

硝酸盐促进环磷酸腺苷发酵合成的生理机制研究

李志刚^{1,2}, 顾阳², 陈宝峰², 王宝石², 张中华², 常景玲^{1,2,*}

(1. 现代生物育种河南省协同创新中心, 河南新乡 453003;

2. 河南科技学院生命科技学院, 河南新乡 453003)

摘要:目的: 阐明硝酸盐促进环磷酸腺苷发酵合成的生理机制。方法: 首先通过摇瓶实验确定硝酸钠最适添加条件, 并在发酵罐上进行添加硝酸钠的 cAMP 发酵实验, 然后对发酵过程动力学数据、硝酸盐代谢、还原力水平、关键酶活性、氨基酸水平和能量代谢进行分析。结果: 确定在发酵 24 h 添加 3 g/L-broth 硝酸钠为最适条件, cAMP 发酵产量和得率分别达到 5.02 g/L 和 0.097 g/g, 比对照批次分别提高了 22.7% 和 29.8%, 发酵性能得到明显提升。硝酸盐利用过程消耗了大量 NADPH, 缓解了对 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的抑制作用, 同时糖酵解途径受到抑制而磷酸戊糖途径和三羧酸循环中关键酶活性明显提高, 更多碳流分配到产物合成途径。此外, 胞内前体氨基酸水平、NADH/NAD⁺ 和 ATP/AMP 均得到明显提高, 为 cAMP 发酵合成提供了物质和能量基础。结论: 硝酸盐利用过程消耗了大量的还原力, 改变了代谢流分配情况, 提高了胞内氨基酸水平和 ATP 合成, 进而促进 cAMP 的发酵合成。硝酸盐作用机制的阐明, 为提高核苷酸类发酵产品的生产水平提供了参考。

关键词: 硝酸钠, NADPH, 氨基酸, 能量代谢, 环磷酸腺苷

Physiological Mechanism for Enhanced Cyclic Adenosine Monophosphate Biosynthesis by Sodium Nitrate in *Arthrobacter* sp. CCTCC M2013431

LI Zhi-gang^{1,2}, GU Yang², CHEN Bao-feng², WANG Bao-shi², ZHANG Zhong-hua², CHANG Jing-ling^{1,2,*}

(1. Collaborative Innovation Center of Modern Biological Breeding of Henan Province, Xinxiang 453003, China;

2. School of Life Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Objectives: The aim of this study is to elucidate the physiological mechanism for enhanced cyclic adenosine monophosphate biosynthesis by nitrate in *Arthrobacter* sp. CCTCC M2013431. Methods: Firstly, optimal sodium nitrate adding condition was determined by fermentations conducted in shaking flask and cAMP fermentation with optimal condition was carried out in a 7 L fermentation tank. Then, fermentation kinetic parameters, nitrate utilization, reducing force level, key enzymes activities, intracellular amino acids levels and energy metabolism were analyzed. Results: Due to the addition of 3 g/L-broth sodium nitrate into fermentation broth at 24 h, cAMP concentration and yield on glucose achieved 5.02 g/L and 0.097 g/g, with the improvements of 22.7% and 29.8%, respectively, when compared with those of control. Activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase were improved greatly by lower NADPH levels caused by plentiful consumption during nitrate reduction process, meanwhile, the metabolic intensity of glycolysis pathway was weakened while activities of key enzymes in pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle were significantly increased. More carbon flux was directed into pentose phosphate pathway and purine synthesis pathway for cAMP production. In addition, intracellular precursor amino acids levels, NADH/NAD⁺ and ATP/AMP ratios were also enhanced greatly by nitrate which supply sufficient energy for cAMP synthesis. Conclusion: Nitrate utilization consumed redundant reducing force which changed the distribution of metabolic flux among different pathways, and improved intracellular amino acids levels and ATP synthesis, then cAMP fermentation synthesis was promoted greatly. The physiological mechanism of nitrate for enhanced cAMP biosynthesis provided reference materials for nucleotide fermentation production.

Key words: sodium nitrate; NADPH; amino acids; energy metabolism; cAMP

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)01-0115-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020030025

收稿日期: 2020-03-03

作者简介: 李志刚(1984-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 发酵过程优化与控制, E-mail: lizhigang25@126.com。

* 通信作者: 常景玲(1963-), 女, 本科, 教授, 研究方向: 发酵制药, E-mail: changjl001@126.com。

基金项目: 河南省科技攻关项目(社会发展)(162102310419, 182102310823); 河南科技学院高层次人才科研启动项目(2015006)。

引文格式:李志刚,顾阳,陈宝峰,等.硝酸盐促进环磷酸腺苷发酵合成的生理机制研究[J].食品工业科技,2021,42(1):115-120,131.

