

· 微生物细胞合成 ·

王远山 博士，浙江工业大学教授，生物工程设备国家一流课程负责人。主要研究领域为生物催化与生物转化、微生物工程、环境生物技术等，多项成果实现产业化应用。获国家科技进步二等奖 1 项、浙江省科学技术一等奖等省部级科技成果 4 项。



微生物发酵法生产 S-腺苷甲硫氨酸的研究进展

李美京，米哲言，王金浩，胡忠策，秦海彬，王远山*，郑裕国

浙江工业大学生物工程学院，浙江 杭州 310014

李美京，米哲言，王金浩，胡忠策，秦海彬，王远山，郑裕国. 微生物发酵法生产 S-腺苷甲硫氨酸的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2248-2264.

LI Meijing, MI Zheyang, WANG Jinhao, HU Zhongce, QIN Haibin, WANG Yuanshan, ZHENG Yugu. Microbial production of S-adenosyl-L-methionine: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2248-2264.

摘 要：S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)广泛存在于生物体内，主要参与生物体内的转甲基过程、转硫过程及转氨丙基过程，具有重要的生理功能，其生产备受重视。目前 SAM 生产的研究主要集中于微生物发酵法，该方法与化学合成法和酶催化法相比，成本较低且更容易实现工业化生产。随着需求量的迅速增加，通过菌种改良提高 SAM 产量备受关注。当前 SAM 生产菌种改良的主要策略包括常规育种和代谢工程。本文综述了提高微生物生产 SAM 能力的近期研究进展并探讨了 SAM 生产中的瓶颈问题及解决方法，以期为进一步提高 SAM 产量提供思路。

关键词：S-腺苷甲硫氨酸；生理功能；常规育种；代谢工程

资助项目：国家重点研发计划(2020YFA0907900)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFA0907900).

*Corresponding author. E-mail: yuanshan@zjut.edu.cn

Received: 2022-11-30; Accepted: 2023-01-31

Microbial production of S-adenosyl-L-methionine: a review

LI Meijing, MI Zheyuan, WANG Jinhao, HU Zhongce, QIN Haibin, WANG Yuanshan*, ZHENG Yuguo

College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: S-adenosyl-L-methionine (SAM) is ubiquitous in living organisms and plays important roles in transmethylation, transsulfuration and transamination in organisms. Due to its important physiological functions, production of SAM has attracted increasing attentions. Currently, researches on SAM production mainly focus on microbial fermentation, which is more cost-effective than that of the chemical synthesis and the enzyme catalysis, thus easier to achieve commercial production. With the rapid growth in SAM demand, interests in improving SAM production by developing SAM hyper-producing microorganisms aroused. The main strategies for improving SAM productivity of microorganisms include conventional breeding and metabolic engineering. This review summarizes the recent research progress in improving microbial SAM productivity to facilitate further improving SAM productivity. The bottlenecks in SAM biosynthesis and the solutions were also addressed.

Keywords: S-adenosyl-L-methionine; physiological function; conventional breeding; metabolic engineering

腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)是一种重要的代谢中间体,存在于所有生物体中,并在各种生物反应中发挥关键作用^[1],其化学结构如图 1 所示。SAM 是由微生物细胞质或生物体组织,特别是哺乳动物肝脏中的甲硫氨酸和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)在甲硫氨酸腺苷转移酶的催化下连续反应合成^[2]。

SAM 在转甲基过程、转硫过程和转氨丙基过程中起着重要作用,也是生物体内精胺与亚精胺

合成的中间代谢物^[1]。SAM 的代谢途径为:在转甲基过程中,甲基被转移到甲基受体上, SAM 被转化成腺苷高半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, SAH),当产物 SAH 或 SAH/SAM 增加到一定水平时,会通过竞争性反馈抑制该反应。因此,SAH 水解酶连续催化 SAH 分解为高半胱氨酸和腺苷可以降低 SAH 的积累从而有利于转甲基反应的进行。在转硫过程中,高半胱氨酸在胱硫醚-β-合成酶的作用下不可逆地生成胱硫醚,而后生成半胱氨酸。在转氨丙基过程中, SAM 作为精胺、亚精胺的合成前体,继而生成蛋氨酸,然后在蛋氨酸腺苷转移酶(methionine adenosyltransferase, MAT)的作用下再次生成 SAM^[3-5]。目前 SAM 相关药品在肝病^[6]、抑郁症^[7]和癌症^[8]等疾病的治疗中具有良好的疗效,市场规模已近 100 亿元,前景广阔。

随着市场对 SAM 的需求量日益增加,目前

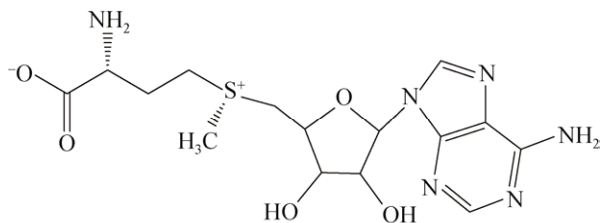


图 1 SAM 分子结构式^[1]

Figure 1 Structure of SAM molecule^[1].

对于 SAM 的工业化生产极其重视。SAM 的生产可以通过化学合成^[9]、酶催化^[10]和微生物发酵^[11]来实现。化学合成法由于产物不易纯化,产率低,环境污染等原因而没有广泛应用。酶催化法与化学合成法相比,虽然产物易纯化、纯度高,并且蛋氨酸的稳定性较高,但是前体成本高,不适合工业化生产。微生物发酵法是微生物利用体内的 SAM 合成酶催化底物 L-蛋氨酸和 ATP 转化为 SAM,然后从发酵液中提取纯化得到 SAM,其生产成本低,适合工业化生产^[9,12],也是目前 SAM 的主要生产方式。SAM 由雅培公司研制开发,通过酵母菌发酵生产,其制剂丁二磺酸腺苷蛋氨酸 1993 年在意大利上市,2000 年在我国上市。国内发酵法 SAM 生产也取得了长足进步,主要厂家包括浙江海正药业股份有限公司、正大天晴药业集团股份有限公司、浙江震元制药有限公司、山东金城生物药业有限公司等,仅山东金城生物药业有限公司 2022 年 SAM 产能就达到 180 t。国产原料药已大量出口,国产制剂打破了原研药的垄断,市场占有率已超过原研药,其中浙江海正药业股份有限公司注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸于 2022 年首家通过仿制药质量和疗效一致性评价。

笔者所在的浙江省生物催化与微生物发酵重点科技创新团队长期从事微生物发酵研究,在发酵法生产 SAM 研究方面有着丰富的经验/工作积累。2020 年笔者所在团队经过 5 轮常压室温等离子体注入(atmospheric and room-temperature plasma, ARTP)和 4 轮 γ -射线辐照诱变并以乙硫氨酸和制霉菌素为筛选压力筛选得到一株高产 SAM 的酿酒酵母突变株 AC-10,摇瓶发酵 SAM 产量达到 1.15 g/L,比出发菌株增加了 130%,通过 5 L 发酵罐分批补料高密度发酵 SAM 产量达到 5.62 g/L^[13]。2022 年笔者所在团队又对酿酒酵母 ZY1-5 进行了 ARTP 及紫外线辐照-氯化

锂(ultraviolet irradiation-lithium chloride, UV-LiCl)复合诱变,并以乙硫氨酸、L-蛋氨酸、制霉菌素和虫草素为筛选压力进行筛选,进一步以乙硫氨酸为筛选压力,通过液滴微流控培养(droplet microfluidics cultivation)对突变株 UV6-69 进行了适应性驯化,得到突变株 T11-1,在 5 L 发酵罐中 SAM 产量达到 10.72 g/L,生物量达到细胞干重(dry cell weight, DCW) 105.9 g/L, SAM 实际得率达到 21.44 mg/g 葡萄糖。进一步利用比较转录组学分析,初步揭示了 SAM 产量提高的可能机理^[14]。本文结合笔者科研经验就近年来微生物生产 SAM 方面的研究进展进行综述,提出了目前生产过程中存在的问题及解决思路,并对 SAM 的生产进行了展望。

1 SAM 的生理功能

1.1 转甲基作用

SAM 作为普遍存在的辅助因子,其主要的功能之一就是在甲基转移酶(methyltransferase, MTases)的催化下,作为 N-、C-、O-或者 S-亲核试剂的甲基供体,这是仅次于 ATP 的第二种最常见的有机辅因子,SAM 是 DNA、组蛋白和 RNA 甲基化的中心甲基供体,从而在基因组、表观基因组和转录组的水平上控制基因表达。此外,SAM 介导的甲基化可以调节各种非组蛋白的功能^[15](图 2)。如图 2 所示,甲基化是 DNA 的一种关键修饰,甲基从 SAM 转移到胞苷和腺苷可以实现 DNA 的甲基化。由于可以调节 DNA 的可及性,DNA 甲基化是基因表达的一种重要调节因素。这种修饰首先在胚胎发育期间建立,并在整个生命周期中持续进行。许多甲基转移酶,包括 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)、赖氨酸甲基转移酶(lysine methyltransferases, KMTs)和肽基精氨酸甲基转移酶(peptidyl-arginine methyltransferases,

