

## 发酵法生产核苷酸类物质研究概况

任 玉 岭

(中国科学院微生物研究所,北京)

自六十年代初发酵生产 5'-肌苷酸试验成功以来<sup>[1]</sup>,利用微生物生产核苷酸类物质的研究得到了迅速发展,并日益展示出核苷酸类物质在医药、食品以及农业上的广泛用途(表1)。

表 1 核苷酸类物质的用途

核苷酸类物质	用 途
5'-肌苷酸、5'-鸟苷酸、5'-黄苷酸	与谷氨酸钠并用制作“强力味精” <sup>[2]</sup>
肌苷、肌苷酸	医治心脏病、肝病、放射线照射病、血吸虫病、白血球减少症、视网膜炎、神经萎缩 <sup>[3]</sup> 、毛地黄中毒等 <sup>[4,5]</sup>
乳清酸、腺嘌呤、AICA*	治疗肝炎、脂肪肝 <sup>[4,6]</sup>
三磷酸腺苷	改善机体代谢,医治生理机能减退引起的疾患,以及肝炎、肾炎、耳鸣 <sup>[7]</sup> 、心机能不全、心肌梗塞 <sup>[4]</sup>
辅酶 A	降低胆固醇,医治动脉硬化、白血球减少、肝炎、脂肪肝、初生儿缺氧等 <sup>[8]</sup>
黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)	医治维生素 B <sub>2</sub> 缺乏症等 <sup>[4]</sup>
腺苷酸、腺苷	医治抗真菌抗菌素引起的疾患、铅中毒、血小板凝集、钙缺乏引起的神经萎缩等 <sup>[6]</sup>
复合核苷酸	治疗白血球减少、血小板减少、肝功能失调等 <sup>[9]</sup>
胞嘧啶阿拉伯糖苷、5'-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤及氮杂嘌呤衍生物	对癌症有缓解作用 <sup>[10]</sup>
CDP-胆碱*	医治脑损伤 <sup>[4]</sup> 、急性安眠药中毒、头外伤、脑溢血后遗症 <sup>[11]</sup>
6-氮杂尿嘧啶核苷	抗菌、抗癌、对干癣症有显著疗效 <sup>[6,9]</sup>
嘌呤核苷酸	有抑制病毒的作用 <sup>[6]</sup>
CTP	医治脑震荡
七〇二	使水稻、玉米、棉花、蔬菜等增产、促进家畜生长 <sup>[12,13]</sup>

\* AICA: 5-氨基-4-甲酰胺嘧啶; CDP-胆碱: 胞嘧啶核苷二磷酸-胆碱。

近十年来,在毛主席革命路线指引下,我国对核苷酸类物质的研究发展很快,已经研究成功和广泛用于生产核苷酸类物质的方法有:①以谷氨酸生产菌体为原料的细菌自溶法<sup>[14]</sup>;②以啤酒酵母<sup>[15]</sup>、白地霉<sup>[13]</sup>、青霉菌体为原料的 5'-磷酸二酯酶酶解法<sup>[9]</sup>;③以石油酵母为原料的碱降解法<sup>[11]</sup>;④直接发酵法<sup>[3,7]</sup>,此外还有以腺苷酸为原料通过光合成、氧化磷酸化等方法生产 ATP。直接发酵生产核苷酸类物质,原料易取,效率较高,甚受重视。

根据国外近年来的报道,以发酵法生成的核苷酸类物质已达 60 多种,例如在医药方面具有重要价值的 IMP (肌苷酸)、IR (肌苷)、ATP (三磷酸腺苷)、GTP (三磷酸鸟苷)、NAD (尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸)、FAD (黄素腺嘌呤二核苷酸) 以及对癌症具有缓解作用的 cAMP (环状腺嘌呤单核苷酸) 和各种氮杂嘌呤衍生物等。其中不少品种已投入生产或已具备工业生产水平。

## 产生核苷酸类物质的微生物及其产率

微生物产生核苷酸物质有两条生化合成途径。其一是向微生物培养基中添加核酸碱基及其衍生物,通过微生物合成相应的核苷或核苷酸,称作分段合成 (salvage) 途径;其二是微生物在一般含有碳氮源及天然营养物质的培养基中培养时直接积累核苷酸类物质,称为直接合成 (de novo) 途径。

绪方<sup>[14]</sup>曾于饥饿条件下研究了各种微生物分泌核苷酸类物质的能力。结果指出,能够分泌吸收紫外光的物质的菌大多属于枯草杆菌属和假单胞杆菌属,以及产气杆菌、大肠杆菌、马铃薯坏腐棒杆菌、粘质赛氏杆菌、白色葡萄球菌等。古屋等<sup>[11]</sup>研究指出,以腺嘌呤营养缺陷型为指示菌,所得产生的腺嘌呤衍生物的菌株中,有 356 株是细菌,35 株是放线菌,13 株是霉菌。说明由细菌当中分离核苷酸类物质的产生菌有较高的频率。但是,通过六十年代初期的筛选工作,人们认识到,野生型菌株不论是通过直接合成或是分段合成,积累核苷酸物质的能力一般来说都是很低的。然而,近代大量实践开始打破了这些看法。三泽

