
Octrooiraad



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8000022**

Nederland

⑲ NL

⑤4 **Werkwijze voor het bereiden van gistextract.**

⑤1 Int.Cl³: C12N1/16// A23L1/221.

⑦1 Aanvrager: Ajinomoto Co., Inc. te Tokio.

⑦4 Gem.: Ir. C.M.R. Davidson c.s.
Octroobureau Vriesendorp & Gaade
Dr. Kuiperstraat 6
2514 BB 's-Gravenhage.

②1 Aanvraag Nr. 8000022.

②2 Ingediend 3 januari 1980.

③2 Voorrang vanaf 5 januari 1979.

③3 Land van voorrang: Japan (JP).

③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 798/79 .

②3 - -

⑥1 - -

⑥2 - -

④3 Ter inzage gelegd 8 juli 1980.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Werkwijze voor het bereiden van een gistextract.

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het bereiden van een gistextract met een uitstekende hoge kwaliteit en een verbeterd aroma. Meer in het bijzonder heeft deze betrekking op een werkwijze voor het bereiden van een gistextract, gekenmerkt door een verbeterde dikte of volheid van smaak, waarbij men gesuspendeerde gistcellen door autolyse ontleedt onder omstandigheden, waarbij ontleding van intracellulair RNA zoveel mogelijk wordt onderdrukt, het RNA uit de geautolyseerde gistcellen extraheert door de autolysaat-suspensie te verwarmen en het ge-
5 extraheerde RNA met enzyme hydrolyseert tot 5'-nucleotiden.
10

Terwijl de toevoer van rundvleesextract of walvisextract beperkt is, kan gistextract gemakkelijk worden bereid uit bakkersgist en biergist en wel in grote hoeveelheden tegen lage prijs en het wordt op grote schaal toegepast als bestanddeel van verschillen-
15 de sausen en dergelijke.

Volgens de gebruikelijke werkwijze kunnen gistextracten worden bereid door autolyse of door hydrolyse met enzymen, zuur of alkali. Van deze werkwijzen verdient de autolyse in het bijzonder de voorkeur, daar de kwaliteit van het verkregen gistextract uitstekend is.
20

Het is bekend dat de kwaliteit van het gistextract, in het bijzonder de dikte of volheid van smaak, kan worden verbeterd door toevoeging van dinatriumguanosine-5'-monofosfaat (GMP) of dinatriuminosine-5'-monofosfaat (IMP), dat bekend is als aromatiserend bestanddeel van een "shiitake" champignon of van gedroogde springende vis (skipjack).
25

Het is bekend dat een belangrijke hoeveelheid RNA in gistcellen aanwezig is. Helaas kan een gistextract, dat een belang-

rijke hoeveelheid aromatiserende 5'-nucleotiden, zoals GMP, bevat niet worden verkregen daar het intracellulaire RNA van gistcellen gewoonlijk wordt ontleed in niet-aromatiserende laagmoleculaire stoffen, zoals nucleosiden of basen, tijdens de autolyse. De hoeveelheid GMP, vooropgesteld dat dit tijdens de autolyse wordt gevormd, is te gering om de kwaliteit van een gistextract te verbeteren. In feite kan geen aromatiserend 5'-nucleotide in de in de handel zijnde gistextracten worden aangetoond.

Volgens een gebruikelijke werkwijze wordt een gistextract, dat aromatiserende 5'-nucleotiden bevat, bereid door een intracellulair RNA uit gistcellen te extraheren door verhitting van een suspensie van gistcellen, die 5 - 15% NaCl bevatten, het geëxtraheerde RNA met 5'-fosfodiesterase te hydrolyseren tot 5'-nucleotiden, die GMP bevatten en de verkregen aromatiserende 5'-nucleotiden te voegen bij een met zuur of enzyme gehydrolyseerde oplossing van rest-gistcellen, waaruit vooraf RNA is geëxtraheerd.

Deze bekende werkwijze is echter niet economisch, daar een duur enzyme moet worden gebruikt en een enzyme, dat inherent in de gistcellen zelf aanwezig is en dat in staat is de gistcellen te autolysen of hydrolyseren, in het geheel niet wordt gebruikt. Bovendien is de kwaliteit van het gistextract niet goed, daar het niet door autolyse wordt bereid.

Een andere bekende werkwijze ter bereiding van een gistextract, dat aromatiserend 5'-nucleotide bevat maakt gebruik van speciale enzymen, afgeleid van een micro-organisme, behorende tot een bestraald fungus ter bereiding van aromatiserende 5'-nucleotiden bij de autolyse.

