸量升高时,也就不会像内源性的 SAM 合成酶那样受到抑制<sup>[15]</sup>。因此通过表达外源的 SAM 合成酶,可以解除这种代谢调控,从而能够有效地将由培养基中摄入的甲硫氨酸转化成为 SAM。

但另一方面,由于 SAM 的合成需要消耗 ATP,因而细胞内累积的 SAM 量不仅与胞内的 SAM 合成酶的活力有关,还和细胞的生长状况和碳源消耗有关。在 SAM 合成酶活力达到一定程度,并有足量的甲硫氨酸存在下,ATP 的供应成了限制因素。因此

在发酵过程后期每天补充适量的甘油,会大幅度提高 SAM 的累积量。

可是重组菌要表达外源 SAM 合成酶,必须要以甲醇作唯一碳源。而在甘油、葡萄糖这类非诱导性碳源未被消耗光的情况下,AOX1 启动子处于关闭状态,外源 SAM 合成酶无法表达。因而增加每天甘油的补加量至 0.5% 时,菌体需要较长的时间消耗完甘油,诱导表达的酶相对较少,SAM 的产量也相应比补加 0.2% 甘油的情况下低。这个现象从侧面佐证了,是外源 SAM 合成酶的表达促进了细胞内 SAM 产量的提高。

从 *Pichia pastoris* 重组菌中筛选出的 SAM 高产菌,在优化了培养条件后,其 SAM 产量在试管水平最高达到 1.72g/L,SAM 含量达到每克干细胞 144mg。与 Shiozaki 等筛选天然菌株,分离到的 SAM 高产菌 *Saccharomyces sake* K-6 菌在试管水平的 SAM 产量相当。考虑到 *Pichia pastoris* 在发酵时需要保证高通氧量,尤其是在以甲醇作为单一碳源的时候,在试管中发酵并没有完全发挥其高生物累积量的优势(发酵罐中干细胞最高可超过 130g/L,而在本实验中,单位发酵体积中菌体干重最高只达到 15g/L),因此这个基因工程菌的 SAM 产量还有很大的提高潜力,显示了很好的应用前景。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Vetter G. Double-blind comparative clinical trial with S-adenosylmethionine and indomethacin in the treatment of osteoarthritis. *American Journal of Medicine*, 1987, **83** (suppl 5A): 78 ~ 80
- [ 2 ] Bressa G M, S-adenosyl-L-methionine (SAMe) as antidepressant:

Meta-analysis of clinical studies. *Acta Neurologica Scandinavica*, 1994, **154** (suppl) 7 ~ 14

- [ 3 ] Osman E, Owen J S, Burroughs A K. S-adenosyl-L-methionine-a new therapeutic agent in liver disease? *Alimentary Pharmacological Therapy*, 1993, **7** 21 ~ 28
- [ 4 ] Shiozaki S, Yamada H, Tani Y *et al.* Yeast culture containing S-adenosyl methionine in high concentrations, and process for production of S-adenosylmethionine. 1985, US4562149
- [ 5 ] 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
- [ 6 ] Shiozaki S, Shimizu S, Yamada H. Unusual intracellular accumulation of S-adenosyl-L-methionine by microorganisms. *Agric Biol Chem*, 1984, **48** (9): 2293 ~ 2300
- [ 7 ] Shiozaki S, Shimizu S, Yamada H. Production of S-adenosyl-L-methionine by *Saccharomyces sake*. *Journal of Biotechnology*, 1986, **4**: 345 ~ 354
- [ 8 ] Angeles P M, Production of S-adenosyl-methionine (SAM) by fermentation of transformed bacteria. 1995, EP0647712
- [ 9 ] XIANG Y H (项昱红), MO X Y (莫晓燕), ZHAN G Y (詹谷宇). S-adenosyl-L-methionine preparation and pharmacology. *Xi Bei Yao Xu Za Zhi* (西北药学杂志), 1999, **1**: 38 ~ 39
- [ 10 ] Wegner G H. Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 1990, **7** (3 ~ 4) 279 ~ 284
- [ 11 ] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E *et al.* *Short protocols in molecular biology*, 2nd edn., Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons: New York, 1995
- [ 12 ] Higgins D R, Cregg J M. *Methods in molecular Biology*, Vol. 103, *Pichia* protocols, New Jersey: Humana Press Inc, 1998
- [ 13 ] Thomas D, Surdin-Kerjan Y. Metabolism of sulfur amino acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, **61** (4): 503 ~ 532
- [ 14 ] Park J, Tai J, Roessner C A *et al.* Enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-methionine on the preparative scale. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 1996, **4** (12): 2179 ~ 2185
- [ 15 ] Thomas D, Surdin-Kerjan Y. The synthesis of the two S-adenosyl-methionine synthetases is differently regulated in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*, 1991, **226**: 224 ~ 232

## Production of SAM by Recombinant *Pichia pastoris*

LI Dong-Yang YU Jian TIAN Lu JI Xin-Song YUAN Zhong-Yi\*

(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** To utilize *Pichia pastoris* to produce S-adenosyl-L-methionine (SAM), an intracellular expression vector harboring *S. cerevisiae* SAM2 was transformed into GS115. A recombinant strain having 2 copies of expression cassette was obtained through G418 resistance screening. This strain had higher SAM synthetase activity and higher SAM production capacity than the original strain, when cultured in medium containing methanol and methionine. The carbon source and nitrogen source of medium was optimized. The results showed SAM production by this strain was closely related to carbon metabolism. With supplementation of 0.2% glycerol every day from the beginning of 3rd day, this strain produced 1.58g/L SAM when cultured in a medium containing 0.75% L-methionine and optimized carbon and nitrogen source after 6 days.

**Key words** S-adenosyl-L-methionine high production strain, recombinant, SAM synthetase, *Pichia pastoris*