等<sup>[16]</sup>以产氨短杆菌 ATCC 6872 积累肌苷酸的培养基为基础,突出高磷、高镁、添加锰离子的特点,设计了表 2 所示的分离培养基及发酵培养基,有效的筛选了积累肌苷酸及其衍生物的菌株。由 22 个鸟粪、5 个哺乳动物粪便及 12 个土壤样品中分离的 520 株菌中,就有 113 株能够积累肌苷酸和肌苷酸衍生物,其中有 5 株菌于摇瓶发酵中,在添加次黄嘌呤的条件下,肌苷酸产量可达 5—8 克/升。但现在所报道的以直接合成途径大量积累核苷酸类物质的菌株,都不是从自然界分离的野生型,而是由野生型诱变得到的各种营养缺陷型。研究的最多的是产氨短杆菌 ATCC 6872 菌株<sup>[10,17-19]</sup>,不仅它的野生型可以直接转化很多嘌呤衍生物生成相应的核苷酸,而且它的各种营养缺陷型突变体能够通过分段合成或直接合成途径积累各种核苷酸衍生物(表 3 与图 1)。其中积累肌苷、肌苷酸、鸟苷酸、黄苷酸、ATP、GTP 以及 NAD 和 FAD 等的能力都达到或接近工业生产水平。以枯草杆菌为出发菌株,通过诱变和转导得到的各种变异株<sup>[46-52]</sup>也具有积累大量各种核苷酸的能力,例如肌苷酸、肌苷、黄苷酸、黄苷、腺苷酸、腺苷等。此外,短小芽孢杆菌积累肌苷 16—18 克/升<sup>[17]</sup>,巨大芽孢杆菌积累 AICAR 15.4 克/升<sup>[53]</sup>,谷氨酸棒状杆菌积累肌苷酸 12.7 克/升<sup>[54]</sup>,产氨短杆

表 2 分离筛选核苷酸物质产生菌的培养基

组 分	分离用固体培养基	发 酵 培 养 基	
		A	B
葡萄糖	10%	10%	10%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	1	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	1	1
MgSO <sub>4</sub>	1	1	1
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.01	0.01	CaCO <sub>3</sub> 0.01
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.001	0.001	0.001
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.0001	—	—
生物素	30微克/升	30微克/升	30微克/升
泛酸钙	10毫克/升	—	10毫克/升
维生素 B <sub>1</sub>	5毫克/升	—	5毫克/升
叶酸	2毫克/升	—	—
尼克酸	2毫克/升	—	—
吡哆醛	4毫克/升	—	—
酚红	15毫克/升	—	—
酵母膏	—	0.5—1.0	肉膏0.2%
尿素	0.6%	0.6%	0.6%
洋葱	2%	—	—
次黄嘌呤	—	3毫克/毫升	3毫克/毫升
pH	8.2	8.0—8.2	8.0—8.2

表 3 产氨短杆菌 ATCC6872 (野生型)分段合成的各种核苷酸衍生物

添 加 前 体	产 物	产 量 (毫克/毫升)	添 加 前 体	产 物	产 量 (毫克/毫升)
次黄嘌呤	IMP	22.3	2,6-二氨基-嘌呤	6-羟胺-Pu***-RP	痕
腺嘌呤	AMP,ADP,ATP	各 2—3		6-羟胺-Pu-RPP	痕
鸟嘌呤	GMP,GDP,GTP	各 2—3		6-羟胺-Pu-RPPP	2.30
腺嘌呤、尼克酸	NAD	3.5	2-氟基-嘌呤	2-F-AMP	0.81
腺嘌呤、FMN	FAD	1.18		2-F-ADP	1.41
尿嘧啶	UMP	4.8		2-F-ATP	1.74
乳清酸	OMP	4.3	6-羟胺-嘌呤	6-羟胺-Pu-RP	0.68
6-氮杂尿嘧啶	UMP	2.54		6-羟胺-Pu-RPP	1.45
6-氮杂尿嘧啶+乳清酸	OMP	3.6		6-羟胺-Pu-RPPP	2.77
6-氮杂-U	6-氮杂-UMP	4.58	2-甲基-腺嘌呤	2-甲基-AMP	+
5-F-U	5-F-UMP	4.62		2-甲基-ADP	痕
5-OH-U	5-OH-UMP	4.24		2-甲基-ATP	痕
2-S-U	2-S-UMP	2.04	8-氮杂-次黄嘌呤	8-氮杂-IMP	1.98
4-S-U	4-S-UMP	2.75	8-氮杂-腺嘌呤	8-氮杂-AMP	痕
	4-S-UDP	0.51		8-氮杂-ADP	痕
	4-S-UTP	0.41		8-氮杂-ATP	1.62
6-氮杂-U	6-氮杂-尿嘧啶核苷		8-氮杂-鸟嘌呤	8-氮杂-GMP	0.96
6-硫基-嘌呤	6-硫基-IMP	3.27		8-氮杂-GDP	2.20
6-硫基-鸟嘌呤	6-硫基-GMP	1.46		8-氮杂-2'-GDP	
6-硫基-黄嘌呤	6-硫基-XMP	0.25		8-氮杂-3'-GDP	
*HPP	HPP-RP	5.5		8-氮杂-5'-GDP	1.50
6-甲基-嘌呤	6-甲基-Pu-RP	3.09	AICA	AICAR	0.68
2-甲基-次黄嘌呤	2-甲基-IMP	4.37	**APP	APP-RP	5.8mM
6-甲基胺-嘌呤	6-甲基胺-Pu-RP	3.67		APP-RPP	1.9mM

