

# 多胺对毕赤酵母合成 S-腺苷甲硫氨酸的影响

胡晓清<sup>1,2</sup>, 陈华新<sup>2</sup>, 储炬<sup>2</sup>, 张嗣良<sup>2</sup>, 庄英萍<sup>2</sup>

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214122)

(2. 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

**摘要:** S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM) 是一种需求量巨大的活性氨基酸。SAM 生产主要是利用过表达甲硫氨酸腺苷转移酶 (methionine adenosyltransferase, MAT) 的毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 进行胞内合成, 但较高密度培养条件下甲醇诱导会造成一定程度的细胞死亡。本研究首先揭示甲醇对 *P. pastoris* 造成过氧化损伤, 然后分析了添加多胺 (腐胺和亚精胺) 对 SAM 合成影响及机制。结果揭示多胺可提高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶活力, 从而缓解细胞氧化损伤, 此外还改善了 MAT 酶活力和细胞生长, 最终 SAM 的积累水平提高 19.2%。

**关键词:** 毕赤酵母; S-腺苷甲硫氨酸; 多胺; 氧化损伤

**文章编号:** 1673-9078(2012)12-1617-1620

## Influence and Mechanism of Polyamines Addition on S-adenosyl-L-methionine Synthesis by *Pichia pastoris*

HU Xiao-qing<sup>1</sup>, CHEN Hua-xin<sup>2</sup>, CHU Ju<sup>2</sup>, ZHANG Si-liang<sup>2</sup>, ZHUANG Ying-ping<sup>2</sup>

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122)

(2.State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

**Abstract:** S-adenosyl-L-methionine (SAM) was a type of active amino acid required largely. SAM was mainly produced through the biosynthesis reaction within *Pichia pastoris* cell that overexpressed methionine adenosyltransferase (MAT), while the inducer methanol led to cell death at some extent during cultivation process with high cell density. Thus this study firstly revealed that methanol exerted oxidative stress on *P. pastoris* cell, and then investigated the influences of adding polyamines (putrescine and spermidine) on SAM biosynthesis and reaction mechanism. The results revealed that polyamines can lessen oxidative damage through elevating catalase activity, and additionally, improving MAT activity and cell growth. As a result, 19.2% higher level of SAM deposit was achieved.

**Key words:** *Pichia pastoris*; S-adenosylmethionine; polyamine, oxidative damage

S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM) 是存在于几乎所有生物体的一种重要的活性物质, 参与细胞内多种生化反应。SAM 也是人体内重要的生理活性物质, 可用于治疗抑郁症、关节炎等疾患, 在欧美作为保健品和药品已经畅销多年。我国于 2010 年对注射用 SAM 丁二磺酸盐发放了药品批准文号, 因此 SAM 具有广阔市场需求。工业上 SAM 的主要生产方法为利用微生物过表达甲硫氨酸腺苷转移酶 (methionine adenosyltransferase, MAT), 将 L-甲硫氨酸转化成 SAM。目前利用最多的微生物为毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)。笔者所在实验室近年来从代谢工程改造、生物过程优化等方面, 对 *P. pastoris* 转化生

产 SAM 进行了深入研究<sup>[1-6]</sup>。

*P. pastoris* 是一种成熟的外源蛋白表达系统, 应用最多的启动子为诱导性启动子 PAOX。当添加诱导性碳源甲醇时, PAOX 启动外源基因转录。笔者在前期研究中发现, *P. pastoris* 在较高密度培养条件下, 保持较高的甲醇利用速率可提升细胞内的蛋白酶表达和能量供应, 但同时也会导致一定的细胞裂解, 从而对 SAM 合成不利。有基于此, 本研究首先对甲醇对细胞致死的作用机制进行了探究, 然后为减缓该胁迫作用, 考察了多胺添加对细胞生长和 SAM 合成的影响, 并揭示了多胺的多重作用机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌株

过表达天蓝色链霉菌来源 MAT 的甲醇诱导型 *P. pastoris* 菌株<sup>[7]</sup>。

收稿日期: 2012-07-24

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK2012114)

作者简介: 胡晓清 (1978-), 男, 副教授

通讯作者: 储炬 (1963-), 女, 教授, 博导

## 1.2 培养基

BSM 培养基 (每升): 5.0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.465 g  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 9.1 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 7.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 6.8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 g 甘油, 4.4 mL PTM1 微量盐溶液, pH 6.0。其中 PTM1 (每升): 硫酸铜 6 g, 碘化钾 0.08 g, 水合硫酸锰 3 g, 钼酸钠 0.2 g, 硼酸 0.02 g, 氯化钴 0.5 g, 硫酸锌 20 g, 硫酸亚铁 65 g, 生物素 0.2 g, 硫酸 5 mL。

