



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114134056 A

(43) 申请公布日 2022.03.04

(21) 申请号 202111307689.9

C12R 1/865 (2006.01)

(22) 申请日 2021.11.05

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:M 2021915 2021.07.21

(71) 申请人 浙江工业大学

地址 310014 浙江省杭州市拱墅区潮王路
18号

(72) 发明人 胡忠策 潘俊超 王远山 秦海彬
郑裕国

(74) 专利代理机构 杭州天正专利事务所有限公
司 33201

代理人 黄美娟 李世玉

(51) Int.Cl.

C12N 1/18 (2006.01)

C12P 19/40 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

酿酒酵母ZJS10041及其在发酵产S-腺苷蛋
氨酸中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种酿酒酵母ZJS10041及其在发酵产S-腺苷蛋氨酸中的应用,将酿酒酵母ZJS10041接种至初始发酵培养基,在28-32℃、100-200rpm下发酵培养至 $OD_{600}=13-15$,补加L-蛋氨酸,继续培养24h,获得含S-腺苷蛋氨酸的发酵液,将发酵液分离纯化,获得S-腺苷蛋氨酸;本发明酿酒酵母ZJS10041高产酿酒酵母,摇瓶发酵产量为1.21g/L,产量提高202.5%,发酵72h后S-腺苷蛋氨酸产量为5.73g/L。

1. 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) ZJS10041, 保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏日期2021年7月21日, 保藏编号CCTCC M 2021915, 地址: 中国武汉, 武汉大学, 邮编430072。

2. 一种权利要求1所述酿酒酵母ZJS10041在发酵产S-腺苷蛋氨酸中的应用。

3. 如权利要求2所述的应用, 所述的应用为: 将酿酒酵母ZJS10041接种至初始发酵培养基, 在28-32℃、100-200rpm下发酵培养至 $OD_{600}=13-15$, 补加L-蛋氨酸, 继续培养24h, 获得含S-腺苷蛋氨酸的发酵液, 将发酵液分离纯化, 获得S-腺苷蛋氨酸; 所述初始发酵培养基组成为: 葡萄糖10-30g/L, 酵母粉1-5g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1-5g/L, K_2HPO_4 1-5g/L, KH_2PO_4 1-10g/L, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5-1.5g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1-1.0g/L, $MgSO_4$ 0.2-5g/L, $CaCl_2$ 0.1-1.0g/L, $CuSO_4$ 0.001-0.6g/L, 柠檬酸三钠二水合物0.1g/L, 溶剂为水。

4. 如权利要求3所述的应用, 其特征在于所述L-蛋氨酸补加总量以发酵培养基体积计为1-4g/L。

5. 如权利要求3所述的应用, 其特征在于所述发酵培养在加有发酵培养基的发酵罐中进行, 控制温度28-32℃、pH5.0-6.0、转速500-700rpm、通气量4-8L/min、罐压0.05MPa, 发酵过程中以6-12ml/(h·L)的速度流加500g/L葡萄糖水溶液使罐内残留糖控制在5g/L; 所述发酵培养基组成为: 葡萄糖10-20g/L, 酵母粉1-5g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1-10g/L, K_2HPO_4 1-10g/L, KH_2PO_4 5-15g/L, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01-1.0g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1-1.0g/L, $MgSO_4$ 1-5g/L, $CaCl_2$ 0.1-1.0g/L, $CuSO_4$ 0.0001-0.01g/L, 钼酸铵0.0001-0.01g/L, NaCl 0.1-1.0g/L, 生物素0.0001-0.01g/L, 泛酸钙0.0001-0.01g/L, 维生素 B_1 0.0001-0.01g/L, 维生素 B_6 0.0001-0.01g/L, 溶剂为水, pH7.0。

