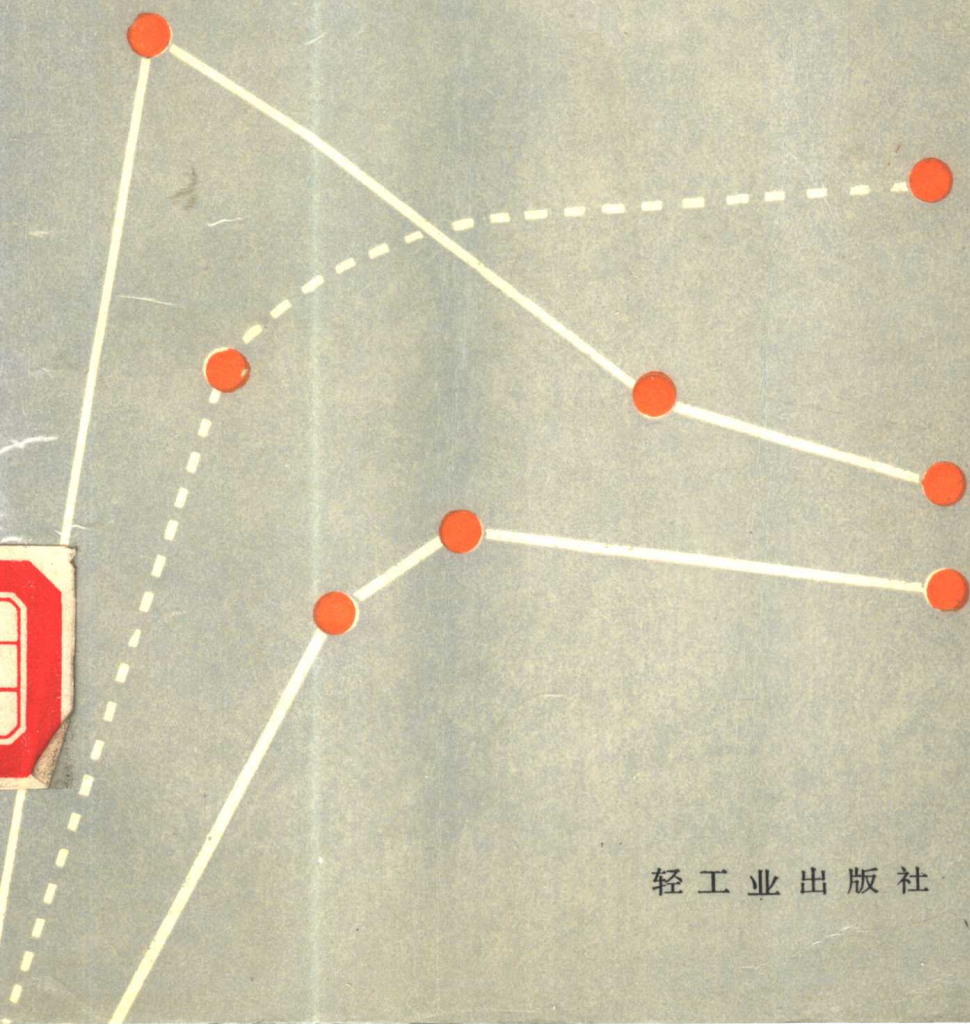


核酸发酵

【日】氨基酸·核酸集谈会 编

张克旭 杜连祥 译



轻工业出版社

核 酸 发 酵

〔日〕氨基酸·核酸集谈会 编

张克旭 杜连祥 译

轻工业出版社

内 容 简 介

本书比较系统地总结和归纳了历年来有关核酸发酵的研究成果。围绕核酸类物质的生产，阐述了“代谢控制发酵”的基本理论、技巧及其在核酸发酵中的深化与发展，涉及核酸类物质的生物合成途径、遗传控制、代谢调节、生化突变株的利用和选育、增大细胞膜渗透性的方法、微生物反应和化学反应结合的生产方法、发酵工程等。关于核酸类物质的应用，本书介绍了天然食品的呈味与鲜味成分及应用实例；在医药方面有：中枢神经、循环与泌尿系统用药、代谢药物、抗肿瘤药物、抗病毒药物及干扰素诱导物（IFI）等；核酸抗菌素方面介绍了核酸抗菌素的种类及其各论。

