

# 产 S-腺苷甲硫氨酸菌株的筛选及发酵工艺优化

万荣娥<sup>1</sup> 王启明<sup>2</sup> 张喜团<sup>1</sup> 熊善柏<sup>1</sup>

1. 华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070; 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

**摘要** 以 45 株酵母菌株作为出发菌株, 筛选出 2 株高产 SAM(S-腺苷甲硫氨酸)的酿酒酵母菌株(A12A、A18A), 以该 2 株酿酒酵母菌株为对象, 研究发酵温度、发酵液初始 pH 值、摇床转速以及发酵时间对菌体产量和 SAM 产量的影响, 并优化发酵工艺条件, 以提高 SAM 的产量。结果表明: 发酵温度、发酵液初始 pH 值、摇床转速和发酵时间对菌体产量和 SAM 产量均有显著影响。经正交试验优化, 2 株酿酒酵母菌株产 SAM 的最佳发酵条件为 25 ℃、发酵液初始 pH 值 5.0、摇床转速 225 r/min、发酵时间 108 h, 在该发酵条件下, 酿酒酵母菌株 A18A 产 SAM 最高量达 2.54 g/L, 较优化前提高 1.17 倍。

**关键词** 酿酒酵母; S-腺苷甲硫氨酸; 发酵工艺

**中图分类号** TS 261.1<sup>+</sup>1

**文献标识码** A

**文章编号** 1000-2421(2011)01-0109-06

S-腺苷甲硫氨酸(SAM)在生物体内具有转甲基、转氨丙基、转硫<sup>[1]</sup>等作用, 对人体许多疾病的预防和治疗都有积极作用<sup>[2]</sup>。自 1952 年 SAM 首次被意大利科学家分离出以来, 在欧洲一直将其作为抑郁症和关节炎的处方治疗药物, 市场需求量大大增加<sup>[3]</sup>。在培养基中添加一定量的 L-甲硫氨酸, 能够在细胞内催化 ATP 与 L-甲硫氨酸反应, 合成较高浓度的 SAM。因此, 先通过微生物发酵, 再从菌体中提取精制 SAM 是目前其工业化生产的主要途径。

酿酒酵母属<sup>[4-5]</sup>、毕赤酵母属<sup>[6]</sup>、大肠杆菌<sup>[7]</sup>等微生物可在体内合成 SAM。Gawe 等<sup>[8]</sup>考察了 10 种微生物产 SAM 的差异, Shiozaki 等<sup>[9]</sup>筛选出 *S. sake* 作为高产 SAM 的菌株<sup>[2]</sup>。目前学者研究了培养基组成、发酵方式<sup>[10]</sup>等对 SAM 产量的影响, 如 Shiozaki<sup>[1]</sup>采用 10 mL 培养基的小量发酵法获得了 1.55 g/L 的 SAM, 叶盛<sup>[11]</sup>利用 YPD 培养基, 经发酵条件优化, 获得了 1.74 g/L 的 SAM。

基于酵母的安全性及高表达性, 笔者从 45 株酵母菌株中筛选得到 2 株高产 SAM 的菌株, 编号为 A12A 和 A18A, 继而以该 2 株菌株为对象, 研究发酵条件对菌体产量和 SAM 产量的影响, 优化发酵工艺条件, 以提高 SAM 的产量。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1) 菌株来源。45 株酵母中有 44 株由中国科学院微生物研究所提供, 1 株为笔者所在实验室保藏。

2) 培养基。YPD 完全培养基(g/L): 酵母粉 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20, 琼脂 20; 自来水配制, pH 值, 自然; 121 ℃ 灭菌 20 min。种子培养基(g/L): 酵母粉 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20; 自来水配制, pH 值, 自然; 121 ℃ 灭菌 20 min。发酵培养基<sup>[11]</sup>(g/L): 葡萄糖 10, 酵母粉 3, 蛋白胨 5, L-甲硫氨酸 3; 自来水配制, 121 ℃ 灭菌 20 min。

### 1.2 试验方法

1) 发酵方法。菌株筛选: 从新鲜斜面接种 1 环酵母<sup>[12]</sup>于 250 mL 摇瓶(溶液体积 25 mL)中, 在一定温度和转速下摇床培养一定时间, 取样测定发酵液菌体产量和 SAM 产量。发酵过程: 种子培养基按 10% 接种量接种于 250 mL 摇瓶(溶液体积 25 mL)中, 在一定温度和转速下摇床培养一定时间, 取样测定发酵液菌体产量和 SAM 产量。