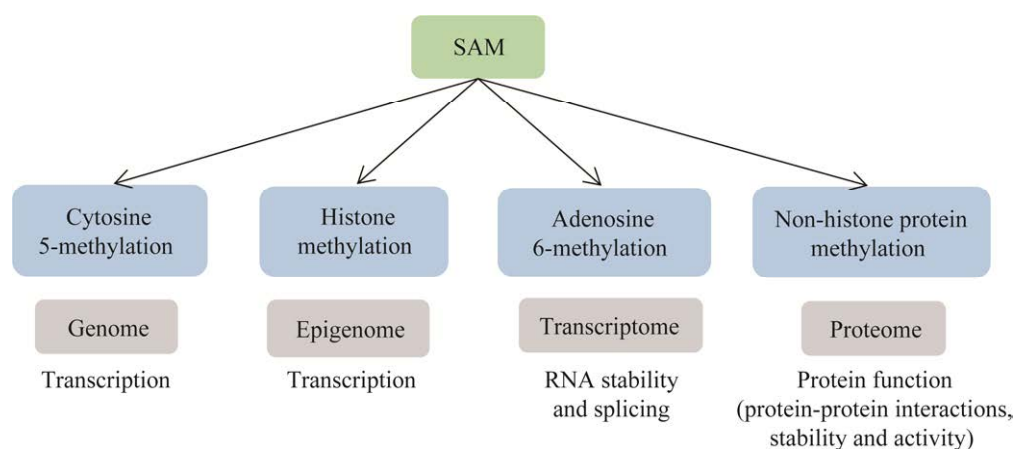


图 2 SAM 修饰大分子^[15] 绿色框：活性代谢物；蓝色框：修饰方式

Figure 2 Modification of macromolecule by SAM^[15]. Green box: Active metabolite; Red box: Modification mode.

PRMTs)等参与表观遗传调控。这些酶通过催化 DNA 和组蛋白的甲基化, 导致染色质可及性、转录因子结合和基因表达发生复杂变化。甲基转移酶和去甲基化酶对组蛋白甲基化和 DNA 甲基化的动态调节是可逆的, 受到多种代谢物的调控, 而这些代谢物的产生则受细胞信号调节, 产生的甲基转移酶和去甲基化酶也可能发生突变, 从而影响生物学结果^[16-17]。5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, MeC)是 DNA 的一种重要的表观遗传修饰, 在 DNA-蛋白质相互作用、染色质结构、表观遗传调控和 DNA 修复中起着至关重要的作用。MeC 由 DNMTs 以 SAM 为甲基供体对胞嘧啶的 C-5 位置进行酶促甲基化而产生^[18]。与 DNA 和蛋白质的修饰相似, RNA 可以分别通过甲基转移酶(也称为“Writers”)和去甲基化酶(也称为“Erasers”)进行甲基化修饰和去甲基化修饰。N6-腺苷酸甲基化(adenosine 6-methylation, m6A)是腺苷位于 6 位的 N 发生甲基化, 为信使 RNA (mRNA)和非编码 RNA (ncRNA)中广泛存在的修饰方式, 作为已知的第一个可逆的 mRNA 修饰, m6A 已经成为表位转录领域的一个主要热点, 目前已经鉴定了 m6A 的一组 Writer 蛋白和 Eraser 蛋白^[19]。

SAM 和其他代谢产物, 如甘氨酸、丙酮酸、半乳糖和苏氨酸, 也可以作为参与转录后 RNA 修饰的酶的辅助因子。这些 RNA 修饰作为信息的传感器(sensors)和换能器(transducers)可以控制代谢速率(如氧的消耗)和蛋白质合成^[15]。SAM 也与其他物质合成有关, 如裸盖菇素、肌酸、香草酸、维生素、辅酶 Q 和许多抗生素^[20-21]。Liu 等^[22]在大肠杆菌中引入甜菜碱-同型半胱氨酸甲基转移酶, 构建了以甜菜碱为甲基源的蛋氨酸循环, 利用这一循环提高了 SAM 的利用率, 并将阿魏酸的产量提高了 15.9 倍。

实际上, 产生的 SAM 分子 90%以上被用于维持甲基化反应。在人类基因组中已鉴定出 200 多种 SAM 依赖性甲基转移酶编码基因。在将甲基传递给受体化合物后, SAM 转化为 SAH。此外, 还证实了 SAH 水平升高和 SAM 水平降低会抑制转甲基化。SAM 与 SAH 的比率通常被认为是控制体内甲基化的代谢指标, 其降低表明甲基化能力的降低^[23-24]。

1.2 转硫作用

转硫代谢途径是连接 SAM 和半胱氨酸生物合成的另一个关键的分解代谢过程。SAM 在转硫作用中可以作为多种含硫化合物的前体,

例如谷胱甘肽、半胱氨酸等,半胱氨酸是由同型半胱氨酸通过转硫化反应生成的,之后再形成谷胱甘肽(glutathione, GSH),这个过程主要发生在肝脏和晶状体中^[25]。

1.3 转氨丙基作用

SAM 通过转氨丙基作用,即两次脱羧反应最后生成精胺和亚精胺。精胺和亚精胺是哺乳动物细胞中的主要多胺,并且都对衰老、免疫和癌症有重要作用^[26]。Xu 等^[27]研究了精胺与亚精胺对小鼠大脑衰老的作用,研究表明二者增加了超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性,降低了衰老大脑中丙二醛(malondialdehyde, MDA)的水平,其抗衰老作用与改善自噬和线粒体功能有关。

2 提高 SAM 产量的方式

微生物发酵法是目前最常用的 SAM 生产方法^[28],提高微生物菌株 SAM 生产能力的策略主要有菌种筛选、培养基和培养条件优化以及菌种改良等。筛选野生型菌株并进行 SAM 生产的报道极少,如 Shiozaki 等^[29]筛选到一株生产 SAM 的野生型酵母菌株 *Saccharomyces sake* k-6,通过培养条件优化,在 10 L 发酵罐中 SAM 产量达到 10.8 g/L。Li 等^[30]利用分离培养基从环境样品中筛选到 572 株菌株,其中假丝酵母(*Candida* sp.) S42-12 生产 SAM 的能力最强,积累量达到 35.7 mg/g 菌体。培养基和培养条件优化也是提高 SAM 产量的途径^[31-32]。Li 等^[33]利用营养价值高、价格低廉的豆腐黄浆液作为基质对发酵培养基进行优化,酿酒酵母 CGMCC 13760 利用优化的培养基在 5 L 发酵罐中 SAM 产量达到 16.14 g/L。Wang 等^[34]考察了在补糖的同时添加磷酸氢二铵、谷氨酸钠、三磷酸腺苷二钠以提高酿酒酵母 SAM0801 发酵后期的稳定性,通过 4 批 5 L 发酵罐高密度补料发酵

34 h 左右,菌体干重超过 100 g/L 后,开始添加 50 g 的 L-蛋氨酸,并在补糖液中加入 10 g/L 三磷酸腺苷二钠,发酵 65.7 h,最高生物量达到 180 g DCW/L, SAM 产量达到 17.1 g/L。

相较于天然菌株筛选和发酵条件优化,菌种改良是提高 SAM 产量最为有效的方法,目前常用的策略包括传统诱变育种和代谢工程^[4]。

2.1 传统育种提高 SAM 产量

传统微生物育种中最常用的方式为诱变育种,其原理就是人为地利用物理或化学因素有目的地使原始菌株的基因发生改变,在很短的时间内筛选出所需的适合大规模生产的正突变菌株,从而实现生物性状的有效改变^[35]。目前在高产 SAM 菌株选育中应用最多的诱变方法包括物理诱变和化学诱变。

常用的物理诱变包括紫外辐照、航天、ARTP 和 γ -射线辐照等。邵娜等^[36]为了研究产脲假丝酵母细胞内的硫代谢途径,实现 SAM 和 GSH 的高效联产,对产脲假丝酵母(*Candida utilis*) SZU07-01 进行了 2 轮紫外诱变和 1 轮 γ -射线辐照诱变,接种在选择培养基上进行培养,筛选到一株 SAM 和 GSH 高效联产的突变株 *C. utilis* SUGS-01,其摇瓶发酵 SAM 和 GSH 产量分别为 324 mg/L 和 220.5 mg/L,较原始菌株分别提高了 131.4%和 26.0%,其中 SAM 实际得率达到 16.2 mg/g 葡萄糖,突变株具有良好的遗传稳定性,比较适于工业化生产。Qin 等^[13]经过 ARTP 和 γ -射线辐照复合诱变并结合抗性筛选,得到高产 SAM 酿酒酵母突变株 AC-10,5 L 发酵罐补料发酵 SAM 产量达到 5.26 g/L。Huang 等^[37]利用太空培养并通过基因组重组对酿酒酵母菌株 H5 进行诱变,得到的突变株 H5M147 在 50 L 发酵罐中 SAM 产量达到 9.64 g/L,较 H5 提高了 86%。Weng 等^[14]通过 ARTP 和 UV-LiCl 复合诱变结合抗性筛选和液滴微流控培养驯化,