LI Zhi-gang, GU Yang, CHEN Bao-feng, et al. Physiological Mechanism for Enhanced Cyclic Adenosine Monophosphate Biosynthesis by Sodium Nitrate in *Arthrobacter* sp. CCTCC M2013431 [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(1): 115-120, 131. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)是生物体内广泛存在的一种生理活性物质,对细胞的各种代谢活动以及核酸和蛋白质等物质的合成具有重要的调节作用^[1]。该物质在体内可以促进心肌细胞存活,增强心肌细胞抗损伤、抗缺血和抗缺氧能力,临床上主要用于心功能不全、心绞痛和心肌梗死等疾病的治疗,另外,其作为饲料添加剂广泛应用于畜禽产品的生产中,具有十分重要的应用价值^[2-3]。

微生物合成cAMP代谢过程涉及糖酵解途径、磷酸戊糖途径、嘌呤核苷酸合成途径、腺苷酸合成途径和三羧酸循环,代谢流分配情况是影响cAMP合成的重要因素^[4]。Chen等^[5]利用不同的抑制剂调节糖酵解途径代谢强度,结果表明氟化钠显著提高了cAMP的产量和得率。Niu等^[6]利用¹³C示踪实验对添加氟化钠条件下的碳流分配情况进行研究,结果表明糖酵解途径代谢强度明显下降,同时磷酸戊糖途径的代谢强度显著上升。此外,Niu等^[7]利用比较转录组和蛋白质组学分析方法对高溶氧条件下cAMP产量显著提高的原因进行研究,发现糖酵解途径中酶的转录水平明显下降,而三羧酸循环和嘌呤核苷酸合成途径中酶的转录水平和表达量明显上升。因此,合理调节碳流在糖酵解和磷酸戊糖途径间的分配,能够有效促进cAMP的积累。

6-磷酸葡萄糖脱氢酶是改变碳流分配的关键酶,活性受NADPH的反馈抑制,消除过量的NADPH有利于碳流更多的分配到磷酸戊糖途径^[8]。硝酸盐是一种氧化性强的氮源,在硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶顺序催化作用下转化为铵态氮,同时该还原反应需要NADPH作为辅酶才能进行^[9-10]。微生物利用硝酸盐的过程会消耗大量NADPH,还原性辅酶NADPH水平下降会提高6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活性,还会影响其他代谢途径中酶的活性,进而改变代谢流分配情况^[11-13]。

本文针对cAMP从头合成途径的代谢特点,通过适量添加硝酸钠的方式促进产物合成,并从cAMP发酵动力学、还原性辅酶水平、关键酶活性、胞内氨基酸水平以及能量代谢水平等方面进行研究,阐明硝酸盐促进cAMP发酵合成的生理机制,为硝酸盐在核苷酸类产品发酵生产中应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

节杆菌(*Arthrobacter* sp.) A.sp01 本实验室筛选并保藏于中国典型培养物保存中心(保藏号为CCTCC No. M2013431); cAMP、ATP、AMP、NADH、NAD⁺分析纯,阿拉丁生化科技股份有限公司;苯酚、次氯酸钠、水杨酸、对氨基苯磺酸、 α -萘胺 分析纯,

国药集团化学试剂有限公司;6-磷酸葡萄糖脱氢酶试剂盒、NADPH与NADP⁺浓度测定试剂盒 北京索莱宝科技有限公司;AccQ-Tag氨基酸分析试剂包、氨基酸柱 沃特世科技(上海)有限公司(Waters);其他试剂 均为市售国产或进口分析级纯。

LDZX-50KBS 高压灭菌锅 上海申安医疗器械厂;SW-CJ-2FD 双人垂直净化工作台 苏净集团安泰公司制造;ZWF-2112 摇床 上海智城分析仪器制造有限公司;UV-2800 紫外分光光度计 上海舜宇恒平科学仪器有限公司;BIOTECH-7BG 机械搅拌式发酵罐 上海保兴生物设备有限公司;Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪 美国安捷伦科技有限公司;VC150 超声波破碎仪 美国 Sonics & Materials 公司;pH和DO电极 瑞士 METTLER TOLEDO 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基配制 斜面培养基、种子培养基和发酵培养基的组成及配制参见文献[14]。

1.2.2 培养方法

1.2.2.1 发酵罐培养 7 L 机械搅拌式发酵罐配备pH和DO电极各一支,装载发酵培养基5 L(初始葡萄糖浓度为80 g/L)。121 °C、高压蒸汽灭菌20 min,接种量10%,发酵温度30 °C,初始pH调节至7.4待下降至6.8时保持不变,搅拌转速初始400 r/min视溶氧变化情况逐渐增加至500 r/min,通风量从起始的0.1 vvm提升至0.6 vvm。

1.2.2.2 硝酸盐添加方法 发酵罐发酵实验:发酵过程进行至24 h一次性添加3 g/L-broth的硝酸钠。摇瓶发酵实验:设置1、2、3、4和5 g/L-broth等5个不同添加量和0、16、24和36 h等4个不同添加时间,共计20个不同组合,每个组合作3个平行试验。

1.2.3 指标测定

1.2.3.1 菌体浓度(OD₆₀₀)和菌体干重(DCW)测定 菌体浓度采用光密度法测定,发酵液稀释适当倍数,在600 nm波长下测吸光度,所测数值乘以稀释倍数即为OD₆₀₀;菌体干重通过关系式DCW(g/L)=0.46×OD₆₀₀计算得出^[15]。

