

S-腺苷-L-蛋氨酸高密度发酵工艺优化

王杰鹏, 韩晋军, 李晓楠, 刘沛溢, 谭天伟

北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

摘要: 利用酿酒酵母在 5 L 发酵罐高密度发酵生产 S-腺苷-L-蛋氨酸(SAM)后期存在稳定性差的问题, 本研究考察了在补糖中添加磷酸氢二铵、谷氨酸钠、三磷酸腺苷二钠来提高酿酒酵母发酵后期的稳定性。通过 4 批 5 L 发酵罐高密度流加发酵实验研究发现: 在发酵 34 h 左右, 菌体干重超过 100 g/L 后, 开始添加 50 克 L-蛋氨酸, 并在补糖中加入 10 g/L 三磷酸腺苷二钠, 发酵 65.7 h, 最高生物量干重达到 180 g/L, SAM 产量达到 17.1 g/L。

关键词: S-腺苷-L-蛋氨酸, ATP, 高密度发酵, L-蛋氨酸

Optimization of high-cell-density fermentation process for S-adenosyl-L-methionine production

Jiepeng Wang, Jinjun Han, Xiaonan Li, Peiyi Liu, and Tianwei Tan

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

Abstract: Poor stability existed in the anaphase of the high-cell-density fermentation of *Saccharomyces crevisiae* for S-adenosyl-L-methionine (SAM) production in 5 L fermentor. To improve the fermentation stability, we studied the addition of diammonium hydrogen phosphate, sodium glutamate and adenosine disodium triphosphate into glucose feeding solution. Study of four fed-batch cultures showed that, after 34 h fermentation, when dry cell weight reached 100 g/L, the addition of 50 g pre-L-methionine and glucose feeding with 10 g/L adenosine disodium triphosphate was optimal for SAM production. Under this condition, after 65.7 h fermentation, both the dry cell weight and the yield of SAM reached the maximum, 180 g/L and 17.1 g/L respectively.

Keywords: S-adenosyl-L-methionine (SAM), ATP, high-cell-density fermentation, L-methionine

S-腺苷-L-蛋氨酸(简称SAM)是Cantoni^[1]发现的一种普遍存在于生物细胞中的生理活性物质, 由ATP和L-蛋氨酸在S-腺苷-L-蛋氨酸合成酶作用下生成。国外S-腺苷-L-蛋氨酸的生产工艺^[2]早已成熟, 而国内的生产工艺长时间落后, 相关产品长期依赖

进口。近几年, 国内研究机构在生产工艺上取得了长足的进步, 部分厂家的产品已经陆续推出市场。目前国内的研究主要集中在2个方向: 一是以固定化酶和固定化细胞为代表的酶促反应法^[3]; 二是以重组毕赤酵母^[4-6]和酿酒酵母^[7,8]为代表的微生物发

Received: January 6, 2009; **Accepted:** February 20, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 20876011), the High-tech Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2006AA020102, 2006AA020103, 2006AA020201, 2007AA100404), the State Key Development Program for Basic Research of China (973 Program) (Nos. 2007CB707804, 2007CB714304), Natural Science Foundation of Beijing, China (No. 2071002), the Science and Technology Program of Beijing, China (No. D0205004040211), the Co-building Special Project of Beijing Municipal Education Commission.

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

国家自然科学基金(No. 20876011), 国家高技术研究发展计划(863计划)(Nos. 2006AA020102, 2006AA020103, 2006AA020201, 2007AA100404), 国家重点基础研究发展规划项目(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), 北京市教育委员会共建项目专项资助。

酵法。朱闪等^[5]报道了利用中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所提供的重组毕赤酵母, SAM 在发酵罐中的产量可达到 14 g/L(具体信息不详); 邓娟娟^[6]报道了利用重组毕赤酵母在 5 L 发酵罐中加入 50 g 前体 L-蛋氨酸, 发酵 120 h 左右, SAM 产量达到 18.03 g/L。王杰鹏等^[8]报道了利用酿酒酵母在 5 L 发酵罐中加入 40 g 前体 L-蛋氨酸, 发酵 58 h 左右, SAM 产量达到 14.48 g/L。文献中酿酒酵母的产量低于毕赤酵母, 但是酿酒酵母的发酵时间约为毕赤酵母发酵时间的一半。

本研究考察了在 5 L 发酵罐中补加前体量为 50 g/罐时, 通过在补糖中添加磷酸氢二铵、谷氨酸钠、三磷酸腺苷二钠增强高密度发酵的稳定性, 将 S-腺苷-L-蛋氨酸的积累量由 14.48 g/L^[8]提高到 17.1 g/L, 生物量干重由 168 g/L 提高到 180 g/L, 前体 L-蛋氨酸的转化率提高到接近 40%。