得到酿酒酵母突变株 T11-1, 5 L 发酵罐补料发酵 SAM 产量达到 10.72 g/L。

化学诱变是化学诱变剂与遗传物质发生生化反应, 发生的大多为点突变。近年来化学诱变筛选 SAM 高产菌株研究较少, 其中常用的诱变剂包括亚硝基胍(nitrosoguanidine, NTG)、硫酸二乙酯、甲磺酸乙酯(ethyl methanesulfonate, EMS)和氯化锂等^[38]。叶盛^[39]对 *Candida* sp. S42-12 进行多轮 NTG 诱变和 UV 诱变并用乙硫氨酸和制霉菌素进行抗性筛选, 获得的突变株 YQ-5 SAM 产量(112.1 mg/g 菌体)较出发菌株提高了 214.09%, 经培养基优化, 在以蔗糖为碳源时 SAM 产量达到 174 mg/L。

表 1 总结了 2007–2022 年期间利用常规育种方式提高微生物 SAM 产量的典型研究。从表 1 可知, 诱变育种在 SAM 产生菌育种方面应用越来越少, 近 5 年来仅有 3 篇报道, 虽然通过常规育种获得了高产 SAM 突变株, 并且提

高了 SAM 积累量, 但也存在着一些局限, 如工作量、筛选过程耗时长、菌株基因型的改变具有不确定性等。

2.2 代谢工程提高 SAM 产量

Chen 等^[40]综述了提高菌株生产 SAM 能力的不同策略。本文主要从以下 4 个方面进行综述: (1) 过表达 SAM 合成的相关基因; (2) 支路代谢调控; (3) ATP 调控; (4) 其他代谢途径。近年来, 利用代谢工程策略提高 SAM 产量的研究日益受到重视(表 2), 研究对象主要为遗传背景清晰的酵母菌或者大肠杆菌, 经过改造显著提高了 SAM 产量。本文关于菌株中 SAM 的代谢网络如图 3 所示。

2.2.1 过表达 SAM 合成相关基因

SAM 合成酶可在胞内催化 L-蛋氨酸和 ATP 生成 SAM, 通过强化 SAM 合成酶的表达可使得 SAM 过量积累。Choi 等^[41]对出发菌株酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) sake K6 进行紫

表 1 常规育种方式生产 SAM 的研究

Table 1 Researches on SAM production by conventional breeding methods

Strain	Strategy	Titer (g/L) (fermentation time)	Yield (mg/g)	References
<i>S. cerevisiae</i> ZY	ARTP and γ -ray radiation mutagenesis, ethionine and nystatin resistance screening	5.62 (68 h)	–	[13]
<i>S. cerevisiae</i> H5	Spaceflight cultivation and genome shuffling	9.64 (84 h)	–	[37]
<i>S. cerevisiae</i> ZY1-5	ARTP and UV-LiCl mutagenesis, droplet microfluidics cultivation with ethionine as screening pressure	10.72 (52 h)	21.4	[14]
<i>Candida tropicalis</i> S42-12	NTG and UV mutagenesis, ethionine and nystatin resistance screening, optimization of fermentation medium	1.74 (48 h)	–	[39]
<i>S. cerevisiae</i> CGMCC 13760	Optimization of fermentation medium	16.14 (60 h)	–	[33]
<i>S. cerevisiae</i> SAM0801	Optimization of fermentation medium and fed-batch fermentation	17.10 (65.7 h)	–	[34]
<i>Candida</i> sp. S42-12	Isolation and screening of SAM producing microorganisms from environmental samples	– (96 h)	–	[30]
<i>C. utilis</i> SZU07-01	UV and γ -ray radiation mutagenesis	0.324 (27 h)	16.2	[36]

–: Not mentioned or cannot be calculated due to the lack of glucose consumed.

表 2 近年来利用代谢工程策略提高 SAM 产量的研究

Table 2 Summary of improving microbial SAM yield by using metabolic engineering

Strategy	Strain	Genetic manipulation	Titer (fermentation time)	Yield (mg/g)	References
Overexpression genes involved in SAM synthesis	<i>S. cerevisiae</i> K6	MAT from <i>S. cerevisiae sam2</i> was overexpressed in the mutant	2.80 g/L (72 h)	–	[41]
	<i>E. coli</i> BL21	The recombinant <i>E. coli</i> strain was constructed for effectively producing SAM by introducing <i>metK</i>	300.9 mg/L (20 h)	4.30	[42]
	<i>S. cerevisiae</i> ZJU001	Multicopy integrated plasmid pYMIKP-SAM2 was introduced into the wild strain	8.81 g/L (52 h)	–	[43]
	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Knocking out <i>thrb</i> , <i>metb</i> , <i>mcb</i> and <i>Ncgl2640</i> , overexpressing <i>metK</i> , <i>vgb</i> , <i>lysC^m</i> , <i>hom^m</i> , <i>metX</i> and <i>metY</i>	196.7 mg/L (48 h)	39.34	[44]
	<i>S. cerevisiae</i> CGMCC 2842	Co-expressing <i>mat6</i> and <i>sam2</i>	1.55 g/L (48 h)	31.00	[45]
Regulation of branch metabolism	<i>P. pastoris</i> DS1	Knocking out <i>cys4</i>	13.01 g/L	–	[47]
	<i>P. pastoris</i> GS115	Overexpressing MAT gene and knocking out CBS gene	13.5 g/L (114 h)	–	[48]
	<i>Pichia pastoris</i> GS115/DS16	Knocking out <i>sah1</i> , <i>spe2</i> and <i>msm1</i> , optimizing the amount of L-met additions	–	–	[49]
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HSAM2	Knocking out <i>thrB</i> and overexpressing <i>sam2</i> , optimization of fermentation parameters	412.01 mg/L (60 h)	–	[50]
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Recombinant plasmid expressing <i>sam2</i> in <i>S. cerevisiae</i> and <i>metA</i> and <i>metB</i> in <i>E. coli</i> was combined with the absence of <i>mccA</i>	648.99 mg/L (74 h)	–	[51]
Regulation of ATP	<i>C. utilis</i> CCTCC M 209298	The foreign <i>ATP6</i> gene from <i>Arabidopsis</i> was expressed in the parental strain	223.9 mg/L (30 h)	–	[55]
	<i>S. cerevisiae</i> BY4741	The introduction of water-forming NADH oxidase, <i>Vitreoscilla</i> hemoglobin and phosphite dehydrogenase in combination with overexpression of the gene <i>sam2</i>	54.92 mg/L (28 h)	2.57	[56]
	<i>S. cerevisiae</i> WT15-33	Knocking out <i>sod1</i> and optimization of fermentation medium	10.1 g/L (118 h)	–	[59]

(待续)

(续表 2)

Strategy	Strain	Genetic manipulation	Titer (fermentation time)	Yield (mg/g)	References
	<i>E. coli</i>	Using riboswitches based on ATP sensitivity	2.32 mg/L (24 h)	–	[57]
	<i>E. coli</i> BL21	Expression of adenosine kinase, adenylate kinase, and acetate kinase	8.7 g/L (18 h)	–	[58]
Engineering of other metabolic pathways	<i>S. cerevisiae</i> CGMCC 2842	Knocking out <i>kcs1</i> and <i>arg82</i>	8.86 g/L (128 h)	–	[52]
	<i>S. cerevisiae</i> HDL	Knocking out <i>hpa3</i> , <i>sah1</i> and <i>glc3</i> , overexpressing <i>DAAO</i> and <i>L-PheDH</i>	10.3 g/L (80 h)	–	[60]
	<i>S. cerevisiae</i> BY4742	Genome-scale engineering using a multifunctional whole-genome CRISPR (MAGIC) system	36.5 mg/L	–	[61]
	<i>S. cerevisiae</i> CGMCC 2842	Knocking out <i>reg1</i> and overexpressing <i>snf1</i>	8.28 g/L (140 h)	–	[64]

–: Not mentioned or cannot be calculated due to the lack of glucose consumed.