2) 样液的制备。参考文献<sup>[13]</sup>, 取 25 mL 发酵液于 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 然后添加 1.5 mol/L 的高氯酸, 并在室温下振荡提取 30 min, 进行第 2 次离心(12 000 r/min, 10 min), 用 25

收稿日期: 2010-04-17

基金项目: 中国科学院知识创新青年人才领域前沿项目

万荣娥, 硕士研究生, 研究方向: 发酵法研制高附加值产品。E-mail: wangronge@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 熊善柏, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品科学与工程。E-mail: xionsgb@mail.hzau.edu.cn

$\mu\text{m}$  滤膜上过滤清液,最后用 pH 值 3.0 的盐酸将滤液稀释至一定浓度。

3) HPLC 测定方法。参考文献[14],色谱柱为 SupeloC18 反相柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5  $\mu\text{m}$ );流动相为甲醇:(40 mmol/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ -8 mmol/L 庚烷磺酸钠)=30:70(V/V),流动相 pH 值用稀盐酸调至 3.0;流速 1.0 mL/min;柱温 35  $^\circ\text{C}$ ;灵敏度 0.004 AUFS;检测波长 257 nm;进样体积 20  $\mu\text{L}$ 。根据标准品峰面积与产量关系作出标准曲线,样品在 257 nm 的峰面积代入标准曲线换算得到 SAM 的产量。

表 1 不同菌株菌体产量及 SAM 产量差异( $n=6$ )<sup>1)</sup>

Table 1 Cell dry weight and SAM content of different strains( $n=6$ )

编号 Number	菌株名称 Strain name	菌体产量/(g/L) Cell dry weight	SAM 产量/(g/L) SAM content
1	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1.18 $\pm$ 0.130 m	0.01 $\pm$ 0.000 v
2	<i>Saccharomyces bayanus</i>	1.69 $\pm$ 0.325 l	0.03 $\pm$ 0.001 v
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.53 $\pm$ 0.014 k	0.30 $\pm$ 0.022 rs
4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.62 $\pm$ 0.573 k	0.45 $\pm$ 0.002 pq
5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.71 $\pm$ 0.072 k	0.19 $\pm$ 0.012 tu
6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.79 $\pm$ 0.042 jk	1.07 $\pm$ 0.071 hi
7	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	2.79 $\pm$ 0.107 jk	0.58 $\pm$ 0.004 no
8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.91 $\pm$ 0.092 jk	0.82 $\pm$ 0.005 l
9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.02 $\pm$ 0.369 jk	0.58 $\pm$ 0.009 no
10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.03 $\pm$ 0.840 jk	1.37 $\pm$ 0.033 ef
11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.11 $\pm$ 0.091 jk	1.03 $\pm$ 0.079 i
12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.87 $\pm$ 0.039 jk	1.89 $\pm$ 0.014 b
13	<i>Saccharomyces carriocanus</i>	3.30 $\pm$ 0.388 ij	0.53 $\pm$ 0.006 op
14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.30 $\pm$ 0.140 ij	1.18 $\pm$ 0.008 gh
15	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	3.31 $\pm$ 0.047 ij	1.40 $\pm$ 0.073 de
16	<i>Saccharomyces mikatae</i>	3.34 $\pm$ 0.058 ij	1.28 $\pm$ 0.101 fg
17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.45 $\pm$ 0.505 hi	1.25 $\pm$ 0.088 fg
18	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.86 $\pm$ 0.292 bc	2.05 $\pm$ 0.069 a
19	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.56 $\pm$ 0.407 fg	0.86 $\pm$ 0.009 kl
20	<i>Pseudozyma antarctica</i>	3.64 $\pm$ 0.586 ef	0.85 $\pm$ 0.008 kl
21	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	3.31 $\pm$ 0.363 ij	0.19 $\pm$ 0.019 t
22	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	3.71 $\pm$ 0.061 cd	0.25 $\pm$ 0.013 rs
23	<i>Saccharomyces arboricolus</i>	3.66 $\pm$ 0.067 ef	0.98 $\pm$ 0.008 kl
24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.66 $\pm$ 0.070 ef	1.60 $\pm$ 0.43 c
25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.75 $\pm$ 0.140 bc	1.44 $\pm$ 0.006 g
26	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.50 $\pm$ 0.119 gh	0.66 $\pm$ 0.041 mn
27	<i>Kazachstania servazzii</i>	2.74 $\pm$ 0.060 jk	0.43 $\pm$ 0.007 rs
28	<i>Kazachstania servazzii</i>	2.81 $\pm$ 0.218 jk	0.49 $\pm$ 0.021 op
29	<i>Kazachstania xiguus</i>	3.07 $\pm$ 0.038 jk	0.98 $\pm$ 0.059 op
30	<i>Kazachstania xiguus</i>	5.13 $\pm$ 0.015 a	0.33 $\pm$ 0.011 qr
31	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1.95 $\pm$ 0.512 l	0.07 $\pm$ 0.011 uv
32	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	2.55 $\pm$ 0.505 k	0.14 $\pm$ 0.004 op
33	<i>Hanseniaspora vineae</i>	5.43 $\pm$ 0.107 a	0.53 $\pm$ 0.052 uv
34	<i>Pichia guilliermondii</i>	2.95 $\pm$ 0.068 jk	0.78 $\pm$ 0.001 gh
35	<i>Pichia membranifaciens</i>	3.30 $\pm$ 0.338 ij	0.14 $\pm$ 0.005 uv
36	<i>Pichia anomala</i>	3.85 $\pm$ 0.051 bc	1.17 $\pm$ 0.043 lm
37	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.12 $\pm$ 0.320 jk	1.81 $\pm$ 0.029 b
38	<i>Pseudozyma sp.</i>	2.92 $\pm$ 0.081 jk	0.80 $\pm$ 0.048 l
39	<i>Pseudozymaantarctica</i>	3.45 $\pm$ 0.098 hi	0.51 $\pm$ 0.032 op
40	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	3.70 $\pm$ 0.821 de	0.50 $\pm$ 0.003 op
41	<i>Candida krusei</i>	3.31 $\pm$ 0.090 ij	1.22 $\pm$ 0.088 d
42	<i>Debaryomyces hansenii</i>	3.66 $\pm$ 0.034 ef	0.32 $\pm$ 0.012 rs
43	<i>Metschnikowia sp.</i>	3.49 $\pm$ 0.085 gh	1.19 $\pm$ 0.005 gh
44	<i>Brettanomyces custerii</i>	3.64 $\pm$ 0.037 ef	1.00 $\pm$ 0.161 ij
45	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4.23 $\pm$ 0.049 b	0.66 $\pm$ 0.028 mn

