

核苷酸生产技术现状及展望

张志军¹ 温明浩¹ 王克文¹ 王星² 王鹏² 许平²

(1. 大化集团有限责任公司, 辽宁 大连 116032;

2. 山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100)

摘要:核苷酸的生产方法主要有化学合成法、RNA 酶解法、微生物发酵法以及生物催化法。探讨了这些方法的原理和发展及其在工业化生产中的优劣势。化学合成法的路线长、立体选择性差, 所用试剂昂贵并有一定毒性, 生产成本较高; 酶解法能一次得到 4 种核苷酸的混合物且收率较高, 是目前我国核苷酸工业生产所用的主要技术, 但其后提取难度大, 产品纯度不高; 微生物发酵法难以解决细胞通透性的问题; 生物催化法是发酵法的延伸, 菌体培养和酶催化反应分两步进行, 有效地解决了细胞通透性问题, 并可以通过偶联不同的基因工程菌株生产多种复杂核苷酸、核苷糖乃至寡聚糖, 这在核苷酸工业、医药及糖化学、糖生物学合成工业中是极其重要的一个环节。

关键词:核苷酸; 生物转化; 核苷糖

中图分类号: Q524

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2004)11-0019-05

Present situation and prospect for production technology of nucleotide

ZHANG Zhi-jun¹, WEN Ming-hao¹, WANG Ke-wen¹, WANG Xing², WANG Peng², XU Ping²

(1. Dahua Group, Dalian 116032, China;

2. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: This paper reviews the principle and development of four nucleotides production methods which are chemical synthetic processes, enzymatic hydrolysis of RNA, fermentation and bioconversion. The advantages and disadvantages of the different methods in industrial production are discussed. The chemical synthetic process which requires expensive and poisonous materials, has more procedures and less stereoselectivity. The mixed solution of 5'-nucleotides could be carried out from the enzymatic hydrolysis of RNA with a high yield. It's the main method for large-scale production of nucleotides in China. But the complication of separation for four nucleotides makes the process long and expensive and it is hard to get pure products. The problem of permeability cannot be solved by fermentation. The bioconversion is the extension of the fermentation which resolves the problem by separating culture and enzymatic reaction step by step. Complex nucleotides, sugar nucleotides and even carbohydrate can be synthesized by coupling metabolically engineered bacteria, which are important for the industry of nucleotide, medicine, glycochemistry and glycobiology.

Key words: nucleotides; bioconversion; sugar nucleotides

核苷酸是一类在代谢上极为重要的生物物质^[1]。除作为 DNA、RNA 的前体外, 在细胞的生长代谢、能量的储存和转化、免疫反应及信号传导中, 都有核苷酸的参与。核苷酸在食品行业中, 已经由最初的食品助鲜剂, 扩展为具有提高生物体免疫功能的功能性食品添加剂, 特别是在婴幼儿食品中, 核苷酸能有效增强婴幼儿抵抗细菌性痢疾的能力, 减少腹泻的发生。同时, 核苷酸在抗癌, 抗病毒, 治疗心血管疾病、糖尿病及干扰诱导等方面具有独特的疗效, 被用于多种药物的合成。据统计, 目前核苷酸类物质可以合成 52 种抗病毒、抗肿瘤药物。而这些

药物有望成为继磺胺类药物、抗生素之后的又一类新型的抗病毒、抗肿瘤药物。此外, 核苷酸还可作为农用激素调节植物生长, 用于农作物的生产, 有明显的增产、增重功效。

20 世纪 60 年代初, 日本的国中明率先发现了利用橘青霉 (*Penicillium citrinum*) 提取的 5'-磷酸二酯酶可以降解 RNA 生成 5'-核苷酸, 随后, 日本利用该方法首先开始了核苷酸的工业化生产^[2]。在几十年的研究中, 已形成生产核苷酸及其衍生物的多种方法, 归纳起来主要有以下 4 种: 化学合成法、RNA 酶解法、微生物发酵法以及生物催化法。

