

枯草芽孢杆菌 JMUKC2 产肌苷摇瓶发酵培养基的优化

杨尚彤¹, 肖安风^{1,2,3}, 倪辉^{1,2,3}, 杨远帆^{1,2,3}, 杨哲¹, 蔡慧农^{1,2,3,*}

(1.集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2.集美大学食品微生物与酶工程研究中心, 福建 厦门 361021;
3.厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021)

摘要: 利用单因素试验和正交试验对肌苷生产菌枯草芽孢杆菌 JMUKC2 的摇瓶发酵培养基进行优化, 优化后的最佳发酵培养基配方为葡萄糖 140g/L、玉米浆 20g/L、酵母膏 17g/L、尿素 7g/L、硫酸铵 20g/L、MgSO₄·7H₂O 1g/L、KH₂PO₄ 7g/L、CaCO₃ 20g/L。培养基经优化后, 生物量比优化前提高了 40.67%, 肌苷产量比优化前提高了 46.57%。

关键词: 肌苷; 枯草芽孢杆菌; 摇瓶发酵; 培养基优化

Culture Medium Optimization for Inosine Production by *Bacillus subtilis* JMUKC2 in Shake Flasks

YANG Shang-tong¹, XIAO An-feng^{1,2,3}, NI Hui^{1,2,3}, YANG Yuan-fan^{1,2,3}, YANG Zhe¹, CAI Hui-nong^{1,2,3,*}

(1. College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;
2. Research Center of Food Microbiology and Enzyme Engineering Technology, Jimei University, Xiamen 361021, China;
3. Food Bioengineering Research Center of Xiamen, Xiamen 361021, China)

Abstract: This paper describes the optimization of the fermentation medium for inosine-overproducing *Bacillus subtilis* JMUKC2 in shake flask using one-factor-at-a-time and orthogonal array design methods. The optimal fermentation medium was composed of 140 g/L glucose, 20 g/L corn liquor, 17 g/L yeast, 7 g/L urea, 20 g/L ammonium sulfate, 1 g/L MgSO₄·7H₂O, 7 g/L KH₂PO₄ and 20 g/L CaCO₃. The resulting biomass and inosine production were increased by 40.67% and 46.57% compared with those before the optimization, respectively.

Key words: inosine; *Bacillus subtilis*; shake flask fermentation; culture medium optimization

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0167-05

肌苷(inosine)又称次黄嘌呤核苷, 其分子式为 C₁₀H₁₂N₄O₅, 相对分子质量为 268.23^[1]。肌苷在食品和医药等领域有着非常重要的用途: 它是食品中较好的呈味物, 其含量常常作为衡量食品“新鲜度”的特征指标之一; 它是食品工业中 5'-肌苷酸的原料, 同时也是各种调味食品(例如味精、酱油等)的营养助鲜剂^[2]。在医药上它能预防及解除由血防药物引起的对心脏或肝脏的副作用^[3-5], 是治疗冠心病、肝炎、白血球减少症等的良效药物; 同时也是抗生素生产的重要原料^[6]。但是, 近年来随着韩国、日本等生产厂家对中国市场的

冲击, 国内的核苷发酵产业面临着严峻的挑战, 为此提高发酵得率、降低生产成本, 提高生产能力已经成为当务之急^[7]。

目前, 提高肌苷产量的方法主要包括诱变育种^[8-9]、基因工程改造菌种^[10]、发酵条件优化^[11]等。吴江等^[9]通过 NTG 诱变的方法得到的 *B. subtilis* IFO14189 可以积累肌苷 15g/L, 然而这样可能会引起一些不必要的负突变而且耗时、低效; 基因工程技术是一种新兴的技术手段, Shimaoka 等^[10,12]报道了关键基因中断技术在大肠杆菌中的应用, 其中关键基因 *edd* (6-磷酸葡萄糖脱氢酶

收稿日期: 2012-02-24

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2011J01225); 集美大学中青年创新团队专项(2010A006);
集美大学科研基金项目(2010N5009)

作者简介: 杨尚彤(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。E-mail: yangshangtong@yahoo.com.cn