## 1.3 分析方法

SAM 分析参照报道方法<sup>[8]</sup>,  $\text{H}_2\text{O}_2$  测定参照 Patterson 方法<sup>[9]</sup>, 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 分析采用 TBA 测定方法<sup>[10]</sup>。菌体密度用 600 nm 吸光度 (OD600) 表征, 菌体干重 (dried cell density, DCW) 测定参照本实验前期方法<sup>[4]</sup>。菌体存活率测定参照 Xiao 等报道方法<sup>[11]</sup>。

MAT 酶活测定参照前期方法<sup>[4,12]</sup>。 $\text{H}_2\text{O}_2$  酶测定参照 Sibirnyi 方法<sup>[13]</sup>, 1 单位的酶活定义为该反应条件下 1 min 内催化 1 mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  降解的酶量。

## 1.4 培养

菌株接种 BSM 培养基, 在 30 °C, 220 r/min 摇床培养, 36 h 后细胞干重达 12 g/L DCW。去培养液离心, 收集细胞, 重悬于甘油被 1.5% 乙醇取代的 BSM 培养基。为考察添加多胺的作用, 在培养液中加入 0.5 mM 腐胺 (putrescine, Put) 或 0.5 mM 亚精胺 (spermidine, Spd), 以不添加多胺为对照组。每 12 h 测定一次培养液中甲醇残留, 并补加至 1.5%。同时, 每 12 h 添加一次 0.2% 甲硫氨酸, 满足 SAM 合成需求。以上实验每组设 3 个平行, 结果取平均值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 甲醇诱导过程中的氧化损伤及多胺对其影响

前期研究发现, 较高密度下甲醇诱导时出现一定程度的细胞裂解, 而细胞死亡对细胞内 SAM 酶促合成不利, 因此本研究首先对细胞存活率进行了定量测定。结果显示, 甲醇诱导后出现了细胞死亡, 诱导 10 h 后, 细胞存活率跌到 97.0% 之下, 并且在发酵 120 h 达最大细胞密度时, 存活率为 94.3%。为揭示细胞裂解的原因, 随后对胞内的  $\text{H}_2\text{O}_2$  进行了测定。甲醇诱导前, 细胞中几乎检测不到  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 而伴随着甲醇的流加, 胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  突然出现并迅速增加 (图 1a), 在 45 h 达到最大积累量 221  $\mu\text{mol/g}$  DCW, 随后虽然缓慢下降, 但仍维持在较高水平, 并且 90 h 后又继续上升。 $\text{H}_2\text{O}_2$  的产生是甲醇代谢的必然结果<sup>[14,15]</sup>, 甲醇氧化最初在过氧化物酶体中进行, 甲醇在醇氧化酶的催化下, 生成甲醛, 伴随  $\text{H}_2\text{O}_2$  的生成。 $\text{H}_2\text{O}_2$  可在  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解酶

的催化下, 分解放出氧气。但当甲醇利用速率较快时, 局部高浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  来不及迅速扩散并分解,  $\text{H}_2\text{O}_2$  会经由 Fenton 反应 ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ ) 和 Haber-Weiss 反应 ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ ), 生成更高活性的  $\cdot\text{OH}$ , 从而对细胞内大分子造成氧化损伤。

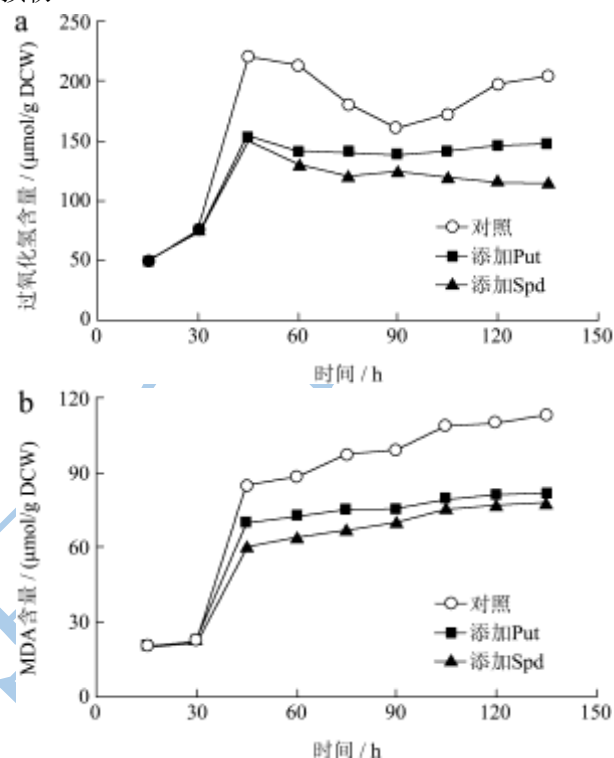


图 1 *P. pastoris* 胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  (a) 和 MDA (b) 含量的变化