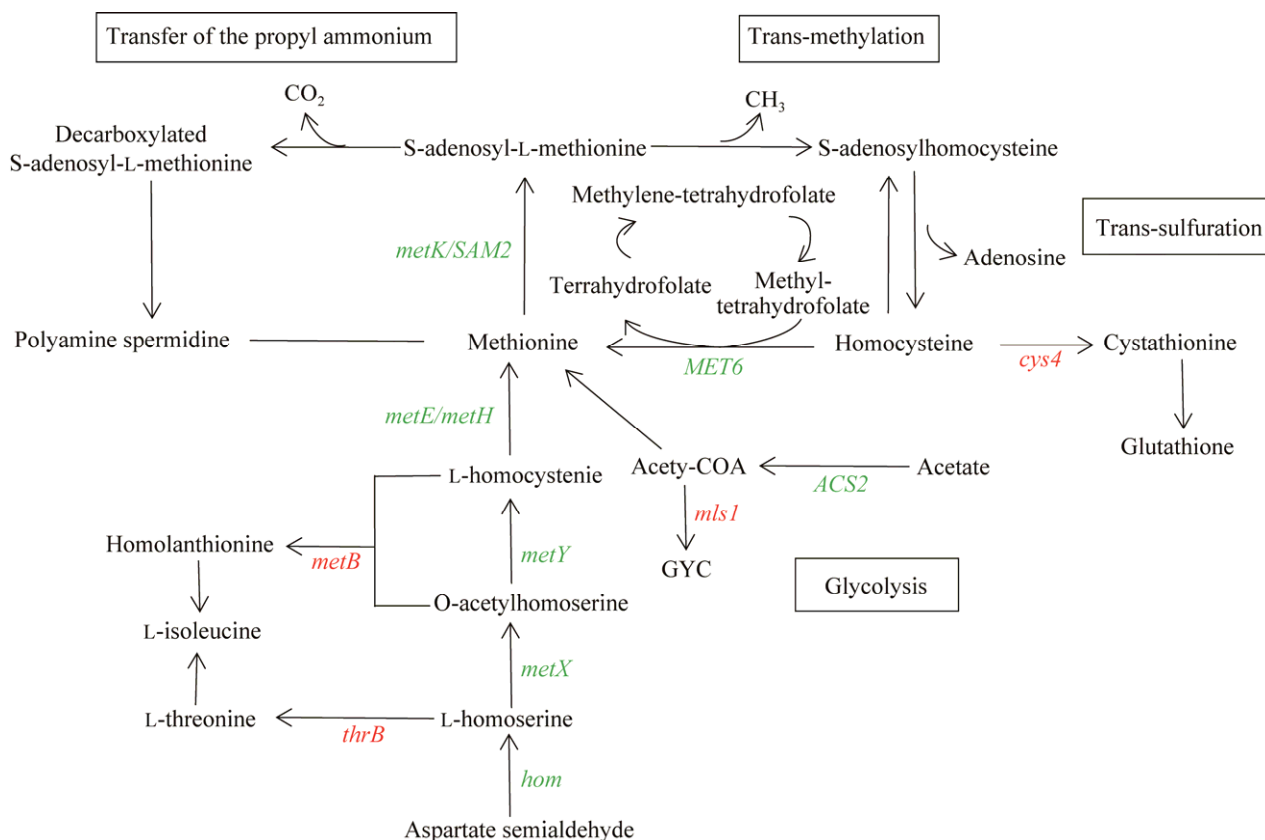


图 3 SAM 在微生物中的生物合成途径 红色字体：敲除该基因；绿色字体：过表达该基因

Figure 3 Biosynthesis pathway of SAM in microbes. Red font: Gene knocked out; Green font: Gene overexpressed.

外诱变, 得到 3 000 株突变株, 通过营养缺陷筛选法分离出一株亮氨酸缺陷型突变株 K6-1, 并过表达 SAM 合成酶基因 *SAM2*, 最终重组菌株 SK6-1 SAM 产量达到 2.8 g/L, 较出发菌株增加了 21.7%。Yu 等^[42]将来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K-12 编码 SAM 合成酶的 *metK* 基因克隆并连接至质粒 pET-28a 中, 得到重组质粒 pET-28a-*metK*, 然后将其转化至大肠杆菌 BL21 中, 构建了重组菌株, 摇瓶发酵 SAM 产量达到 34.5 mg/L, 经过培养基及培养条件优化, 最终摇瓶发酵 SAM 产量达到 128.2 mg/L, SAM 实际得率为 6.41 mg/g 葡萄糖, 在 5 L 发酵罐中发酵 SAM 产量达到 300.9 mg/L, SAM 实际得率为 4.3 mg/g 葡萄糖。来自酿酒酵母的两种酶 SAM 合成酶 I 与 SAM 代谢的调节机制有关, 并且会受到产物积累的抑制。相比之下, 由 *sam2* 基因编码的 SAM 合成酶 II 不受相对高浓度的 SAM 的抑制。因此选择 *sam2* 进行过表达或改造是优化 MAT 基因最适合的选择。Zhao 等^[43]将多拷贝整合质粒 pYMIKP-*SAM2* 导入野生型酿酒酵母菌株 ZJU001 染色体中, 构建了重组菌株 R1-ZJU001。该重组菌株具有更高的 MAT 活性, SAM 合成能力也得到提升, 在 15 L 发酵罐利用分批补料策略培养 52 h 后 SAM 产量达到 8.81 g/L, 比亲本菌株增加了 27.1%。Han 等^[44]以谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032 为基础, 通过敲除 *thrB*、*metB*、*mcbR* 和 *Ncgl2640* 等 4 个基因, 构建了一株能够积累 SAM 的重组菌株 *C. glutamicum* HW104, 进而在菌株 HW104 中以不同的组合过表达 *metK*、*vgb*、*lysC^m*、*hom^m*、*metX* 和 *metY* 等 6 个基因, 结果显示同时过表达 *metK* 和 *vgb*, 得到的重组菌株 HW105 比其他菌株产生更多的 SAM, 在发酵 48 h 后 SAM 产量达到 196.7 mg/L, SAM 实际得率达到 39.34 mg/g 葡

萄糖。Chen 等^[45]在酿酒酵母 CGMCC 2842 中共表达编码蛋氨酸合成酶的基因 *mat6* 和 *sam2* 以增加 SAM 的积累量, 最终重组菌株 YGSPM 的 SAM 产量达到 1.55 g/L, 是原始菌株的 2.34 倍, SAM 得率达到 31 mg/g 葡萄糖。

2.2.2 支路代谢的调控

从图 3 可以看出 SAM 的积累不仅可以通过过表达 SAM 合成酶最大化, 还可以通过调控其支路代谢来达到最大化。同型半胱氨酸位于 SAM 代谢的关键分支点, 具有 3 种不同的代谢途径: 形成蛋氨酸、恢复为 SAH 或在半胱硫氨酸合成酶 (cysteine synthase, CBS) 存在的情况下形成胱硫醚。CBS 在 SAM 分解中起着重要作用, 通过破坏 CBS 阻断胱硫醚合成途径可能会增强 SAM 的积累^[46]。Qin 等^[47]利用启动子文库中的弱启动子 *P_{G12}* 将胱硫醚合成途径中的关键酶 CBS 编码基因 *cys4* 表达下调, 构建了 CBS 合成途径被逐渐弱化的重组毕赤酵母 G12-CBS, 摇瓶培养发现, G12-CBS 的生长与出发菌 DS16 相比没有明显差异, 但胞内 SAM 浓度则显著提高, SAM 产量达到 1.68 g/L, 提高了 48.8%。随后, 采用优化的 L-蛋氨酸补料策略, 在 15 L 发酵罐中通过分批补料发酵, G12-CBS SAM 产量提高至 13.01 g/L。最后, 在比较转录组学分析的基础上, 筛选出 5 个高表达的基因, 其中过表达 *gdh2* 基因的重组菌株摇瓶培养时, SAM 产量达到 2.71 g/L, 提高了 52.3%。过表达 MAT 基因或者敲除 CBS 基因都可以使 SAM 过量积累。He 等^[48]研究了在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 中两种路线协同作用对 SAM 产量的影响。具有异位 MAT 基因的重组菌株 Gsam SAM 产量达到 0.74 g/L, 是原始菌株的 20 倍, 进一步敲除菌株 Gsam 的 CBS 基因得到重组菌株 Gsam-*cbs*, 其摇瓶发酵 SAM 产量达到 3.6 g/L, 是原始菌株的 56 倍, 5 L 发酵罐中发酵 SAM 产

量达到 13.5 g/L。Su 等^[49]通过敲除 *P. pastoris* GS115/DS16 (过表达高活性 MAT 的重组菌)的 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶基因 *sah1*、S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶基因 *spe2* 和 L-甲硫氨酰 tRNA 合酶基因 *msm1*, 减少 SAM 在胞内的消耗, 提高了重组菌积累 SAM 的能力, 进一步优化 L-蛋氨酸添加量, 突变株 G/Dsah 和 G/Dmsm 单位菌体的 SAM 产量分别提高了 26.4%和 28.9%。Jiang 等^[50]为了提高无蛋氨酸培养基中 SAM 的产量, 在解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) HSAM2 中敲除 *thrB* 阻断分支途径后, 所得突变体 HSAM4 SAM 达到 143.93 mg/L, 比 HSAM2 增加了 42%。过表达 *sam2* 使重组菌 SAM 产量提高至 226.92 mg/L, 在对关键发酵参数进行优化后, 突变体 HSAM4 SAM 产量最高达到 412.01 mg/L, SAM 的实际得率达到 41.2 mg/g 葡萄糖。Ruan 等^[51]设计了 SAM 的合成途径, 并将其与 *B. amyloliquefaciens* 中的三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle)相结合, 以提高无蛋氨酸培养基中 SAM 的产量, 通过酿酒酵母中 *sam2* 和大肠杆菌中 *metA* 与 *metB* 的重组质粒表达结合 *mccA* 的缺失, 构建了重组毕赤酵母 HSAM3, 最终 SAM 产量达到 648.99 mg/L。

2.2.3 ATP 调控

ATP 为几乎所有的细胞功能提供动力, 是细胞新陈代谢的至关重要的调节剂。细胞必须产生足够的 ATP 以满足其生物合成需求和维持细胞生长。ATP 参与许多代谢反应, 控制 ATP 供应和消耗是实现微生物生产高产量目标代谢物的最有效的策略之一^[49,52-53]。细胞内 ATP 生物合成的调节策略包括调节烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)的可用性、调节电子传递链、氧供应、质子梯度和 FoF1-ATPase 活性。基于目前对物质代谢和能量代谢的更深入理解以及合成生物学的迅

