

## 高产 S-腺苷甲硫氨酸酵母菌株的筛选

刘 勇<sup>1,2</sup>, 刘建玲<sup>1</sup>, 王 璋<sup>2</sup>

1(西北大学生命科学学院, 陕西 西安, 710069) 2(中国食品发酵工业研究院, 北京, 100027)

**摘 要** 从土壤和酒曲中对产 S-腺苷甲硫氨酸的酵母菌株进行了筛选, 通过 HPLC 外标法测定得到 8 株产量较高的酵母菌株。对高氯酸细胞破壁和酵母细胞水解作用条件进行优化, 确定了高氯酸提取 S-腺苷甲硫氨酸的理想条件为 2.5 mol/L 高氯酸 10 mL, 时间为 5 h, 菌体量为 0.6 g。

**关键词** 土壤, 酒曲, S-腺苷甲硫氨酸, 高氯酸, 优化

S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM)<sup>[1]</sup>, 所示, 1952 年 Cantoni<sup>[2]</sup> 发现其为甲硫氨酸在生物体内的活性形式。SAM 在生物体内由甲硫氨酸和 ATP 经 SAM 合成酶 (EC 2.5.1.6) 合成<sup>[3]</sup>, 是一种重要的生理活性物质, 参与了 40 多种生化反应, 具有转甲基、转硫基、转氨丙基等作用。肝脏是合成和降解 SAM 的主要场所, 肝脏内每天几乎有 50% 的甲硫氨酸转化成 SAM, 并且超过 85% 的转甲基反应发生在肝脏中, SAM 代谢异常将会导致各种肝脏疾病和精神混乱。临床实验证明, SAM 对关节炎, 抑郁症、肝功能紊乱等疾病都有较好的疗效。早在 1970 年代末, SAM 就开始出现在欧洲的医药市场上, 当时是用做治疗关节炎的抗炎止痛药物, 据推测其作用机制可能是由于 SAM 对花生酸系统的干扰; 1990 年美国 FDA 也通过了随机双盲法验证后, 迅速成为美国最畅销的保健品之一, 但目前国内使用主要依赖于进口, 由于价格昂贵限制了其在临床上的应用。

近年有报道, 某些微生物能够在体内积累 SAM, 尤其是一些酵母属的菌株, 当在培养基中加入一定量的甲硫氨酸时可以产生较高浓度的 SAM。日本的 Shiozaki<sup>[5]</sup> 等筛选到 1 株 *Saccharomyces sake* K-6 菌, 经过菌种特殊改良和条件优化以后高密度培养产量可达 10.8 g/L, 是目前报道的最高产量, 国内未见有工业化生产的报道。

本研究以酵母属微生物作为筛选对象, 对高产 SAM 的酵母进行了筛选, 通过正交实验法确定了高氯酸提取 SAM 的条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

第一作者: 在读硕士研究生。

收稿日期: 2007-12-05

#### 1.1.1 菌种和土样样品来源

参照土样采集标准方法<sup>[6]</sup>。采集了 8 份土样。采样时先除去表层 5 cm 表土, 取 5~15 cm 深的土壤, 装到灭菌过的大试管当中, 每份样品重约 20 g。同时分离了本实验室保藏的酒曲和啤酒废液中的酵母。

#### 1.1.2 主要化学试剂

SAM 标品 (Sigma 公司), 甲醇为色谱醇, L-甲硫氨酸等均为分析纯试剂。

#### 1.1.3 培养基

斜面培养基: 麦芽汁 (12°Brix) 20 mL, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 1 g, 琼脂粉 18 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 6.0。121℃ 湿热灭菌 20 min。

酵母分离筛选培养基: 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 g, 琼脂粉 18 g, 0.03% 链霉素稀溶液 100 mL, 1/3 000 孟加拉红水溶液 100 mL, 蒸馏水 800 mL, pH 自然。121℃ 湿热灭菌 20 min。

