〔19〕中华人民共和国专利局

[11]公开号 CN 1049521A

〔12〕发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 89106596.2

[51] Int.Cl[5] C12P 19／30

〔43〕公开日 1991年2月27日

[22]申请日 89.8.17

[71]申请人 中国科学院武汉病毒研究所
地址 湖北省武汉市武昌小洪山
[72]发明人 糜克永 张雁滨 王蔷 夏秀琴 苗立宪 余承鑫

[74]专利代理机构 湖北省专利事务所
代理人 韩建英

C07H 1／06 C07H 19／02

说明书页数: 3 附图页数:

[54]发明名称 利用酒厂废酵母生产5′–核苷酸的方法

[57]摘要

一种利用酒厂废酵母生产5′–单核苷酸的方法。

它是通过增加酵母液中，酵母含量的浓度，延长NaOH与酵母液的作用时间，然后调pH值到4–5来使酵母核糖核酸充分裂解的。在核苷酸的分离过程中，利用一种制剂将核苷酸分成G型和A型5′–核苷酸。该方法相比已有的工艺具有工艺简单、投资少、核酸回收率高、产品溶解性好、纯度高的特点，并可得到中间产品：酵母核糖核酸、脱氧核糖核酸、浓缩蛋白饲料。

（BJ）第1456号

1、一种用酒厂废酵母生产5′—单核苷酸的方法，它分为四个过程：酵母裂解及核糖核酸的释放、核糖核酸酶解为5′—核苷酸混合液、5′—核苷酸混合液的分离、5′—单核苷酸的精制，其特征在于：

⑴、酵母裂解及核糖核酸的释放过程，是将湿酵母按1∶1的体积比加水并加NaOH到酵母液总体积的2%，加温至70—90℃，使NaOH与酵母液的作用时间为72—120小时，再将PH值调到4—5，除去蛋白，将PH值调到2.5，加乙醇漂洗除去色素。

⑵、5′—核苷酸的混合液分离，是将5′—核苷酸的酶解液，静置10—18小时，移出上清液，下层含沉淀的液体，减压抽滤，将两次清液合并，调PH值至3.5，加2倍95%乙醇，使A型5′—核苷酸沉淀，取出A型5′—核苷酸沉淀，将溶液调PH值至10，使G型5′—核苷酸沉淀。

2、根据权利要求1中所述5′—核苷酸的生产方法，其特征在于，⑴中NaOH与酵母液的作用方式，按每间隔20—28小时加热一次，加热四次以上，温度控制在90℃为最佳。

利用酒厂废酵母生产5'一核苷酸的方法

本发明涉及一种核苷酸的生产方法，特别是利用酒厂废酵母生产5'一核苷酸的方法

目前核苷酸的生产方法，主要采用发酵法、酶解法、双酶法及化学合成法，来分别得到5'一核苷酸类物质。然而应用化学合成法生产5'一核苷酸，由于采用有毒性的化学合成原料，工艺要求高，对环境污染严重，因此，该方法已逐渐被淘汰，应用发酵法建厂投资大，生产产品单一，成本高；与本发明提出方法相类似的酶解法，一般是采用稀碱法或浓盐法，使核糖核酸从酵母中释放出来，即取湿酵母加水1：50，然后按湿酵母重量的20%，加入NaOH或Na_2CO_3，裂解作用最多不超过2小时，加入盐酸调PH值至7，然后加热到90℃，维持10分钟，使蛋白变性沉淀，作用完毕，将液体中加入大量冰块，使温度降温至10℃，以防核糖核酸降解，弃去沉淀后，取出上清液，所获清液加HCl调PH值到2.5，使核糖核酸沉淀而回收。第二步将回收的核糖核酸，通过桔青雷菌发酵产物磷酸二脂酶降解为5'一单核苷酸。第三步，再用阳离子交换树脂及阴离子交换树脂，将其所含四种核苷酸分离，在第一步工艺中，由于湿酵母与NaOH或Na_2CO_3的反应，并不能在2小时内使酵母细胞完全裂解，因此有大量的未被裂解的酵母随渣质被去掉，并且被裂解的酵母细胞，释放的大部分是与蛋白相结合的核酸，核酸仅少部分游离出来，在调PH值为7后，与蛋白相结合的核酸，不能沉淀而随上清液弃去，这样便大大影响了核酸的回收率。在核苷酸分离提取四种核苷酸过程中所采用的阳离子交换树脂及阴离子交换树脂的方法，由于其工艺繁琐，且阳离子交换剂对变性蛋白的吸附力差，因此，不能有效的除去蛋白质，造成核苷酸纯度降低，并再次降低了核酸的回收率，使核酸的回收率仅达到