Deze werkwijze kan echter in de praktijk niet worden uitgevoerd daar de veiligheid van het enzyme en van de voor de bereiding van het enzyme gebruikte micro-organismen niet wettelijk zijn aanvaard.

De uitvinding beoogt derhalve in de eerste plaats een nieuwe economische werkwijze te verschaffen voor het bereiden van een gistextract, dat aromatiserend 5'-nucleotide bevat en een verbeterde dikte of volheid van smaak bezit.

Gevonden werd dat 50 - 80% van een intracellulair RNA

achterblijft in geautolyseerde gistcellen in niet ontlede toestand terwijl het grootste deel van het proteïne in gistcellen vrijwel wordt gehydrolyseerd tot de samenstellende aminozuren en oligopeptiden als een autolyse van gistcellen wordt uitgevoerd bij
 5 een constante pH tussen 6,0 en 6,6 of nog liever tussen 6,2 en 6,4, dat het achterblijvende intracellulaire RNA gemakkelijk uit de geautolyseerde gistcellen kan worden geëxtraheerd door uitsluitend het autolysaat te verhitten zonder NaCl te gebruiken en dat een
 10 gistextract, dat aromatiserend 5'-nucleotide bevat en dat een bepaalde dikte of volheid van smaak bezit, kan worden bereid door het geëxtraheerde RNA te hydrolyseren met 5'-fosfodiesterase of 5'-fosfodiesterase en een AMP-deaminase, waarbij een aromatiserend 5'-nucleotide wordt gevormd, zoals GMP of IMP.

De werkwijze volgens de uitvinding omvat de volgende
 15 stappen:

- (1) Autolysen van de gistcellen bij aanwezigheid van een autolyse-stimulator bij een constante pH tussen 6,0 en 6,6, bij voorkeur tussen 6,2 en 6,4 en bij een temperatuur van 30 - 60°C gedurende 10 - 30 uur,
- 20 (2) verhitten van de geautolyseerde suspensie van gistcellen bij een temperatuur van 90 - 100°C gedurende 1,0 tot 3,0 uur, voor het extraheren van een overgebleven RNA en de daarna de volgende trappen uit te voeren in een willekeurige volgorde,
- (3) hydrolyseren van het geëxtraheerde RNA met 5'
 25 fosfodiesterase, waarbij AMP in IMP wordt omgezet, desgewenst bij aanwezigheid van AMP-deaminase en
- (4) scheiden van het verkregen heldere extract van het onoplosbare residu.

Volgens de uitvinding kan iedere variëteit eetbare gist
 30 worden toegepast. Hiertoe behoren bakkersgist, zoals *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1172, CBS 1234, biergist, zoals *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171, CBS 1230 en *Saccharomyces uvarum* CBS 1503 en *Saccharomyces carlsbergensis* IFO 2015, sake-gist, zoals *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2165, IFO 2342, wijngist, zoals
 35 *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4274 en *Pichia farinosa* CBS 2004, CBS 2006.

De in deze beschrijving door de toegangs-nummers ge-
 identificeerde giststammen, voorafgegaan door CBS, zijn vrij ver-
 krijgbaar bij het Centraalbureau voor Schimmelkultures, Baarn,
 Nederland. Die, welke zijn geïdentificeerd door toegangs-nummers,
 5 voorafgegaan door IFO, zijn verkrijgbaar bij het Institute for
 Fermentation, Osaka, Japan.

Voor het gebruik bij de onderhavige uitvinding worden
 gistcellen op geheel gebruikelijke wijze bereid met een cultuur-
 medium, dat een koolstofbron bevat, zoals glucose, saccharose,
 10 zetmeelhydrolysaat, melasse, organische zuren of alcohol.

Gistcellen, verkregen als residu bij het brouwen van
 bier, sake en bij de bereiding van wijn, zijn bijzonder bruikbaar
 bij de onderhavige uitvinding, en deze kunnen worden gebruikt voor
 autolyse zonder werkelijke isolering van de gistcellen.

15 Van deze gistcellen, zijn verse gistcellen, verkregen
 door het kweken van bakkers- of biergist, in het bijzonder
Saccharomyces cerevisiae CBS 1171 of CBS 1172, onder aerobe
 omstandigheden in een gebruikelijk voedings-kweekmedium, de voor-
 keur, daar gist verkregen uit verse gistcellen een minder onaange-
 20 name geur of smaak heeft dan andere gistcellen.

Voor autolyse bedraagt de hoeveelheid gistcellen in de
 suspensie bij voorkeur 5 tot 20 gew.%, berekend op de droge stof.