1) 不同字母为纵向间的比较( $P<0.05$ ),下同。Different letters for vertical comparisons ( $P<0.05$ ), the same as below.

4) 菌体产量的测定。取 25 mL 发酵液,滤纸过滤得净菌后,(105 $\pm$ 1)  $^\circ\text{C}$  烘至恒质量后称质量<sup>[15]</sup>。

5) 数据分析。应用 SAS 软件和 Excel 软件对数据进行分析,试验结果取 3 次平行测量的平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 高产 SAM 菌株的筛选

45 株酵母菌株接种于 pH 值 5.0 的发酵培养基,发酵温度 25  $^\circ\text{C}$ ,摇床转速 250 r/min,发酵时间 96 h,通过自然对比法进行产量筛选试验,结果见表 1。

从表 1 的结果看出,菌株生产能力较好的有 12、18、24、41 号。再将表现较好的 4 株菌株复筛,获得产 SAM 较高的 12、18 号菌株。在后续试验中对 18、12 号菌株进行最佳发酵条件的优化。

表 2 不同菌株产 SAM 的产量

Table 2 Differences of SAM content between different genera

属名 Genera	菌体产量/(g/L) Cell dry weight	SAM 产量/(g/L) SAM content
<i>Saccharomyces</i>	3.10±0.61 d	1.85±1.06 a
<i>Kazachstania</i>	3.37±1.20 c	1.11±0.55 cd
<i>Hanseniaspora</i>	3.10±1.97 cd	0.53±0.51 cd
<i>Pichia</i>	3.33±0.47 c	1.41±1.00 b
<i>Pseudozyma</i>	3.00±0.30 c	1.13±0.48 a
<i>Candida</i>	3.38±0.56 c	1.07±0.16 a
<i>Metschnikowia</i>	3.40±0.64 b	1.19±0.01 c
<i>Zygosaccharomyces</i>	3.88±0.39 a	0.50±0.01 e
<i>Debaryomyces</i>	3.63±0.44 a	0.32±0.01 f
<i>Brettanomyces</i>	3.64±0.037 a	1.00±0.161 c
<i>Rhodotorula</i>	4.27±0.88 a	0.70±0.01 d

