

用面包酵母制取鸟苷酸

南京发酵厂

江苏省化工设计研究所

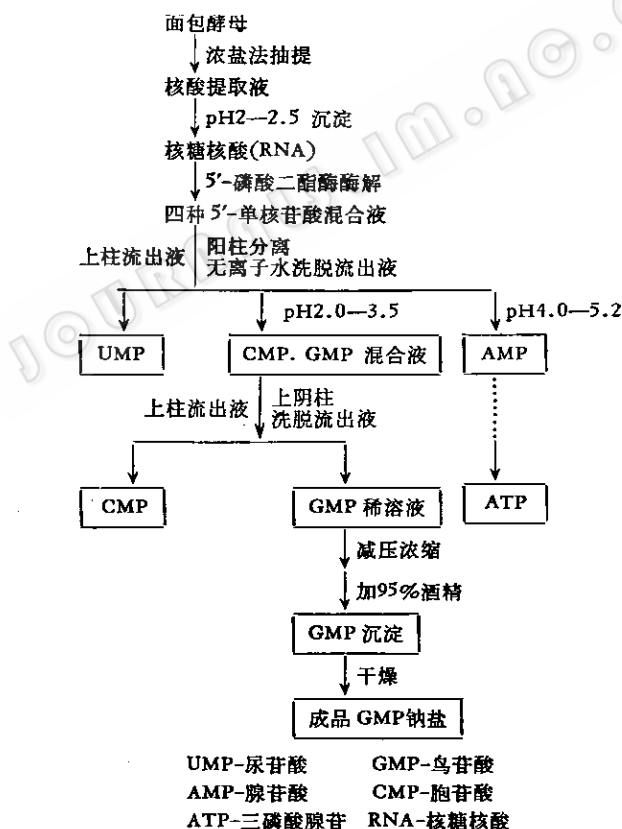
(南京)

鸟苷酸和谷氨酸钠并存时,对谷氨酸钠的鲜味有显著的促进效果。根据国外报道,谷氨酸钠与鸟苷酸混合比例为 10:1 时,能增加鲜味 19 倍,混合比例为 20:1 时,能增加鲜味 12.4 倍,混合比例为 50:1 时,增加鲜味 6.4 倍。因此用鸟苷酸与谷氨酸钠调制的味精和肌苷酸与谷氨酸钠配制的复合味精一样统称强力味精。

为增加我国味精产品的新品种,我们进行了利用面包酵母制造鸟苷酸强力味精的研制工作。通过试验,应用黄浆水培养面包酵母并利

用面包酵母核酸降解提取鸟苷酸,将此鸟苷酸钠添加在味精中(鸟苷酸钠与味精重量比为 1:19),可以提高鲜味 10 倍。在酶解时添加 0.028% 硫酸锌(相当 60ppm 锌离子),可使降解率达到 80% 左右。利用普通粗树脂(732 阳离子树脂和 717 阴离子树脂),上柱率最高可达 80%,所得成品质量合格,纯度最高可达 90% 左右。现将结果报告如下:

一、生产流程



二、核酸的提取

采用浓盐法提取,纯核酸收得率(对于酵母

重)为 3% 左右。黄浆水生产的面包酵母得率为纯糖生产得率的 128—130% (鲜酵母)。

(一) 抽提

100 公斤鲜酵母加水 200 公斤、加盐 32 公斤, 保温 90—95℃, 定期搅拌, 3 小时后离心, 取上清液冷却到 5℃。

(二) 沉淀核酸

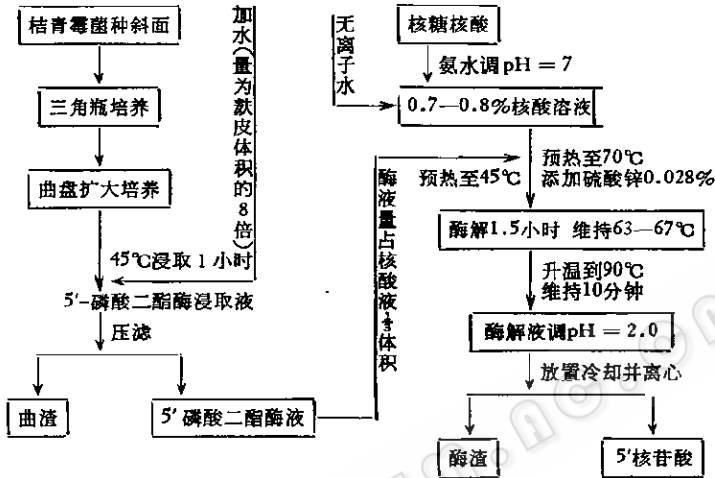
上清液用 6N HCl (工业用) 调 pH 为 2—2.5, 待有核酸沉淀出现后, 离心收集沉淀。沉淀用酒精浸泡后洗涤 1—2 次, 除去杂质, 最后得到