Fig.1 The content changes of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (a) and MDA (b) within *P. pastoris* cell

细胞氧化损伤从指示剂 MDA 的含量变化获得证实, MDA 是细胞损伤的标志物, 常被用以评价细胞内氧化胁迫导致的细胞损伤<sup>[16]</sup>。如图 1b 所示, 伴随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  的出现和跃升, MDA 含量也快速增加, 并持续上升直至放罐, 显示细胞中发生了越来越严重的氧化损伤<sup>[17]</sup>, 这是引起细胞死亡的直接原因之一。有鉴于此, 本研究通过添加多胺, 拟改善细胞氧化损伤。结果显示, 添加 Put 和 Spd 后, 细胞死亡率明显降低, 存活率上升显著, 放罐前最低存活率提高至 99.6%。图 1a 和 1b 揭示了其原因, 相对于对照组, 添加 Put 和 Spd 使得诱导初期的  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量大幅降低, 在 45 h 分别为 156 和 151  $\mu\text{mol/g}$  DCW, 降幅达 29.1% 和 31.4%, 且在诱导中后期维持在低于 140  $\mu\text{mol/g}$  DCW 范围。MDA 的变化也印证了细胞内氧化损伤的减弱。相对而言, Spd 对胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 MDA 的削弱更为显著, 也与其略高的细胞存活率相吻合。

2.2 添加多胺对细胞生长和 SAM 产率影响及机制  
随后对细胞生长曲线进行了测定, 如图 2 所示,

0.5 mM 的 Put 和 Spd 均促进了细胞的生长, 在培养后期尤其明显。对照组最大 OD600 为 63, 而添加 Put 和 Spd 后, 分别提高到 69 和 66, 究其原因, 一方面多胺降低了细胞死亡率, 使得可增殖的细胞比例增大增多; 另外一方面, 多胺是一种重要的细胞生长因子<sup>[18]</sup>, 可促进细胞快速生长及代谢。