\* HPP: 4-羟基吡唑[3,4-d]嘧啶      \*\* APP: 4-氨基吡唑[3,4-d]嘧啶      \*\*\* Pu: 嘌呤

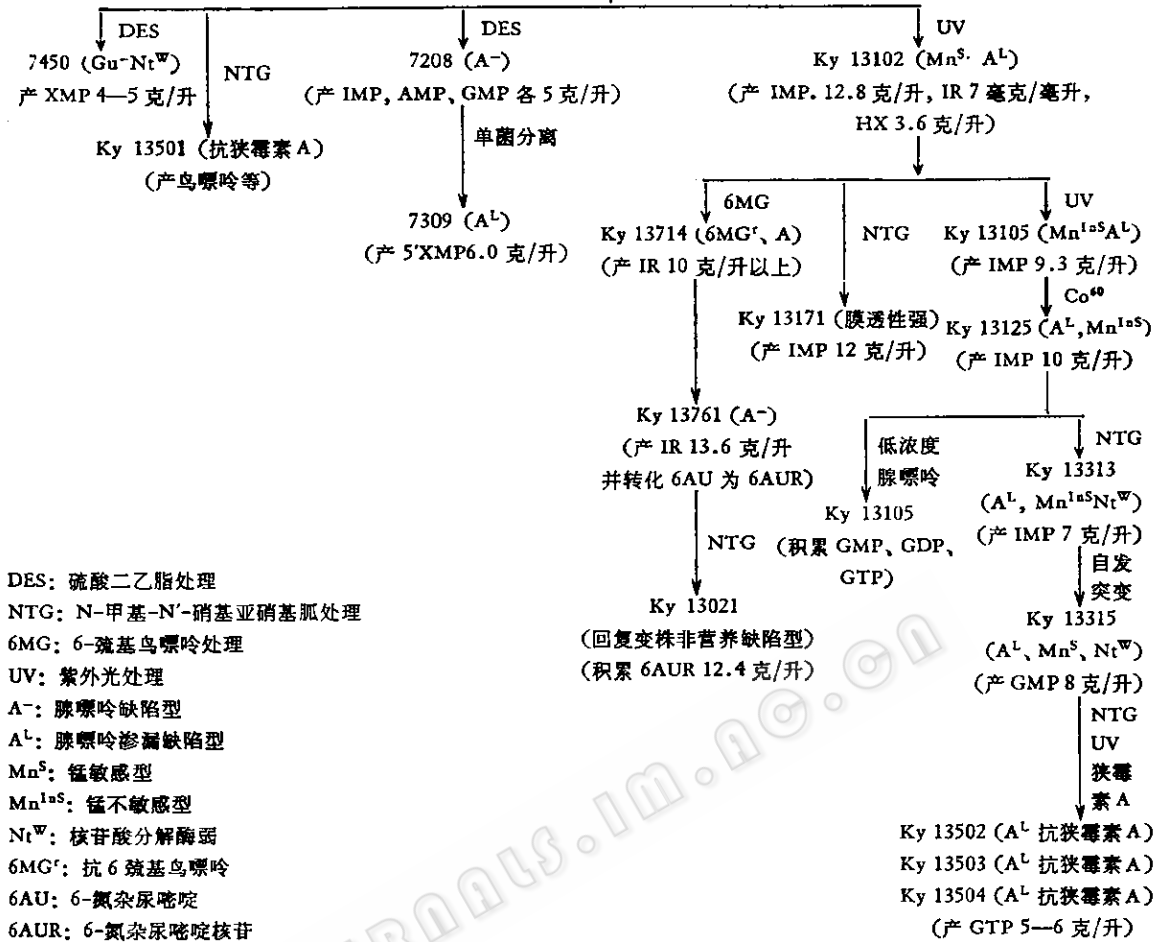


图1 产氨短杆菌 ATCC 6872 诱变谱系及积累产物

菌 ATCC 2195 积累肌苷酸 18.4 克/升<sup>[54]</sup>, 产氨短杆菌腺嘌呤缺陷型积累乳清酸 6.5 克/升<sup>[55]</sup>, 还有藤黄八叠球菌积累辅酶 A<sup>[56]</sup>, 产气杆菌积累黄苷等<sup>[56]</sup>。还筛选到一些以石油为碳源积累核苷酸类物质的菌株, 如石油棒杆菌的腺嘌呤缺陷型可以石蜡为碳源积累肌苷, 热带假丝酵母以煤油为碳源积累肌苷酸, 解烷假单胞菌以石蜡为原料积累辅酶 A 等。

## 核苷酸类物质发酵的代谢控制

核苷酸物质多是微生物体核酸代谢的中间产物, 正常条件下, 菌体本身可以通过一套完整的代谢调节系统使其不致过量产生。因此, 要使微生物在培养液中分泌并积累某种核苷酸物质, 就需要改变它的代谢调节机理。