6. 如权利要求5所述的应用, 其特征在于采用发酵罐培养时, 所述L-蛋氨酸分批添加, 当发酵液中菌体湿重达到220g/L时以终浓度2g/L的量补加1次蛋氨酸, 当菌体湿重达到240g/L时以终浓度3g/L的量补加1次蛋氨酸, 然后每隔4小时以终浓度3g/L的量补加蛋氨酸直至发酵结束, 蛋氨酸总添加终浓度为10-16g/L。

7. 如权利要求6所述的应用, 其特征在于所述L-蛋氨酸补加总量为12-14g/L。

8. 如权利要求6所述的应用, 其特征在于所述发酵培养基组成为: 葡萄糖20g/L, 酵母粉3g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 5g/L, K_2HPO_4 5g/L, KH_2PO_4 10g/L, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6g/L, $MgSO_4$ 3g/L, $CaCl_2$ 0.5g/L, $CuSO_4$ 0.0016g/L, 钼酸铵0.0048g/L, NaCl 0.5g/L, 生物素0.0003g/L, 泛酸钙0.0036g/L, 维生素 B_1 0.0036g/L, 维生素 B_6 0.0036g/L, 溶剂为水, pH7.0。

9. 如权利要求3所述的应用, 其特征在于所述酿酒酵母ZJS10041发酵前先进行活化和种子扩大培养, 再将种子液以体积浓度5-10%的量接种至初始发酵培养基或发酵培养基, 所述活化和种子扩大培养按如下步骤进行: (1) 取酿酒酵母ZJS10041接种至活化培养基, 30℃培养2-3d, 获得酿酒酵母活化菌株; 所述活化培养基组成为: 葡萄糖30g/L, 酵母粉10g/L, 蛋白胨20g/L, 琼脂20g/L, 溶剂为水, pH自然; (2) 挑取单菌落接种至种子培养基中, 30℃培养12小时, 获得种子液; 所述种子培养基组成为: 葡萄糖20g/L, 酵母粉10g/L, 蛋白胨20g/L, 溶剂为水, pH7.0。

酿酒酵母ZJS10041及其在发酵产S-腺苷蛋氨酸中的应用

(一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一种酿酒酵母ZJS10041及其在发酵产S-腺苷蛋氨酸中的应用。

(二) 背景技术

[0002] S-腺苷蛋氨酸是一种存在于生物体内的天然活性物质,是生物体内重要的甲基供体,通过转甲基作用、转硫基作用和转氨丙基作用参与生物体内激素、神经递质、核酸、蛋白质和磷脂等物质的生物合成代谢;S-腺苷蛋氨酸与谷胱甘肽的生物合成有密切关联,与体内各种解毒过程关系密切,是维护细胞膜正常功能、人体正常代谢和健康不可缺少的重要生命物质。S-腺苷蛋氨酸在临床上应用广泛,与基因调控、荷尔蒙活性、神经传导和解毒功能等诸多生理功能密切相关,对肝病、抑郁症、阿尔茨海默病等具有治疗作用。用于治疗药物的主要产品有S-腺苷蛋氨酸对甲苯磺酸硫酸盐和S-腺苷蛋氨酸1-4-丁二磺酸盐。

[0003] S-腺苷蛋氨酸分子式为 $C_{15}H_{22}N_6O_5S$,分子量398.44,S-腺苷蛋氨酸极其不稳定,容易被亲核试剂进攻发生裂解反应,容易在中性或碱性条件下发生水解反应,对温度敏感。S-腺苷蛋氨酸对甲苯磺酸硫酸盐的结晶为白色结晶或结晶性粉末,S-腺苷蛋氨酸对甲苯磺酸硫酸盐易溶于水,微溶于甲醇、乙醇,不溶于乙醚、丁酮。

[0004] S-腺苷蛋氨酸的生产主要有两种方法:化学合成法、微生物发酵法。

[0005] 化学法合成S-腺苷蛋氨酸副产物多,分离纯化困难,工业化前景小。微生物发酵法生产S-腺苷蛋氨酸的机理是利用酵母细胞体内的S-腺苷蛋氨酸合成酶催化腺苷三磷酸和蛋氨酸反应合成S-腺苷蛋氨酸,其合成途径原理见图1。