1.2.3.2 葡萄糖浓度测定 采用DNS法进行测定^[15]。

1.2.3.3 cAMP与次黄嘌呤测定 使用高效液相色谱进行测定^[5],取适量发酵液于离心管中,9000 r/min,离心10 min。上清液经过0.45 μm孔径的水相膜过滤后待测。色谱条件:色谱柱为Lichrospher C₁₈柱(4.6 mm×300 mm,5 μm),进样量5 μL,有机相为甲醇,水相为磷酸三乙胺缓冲液(0.6%的磷酸溶液,用三乙胺调pH为6.6),水相与有机相体积比为70:30,流速0.8 mL/min,柱温30 °C,波长254 nm。

1.2.3.4 pH和CO₂含量测定 pH由发酵罐配备的

表1 硝酸钠不同添加时间和添加量对 cAMP 发酵产物浓度的影响(g/L)

Table 1 The effects of sodium nitrate on cAMP fermentation production with different addition time and amounts(g/L)

添加量 (g/L-broth)	添加时间(h)			
	0	16	24	36
1	2.68 ± 0.13 ^a	2.73 ± 0.10 ^a	2.98 ± 0.16 ^c	2.86 ± 0.15 ^b
2	2.83 ± 0.12 ^b	2.92 ± 0.16 ^b	3.32 ± 0.22 ^d	3.17 ± 0.24 ^c
3	2.88 ± 0.16 ^b	3.23 ± 0.21 ^d	3.58 ± 0.13 ^f	3.37 ± 0.21 ^d
4	2.92 ± 0.15 ^b	3.17 ± 0.18 ^c	3.43 ± 0.16 ^c	2.86 ± 0.13 ^b
5	2.90 ± 0.12 ^b	2.87 ± 0.13 ^b	3.28 ± 0.23 ^d	3.32 ± 0.15 ^d
对照	2.62 ± 0.14 ^a	-	-	-

注:小写字母表示与对照组比较差异显著性小于0.05。

电极在线测定,尾气中 CO₂ 含量由尾气分析仪在线测定。

1.2.3.5 NH₄⁺ - N、NO₃⁻ - N 和 NO₂⁻ - N 含量的测定 NH₄⁺ - N 采用苯酚-次氯酸盐比色法进行测定,具体方法参照文献^[16]; NO₃⁻ - N 采用水杨酸法测定, NO₂⁻ - N 采用萘氨比色法进行测定,具体见文献^[17]。

1.2.3.6 细胞内 ATP、AMP、NADH 和 NAD⁺ 浓度测定 取 5 mL 发酵液,在 4 °C、9000 r/min 条件下离心 10 min。所得菌体于液氮中处理 2 min,使细胞代谢瞬间停止。用 PBS 缓冲液洗涤细胞两次,重新悬浮在 5 mL 的 PBS 缓冲液中,冰浴条件下超声波破碎 10 min,超声 3 s,停 5 s。在 4 °C、12000 r/min 条件下离心 15 min,上清液用 0.22 μm 孔径的滤膜过滤后待测。ATP、AMP 采用高效液相色谱法进行测定,具体方法参见文献^[15]; NADPH 与 NADP⁺ 浓度采用试剂盒进行测定,操作方法和步骤按照说明书进行。

1.2.3.7 关键酶活性测定 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性采用试剂盒进行测定,操作方法和步骤按照说明书进行;异柠檬酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶和琥珀腺苷酸合成酶活性测定方法参见文献^[18],比酶活以 U/mg 蛋白表示。

1.2.3.8 蛋白浓度测定 采用考马斯亮蓝染色法测定^[18]。

1.2.3.9 胞内氨基酸浓度测定 在不同发酵时期,分别取 50 mL 发酵液,12000 × g 离心 10 min,使用超纯水洗涤 2 次。细胞重悬于 1 mL 10% (w/v) 的三氯乙酸中,37 °C 放置 10 min,煮沸 15 min。12000 × g 离心 10 min 除去细胞碎片,上清经 0.22 μm 滤膜过滤后^[19-20],采用 Waters 公司开发的 AccQ-Tag 法进行测定,操作方法和步骤按照说明书进行。

1.3 数据处理

摇瓶实验中每个样品作三个平行重复,发酵罐培养实验定时取样,测定发酵指标时每个样品测三次。用 Excel 进行数据处理,应用 Origin 8.5 软件作图。

2 结果与讨论

2.1 硝酸钠最佳添加时间与添加量的确定

在 250 mL 锥形瓶中进行了添加硝酸钠的 cAMP 发酵实验,以产物浓度为指标确定最佳添加时间和添加量。如表 1 所示,硝酸钠添加量和添加时间对

cAMP 产量均有较为明显的影响,24 h 添加 3 g/L-broth 硝酸钠时 cAMP 浓度达到最高的 3.58 g/L,比对照提高了 36.6%,与其他组合条件相比具有显著差异。因此,将 24 h 添加 3 g/L-broth 硝酸钠确定为最佳操作条件,在 7 L 发酵罐上进行发酵实验。