1 材料和方法

1.1 菌株

酿酒酵母 SAM0801。

1.2 培养基

与文献[7]一致。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量的测量方法

取 1 mL 发酵液定容至 1000 mL, 用紫外可见分光光度计检测 OD_{660} , 或取 5 mL 发酵液 5000 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 发酵液用 1.5 mol/L 高氯酸定容至 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 μ L。色谱柱为反向 C18 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^[7]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 流加 10 g/L 磷酸氢二铵的发酵

从文献[7]和[8]中可以发现在酿酒酵母高密度发酵生产 S-腺苷-L-蛋氨酸的后期一直存在着不稳定的因素导致菌体死亡, 产量下降。特别是文献[8]中, 在发酵 50 多小时后出现死亡的机率很大。菌体突发性的死亡严重影响实验研究的展开以及其在工业上的应用。为了增强发酵过程的稳定性, 避免菌体突发性死亡, 本研究参考了大量文献并进行了相关摇瓶实验。文献中大都利用调节温度^[9]、溶氧^[10]、pH^[11]等方法, 本研究则利用增加发酵后期氮源和能源供应来解决。

在 5 L 发酵罐中首先尝试了在补糖中加入 10 g/L 磷酸氢二铵的发酵。发酵 34 h, 菌体干重超过 100 g/L 后, 开始流加 50 g 前体 L-蛋氨酸。

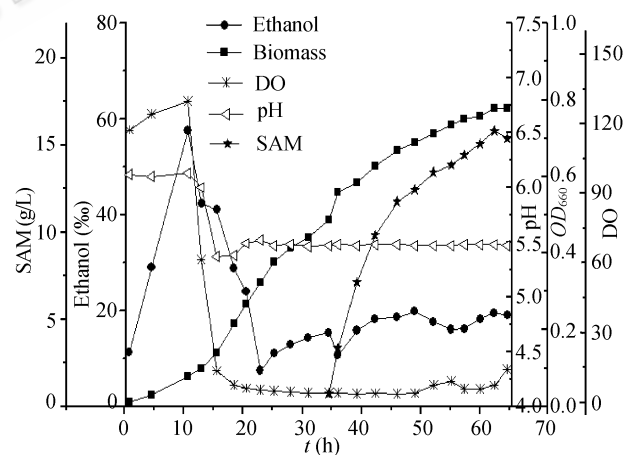


图 1 流加 10 g/L 磷酸氢二铵的发酵

Fig. 1 Fed-batch fermentation for SAM with 10 g/L diammonium hydrogen phosphate added.

如图 1 所示, 当加入前体诱导后, S-腺苷-L-蛋氨酸产量迅速积累。对照文献[8]的图 5, 图 1 中 50 h 后虽然溶氧和乙醇也出现了小幅波动, 但是产量和生物量均未出现大幅的波动。在 62 h 左右产量达到最高值 15.8 g/L, 生物量干重最高达到 170 g/L, 消耗补糖 2.3 L。

2.2 流加 10 g/L 谷氨酸钠的发酵

鉴于谷氨酸^[12,13]在细胞生长和代谢中的重要作用,尝试了在补糖中加入 10 g/L 谷氨酸钠的发酵。发酵 34 h, 菌体干重超过 100 g/L 后, 开始流加 50 g 前体 L-蛋氨酸。

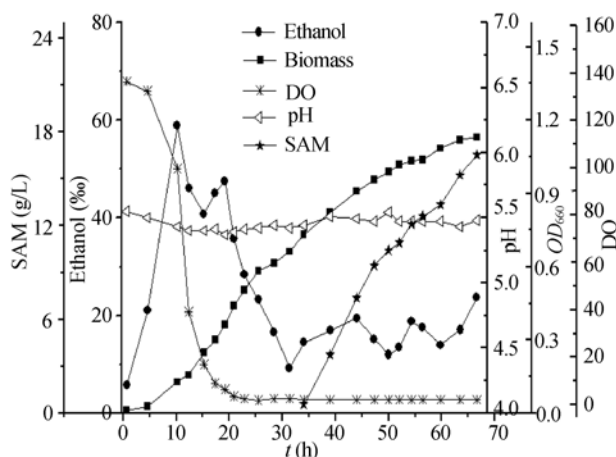


图 2 流加 10 g/L 谷氨酸钠的发酵

Fig. 2 Fed-batch fermentation for SAM with 10 g/L sodium glutamate added.