[0006] 微生物发酵法生产S-腺苷蛋氨酸是以葡萄糖等为主要碳源,在发酵过程中添加前体物质L-蛋氨酸促进S-腺苷蛋氨酸生物合成,具有工艺流程简单、产量高、底物廉价易得等优势,是目前应用最为广泛、成本相对低的一种方法。

[0007] 目前酿酒酵母作为微生物发酵生产S-腺苷蛋氨酸的常用菌株仍存在S-腺苷蛋氨酸产量低的问题,其原因主要是集中在细胞内S-腺苷蛋氨酸合成能力较低和S-腺苷蛋氨酸作为甲基供体消耗量较大,导致酿酒酵母中无法积累较多的S-腺苷蛋氨酸。目前提高S-腺苷蛋氨酸产量主要是通过增强细胞内S-腺苷蛋氨酸的合成能力,包括通过改造S-腺苷蛋氨酸合成酶,过表达S-腺苷合成酶,增加细胞内ATP的含量等方法。同时为了保证细胞内S-腺苷蛋氨酸在细胞内的存储量,通过分析S-腺苷蛋氨酸在细胞内的代谢途径,敲除相关基因或降低关键酶的表达来减少S-腺苷蛋氨酸的消耗。因此通过生物工程手段筛选出高产S-腺苷蛋氨酸的酿酒酵母能够有效解决目前工业生产S-腺苷蛋氨酸产量低的问题。

[0008] 在酿酒酵母中,S-腺苷蛋氨酸合成与分解代谢途径如下:第一步是由蛋氨酸合成酶催化生产S-腺苷蛋氨酸,第二步是通过转甲基化反应形成腺苷高半胱氨酸,第三步是由腺苷高半胱氨酸水解酶催化的形成腺苷和高半胱氨酸,腺苷由腺苷激酶生成腺嘌呤核糖核苷酸。高半胱氨酸是通过蛋氨酸合成酶催化的蛋氨酸生成产生的,或者通过形成胱氨酸合成酶催化的胱氨酸。胱氨酸经过三次反应步骤后转化为谷胱甘肽。S-腺苷蛋氨酸是通过将ATP的腺苷酸部分转移到蛋氨酸的硫原子中而合成的。

[0009] 虫草菌素是一种核苷,结构与腺苷相似,但缺少3'-羟基,作为一种核苷类似物,它能够竞争性地抑制酿酒酵母中腺苷激酶(AD01)的活性。减少了腺苷向腺嘌呤核糖核苷酸的转化,造成细胞中腺苷的累积,进而减弱S-腺苷蛋氨酸转甲基化反应形成腺苷高半胱氨酸并进一步水解得到腺苷的能力,最终增加S-腺苷蛋氨酸的积累。

[0010] 由于胱硫醚-β-合酶(CBS)可以从S-腺苷蛋氨酸循环中清除高半胱氨酸,因此破坏胱硫醚-β-合酶基因能够提高酿酒酵母中S-腺苷蛋氨酸的产量。

[0011] 基于上述原理,本发明提供一种基于酿酒酵母腺苷激酶和胱硫醚β合成酶(CBS)在S-腺苷蛋氨酸代谢中的功能与作用,使用虫草菌素和氨基氧乙酸作为筛选剂来筛选高产S-腺苷蛋氨酸菌株。

(三) 发明内容

[0012] 本发明目的是提供一株高产S-腺苷蛋氨酸的酿酒酵母菌株ZJS10041及其在发酵产S-腺苷蛋氨酸中的应用,有效解决目前工业生产S-腺苷蛋氨酸产量低的问题。

[0013] 本发明采用的技术方案是:

[0014] 本发明提供一株高产S-腺苷蛋氨酸的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) ZJS10041,保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏日期2021年7月21日,保藏编号CCTCC NO:M 2021915,地址:中国武汉,武汉大学,邮编430072。