* 通信作者: 蔡慧农(1957—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为食品发酵工程。E-mail: huinongcai@163.com

的关键基因)和 *pgi* (6-磷酸葡萄糖异构酶的关键基因)的中断有利于肌苷的积累,但基因工程技术不易操作且成本较高;而发酵条件的优化是较为简单且成本较低的实验手段^[11]。肌苷发酵是典型的代谢控制发酵,优良生产菌种的选育固然是肌苷发酵的关键,但发酵条件的控制对肌苷发酵也有很大的影响^[13-14]。樊国燕^[15]采用四因素三水平正交试验对枯草芽孢杆菌发酵生产肌苷的培养基进行了优化,考察了葡萄糖、酵母粉、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 对产苷的影响,优化后的肌苷产量比优化前的肌苷产量提高了20.14%;吕东坡等^[6]采用七因素三水平正交试验对枯草芽孢杆菌发酵培养基进行了优化,并确定了其发酵培养基的最佳配方;徐咏全等^[16]利用模式识别法对枯草芽孢杆菌发酵生产肌苷的培养基进行了优化,以培养基组成为特征变量构筑模式空间,以肌苷产量为评价目标,通过主成分分析法线性映射,在优类区域寻点逆推回高维空间,得到最优的培养基配方,将肌苷产量提高了26.8%;常景玲等^[17]对选育出的优良菌种的发酵培养基通过正交试验设计的方法进行了优化,优化后的肌苷产量比优化前提高了1.5%。

在本实验室的前期研究中,由集美大学生物工程学院发酵工程研究室提供的枯草芽孢杆菌(CICC 20958)经紫外诱变筛选获得了一株高产肌苷的生产菌株枯草芽孢杆菌 JMUKC2,并在-70℃条件下于体积分数20%的甘油中保存。本实验从培养基的基本成分入手,利用单因素试验并结合正交试验对枯草芽孢杆菌 JMUKC2的发酵培养基成分进行了较为系统地优化,确定了其最佳发酵培养基配方,提高了肌苷产量,并为后续罐上工艺的开发提供基础支持。

1 材料与方法

1.1 菌种

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) JMUKC2由集美大学生物工程学院发酵工程研究室提供的枯草芽孢杆菌(CICC 20958)经紫外诱变筛选获得,并在-70℃条件下于20%的甘油中保存。

1.2 培养基

斜面培养基(g/L):牛肉膏3、蛋白胨10、NaCl 5、琼脂20, pH 7.2;种子培养基(g/L):葡萄糖20、蛋白胨10、酵母粉15、玉米浆12、NaCl 2.5、尿素2, pH 7.2;初始发酵培养基(g/L):葡萄糖140、酵母膏15、玉米浆16、尿素13、硫酸铵22、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2、 K_2HPO_4 5、 CaCO_3 20, pH 7.0。

1.3 试剂与仪器

硫酸铵、磷酸二氢钾、硫酸镁、碳酸钙、蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉等(均为分析纯) 国药集团化学试

剂北京有限公司;酵母膏 英国Dxoid公司;玉米浆(含47.5%干物质) 厦门汇盛生物有限公司;肌苷标准 美国Sigma公司;甲醇(色谱纯) 美国天地公司。

Waters 2695 高效液相色谱仪 美国Waters公司; ZHWY-2102 双层全温度恒温摇床 上海智诚实验设备有限公司;BS223S 电子天平 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;SW-CJ-2FD 超净工作台 苏州净化设备有限公司;Minispin 高速离心机 德国Eppendorf公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化

将保存的菌种接种于斜面培养基上,37℃恒温培养18h。

1.3.2 液体种子培养

从活化18h的斜面培养基上取一环菌种转接到装有25mL种子培养基的250mL三角瓶中,220r/min、34℃培养18h。

1.3.3 液体发酵培养

取培养18h的新鲜种子液,以5%接种量接入装有25mL培养基的250mL三角瓶中,220r/min、34℃培养72h。

1.3.4 指标测定

1.3.4.1 生物量测定^[18]