摇瓶发酵培养基: 葡萄糖 50 g, 蛋白胨 10 g, 酵母浸粉 5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  500 mg, L-甲硫氨酸 1 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 6.0, 加热溶解后分装, 121℃ 湿热灭菌 20 min。

## 1.2 酵母分离筛选方法

### 1.2.1 土壤酵母菌株的分离筛选

分别称取土样 10 g, 放入 90 mL 无菌水并带有玻璃珠的三角瓶中, 振荡 20 min 使土样样品充分分散, 10 倍稀释法稀释成不同梯度后取 0.1 mL 均匀涂布到酵母分离筛选培养基平板, 在 30℃ 培养箱中静置培养 2~4 d。根据酵母菌体菌落形态大小特征以及对孟加拉红试剂的反应作用程度进行分析鉴别, 分离挑选出可能产生 SAM 的酵母菌株, 在 PDA 培养基平板纯化后斜面保藏备用。

### 1.2.2 酒曲酵母菌株的分离筛选

将保藏的酒曲样品在常温下放置一段时间后, 吸

取酒曲浸液 1 mL,用无菌水稀释成不同浓度后,同样涂平板,培养,分离筛选酵母菌株斜面保藏。

1.2.3 酵母菌体细胞摇瓶培养

将斜面上的保存的初筛菌株活化后接种到摇瓶中,装液量 20 mL,150 r/min 下 30℃ 培养 2~3 d,取样分析发酵液中 SAM 含量。

1.2.4 发酵液处理

经过产 SAM 发酵培养后的发酵液,在 3 000 r/min 低温离心 10 min 后收集菌体,并用蒸馏水洗涤 2 次。取一定量菌体加入 1.5 mol/L 高氯酸 10 mL,于 4℃ 静止 3 h,期间每 5~10 min 振荡混匀。3 h 后菌悬液在 12 000 r/min 低温离心 10 min,上清液再用 0.22 μm 滤膜过滤,滤液进行 SAM 的含量分析。

1.3 SAM 的 HPLC 法定量分析

采用 Shiozaki 等人<sup>[5]</sup>的方法,并做部分改进,进样量 10 μL,分离柱为 Partisil PXS 10/25 SAX (4.6 mm×150 mm),流动相为 0.2 mol/L V(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): V(Methanol) = 92:8,流速为 1.0 mL/min,检测波长为 256 nm。采用外标法,根据不同浓度的 SAM 标准品的峰面积制作标准曲线(如图 1 所示),并用于定量分析计算各样品的 SAM 含量。

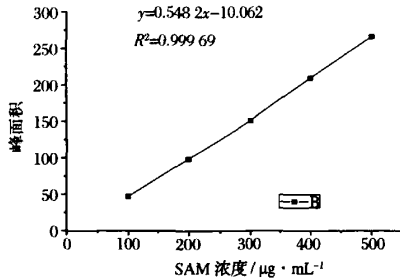


图 1 腺苷甲硫氨酸标准曲线

2 实验结果

2.1 菌株筛选结果

由于酵母菌株分离筛选所用的孟加拉红培养基中加入了链霉素,可以有效地抑制细菌和放线菌生长,虽有少量霉菌生长,但通过菌落形态可以清晰地与酵母菌区别开来。经分离纯化,从不同来源的土壤、酒曲和啤酒废液样品中分离出的菌落数见表 1,共得到初筛酵母菌种 404 株。

2.2 产甲硫氨酸菌株的初筛

通过对所筛选到的 404 株酵母菌摇瓶发酵,得到 SAM 含量较高的菌株 39 株,并作为初筛选出菌株。部分结果见表 2。

表 1 不同土壤中菌落数结果

编号	采集地点	土壤类型	所含菌类	挑取酵母单菌落数	命名
1	北京郊区果树下	润土	霉菌 酵母	42	gsx1-42
2	糖厂	壤土	霉菌 酵母	45	tc1-45
3	太阳宫公园树下土	腐生土	霉菌 酵母	50	tyg1-50
4	元大都遗址公园	沃土	霉菌 酵母	50	ydd1-50
5	农大西校区	润土	霉菌 酵母	38	ndl-38
6	农科院树下土	润土	霉菌 酵母	43	nky1-43
7	北师大校园	润土	霉菌 酵母	47	bsd1-47
8	化工大学校园	沃土	霉菌 酵母	36	hgd1-36
9	酒曲		酵母	33	jql-33
10	啤酒废液		酵母	25	pf1-25