[0015] 本发明还提供一种所述酿酒酵母ZJS10041在发酵产S-腺苷蛋氨酸中的应用,所述的应用为:将酿酒酵母ZJS10041接种至初始发酵培养基,在28-32℃、100-200rpm下发酵培养至 $OD_{600}=13-15$,补加L-蛋氨酸,继续培养24h,获得含S-腺苷蛋氨酸的发酵液,将发酵液分离纯化,获得S-腺苷蛋氨酸;所述初始发酵培养基组成为:葡萄糖10-30g/L,酵母粉1-5g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1-5g/L, K_2HPO_4 1-5g/L, KH_2PO_4 1-10g/L, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5-1.5g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1-1.0g/L, $MgSO_4$ 0.2-5g/L, $CaCl_2$ 0.1-1.0g/L, $CuSO_4$ 0.001-0.6g/L,柠檬酸三钠二水合物0.1g/L,溶剂为水。优选初始发酵培养基终浓度组成为:葡萄糖30g/L,酵母粉5g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 5g/L, K_2HPO_4 5g/L, KH_2PO_4 10g/L, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g/L, $MgSO_4$ 0.2g/L, $CaCl_2$ 0.1g/L, $CuSO_4$ 0.0016g/L,柠檬酸三钠二水合物0.1g/L,溶剂为水, pH7.0。

[0016] 进一步,所述L-蛋氨酸补加总量以初始发酵培养基体积计为1-4g/L,优选1.38g/L。

[0017] 进一步,所述发酵在加有发酵培养基的发酵罐中进行,控制温度28-32℃、pH5.0-6.0、转速500-700rpm、通气量4-8L/min、罐压0.05MPa,发酵过程中以6-12ml/(h·L)的速度流加500g/L葡萄糖水溶液使罐内残留糖控制在5g/L,通过控制搅拌转速和通气量,使罐内溶氧保持在10%~20%;所述发酵培养基组成为:葡萄糖10-20g/L,酵母粉1-5g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1-10g/L, K_2HPO_4 1-10g/L, KH_2PO_4 5-15g/L, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01-1.0g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1-1.0g/L, $MgSO_4$ 1-5g/L, $CaCl_2$ 0.1-1.0g/L, $CuSO_4$ 0.0001-0.01g/L,钼酸铵0.0001-0.01g/L, NaCl 0.1-1.0g/L,生物素0.0001-0.01g/L,泛酸钙0.0001-0.01g/L,维生素B₁ 0.0001-0.01g/L,维生素B₆ 0.0001-0.01g/L,溶剂为水, pH7.0。

[0018] 进一步,采用发酵罐培养时,所述L-蛋氨酸优选分批添加,当发酵液中菌体湿重达到220g/L时开始以终浓度2g/L的量补加1次蛋氨酸,当菌体湿重达到240g/L时开始以终浓

度3g/L的量补加1次蛋氨酸,然后每隔4小时以终浓度3g/L的量补加蛋氨酸直至发酵结束。所述L-蛋氨酸补加总量为10-16g/L,优选12-14g/L。

[0019] 进一步,所述发酵培养基组成优选为:葡萄糖20g/L,酵母粉3g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g/L, K_2HPO_4 5g/L, KH_2PO_4 10g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6g/L, MgSO_4 3g/L, CaCl_2 0.5g/L, CuSO_4 0.0016g/L, 钼酸铵0.0048g/L, NaCl 0.5g/L, 生物素0.0003g/L, 泛酸钙0.0036g/L, 维生素 B_1 0.0036g/L, 维生素 B_6 0.0036g/L, 溶剂为水, pH7.0。115℃灭菌30min。

