

提高肌苷提取收率的试验

苏州味精厂

文献报道：肌苷产生菌枯草杆菌变异株以葡萄糖为主要碳源的发酵液（含肌苷 2.36%，肌苷与非肌苷固形物比为 0.4:1），可采用调 pH11，进行减压浓缩，然后再将 pH 调至 11，在 7℃ 放置 11 小时，即可析出肌苷钠盐结晶，此方法的小样提取收率可达 75%。现在我们使用肌苷产生菌枯草杆菌 7171-9-1 进行发酵时，在发酵液中除了含 0.5% 左右的肌苷外，还有 0.1% 左右的次黄嘌呤，在目前这种产肌苷水平较低的情况下，肌苷提取采用的方法：一种是先上 732 阳离子交换树脂柱（简称 732 柱），吸附肌苷和次黄嘌呤，用 pH3 的水将肌苷从 732 柱上洗脱下来，在此同时串联 769 号活性炭柱（简称炭柱）吸附浓缩；另一种方法是先上炭柱吸附，然后从炭柱上将肌苷和次黄嘌呤一起洗脱下来，再上 732 柱分离。上述两种方法的收率一般在 40—50%，现在国内基本上都采用第一种方法。为提高肌苷的提取收率，我们着重研究了第一种方法的各步工

艺中影响肌苷提取收率和成品质量的一些因素，现将结果报告如下。

材料和方法

一、材料和设备

（一）材料

1. 肌苷发酵液：肌苷产生菌枯草杆菌 7171-9-1 在含淀粉水解糖 10%、纸浆酵母 1.7%、硫酸铵 0.8%、磷酸氢二钠 0.5%、氯化钾 0.2%、硫酸镁 0.1%、尿素 0.3% 的发酵培养基中，发酵 60—70 小时。发酵終了，发酵液含残糖 2% 左右，肌苷含量 0.4—0.6%，次黄嘌呤含量 0.05—0.15%。

2. 树脂和活性炭：732 阳离子交换树脂，规格 16—50 目，无锡树脂厂产。769 号活性炭，又名辅酶 A 用活

性炭,规格 80 目,上海活性炭厂产。

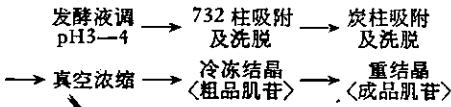
(二) 设备

1. 小型试验: 732 柱和炭柱均用上半部直径为 35 毫米、下半部直径为 14 毫米的玻璃柱。732 柱装 732 阳离子交换树脂 8 克,炭柱装 769 号活性炭 1.2 克。

2. 中型试验: 732 柱为 $\phi 500 \times 1,500$ 毫米,两只柱串联,共装 732 阳离子交换树脂 400 公斤,炭柱径高比与 732 柱相同,装 769 号活性炭 30 公斤。

3. 生产试验: 732 柱为 $\phi 1,300 \times 3,000$ 毫米,两只柱串联,共装 732 阳离子交换树脂 4 吨。炭柱为 $\phi 800 \times 3,000$ 毫米,两只柱串联,共装 769 号活性炭 500—600 公斤。

二、工艺流程



试验结果

一、上柱及洗脱流速对肌苷洗脱收率的影响

取两根玻璃小柱,各装 8 克 732 阳离子交换树脂,分别上发酵液 20 毫升,一组以 1 毫升/分的流速上柱及洗脱,另一组以 3.5—4 毫升/分流速上柱及洗脱,其结果见表 1。

表 1 上柱及洗脱流速对肌苷洗脱收率的影响

流速	肌苷含量 试验次数	发酵液 (毫克)	洗脱液 (毫克)	洗脱收率 (%)
1 毫升/分	一	113	108	95.6
	二	113	93	90.8
3.5—4 毫升/分	一	113	85	75.2
	二	113	81	72.0

从表 1 可看出,上柱及洗脱流速慢的 732 柱的肌苷洗脱收率较高。

两万升罐的肌苷发酵液在提取时,也作了上柱及洗脱流速的试验,原来上柱流速 20 升/分,洗脱流速 60 升/分,现改为上柱流速 15 升/分,洗脱流速 40 升/分,其结果见表 2。

从表 2 可看出,上柱及洗脱流速慢的 732 柱的肌苷洗脱收率较高。

在上柱及洗脱流速减慢后,肌苷在发酵液酸化和存放过程中,以及上柱后肌苷在 732 柱内 pH0.5—1 较长时间下是否会破坏,我们做了一些试验:将肌苷发酵液调 pH3—4 后,放置一天,再上小柱并进行肌苷含量测定,其结果与当天测定的无明显差别。另外,将肌

