

根抽提液先经热处理再与 RNA 混合是必要的。热处理可以达到保留 5'-磷酸双酯酶并抑制其它“旁路”酶活力的目的。热处理的时间取决于温度高低。在适宜的温度范围内,温度高时热处理时间可相应缩短,反之则应延长。小试证明,麦根抽提液在 65℃ 热处理 15 分钟或 70℃ 热处理 7.5 分钟均较理想。大规模生产时,由于容量大、升温慢,热处理的最适条件要根据具体情况调整,既要防止加热破坏 5'-磷酸双酯酶,又要达到抑制其它酶的目的。

用麦根法降解 RNA 制取 5'-核苷酸,关键的问题是提高转化率。转化率低时,不仅得率低,而且使降解液中杂质增加,给后步的分离、纯化造成困难。遇此情况,可通过调节降解液

的 pH、低温存放或减压浓缩等方法除去部分杂质,可以相对改善上柱分离效果。

在小试基础上做过数次投料量为 2 公斤的 RNA 的生产性试验,证明按照上述工艺条件,麦根法与固体桔青霉法降解 RNA 生产 5'-AMP 的净得率相当。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所编:《核苷酸类物质的生产和应用》,科学出版社,1971 年。
- [2] 永野重树:核糖の分离,定量 1,化学と生物,3,148,1965。
- [3] Schmid, G.: Methods in Enzymology, 12, B, 230, 1968。
- [4] 中桐義隆等:发酵工學雜誌,46 (8),605,610,616,1968。

[本文于 1979 年 10 月 29 日收到]

用固定化 5'-磷酸二酯酶工业生产 5'-核苷酸*

袁中一 刘树煌 汪静英 马凤竹 陈远河** 钱习明

(中国科学院上海生物化学研究所)

自从固定化氨基酸化酶在日本获得工业应用以来,已引起各国广泛注意,至今已有近 10 个固定化酶在一些先进国家投入工业使用^[1-3]。我们自 1970 年开展固定化酶研究以来,已将我国染料工业中容易得到的“591 脂化物”——对- β -硫酸酯乙苯基苯胺 [p-(β -sulfate-ethylsulfonyl)-aniline, 简称 SESA] 作为双功能试剂,引入固定化酶领域。纤维素结合酶的反应方式见图 1。用这一手段制备的一些固定化的酶无论从活力回收或相对活力方面都较为满意^[4,5]。1972 年我们制得了葡聚糖凝胶共价结合的 3'-核糖核酸酶并小规模地用于工厂生产 3'-核苷酸^[6]。

目前国内外用于助鲜剂或药物的 5'-核苷酸^[7],大多应用桔青霉 (Penicillium citrinum) 产生的 5'-磷酸二酯酶水解核糖核酸生产。我们和上海啤酒厂、江门甘蔗化工厂协作,从 1975 年起试用固定化酶新工艺代替原有的用发酵液

降解核糖核酸的工艺,进行 5'-磷酸二酯酶的固定化方法及应用研究。首先,将桔青霉的发酵液经酒精沉淀制得 5'-磷酸二酯酶酶粉,然后通过偶联反应共价结合于重氮化的 ABSE-纤维素上。在 1976 年采用分批法进行了固定化酶每批降解 3.3 公斤纯核酸的扩大试验,结果提高了原发酵液利用率 20 倍,并表明使用固定化酶有优越性^[7]。从实际应用的要求出发,我们一方面解决了不经酒精沉淀的发酵液直接共价连接到载体上的问题,另一方面又简化了制备 ABSE-纤维素的工艺,从而使得固定化酶的制备过程,在经济和工艺二方面都适合工厂生产要求。随后于 1977 年底在江门甘蔗化工厂完成了生产试验。