### (一) 解除反馈抑制和酶阻遏

如图2所示的那样, 微生物本身存在着这样一套

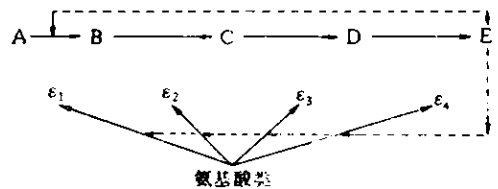


图2 生物合成途径的反馈抑制

- A—E: 代谢生成物(E是最终生成物)  
 $e_1—e_4$ : 参预各步反应的酶  
 —→: 各代谢产物和酶的生成途径  
 .....→: E对 $e_1$ 酶活性的抑制(终产物抑制)  
 .....→: E对 $e_1—e_4$ 各种酶生成的抑制(酶阻遏)

反馈调节机理, 其中终产物E能抑制开始催化其合成的酶( $e_1$ )活性, 叫反馈抑制或终产物抑制。同时终产物E对参预合成过程中的各种酶( $e_1—e_4$ )的生成能够发生抑制, 叫酶阻遏。微生物即通过这样两种方式, 对酶的活性及其合成进行调节。从而使核酸代谢中间产物不过量积累。

为了使微生物在培养液中蓄积所需要的核苷酸物质,就应打破或排除这样的反馈调节系统。例如,要生产中间产物 D,就要使参与由 D 生成 E 时所起作用的酶( $\epsilon_1$ )缺失或失活。以物理或化学方法对微生物诱变即有可能达此目的。这样的变异株因为丢失了合成 E 的能力,所以培养基中必须补加 E 才能确保细菌正常生长。当 E 的添加量充分时,细菌生长良好,但按反馈调节的原理,这时, $\epsilon_1$  的活性被抑制, $\epsilon_1-\epsilon_2$  的生成被阻遏,D 即不能多量生成。因此,限制 E 的添加量,使菌体生长,但又不足以引起反馈抑制或酶阻遏时,则可避免反馈抑制和酶阻遏的发生,使 D 得以积累。例如产氨短杆菌 ATCC 6872 [野生型] 其本身不能积累肌苷酸和黄苷酸。但当分别使用缺失 SAMP 合成酶的腺嘌呤缺陷型和缺失 XMP 氨化酶的鸟嘌呤缺陷型变异菌株时,便成功地在培养基中分别积累了 5'-IMP 和 5'-XMP。

如图 3 所示,对于 5'-IMP 的生成来说,最初起作用的酶是 PRPP 酰胺基转移酶,此酶受 AMP、ATP 及 GMP 的反馈抑制,被腺嘌呤阻遏。当使用腺嘌呤缺陷型变异株时,通过限制腺嘌呤的添加量,可解除对 PRPP 酰胺基转移酶的反馈抑制,同时也避免了腺嘌呤对 PRPP 酰胺基转移酶的阻遏作用,因而 5'-IMP 积累。

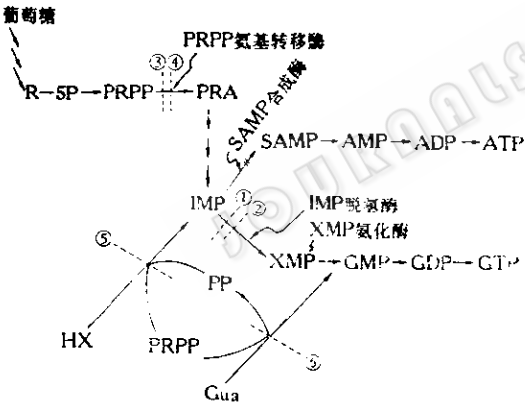


图 3 产氨短杆菌 ATCC 6872 嘌呤核苷酸代谢途径<sup>[39]</sup>  
①被鸟嘌呤阻遏;②被 GMP 抑制;③被腺嘌呤阻遏;④被 ATP、AMP、GMP 抑制;⑤被 GTP、ATP 抑制;⑥被 GTP 抑制。

同理,由 5'-IMP 生成 5'-GMP 的合成途径上的初始酶是 IMP 脱氢酶,此酶受 GMP 的反馈抑制,受鸟嘌呤阻遏,在应用缺失 XMP 氨化酶的鸟嘌呤变异株时,可通过限制鸟嘌呤的添加量,解除 GMP 对 IMP 脱氢酶的反馈抑制,同时避免鸟嘌呤对 IMP 脱氢酶的阻遏,XMP 在培养基中得到积累。

### (二) 应用抗代谢类似物突变株

应用抗代谢类似物变异菌株,实质上是解除反馈

抑制和酶阻遏的又一手段。抗代谢类似物变异株也称抗反馈抑制或抗阻遏突变株。

这样的菌株和非抗性菌株不同,一般认为在非抗性菌株的反馈抑制体系中,终产物和合成途径中的初始酶相结合,而引起酶活的被抑制,致使终产物的积累不致过量。而对抗代谢类似物变异株而言,代谢的终产物将不与合成途径中的初始酶相结合,因而不抑制酶活性,使代谢终产物就能继续不断的生成,使积累浓度较非抗性菌株明显提高。