收稿日期: 2004-04-29; 修回日期: 2004-09-07

作者简介: 张志军 (1963-), 男, 硕士, 副总工程师, 主管和从事生物技术项目研发; 许平 (1961-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为应用与环境微生物技术和生物过程工程, 通讯联系人, 0531-8564003, pingxu@sdu.edu.cn。

1 化学法

化学法生产核苷酸^[3],通常是用磷酸或者焦磷酸的活性衍生物对核苷进行磷酸酯化反应。一般常用的焦磷酸的活性衍生物有三卤氧化磷、焦磷酸氯、双-对硝基苯焦磷酸等。另外,要得到 5'-核苷酸,必须在磷酸化反应前以适当的保护基保护核苷上核糖的 2',3'羟基。一般采用乙酰基、苄基、 ω -亚异丙基或苯亚甲基的功能化基团保护。

目前已知的核苷酸化学合成方法主要有^[4]:

(1) Ott 法

以 5'-核苷单磷酸三正丁胺盐与过量的 1,1'-碳二酰咪唑于室温下反应 1 h,活化生成 5'-核苷单磷酰咪唑,将未反应的 1,1'-碳二酰咪唑用甲醇除去;5'-核苷单磷酰咪唑与焦磷酸盐反应生成 5'-核苷三磷酸。

反应产物用二乙胺基乙基(DEAE)阴离子纤维素树脂层析柱分离纯化。采用 0~0.4 mol 碳酸三乙铵进行梯度洗脱,所得的核苷酸三乙铵盐用甲醇溶解,加入高氯酸钠转型成钠盐。

(2) Ludwig 法

将 0.26 mmol POCl_3 加入到 0.5 mL 磷酸三甲酯和 0.20 mmol 核苷悬浮液中,0℃搅拌 1.5 h。反应混合物中加入 2 mL 浓度为 0.5 mol/L 的焦磷酸三正丁胺盐的 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液和 0.2 mL Bu_3N ,迅速剧烈搅拌。1 min 后加入 pH 值为 7.5 的碳酸三乙铵缓冲液水解。反应产物用 DEAE 纤维素树脂层析分离,洗脱剂为碳酸三乙铵盐,0~0.4 mol 梯度洗脱,得到核苷酸三乙铵盐。

化学法合成核苷酸经历的步骤多、路线长,立体选择性差,所涉及的试剂昂贵,并有一定毒性,生产成本较高。因此一般仅限于实验室规模生产一些有特殊用途的核苷酸的衍生物,难以达到工业规模。

2 酶解法

20 世纪 60 年代,日本科学家发现,可以用从橘青霉中提取的 5'-磷酸二酯酶降解 RNA 生成 5'-单核苷酸,从而生产具有呈味作用的 5'-鸟嘌呤核苷酸(GMP)。从 1961 年起,以酵母 RNA 为原料,利用橘青霉和金色链霉菌生产 5'-磷酸二酯酶降解 RNA,开始了 5'-GMP 的工业化生产。目前,在日本有 40% 的核苷酸是以 RNA 为底物酶解得到的^[2]。

酶解法生产 5'-核苷酸的工艺流程为:酵母经稀碱或浓盐抽提后,在 pH 值为 2.5 的条件下沉淀得

到 RNA,再经 5'-磷酸二酯酶酶解,得到 4 种核苷酸的混合液,将该混合物经离子交换树脂分离纯化可以得到 4 种核苷酸的纯品。其中磷酸二酯酶主要是通过橘青霉固体发酵生产的核酸酶 P1。它是一个胞外酶,提取后的粗酶液酶活一般在 0.0067~0.012 kat/L(即 400~700 U/mL),可以直接用于水解核酸,其水解率一般为 70%~85%^[5-7],由于酶解反应水解率不高,水解液中除了 4 种核苷酸外,还存在大量的杂质。一次性分离 4 种核苷酸本身难度就大,加上其他杂质,使得后续工艺对 4 种核苷酸的分离非常困难。

徐焱^[2]通过对原始菌株的筛选,得到一个酶活可达 0.017 kat/L(即 1 000 U/mL)以上的橘青霉菌株,并改变了传统的固体发酵方式,用新型气升式反应器液体发酵生产核酸酶 P1,酶解率达到 90%,从而减轻了分离工艺的压力。