取0.2mL的发酵液用蒸馏水稀释30倍,以蒸馏水作空白,用分光光度计在660nm波长处测定其光密度值,用此光密度值表示生物量。

1.3.4.2 肌苷产量测定^[19]

采用HPLC法,色谱柱Symmetry型C₁₈反相柱(4.6mm×150mm, 3.5μm),色谱条件:流动相为A:超纯水(含0.5%磷酸);B:甲醇。梯度程序为:0~3min, 100% A;3~9min, 92% A, 8% B;9~11min, 100% B;11~12.42min, 100% A。波长:248nm;流速:0.60mL/min;进样量:20μL;柱温:30℃。

1.3.5 数据处理

所有数据采用统计学软件SPSS 17.0进行差异显著性分析(显著水平 $\alpha = 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 碳源对枯草芽孢杆菌 JMUKC2 发酵产肌苷的影响

2.1.1 碳源种类的影响

枯草芽孢杆菌为化能异养菌,碳源对其生长代谢会有非常重要的作用。碳源是组成培养基的主要成分之一,其主要作用构成菌体和合成肌苷的碳架及能量来源^[20]。一般的微生物可以在含各种碳水化合物的培养基上良好生

长,但它们产物的生产能力和碳源的种类有很大关系。保持摇瓶发酵初始培养基的其他成分不变,固定各碳源含碳量为50.91g/L(以葡萄糖计),分别以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、甘油为碳源,进行发酵培养,比较不同碳源对枯草芽孢杆菌 JMUKC2 发酵产肌苷的影响,结果见图1。

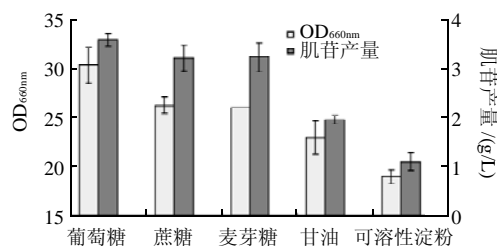


图1 不同碳源种类对枯草芽孢杆菌 JMUKC2 发酵产肌苷的影响
Fig.1 Effect of carbon source on inosine production during fermentation

由图1可知,当以葡萄糖作碳源时,菌体的生物量及肌苷产量均达到最大,其中肌苷产量比蔗糖作碳源时的肌苷产量高出11.84%,比麦芽糖高出11.14%,比可溶性淀粉高出229.36%,比甘油高出84.10%,故确定其最佳碳源种类为葡萄糖。由于适宜的葡萄糖为菌体的生长既可以提供碳源,又可以提供能量,故菌体生长旺盛,为肌苷生产菌的产苷奠定良好的基础;同时又可以保证充足的能量供产苷期利用,以尽量发挥菌种的产苷潜力,能够较好的满足菌体生长和产苷的需要,因此,以葡萄糖为碳源。

2.1.2 不同葡萄糖质量浓度的影响

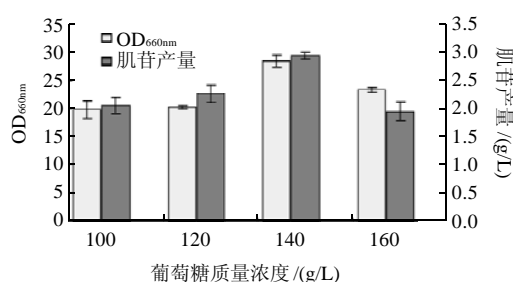


图2 不同葡萄糖质量浓度对枯草芽孢杆菌 JMUKC2 发酵产肌苷的影响
Fig.2 Effect of glucose concentration on inosine production during fermentation

由图2可知,随着葡萄糖质量浓度的增加,肌苷产量和生物量均呈现先上升后下降的趋势,其中当葡萄糖质量浓度为140g/L时,生物量和肌苷产量均达到最大,其中肌苷产量达到2.94g/L。当葡萄糖质量浓度大于140g/L时,肌苷产量和生物量又呈现下降的趋势,故培养基中添加适宜质量浓度的葡萄糖有利于肌苷的发