[0020] 进一步,所述酿酒酵母ZJS10041发酵前先进行活化和种子扩大培养,再将种子液以体积浓度5-10%的量接种至初始发酵培养基或发酵培养基,所述活化和种子扩大培养按如下步骤进行:(1)取酿酒酵母ZJS10041接种至活化培养基,30℃培养2-3d,获得酿酒酵母活化菌株;所述活化培养基组成为:葡萄糖30g/L,酵母粉10g/L,蛋白胨20g/L,琼脂20g/L,溶剂为水, pH自然;(2)挑取单菌落接种至种子培养基中,30℃培养12小时,获得种子液;所述种子培养基组成为:葡萄糖20g/L,酵母粉10g/L,蛋白胨20g/L,溶剂为水, pH7.0。

[0021] 与现有技术相比,本发明有益效果主要体现在:

[0022] 本发明选择用酿酒酵母作为出发菌株进行诱变获得高产菌株,酿酒酵母ZJS10041合成S-腺苷蛋氨酸能力强,诱变出发菌株摇瓶发酵产量为0.4g/L,经过多轮诱变后,最终获得S-腺苷蛋氨酸高产酿酒酵母,摇瓶发酵产量为1.21g/L,产量提高202.5%。通过此方法能够筛选出高产S-腺苷蛋氨酸的酿酒酵母,能够缓解目前工业生产S-腺苷蛋氨酸产量低的问题。发酵72h后S-腺苷蛋氨酸产量为5.73g/L。

(四)附图说明

[0023] 图1为S-腺苷蛋氨酸合成流程图。

(五)具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此:

[0025] 为了使本技术领域的人员更好地理解本申请中的技术方案,下面将结合本申请具体实施例,对本申请的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本申请一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都应当属于本发明保护的范围。

[0026] 实施例1、出发菌株的筛选

[0027] (1)初筛:将10g采集自江苏南京六合区经济开发区六新路周边的土壤加入90ml的无菌水中震荡,形成土壤溶液,备用。将土壤溶液用生理盐水稀释 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 倍体积后,均匀涂布在含 $30\mu\text{g/mL}$ 链霉素的YPD固体培养基中,30℃培养2-3天,观察菌落颜色,表面结构等特征,酿酒酵母菌落呈球形突起,表面光滑不透明,颜色呈现出白色,根据菌株菌落特征筛出酿酒酵母菌株。YPD固体培养基组成:葡萄糖20g/L,酵母粉10g/L,蛋白胨20g/L,琼脂20g/L,溶剂为水, pH值自然。

[0028] (2)复筛:将步骤(1)从土壤中筛选出的酿酒酵母菌株接种YPD液体培养基,30℃培养12h,获得种子液;将种子液以体积浓度4%的接种量接种至装有50mL初始发酵培养基的500mL摇瓶中,30℃,150r/min摇床中培养24h至 $\text{OD}_{600}=14-15$,补加36g/L的L-蛋氨酸水溶液

2mL (L-蛋氨酸加入终浓度为1.38g/L),继续培养24h,获得发酵液。利用HPLC法测定S-腺苷蛋氨酸产量,进一步挑选出产量高的酿酒酵母菌株。

[0029] 初始发酵培养基组成:葡萄糖30g/L,酵母粉5g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g/L, K_2HPO_4 5g/L, KH_2PO_4 10g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/L, MgSO_4 0.2g/L, CaCl_2 0.1g/L, CuSO_4 0.0016g/L,柠檬酸三钠二水合物0.1g/L,溶剂为水,pH7.0。

[0030] (3) S-腺苷蛋氨酸产量的测定:取步骤(2) 1mL发酵液,12000r/min高速离心2min,去上清,加入200 μL 超纯水和200 μL 乙酸乙酯,30 $^\circ\text{C}$ 金属浴振荡30min,随后加入500 μL 0.35mol/L硫酸水溶液,振荡1.5h后12000r/min离心2min,取上清液,0.22 μm 有机膜过滤,滤液采用HPLC检测S-腺苷蛋氨酸峰面积,根据S-腺苷蛋氨酸标准曲线,获得S-腺苷蛋氨酸浓度,挑选出S-腺苷蛋氨酸产量高的作为酿酒酵母菌出发菌株,产量1.21g/L。