除了橘青霉的核酸酶 P1 外,还可从麦芽根中提取磷酸二酯酶进行酶解反应。并通过将 5'-磷酸二酯酶和 5'-脱氨酶固定在树脂上实现了 RNA 的连续酶解反应,生产 5'-肌苷酸(5'-IMP)和 5'-GMP^[8]。其他的固定化技术研究还有用对氨基苯磺酰乙基纤维素^[9]或钛氯化纤维素^[5]固定化 5'-磷酸二酯酶。后者的活力回收可达 70%,平均水解率为 74.6%,且载体成本低廉,固定化效果很好。另外,中国科学院大连化学物理研究所^[10]用膜反应器实现了核糖核酸的连续水解生产核苷酸,核酸酶水解水平平均达到 80%,多个膜反应器串联使用,平均水解可达 90%。但是水解一定时间后,聚砜超滤膜会出现部分堵塞的现象,需要处理,且维护费用也较高,因此不适合大规模工业化生产。

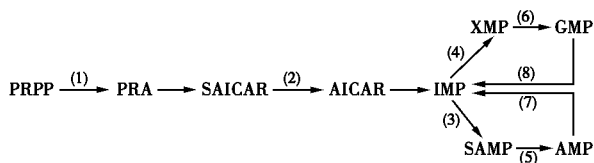
总的来说,酶解法生产核苷酸能一次得到 4 种核苷酸的混合物,且酶反应收率较高,但后提取过程中,分离纯化得到 4 种高纯度产品的难度大,导致生产周期长,提取工艺烦琐,产品纯度不高。但是由于该生产工艺简单、原料来源丰富、成本低廉,所以长期以来,我国都以此方法进行核苷酸的工业生产。

3 微生物发酵法

微生物发酵法生产核苷酸,主要是利用微生物菌株的生物合成途径来生产核苷酸,所使用的菌种多为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和产氨棒杆菌(*Corynebacterium ammoniagenes*)。前者主要用于生产核苷和嘌呤核苷酸^[11-12],而后者是目前利用微生物工业化合成核苷酸及其高级衍生物的主要菌种。

3.1 嘌呤核苷酸的微生物合成

早在1963年, Momose等^[13]就开始了枯草杆菌的嘌呤核苷酸合成途径的研究,发现枯草杆菌通过分解代谢利用碳源提供满足菌体生长和产物合成所需要的能量,同时也提供合成嘌呤、嘧啶和芳香族氨基酸的基本前体物——5-磷酸核糖。后来Nishikawa等系统地从前体物5-磷酸核糖合成嘌呤核苷、腺嘌呤系列物质和鸟嘌呤系列物质的途径做了详细的研究(见图1)。



PRPP—5-磷酸核糖焦磷酸;PRA—5-磷酸核糖胺;SAICAR—5-氨基-4-咪唑-N-腺苷酸羧基酰胺核糖核苷酸;AICAR—5-氨基-4-咪唑羧基酰胺核糖核苷酸;XMP—黄嘌呤核苷酸;AMP—腺嘌呤核苷酸;SAMP—腺苷琥珀酸;1—PRPP转酰胺酶;2—SAMP裂解酶;3—SAMP合成酶;4—IMP脱氢酶;5—SAMP裂解酶;6—XMP氧化酶;7—AMP脱氢酶;8—GMP还原酶

图1 枯草杆菌嘌呤核苷酸合成途径^[12]

PRPP转酰胺酶、IMP脱氢酶和SAMP合成酶是嘌呤核苷酸全合成途径的关键酶^[11]。其中,PRPP转酰胺酶受GMP和AMP的强烈抑制,GMP与AMP能阻遏PRPP转酰胺酶的形成,其抑制作用与PRPP是拮抗性的,同时添加GMP和AMP对该酶的抑制具有协同作用,是相乘性的结果,而且,如果腺嘌呤和鸟嘌呤都过量,该酶的合成就会被完全阻遏;若只限量鸟嘌呤,就仅部分解除。GTP、ADP和IMP对该酶的抑制作用较差,三磷酸腺苷酸和腺嘌呤对该酶不产生抑制作用。IMP脱氢酶的合成不为腺嘌呤、次黄嘌呤及黄嘌呤衍生物所阻遏,仅受GMP的阻遏。SAMP合成酶只专一性地受AMP的阻遏。