酵,葡萄糖质量浓度过高,可能会使枯草芽孢杆菌代谢产生较多的酸类^[21-22];同时导致菌体细胞渗透压增大,对菌体生长和发酵均有不利影响,不利于肌苷的积累。因此,选择初始葡萄糖质量浓度140g/L进行下一步研究。

2.2 不同氮源质量浓度对枯草芽孢杆菌 JMUKC2 发酵产肌苷的影响

氮源不仅是构成枯草芽孢杆菌蛋白质、核酸等含氮物质合成的来源,而且也是肌苷碱基部分合成的来源^[20]。由于该发酵培养基中氮源成分较为复杂,根据枯草芽孢杆菌 JMUKC2 发酵特性的研究,确定所要考察的4种组分为:酵母膏、玉米浆、尿素、硫酸铵,对此选择四因素三水平正交设计试验进行优化,所得肌苷产量与极差分析结果见表1。

表1 发酵培养基中氮源优化的正交试验结果
Table 1 Orthogonal array design and results for the optimization of combined nitrogen sources

试验号	因素				肌苷产量/(g/L)
	A 酵母膏 质量浓度/(g/L)	B 玉米浆质量 浓度/(g/L)	C 尿素质量 浓度/(g/L)	D 硫酸铵 质量浓度/(g/L)	
1	1(9)	1(8)	1(7)	1(16)	2.76 ± 0.32
2	1	2(14)	2(11)	2(20)	3.01 ± 0.29
3	1	3(20)	3(15)	3(24)	2.66 ± 0.25
4	2(13)	1	2	3	2.67 ± 0.17
5	2	2	3	1	2.78 ± 0.65
6	2	3	1	2	4.01 ± 0.60
7	3(17)	1	3	2	3.23 ± 0.25
8	3	2	1	3	3.83 ± 0.25
9	3	3	2	1	3.49 ± 0.24
k ₁	2.175	2.946	3.534	3.007	
k ₂	3.152	2.872	2.712	3.142	
k ₃	3.575	3.384	2.947	3.053	
R	1.100	0.512	0.813	0.135	

由表1极差分析可知,酵母膏对肌苷生产菌 JMUKC2 生产肌苷的影响最为显著,其次依次为尿素、玉米浆、硫酸铵。由均值分析可知,培养基氮源最优组合为: A₃B₃C₁D₂。按照确定的培养基氮源最优组合 A₃B₃C₁D₂ 以及9组正交试验中肌苷产量最大组即第6试验组 A₂B₃C₁D₂ 进行重复验证,结果显示 A₃B₃C₁D₂ 产肌苷为4.27g/L 大于 A₂B₃C₁D₂ 组合下的肌苷产量(4.01g/L),故可确定枯草芽孢杆菌发酵产肌苷的最优氮源组合为 A₃B₃C₁D₂,即酵母膏17g/L、玉米浆20g/L、尿素7g/L、硫酸铵20g/L。

2.3 磷酸盐对枯草芽孢杆菌 JMUKC2 发酵产肌苷的影响

2.3.1 磷酸盐种类的影响

无机盐是微生物生命活动中所不可缺少的物质:可

以构成菌体成分;作为酶的激活剂或抑制剂;调节培养基的渗透压以及调节 pH 值和氧化还原电位等^[23]。本实验按初始培养基配比,恒定 CaCO_3 加入量 20g/L,考察磷酸盐和镁离子对枯草芽孢杆菌 JMLIKC2 发酵产肌苷的影响。保持培养基的其他成分不变,固定各磷酸盐含磷量 0.89g/L(以 KH_2PO_4 计),分别以 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ 为磷酸盐,进行发酵培养,比较不同磷酸盐对枯草芽孢杆菌 JMLIKC2 发酵产肌苷的影响,结果见图 3。