以上 11 个属的酵母菌株中 *Saccharomyces* 属产 SAM 产量与其他属有显著性差异,平均产量为 (1.85±1.06) g/L,菌株生产能力较好的 12、18 号菌株皆为 *Saccharomyces* 属菌株。

### 2.2 发酵温度对酿酒酵母菌株产 SAM 的影响

接种后,以初始 pH 值 5.0、时间 96 h、摇床转速 250 r/min 为发酵条件,研究发酵温度对酿酒酵母菌株产 SAM 的影响。酿酒酵母菌株有其适宜的生长温度范围,发酵温度会对菌体生长、酶活性和次生代谢产物的形成产生明显影响。图 1 和图 2 分别显示了发酵温度对 2 株酿酒酵母菌株 (A12A, A18A) 发酵液中 SAM 产量和菌体产量的影响。随着发酵温度的升高,发酵液中 SAM 产量和菌体产量明显升高;至 25 °C 时,酿酒酵母菌株发酵液中 SAM 产量和菌体产量最高,其值分别为 2.18、3.19 g/L;继续升高发酵温度,则发酵液中 SAM 产量和菌体产量迅速降低。其原因可能是温度过低会使酶活性下降,代谢速度降低,代谢产物积累延长<sup>[16]</sup>;温度过高也会使酶活受到限制,细胞用于自身维持的能量消耗增加,维持系数随温度升高而加大,造成了提供给细胞生长和产物合成能量水平的下降<sup>[17]</sup>。

### 2.3 pH 值对酿酒酵母菌株产 SAM 的影响

接种后,以发酵温度 25 °C、时间 96 h、摇床转速 250 r/min 为发酵条件,研究发酵液初始 pH 值对酿酒酵母菌株产 SAM 的影响。从图 3 和图 4 可知,发酵液的 pH 值对 SAM 的产量及菌体产量有较大影响 ( $P < 0.05$ ),随着发酵液初始 pH 值的升