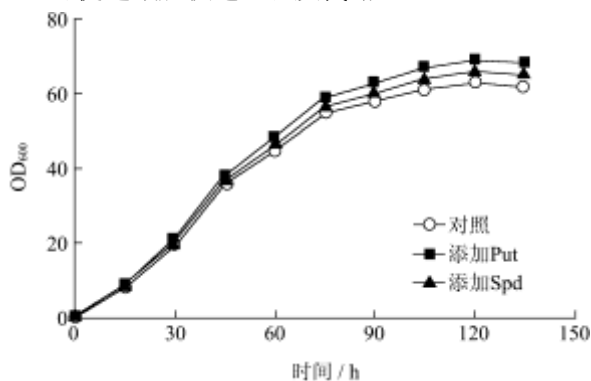


图2 *P. pastoris* 生长曲线

Fig.2 The growth curves of *P. pastoris*

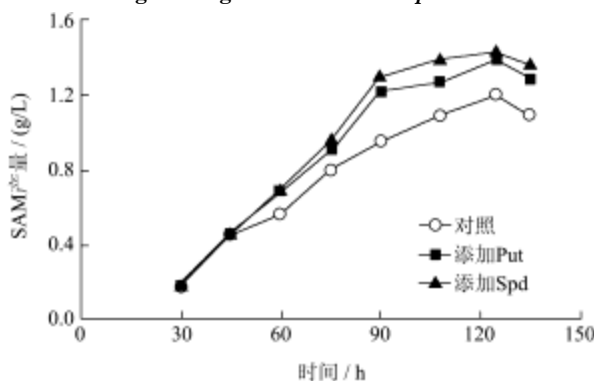


图3 *P. pastoris* 胞内 SAM 积累量

Fig.3 The accumulation levels of SAM within *P. pastoris* cell

提高细胞存活率和生物量有助于单位发酵体积 SAM 的积累。如图 3 所示, 诱导 45 h 后, 添加 Put 和 Spd 后 *P. pastoris* 积累 SAM 的速率高于对照组, 使得最终 SAM 的积累量分别达到 1.39 g/L 和 1.43 g/L, 与对照相比产率分别提高 15.8% 和 19.2%。而单位细胞中 SAM 产量 (比产率) 分别为 76 mg/g DCW (对照), 81 mg/g DCW (添加 Put) 和 87 mg/g DCW (添加 Spd)。排除细胞数量增大的因素后, 多胺添加仍然提高了 SAM 比产率, 其中 Spd 最为明显, 增幅达 14.5%, 这意味着多胺还可通过其他机制促进细胞中 SAM 的积累。SAM 在胞内是一种重要的活性中间物, 其存在着三大转化途径: 转甲基、转硫和转氨丙基。转氨丙基作用的产物为多胺<sup>[19]</sup>, 转硫作用可生成抗氧化剂还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH)<sup>[20]</sup>。外源多胺的添加减弱了细胞对 SAM→多胺的需求, 而氧化胁迫的削弱也使得经由 SAM→GSH 的需求降低, 最终使得菌体 SAM 的消耗变少, 从而积累变多。

### 2.3 添加多胺促进 SAM 合成的机制

添加多胺后, SAM 比产率获得改善, 一方面归因于 SAM 消耗量的减少, 另外一方面归因于 SAM 合成的增强, 后者有赖于 MAT 酶活的提高。如图 4 所示, 添加 Put 和 Spd 后, 胞内 MAT 活力均有 10~15% 范围的提高, 这有助于 SAM 的合成。其作用机制可能是对照中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 MAT 酶活具有抑制, 也可能破坏 MAT 蛋白结构导致失活, 而多胺的加入减轻了这种不利 SAM 合成的因素, 从而增强 SAM 合成, 这有待后续验证。

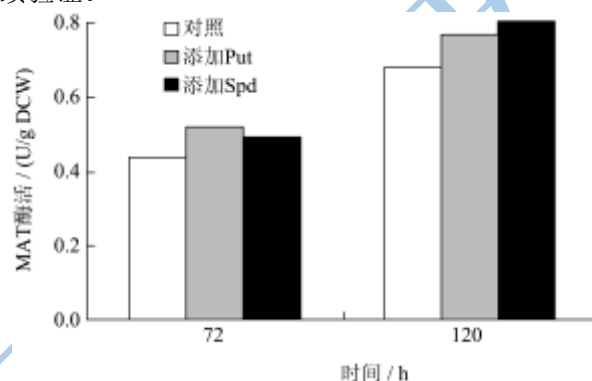


图4 *P. pastoris* 胞内 MAT 酶活变化

Fig.4 The changes of MAT activities within *P. pastoris* cell

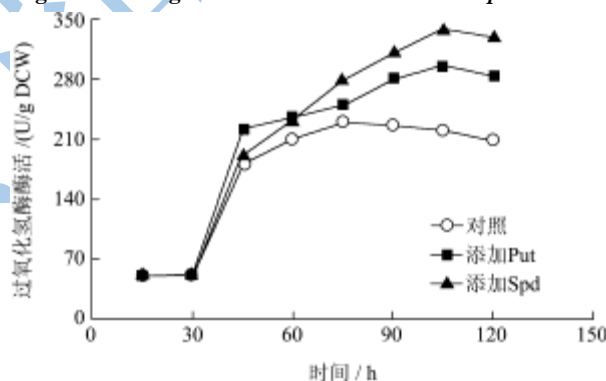


图5 *P. pastoris* 胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶活变化

Fig.5 The changes of catalase activity within *P. pastoris* cell

除了可提高 MAT 酶活, 多胺还可改善其他酶如过氧化氢酶的酶活。如图 5 所示, 加入多胺前, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶活在 75 h 达最大值 230 U/g DCW, 而加入 Put 和 Spd 后, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶活上升期延长, 在 105 h 分别达到最大值 296 U/g DCW 和 340 U/g DCW, 从而强化了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的清除效率。关于多胺和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶相关性研究在植物细胞衰老和抵抗逆境研究中已有较多报道, 多胺代谢关键酶—多胺氧化酶和精氨酸脱羧酶除参与胞内多胺水平调节, 还与细胞内活性氧的调节有关<sup>[21]</sup>。本研究首次发现酵母中多胺添加可促进 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶的合成, 这也是多胺减轻细胞氧化损伤的直接原因。