核酸泥供降解用。

三、核酸酶解

利用桔青霉产生的 5'-磷酸二酯酶使磷酸保留在核糖的 5 位碳原子上, 形成四种 5'-核苷酸, 其中只有鸟苷酸呈鲜味。

核酸酶解的流程如下:



(一) 桔青霉 AS 3.2788 菌株的培养

1. 斜面培养:

采用中国科学院微生物研究所筛选的 AS 3.2788 菌株。斜面培养用察氏培养基和土豆葡萄糖培养基轮换接种保存。使用前在土豆培养基或麦芽汁培养基上活化, 28—30℃ 培养 3—4 天后孢子呈灰绿色, 即可作种子用。

2. 三角瓶培养:

麸皮和水按 1:1.4—1.5 混合, 装入 1,000 毫升三角瓶中(每瓶装 50 克麸皮), 在 1.5 公斤/厘米²压力下, 灭菌 1 小时, 将斜面种子接种, 28—30℃ 静置培养 4—5 天, 待孢子呈灰绿色可供扩大培养用。

3. 曲盘培养:

将麸皮和水按 1:1.7—1.8 混合, 装入 55×40×4 厘米曲盘中(每盘装麸皮 500 克)灭菌条件同前, 然后将三角瓶内长好的种曲搓碎和曲盘内的麸皮拌匀, 于 28—30℃ 培养。此时相对湿度为 70—80%, 品温不宜超过 32℃, 培养 3 天左右, 到曲呈灰绿色即可采收。若培养时间

延长, 曲变为深绿色时, 则活力下降。

(二) 5'-磷酸二酯酶酶的制备

将培养好的桔青霉曲, 添加麸皮体积 8 倍无离子水, 在 45℃ 保温 1 小时, 抽提并间歇搅拌, 过滤弃去曲渣, 即得酶液, 放冷库备用。酶液的 pH 为 5.8—6.2, pH 值过高表示桔青霉生长过老, 酶活力低。

(三) 核酸酶解

先将核酸溶于少量无离子水中, 用 5—6% 氨水或少量 30% NaOH 助溶, 将核酸溶液调到 pH 7, 使核酸溶解完全。并添加 0.028% 硫酸锌, 配成核酸浓度为 0.7—0.8% 的溶液, 升温至 67—70℃, 再加入酶液(预热至 45℃), 使两者混合后维持 65℃, 进行降解 1.5 小时, 再升温至 90℃ 维持 10 分钟, 使蛋白质类杂质凝固便于除去, 然后冷至室温, 调 pH 值为 2.0, 静置, 离心后得上清液即为 5'-核苷酸液。

根据试验结果, 添加锌离子可以使降解率提高 15% 以上, 酶降解率最高可达 80% 左右。

四、鸟苷酸的分离

(一) 原理

根据在一定条件下,离子交换树脂对不同的单核苷酸的吸附能力不同的原理,选择适当类型树脂。控制吸附和洗脱条件便可以从混合核苷酸溶液中分离出鸟苷酸。在 pH 值为 1.5 时 AMP, CMP, GMP 上的氨基带正电荷,可被阳离子交换树脂所吸附,UMP 没有氨基,不带正电荷,大部份直接流下来,不被树脂吸附。如用无离子水洗脱时,随着 pH 值的变化,GMP、CMP、AMP 上的氨基解离降低的程度不同,而先后失去在阳离子交换树脂上的吸着能力,按 GMP, CMP, AMP 的顺序依次洗脱下来,收集 GMP、CMP 的混合液,再用阴离子交换树脂提纯 GMP。