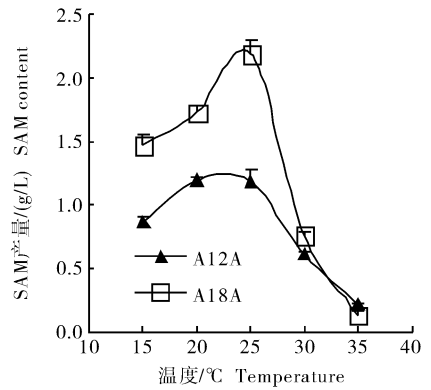


图 1 发酵温度对酿酒酵母菌株产 SAM 的影响

Fig. 1 Effects of fermentation temperature on SAM content

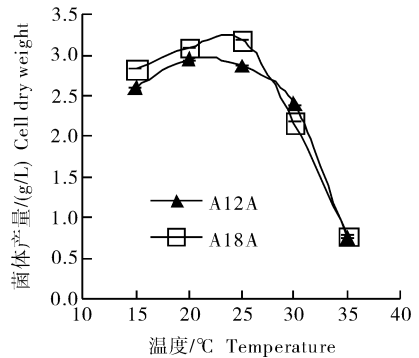


图 2 发酵温度对酿酒酵母菌体产量的影响

Fig. 2 Effects of fermentation temperature on cell dry weight

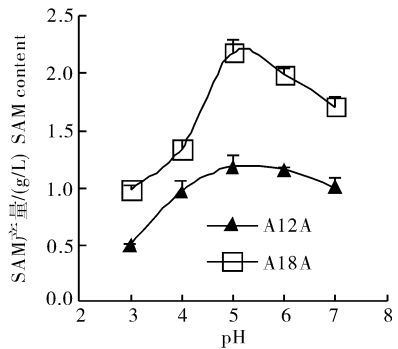


图 3 pH 值对酿酒酵母菌株产 SAM 的影响

Fig. 3 Effects of initial pH on SAM content

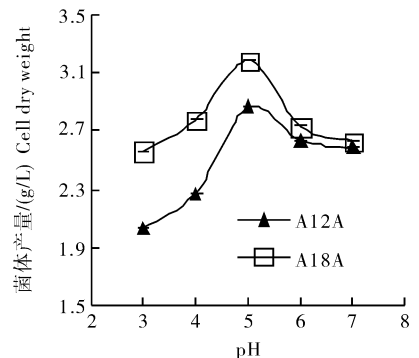


图 4 pH 值对酿酒酵母菌体产量的影响

Fig. 4 Effects of initial pH on cell dry weight

高, SAM 产量和菌体产量均有所增加; pH 值 5.0 时, SAM 产量与菌体产量达到最高, 2 株酿酒酵母菌株产 SAM 分别达 1.18、2.18 g/L。A12A 菌体产量可达 2.87 g/L, A18A 的菌体产量可达 3.20 g/L。pH 值继续升高, 菌体产量和 SAM 的产量急剧下降。发酵液影响菌体对基质的利用速度、细胞结构以及细胞内各种酶的活性<sup>[18]</sup>, 从而影响菌体生长和产物合成。pH 值显著影响酵母代谢及产物合成中酶系的活力, pH 值过高, 细胞膜内外质子浓度差会导致质子电势差, 细胞的维持能耗增加<sup>[19]</sup>, 合成 SAM 所需的 ATP 减少, 外加 L-蛋氨酸通过细胞膜的传递也将受到抑制, 导致 SAM 产量的下降。

## 2.4 转速对酿酒酵母产 SAM 的影响

接种后, 以初始 pH 值 5.0、发酵温度 25 °C、发酵时间 96 h 为发酵条件, 研究不同摇床转速对酿酒酵母菌株产 SAM 的影响。氨基酸发酵过程中对溶氧水平的控制可以显著提高目的氨基酸的产量, 同时还可降低副产物的量。因此, 研究氨基酸发酵条件并控制溶氧在适当水平是十分必要的<sup>[20]</sup>, 而摇床转速可作为控制氧传递速率的操作变量之一<sup>[21]</sup>。

由图 5 和图 6 可以看出, 随着转速的增加, 发酵液中 SAM 产量和菌体产量均有所增加, 在摇床转速为 250 r/min 时, 发酵液中 SAM 产量和菌体产量最高, A12A 产 SAM 达 1.22 g/L, A18A 产 SAM 可达 2.18 g/L。A12A 菌体产量可达 2.87 g/L, A18A 的菌体产量可达 3.20 g/L; 转速继续升高, 发酵液的 SAM 产量下降, 菌体产量先下降后上升。发酵液中溶解氧对发酵液中细胞的形态、数量和发酵液的流动性都有一定的影响。转速过低, 溶氧不足, 菌体生长受到抑制<sup>[22]</sup>; 当转速升高至 250 r/min 时, 细胞生长迅速, 产生了大量的 ATP, 在腺苷蛋氨酸合成酶的作用下, 胞内大量的 ATP 和甲硫氨酸合成了腺苷蛋氨酸, 从而获得了腺苷蛋氨酸的高浓度表达; 在酵母菌达到最旺盛时期, 酶活性最强, 产 SAM 的能力最强, 酵母菌旺盛期过后酶活性降低, 酵母菌继续繁殖的速度慢, 产 SAM 能力极低, 则菌体产量会有所增加, 而对应时期 SAM 的产量基本不会增加; SAM 产量降低也是由于发酵液中溶氧浓度过高使得甲硫氨酸的氧化严重, 转化率大大降低所导致<sup>[22]</sup>。