枯草杆菌的嘌呤核苷酸合成途径是从PRPP经IMP然后分为2条环形途径,加之此类菌自身5'-核苷酸酶活力强,因此常被用于嘌呤核苷的合成。只要阻塞某一代谢途径(如选育遗传缺陷型菌株、抗嘌呤核苷酸类似物)解除反馈抑制,就能产生相应缺陷型的积累产物。如,以肌苷产生菌为出发株,经多次诱变育种获得一株腺嘌呤回复、黄嘌呤缺陷型、GMP还原酶缺失、抗8-杂氮黄嘌呤为主要遗传标记的变异株产生大量腺苷,可达16 g/L。

产氨棒杆菌嘌呤核苷酸的生物合成途径是从PRPP经IMP后分为2条直链途径,最终产生AMP和GMP,即没有图1中的反应(7)和(8)。

使用产氨棒杆菌为出发株,经诱变育种后用发酵法直接产生AMP或GMP是十分困难的,因此常利用产氨棒杆菌的补救途径(见图2)进行嘌呤核苷酸的合成。培养基中过量腺嘌呤和鸟嘌呤会抑制PRPP转酰胺酶,但会促使菌株通过补救途径(salvage pathway)合成嘌呤核苷酸。补救途径中的核苷酸磷酸化酶、核苷酸焦磷酸化酶和核苷酸磷酸激酶,都被多种嘌呤核苷酸所抑制,并且嘌呤碱基、核苷、核苷酸之间可通过补救途径相互转化。

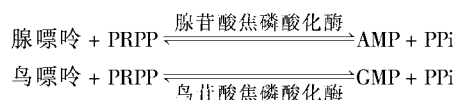


图2 嘌呤核苷酸合成的补救途径

从1964年开始,日本科学家就开始了发酵合成核苷酸的研究。T.Nara等^[14]筛选多株具有核苷酸合成能力的菌种,并发现其中*Brevibacterium ammoniagenes* ATCC6872能够在提供不同底物的情况下通过补救途径发酵合成不同核苷酸^[15-18]。该课题组在1964~1971年间,先后用该菌成功地发酵生产了IMP(>14 g/L)、XMP(约5 g/L)、AMP(约3.8 g/L)及GMP(约2 g/L)。在其工作基础上,以*B. ammoniagenes* ATCC6872为出发株,筛选各种突变体用于核苷酸生产的研究一直持续至今。

3.2 嘧啶核苷酸的微生物合成

嘧啶核苷酸的合成的关键酶有:催化天冬氨酸和氨甲酰磷酸生成氨甲酰天冬氨酸的天冬氨酸转氨甲酰酶(aspartate transcarbamoylase)、催化合成二氢乳清酸的二氢乳清酸合成酶(dihydroorotase)、催化二氢乳清酸生成乳清酸(ORA)的二氢乳清酸脱氢酶(dihydroorotate dehydrogenase)、将乳清酸焦磷酸化的乳清酸焦磷酸化酶(orotate phosphoribosyltransferase),以及乳清苷酸(OMP)脱羧酶(monophosphate decarboxylase),它催化乳清苷酸脱羧生成尿苷酸(UMP)。UMP被磷酸化为三磷酸尿苷酸(UTP)后,可通过胞苷三磷酸(CTP)合成酶(CTP synthetase)生成CTP。除了“从头”(de novo)合成途径外,嘧啶核苷酸同样可以由嘧啶碱基通过补救途径合成。