速发展, 学者们已在各种宿主菌中通过 ATP 调控来提高目标产物的浓度和生产能力^[54]。

作为前体和驱动力, ATP 对于微生物中 SAM 的合成是必不可少的。Xu 等^[55]为了改善 *C. utilis* CCTCC M 209298 中 SAM 过量产生导致的 ATP 供应不足问题, 在亲本菌株中表达来自拟南芥的外源 *ATP6* 基因, 通过基因组整合构建突变体 *C. utilis ATP6* 菌株, 增加了 F₀F₁-ATP 酶活性和 NADH 可用性, 并改善了 ATP 再生和细胞内 ATP 供应。最终突变株 *C. utilis ATP6* 的 SAM 产量达到 223.9 mg/L, 与亲本菌株相比增加了 46.6%。Chen 等^[56]在酿酒酵母中采用了一种新的 ATP 调控策略来增强 SAM 的生物合成, 包括改变 NADH 的可用性和调节氧气供应两个方面。在引入产水型的 NADH 氧化酶、透明颤菌血红蛋白(vitreoscilla hemoglobin, VHB)和亚磷酸脱氢酶的基础上, 结合 *sam2* 的过表达, 设计了不同的 ATP 调控系统。其中引入 VHB 所得到的重组菌株 ABYSM-2 SAM 产量达到 54.92 mg/L, 比原始菌株增加了 67%, SAM 实际得率为 2.75 mg/g 葡萄糖。Chen 等^[57]首次提出了一种基于 ATP 敏感的核糖开关 *ydaO* 基序、多聚磷酸酶(polyphosphate kinase, PPK)和 VHB 的新 ATP 再生策略并在大肠杆菌中得到成功应用, 促进了 GSH 和 SAM 的联产。在发酵过程中, 重组菌株 CGS-2 生产 GSH 和 SAM 的能力比原始菌株分别提高了 137.4%和 82.18%。由于 ATP 价格昂贵, 导致 SAM 生产成本提高, 所以有研究者尝试利用一些前体物质来代替 ATP 以降低成本。Jiang 等^[58]构建了同时表达腺苷激酶、腺苷酸激酶和乙酸激酶 3 种酶的重组大肠杆菌 BL21, 催化底物腺苷(adenosine, ACP)合成 ATP, 并优化了反应体系, 最终重组菌株 SAM 产量达到 8.7 g/L, ACP 转化率达到 72.5%。最近笔者所在团队 Hu 等^[59]分别研究了 NADH

的转化和 ATP 酶必需基因的相对表达。结果表明, *sod1* 基因缺失有利于 ATP 的生成, ATP 对 SAM 的合成有积极的调控作用。所以从酿酒酵母 WT15-33 中敲除 *sod1* 基因, 得到提高 ATP 供给的突变株 Δ SOD1, 然后通过培养基优化, 最终在 5 L 发酵罐中突变株 SAM 产量达到 10.1 g/L, 比原始菌株提高了 38.4%。

2.2.4 其他代谢途径

除了以上方向, 目前也有利用其他途径增加 SAM 产量的研究。目前发酵法生产 SAM 都以 L-蛋氨酸为底物, 但消旋的 DL-蛋氨酸由于

价格便宜, 更适合用作工业化 SAM 生产的底物。然而, 由于 SAM 合成酶的底物专一性, D-蛋氨酸对 SAM 的形成效率不高。为了提高 DL-蛋氨酸的利用效率, 连佳长团队^[60]对模式菌株酿酒酵母 BY4741 和工业菌株 *S. cerevisiae* HDL 进行了改造, 以利用 DL-蛋氨酸生产 SAM (图 4), 首先通过破坏编码 D-氨基酸-N-乙酰转移酶的 *hpa3* 基因, 在胞内积累 D-蛋氨酸, 然后引入密码子优化的 D-氨基酸氧化酶基因(D-amino acid oxidase gene, *DAAO*)和 L-苯丙氨酸脱氢酶基因(L-phenylalanine dehydrogenase gene, *L-PheDH*)

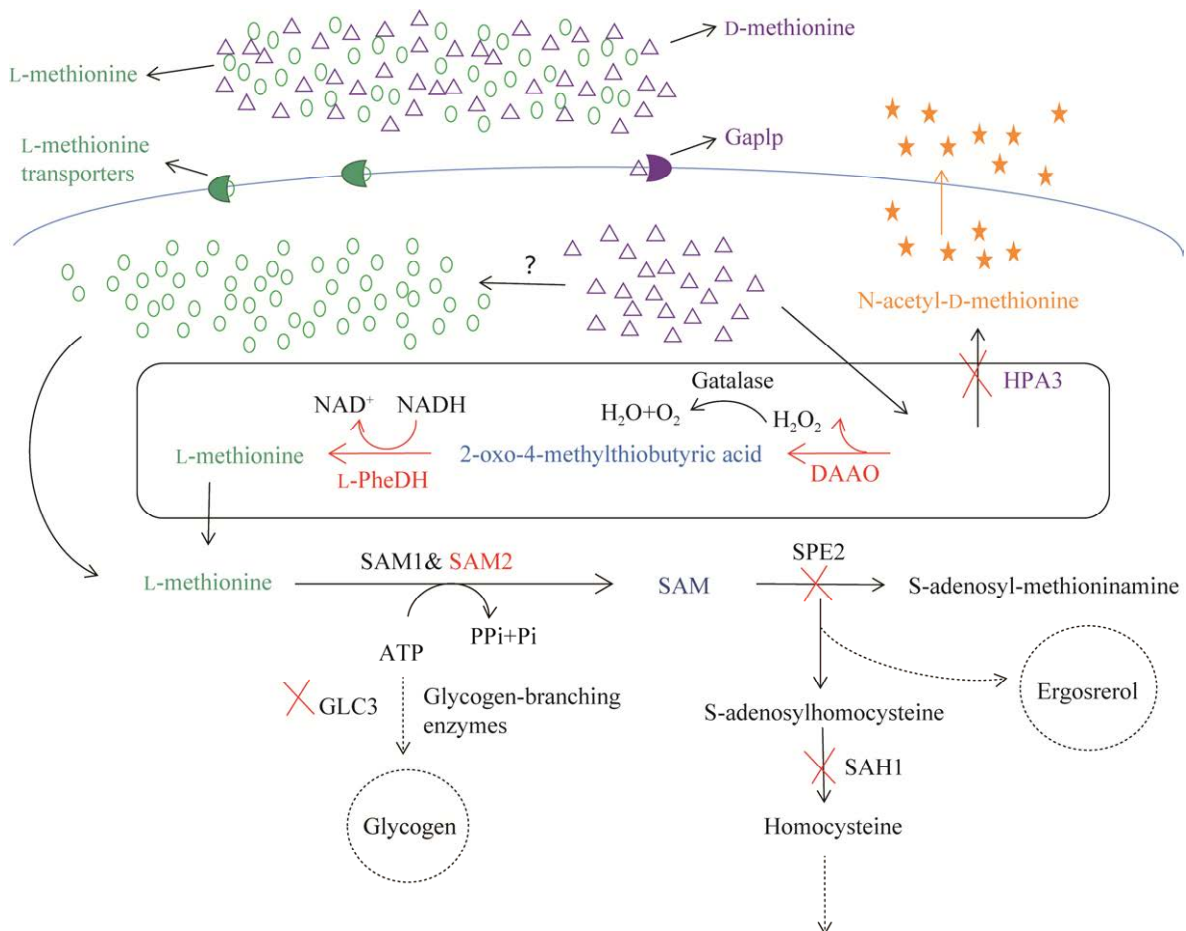


图 4 重组 *Saccharomyces cerevisiae* DL-蛋氨酸转化 SAM 的代谢途径^[60] 红色字体: 过表达该基因; 红色叉: 抑制该代谢途径

Figure 4 Metabolic pathway for the conversion of DL-methionine into SAM in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*^[60]. Red font: Overexpression of this gene; Red fork: Inhibition of this metabolic pathway.