[0031] S-腺苷蛋氨酸标准曲线:取S-腺苷蛋氨酸标品,溶于水中,配制成不同浓度的标品溶液(0.4g/L、0.6g/L、0.8g/L、1.0g/L、1.2g/L、1.4g/L),采用HPLC检测。以峰面积为纵坐标,S-腺苷蛋氨酸浓度(g/L)为横坐标,绘制标准曲线,曲线方程为 $y=14528x+83$,x是S-腺苷蛋氨酸浓度(g/L),y是峰面积。

[0032] HPLC具体测定条件如下:色谱柱:J&K C18(4.6mm $\times$ 250mm,5 μm),流动相:含终浓度40mmol/L磷酸二氢铵和终浓度2mmol/L庚烷磺酸钠的甲醇水溶液(甲醇:水=18:82,v/v)的混合溶液,检测温度:30 $^\circ\text{C}$,检测流速:1.0ml/min,检测波长:254nm,进样量:10 μL 。

[0033] 实施例2:筛选高产S-腺苷蛋氨酸的酿酒酵母菌株

[0034] 对实施例1酿酒酵母出发菌株进行紫外诱变处理进行进一步筛选,具体方法如下:

[0035] 1、以600 $\mu\text{g/mL}$ 虫草菌素作为抗性筛选剂

[0036] (1)取实施例1筛选的酿酒酵母出发菌株接种至活化培养基,30 $^\circ\text{C}$ 培养2-3d,获得酿酒酵母活化菌株单菌落;挑取单菌落接种至种子培养基中,30 $^\circ\text{C}$ 培养12h,获得种子液。所述活化培养基组成为:葡萄糖30g/L,酵母粉10g/L,蛋白胨20g/L,琼脂20g/L,溶剂为水,pH自然。种子培养基组成为:葡萄糖20g/L,酵母粉10g/L,蛋白胨20g/L,溶剂为水,pH7.0。

[0037] (2)将紫外诱变仪器(UV8AC18H赛百奥)操作室用酒精棉擦拭,18W紫外照射30min灭菌。吸取1mL步骤(1)种子液置于洁净无菌平皿中,放置在紫外诱变操作台,18W紫外照射90S,将处理后的菌液涂布在抗性培养基上,30 $^\circ\text{C}$ 培养2-3d。所述抗性培养基终浓度组成:葡萄糖30g/L,酵母粉10g/L,蛋白胨20g/L,琼脂20g/L,虫草菌素600 $\mu\text{g/mL}$,溶剂为水,pH值自然。

[0038] (3)在步骤(2)抗性平板中挑取较大的诱变菌株单菌落,接种至种子培养基(组成同步骤1)中,30 $^\circ\text{C}$ 培养12h,获得诱变菌株种子液。

[0039] (4)将步骤(3)诱变菌株种子液以体积浓度4%的接种量接种至50mL初始发酵培养基(组成同实施例1),在转速150r/min、30 $^\circ\text{C}$ 发酵培养24h至 $\text{OD}_{600}=14-15$,补加36g/L的L-蛋氨酸水溶液2mL(L-蛋氨酸加入终浓度为1.38g/L),继续培养24h,获得发酵液。

[0040] (5)取1mL步骤(4)发酵液,12000r/min高速离心2min,去上清,加入200 μL 超纯水,200 μL 乙酸乙酯,30 $^\circ\text{C}$ 金属浴振荡30min,随后加入500 μL 0.35mol/L硫酸水溶液,振荡1.5h后12000r/min离心2min,取上清液,0.22 μm 有机膜过滤后,滤液采用实施例1所述高效液相检测并获得S-腺苷蛋氨酸浓度,从50株突变株中挑取S-腺苷蛋氨酸产量最高的突变菌株,记为菌株ZJS01012,S-腺苷蛋氨酸产量为0.45g/L。