本书可供从事核酸类物质生产、应用及研究工作的专业人员和有关高等院校师生参考。

核 酸 发 酵

核酸集談会 编

本书系根据日本讲谈社1976年版本译出

核 酸 发 酵

〔日〕氨基酸·核酸集談会 编

◆ 张克旭 杜连祥 译

*

轻工业出版社出版

（北京广安门南滨河路25号）

国防科工委印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

各地新华书店经售

*

787×1092毫米 1/32 印张：14¹⁰/₃₂ 字数：318千字

1987年11月 第一版第一次印刷

印数：1—3,000 定价：3.60元

ISBN7-5019-0224-0/TS·144

译 者 序

随着我国应用微生物工业的蓬勃发展，应用微生物生产核酸类物质的科学研究工作也取得了巨大成绩。目前，在我国许多地区和部门，正进行着多方面的核酸发酵的研究。为了有益于这一新领域科学研究的开展，有必要了解和掌握国外核酸发酵的进展及成就。为此，我们翻译了《核酸发酵》一书。该书是日本一九七六年三月出版，系日本“氨基酸·核酸集谈会”编。对一九七五年以前世界各国核酸发酵研究进程和成果作了比较系统的总结。

本书围绕核酸类物质的生产，阐述了“代谢控制发酵”的基本理论、技巧及其在核酸发酵中的深化与发展，涉及核酸类物质的生物合成途径、遗传控制、代谢调节、生化突变株的利用和选育、增大细胞膜渗透性的方法、微生物反应和化学反应结合的生产方法、发酵工程等内容。可以说是一本开发微生物工业典型性研究的综合著作。

在翻译过程中，译者对书中一些不妥之处参阅了原始文献，作了力所能及的更正与微小的增删，有的加了译注。希望读者在参阅本书时，注意去粗取精，去伪存真，结合科研、生产实践，吸取对我国社会主义现代化建设有益的东西。

由于译者水平有限，经验不足，译文中难免有不妥之处，切盼读者批评指正。

译 者

一九八〇年四月

缩 写 说 明

为了叙述方便，本书采用以下缩写：

AMP：腺嘌呤核苷-磷酸，简称腺苷酸

CMP：胞嘧啶核苷-磷酸，简称胞苷酸

GMP：鸟嘌呤核苷-磷酸，简称鸟苷酸

IMP：次黄嘌呤核苷-磷酸，简称肌苷酸

UMP：尿嘧啶核苷-磷酸，简称尿苷酸

XMP：黄嘌呤核苷-磷酸，简称黄苷酸

必要时，**AMP**、**CMP**、**GMP**、**IMP**、**UMP**、**XMP**前加5'-、3'-
2'-，不加时表示5'-。

ADP：二磷酸腺苷，简称腺二磷

ATP：三磷酸腺苷，简称腺三磷

AICA：5-氨基-4-氨甲酰(基)咪唑

AICAR：5-氨基-4-氨甲酰(基)咪唑核苷酸

AICAR(s)：5-氨基-4-氨甲酰(基)咪唑核苷

CDP：二磷酸胞苷，简称胞二磷

CTP：三磷酸胞苷，简称胞三磷

CoA：辅酶A

cAMP：环腺苷酸

DNA：脱氧核糖核酸

DNase：脱氧核糖核酸酶

FAD：黄素腺嘌呤二核苷酸

FMN：黄素单核苷酸

GDP：二磷酸鸟苷，简称鸟二磷

GTP：三磷酸鸟苷，简称鸟三磷

NAD：烟酰胺腺嘌呤二核苷酸；辅酶I

NADP: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸: 辅酶 I

Pi, PPI: 无机磷酸及焦磷酸

PRPP: 磷酸核糖焦磷酸

RNA: 核糖核酸

mRNA: 信使RNA; 信息RNA

rRNA: 核糖体RNA; 核蛋白体RNA

tRNA: 转移RNA

RNase: 核糖核酸酶

SAICAR: 5-氨基-4- (N-琥珀基) 代氨基甲酰咪唑核苷酸

SAICAR(s): 5-氨基-4- (N-琥珀基) 代氨基甲酰咪唑核苷

SDS: 十二烷基硫酸钠 (Sodium dodesyl sulfate)