将 D-蛋氨酸转化为 L-蛋氨酸。在 0.5 g/L DL-蛋氨酸条件下,改造的 BY4741 中的 SAM 浓度和含量分别提高了 110%和 72.1%,而在改造的菌株 HDL 中, SAM 的浓度和含量分别提高了 38.2%和 34.1%。继而利用新开发的 CRISPR 工具将 *DAAO* 和 *L-PheDH* 表达框整合至 *hpa3* 和 *sah1* 基因座, *sam2* 表达框整合至 HDL 菌株 *spe2* 和 *glc3* 基因座,在 0.5 g/L DL-蛋氨酸条件下,所得的重组菌株 HDL-R2 SAM 浓度和含量分别增加 289%和 192%。在 10 L 发酵罐中发酵时,补加 16 g/L DL-蛋氨酸可积累 10.3 g/L SAM, SAM 含量达到 242 mg/g 菌体。虽然在酵母中已经实现了 SAM 高水平生产,但还需要新的代谢工程策略来进一步提高重组菌的工业应用性。Dong 等^[61]利用多功能全基因组 CRISPR (multi-functional genome-wide CRISPR, MAGIC) 系统进行基因组规模工程(genome-scale engineering, GSE)以确定 SAM 过量生产的新靶点,并在工业酵母菌株中进一步验证这些新确定靶点的效果。首先,构建并优化了 SAM 响应的基因回路作为细胞内 SAM 浓度的生物传感器。然后使用生物传感器辅助的 GSE 来识别新的遗传决定因素,以增强酵母中 SAM 的积累,其中 *snz3*、*rfc4* 和 *rps18b* 的上调被确定为最佳组合并进行了转录组学和代谢组学的分析,以探究增强 SAM 积累的分子机制。最后将最佳组合应用于实验室酵母菌株 BY4742- iAID6 和工业酿酒酵母 HD, SAM 生产力分别提高了 2.2 倍和 1.6 倍。

糖酵解在碳代谢中起关键作用,通常是代谢工程的目标。糖酵解中间体与 L-天冬氨酸、L-丝氨酸和 L-蛋氨酸等氨基酸的代谢有关。在这些中间体中,丙酮酸被转化为乙酰辅酶 A,后者在三羧酸循环中代谢,转化为 L-蛋氨酸或 L-天冬氨酸。3-磷酸甘油酸酯通过多步反应转化为 L-丝氨酸。L-天冬氨酸和 L-丝氨酸通过不同

途径参与 L-蛋氨酸的代谢。因此,糖酵解的代谢重编程可能是一种极有潜力的提高酵母 SAM 合成的策略^[62-63]。为提高 SAM 在酵母中的积累,Chen 等^[52]提出了一种通过改变肌醇焦磷酸(inositol pyrophosphates, IPs)代谢增强糖酵解的策略。他们将酿酒酵母 CGMCC 2842 中与 IPs 代谢相关的基因 *arg82*、*ipk1* 和 *kcs1* 分别敲除。与对照组相比, *kcs1* 和 *arg82* 基因的缺失分别使重组菌株 SAM 产量增加了 83.3%和 31.8%。除了多种糖酵解基因转录水平和相关酶活性提高外,糖酵解中间体和 ATP 水平也有所提高。为进一步证实可行性,在缺失苹果酸合成酶基因 *mls1* 的 SAM 高产菌株 *Ymls1ΔGAPmK* 中敲除 *kcs1* 基因,并将乙酰辅酶 A 合成酶基因 *acs2* 和婴儿利什曼原虫 SAM 合成酶基因 *metK1* 共表达,得到重组菌株 *Ymls1Δkcs1ΔGAPmK*,其在 250 mL 摇瓶和 10 L 发酵罐中 SAM 的发酵产量分别达到 2.89 g/L 和 8.86 g/L,与菌株 *Ymls1ΔGAPmK* 相比分别提高了 30.2%和 46.2%, SAM 的得率分别为 57.8 mg/g 葡萄糖和 13.6 mg/g 葡萄糖。Chen 等^[64]利用酿酒酵母 CGMCC 2842 敲除 *reg1* 基因和过表达 *snf1* 来缓解葡萄糖抑制,提高葡萄糖转运和糖酵解相关基因的表达水平,提高葡萄糖利用率,从而提高酿酒酵母 SAM 的产量。最终突变株 *Yreg1ΔPsnf1* 的 SAM 产量达到 8.28 g/L,比原始菌株提高了 51.6%。

综上所述,影响微生物 SAM 合成的关键因素主要为 SAM 合成酶的活力、SAM 的代谢和底物 ATP 的供应等。其相应的改造策略主要包括过表达 SAM 合成酶相关基因增强菌株生产 SAM 能力、阻断 SAM 支路代谢增加 SAM 积累以及辅因子 ATP 调控强化 ATP 供应提高菌株 SAM 的积累。

总之,从文献来看,与传统诱变育种方法相比, SAM 产生菌的代谢工程改造已成为研究

热点,这主要是由于:(1)代谢工程策略通过生物信息学分析和实验可以确定宿主菌的关键代谢途径与代谢节点,随之进行针对性改造以提高目标产物的产量和菌种性能,操作步骤简单^[64];(2)代谢工程改造手段包括基因敲除和过表达等技术成熟^[64];(3)CRISPR-Cas9系统的发展为SAM产生菌的改造提供了高效、快速并且简便的工具^[65];(4)SAM响应的基因回路的构建和应用大大提高了重组SAM生产菌株的筛选效率^[49]。

3 结论与展望

SAM市场前景广阔,其高效生产具有重要意义。微生物发酵法是SAM主要生产方法,当前的研究重点是通过菌种改良提高SAM产量,虽然已取得了一定的进展,但在菌株生产能力提高和SAM检测等方面还存在着挑战。

在生产能力方面,野生菌株和工程菌株的SAM合成能力都有很大提升空间,需要更系统的工作构建高效的细胞工厂以更好地满足工业化需求^[66-67]。鉴于目前重组菌种用于工业化生产存在一定困难,传统的诱变育种仍将发挥重要作用^[68],液滴微流控驯化等技术也能够提高菌种改良效率^[69],而基因工程技术在菌种改造中也展现了巨大潜力,是今后的重点发展方向,更值得关注的是将系统生物学、合成生物学和进化工程的工具和策略与传统代谢工程相结合的系统代谢工程技术^[70]。组学技术的进步为确定关键途径和靶点并对菌种进行针对性改造、构建性状提高的生产菌种提供了有力的工具箱^[71],如Weng等^[14]和Dong等^[61]通过组学分析解析了重组菌株SAM产量提高的机理,Hayakawa等^[72]通过代谢组分析确定了酿酒酵母SAM合成的限速步骤。

在SAM检测方面,目前SAM主要利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography,

HPLC)方法检测,工作量大且繁琐,开发高通量检测方法可以大大加快SAM高产菌株筛选效率并实现发酵过程的高效控制与检测。近年来,由于能灵敏、特异和快速感应代谢物浓度信号并将其转换为特定信号输出,基于转录因子的代谢物生物传感器(biosensor)在代谢工程和合成生物学中备受关注^[69]。基因电路是目前合成生物学的热点之一,常用于理性育种等方面,且在理性育种的高通量筛选中具有重要作用^[73]。Umeyama等^[74]基于大肠杆菌的操纵基因*metO*和抑制子*MetJ*在酿酒酵母中构建了一个SAM响应基因电路,可以监测胞内SAM相对含量,进而从基因组文库中鉴定到一个促进SAM合成的多拷贝增强子。Dong等^[61]利用MAGIC技术在酿酒酵母中构建并优化了一个SAM响应的基因电路,用于确定SAM过量合成关键靶点并在工业菌株中进行了验证,但具体的SAM含量仍用HPLC检测。Chen等^[75]构建了一种基于转录因子的生物传感器,能够以荧光作为输出,以剂量依赖的方式对酿酒酵母细胞中SAM进行传感。这几项研究为开发高通量SAM特异性生物传感器、提升SAM检测效率奠定了基础。

综上所述,基于诱变-遗传操作-高通量筛选-生物信息学分析-发酵工艺优化多策略组合将成为SAM生产菌改良的主流技术,为SAM工业化生产奠定扎实的基础。

REFERENCES

- [1] 颜光波. ATP以及S-腺苷甲硫氨酸的多酶催化合成研究[D]. 武汉:湖北大学硕士学位论文,2021.
YAN GB. Studies on the multi-enzyme catalytic synthesis of ATP and S-adenosyl-L-homocysteine[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei University, 2021 (in Chinese).
- [2] de la HG, CANTONI GL. The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine[J]. Journal of Biological Chemistry, 1959, 234(3): 603-608.
- [3] ZHAO WJ, SHI F, HANG BJ, HUANG L, CAI J, XU