另外,与嘌呤核苷酸的合成途径不同,嘧啶核苷酸的生物合成途径与某些氨基酸的代谢关系更为密切^[12],主要是作为前体的天冬氨酸盐能途经天冬氨酸β半醛生成高丝氨酸,进而被高丝氨酸脱氢酶催化生成甲硫氨酸及苏氨酸。因此选育高丝氨酸脱氢酶缺失,阻塞分支代谢途径,使不产生甲硫氨酸、苏氨酸副产物的菌株,是发酵产生嘧啶核苷和核苷酸

的前提。

由于尿苷酸对氨甲酰磷酸的合成有反馈抑制,同时,要解除合成尿苷酸之前 5 个中间体必需酶的阻遏,可以通过选育尿苷酸的结构类似物——2-巯基尿嘧啶、6-杂氮尿嘧啶的抗性菌株来解决。乔宾福^[12]将一株野生型枯草芽孢杆菌通过诱变加上 2-巯基尿嘧啶和 6-杂氮尿嘧啶的抗性标记,并使其嘧啶核苷磷酸化酶缺失,其尿苷产量达 65 g/L。同一株出发菌再诱变获得胞苷脱氨酶缺失、5-氟胞苷抗性及高丝氨酸缺陷型的突变株,其胞苷产量达 30.2 g/L。

枯草芽孢杆菌的 5'-核苷酸酶活性很高,一般用来合成核苷,而不能大量合成核苷酸。1971 年, K. Nakayama 等^[18]在嘌呤核苷酸发酵法合成的研究基础上,利用 *B. ammoniagenes* ATCC6872 通过发酵法合成了 4.8 g/L 的 UMP。

4 生物催化法

核苷酸是一种糖基磷酸酯,难以透过细胞膜。在菌体发酵过程中除了要考虑解除反馈抑制外,还需考虑细胞渗透性的改变。因此增加了菌体发酵的难度。T. Nara 等发现控制培养基中锰离子在亚适量状态,能改变细胞表面结构,从而增大细胞通透性,促进核苷酸的合成^[19]。1983 年, T. Fujio 和 A. Furuya^[19]改变传统的发酵方法,利用 *B. ammoniagenes* 的一个突变株 KY13510 作为生物催化剂,在含底物和表面活性剂的催化系统中合成了 13 g/L 的 ATP。从此,通过微生物代谢进行的核苷酸合成,开始由发酵法转为生物催化转化法。

微生物催化转化合成核苷酸,就是利用微生物作为酶源,催化核苷酸的前体物质转化为核苷酸。用于催化转化法合成核苷酸的微生物一般是产氨棒杆菌[*Corynebacterium ammoniagenes* (旧称 *Brevibacterium ammoniagenes*)],它具有很强的 ATP 再生能力,并能有效提供作为焦磷酸化供体的 PRPP。同时,该菌的核苷酸酶的活性较低,有利于积累核苷酸。生产上用的菌种除了上述特征外,一般还要经过诱变选育以增加其转化活性。如, *C. ammoniagenes* KY13505 具有 GMP 合成酶抑制剂德夸菌素的抗性标记且核苷酸酶弱化以减少核苷酸的分解。另外,转化反应中需要适当的表面活性剂增加细胞膜通透性,使底物能进入胞内参与反应,产物核苷酸能分泌到胞外。