桔青霉在 1000 升发酵罐内通风培养。当

* 本工作承广东江门甘蔗化工厂刘同昌、卢耀光及酿造车间核苷酸工段全体同志的密切配合,特此致谢。

** 上海啤酒厂。

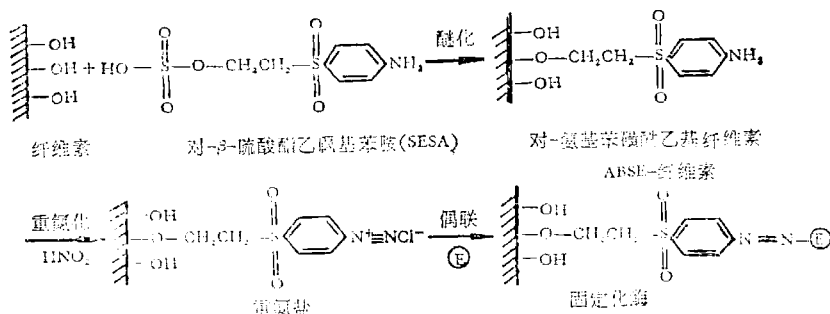


图 1 酶固定化于纤维素上的反应过程

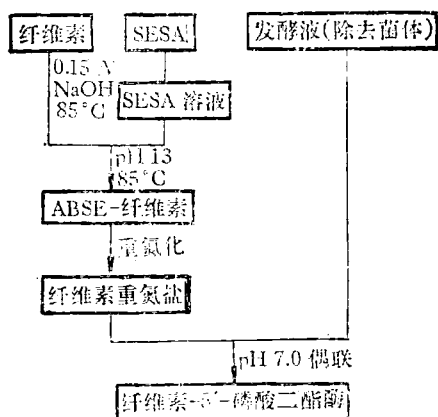


图 2 固定化酶制备过程

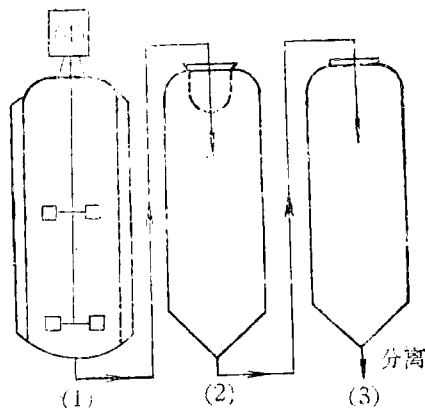


图 3 固定化酶降解核酸的装置

(1) 降解罐(容量 2,000 升), 搅拌 40—50 转/分, 夹套内可通蒸汽和冷水。(2) 核苷酸贮罐(容量 2,000 升)。(3) 沉淀罐(容量 2,000 升); (4) 搅拌马达

酶活力达 500 单位/毫升以上时, 停止发酵, 滤去菌体的发酵液即可直接用于偶联反应。这一改进省去了制备酶粉的步骤, 降低了成本。

固定化酶制备过程如图 2 所示。在 1000 升有夹套的搅拌罐中 221 公斤湿的蔗渣-芒杆

纸浆(合 30 公斤干重, 扣解度约 30—35 度)经稀碱活化处理后, 与 30 公斤 SESAs 的水溶液混和, 在 pH11.3 的条件下, 85°C 进行醚化反应 30 分钟, 用稀碱和无离子水洗涤后得 157 公斤湿的 ABSE-纤维素(相当于 27 公斤干重)。ABSE-纤维素经 HCl 及 NaNO_2 重氮化生成重氮盐, 洗去大部分游离试剂后, 立即投入酶液中(一般按每克干重 ABSE-纤维素与 15 毫升发酵液的比例混合)在 pH 7 间歇搅拌并放置二小时。固定化 5'-磷酸二酯酶经无离子水洗涤后, 可直接用于降解核糖核酸或湿态在 4°C 保藏。固定化 5'-磷酸二酯酶活力为 2000—2500 单位/克干重 ABSE-纤维素。此步活力回收为 20—30%。

固定化酶降解酵母核糖核酸采用了罐式搅拌反应器分批进行。装置如图 3。固定化 5'-磷酸二酯酶降解核糖核酸的工艺条件总结在表 1。

表 1 固定化酶工艺参数

有效容积	2,000 升
核酸浓度(百分比)	0.5%
固定化酶用量	2 单位/毫升
硫酸锌	5×10^{-4} 克分子浓度
pH	5.0—5.1
温度	65°C