- ZN. The Improvement of SAM accumulation by integrating the endogenous methionine adenosyltransferase gene *SAM2* in genome of the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 178(6): 1263-1272.
- [4] CHU J, QIAN JC, ZHUANG YP, ZHANG SL, LI YR. Progress in the research of S-adenosyl-L-methionine production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(1): 41-49.
- [5] LIU Q, LIN Q, LI XY, ALI M, HE J. Construction and application of a "superplasmid" for enhanced production of antibiotics[J]. Applied Microbiology Biotechnol, 2020, 104(4): 1647-1660.
- [6] BIAN XY, SHI DM, XING KL, ZHOU HX, LU LL, YU DH, WU WZ. *AMD1* upregulates hepatocellular carcinoma cells stemness by FTO mediated mRNA demethylation[J]. Clinical and Translational Medicine, 2021, 11(3): e352.
- [7] GALIZIA I, OLDANI L, MACRITCHIE K, AMARI E, DOUGALL D, JONES TN, LAM RW, MASSEI GJ, YATHAM LN, YOUNG AH. S-adenosyl-L-methionine (SAME) for depression in adults[J]. The Cochrane Database of Systematic Reviews, 2016, 10(10): CD011286.
- [8] MAHMOOD N, ARAKELIAN A, CHEISHVILI D, SZYF M, RABBANI SA. S-adenosylmethionine in combination with decitabine shows enhanced anti-cancer effects in repressing breast cancer growth and metastasis[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020, 24(18): 10322-10337.
- [9] SHOBAYASHI M, MUKAI N, IWASHITA K, HIRAGA Y, IEFUJI H. A new method for isolating S-adenosylmethionine (SAM)-accumulating yeast[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 69(6): 704-710.
- [10] 刘艳辉. 酶法生产 S-腺苷蛋氨酸[D]. 北京: 北京化工大学博士学位论文, 2016.
LIU YH. The enzymatic production of S-adenosyl-L-ethionine[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Beijing University of Chemical Technology, 2016 (in Chinese).
- [11] 陈原, 肖冬光. 发酵法制备 S-腺苷-L-甲硫氨酸的研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(9): 435-438.
CHEN Y, XIAO DG. Research progress in S-adenosyl-L-methionine producing with fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(9): 435-438 (in Chinese).
- [12] 汤亚杰, 李艳, 李冬生, 李红梅. S-腺苷甲硫氨酸的研究进展[J]. 生物技术通报, 2007(2): 76-81.
TANG YJ, LI Y, LI DS, LI HM. Advance on the study of S-adenosyl-L-methionine[J]. Biotechnology Bulletin, 2007(2): 76-81 (in Chinese).
- [13] 秦海彬, 牛坤, 王远山. 产 S-腺苷蛋氨酸酵母菌的诱变选育[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(21): 23-27.
QIN HB, NIU K, WANG YS. Breeding of S-adenosylmethionine-producing yeast by mutagenesis[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(21): 23-27 (in Chinese).
- [14] WENG CY, MI ZY, LI MJ, QIN HB, HU ZC, LIU ZQ, ZHENG YG, WANG YS. Improvement of S-adenosyl-L-methionine production in *Saccharomyces cerevisiae* by atmospheric and room temperature plasma-ultraviolet compound mutagenesis and droplet microfluidic adaptive evolution[J]. 3 Biotech, 2022, 12(9): 1-15.
- [15] RINSCHEN MM, IVANISEVIC J, GIERA M, SIUZDAK G. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019, 20(6): 353-367.
- [16] LI XJ, EGERVARI G, WANG YG, BERGER SL, LU ZM. Regulation of chromatin and gene expression by metabolic enzymes and metabolites[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018, 19(9): 563-578.
- [17] RUDENKO AY, MARIASINAA SS, SERGIEV PV, POLSHAKOV VI. Analogs of S-adenosyl-L-ethionine in studies of methyltransferases[J]. Molecular Biology (Mosk), 2022, 56(2): 296-319.
- [18] KOTANDENIYA D, SEILER CL, FERNANDEZ J, PUJARI SS, CURWICK L, MURPHY K, WICKRAMARATNE S, YAN S, MURPHY D, SHAM YY, TRETYAKOVA NY. Can 5-methylcytosine analogues with extended alkyl side chains guide DNA methylation?[J]. Chemical Communications (Camb), 2018, 54(9): 1061-1064.
- [19] SHIMA H, MATSUMOTO M, ISHIGAMI Y, EBINA M, MUTO A, SATO Y, KUMAGAI S, OCHIAI K, SUZUKI T, IGARASHI K. S-adenosylmethionine synthesis is regulated by selective N⁶-adenosine methylation and mRNA degradation involving METTL16 and YTHDC1[J]. Cell Reports, 2017, 21(12): 3354-3363.
- [20] ADAMS AM, KAPLAN NA, WEI ZY, BRINTON JD, MONNIER CS, ENACOPOL AL, RAMELOT TA, JONES JA. *In vivo* production of psilocybin in *E. coli*[J]. Metabolic Engineering, 2019, 56: 111-119.
- [21] KUNJAPUR AM, HYUN JC, PRATHER KJ. Deregulation of S-adenosylmethionine biosynthesis and regeneration improves methylation in the *E. coli de novo* vanillin biosynthesis pathway[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 1-17.
- [22] LIU Q, LIN BX, TAO Y. Improved methylation in *E. coli* via an efficient methyl supply system driven by

- betaine[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 72: 46-55.
- [23] MARIASINA SS, CHANG CF, PETROVA OA, EFIMOV SV, KLOCHKOV VV, KECHKO OI, MITKEVICH VA, SERGIEV PV, DONTSOVA OA, POLSHAKOV VI. Williams-Beuren syndrome-related methyltransferase WBSR27: cofactor binding and cleavage[J]. *The FEBS Journal*, 2020, 28, 7(24): 5375-5393.
- [24] OUYANG Y, WU Q, LI JJ, SUN S, SUN SR. S-adenosylmethionine: a metabolite critical to the regulation of autophagy[J]. *Cell Proliferation*, 2020, 53(11): e12891.
- [25] DARROUDI M, ZIARANI GM. Chemical behavior of cysteine in organic synthesis[J]. *Current Organic Synthesis*, 2021, 18(7): 624-638.
- [26] PIETROCOLA F, CASTOLDI F, KEPP O, CARMONA-GUTIERREZ D, MADEO F, KROEMER G. Spermidine reduces cancer-related mortality in humans[J]. *Autophagy*, 2019, 15(2): 362-365.
- [27] XU T, LI H, DAI Z, LAU GK, LI BY, ZHU WL, LIU XQ, LIU HF, CAI WW, HUANG SQ, WANG Q, ZHANG SJ. Spermidine and spermine delay brain aging by inducing autophagy in SAMP8 mice[J]. *Aging (Albany, NY.)*, 2020, 12(7): 6401-6414.
- [28] CAO XT, YANG MH, XIA Y, DOU J, CHEN K, WANG H, XI T, ZHOU CL. Strain improvement for enhanced production of S-adenosyl-L-methionine in *Saccharomyces cerevisiae* based on ethionine-resistance and SAM synthetase activity[J]. *Annals of Microbiology*, 2012, 62(4): 1395-1402.
- [29] SHIOZAKI S, SHIMIZU S, YAMADA H. Unusual intracellular accumulation of S-adenosyl-L-methionine by microorganisms[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1984, 48(9): 2293-2300.
- [30] LI W, YE S, LUO KJ, GE FL, DU LJ, WU K, DING CW. Isolation and characterisation of *Candida* sp. mutants enriched in S-adenosylmethionine (SAM)[J]. *Annals of Microbiology*, 2007, 57(3): 383-387.
- [31] 武晓乐. 重组毕赤酵母合成 S-腺苷甲硫氨酸的发酵过程优化及转录谱分析[D]. 上海: 华东理工大学硕士学位论文, 2012.
- WU XL. Fermentation optimization for S-adenosyl-L-ethionine production and transcriptome analysis in recombinant *Pichia pastoris* strains[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China University of Science and Technology, 2012 (in Chinese).
- [32] 万荣娥. S-腺苷甲硫氨酸高产菌株筛选及发酵工艺优化[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2010.
- WAN RE. Isolation of high-producers of S-adenosylmethionine and optimization of fermentation process[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- [33] LI GL, LI H, TAN YY, HAO N, YANG XL, CHEN KQ, OUYANG PK. Improved S-adenosyl-L-methionine production in *Saccharomyces cerevisiae* using tofu yellow serofluid[J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 309: 100-106.
- [34] 王杰鹏, 韩晋军, 李晓楠, 刘沛溢, 谭天伟. S-腺苷-L-蛋氨酸高密度发酵工艺优化[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(4): 533-536.
- WANG JP, HAN JJ, LI XN, LIU PY, TAN TW. Optimization of high-cell-density fermentation process for S-adenosyl-L-methionine production[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25(4): 533-536 (in Chinese).
- [35] 全倩倩, 李亚亮, 王顺昌, 颜守保. 药源微生物遗传育种的研究进展[J]. *辽宁大学学报(自然科学版)*, 2021, 48(4): 312-320.
- TONG QQ, LI YL, WANG SC, YAN SB. Research advances in the breeding of medicinal source microorganisms[J]. *Journal of Liaoning University (Natural Science Edition)*, 2021, 48(4): 312-320 (in Chinese).
- [36] 邵娜, 卫功元, 葛晓光, 聂敏. 紫外线 γ 射线复合诱变筛选 S-腺苷甲硫氨酸和谷胱甘肽联产发酵菌株[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2010, 28(2): 107-113.
- SHAO N, WEI GY, GE XG, NIE M. Complex mutagenesis of *Candida utilis* by UV and γ -rays for the co-production of S-adenosyl-L-methionine and glutathione[J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 2010, 28(2): 107-113 (in Chinese).
- [37] HUANG Y, GOU X, HU H, XU Q, LU Y, CHENG J. Enhanced S-adenosyl-L-methionine production in *Saccharomyces cerevisiae* by spaceflight culture, overexpressing methionine adenosyltransferase and optimizing cultivation[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 112(4): 683-694.
- [38] 王卫国, 张仟伟, 赵永亮, 李瑞静, 林强, 李晓丹, 陶宜辰, 王卫. 酿酒酵母的选育及其应用研究进展[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2015, 36(6): 104-112.
- WANG WG, ZHANG QW, ZHAO YL, LI RJ, LIN Q, LI XD, TAO YC, WANG W. Progress on the research of *Saccharomyces cerevisiae*'s breeding and its applications[J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2015, 36(6): 104-112 (in Chinese).
- [39] 叶盛. S-腺苷甲硫氨酸高产菌株的筛选、诱变选育及其培养条件优化的优化[D]. 成都: 四川师范大学硕士学位论文, 2007.
- YE S. Isolation of high S-adenosylmethionine producing