石井等<sup>[50]</sup>用 8-氮杂鸟嘌呤(8-AG)处理缺失 AMP 脱氨酶的积累肌苷的枯草杆菌 K 腺嘌呤缺陷型菌株,得到了比原菌株产量增加 70—80% 的肌苷产生菌。用 8-AG 处理枯草杆菌的各种营养缺陷型,所得解阻遏突变株的核苷积累量均比其亲株显著提高<sup>[51]</sup>(表 4)。除了提高产量外还可以通过代谢类似物抗性菌株的选育,获得新类型的代谢产物。如以 8-AG 处理产肌苷的枯草杆菌(腺嘌呤缺陷型),结果由抗 8-AG 的菌株中选到了积累黄苷的变异株<sup>[43]</sup>。

表 4 枯草杆菌不同解阻遏突变株与其亲株积累产物的比较

遗传标记	添加营养物 (微克/毫升)	产物	产量 (克/升)	亲株产量 (克/升)
A <sup>-</sup> , 8AG <sup>r</sup>	腺嘌呤 100	肌苷	17—19	9—11 (A <sup>-</sup> )
X <sup>-</sup> an, 8AG <sup>r</sup>	鸟 苷 100	腺苷	6.5	4.5 (X <sup>-</sup> )
G <sup>-</sup> , 8AG <sup>r</sup>	鸟 苷 100	黄苷	8.5	4.5 (G <sup>-</sup> )
A <sup>-</sup> , X <sup>-</sup> , 8AG <sup>r</sup>	腺嘌呤 100 鸟 苷 500	肌苷	15.2	少量 (A <sup>-</sup> , X <sup>-</sup> )
A <sup>-</sup> , G <sup>-</sup> , 8AG <sup>r</sup>	鸟 苷 150	黄苷	17.5	10 (A <sup>-</sup> , G <sup>-</sup> )

中国科学院上海生化研究所等单位<sup>[52]</sup>使用 8-AG 和硫酸二乙酯复合处理枯草杆菌的腺嘌呤缺陷型,得到了一株腺嘌呤、硫胺素双营养缺陷型突变株 7171-6-1,经摇瓶发酵试验产肌苷 11.65 克/升。

木下等用 6-巯基嘌呤(6-MG)处理产氨短杆菌选育肌苷产生菌时发现,6-MG 的浓度过高(150 微克/毫升以上)时,选出的抗性菌株没有积累肌苷的能力<sup>[53]</sup>。

### (三) 选育酶缺失(或活性微弱)变异株

在开始进行核苷酸发酵的研究时,有人注意了磷酸酯酶活性弱的菌株的选育<sup>[54]</sup>。结果,在很多种微生物中,仅发现产氨短杆菌的磷酸酯酶活性趋近于零。产氨短杆菌 ATCC 6872 的野生型能够大量转化各种碱基生成相应的核苷酸是与此密切相关的。

以枯草杆菌腺嘌呤缺陷型为出发菌株,通过诱变选育了肌苷分解活力微弱的菌株,结果得到显著积累肌苷的突变体<sup>[44]</sup>。同样,由产氨短杆菌诱导的肌苷产生菌 Ky 13714<sup>[55]</sup>也是缺失肌苷分解酶的变异株(表 5)。

经诱变得到的枯草杆菌 5'-核苷酸酶活性微弱的

表5 肌苷产生菌Ky 13714两亲株分解  
肌苷酶活力的比较

菌株	IR $\xrightarrow{\text{分解}}$ HX	IR 积累	HX 积累
Ky 13102 (亲株)	7.67(比活)	0	3.65 毫克/毫升
Ky 13714	0 (比活)	7.10毫克/毫升	0

腺嘌呤缺陷型变异株,可大量积累 5'-IMP<sup>[49]</sup>。

在 GMP 发酵的研究中,借助于亚硝基胍处理,自 2000 株菌中选出了 GMP 分解酶活性微弱的菌株——产氨短杆菌 Ky 13313 及 Ky 13315,皆能大量积累鸟苷酸,成为分段合成 GMP 的优秀菌株<sup>[36]</sup>。

#### (四) 改变细胞膜的透性

核苷和碱基易透过微生物的细胞,但核苷酸透出细胞比较困难,所以在解除反馈抑制的前提下,还要考虑改变膜透性的问题。奈良等的研究发现,锰离子对于产氨短杆菌核苷酸的膜透性起着关键性的作用<sup>[22,23,31]</sup>。锰可引起细胞形态变化,造成细胞伸长和膨胀<sup>[32]</sup>。IMP、GMP 发酵都要求细胞出现这个异常变化的阶段。不管菌株对锰离子是否敏感都是这样。

锰离子的浓度过高或过低时,菌体均呈小球状或卵圆形。此时,R-5P(核糖-5-磷酸)与催化核苷酸合成的磷酸核糖焦磷酸化酶及核苷酸磷酸酯酶向胞外的分泌被抑制,因而核苷酸的积累急剧减少。

曾经观察到<sup>[33]</sup>,在锰过剩时细胞壁的脂肪含量升高,尤其是油酸的成分剧增,而锰为亚适量时,细胞壁脂肪含量极度下降。锰对细胞壁透性的调节作用颇似生物素对产谷氨酸菌的细胞透性的调节。

能够调节膜透性的因素还有腺嘌呤<sup>[36]</sup>、抗菌素、表面活性剂<sup>[33]</sup>。对锰离子不敏感菌株,腺嘌呤强烈控制着菌体形态的变化。