### 3 结论

诱导性 *P. pastoris* 利用甲醇诱导时会导致氧化损伤, 这通过胞内  $H_2O_2$  和 MDA 测定获得了证实。添加  $0.5 \mu M$  Put 或 Spd 可减缓这一胁迫作用, 其机制在于多胺可提高  $H_2O_2$  酶酶活, 从而使得细胞存活率提高。多胺作为生长因子, 还促进了细胞生长。此外, 多胺可提高 MAT 酶活, 使单位细胞内的 SAM 合成速率加快, 更重要的是, 多胺的加入可削弱 SAM 在胞内的转化。上述因素共同作用, 使得 SAM 产量提高 19.2%, 达  $1.43 g/L$ , 这对于 SAM 的工业制备具有重要意义。

### 参考文献

- [1] Hu H, Qian J, Chu J, et al. DNA shuffling of methionine adenosyltransferase gene leads to improved S-adenosyl-L-methionine production in *Pichia pastoris* [J]. J Biotechnol, 2009, 141: 97-103
- [2] Hu H, Qian J, Chu J, et al. Optimization of L-methionine feeding strategy for improving S-adenosyl-L-methionine production by methionine adenosyltransferase overexpressed *Pichia pastoris* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 83: 1105-1114
- [3] Hu X. Optimization of S-adenosyl-L-methionine production by two recombinant *Pichia pastoris* employing inducible and constitutive promoters respectively and comparison of their fermentation performances. Ph. D Thesis, in Biotechnology College, East China University of Shanghai, 2008
- [4] Hu X, Chu J, Zhang S, et al. A novel feeding strategy during the production phase for enhancing the enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-methionine by methylotrophic *Pichia pastoris* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40: 669-674
- [5] Hu XQ, Chu J, Zhang Z, et al. Effects of different glycerol feeding strategies on S-adenosyl-L-methionine biosynthesis by PGAP-driven *Pichia pastoris* overexpressing methionine adenosyltransferase [J]. J Biotechnol, 2008, 137: 44-49
- [6] Qin X, Qian J, Yao G, et al. GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris* [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77: 3600-3608
- [7] Chen H, Chu J, Zhang S, et al. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves S-adenosylmethionine production in a recombinant *Pichia pastoris* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74: 1205-1212
- [8] Wagner J, Danzin C, Huot-Olivier S, et al. High-performance liquid chromatographic analysis of S-adenosylmethionine and its metabolites in rat tissues: interrelationship with changes in biogenic catechol levels following treatment with L-dopa [J]. J Chromatogr, 1984, 290: 247-262
- [9] Patterson BD, MacRae EA, and Ferguson IB. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV) [J]. Anal Biochem, 1984, 139: 487-492
- [10] Draper H, and Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation [J]. Methods Enzymol, 2002, 86: 421-431
- [11] Xiao AF, Zhou XS, Zhou L, et al. Detection of intracellular reactive oxygen species by flow cytometry in *Pichia pastoris* fermentation [J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2006, 22: 273-277
- [12] Shiozaki S, Shimizu S, and Yamada H. Unusual intracellular accumulation of S-adenosyl-L-methionine by microorganisms [J]. Agric Biol Chem, 1984, 48: 2293-2300
- [13] Sibirnyi AA, and Titorenko VI. A method of quantitative determination of alcohol oxidase and catalase in yeast colonies [J]. Ukr Biokhim Zh, 1986, 58: 65-68
- [14] Cereghino JL, and Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24: 45-66
- [15] Charoenrat T, Ketudat-Cairns M, Stendahl-Andersen H, et al. Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2005, 27: 399-406
- [16] Lee JH, Choi IY, Kil IS, et al. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast [J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1526: 191-198
- [17] Steels EL, Learmonth RP, and Watson K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically [J]. Microbiology, 1994, 140(Pt3): 569-576
- [18] Mozhenok TP, Beliaeva TN, Bulychev AG, et al. Effect of polyamine synthesis inhibitors separately and in combination with epidermal growth factor on fusion of lysosomes with phagosomes and F-actin level in mouse peritoneal macrophages [J]. Tsitologiya, 2000, 42: 573-577
- [19] Bistulfi G, Diegelman P, Foster BA, et al. Polyamine biosynthesis impacts cellular folate requirements necessary to maintain S-adenosylmethionine and nucleotide pools [J]. FASEB J, 2009, 23: 2888-2897
- [20] Stipanuk MH. Metabolism of sulfur-containing amino acids [J]. Annu Rev Nutr, 1986, 6: 179-209
- [21] Cona A, Rea G, Angelini R, et al. Functions of amine oxidases in plant development and defence [J]. Trends Plant Sci, 2006, 11: 80-88

现代食品科技