表 2 上柱及洗脱流速对肌苷洗脱收率的影响

流速	肌苷含量 试验批号	发酵液 (公斤)	洗脱液 (公斤)	洗脱收率 (%)
上柱 20 升/分 洗脱 60 升/分	76-8	58.5	32.5	55.6
	76-46	53.1	34.2	64.4
上柱 15 升/分 洗脱 40 升/分	77-13	59.4	54.1	91.1
	77-15	58.5	56.2	96.1

苷发酵液同时上三个小柱,在当天和隔两天分别进行洗脱液的肌苷含量测定,其结果也没有明显差别。

另外,732 柱的径高比,同 732 柱上柱、洗脱流速及洗脱收率有一定的相应关系。我们曾取四个玻璃小柱,其中三个玻璃小柱各装 8 克 732 阳离子交换树脂,并且将其串联(径高比为 1:15),另一个玻璃小柱,装 24 克 732 阳离子交换树脂于玻璃小柱上端(径高比为 1:2),然后分别各上 60 毫升发酵液,上柱及洗脱流速两组完全相同,均是 7—8 毫升/分,其结果见表 3。

表 3 树脂柱径高比对肌苷洗脱收率的影响

径高比	肌苷含量 试验次数	发酵液 (毫克)	洗脱液 (毫克)	洗脱收率 (%)
1:15	一	326.7	315.9	96.7
	二	326.7	311.0	95.2
1:2	一	326.7	248.0	75.9
	二	326.7	252.9	77.4

从表 3 可看出,在上柱及洗脱流速相同的情况下,732 柱径高比大的洗脱收率高,因此在保证 732 柱洗脱收率高的前提下,可采用增大 732 柱之径高比的方法,适当地加快上柱及洗脱流速,以便缩短生产周期。

二、炭柱洗脱剂对肌苷洗脱收率的影响

在 2,000 升罐肌苷发酵液的提取过程中,曾用热碱水洗脱炭柱,效果较差,后用玻璃小柱做了酒精烧碱水洗脱炭柱的试验,结果炭柱的洗脱收率明显提高。因此又做了中试比较,将原来热碱水(1N 氢氧化钠)45 升,改用酒精烧碱水(1N 氢氧化钠,50% 酒精)40 升,

表 4 炭柱洗脱剂对肌苷洗脱收率的影响

洗脱剂	肌苷含量 试验批号	上柱 (公斤)	洗脱液 (公斤)	洗脱收率 (%)
热碱水	72-10-1	1.07	0.66	61.5
	72-10-2	0.98	0.46	47.0
酒精烧碱水	72-11-1	3.10	2.98	96.1
	72-11-4	2.80	2.58	92.1

其洗脱结果见表4。

从表4可看出,用酒精烧碱水洗脱炭柱,肌苷洗脱收率是较高的,两万升罐的肌苷提取,就选用了酒精烧碱水作为炭柱的洗脱剂。

三、浓缩条件对肌苷收率的影响

取母液两杯,调pH7.0和10.0,分别测量其体积和以紫外分光光度计测定肌苷在波长为260毫微米以下的光密度(O.D.260),接着加热煮沸浓缩30分钟,然后加水至原来体积,并再次测定O.D.260读数,同加热煮沸前相比较,其结果见表5。

表5 pH值对肌苷收率的影响

pH	肌苷含量 试验次数	浓缩前	浓缩后	浓缩收率
		(O.D. 260)	(O.D. 260)	(%)
7.0	1	0.175	0.156	89.1
	2	0.180	0.160	88.9
10.0	1	0.164	0.152	92.7
	2	0.185	0.172	93.0

从表5可看出,在碱性条件下浓缩,肌苷破坏较少。

2,000升罐肌苷发酵液提取过程中,由于设备条件所限,浓缩时真空度只能控制在450—500毫米汞柱,温度约在80℃左右,在这种条件下,经过10多个小时的浓缩,即使在碱性条件下,肌苷也有较多的破坏。其结果见表6。

表6 80℃浓缩对肌苷收率的影响

肌苷含量		浓缩前	浓缩后	浓缩收率
温度	试验批号	(公斤)	(公斤)	(%)
80℃	72-10-2	0.455	0.323	71.0
	72-11-1	2.98	2.43	81.5