从 1983 年以来,利用 *C. ammoniagenes* 作微生

物催化剂合成核苷酸的研究层出不穷。1983 年 T. Fujio 和 A. Furuya^[19]以腺嘌呤为底物,利用 *C. ammoniagenes* KY13510 合成了 13 g/L 的 ATP;1984 年该课题组用同一菌株以 5'-XMP 为底物合成了 43.5 g/L GMP^[20];1997 年 T. Fujio 和 A. Maruyama^[21]以乳清酸为底物,用 *C. ammoniagenes* KY13505 催化合成了 28.6 g/L (77.6 mmol/L) UMP。并通过偶联一株基因工程菌 *Escherichia coli* JF646/pMW6 (该菌株能自主复制 CTP 合成酶基因 *pyrG*),共同转化产生 8.95 g/L (15.1 mmol/L) CTP;同时,利用能表达 *Saccharomyces cerevisiae* 的胆碱激酶的 *E. coli* MM294/pUC3 和 MM294/pCC41 细胞与以上细胞联合转化生成了 7.7 g/L (15.1 mmol/L) 的 CDP-胆碱。此后, *C. ammoniagenes* 被广泛用于核苷糖(sugar nucleotides)类的合成,如, A. Ozaki 实验组^[22-24]自 2000 年以来,用 *C. ammoniagenes* DN510 和不同的基因工程菌组合,通过添加不同底物,先后合成了 UDP-N-乙酰葡萄糖胺、CMP-唾液酸(CMP-NeuAc)、 α -Neup5Ac-(2-6)-D-GalpNAc 等多种核苷糖和寡聚糖。2001 年 A. Maruyama 和 T. Fujio^[25]通过控制菌体培养及转化过程中的氨含量,使 *C. ammoniagenes* KY13510 的 ATP 产量提高到了 70.6 g/L (117 mmol/L)。2002 年 Peng George Wang 及其合作者^[26]将一株能高效表达聚磷酸激酶(PPK)的重组大肠杆菌细胞用果胶酸钙包埋固定化后,和 *C. ammoniagenes* ATCC21264 细胞偶联,以乳清酸为底物合成了 17 mmol/L 的 UTP。

从上述例子可以看出,相对于发酵法生产,催化转化法不但缩短了生产周期,也使核苷酸的产量大大增加;并且反应体系简单,一般只需要底物、表面活性剂、酶辅基(如镁离子)及一定量的 pH 值调节剂。这使得后提取工艺相对于酶解生产法或化学合成法简单容易;更重要的是,可以通过偶联不同的基因工程菌株,生产多种复杂核苷酸、核苷糖乃至寡聚糖。这在核苷酸工业、医药及糖化学、糖生物学合成工业中是极其重要的一个环节,也是其他 3 种方法不能替代的一个关键环节。遗憾的是,我国到目前为止还停留在核苷的发酵生产上;核苷酸的工业生产也仅限于酶解法,而通过生物催化转化技术生产核苷酸尚未见有报道。

5 展望

如前所述,核苷酸在农业、食品制造、医药生产上都有极为重要的用途,特别是作为寡聚糖生物合成的必须前体,它被用于合成多种抗肿瘤和抗病毒

药物。其市场需求量日益加大,蕴含有巨大的商业潜力。但与此同时,由于生产困难,其生物法生产技术基本被日本垄断,仅韩国有少量生产,从而造成核苷酸的价格太高。我国的核苷酸产业到目前为止尚未能大规模生产高质量的核苷酸,仅限于核苷类物质的生产。大量产品依赖进口,不但需要大量外汇,而且由于价格因素,严重限制了相应衍生物产品的研究开发工作。目前,核苷酸的生产,特别是生物转化生产技术已经成为国内外糖化学进一步产业化和高附加值核苷酸产业化的瓶颈所在。该技术的研究对于推动我国核苷酸研究及商业生产、糖化学和糖生物学研究,以及核苷酸相关医药产品的研发具有十分重要的经济意义和社会意义。