此外,也可以通过化学诱变,选育核苷酸膜透性强的菌株。这类菌株的细胞形态不因锰和腺嘌呤的浓度而改变,有较强的分泌核苷酸的能力<sup>[34]</sup>。

#### (五) 采用酶抑制剂

有报告指出<sup>[44]</sup>,在培养 24 小时后向产氨短杆菌 Ky 7309 的发酵液中添加酶抑制剂狭霉素 C (有嘌呤结构的抗菌素),成功地积累了 5'-XMP。这时狭霉素 C 抑制了鸟苷酸合成酶的活性,使 XMP 不能向 GMP 转化。

三泽等<sup>[28]</sup>还用产氨短杆菌 ATCC 6872 的超声波匀浆试验了酶抑制剂对核苷酸磷酸转移反应的抑制情况,发现  $\text{Ni}^{++}$ 、 $\text{Hg}^{++}$ 、 $\text{Zn}^{++}$  及 PCMB (对氯汞苯甲酸) 能在适当浓度下使磷酸转移酶活力抑制 90% 以上。把这些酶抑制剂用于鸟苷酸发酵的培养液,从而

提高了 GMP 的积累量。

## 影响核苷酸类物质发酵的因素

在核苷酸类物质的发酵生产中,培养基的组份及培养条件对产量影响很大。即使有了优良的菌株,如果培养基组份或发酵条件不适合,菌种的生产能力就不能充分表现出来,甚至不产生所需要的物质。核苷酸类物质发酵所要求的一般条件列入表 6。

表6 核苷酸类物质的发酵条件

1. 基本营养物质: 碳源、氮源、无机盐
2. 特殊营养物质: 氨基酸、维生素、核酸碱基等
3. 适宜的 pH 值
4. 供给适量的氧(振荡或通气)
5. 适合的温度

#### (一) 碳、氮源的影响

和其它发酵产品相似,碳、氮源是核苷酸类发酵的基本条件,碳、氮源的种类、用量及两者的配比都是

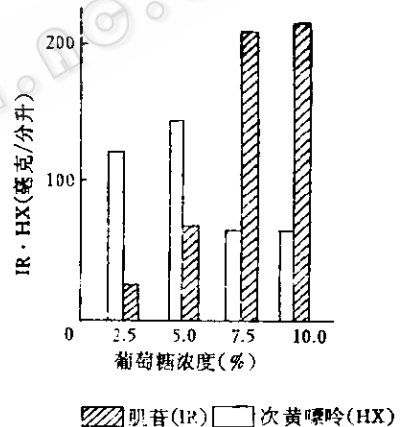


图4 葡萄糖浓度对枯草杆菌生成 IR 和 HX 的影响

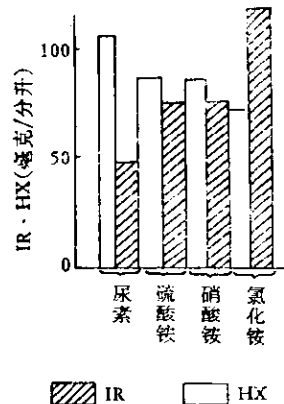
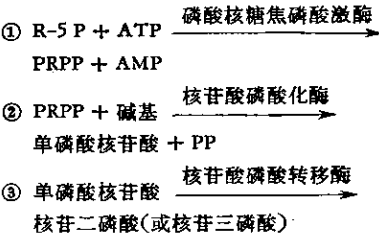


图5 氮源的种类对枯草杆菌生成 IR 和 HX 的影响

不可忽视的。目前所用的碳源多是葡萄糖或淀粉水解糖。蔗糖、甘露糖、乳糖及山梨醇等对肌苷的生成证明有更好的效果<sup>[37]</sup>，常用的氮源有尿素、氨水、氯化铵、硫酸铵等。图4及图5表明，碳源浓度和氮源种类不仅影响着核酸类物质的积累量，而且影响着不同核苷酸物质的积累比例。

(二) 金属离子的影响

产氨短杆菌合成核苷、核苷酸及核苷二磷酸和核苷三磷酸时大致有以下三个反应：



磷及镁离子对这三个反应是不可缺少的。  
锌离子和锰离子的作用是相近的，都对 R-5P 和作用于①、②两个反应的酶的分泌起着重要作用。

铁离子和钙离子也明显地左右着核苷酸的积累。对短小芽孢杆菌发酵肌苷的研究还发现<sup>[37]</sup>，添加非水溶性的磷酸钙，可以保持无机磷供应的低水平，而且它同酵母膏等一起灭菌可以生成促进肌苷积累的物质。

但是，多数报道表明，对于核苷酸类物质的生产并不需要维持无机磷的低水平，相反需要添加较高浓度的磷盐。对产氨短杆菌 ATCC 6872 而言，无论是直接合成 IMP、肌苷等，还是分段合成 ATP、GTP 以及 NAD、FAD 等，都需要添加 2% 的磷酸盐。添加镁离子(高浓度)、锰离子、泛酸可以解除高磷引起的细菌生长的抑制。