从表6可看出,这里肌苷浓缩破坏率在20%左右。因此考虑在80℃浓缩时间过长,对肌苷收率是不利的。

两万升罐肌苷发酵液的提取,改进了浓缩设备条件,浓缩的真空度达到700毫米汞柱左右,温度在40—50℃,在这种温度条件下浓缩,肌苷基本上不被破坏。

四、提高成品质量的几个因素

发酵液上732柱后,先要洗去柱内的菌体、色素等杂质,两万升罐发酵液提取肌苷,原来用6吨pH3的水顺洗,现增加到12吨,这样大量地减少了炭柱内的菌体、色素等杂质,不仅有利于炭柱的吸附和洗脱,而且有益于肌苷的浓缩和结晶。一般讲,炭柱内杂质减

少后,炭柱洗脱液的杂质也减少,浓缩后肌苷结晶就好,对于配制炭柱洗脱剂酒精烧碱水的溶液,要适当地控制铁质,以防大量铁离子带到肌苷成品中去。

控制肌苷浓缩前后的pH也很重要,浓缩前调pH为10,浓缩后调pH为11,在这样的pH条件下,肌苷变为肌苷钠盐析出结晶,次黄嘌呤仍溶于母液中。

肌苷粗结晶和肌苷重结晶用冰冻无离子水洗涤,可大量弃去粗品中的色素和重结晶的盐分等杂质,降低了成品残渣含量,从而提高了肌苷成品的质量。

五、两万升罐肌苷发酵液提取实例

发酵液12吨,调pH3—4,以13—15升/分流速上柱,用pH3的自来水,以40升/分流速洗脱,最先一倍体积的洗脱液,因有大量菌体和色素等杂质,而含肌苷很少,所以弃去。从第二倍体积的洗脱液开始串联于炭柱,进行吸附,约需洗脱12倍体积即可结束,用酒精烧碱水(0.8N—1N氢氧化钠,50%酒精)1,500升,将炭柱浸泡2—3次(每次一小时),然后以10升/分流速洗脱,共收集2,800升,接着真空浓缩(温度40—50℃),放冷库结晶得粗品,再重结晶得成品,根据上述试验结果,进行两万升罐肌苷发酵液的提取,732柱、炭柱和浓缩的各步收率都可达到90—97%,肌苷重结晶的收率为86—92%,因而肌苷提取的总收率由原来40—50%提高到60—70%,部分收率高的可达80%左右,现将两万升罐的肌苷提取实例列于表7。

表7 两万升罐肌苷提取实例

肌苷含量 试验批号	发酵液 (公斤)	732柱 洗脱液 (公斤)	炭柱 洗脱液 (公斤)	肌苷 成品 (公斤)	总收率 (%)	成品 质量
77-11	47.25	43.39	39.60	35.89	75.9	合格
77-14	56.07	52.20	43.13	37.75	67.3	合格
77-20	53.55	50.97	47.07	43.23	80.7	合格

从表7可看出,由于提取工艺的各步收率都有了提高,所以提取的总收率也有明显的提高。但是各步收率尚有些波动,732柱洗脱收率受到732阳离子交换树脂的再生好坏,732柱上柱和洗脱流速的控制是否正确所影响,炭柱洗脱收率也受到769号活性炭的再生好坏所影响,炭柱有时不能完全将肌苷吸附,造成流失现象,因而影响了炭柱的洗脱收率。

讨 论

我们对两万升罐的肌苷发酵液进行提取时,用两只732柱装732阳离子交换树脂4吨,装柱后树脂柱的径高比为1:3,在这种径高比条件下,上柱及洗脱流速对732柱洗脱收率影响很大,通过试验摸索,正确地控制了上柱及洗脱流速,从而提高了732柱洗脱收率。

另外,上柱及洗脱流速同732柱径高比也有一定的相应关系,如能增大732柱的径高比,可以适当加快流速,达到收率既高、生产周期又短的目的。

用酒精烧碱水作为炭柱洗脱剂,提高了炭柱的洗脱收率,工业酒精在肌苷浓缩时可以回收,酒精烧碱水同热碱水比较,可以减少对769号活性炭的破坏,从而

延长了769号活性炭的使用寿命。

发酵液上柱后,一定要充分洗去732柱内菌体、色素等杂质,从732柱上洗脱肌苷的过程中,还要严格控制柱内残留菌体使之松动。这样有利于浓缩后的肌苷结晶。肌苷粗品和重结晶,都要用冰冻无离子水洗涤,以利减少成品的残渣含量。提高肌苷成品的质量。