UDP: 二磷酸尿苷, 简称尿二磷

UTP: 三磷酸尿苷, 简称尿三磷

其它缩写请参照各篇、章规定。

前 言

一九五七年，日本发表了发酵法生产L-谷氨酸的研究成果，接着，一九五九年发现了使用微生物酶由核酸分解法生产5'-肌苷酸、5'-鸟苷酸的可能性。之后，随着L-谷氨酸发酵工业的确立，氨基酸发酵向多种氨基酸工业发展。关于核酸类物质的生产，自一九六一年由酵母核酸的分解法生产5'-肌苷酸、5'-鸟苷酸首先工业化后，相继开发了利用微生物直接生产这些物质的方法，即二步发酵法和一步发酵法（直接发酵法）。进而，展开了关于利用微生物生产各种核苷酸衍生物的研究，许多研究人员陆续发表了大量专利、论文。

在这种形势下，于一九五九年创立了“氨基酸集谈会”，从一九六三年起向“氨基酸·核酸集谈会”发展，先后由坂口谨一郎博士、片桐英郎博士、朝井勇宣博士（已故）、植村定治郎博士（已故）、山田浩一博士、有馬 啓博士任历届会长，由于多数委员、干事和会员们的努力，赞助会员们的经济支持，得以顺利发展。会刊“氨基酸与核酸”，一年二期，现已出版了32期。

一九七二年，由“氨基酸·核酸集谈会”编辑出版了《氨基酸发酵》一书，接着便着手归纳总结关于核酸类物质生产方面的研究成果，组织编写《核酸发酵》这本书。承蒙很多第一线的研究者执笔，本书以日文版、英文版问世，颇感欣慰。

现在发酵这个词非常广义，凡通过培养微生物，使某种特定产物大量积累的过程都称为发酵。并可通过冠以主产物或主原料的名称来反映某种特定的发酵。所以，氨基酸·核酸集谈会使用“核酸发酵”的措词为本书命名，即应用微生物生产核酸类物质的意思。

虽然本书的主题是核酸类物质的生产，却不能不涉及由二步发酵往一步发酵的转移、生物化学突变株的利用、如何解除代谢控制、增大细胞膜渗透性的方法、微生物反应和化学反应结合的生产方法、发酵工程等内容。可以说是一本开拓新微生物工业典型性研究的综合著作。确信，本书不仅对从事核酸类物质生产的科技人员具有指导意义，而且也是开发新的发酵工业的指南。

本书在出版过程中，蒙講談社编辑部高阜雅映、芳贺穰两先生的大力协助，特此致谢。

1976年1月1日

编委	緒方	浩一
	木下	祝郎
	角田	俊直
	相田	浩

目 录

序论 核酸发酵的历史与展望	1
第一篇 生产核酸类物质的关键因素	10
1. 与核酸分解有关的酶及其生产菌	10
1.1 5'-磷酸生成核酸分解酶及其生产菌	13
1.2 3'-磷酸生成核酸分解酶及其生产菌	26
1.3 2'-磷酸生成核糖核酸分解酶及其生产菌	31
1.4 核酸分解酶の利用	32
2. 核苷酸的生物合成途径及其调节机制	42
2.1 嘌呤核苷酸的从头合成途径	43
2.2 嘧啶核苷酸的从头合成途径	49
2.3 核苷酸的补救途径	50
2.4 嘌呤和嘧啶核苷酸生物合成的控制机制	51
3. 核酸类物质的分离与定量	61
3.1 利用离子交换柱层析的分离定量法	61
3.2 利用高压液体层析的分离定量法	6
3.3 酶法分析	67
3.4 利用纸层析的分离定量法	70
3.5 利用纸电泳的分离定量法	72
3.6 利用薄层层析的分离定量法	73
3.7 比色测定法	74
3.8 利用活性炭吸附的分离精制法	75
3.9 其它分离定量法	75
第二篇 分解法生产核酸类物质	84
4. 核糖核酸的生产	84
4.1 在细菌中核糖核酸的生成积累	85