2.2 硝酸盐对 7 L 发酵罐中 cAMP 发酵性能的影响

在 7 L 机械搅拌式发酵罐上进行了添加硝酸盐的发酵实验,添加时间为 24 h,添加量为 3 g/L-broth,其它操作条件与对照批次一致。如图 1 所示,添加硝酸盐发酵批次的 cAMP 终产量达到 5.02 g/L,比对照批次提高了 22.7%,而葡萄糖消耗量有一定幅度的下降,cAMP 对葡萄糖的得率达到了 0.097 g/g,比对照提高了 29.8%。在发酵中后期(36~60 h),对照批次的产物合成速率明显变慢,产物增加量很少,而添加硝酸盐批次的产物合成仍较为活跃,合成量比对照批次高出约 1.0 g/L,有效促进了产物的合成与积累。这可能是由以下 3 个原因导致的:a.硝酸钠作为一种氧化性氮源,利用过程消耗大量还原力(NADPH 或 NADH),一定程度上影响了菌体的生长和葡萄糖的利用;b.还原力的消耗缓解了 NADPH 对 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的反馈抑制,使碳流更多的分配到产物合成途径;c.还原力的消耗致使副产物(乙酸和乳酸)合成大幅下降,从而提高了产物的转化率。由图 1C 可知,两批次中 pH 均呈现先降后升的趋势,在 36 h 后添加硝酸盐批次的 pH 回升速度明显快于对照批次,有机酸合成量减少和碱性物质生成导致 pH 的迅速回升。添加硝酸盐批次尾气中 CO₂ 比例明显高于对照批次(图 1D),表明菌体的代谢活性得到增强。

另外,两批次中次黄嘌呤浓度在 40 h 后均降到 0.2 g/L 以下,且基本没有变化,cAMP 是通过从头合成途径进行合成的。cAMP 的从头合成途径涉及到糖酵解与磷酸戊糖途径间的碳流分配、能量供应以及氨基酸供应等问题,因此,可以从硝酸盐利用、代谢途径关键酶活性水平、辅因子和 ATP 变化规律、氨基酸代谢等方面阐明硝酸盐促进 cAMP 合成的生理机制。

2.3 硝酸盐对氮代谢和细胞内还原性辅酶水平的影响

微生物利用硝酸盐时,先通过硝酸盐还原酶作用转化为 NO₂⁻ - N,再由亚硝酸盐还原酶催化生成

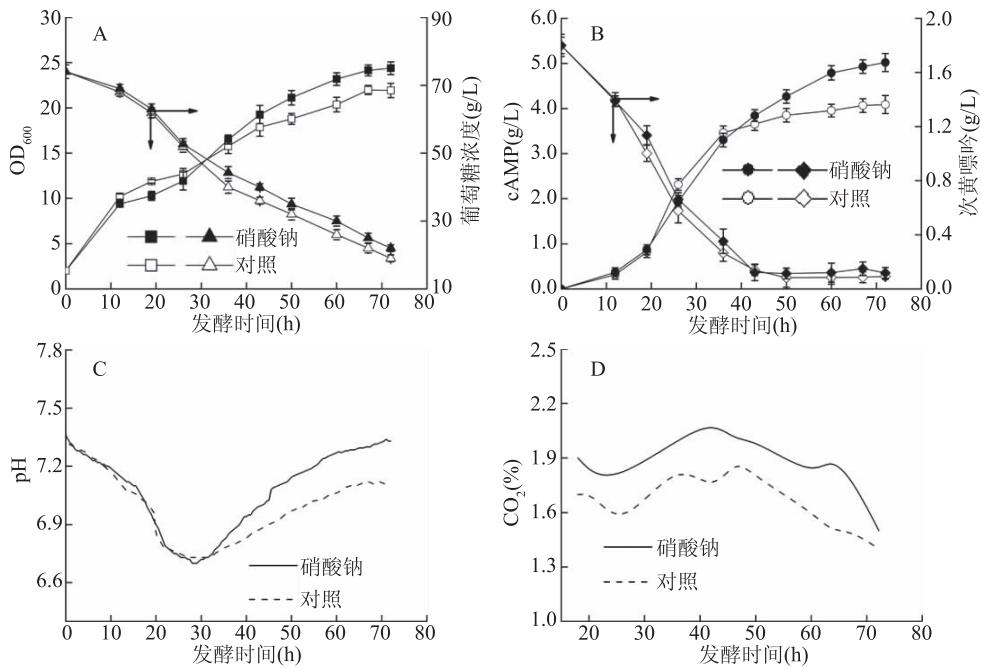


图1 添加硝酸钠对 cAMP 发酵性能的影响

Fig.1 The effect of sodium nitrate on cAMP fermentation performance

$\text{NH}_4^+ - \text{N}$, 最终 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 进入氨基酸代谢转化为各种氨基酸, 参与各项代谢活动。如图 2A 所示, 发酵 24 h 后, 添加硝酸盐批次的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 浓度比对照批次有明显提高, 并一直保持在较高水平, 为产物合成提供充足氮源。为阐明硝酸盐添加批次中 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 浓度提高的原因, 对两批次中 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度进行测定, 如图 2B 所示, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度自添加时起逐渐降低, 并呈现先快后慢的趋势, 总消耗量约为 20 mmol/L, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 得到快速利用; 而 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度呈现先升后降的趋势, 最后消耗殆尽, 完全转化为铵盐。

硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶必须要有还原型辅酶 (NADH 或 NADPH) 提供还原力才能完成催化反应, 因此, 对反映细胞内氧化还原状态的 NADH/NAD⁺ 和 NADPH/NADP⁺ 进行测定。如图 3 所示, 添加硝酸盐批次细胞内 NADH/NAD⁺ 明显高于对照批次的, 而 NADPH/NADP⁺ 却明显低于对照批次的, 表明上述两种还原酶主要以 NADPH 作为辅酶来提供原力, 而 NADH/NAD⁺ 的提高表明细胞能量代谢得到强化。这也解释了添加硝酸盐批次呼吸代谢旺盛而菌体浓度较低的现象, NADPH/NADP⁺ 的大幅降低, 使细胞组分的合成受到影响, 进而影响菌体生长。

2.4 硝酸盐对 cAMP 合成途径中关键酶活性的影响

微生物合成 cAMP 过程涉及到糖酵解、磷酸戊糖途径、嘌呤核苷酸合成途径以及三羧酸循环等。代谢流在不同途径间的分配对产物合成具有显著影响, 而代谢网络中关键节点处酶活性变化反映了代谢途径的强弱和碳流分配情况。

如图 4 所示, 添加硝酸盐批次的丙酮酸脱氢酶活性比对照批次有一定程度下降, 糖酵解途径的代

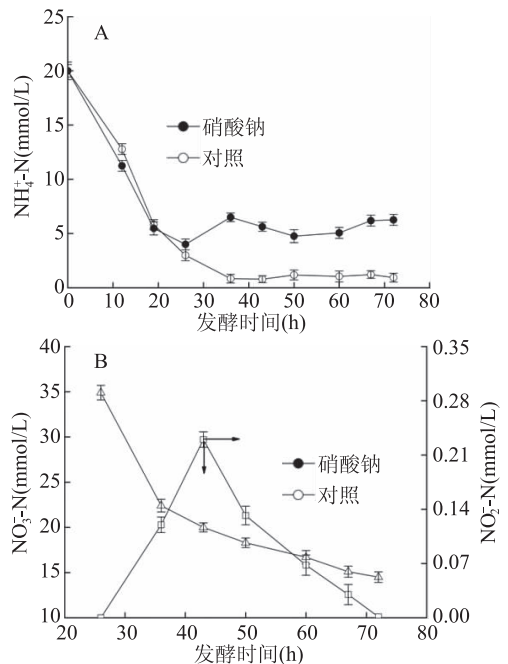


图2 添加硝酸钠时 cAMP 发酵液中铵态氮和硝态氮的变化情况

Fig.2 Time courses of $\text{NH}_4^+ - \text{N}$, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ and $\text{NO}_2^- - \text{N}$ concentrations in fermentation with sodium nitrate added

注: 图 B 展示了添加硝酸钠批次中 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的变化趋势。

谢强度弱化; 而异柠檬酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶和琥珀腺苷酸合成酶的活性均一定程度上高于对照批次, 表明代谢流更多的分配到磷酸戊糖途径为产物合成提供碳骨架, 同时三羧酸循环的代谢强度也得到强化。同时细胞内高 NADPH/NADP⁺ 水平会抑制 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活性, 本文中硝酸钠利

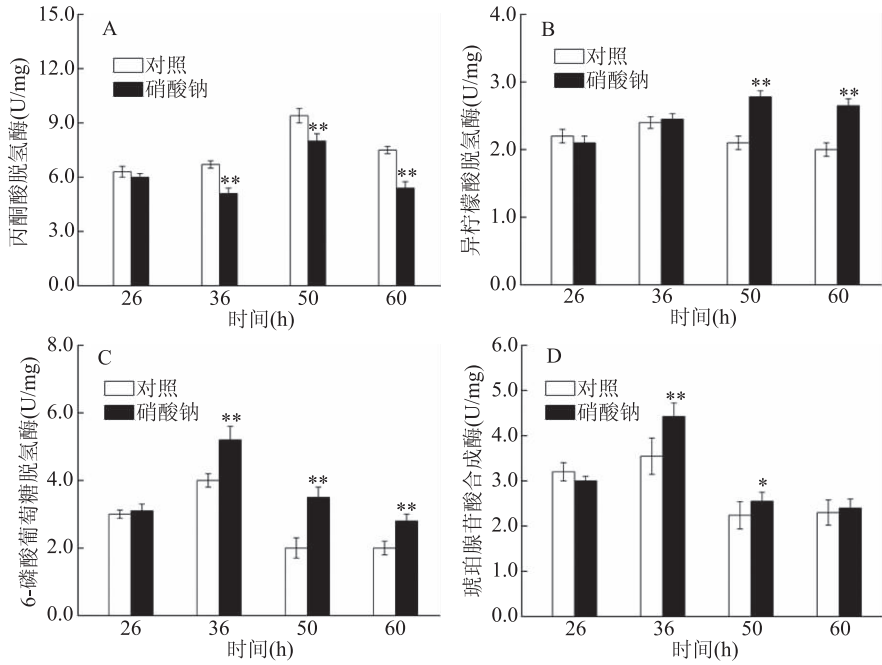


图4 硝酸盐对 cAMP 发酵代谢过程中关键酶活性的影响

Fig.4 The effects of sodium nitrate on the activities of sAMPase, PGH, ICDH and G6PD