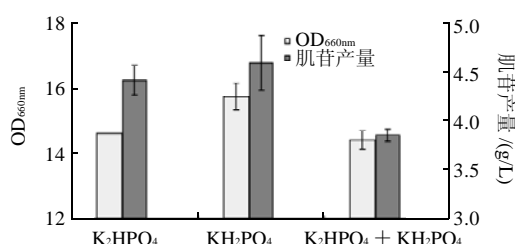


图 3 不同磷酸盐种类对枯草芽孢杆菌 JMLIKC2 发酵产肌苷的影响
Fig.3 Effect of phosphate type on inosine production during fermentation

由图 3 可知,培养基中单独添加 KH_2PO_4 时肌苷产量和生物量均达到最大,其中生物量比 K_2HPO_4 所得生物量高出 7.74%,比等量的 K_2HPO_4 和 $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ 所得生物量高出 9.24%;单独添加 KH_2PO_4 时肌苷产量为 4.59g/L,比 KH_2PO_4 所得肌苷产量高出 4.08%,比添加等量的 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 所得肌苷产量高出 19.22%。 KH_2PO_4 在菌体生长、繁殖和代谢活动中起着非常重要的作用:一方面, KH_2PO_4 提供的磷是构成核酸磷脂、许多辅酶或辅基(辅酶 I、辅酶 II、辅酶 A、NAD 和 NADP 等)以及高能磷酸化合物的重要原料^[24];另一方面, KH_2PO_4 在代谢调节方面也起着重要的作用,能促进糖代谢的进行,有利于微生物的生长^[25]。因此,磷酸盐是枯草芽孢杆菌发酵培养基中另一个重要的组成成分,它的浓度大小直接影响着枯草芽孢杆菌菌体的生长和芽孢的形成。

2.3.2 不同质量浓度 KH_2PO_4 的影响

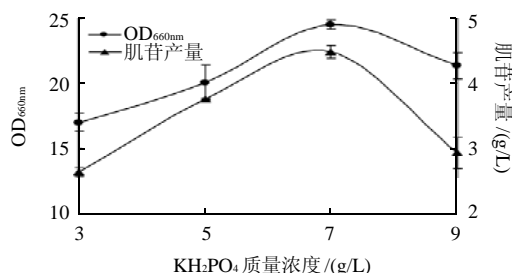


图 4 不同质量浓度 KH_2PO_4 对枯草芽孢杆菌 JMLIKC2 发酵产肌苷的影响

Fig.4 Effect of KH_2PO_4 concentration on inosine production during fermentation

由图 4 可知,随着 KH_2PO_4 质量浓度的增大,枯草芽孢杆菌 JMLIKC2 发酵 72h 后的生物量和所得肌苷产量均呈现先上升后下降的趋势,其中当培养基中 KH_2PO_4 的质量浓度为 7g/L 时生物量和肌苷产量均达到最大: $\text{OD}_{660\text{nm}}$ 值为 24.53,比优化前提高了 10.12%;肌苷产量为 4.48g/L,比优化前提高了 10.12%。 KH_2PO_4 的添加能解除 ATP 对 1,6-二磷酸果糖激酶的抑制,而磷酸果糖激酶是糖酵解途径中的关键酶^[25],因而 KH_2PO_4 的添加可以改变枯草芽孢杆菌肌苷合成途径中的代谢流分布,进而增大了肌苷合成的代谢通量,实现肌苷产量的增加。因此,选择 7g/L 的 KH_2PO_4 进行下一步研究。

2.4 不同质量浓度的镁离子对枯草芽孢杆菌 JMLIKC2 发酵产肌苷的影响

基于上述培养基成分优化结果(葡萄糖 140g/L、玉米浆 20g/L、酵母膏 17g/L、尿素 7g/L、硫酸铵 20g/L、 KH_2PO_4 7g/L),分别考察 0、1、2、3、4g/L 的硫酸镁对枯草芽孢杆菌 JMLIKC2 发酵产肌苷的影响,结果见图 5。