[0041] (6) 菌株ZJS01012进行多轮诱变

[0042] 将步骤(5)获得的菌株ZJS01012重复步骤(1)-步骤(5)操作,筛选得到突变株ZJS02008,S-腺苷蛋氨酸产量为0.47g/L;将突变株ZJS02008重复步骤(1)-步骤(5)操作,筛选得到突变株ZJS03021,S-腺苷蛋氨酸产量为0.52g/L;将突变株ZJS03021重复步骤(1)-步骤(5)操作,筛选得到突变株ZJS04033,S-腺苷蛋氨酸产量为0.59g/L;将突变株ZJS04033重复步骤(1)-步骤(5)操作,筛选得到突变株ZJS05099,S-腺苷蛋氨酸产量为0.71g/L;将突变株ZJS05099重复步骤(1)-步骤(5)操作,筛选得到突变株ZJS06025,S-腺苷蛋氨酸产量为0.78g/L。

[0043] 2、以300 μ g/mL氨基氧乙酸作为抗性筛选剂

[0044] 将步骤(2)抗性培养基中虫草菌素替换为300 μ g/mL氨基氧乙酸,将步骤(6)中突变株ZJS06025重复步骤(1)-步骤(5)操作,筛选得到突变株ZJS07016,S-腺苷蛋氨酸产量为0.85g/L;将突变株ZJS07016重复步骤(1)-步骤(5)操作,筛选得到突变株ZJS08003,S-腺苷蛋氨酸产量为0.96g/L;将突变株ZJS07016重复步骤(1)-步骤(5)操作,筛选得到突变株ZJS08003,S-腺苷蛋氨酸产量为0.96g/L;将突变株ZJS08003重复步骤(1)-步骤(5)操作,筛选得到突变株ZJS09021,S-腺苷蛋氨酸产量为1.09g/L;将突变株ZJS09021重复步骤(1)-步骤(5)操作,筛选得到突变株ZJS10041,S-腺苷蛋氨酸产量为1.21g/L。

[0045] 实施例3、突变菌株ZJS10041的鉴定

[0046] 1、生理生化特征

[0047] 将实施例2筛选的菌株ZJS10041接种至活化培养基(组成同实施例2),30℃培养2-3d,观察菌落形态。菌株ZJS10041的菌落大而厚,菌落表面光滑、湿润、粘稠,容易挑起,菌落质地均匀,正反面和边缘、中央部位的颜色都很均一,菌落为乳白色。

[0048] 2、分子鉴定

[0049] 采用ITS方法进行菌种鉴定。

[0050] 将菌株ZJS10041接种至活化培养基(组成同实施例2),30℃培养2-3d,再接种在种子培养基(组成同实施例2)中,30℃培养12小时,获得种子液。取2ml种子液送至擎科生物技术有限公司进行ITS测序,将测序结果提交到NCBI数据库,并进行BLAST比对。该菌株ITS序列为819bp(核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示),将其ITS序列与GenBank中的基因序列进行同源性比较,发现其与*Saccharomyces cerevisiae*同源性达99.75%。

[0051] SEQ ID NO.1

[0052] GCTGGAATTTATAATTTTGAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAA
GAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTT
GCTATTCCAAACGGTGAGAGATTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAACACACTGTGG
AGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTT
TATTTATTCATTAAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAC TGAAATTTTAAAAATATTA AAAACTTTCAACA
ACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGA
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGTTATTCCAGGGGCGATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCT
CAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTT
TTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGC
TAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGT

TTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAAGCGAAGAAAACCGGGC。

[0053] 根据生理生活特征和ITS序列,将菌株ZJS10041鉴定为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) ZJS10041,保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC),保藏日期2021年7月21日,保藏编号CCTCC M 2021915,地址:中国武汉,武汉大学,邮编430072。