表 7 金属离子对枯草杆菌 No. 322 菌株积累鸟嘌呤衍生物的影响<sup>[51]</sup>

金属离子	鸟嘌呤及鸟苷(毫克分子)
无	0
Zn <sup>++</sup>	0
Cu <sup>++</sup>	0
Ni <sup>++</sup>	0
Co <sup>++</sup>	0
Fe <sup>++</sup>	9.5
Mn <sup>++</sup>	11.0
Sn <sup>++</sup>	0

(三) 维生素、氨基酸的影响

小西真八<sup>[47]</sup>报道了枯草杆菌 IAM-1523 的异亮氨酸缺陷型，在限制异亮氨酸的添加量时，产生腺苷 1.4 毫克/毫升。对于产氨短杆菌积累核苷酸来说，加入脯

氨酸、蛋氨酸、缬氨酸显示出促进作用。但是，一般说来没有发现氨基酸的特殊作用。与此相反，维生素对于核苷酸的积累有着很大的影响。尤其是泛酸和硫胺素的作用十分重要。对产氨短杆菌的实验表明<sup>[43]</sup>这两种维生素左右着 R-5P 及两种核苷酸合成酶的分泌，尤其是种子培养基中添加泛酸和 B<sub>1</sub> 更为重要。IMP 发酵中，假如种子培养基中没有 B<sub>1</sub>，即使转接到有泛酸和 B<sub>1</sub> 的发酵培养基中也不能积累 IMP (表 8)。

表 8 在种子培养基中添加维生素对 IMP 发酵的影响\*

维 生 素		IMP (毫克/毫升)	
		单独抽掉	单独加入
无		痕	—
维生素混合液	0.1 毫升	5.78	5.78
B <sub>2</sub>	2.0 微克/毫升	6.50	痕
B <sub>1</sub>	1.0 ”	痕	5.79
对氨基苯甲酸	1.0 ”	5.82	痕
吡 哆 辛	1.0 ”	5.29	痕
吡 哆 醛	0.2 ”	5.18	痕
泛 酸 钙	2.0 ”	5.48	痕
尼 克 酸	2.0 ”	5.37	痕
叶 酸	10.0 微克/升	5.86	痕

\* 发酵培养基有泛酸、B<sub>1</sub>。

(四) 核酸碱基及其衍生物的影响

发酵生产核苷酸类物质的微生物，多是碱基缺陷型，因此，碱基对菌的生长和核苷酸物质的积累是很重要的。碱基供体的物质常是酵母膏、酵母粉、肉膏、玉米浆、鱼浸出物一类的物质。碱基对于核苷酸类物质的积累有一个最适浓度，这个浓度通常比生长所需要最适浓度要小，所以也称亚适量。

石井等<sup>[50]</sup>选育的几株抗 8-AG 的枯草杆菌腺嘌呤缺陷突变株，其积累肌苷的能力都受腺嘌呤初始浓度的影响。阿部等<sup>[45]</sup>的实验还证明在产氨短杆菌 ATCC 6872 把 XMP 转化为鸟苷酸时，加入 XMP 的时间影响极大。又如发酵生成辅酶 1 时<sup>[41]</sup>，增加腺嘌呤添加量对其辅酶 1 的生成有显著促进作用。

(五) 温度的影响

比较了枯草杆菌的腺嘌呤缺陷型在 30℃ 与 40℃ 生成肌苷酸时的发酵情况。发现在 30℃ 时，不仅积累 IMP，还积累次黄嘌呤，但在 40℃ 培养时，仅有 IMP 的积累，其产量为 30℃ 的三倍。对腺嘌呤和鸟嘌呤的双重缺陷型菌株来说，5'-XMP 的积累也是 40℃ 较为有效(表 9)<sup>[49]</sup>。

(六) 多菌株混合发酵

关于多菌株混合发酵，苏州味精厂与中国科学院

微生物研究所合作<sup>[1]</sup>对肌苷酸的发酵进行了研究,开始接种接入谷氨酸棒杆菌 265(A<sup>-</sup>, Me<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Ni<sup>-</sup>)接种量 3%,培养 24 小时后,接入产氨短杆菌 926(A<sup>-</sup>),接种量 10%,结果肌苷酸产量提高了一倍以上。

表 9 温度对枯草杆菌 A-1-25 积累 IMP 的影响  
(30℃ 5 天 40℃ 4 天)

培 养 基 酵 母 膏 量 (克/升)	培 养 后 的 积 累			
	30℃		40℃	
	IMP (毫克分子)	HX (毫克分子)	IMP (毫克分子)	HX (毫克分子)
7	2.61	2.30	4.60	0
10	2.87	4.32	7.05	0
12	2.96	5.36	7.81	0.48
15	2.00	2.05	3.08	1.16

此外古屋等<sup>[42]</sup>采用 5'-XMP 生产菌与能将 5'-XMP 转化为鸟苷酸的菌株混合培养,结果在不添加 XMP 的前提下,鸟苷酸积累量达 9.67 毫克/毫升。三泽等<sup>[16]</sup>认为,三菌株混合培养比两菌株混合培养的效果还好些。

随着生产和科学研究工作的发展,发酵法生产核苷酸类物质已显示出广阔的前途。为了发展核苷酸类物质的发酵生产,应把注意力放到菌种的选育和对发酵条件的探讨上。研究和认识核苷酸类物质发酵的代谢控制及其发酵的调节因素,以加速选育菌种和选择适宜发酵条件。