(二) 树脂的选择

实验采用 732 阳离子树脂(16—50 目)和 717 阴离子树脂(80 目)。

(三) 分离

1. 阳柱分离:

①平衡:用相当于树脂体积 2 倍的 pH 1.5 的水平衡阳柱,待流出液 pH 值为 1.5 时即可上柱。

②上柱:先把 5'-核苷酸液用 6N HCl 调 pH 1.5 后上柱,上柱量按每公斤阳树脂能吸附 43—57 克单核苷酸计算。

③洗去 UMP:上柱完毕,用相当于树脂体积 2 倍的 pH 1.5 的无阳离子水把柱内少量的 UMP 洗脱。

④洗脱 GMP 和 CMP:用无阳离子水洗脱,当流出液 pH 为 2.0—3.5 时得到 CMP 和 GMP 混合液,将此部分液体调 pH 为 4.0 后,上阴柱再分离 GMP。

2. 阴柱分离:

阴离子交换树脂季胺基上的氯离子(Cl^-)可被溶液中的阴离子交换。在 pH 4.0 时, CMP 氨基的解离显著大于 GMP 氨基的解离,致使 CMP 的总负电荷大大地小于 GMP,故 GMP 被阴离子树脂牢固地吸附着,而 CMP 则不被吸附直接

流下来。

①平衡:用树脂体积 4 倍的水平衡阴柱,使流出液 pH 值为 4.0 即可上柱。

②上柱:将阳柱的洗脱液(pH 为 2.0—3.5)用 6N NaOH 调到 pH 为 4.0 时上阴柱,直到 GMP 不被吸附为止(通常 100 克湿树脂可吸附 GMP 15 克以上)。上柱时流出液为 CMP 的稀溶液,待进一步浓缩,沉淀。

③洗脱:上柱结束后,用相当于树脂体积 15 倍的 0.01N HCl 加 0.1M NaCl 溶液进行洗脱,将洗脱液浓缩后即得成品 GMP 钠盐。

五、鸟苷酸钠的浓缩和干燥

将 GMP 钠洗脱液调 pH 为 7 放在真空浓缩器中,于 $60 \pm 5^\circ\text{C}$ 浓缩约 10 倍左右。用布氏漏斗抽滤以后加 2 倍 95% 酒精,鸟苷酸钠即成为白色沉淀,在 10°C 下放置过夜,以后用 G₂ 漏斗抽滤,并用 95% 酒精洗 2—3 次。在 45—50°C 真空干燥,得到 GMP 钠白色粉末。

六、鸟苷酸强力味精的配制

浓缩干燥后的鸟苷酸钠为白色至微黄色粉末,纯度 75—92%。将鸟苷酸钠按比例(鸟苷酸钠与味精重量比为 1:19)添加到味精中,研细后装袋即为强力味精。

讨 论

1. 在用 5'-磷酸二酯酶酶解时,利用锌离子对此酶能激活的原理,在核酸溶液中添加 0.028% 硫酸锌,可以提高核酸的降解率。

2. 在树脂分离 5'-核苷酸时,我们采用普通 732 阳树脂(16—50 目)和 717 阴树脂(80 目),价格便宜,再生方便,也能获得良好的分离效果。

3. 为了就地取材,土法上马,采用陶瓷缸代替有机玻璃柱,仅添加树脂量稍多,也能获得良好分离效果。

4. 用阴柱分离鸟苷酸时,根据阴柱上柱液和流出液进行电泳比较,发现上柱液中有 CMP

和 GMP, 流出液中只有 CMP, 得知在 pH 4 时 GMP 全部被树脂吸附。故在洗脱 GMP 时只采用 0.01 N HCl 加 0.1M NaCl 进行洗脱, 即得成品 GMP 钠盐。这样, 既简化操作, 又缩短了时间。

5. 利用面包酵母提取鸟苷酸制强力味精的同时可以综合利用 AMP 制造 ATP。树脂分离同时还可得到 CMP 和 UMP, 均应收集浓缩, 以

利降低成本和增加新药品种。

6. 在酵母抽提核酸后, 最好采用管式高速离心机分离, 可省人力和时间。如有条件, 最好能增设附有搅拌的核酸抽提罐和酒精回收塔各一个。

7. 提取核酸后的残渣, 含有大量蛋白质, 可作精饲料用。