[0054] 实施例4、高产S-腺苷蛋氨酸酿酒酵母ZJS10041在5L发酵罐中的生产情况

[0055] (1) 取实施例3筛选的酿酒酵母ZJS10041菌种接种至活化培养基 (组成同实施例2), 30℃培养2-3d,获得酿酒酵母活化菌株单菌落。

[0056] (2) 挑取步骤(1)单菌落接种至种子培养基 (组成同实施例2) 中, 30℃培养12小时,获得种子液。

[0057] (3) 将种子液以体积浓度10%的接种量接种装有3L发酵培养基的5L发酵罐中,控制发酵罐内温度30℃、pH5.5、搅拌转速600rpm、通气量8L/min,罐压0.05MPa,发酵过程中以6-12ml/(h·L)的速度流加500g/L葡萄糖水溶液使罐内残留糖控制在5g/L。当发酵56h后发酵液中菌体湿重达到220g/L时,以终浓度2g/L的量补加1次蛋氨酸,当菌体湿重达到240g/L时以终浓度3g/L的量补加1次蛋氨酸,之后每隔4小时以3g/L的量补加蛋氨酸直至发酵结束,蛋氨酸总添加终浓度为12g/L。发酵72h后,测定S-腺苷蛋氨酸产量为:5.73g/L。

[0058] 发酵培养基组成:葡萄糖20g/L,酵母粉3g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g/L, K_2HPO_4 5g/L, KH_2PO_4 10g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6g/L, MgSO_4 3g/L, CaCl_2 0.5g/L, CuSO_4 0.0016g/L, 钼酸铵0.0048g/L, NaCl 0.5g/L, 生物素0.0003g/L, 泛酸钙0.0036g/L, 维生素 B_1 0.0036g/L, 维生素 B_6 0.0036g/L, 溶剂为水, pH自然。115℃灭菌30min, pH7.0。

[0059] 对比例1

[0060] 申请号2015101498076公开了一种制备S-腺苷蛋氨酸的方法,通过在基本发酵培养基中(葡萄糖3%,蛋白胨1.5%,酵母粉1%, K_2HPO_4 0.5%, MgCl_2 0.01%, pH 5.0~5.5)添加5mmol/L的柠檬酸和0.25mol/L的磷酸二氢钾,野生酿酒酵母在含有体积为1L的液体发酵培养基的发酵罐中进行发酵, SAM产量最高为2.2g/L。

序列表

<110> 浙江工业大学

<120> 酿酒酵母ZJS10041及其在发酵产S-腺苷蛋氨酸中的应用

<160> 1

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 819

<212> DNA

<213> 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)

<400> 1

```
gctggaatTTT ataattttga aatggatttt tttgttttgg caagagcatg agagctttta 60
ctgggcaaga agacaagaga tggagagtcc agccgggcct gcgcttaagt gcgcggtctt 120
gctaggcttg taagtTtctt tcttgcTatt ccaaacggTg agagatttct gtgcTtttTg 180
tataggacaa ttaaaaccgt ttcaatacaa cacactgtgg agTtttcata tctttgcaac 240
TTTTTctttg ggcatTCgag caatcggggc ccagaggtaa caaacacaaa caattttatt 300
tattcattaa atttttTtca aaaacaagaa ttttcgtaac tggaaatttt aaaatattaa 360
aaactttcaa caacggatct cttggTtctc gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat 420
acgtaatgtg aattgcagaa ttccgtgaat catcgaatct ttgaacgcac attgcgcccc 480
ttggTattcc agggggcatg cctgtttgag cgtcatttcc ttctcaaaca ttctgtttgg 540
tagtgagtga tactctttgg agttaacttg aaattgctgg ctttttcatt ggatgttttt 600
ttttccaaag agaggTttct ctgcgtgctt gaggtataat gcaagtacgg tcgttttagg 660
ttttaccaac tgcggctaatt cttttttata ctgagcgtat tggaacgtta tcgataagaa 720
gagagcgtct aggcgaacaa tgttcttaaa gtttgacctc aaatcaggta ggagtaccg 780
ctgaacttaa gcatatcaat aaagcgaaga aaaccgggc 819
```