降解罐中 5'-核苷酸生成的典型时间曲线如图 4。当 5'-核苷酸含量不再增高, 即降解率达 70% 以上时(10 小时左右)停止搅拌, 降解液用泵输入核苷酸贮罐。贮罐口装有尼龙网袋回收固定化酶。次日, 将固定化酶投入新的一批核糖核酸溶液中进行降解。降解所得的核苷酸溶液按该厂原工艺经离子交换树脂分离精制。取

得 AMP、GMP 和 CMP。

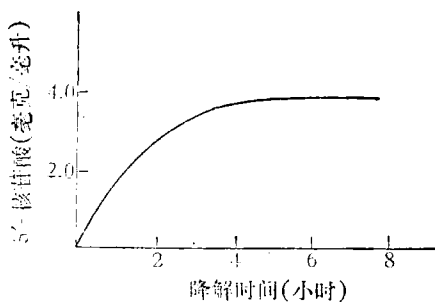


图 4 固定化 5-磷酸二酯酶降解核酸的时间曲线

在整个试验中，来自 145 升发酵液制得的

76.3 公斤湿重固定化酶反复降解 23 批核酸溶液，每批降解时间在 10 小时左右，平均降解率 70.24%，共处理了 203.7 公斤纯核酸，得 AMP、GMP、CMP 的总量为 86.14 公斤，总回收率达 42.27%，核苷酸产品质量符合要求。固定化酶新工艺所得的产品与该厂原工艺的比较如表 2。

按原工艺 145 升发酵液只能降解 1450 升 0.5% 核糖核酸，而这些发酵液经固定化后实际降解核酸为 46,000 升，故发酵液利用率至少提高 30 倍。按此，每天降解 10 公斤核酸的工厂全年只需发酵液 2500 升。

表 2 固定化酶工艺与原工艺降解效果比较

采用工艺	日期	批数	降解 RNA 总量	平均降解率	AMP/RNA	GMP/RNA	CMP/RNA
原工艺	1977 年 9 月	28 批	284.8 公斤	69.26%	11.96%	19.01%	9.41%
原工艺	1977 年 11 月	21 批	185 公斤	70.3 %	13.92%	19.67%	9.71%
固定化酶工艺	1977 年 12 月	23 批	203 公斤	70.2 %	13.98%	18.82%	9.47%

固定化 5-磷酸二酯酶在 4℃ 可保藏一年，活力没有可察觉的改变。故固定化酶可在适当季节短期制备供全年使用，避免了夏季发酵罐易染菌而影响生产的缺点。

固定化酶制备的方法简单，取材容易，从经济上讲是可取的。由于酶在整个产品成本中所占比重不大，故其优越性主要表现在有利于生产调节及产品的产量和质量稳定，以及可以节省一定的劳动力。

1978 年 5 月在全国固定化酶研究及应用学术交流会上通过了此工艺的技术鉴定。目前固定化酶反应器还需进一步改进。

参 考 文 献

[1] 袁中一：《生物科学动态》，1979 年，4 期，1 页。
[2] Mosbach, K.: "Methods in Enzymology vol. 44 Immobilized Enzymes", Academic Press, Inc., New York.
[3] Chang, T. M. S.: "Biomedical Application of Immobilized Enzymes and Proteins", Plenum Press, New York and London, 1977.
[4] 上海生物化学研究所固相酶组：《生物化学与生物物理进展》，1974 年，1 期，57 页。
[5] ———：《生物化学与生物物理学报》，1977 年，9 卷，187 页。
[6] Ogata, K: "The microbial production of nucleic acid-related compounds, Advances in Applied Microbiology", (Perlman, D. ed.), p. 209, 1975.
[7] 上海生物化学研究所固相酶组：《生物化学与生物物理进展》，1977 年，6 期，17 页。

[本文于 1979 年 6 月 26 日收到]

肝素的简易化学测定法

季钟煜 蒋传葵

(中国科学院上海生物化学研究所)

1962 年 Bitter 曾报道^[1]，糖醛酸(uronic acid)的硼砂硫酸液与咪唑(carbazol)所产生的显色

反应，其效果迅速而稳定，从而改进了著名的 Dische 反应条件，可作为糖醛酸的定量分析法。