- strain by complex mutation and optimization of culture conditions[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan Normal University, 2007 (in Chinese).
- [40] CHEN HL, WANG ZL, CAI HB, ZHOU C. Progress in the microbial production of S-adenosyl-L-methionine[J]. World Journal of Microbiol Biotechnology, 2016, 32(9): 1-8.
- [41] CHOI ES, PARK BS, LEE SW, OH MK. Increased production of S-adenosyl-L-methionine using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* sake K6[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2009, 26(1): 156-159.
- [42] YU P, ZHU PZ. Improving the production of S-adenosyl-L-methionine in *Escherichia coli* by overexpressing *metK*[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2017, 47(9): 867-873.
- [43] ZHAO WJ, SHI F, HANG BJ, HUANG L, CAI J, XU ZN. The improvement of SAM accumulation by integrating the endogenous methionine adenosyltransferase gene *SAM2* in genome of the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 178(6): 1263-1272.
- [44] HAN GQ, HU XQ, QIN TY, LI Y, WANG XY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 to produce S-adenosyl-L-methionine[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2016, 83: 14-21.
- [45] CHEN HL, WANG Z, WANG ZL, DOU J, ZHOU CL. Improving methionine and ATP availability by *MET6* and *SAM2* co-expression combined with sodium citrate feeding enhanced SAM accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(4): 1-10.
- [46] HU XQ, QUINN PJ, WANG Z, HAN GQ, WANG XY. Genetic modification and bioprocess optimization for S-adenosyl-L-methionine biosynthesis[J]. Subcellular Biochemistry, 2012, 64: 327-341.
- [47] QIN XL, LU JJ, ZHANG Y, WU XL, QIAO XF, WANG ZP, CHU J, QIAN JC. Engineering *Pichia pastoris* to improve S-adenosyl-L-methionine production using systems metabolic strategies[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2020, 117(5): 1436-1445.
- [48] HE JY, DENG JJ, ZHENG YH, GU J. 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- β synthase[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 126(4): 519-527.
- [49] 苏慧颖, 蒙世拯, 赵欣欣, 钱江潮, 储炬, 秦秀林. 阻断消耗途径提高毕赤酵母工程菌 S-腺苷甲硫氨酸产量[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 441-453.
- SU HY, MENG SZ, ZHAO XX, QIAN JC, CHU J, QIN XL. Blocking consumption pathway increases production of S-adenosyl-L-methionine by *Pichia pastoris*[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 441-453 (in Chinese).
- [50] JIANG C, RUAN LY, WEI XT, GUO AL. Enhancement of S-adenosylmethionine production by deleting *thrB* gene and overexpressing *SAM2* gene in *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Biotechnology Letters, 2022, 42(11): 2293-2298.
- [51] RUAN LY, LI L, ZOU D, JIANG C, WEN ZY, CHEN SW, DENG Y, WEI XT. Metabolic engineering of *Bacillus amyloliquefaciens* for enhanced production of S-adenosylmethionine by coupling of an engineered S-adenosylmethionine pathway and the tricarboxylic acid cycle[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12(1): 1-12.
- [52] CHEN HL, ZHU NQ, WANG Y, GAO XX, SONG YH, ZHENG J, PENG JP, ZHANG X. Increasing glycolysis by deletion of *kes1* and *arg82* improved S-adenosyl-L-methionine production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. AMB Express, 2021, 11(1): 1-16.
- [53] MAN ZW, GUO J, ZHANG YY, CAI Z. Regulation of intracellular ATP supply and its application in industrial biotechnology[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2020, 40(8): 1151-1162.
- [54] 陈雅维. ATP 调控策略及其在微生物代谢产物合成中的应用[J]. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1515-1527.
- CHEN YW. ATP regulation strategy and its application in the synthesis of microbial metabolites[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(8): 1515-1527 (in Chinese).
- [55] XU RY, WANG DH, WANG CL, ZHANG GC, WEI GY. Improved S-adenosylmethionine and glutathione biosynthesis by heterologous expression of an *ATP6* gene in *Candida utilis*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2018, 58(10): 875-882.
- [56] CHEN YW, TAN TW. Enhanced S-adenosylmethionine production by increasing ATP levels in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(20): 5200-5209.
- [57] CHEN YW, LIAO Y, KONG WZ, WANG SH. ATP dynamic regeneration strategy for enhancing co-rodution of glutathione and S-adenosylmethionine in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(12): 2581-2587.
- [58] 江林林, 吴磊, 许海霞, 黄坚丽, 张永进, 徐期, 杨勇. ATP 合成菌株的构建及用于联合生产 S-腺苷甲硫氨酸[J]. 生物技术通报, 2019, 35(6): 221-226.
- JIANG LL, WU L, XU HX, HUANG JL, ZHANG YJ, XU Q, YANG Y. Construction of ATP synthetic strain and its application in the production of

- S-adenosylmethionine[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(6): 221-226 (in Chinese).
- [59] HU ZC, ZHENG CM, TAO YC, WANG SN, WANG YS, LIU ZQ, ZHENG YG. Improving ATP availability by *sod1* deletion with a strategy of precursor feeding enhanced S-adenosyl-L-methionine accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2022, 164: 110189.
- [60] LIU W, TANG DD, SHI R, LIAN JZ, HUANG L, CAI J, XU ZN. Efficient production of S-adenosyl-L-methionine from DL-methionine in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(12): 3312-3323.
- [61] DONG C, SCHULTZ JC, LIU W, LIAN JZ, HUANG L, XU ZN, ZHAO HM. Identification of novel metabolic engineering targets for S-adenosyl-L-methionine production in *Saccharomyces cerevisiae* via genome-scale engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 66: 319-327.
- [62] MASUMOTO H, MATSUYAMA S. The combination of NAD⁺-dependent deacetylase gene deletion and the interruption of gluconeogenesis causes increased glucose metabolism in budding yeast[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0194942.
- [63] CHEREST H, EICHLER F, de ROBICHON-ZULMAJSTER H. Genetic and regulatory aspects of methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1969, 97(1): 328-336.
- [64] CHEN HL, CHAI XQ, WANG Y, LIU J, ZHOU GH, WEI PH, SONG YH, MA LM. The multiple effects of *REG1* deletion and *SNF1* overexpression improved the production of S-adenosyl-L-methionine in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 1-15.
- [65] GUPTA D, BHATTACHARJEE O, MANDAL D, SEN MK, DEY D, DASGUPTA A, KAZI TA, GUPTA R, SINHAROY S, ACHARYA K, CHATTOPADHYAY D, RAVICHANDIRAN V, ROY S, GHOSH D. CRISPR-Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing[J]. *Life Sciences*, 2019, 232: 116636.
- [66] 丁娜娜, 周胜虎, 邓禹. 基于转录因子的代谢物生物传感器的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 911-922.
- DING NN, ZHOU SH, DENG Y. Progress in transcription factor-based metabolite biosensors[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(3): 911-922 (in Chinese).
- [67] OYETUNDE T, LIU D, MARTIN HG, TANG YJ. Machine learning framework for assessment of microbial factory performance[J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0210558.
- [68] KANAI M, YASUDA N, MORIMOTO T, YOSHIDA S, NISHIBORI N, MIZUNUMA M, FUJII T, IEFUJI H. Breeding of a cordycepin-resistant and adenosine kinase-deficient sake yeast strain that accumulates high levels of S-adenosylmethionine[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2019, 83(8): 1530-1537.
- [69] 郭肖杰, 王立言, 张翀, 邢新会. 高通量自动化微生物微液滴进化培养与筛选技术及其装备化[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 991-1003.
- GUO XJ, WANG LY, ZHANG C, XING XH. Technology development and instrumentation of a high-throughput and automated microbial microdroplet culture system for microbial evolution and screening[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(3): 991-1003 (in Chinese).
- [70] CHOI KR, JANG WD, YANG D, CHO JS, PARK D, LEE SY. Systems metabolic engineering strategies: integrating systems and synthetic biology with metabolic engineering[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(8): 817-837.
- [71] 江丽红, 董昌, 黄磊, 徐志南, 连佳长. 酿酒酵母代谢工程技术[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1578-1602.
- JIANG LH, DONG C, HUANG L, XU ZN, LIAN JZ. Metabolic engineering tools for *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(5): 1578-1602 (in Chinese).
- [72] HAYAKAWA K, MATSUDA F, SHIMIZU H. Metabolome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* and optimization of culture medium for S-adenosyl-L-methionine production[J]. *AMB Express*, 2016, 6(1): 1-8.
- [73] 赵伟军, 黄磊, 徐志南. 微生物合成腺苷蛋氨酸的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(01): 99-105.
- ZHAO WJ, HUANG L, XU ZN. Research progress on the synthesis of S-adenosyl-L-methionine in microorganism[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(1): 99-105 (in Chinese).
- [74] UMEYAMA T, OKADA S, ITO T. Synthetic gene circuit-mediated monitoring of endogenous metabolites: identification of *GALI1* as a novel multicopy enhancer of S-adenosylmethionine level in yeast[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2013, 2(8): 425-430.
- [75] CHEN YW, ZHENG HJ, YANG JJ, CAO YT, ZHOU HY. Development of a synthetic transcription factor-based S-adenosylmethionine biosensor in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology Letters*, 2022, 45(2): 255-262.

(本文责编 陈宏宇)