表 2 初筛酵母菌的腺苷甲硫氨酸含量

菌株	SAM 含量 /mg · L <sup>-1</sup>	菌株	SAM 含量 /mg · L <sup>-1</sup>	菌株	SAM 含量 /mg · L <sup>-1</sup>
gsx-1	356.41	tc-7	328.58	nky-32	263.77
gsx-18	331.39	tc-10	260.36	nky-34	253.68
jq-3	420.71	tc-15	245.35	nky-35	252.85
jq-4	438.38	tc-23	287.22	Hgd-1	266.99
jq-26	346.26	tyg-18	287.98	Hgd-3	277.24
pfj-6	366.64	tyg-28	288.17	Hgd-11	254.19
pfj-8	320.56	tyg-29	312.77	Hgd-20	288.16
pfj-11	395.81	tyg-31	255.34	Hgd-21	365.48

从表 2 的结果可以看出,从酒曲和啤酒废液中分离到的酵母菌株产量要略高于其它地方所筛选的菌株,这可能是因为酒曲中主要为酿酒酵母,这与文献<sup>[5]</sup>报道的酿酒酵母可以较好地积累 SAM 的结果相符合。

2.3 菌种复筛结果

在菌种初筛的基础上,通过加大摇瓶培养基中 L-甲硫氨酸添加量等方法进行菌种的复筛,得到较好的菌株 8 株,结果如图 2 所示。

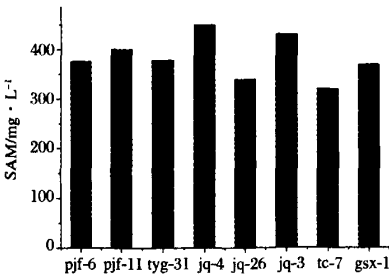


图 2 酵母菌种复筛产 SAM 的结果

由图 2 可知,这 8 株菌生产 SAM 稳定性好,产能和初筛结果基本一致,大部分都有所提高,也说明了 L-甲硫氨酸的诱导效果比较显著。其中 jq-4 产 SAM 最高,达到 450 mg/L 发酵液,因此,以后的实验采用此菌株。目前正在进行该菌株的具体分类鉴定。

2.5 酵母细胞破壁条件优化

由于 SAM 为胞内产物,为分离纯化制备 SAM,首先需将酵母细胞破壁。有文献报道<sup>[7]</sup>,乙醇、乙酸

乙酯、甲苯、硫酸、高氯酸等试剂能有效地破碎酵母细胞,通过溶解或氧化酵母细胞壁上的类脂物质,从而改变酵母细胞的通透性而使细胞壁破裂,使 SAM 渗漏出来。本实验在比较了乙醇、乙酸乙酯、硫酸、高氯酸的破壁效果后,发现高氯酸的破壁效果要好于其它溶剂,因此,采用高氯酸作为酵母细胞破壁的有机溶剂。为提高酵母细胞破壁率,如表 3 所示,实验以高氯酸的浓度、处理时间和酵母菌体量作为主要影响因素,采用  $L_4^3$  的 3 因素 4 水平正交试验设计表,以表 1 中的 jq-4 做为出发菌株,分析酵母细胞破壁的协同作用效果,以期得到最佳破壁条件,试验结果见表 4。

表 3 因素-水平设置因素

水平	(A)浓度/mol·L <sup>-1</sup>	(B)时间/h	(C)菌体量/g
1	1.5	3.5	0.30
2	2.5	5.0	0.45
3	3.5	6.5	0.60
4	4.5	8.0	0.75