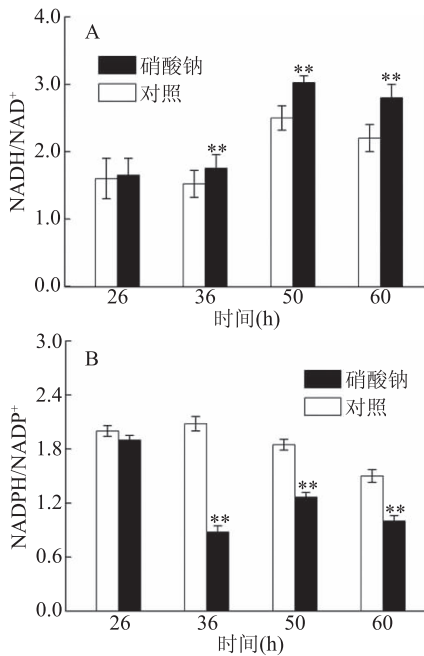


图3 硝酸盐对胞内氧化还原水平的影响

Fig.3 The effects of sodium nitrate on NADPH/NADP⁺ and NADH/NAD⁺

注: * 表示与对照组相比差异显著 (P < 0.05), ** 表示与对照组相比差异极显著 (P < 0.01)。

用过程以 NADPH 为辅酶,使胞内 NADPH/NADP⁺ 水平显著下降,解除或缓解了对 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的抑制作用,提高了该酶的活性,进而将更多的碳流分配到磷酸戊糖途径为产物合成提供碳骨架,促进了产物的合成。

2.5 硝酸盐对 cAMP 发酵过程中氨基酸合成的影响

对添加硝酸盐发酵批次的细胞内氨基酸含量进行测定,结果表明,添加硝酸盐批次中有 12 种氨基

酸的含量高于对照批次,其中 6 种氨基酸含量得到明显提高,分别是天冬氨酸、甘氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸和异亮氨酸(图 5)。天冬氨酸、甘氨酸、谷氨酸是微生物通过从头合成途径进行 cAMP 合成的前体氨基酸,能够部分或整体的整合到嘌呤环上,是产物合成的材料来源;同时天冬氨酸、谷氨酸、异亮氨酸、赖氨酸和精氨酸均是以三羧酸循环的代谢物为碳骨架进行合成的。硝酸盐的利用不仅为氨基酸合成提供了氮素,还通过强化三羧酸循环提供了碳

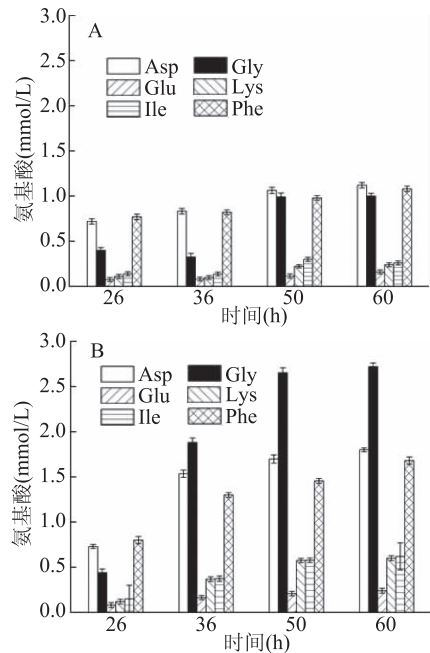


图5 硝酸盐对细胞内氨基酸合成的影响

Fig.5 The effects of sodium nitrate on the amounts of intracellular amino acids

注:A 对照批次;B 添加硝酸盐批次。

骨架,促进了氨基酸代谢,进而促进产物合成。

2.6 硝酸盐对 cAMP 合成过程中能量代谢的影响

cAMP 是由 ATP 在腺苷酸环化酶的催化下合成的,高 ATP 水平有利于产物的合成;而 ATP/AMP 则一定程度上体现了细胞内磷酸化水平和 ATP 合成水平。如图 6 所示,添加硝酸盐发酵批次的细胞内 ATP 含量和 ATP/AMP 均明显高于对照批次,结合 NADH/NAD⁺ 的提高,表明硝酸盐能够强化能量代谢,有利于胞内 ATP 的合成。

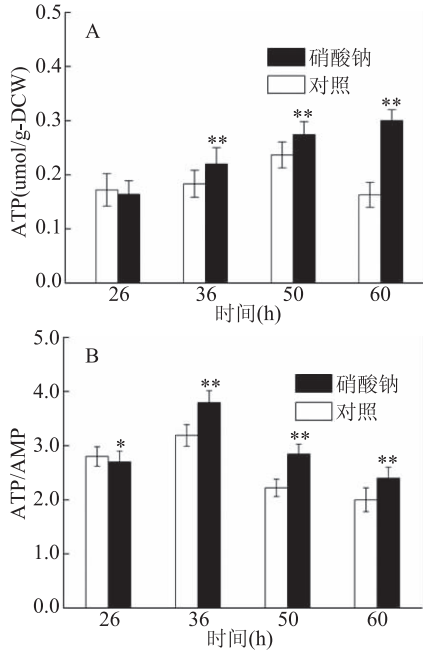


图 6 硝酸盐对胞内 ATP 含量和 ATP/AMP 比的影响

Fig.6 The effects of sodium nitrate on intracellular ATP concentration and ATP/AMP