De autolyse wordt gewoonlijk uitgevoerd bij aanwezigheid
 van 1 tot 5% van een stimulator voor de autolyse, bijvoorbeeld
 25 ethylacetaat, bij een constante pH tussen 6,0 en 6,6 en bij een
 temperatuur van 30 tot 60°C, meer in het bijzonder bij een pH van
 6,2 tot 6,4 bij 45 tot 55°C en deze wordt gewoonlijk uitgevoerd
 gedurende 10 tot 30 uur.

Bij het voortschrijden van de autolyse daalt de pH van
 30 de suspensie van gistcellen sterk en het is derhalve noodzakelijk
 de pH binnen het gewenste traject in te stellen door alkali aan de
 suspensie toe te voegen.

De werkwijze volgens de uitvinding wordt in de eerste
 plaats gekenmerkt doordat een autolyse van gistcellen doeltreffend
 35 wordt uitgevoerd onder de specifieke omstandigheden, waarbij het
 proteïne van de gistcellen effectief wordt gehydrolyseerd tot de

samenstellende aminozuren en oligopeptiden, terwijl een ontleding of hydrolyse van een intracellulair RNA zoveel mogelijk wordt onderdrukt, dat wil zeggen door de autolyse uit te voeren bij een constante pH tussen 6,0 en 6,6.

5 Als een autolyse van de gistcellen bij een dergelijke constante pH wordt uitgevoerd blijft, hoewel een intracellulair RNA gedeeltelijk wordt gehydrolyseerd tot niet-aromatiserende laag moleculaire bestanddelen, 50 tot 80% van het RNA in niet
10 ontlede toestand in de geautolyseerde gistcellen achter en een ander bestanddeel dan RNA, zoals proteïne, wordt doeltreffend gehydrolyseerd tot de samenstellende aminozuren en oligopeptiden en de opbrengst aan vast materiaal, uitgedrukt als totaal geëxtraheerd vast materiaal/gistcellen varieert in percentage gewoonlijk van 50 tot 65%.

15 Het tweede kenmerk van de uitvinding is gelegen in trao (2) van het extraheren van het achterblijvende RNA uit de geautolyseerde gistcellen door de geautolyseerde gistcellen te verhitten zonder toepassing van NaCl.

Gewoonlijk is het noodzakelijk een betrekkelijk sterk
20 geconcentreerde NaCl oplossing te gebruiken om RNA doeltreffend uit de gistcellen te extraheren, daar RNA niet zonder NaCl kan worden geëxtraheerd.

In vergelijking met een bekende werkwijze, kan het intracellulaire RNA in de geautolyseerde gistcellen gemakkelijk
25 worden geëxtraheerd door de geautolyseerde suspensie alleen maar te verhitten op een temperatuur van 90 tot 100°C gedurende 1 tot 3 uur en zonder daarbij NaCl te gebruiken.

Zowel de opbrengst aan vast materiaal als de hoeveelheid geëxtraheerd RNA, dat wil zeggen een hoeveelheid aromatiserend
30 5-nucleotide in het verkregen gistextract, worden sterk beïnvloed door de pH, waarbij de autolyse wordt uitgevoerd. Zoals uit tabel A blijkt is, indien de autolyse wordt uitgevoerd bij een pH beneden 6,0 (5,5 tot 5,8), hoewel de opbrengst aan vast materiaal meer dan 60% bedraagt en deze waarde betrekkelijk hoog is, de GMP-vormende
35 verhouding (5'-GMP/geëxtraheerde gedroogde gist, in procenten) slechts 0 tot 0,17%. Het blijkt dat het intracellulaire RNA vrij-

wel ontleed wordt tot niet-aromatiserende bestanddelen, door de RNA-ontledende enzymen, die in de gistcellen aanwezig zijn.

Als de autolyse van gistcellen wordt uitgevoerd bij een pH tussen 6,0 en 6,6 zijn zowel de opbrengst aan vast materiaal als de GMP-vormende verhouding hoog en derhalve wordt de autolyse van gistcellen bij voorkeur uitgevoerd bij een pH tussen 6,0 en 6,6.

Als het verschijnsel nauwkeurig wordt geobserveerd, blijkt dat in dit pH traject de opbrengst aan vast materiaal geleidelijk daalt, maar dat daarentegen de GMP-vormende verhouding hoger wordt als de pH van 6,0 tot 6,6 stijgt. Het GMP gehalte van een gewenst gistextract kan derhalve worden geregeld door het kiezen van de pH, waarbij de autolyse wordt uitgevoerd.