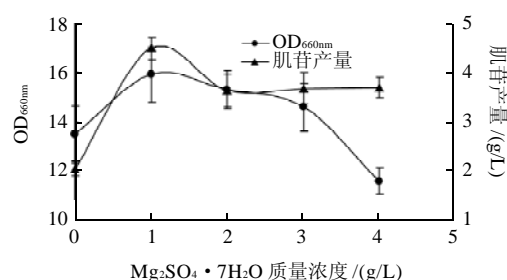


图 5 不同质量浓度的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对枯草芽孢杆菌 JMLIKC2 发酵产肌苷的影响

Fig.5 Effect of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration on inosine production during fermentation

由图 5 可知,随着 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度的增大,枯草芽孢杆菌 JMLIKC2 发酵 72h 后的生物量和所得肌苷产量大体上均呈现先上升后下降的趋势,其中当培养基中 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的添加质量浓度在 1g/L 时生物量和肌苷产量均达到最大, $\text{OD}_{660\text{nm}}$ 值比优化前提高了 4.12%;肌苷产量达到了 4.50g/L,比优化前提高了 23.97%。由于 Mg^{2+} 能与 ATP 结合形成 ATP 复合物,此复合物对己糖激酶(HK)有很强的激活作用,加快了 6-磷酸葡萄糖的合成速率^[26],从而加快了肌苷合成的速率;但过多 Mg^{2+} 的添加容易和微生物的蛋白质结合而发生变性或沉淀^[27],对枯草芽孢杆菌的生长和发酵均有不利影响。因此,添加适量的 Mg^{2+} 有利于肌苷的积累。

2.5 发酵培养基优化前后肌苷产量对比

通过以上实验,初步优化得到了枯草芽孢杆菌 JMUKC2 产肌苷的发酵培养基为葡萄糖 140g/L、玉米浆 20g/L、酵母膏 17g/L、尿素 7g/L、硫酸铵 20g/L、 KH_2PO_4 7g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/L。在此条件下,与最初的发酵培养基发酵结果进行对比,结果见图 6。

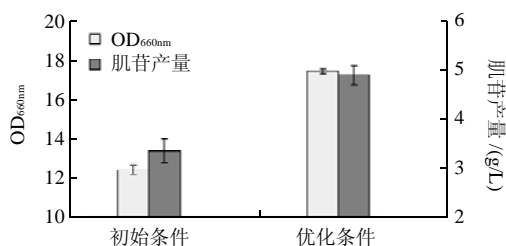


图 6 培养基优化前后肌苷产量的对比

Fig.6 Comparisons of inosine production biomass before and after the optimization

由图 6 可知,枯草芽孢杆菌 JMUKC2 在优化后的发酵培养基中培养 72h 后, $\text{OD}_{660\text{nm}}$ 值为 17.17,肌苷产量可达 4.91g/L,比初始培养基分别提高了 40.67% 和 46.57%。

3 结 论

本实验利用单因素试验和正交试验相结合的方法,采用较少的实验找出各因素之间的相互关系,对肌苷产生菌枯草芽孢杆菌 JMUKC2 发酵培养基进行了优化,优化后的发酵培养基最佳配方为:葡萄糖 140g/L、酵母膏 17g/L、玉米浆 20g/L、尿素 7g/L、硫酸铵 20g/L、 KH_2PO_4 7g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/L、 CaCO_3 20g/L。优化后的生物量和肌苷产量均比优化前有较大的提高:比初始培养基分别提高了 40.67% 和 46.57%。

参考文献:

- [1] 徐咏全. 肌苷产生菌的选育及其发酵条件研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2004.
- [2] 尚四华. 肌苷和肌苷酸测定的新方法研究[J]. 理化检验: 化学分册, 2001, 37(10): 463-464.
- [3] ABBOUNI B, ELHARIRY H, GEORG A. Overproduction of NAD^+ and 5'-inosine monophosphate in the presence of $10\mu\text{M Mn}^{2+}$ by a mutant of *Corynebacterium ammoniagenes* with thermosensitive nucleotide reduction (*nrd^{ts}*) after temperature shift[J]. Arch Microbiol, 2004, 182(4): 119-125.