4.2	在酵母中核糖核酸的生成积累	87
4.3	酵母核糖核酸的生产	92
5.	脱氧核糖核酸的生产	98
5.1	脱氧核糖核酸生产菌	99
5.2	脱氧核糖核酸的生产与其机制	102
6.	利用青霉属菌分解核酸	110
6.1	关于核酸酶 P_n 的基础知识	112
6.2	5'-核苷酸的制造	120
6.3	在研究核酸结构方面的应用	121
7.	利用放线菌分解核酸	125
7.1	使用的菌株	125
7.2	金色链霉菌中与分解核糖核酸及其关联物有关的酶	129
7.3	5'-核苷酸的生产	132
8.	利用自溶法分解核糖核酸	143
8.1	影响核糖核酸自溶的各种因素	145
8.2	与核糖核酸自溶有关的酶	147
8.3	利用核糖核酸自溶法生产5'-核苷酸	148
9.	用化学法生产核苷酸	159
9.1	用核糖核酸的化学分解法生产核苷	159
9.2	通过核苷的直接磷酸化反应生产5'-核苷酸	161
第三篇 直接发酵法生产核酸类物质		173
10.	5'-肌苷酸的生产	173
10.1	肌苷	175
10.2	5'-肌苷酸	188
10.3	腺苷与5'-腺苷酸	203
11.	5'-鸟苷酸的生产	216
11.1	由5-氨基-4-氨甲酰咪唑核苷制造5'-鸟苷酸	217

11.2	由鸟苷制造5'-鸟苷酸	228
11.3	直接发酵法生产5'-鸟苷酸	237
11.4	由5'-黄苷酸造制5'-鸟苷酸	239
12.	其它核酸类物质的生产	248
12.1	乳清酸	248
12.2	环腺苷酸	256
12.3	D-核糖	264
12.4	S-腺苷蛋氨酸和S-腺苷乙硫氨酸	270
13.	氧和二氧化碳对核酸类物质发酵生产的影响	276
13.1	氧对核苷发酵的影响	276
13.2	二氧化碳对肌苷发酵的影响	280
14.	核苷的磷酸化	283
14.1	生物化学法	283
14.2	化学法	288
15.	核苷的相互转换	299
15.1	核苷-N-戊糖基的转移反应	299
15.2	核苷酸(核苷)向脱氧核苷酸(脱氧核苷)的 转换	308
第四篇 添加前体法生产核酸类物质		313
16.	核苷、核苷酸的生产	313
16.1	由腺嘌呤经腺苷生产5'-肌苷酸	313
16.2	积累肌苷或5'-肌苷酸的补救途径	316
16.3	非天然型嘌呤核苷和核苷酸的生成	316
16.4	琥珀酰腺嘌呤、琥珀酰腺苷和琥珀酰-5'-腺苷酸 的生成	320
16.5	天然型和非天然型嘧啶核苷酸的生成	321
17.	核苷酸辅酶的生产	325
17.1	三磷酸腺苷(ATP)	325

17.2	辅酶A(CoA)	328
17.3	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)	334
17.4	黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)	339
18.	糖核苷酸的生产	347
18.1	生产方法	349
18.2	生产机制	355
19.	其它核苷衍生物的生产	366
19.1	多核苷酸	366
19.2	核苷多磷酸	372
19.3	胞苷衍生物	375
第五篇	核酸类物质的应用	385
20.	在食品方面的应用	385
20.1	天然食品的呈味成分	385
20.2	鲜味成分	386
20.3	5'-核苷酸钠的呈味性	393
20.4	5'-核苷酸钠的调味效果	397
20.5	在食品方面的应用实例	400
21.	在医药方面的应用	412
21.1	中枢神经系统用药	412
21.2	循环系统用药与泌尿系统用药	413
21.3	代谢药物	420
21.4	抗肿瘤药物	421
21.5	抗病毒药物、干扰素诱导物(IFI)	422
22.	核酸类抗菌素	424
22.1	核酸类抗菌素的种类	424
22.2	核酸类抗菌素的各论	430
	专用词对照	442
	执笔者	451