3 结论

发酵 24 h 添加 3 g/L-broth 硝酸钠时,cAMP 发酵性能得到明显提升。硝酸盐利用过程消耗了大量 NADPH,缓解了对 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的抑制作用,同时糖酵解途径受到抑制而磷酸戊糖途径和三羧酸循环中关键酶活性明显提高,更多碳流分配到产物合成途径。此外,胞内前体氨基酸水平、NADH/NAD⁺ 和 ATP/AMP 均得到明显提高,为 cAMP 的发酵合成与积累提供了物质和能量基础。硝酸盐利用过程消耗了大量的还原力,改变了代谢流分配情况,提高了胞内氨基酸水平和 ATP 合成,为 cAMP 发酵合成提供了物质和能量基础。硝酸盐作用机制的阐明,为提高核苷酸类发酵产品的生产水平提供了参考。

参考文献

[1] Mcphee I, Gibson L, Kewney J, et al. Cyclic nucleotide signalling: A molecular approach to drug discovery for Alzheimer's disease [J]. Biochemical Society Transactions, 2005, 33: 1330-1332.
 [2] Hong D, Peng X R. Role of the cAMP in immunological liver injury in mice: Comparing LPS-induced model with LPS? [J].

Chinese Pharmacology Bull, 2003, 19: 940-943.

[3] Dong J, Fu X M, Wang P F, et al. Construction of industrial baker's yeast with high level of cAMP [J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(7): 1-7.
 [4] Li L, Chen X C, Cheng J, et al. Bi-stage control of dissolved oxygen to enhance cyclic adenosine monophosphate production by *Arthrobacter* A302 [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2012, 35: 1281-1286.
 [5] Chen X C, Song H, Fang T, et al. Enhanced cyclic adenosine monophosphate production by *Arthrobacter* A302 through rational redistribution of metabolic flux [J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 3159-3163.
 [6] Niu H Q, Chen Y, Yao S W, et al. Metabolic flux analysis of *Arthrobacter* sp CGMCC 3584 for cAMP production based on C-13 tracer experiments and gas chromatography - mass spectrometry [J]. Journal of Biotechnology, 2013, 168 (4): 355-361.
 [7] Niu H Q, Wang J Z, Zhuang W, et al. Comparative transcriptomic and proteomic analysis of *Arthrobacter* sp CGMCC 3584 responding to dissolved oxygen for cAMP production [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1246-1249.
 [8] 王镜岩,朱圣庚,徐长法,等.生物化学教程[M].北京:高等教育出版社,2008:376-378.
 [9] Chen X, Xie F L, Zeng X N, et al. Supplementations of ornithine and KNO₃ enhanced bacitracin production by *Bacillus licheniformis* LC-11 [J]. Annals of Microbiology, 2014, 64 (2): 509-514.
 [10] Li X, Gou X Y, Long D, et al. Physiological and metabolic analysis of nitrate reduction on poly-γ-glutamic acid synthesis in *Bacillus licheniformis* WX-02 [J]. Archives of Microbiology, 2014, 196(11): 791-801.
 [11] Cai D B, He P H, Lu X C, et al. A novel approach to improve poly-γ-glutamic acid production by NADPH regeneration in *Bacillus licheniformis* WX-02 [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 43404.
 [12] Wang Y P, San K Y, Bennett G N. Cofactor engineering for advancing chemical biotechnology [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2013, 24(6): 994-999.
 [13] Zou Y Z, Zhang H J, Brunzelle J S, et al. Crystal structures of phosphite dehydrogenase provide insights into nicotinamide cofactor regeneration [J]. Biochemistry, 2012, 51(21): 4263-4270.
 [14] 陈宝峰,李志刚,张中华,等.低聚磷酸盐与次黄嘌呤偶合添加提高环磷酸腺苷发酵性能[J].中国生物工程杂志, 2019, 39(8): 25-31.
 [15] 李志刚,陈宝峰,方智博,等.基于柠檬酸盐与次黄嘌呤偶合添加的环磷酸腺苷发酵工艺[J].食品与发酵工业, 2018, 44(11): 154-158.
 [16] 李宝齐,邓英杰,杨静文.苯酚-次氯酸盐法测定空白脂质体透析液中铵离子浓度[J].中国药剂学杂志, 2006, 4: 184-188.
 [17] Fisher F, Ibert E, Beckman H, et al. Inorganic Nitrate, Nitrite, or Nitrate - Nitrite. Rapid colorimetric determination of

(下转第 131 页)