- [4] LI Haojian, ZHANG Guoqiang, DENG Aihua, et al. De novo engineering and metabolic flux analysis of inosine biosynthesis in *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnol Lett, 2011, 33(2): 1575-1580.
- [5] 氨基酸·核酸集谈会. 核酸发酵[M]. 张克旭, 杜连祥, 译. 北京: 中国轻工业出版社, 1987: 175-188.
- [6] 吕东坡, 吕广磊, 刘芳芳, 等. 肌苷发酵条件优化的研究[J]. 中国食品添加剂, 2008, 6(2): 161-166.
- [7] 陈双喜. 肌苷多尺度发酵过程[D]. 上海: 华东理工大学, 2005.
- [8] 贾红华, 周华, 韦萍. 微波诱变育种研究及应用进展[J]. 工业微生物, 2003, 33(2): 46-50.
- [9] 吴江, 黄为一, 陈晓路. 肌苷产生菌 HW-9 的选育[J]. 南京农业大学学报, 2004, 17(2): 66-69.
- [10] SHIMAOKA M, KAWASAKI H, TAKENAKA Y, et al. Effects of *edd* and *pgi* disruptions on inosine accumulation in *Escherichia coli*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2005, 69(7): 1248-1255.
- [11] 施庆珊, 李良秋, 林小平, 等. 产氨短杆菌 GMA-2802 1.2L 罐肌苷发酵试验[J]. 生物学杂志, 2002, 18(2): 13-14.
- [12] SHIMAOKA M, TAKENAKA Y, MIHARA Y, et al. Effects of *xapA* and *guaA* disruption on inosine accumulation in *Escherichia coli*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2006, 70(12): 3069-3072.
- [13] HUI Ming, SUN Junliang, ZHANG Xingyuan. Study on fermentation process conditions of excess synthetic riboflavin by *Eremothecium ashbyii* T30[J]. Feed Res, 2000, 3(1): 13-16.
- [14] 郝林华, 孙丕喜, 姜振波, 等. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)液体发酵条件[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2006, 24(4): 380-385.
- [15] 樊国燕. 肌苷发酵条件及含量分析研究[J]. 郑州牧专学报, 1998, 18(2): 5-9.
- [16] 徐咏全, 张蓓, 赵蕊, 等. 肌苷发酵培养基的模式识别法优化[J]. 中国食品学报, 2003, 18(3): 105-108.
- [17] 常景玲, 任敏. 肌苷菌种的筛选和发酵条件的优化[J]. 中国酿造, 2002, 21(12): 29-32.
- [18] 柏建新, 邓崇亮, 钱养钊, 等. 肌苷产生菌缺失核糖苷水解酶活性突变株选育及其发酵生产试验[J]. 工业微生物, 2007, 27(3): 11-15.
- [19] 吴波, 张寒俊. 高效液相色谱分析啤酒中的肌苷、肌苷酸[J]. 中国酿造, 2007, 26(2): 56-58.
- [20] 张丽霞. 枯草芽孢杆菌 B908 发酵工艺优化研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2006.
- [21] 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998.
- [22] 张云波, 孙溢. 黄褐杆菌 YS-9412-130 产酸发酵条件的优化[J]. 海洋水产研究, 2010, 21(4): 26-35.
- [23] BALTER M. Protein matchmaker may lead new gene therapy to the alter[J]. Science, 1996, 273: 183.
- [24] 庞勇, 李斌, 吕颂辉. 不同磷源对海洋卡盾藻生长和碱性磷酸酶活性的影响[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(17): 9146-9148.
- [25] 赵春光, 谢希贤, 徐庆阳, 等. 磷酸盐对 *Escherichia coli* TRJH L- 色氨酸发酵代谢流分布的影响[J]. 天津科技大学学报, 2009, 24(5): 10-14.
- [26] 欧阳平凯, 应汉杰. 金属离子对 1,6- 二磷酸果糖合成代谢流量的影响[J]. 高校化学工程学报, 2008, 14(5): 443-446.
- [27] 刘国生, 李学梅, 李用芳, 等. 六种金属离子对 *Bacillus subtilis* 肌苷产率的影响[J]. 中国医药工业杂志, 2009, 34(8): 385-388.