## 2.5 发酵时间对酿酒酵母菌株产 SAM 的影响

接种后, 以发酵温度 25 °C、初始 pH 值 5.0、发

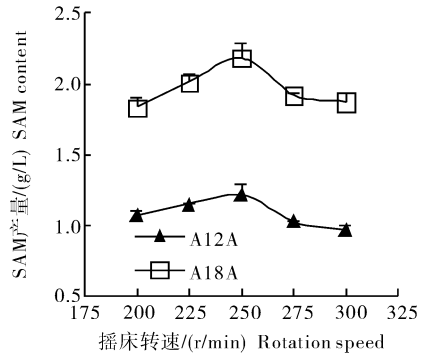


图 5 摇瓶转速对酿酒酵母菌株产 SAM 的影响

Fig. 5 Effects of rotation speed on SAM content

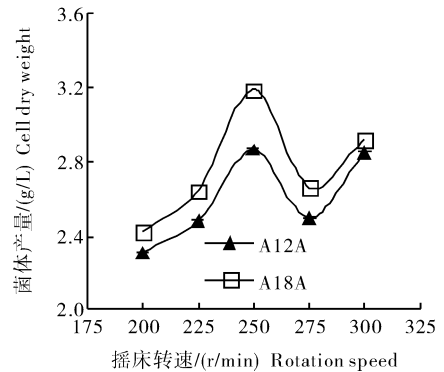


图 6 摇瓶转速对酿酒酵母菌体产量的影响

Fig. 6 Effects of rotation speed on cell dry weight

酵转速 250 r/min 为发酵条件, 研究发酵时间对酿酒酵母菌株产 SAM 的影响。

由图 7 和图 8 可看出, 96 h 是酵母发酵的最适生长时间, A12A 产 SAM 达 1.22 g/L, A18A 产 SAM 达 2.18 g/L。A12A 菌体产量可达 2.87 g/L, A18A 的菌体产量可达 3.20 g/L, 出现这种现象可能是在酵母菌生长 96 h 达到最旺盛时期, 酶活性最强, 产 SAM 的能力最强, 繁殖快, SAM 合成酶活性提高后, SAM 的合成量可能受 ATP 供应不足的影响而无法进一步提高<sup>[22]</sup>。再延长发酵时间, SAM 的产量与菌体产量甚至会有一些下降, 可能是由于菌体的自溶造成<sup>[23]</sup>。蔡瑞<sup>[6]</sup>也证实时间再延长细胞浓度下降, 这是由于培养时间过长, 而且摇瓶中供氧不能进一步优化, 所以出现老化现象<sup>[24]</sup>。

## 2.6 酿酒酵母菌株产 SAM 的工艺优化

通过单因素试验可以得到所选取的 4 个单因素对酿酒酵母菌株产 SAM 都有显著影响 ( $P < 0.05$ )。根据所得单因素最佳值, 分别取 2 个点进行三水平四因素 ( $L_3^4$ ) 的正交试验, 如表 3 所示。

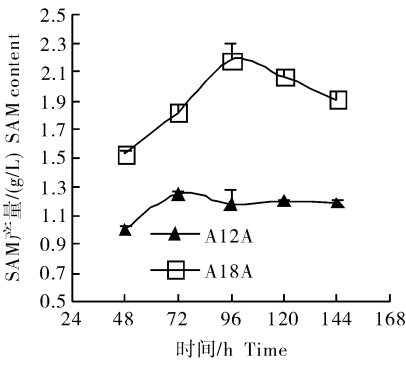


图 7 发酵时间对酿酒酵母菌株产 SAM 的影响

Fig. 7 Effects of fermentation time on SAM content

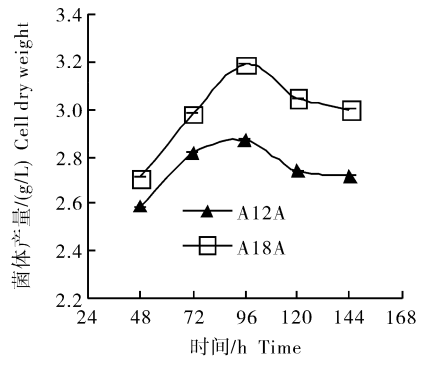


图 8 发酵时间对酿酒酵母菌体产量的影响

Fig. 8 Effects of fermentation time on cell dry weight

表 3 SAM 发酵工艺正交试验结果

Table 3 Results and analysis of the orthogonal experiment

编号 Number	温度/℃ Temperature	时间/h Time	pH	转速/(r/min) Rotation speed	菌体产量/(g/L) Cell dry weight		SAM 产量/(g/L) SAM content	
					A12A	A18A	A12A	A18A
1	20.0	84	4.5	215	2.72±0.03 a	2.75±0.07 e	1.28±0.04 a	1.76±0.09 de
2	20.0	96	5.0	225	2.76±0.07 a	2.81±0.04 de	0.96±0.02 ef	1.67±0.12 ef
3	20.0	108	5.5	235	2.64±0.18 a	2.80±0.10 de	1.20±0.04 c	1.93±0.16 bc
4	22.5	84	5.0	235	2.82±0.10 a	2.99±0.10 bc	0.96±0.01 ef	1.73±0.30 de
5	22.5	96	5.5	215	2.83±0.15 a	3.20±0.04 a	1.00±0.03 e	1.56±0.06 f
6	22.5	108	4.5	225	2.58±0.27 a	3.00±0.03 bc	0.92±0.01 fg	1.57±0.09 f
7	25.0	84	5.5	215	2.62±0.16 a	2.91±0.09 cd	0.87±0.02 g	1.86±0.08 cd
8	25.0	96	4.5	235	2.78±0.03 a	3.04±0.05 bc	1.07±0.05 d	2.06±0.04 b
9	25.0	108	5.0	225	2.67±0.08 a	3.08±0.07 ab	1.35±0.04 a	2.54±0.02 a