参考文献

- [1] 汪余勤.[J].国外医学(卫生学分册),1999,26(5):257-260.
- [2] 徐燧.5'-核苷酸制备工艺的研究[D].南京:南京工业大学,2002.
- [3] 武田药品工业株式会社.5'-核苷酸的生产方法[P].CN 1086219A,1994-05-04.
- [4] 成都国嘉制药有限公司.核苷酸的生产方法[P].CN 1304939A,2001-07-25.
- [5] 宋荣钊,王春林,梁峰.[J].微生物学报,1991,18(4):211-214.
- [6] 王普行,许惟治,厉雪君,等.[J].上海调味品,1990,(1):19-23.
- [7] 房兴利.[J].中国调味品,1993,(10):1-4.
- [8] Olmedo F, Lurbe F, Gomez-Hernandez J.[J].World Journal of Microbiology and Biotechnology,1994,10(1):36-40.
- [9] 袁中一,刘树煌,汪静英,等.[J].科学通报,1980,14:654-657.
- [10] 中国科学院大连化学物理研究所.一种由核糖核酸连续酶水解制5'-核苷酸的方法[P].CN 1121112A,1996-04-24.
- [11] 蔡显鹏,储炬,庄英萍,等.[J].中国生物工程杂志,2002,22(5):9-14.
- [12] 乔宾福.[J].工业微生物,1998,28(1):22-27.
- [13] Momose H, Nishikawa H, Katsuya N.[J].Journal of General and Applied Microbiology,1964,10:343-349.
- [14] Nara T, Misawa M, Kinoshita S.[J].Biotechnology and Bioengineering,1968,10:277-289.
- [15] Nara T, Misawa M, Kinoshita S.[J].Agricultural and Biological Chemistry,1968,32(5):561-567.
- [16] Nara T, Misawa M, Kinoshita S.[J].Agricultural and Biological Chemistry,1968,32(9):1153-1161.
- [17] Misawa M, Nara T, Kinoshita S.[J].Agricultural and Biological Chemistry,1969,33(3):370-376.
- [18] Nakayama K, Tanaka H.[J].Agricultural and Biological Chemistry,1971,35(4):518-525.
- [19] Fujio T, Furuya A.[J].Journal of Fermentation Technology,1983,61(3):261-267.
- [20] Fujio T, Kotani Y, Furuya A.[J].Journal of Fermentation Technology,1984,62(2):131-137.
- [21] Fujio T, Maruyama A.[J].Bioscience, Biotechnology and Biochemistry,1997,61(6):956-959.
- [22] Tabata K, Koizumi S, Endo T, et al.[J].Biotechnology Letters,2000,22(6):479-483.
- [23] Endo T, Koizumi S, Tabata K, et al.[J].Applied Microbiology and Biotechnology,2000,53(3):257-261.
- [24] Endo T, Koizumi S, Tabata K, et al.[J].Carbohydrate Research,2001,330(4):439-443.
- [25] Maruyama A, Fujio T.[J].Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,2001,65(3):644-650.
- [26] Nahálka J, Liu Ziyue, Gemeiner P, et al.[J].Biotechnology Letters,2002,24(11):925-930. ■
- [14] BASF AG. Fixed-bed Raney metal catalyst, its preparation and the hydrogenation of polymers using this catalyst[P]. US 6121188, 2000-09-19.
- [15] 底古萨股份公司.活化的阮内金属固定床催化剂及其制备方法[P].CN 1083736C,2002-05-01.
- [16] Degussa AG. Process for the production of 3-aminoethyl-3, 5, 5-trimethylcyclohexyl amine[P]. US 5679860, 1997-10-21.
- [17] Degussa AG. Fixed bed catalysts[P]. US 6489521, 2002-12-03.
- [18] Degussa AG. Method for producing alcohols by hydrogenation of carbonyl compounds[P]. US 6486366, 2002-11-26.
- [19] Südzucker AG. Process for the hydrogenation of sugars using a shell catalyst[P]. US 5936081, 1999-08-10.
- [20] W R Grace & Co Conn. Shaped catalyst and process for making it[P]. US 4826799, 1989-05-02.
- [21] 格雷斯公司.成型的催化剂和制备方法[P].CN 1037283A, 1989-11-22.
- [22] BASF AG. Process for the production of a hydrogenation catalyst[P]. US 5733838, 1998-03-31.
- [23] Degussa-Huls AG. Shaped, activated metal, fixed-bed catalyst[P]. US 6262307, 2001-07-17.
- [24] Degussa AG. Shaped metal fixed-bed catalyst, a process for its preparation and its use[P]. US 6337300, 2002-01-08.
- [25] 赵会占,白锐,刘晨光.[J].石油大学学报(自然科学版),2004,28(3):90-92.
- [26] Haake M, Dorsam G, Boos H. Thin layer catalysts based on Raney alloys, and method for the production thereof[P]. US Application 2003/0004059A, 2003-01-02.
- [27] 巴斯福股份公司.基于阮内合金的薄膜催化剂及其制备[P].CN 1413128A, 2003-04-23. ■

(上接第18页)