- [13] 王丹丹, 沈馨, 董蕴, 等. 孝感凤窝酒曲真菌多样性评价[J]. 中国酿造, 2017, 36(11): 38-42.
- [14] 沈馨, 尚雪娇, 董蕴, 等. 基于 MiSeq 高通量测序技术对 3 个孝感凤窝酒曲细菌多样性的评价[J]. 中国微生物学杂志, 2018, 30(5): 525-530.
- [15] 郭壮, 葛东颖, 尚雪娇, 等. 退化和正常窖泥微生物多样性的比较分析[J]. 食品工业科技, 2018, 39(22): 93-98, 106.
- [16] 王玉荣, 折米娜, 刘康玲, 等. 内蒙古鄂尔多斯地区酸粥真菌多样性研究[J]. 中国酿造, 2018, 37(8): 50-55.
- [17] 尚雪娇, 代程洋, 王玉荣, 等. 腌菜中细菌多样性研究及乳酸菌分离鉴定[J]. 中国酿造, 2018, 37(11): 40-44.
- [18] Zannini E, Waters D M, Coffey A, et al. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(3): 1121-1135.
- [19] Chiriac A, Brzezinski P, Foia L, et al. Chloronychia: Green nail syndrome caused by *Pseudomonas aeruginosa* in elderly persons [J]. Clinical Interventions in Aging, 2015, 10(1): 265-267.
- [20] Anne D R, Pags J. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic

(上接第 114 页)

- Genetics, 2016, 62(2): 243-254.
- [29] Kumar M, Brar A, Yadav M, et al. Chitinases—potential candidates for enhanced plant resistance towards fungal pathogens [J]. Agriculture, 2018, 8(2): 29-39.
- [30] Pan M, Li J, Lv X, et al. Molecular engineering of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101 for enzymatic production of

(上接第 120 页)

- microgram quantities in aqueous solution [J]. Analytical Chemistry, 2002, 30(12): 1972-1974.
- [18] Liu C B, Pan F, Li Y, et al. A combined approach of generalized additive model and bootstrap with small sample sets for fault diagnosis in fermentation process of glutamate [J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15: 1-6.
- [19] Guan N, Liu L, Shin H, et al. Systems-level understanding
- (上接第 125 页)
- [30] Li J W, Liu Y F, Fan L P, et al. Antioxidant activities of polysaccharides from the fruiting bodies of *Zizyphus Jujuba* cv. Jinsixiaozao [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(1): 390-394.
- [31] Vo Dinh T, Saravana PS, Woo HC, et al. Ionic liquid-assisted subcritical water enhances the extraction of phenolics from brown seaweed and its antioxidant activity [J]. Separation and Purification Technology, 2018, 196: 287-299.
- [32] 秦媛媛, 冯育林, 邵崇钰, 等. DPPH 法测定芒果叶中总黄酮提取物的抗氧化活性 [J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(2): 185-188.
- [33] 施英英, 夏黎明. 葛根渣固态发酵产异黄酮的研究 [J]. 林

- treatment [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6(3): 392.
- [21] Dytkiewicz J, Mackiewicz B, Lemieszek M K, et al. *Pantoea agglomerans*: A mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: Infections of humans, animals and plants [J]. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 2016, 23(2): 197-205.
- [22] Tumbarello M, Trecarichi E M, Derosa F G, et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2015, 70(7): 2133-2143.
- [23] Ria M, Lars E, Mohammad J T. Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 36(2): 294-300.
- [24] 赵婷婷, 卢倩文, 宋菲菲, 等. 1 株产香真菌的筛选及其协同米根霉对米酒发酵的影响 [J]. 食品科学, 2017, 38(14): 42-48.
- [25] 苏畅, 马莹莹, 杨建刚. 扣囊复膜酵母在酿酒中的应用研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2018, 39(1): 205-209, 220.
- [26] Yang J G, Dou X, Han P J, et al. Microbial diversity in Daqu during production of Luzhou flavored liquor [J]. Journal of The American Society of Brewing Chemists, 2017, 75(2): 136-144.

chitooligosaccharides [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2019, 124: 54-62.

- [31] 陈立功, 吴家葳, 张庆芳, 等. 产低温几丁质酶菌株的筛选、鉴定与产酶条件优化 [J/OL]. 食品工业科技: 1-14 [2020-12-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20200612.1014.002.html>.

how *Propionibacterium acidipropionici* respond to propionic acid stress at the microenvironment levels: Mechanism and application [J]. Journal of Biotechnology, 2013, 167: 56-63.

- [20] Blattmann T M, Montlucon D B, Haghpor N, et al. Liquid chromatographic isolation of individual amino acids extracted from sediments for radiocarbon analysis [J]. Frontiers in Marine Science, 2020, 7: 1-8.

产化学与工业, 2007(1): 57-60.

- [34] 高靖, 陈继红. 葛根及葛根异黄酮的研究现状 [J]. 畜牧与饲料科学, 2013, 34(6): 44-45.
- [35] 宋艳秋, 陈有为. 葛根的红曲霉转化产物化学成分分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(11): 1525-1528.
- [36] 张立衡. 葛根等中草药化学成分提取与分离研究 [D]. 聊城: 聊城大学, 2018.
- [37] 李莹. 寇冠散霉菌化学成分及其抗氧化活性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [38] 李玉婷, 吕嘉柄. 金花菌黄色素的稳定性及其抗氧化活性研究 [J]. 微生物学通报, 2013, 40(11): 2030-2036.