让我们不断总结国内外的实际经验,遵照毛主席关于“古为今用,洋为中用”的教导,“破除迷信,解放思想”,多快好省地发展我国核苷酸类物质的生产。

### 参 考 资 料

[1] 国中 明:日本酿造协会志, **56**: 12, 1961。  
 [2] 木下祝郎:发酵协会志, **22**: 37、53、101, 1964。  
 [3] 中国科学院生物化学研究所等:微生物学报, **13**: (2), 136, 1973。  
 [4] 若木重敏:发酵协会志, **28**: 267, 1970。  
 [5] 上海味精厂等:微生物在医药工业上的应用, 149 页, 中国工业出版社, 1971。  
 [6] Demain, A. L.: *Progress Industrial Microbiology*, **8**: 36, 1969。  
 [7] 中国科学院微生物研究所编:核苷酸类物质的生产和应用, 138 页, 科学出版社, 1971。  
 [8] 上海酵母厂:菌体的综合利用(第三集), 17 页, 上海人民出版社, 1972。  
 [9] 华北制药厂等:微生物资料汇编 4: 43, 科学出版社, 1972。  
 [10] 田中晴雄等:发酵与代谢, **25**: 125, 1972。

[11] 绪方浩一:发酵工学杂志 **50**: 54, 1972。  
 [12] 杭州微生物协作组:菌肥和植物生长激素, 100 页, 中国工业出版社, 1971。  
 [13] 中国科学院微生物研究所编:核酸降解物在农业上的应用, 5 页, 科学出版社, 1971。  
 [14] Ogata, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **26**: 596, 1962。  
 [15] 古屋等:发酵与代谢, **9**: 24, 1963。  
 [16] Misawa, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**: 617, 1970。  
 [17] Nara, T.: *ibid.*, **31**: 1351, 1967。  
 [18] Nara, T.: *ibid.*, **32**: 561, 1968。  
 [19] Tanaka, H.: *ibid.*, **32**: 721, 1968。  
 [20] Nara, T.: *ibid.*, **32**: 956, 1968。  
 [21] 山田等:发酵与代谢, **18**: 25, 1968。  
 [22] 奈良等: *ibid.*, **18**: 111, 1968。  
 [23] Furuya, A.: *Appl. Microbiol.*, **16**: 981, 1968。  
 [24] Nakayama, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**: 290, 1969。  
 [25] 奈良等:发酵与代谢, **19**: 131, 1969。  
 [26] 三泽等: *ibid.*, **19**: 143, 1969。  
 [27] Misawa, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**: 521, 1969。  
 [28] Misawa, M.: *ibid.*, **33**: 532, 1969。  
 [29] Nara, T.: *ibid.*, **33**: 739, 1969。  
 [30] Komuro, T.: *ibid.*, **33**: 1018, 1969。  
 [31] 古屋等:发酵与代谢, **19**: 97, 1969。  
 [32] 奈良等: *ibid.*, **20**: 85, 1969。  
 [33] 奈良等: *ibid.*, **20**: 92, 1969。  
 [34] 古屋等: *ibid.*, **20**: 100, 1969。  
 [35] Kinoshita, S.: *Appl. Microbiol.*, **20**: 263, 1970。  
 [36] 高山等:发酵与代谢, **22**: 15, 1970。  
 [37] 古屋等: *ibid.*, **22**: 9, 1970。  
 [38] 加藤等: *ibid.*, **22**: 23, 1970。  
 [39] Nakayama, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**: 518, 1971。  
 [40] Tanaka, H.: *ibid.*, **35**: 989, 1971。  
 [41] 田中晴雄等:发酵与代谢, **25**: 133, 1972。  
 [42] 古屋等: *ibid.*, **27**: 57, 1973。  
 [43] 特许公报:昭 45—22518, 1970。  
 [44] 特许公报:昭 45—28556, 1970。  
 [45] Abe, S.: *Biotech. Bioeng.*, **13**: 229, 1971。  
 [46] Aoki, R.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **9**: 386, 1963。  
 [47] 小西真八:发酵与代谢, **18**: 15, 1968。  
 [48] Konishi, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **32**: 396, 1968。  
 [49] Akiya, T.: *ibid.*, **36**: 227, 1972。  
 [50] Ishii, K.: *ibid.*, **36**: 1511, 1972。  
 [51] Midorikawa, Y.: *ibid.*, **36**: 1529, 1972。  
 [52] Ishii, K.: *ibid.*, **37**: 287, 1973。  
 [53] Skodova, H.: *Folia Microbiol.*, **14**: 145, 1969。  
 [54] 柿本:日本农艺化学会讲演要旨集, 128 页, 1971。  
 [55] 特许公报, 昭 44—24307, 1969。  
 [56] 中山清等:发酵与代谢, **8**: 88, 1963。  
 [57] Suzuki, T.: 武田年报, **26**: 126, 1967。  
 [58] U S Patent, 3,620,922, 见《应用微生物学》**1**: 25, 1973。  
 [59] 奈良等:农艺化学会志, **38**: 167, 1964。  
 [60] 古屋晃等:发酵与代谢, **30**: 74, 1974。