方差分析表明 9 号的结果最优,即优化条件为温度 25 ℃、发酵液初始 pH 值 5.0、转速 225 r/min、发酵时间 108 h。此条件下 A12A 产量达 1.35 g/L, A18A 的产量达 2.54 g/L; 菌体产量分别为 2.67、3.08 g/L, 此时 A12A 和 A18A 的 SAM 的产率分别为 50.6% 和 82.5%, 其最高的 SAM 产量和菌体产量分别为 2.54、3.08 g/L。

表 4 方差分析结果 (F/p)

Table 4 Results of ANOVAs analysis (F/p)

项目 Items	SAM 产量/(g/L) SAM content		菌体产量/(g/L) Cell dry weight	
	A12A	A18A	A12A	A18A
温度/℃ Temperature	79.814/0.00	84.40/0.00	0.266/0.77	3.26/0.06
时间/h Time	239.61/0.00	39.43/0.00	1.51/0.25	0.91/0.42
pH	194.57/0.00	32.59/0.00	0.93/0.41	0.14/0.88
转速/(r/min) Rotation speed	191.37/0.00	21.74/0.00	0.92/0.42	0.23/0.80

### 3 讨论

通过对菌株的筛选, 11 个属的酵母菌株中 *Saccharomyces* 属 SAM 产量与其他属有显著性差异, 2 株高 SAM 产量的菌株均为 *Saccharomyces* 属, 基于 *Saccharomyces* 属的安全性及高表达性, 可以考虑在后续试验中以筛选出的菌株作为出发菌

株, 通过基因重组等手段获得更高 SAM 表达量。

利用温度、发酵液初始 pH 值、摇床转速、发酵时间 4 个单因素试验和正交试验对 2 株筛选出的酿酒酵母菌株通过摇瓶发酵产生 SAM 的培养条件进行优化, 结果表明, 单因素试验中最适温度为 25 ℃, 最适发酵液初始 pH 值为 5.0, 最佳摇床转速为 250 r/min, 最佳发酵时间为 96 h, SAM 的产量最高可达 2.18 g/L, 菌体产量最高可达 3.20 g/L。通过正交试验可得最佳优化条件是温度为 25 ℃、pH 值为 5.0, 摇床转速为 225 r/min, 发酵时间为 108 h。放大到 25 mL 发酵液, 产 SAM 量达 2.54 g/L, 较优化前提提高了 1.17 倍, 比文献[9] SAM 产量提高 1.77 倍。

### 参 考 文 献

[1] SHIOZAKI S, SHIMIZU S, YAMADA H. Production of S-adenosyl-L-methionine by *Saccharomyces sake* [J]. *Biotechnol*, 1986, 4(6): 345-354.

[2] 余志良, 杨晟, 蔡谨, 等. S-腺苷甲硫氨酸的研究进展[J]. *中国医药工业杂志*, 2003, 34(1): 49-52.

[3] 汤亚杰, 李艳, 李冬生, 等. S-腺苷甲硫氨酸的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2007(2): 76-81.

[4] 董函竹, 刘沛溢, 谭天伟. 发酵生产 S-腺苷-L-蛋氨酸培养条件的优化研究[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(1): 110-113.