序论 核酸发酵的历史与展望

利用微生物生产核酸类物质，特别是关于发酵法生产5'-IMP, 5'-GMP和各种核苷衍生物的研究，主要发展于日本，与氨基酸发酵共同形成日本应用微生物领域独树一帜的新型发酵工业部门。尽管历史较短，迄今不满20年，但却发展神速，论文浩瀚。

在序论里，想概述一下应用微生物生产核酸类物质的研究背景；发展经过；5'-IMP和5'-GMP的生产现状；关于核苷衍生物的研究近况等，并加以展望。为避免与后述各章发生重复，删去了综述以外的文献，人名也仅限于该领域的主要研究者，其它请参阅后述各章。

A. 生产核酸类物质的背景

应用微生物生产核酸类物质，是以5'-核苷酸的生产为代表的，坂口¹⁾称之为5'-核苷酸发酵，它是日本发酵工业技术进步的一个重要阶段，其背景如下：

i. 应用微生物工业的发展

在日本，作为传统性的发酵工业有日本酒、豆酱及酱油等的生产。自明治以来，很多研究人员对于与这些物质生产有关的微生物，如霉菌、酵母、乳酸菌等，进行了大量的、出色的研究。

第二次世界大战以后，抗菌素、酵母、类固醇、酶制剂

及氨基酸等工业迅速发展起来。抗菌素发酵研究时所用的菌种筛选技术、诱变育种和通气搅拌技术；酵母生产中的连续培养技术；类固醇生产时非常专一性的转换作用；酶制剂工业中的生产管理；尤其是在氨基酸发酵中关于细胞膜渗透性的研究、生化突变株的选育、发酵转换、解除各种反馈抑制与阻遏的方法等等，为发酵法生产5'-核苷酸奠定了基础。

ii. 核酸及其有关物质的生物化学进展

一八六八年^{*}，米谢尔 (Miesher) 在外科绷带的脓细胞的细胞核中发现核酸，命名为核素 (nuclein)，即今天所指的核蛋白 (核酸与蛋白质的结合物)。第二次世界大战之后，作为了解、阐明生命现象的途径，对 RNA, DNA 的研究，逐渐成了生物化学的中心课题。在核苷酸的生物合成途径；RNA, DNA 合成或分解有关的酶系；代谢调节机制的研究及各种定量法的发展方面，都取得了惊人的成果。这些方面的文献，请参阅京都大学农学系发酵生理学研究室编写的《关于核酸发酵的研究报告》²⁾和中山清编写的《关于核酸发酵的文献集》³⁾。

B. 核酸类物质生产的历史

自古以来，在日本作为增强鲜味的食品有海带、干松鱼、干鱼和香蕈等。一九〇八年，池田指出，海带鲜味的本质是L-谷氨酸，并于数年后使用植物蛋白质水解法进行工业化生产。到一九五七年，利用微生物由糖直接发酵生产谷氨酸的研究成功，发酵法味精正式工业化生产，随之展开了

* 原书误为一八六九年。——译者注

各种其它氨基酸发酵的研究。

→一九一三年，小玉⁴发现干松鱼的鲜味成分是肌苷酸的组氨酸盐，但当时还不知道存在有2',3',5'-IMP三种异构体。后来，国中⁵阐明了2',3'-IMP没有呈味性，仅5'-IMP，5'-GMP和5'-XMP具有呈味性。

已知用存在于蛇毒、牛的小肠粘膜中的蛇毒型磷酸二酯酶，可将核酸中含有的AMP分解成游离状态的5'-AMP，5'-AMP经5'-AMP脱氨酶（存在于动物肌肉中）催化脱氨生成5'-IMP。然而，由于这些材料无法大量采取，因此工业上未加采用。

一九五六年~一九六〇年，曾从干鱼、鱼肉罐头废液或是乌贼肌肉中提取ATP，用抽提法生产5'-IMP，产量很少。

一九五九年，国中、坂口等报道，RNA可以用从桔青霉（*Penicillium citrinum*）中提取的5'-磷酸二酯酶降解成5'-单核苷酸；国中等还发现，不仅5'-IMP具有呈味性，而且5'-GMP也有呈味性。接着，大村、緒方等经研究指出，金色链霉菌（*Streptomyces aureus*）等很多霉菌、放线菌、细菌都能生产将RNA降解成5'-单核苷酸的酶。三輪等人用亚硫酸纸浆废液培养酵母，确立了以RNA为对象的酵母培养法，并自一九六一年起，以酵母RNA为原料，利用桔青霉和金色链霉菌生产的5'-磷酸二酯酶，酶解RNA，进行5'-IMP，5'-GMP的工业化生产。