如图 2 所示, 当加入前体诱导后, S-腺苷-L-蛋氨酸产量迅速积累。对照文献[8]发酵图以及上面图 1, 尽管在 50 多小时乙醇仍有波动, 生物量和产量上也有所反映, 但是图 2 的溶氧始终维持在低水平。直到补料结束, 产量和生物量仍然保持向上的趋势。在发酵 66.6 h 产量达到最高值 16.5 g/L, 生物量干重最高达到 176 g/L, 消耗补糖 2.5 L。

2.3 流加 5 g/L 三磷酸腺苷二钠的发酵

近来对 S-腺苷-L-蛋氨酸发酵的腺苷^[14]前体的研究越来越多。因此本实验尝试了在补糖中加入 5 g/L 三磷酸腺苷二钠的发酵, 希望可以同时达到维持发酵过程稳定和提供腺苷前体基团的目的。发酵 34 h, 菌体干重超过 100 g/L 后, 开始流加 50 g 前体 L-蛋氨酸。

如图 3 所示, 当加入前体诱导后, S-腺苷-L-蛋氨酸产量迅速积累。50 多小时的时候部分参数出现波动, 可能原因是葡萄糖流加过快导致发酵液的乙醇浓度过高, 影响了菌体的生长和 S-腺苷-L-蛋氨酸的合成, 最终产量小于上一罐添加 10 g/L 谷氨酸钠时的产量。在 63.5 h 下罐产量达到最高值 16.1 g/L, 生物量干重最高达到 173 g/L, 消耗补糖 2.2 L。由此可见过高的乙醇浓度不利于 SAM 的发酵生产。

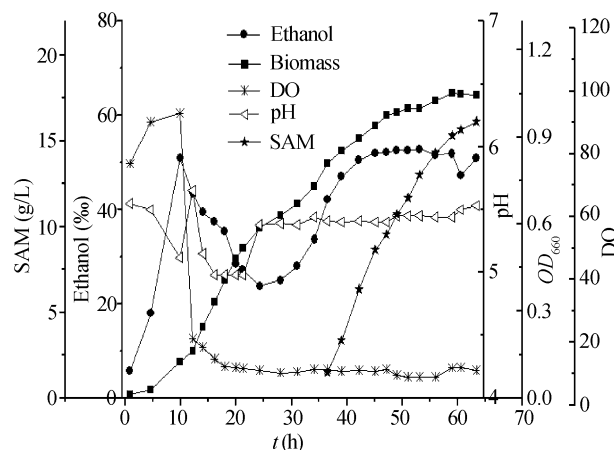


图 3 流加 5 g/L 三磷酸腺苷二钠的发酵

Fig. 3 Fed-batch fermentation for SAM with 5 g/L adenosine disodium triphosphate added.

2.4 流加 10 g/L 三磷酸腺苷二钠的发酵

在图 3 发酵数据分析的基础上, 继续尝试在补糖中加入 10 g/L 三磷酸腺苷二钠的发酵。同时鉴于高浓度乙醇对发酵过程的抑制, 减少了培养基的初糖浓度, 并且在后期发酵控制中维持相对较低的乙醇浓度。发酵 34 h, 菌体干重超过 100 g/L 后, 开始流加 50 g L-蛋氨酸。发酵结果如图 4 所示。

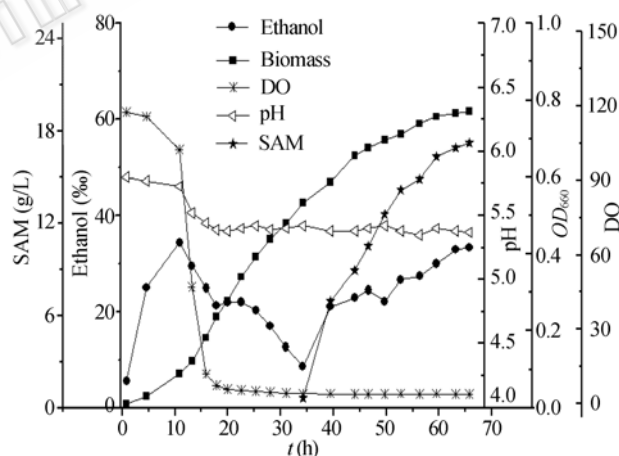


图 4 流加 10 g/L 三磷酸腺苷二钠的发酵

Fig. 4 Fed-batch fermentation for SAM with 10 g/L adenosine disodium triphosphate added.

如图 4 所示, 当加入前体诱导后, S-腺苷-L-蛋氨酸产量迅速积累。整个发酵过程中的乙醇浓度都要低于图 3, 发酵过程相对稳定。在 65.7 h 下罐产量达到最高值 17.1 g/L, 生物量干重最高达到 180 g/L, 消耗补糖 2.1 L。添加三磷酸腺苷二钠时的补糖消耗要比不加时消耗的少, 可能是由于三磷酸腺苷二钠本身就是能量物质, 降低了菌体对糖的需求量。