[5] KREMENA M, VESELKA K, VENELIN B. Optimization of

- S-adenosyl-L-methionine production by *Kluyve romyces* lactis on whey in batch culture using a mathematical model [J]. *Biotechnol*, 2002, 24: 21.
- [6] 蔡瑞. 从重组毕赤酵母中制备腺苷甲硫氨酸的研究[D]. 扬州: 扬州大学图书馆, 2004.
- [7] 牛卫宁, 左晓佳, 丁焰, 等. 重组大肠杆菌全细胞催化合成 S-腺苷甲硫氨酸[J]. *精细化工*, 2009, 26(3): 288-292.
- [8] GAWE L, TUME R, PARK S. Accumulation of S-adenosylmethionine by Microorganisms [J]. *J Bacteriol*, 1962(83): 497-499.
- [9] SHIOZAKI S, SHIMIZU S, YAMADA H. Unusual intracellular accumulation of S-adenosyl-L-methionine by microorganisms[J]. *Agric Biol Chem*, 1984, 48(9): 2293-2300.
- [10] 刘惠, 林建平, 岑沛霖, 等. 酿酒酵母微生物转化蛋氨酸生产 S-腺苷-L-蛋氨酸[J]. *化学反应工程与工艺*, 2002, 18(4): 310-314.
- [11] 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研究[D]. 成都: 四川师范大学图书馆, 2007.
- [12] 王远山, 陈小龙, 郑裕国, 等. 产腺苷蛋氨酸酵母菌株的选育[J]. *中国生化药物杂志*, 2007, 28(2): 77-81.
- [13] SCHLENK F, ZYDEK C R, EHNINGER D J, et al. The production of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-ethionine by yeast [J]. *Enzymologia*, 1965, 29: 283-298.
- [14] WANG W, KRAMER P M, YANG S, et al. Reversed-phase high-performance liquid chromatography procedure for the simultaneous determination of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine in mouse liver and the effect of methionine on their concentrations [J]. *J Chromatography B*, 2001, 762: 59-65.
- [15] 汪文俊, 肖靛. 高产 S-腺苷蛋氨酸啤酒酵母诱变选育及其培养条件[J]. *武汉工业学院学报*, 2007, 26(4): 17-20.
- [16] 陈小龙, 王远山, 郑裕国, 等. 腺苷蛋氨酸发酵条件及发酵培养基的优化[J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(11): 65-69.
- [17] 施源, 唐孝宣, 袁渭康, 等. 培养基组分和发酵温度对重组酵母表达 HBsAg 的影响[J]. *生物工程学报*, 1989, 5(3): 207-213.
- [18] KIM D J, HUH J H, YANG Y Y, et al. Accumulation of S-adenosyl-L-methionine enhances production of actinorhodin but inhibits sporulation in *Streptomyces lividans* TK23[J]. *Bacteriol*, 2003, 185(2): 592-600.
- [19] ZAPPALÀ V G, URLAUB L A. Chasin, isolation of Chinese hamster cell mutant deficient in dihydrofolate reductase activity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 4216-4220.
- [20] 刘晓波, 李宗伟, 闫世梁, 等. 溶氧控制对氨基酸发酵的影响[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(19): 7977-7979.
- [21] 张智, 滕婷婷, 王森. 溶氧对发酵的影响及控制[J]. *科学咨询*, 2008, 11: 63.
- [22] 张建勇, 王晓港, 王水莲, 等. 溶氧对重组毕赤酵母高密度发酵生产腺苷蛋氨酸的影响[J]. *齐鲁药事*, 2007, 26(7): 428-430.
- [23] 吕中原, 钱江湖, 储炬, 等. 同时利用 AOX1 和 GAP 启动子表达 SAM 合成酶促进重组毕赤酵母中 S-腺苷甲硫氨酸积累[J]. *工业微生物*, 2008, 38(4): 24-30.
- [24] 林海军. 酿酒酵母发酵生产腺苷蛋氨酸及其分离纯化工艺的研究[D]. 重庆: 西南大学图书馆, 2008.

## Screening of *Saccharomyces cerevisiae* producing S-adenosylmethionine and optimization of fermentation process

WAN Rong-e<sup>1</sup> WANG Qi-ming<sup>2</sup> ZHANG Xi-tuan<sup>1</sup> XIONG Shan-bai<sup>1</sup>

1. Department of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070 China;

2. Institute of Microbiology Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract** The effects of fermentation temperature, the initial pH of fermentation broth, shaking speed and feeding time on the cell dry weight and yield of S-adenosyl-L-methionine (SAM) produced by *Saccharomyces cerevisiae* (A12A, A18A) selected from 45 yeast strains were studied, and the fermentation conditions was optimized. The results showed that cell dry weight and SAM production were significantly affected ( $P < 0.05$ ) by fermentation temperature, the initial pH, rotation speed and the feeding time. With the orthogonal optimization, the most suitable conditions for SAM accumulation are temperature 25 °C, initial pH 6.0, shaking speed 225 r/min, and feeding time 108 h. Under fermentation conditions mentioned above, the SAM production of *Saccharomyces cerevisiae* A18A was up to 2.54 g/L broth, 1.17-fold higher than before optimization.

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*; S-adenosyl-L-methionine; fermentation process

(责任编辑: 陆文昌)