从酵母提取RNA，再以酶解法生产5'-IMP，5'-GMP的方法是二步发酵，需要经过二步手续才能制成5'-IMP或5'-GMP。为此，很多科技人员转移注意力于研究5'-IMP，

5'-GMP的一步发酵法，即不经酵母菌制造阶段，而由原料通过从头 (de novo) 合成直接发酵生产5'-IMP 5'-GMP的方法。

首先，岡林等、有馬等、古屋等、中山等以碱基缺陷型指示菌的增殖为对象或以是否具有紫外吸收特性为指标，从自然界中筛选碱基、嘌呤核苷、嘌呤核苷酸生产菌，没有找到大量积累核酸类物质的菌株。

关于微生物因自溶而向细胞外分泌渗出核苷酸的现象，樋口、植村对酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)，中尾、緒方对多数酵母菌作了研究。就细菌而言，緒方、今田等人在对巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 的研究中，观测到5'-核苷酸的渗漏现象。经过这些过渡性研究，人们认识到，野生型菌株积累核酸类物质的能力一般来说都是很低的，于是转向利用生物化学性突变株生产核酸类物质的研究。

一九六一年，内田、国中、吉野等发表了利用枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 腺嘌呤缺陷型菌株，发酵积累肌苷、次黄嘌呤的报告。一九六二年，城、高橋等发现，枯草杆菌的嘌呤缺陷型能积累较多的AICAR(S)；之后，山崎等报道了由AICAR(S)化学合成5'-GMP的方法，作为一种工业生产5'-GMP的方法。这是避开终产物的代谢控制，先用发酵法生产中间体，再经有机化学合成法得到目的物，发酵与有机合成联合作业的典型例子。

同年原、小嶋、小嶋等在发酵培养枯草杆菌嘌呤缺陷型时，发现如果在培养基中添加化学合成的腺嘌呤，可通过补救 (Salvage) 合成，生成腺苷，腺苷能用酵母腺苷激酶磷

酸化为5'-AMP，再经脱氨，即可制得5'-IMP。但该方法并未投产。

一九六三年，有馬、田村等研究指出，利用各种细菌的嘌呤碱基缺陷型菌株，能够在发酵液中积累嘌呤系物质。

同年，奈良、木下等、青木、百濑等先后发表了利用枯草杆菌的腺嘌呤缺陷型突变株发酵积累肌苷的研究报告，肌苷产量达7克/升，从而确立了肌苷发酵。随之，展开了关于肌苷磷酸化的研究，由片桐、山田、光木等成功地研究了利用磷酸转移酶进行选择性的磷酸化的方法。

一九六四年以后，陆续发表了很多利用营养缺陷型突变株积累嘌呤系物质的论文。使用菌株有产氨短杆菌 (*Brevibacterium ammoniagenes*)、枯草杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、某种芽孢杆菌 (*Bacillus* sp)、谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、嗜石油棒状杆菌 (*Corynebacterium petrophilum*)、石蜡节杆菌 (*Arthrobacter paraffineus*)、产气气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*)、晓多链霉菌 (*Streptomyces showdoensis*) 以及热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 等⁶⁾。详见后述各章。

一九六八年，古屋、木下等利用产氨短杆菌的腺嘌呤缺陷突变株，研究5'-IMP发酵时，发现5'-IMP的积累受 Mn^{2+} 浓度的调节， Mn^{2+} 对于产氨短杆菌5'-IMP的膜透性起着关键性的作用，限制 Mn^{2+} 的浓度，可以促使细胞膜通透性的改变，以磷酸酯的状态透过细胞膜，于细胞外积累。

利用微生物发酵法积累鸟嘌呤系物质非常困难。一九六六年，德梅因 (Demain) 等曾观测到，谷氨酸棒状杆菌的