3 讨论

影响 S-腺苷-L-蛋氨酸高密度发酵生产的 2 个重要因素是菌株本身的生产能力和高密度发酵控制工艺。在菌株一定的情况下, 稳定可靠的高密度发酵工艺可以有效地促进产量的提升。在发酵后期, 菌体浓度很高, 高密度发酵体系的平衡非常脆弱, 很可能导致菌体的突发性死亡。通过在发酵后期补糖中添加磷酸氢二铵、谷氨酸钠、三磷酸腺苷二钠等可以有效增强菌体在高密度条件下的生存能力, 提高发酵过程的稳定性, 为进一步发酵研究提供保障。在文献[8]中, 菌体到发酵后期几乎都会出现死亡, 导致发酵参数巨幅波动, 产量开始下降。但是在本研究的发酵过程中, 直到补料结束下罐, 各参数的变化都不是很大, 发酵过程比较平稳, 如果增大补加前体量, 可以得到更高的 SAM 产量。添加三磷酸腺苷二钠的发酵实验中葡萄糖的消耗速度明显慢于其他实验, 可能是因为它本身就是能量物质, 不经过糖代谢就可以为菌体提供能量, 从而减少了菌体细胞对糖的需求量。同时, 对比图 3 和图 4 可以发现在酿酒酵母高密度发酵过程中维持相对较低的乙醇含量更有利于 SAM 的积累。

REFERENCES

- [1] Cantoni GL. S-adenosylmethionine: A new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosine triphosphate. *Biol Chem*, 1953, **204**(1): 403–416.
- [2] Shiozaki S, Shimizu S, Yamada H. Production of S-adenosyl-L-methionine by *Saccharomyces sake*. *J Biotechnol*, 1986, **4**: 345–354.
- [3] Luo YX. Studies on preparation of S-adenosylmethionine by enzymatic synthesis and microbial fermentation. Ph. D Dissertation, Jilin University, 2008.
罗赞星. 酶促转化法和微生物发酵法制备 S-腺苷甲硫氨酸的研究. 博士论文, 吉林大学, 2008.
- [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] 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.
- [6] Deng JJ. Study on the production of S-adenosylmethionine by recombinant *Pichia Pastoris*. Master Thesis, Hua Zhong Agricultural University, 2006.
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. 硕士论文, 华中农业大学, 2006.
- [7] 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.
- [8] Wang JP, Tan TW. Pre-L-methionine feeding strategy for S-adenosyl-L-methionine fermentative production. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(10): 1824–1827.
王杰鹏, 谭天伟. 发酵法生产 S-腺苷蛋氨酸前体蛋氨酸补加策略. 生物工程学报, 2008, **24**(10): 1824–1827.
- [9] Wei GY, Li Y, Du GC, *et al*. Kinetic models for the effect of temperature on batch glutathione fermentation by *Candida utilis*. *Chin J Biotech*, 2003, **19**(3): 358–363.
卫功元, 李寅, 堵国成, 等. 温度对谷胱甘肽分批发酵的影响及动力学模型. 生物工程学报, 2003, **19**(3): 358–363.
- [10] Zhang JG, Wang XG, Zhang JN, *et al*. Oxygen vectors used for S-adenosylmethionine production in recombinant *Pichia pastoris* with sorbitolas supplemental carbon source. *J Biosci Bioeng*, 2008, **105**(4): 335–340.
- [11] Wang CL, Zhu HC, Zhang XX, *et al*. Effect of pH on fermentation of S-adenosyl-L-methionine production. *Biotechnol Bull*, 2007, **6**: 154–156.
王昌禄, 朱汉春, 张晓霞, 等. pH 对 S-腺苷-L-蛋氨酸发酵的影响. 生物技术通报, 2007, **6**: 154–156.
- [12] Li Y, Chen J, Zhou ND, *et al*. Effects of amino acids and yeast extract on glutathione production. *Chin J Pharmaceuticals*, 1998, **29**(12): 537–542.
李寅, 陈坚, 周楠迪, 等. 氨基酸和酵母膏对谷胱甘肽发酵的影响. 中国医药工业杂志, 1998, **29** (12): 537–542.
- [13] Liu PY, Wang JP, Tan TW. Influences of amino acids on high-cell-density fermentation for S-adenosylmethionine production. *Chin J Biopr Eng*, 2007, **5**(4): 48–53.
刘沛溢, 王杰鹏, 谭天伟. 代谢过程中相关氨基酸对高密度发酵生产腺苷蛋氨酸的影响. 生物加工过程, 2007, **5**(4): 48–53.
- [14] Zhang JG, Wang XD, Wei DZ. Direct separation and determination of SAM and its analogs in *Pichia pastoris* by HPLC. *Ind Microbiol*, 2008, **38**(1): 6–9.
张建国, 王学东, 魏东芝. 高效液相色谱法同时测定 *Pichia pastoris* 发酵过程中腺苷甲硫氨酸相关的六种物质. 工业微生物, 2008, **38**(1): 6–9.