0.4—0.5%. 综合上述，原5′—单核苷酸的生产方法，存在生产周期长，回收率低，提取工艺繁琐，产品溶解性差，颜色深，生产成本高等不足，难以普遍使用。

本发明的目的在于，提供一种能提高核酸回收率，提高产品纯度，简化生产工艺的5′—核苷酸的生产方法。

本发明的目的是这样实现的：为减少酵母裂解设备及碱(NaOH)或盐(Na_2CO_3)的用量，大幅度提高裂解液中酵母含量，将含量由旧工艺的2%提高到50%，并相应加热到70—90°C，以促进裂解。为了使酵母裂解，核糖核酸释放完全，延长NaOH与酵母的作用时间，使之从2小时提高到72小时—120小时，建立二步裂解的概念，第一步使酵母细胞壁破裂，释放出核酸蛋白结合体，第二步再进一步使核酸蛋白结合体中核酸与蛋白分离。为了获得比较纯的酵母核糖核酸，将酵母裂解液的PH值由旧工艺调到7，改调到4—5，通过离心而除去大量的蛋白，在PH值2.5的核酸混合物中，加乙醇漂洗，除去大量色素及醇溶性蛋白，这样提高了下一步的酶解率。为了改进并简化提取工艺，采用调等电点或酸碱度法，将四种核苷酸分成两大类，即利用腺嘌呤核苷酸易在PH3.5条件下，被乙醇沉淀的特点，而将其分为A型5′—核苷酸与G型5′—核苷酸，它们分别以含腺嘌呤核苷酸和鸟便腺嘌核苷酸为主。为避免活性炭在产品脱色蛋白过程中，吸附核苷酸而影响收得率，采用钨酸钠加硫酸和皂土进行精制处理。

本发明与现有工艺相比，它利用酒厂的废料作主要原料，变废为利，同时减少了对环境的污染，其投资少，收效快。采用该方法，提高了酵母核糖核酸的回收率和纯度，以湿酵母计，收得率可达1%以上，产品纯度达70%以上。采用该方法其工艺设计合理，并比老工艺大大简化，不仅减少了每步对核糖核酸的损失率，使5′—核苷酸的回收率达核糖核酸总量的50%，而且还可得到一些中间产品，如：酵母核糖核酸、脱氧核糖核酸、浓缩蛋白饲料，其两型5′—核苷酸产品呈白色，溶解性好。采用该方法，还可通过调酸

碱度，很方便的分离出C型和U型5′—核苷酸，使产品成本大为降低。

本发明的具体实施步骤如下：

将湿酵母按1∶1的体积比加入水混合，并加NaOH到酵母液总体积的2%，将湿酵母每间隔20—28小时加热一次，温度保持在90°C，并连续搅拌，直至酵母细胞破裂达90%，酵母核糖核酸单位体积含量达最大时终止。然后将酵母裂解液调PH值到4—5之间，使绝大部分蛋白沉淀，通过离心和减压抽滤，除去蛋白，再将溶液调PH至2.5，加2倍乙醇，使酵母核糖核酸沉淀，再通过离心取出。将沉淀的酵母核糖核酸配成2%的溶液，并用氨水调PH为5.6—5.8，预热至70°C，同时把经粗提纯的桔青霉菌发酵液(含磷酸二脂酶)，加温到45°C—50°C，并以1/3倍核糖核酸溶液的体积加入核糖核酸溶液中，使其在63—65°C条件下，保温反应2—4小时，酶解液中即含有四种5′—核苷酸混合液。将5′—核苷酸的酶解液，静置10—18小时后，移出上层清液，下层含沉淀的液体，减压抽滤，两次清液合并后，调PH至3.5，加2倍95%乙醇，使A型5′—核苷酸沉淀，取出A型5′—核苷酸沉淀后，将溶液调PH值至10，使G型5′—核苷酸沉淀。将A型与G型5′—核苷酸分别加入少量水溶解，并调PH至7，按体积1/10量加入20%钨酸钠，再虽入1当量硫酸使其出现乳白色沉淀，使蛋白沉淀而除去，或调PH至7后，加入三氯醋酸到PH值为3—4，使蛋白沉淀而除去。两型的含核苷酸清液分别加入皂土，抽滤后，进一步脱去热源和色素。将G型5′—核苷酸以及A型5′—核苷酸液调PH至3.5，分别加入2—3倍的90%—95%的乙醇，使之沉淀，将沉淀反复用乙醇漂洗至测定合乎标准为止，然后冻干或50°C—60°C的条件下，减压烘干。