表 4 高氯酸破壁正交实验结果

试验号	(A)浓度 /mol·L <sup>-1</sup>	(B)时间 /h	(C)菌体量 /g	SAM 含量 /μg·mL <sup>-1</sup>
1	1.5	3.50	0.30	390.06
2	1.5	5.00	0.45	619.61
3	1.5	6.50	0.60	841.08
4	1.5	8.00	0.75	1 072.73
5	2.5	3.50	0.60	1 136.49
6	2.5	5.00	0.75	1 168.56
7	2.5	6.50	0.30	553.45
8	2.5	8.00	0.45	740.9
9	3.5	3.50	0.75	927.09
10	3.5	5.00	0.60	1 024.9
11	3.5	6.50	0.45	778.39
12	3.5	8.00	0.30	525.65
13	4.5	3.50	0.45	804.18
14	4.5	5.00	0.30	567.42
15	4.5	6.50	0.75	1 149.57
16	4.5	8.00	0.60	999.62
JQ-	1.5	5.00	0.67	841.89

通过对表 4 中的结果进行统计计算分析,结果表明,较好的条件为  $A_2B_2C_3$ ,即高氯酸浓度 2.5 mol/L,破壁时间 5 h,菌体量 0.6 g;而且这 3 个因素对实

验的影响都是不可忽视的,即 3 个因素对 SAM 发酵生产都有一定显著性的影响作用,3 个因素的显著性主次顺序为:高氯酸浓度>破壁时间>菌体量。

### 3 小 结

通过生产菌株分离筛选和初步的摇瓶发酵与菌体细胞破壁条件的考察发现,所分离得到的酵母 jq-4 菌株以及 jq-3 菌株在低浓度甲硫氨酸存在的情况下具有明显积累 SAM 的能力,为以后发酵生产 SAM 奠定了基础。SAM 主要存在酵母细胞液泡内,因此释放率的高低直接影响 SAM 的产率。本文通过正交实验确定了 SAM 从酵母细胞中提取的优化条件(2.5 mol/L 高氯酸 10 mL,时间为 5 h,菌体量为 0.6 g)为以后工业化生产下游工程提取 SAM 提供了参考依据。

### 参 考 文 献

- Shelly C Lu. Molecules in focus S-Adenosylmethionine [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2000, 32: 391~395
- Cantoni GL. The nature of the active methyl donor formed enzymatically from L-methionine and adenosine triphosphate[J]. J Am Chem Soc, 1952, 74: 2 942~2 943
- Park J, Tai Roessner A. Enzymatic Synthesis of S-adenosylmethionine on the Preparative Scale[J]. J Bioorg Med Chem, 1996, 4(12): 2 179~2 185
- Lu S C. Review article: S-Adenosylmethionine[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2000, 32: 391~395
- Shiozaki. Unusual Intracellular Accumulation of S-Adenosyl-L-methionine by Microorganisms [J]. Agric Biol Chem, 1984, 48 (9): 2293~2300
- 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1995. 394~400
- 曾俊华,王昌禄. 酵母细胞破碎方法对 S-腺苷-L-蛋氨酸提取的影响[J]. 氨基酸和生物资源, 2005, 27(1): 49~51

## Isolation of Yeast Strains for S-adenosyl-L-methionine Production

Liu Yong<sup>1,2</sup>, Liu Jianling<sup>1</sup>, Wang Zhang<sup>2</sup>

1 (College of Life Science, Northwest University, Xi-An 710069, China)

2 (China National Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

**ABSTRACT** The yeast strains producing S-adenosyl-L-methionine (SAM) were isolated from the soil and solid koji samples. Eight yeast stains of higher SAM productivities were acquired with an external standard analytical method of HPLC. The best conditions of extracting SAM form the yeast cells were 2.5 mol/l perchloric acid 10 ml, 5 h hydrolytic time and 0.6 g biomass by optimizing the condition between perchlorate and cells of yeast.

**Key words** S-adenosyl-L-methionine, screening, soil, solid koji