Als de autolyse van gistcellen wordt uitgevoerd bij een pH boven 6,6 is de opbrengst aan vast materiaal te laag om de werkwijze op economische wijze te kunnen uitvoeren.

Na de extractie van RNA kan een onoplosbaar residu, in hoofdzaak bestaande uit celwanden van gist, dat in de verhitte suspensie aanwezig is, op geheel gebruikelijke wijze worden verwijderd, bijvoorbeeld door centrifugeren of filtreren. Het verwijderen van het onoplosbare residu kan hetzij geschieden na trap (2) van de extractie van RNA of trap (3) van de hydrolyse van RNA tot 5'-nucleotide met behulp van 5'-fosfodiesterase. Het derde kenmerk van de werkwijze volgens de uitvinding is gelegen in trap (4), waarbij aromatiserend 5'-nucleotide in de autolysaat-oplossing of -suspensie wordt gevormd door het geëxtraheerde RNA te hydrolyseren tot 5'-nucleotide met 5'-fosfodiesterase en desgewenst door AMP in IMP om te zetten met AMP-deaminase.

De volgens de uitvinding toegepaste 5'-fosfodiesterasen zijn die, welke RNA kunnen hydrolyseren in 5'-nucleotiden, die GMP en AMP bevatten. Zo kan bijvoorbeeld 5'-fosfodiesterase, afgeleid van micro-organismen, behorende tot het geslacht *Aspergillus* of *Penicillium* of van mout- of moutwortelen, worden gebruikt. Hierbij wordt het enzyme, afgeleid van moutwortelen, bij voorkeur toegepast, daar het gemakkelijk verkrijgbaar is uit de beschikbare en goedkope moutwortelen en in staat is RNA doeltreffend te hydrolyseren, terwijl bovendien geen vraag bestaat over de veiligheid van het enzyme.

Voor het gebruik bij de uitvinding worden de beschikbare moutwortelen tot kleine stukken gebroken, in water ondergedompeld om het enzyme te extraheren en het heldere filtraat wordt daarna 5 tot 10 minuten op een temperatuur van 60 tot 65°C verhit voor het inactiveren van een schadelijk enzyme, dat een gevormd 5'-nucleotide ontleeft tot 5'-nucleoside en basen.

Als 5'-fosfodiesterase, afgeleid van moutwortelen, wordt gebruikt, is het noodzakelijk dat bij de autolyse geen fosfaationen als buffermiddel aanwezig zijn, daar de activiteit van het enzyme volledig wordt geïnhibiteerd bij aanwezigheid van $4 \times 10^{-2} \text{M}$ fosfaat-ion.

Het verdient ook de voorkeur geen melkzuur toe te voegen voor de hydrolyse van het RNA, daar melkzuur, dat gewoonlijk wordt gebruikt om de kwaliteit van een gistextract te verbeteren, eveneens de enzym-activiteit inhibiteert.

Voor de hydrolyse van RNA bedraagt de hoeveelheid moutwortelen, nodig voor het hydrolyseren van RNA als enzymbron, 10 tot 30 gew.% met betrekking tot het gewicht van de verhitte autolysaat-oplossing.

De hydrolyse van het RNA wordt gewoonlijk uitgevoerd bij een neutrale pH en een temperatuur van 50 tot 60°C gedurende 2 tot 20 uur. Daarbij wordt het geëxtraheerde RNA gehydrolyseerd tot 5'-nucleotiden, die GMP en AMP bevatten. Het gevormde AMP kan desgewenst met AMP-deaminase worden omgezet in aromatiserend IMP en voor dit doel kan iedere bekende variëteit van het bekende AMP-deaminase worden gebruikt.

Van de bekende AMP-deaminase, wordt het enzyme afgeleid van een fungus, behorende tot een gele "koji" stam, zoals *Aspergillus oryzae* en *Aspergillus sojae*, bij voorkeur gebruikt, daar zowel het enzyme als het fungus, dat het enzyme produceert, veilig zijn voor gebruik in voedingsmiddelen.

Voor gebruik bij de onderhavige uitvinding wordt een AMP-deaminase bereid door op de gebruikelijke wijze deze fungi te kweken in een normaal voedings-kweekmedium.

Bij voorkeur wordt een waterig extract van een vast kweekmedium van de gele koji-schimmel of een ruw enzympreparaat,

verkregen door een geheel gebruikelijke werkwijze, zoals een uitzoutmethode met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of Na_2SO_4 , gebruikt.

Ook een in de handel verkrijgbaar enzympreparaat voor medische toepassing, zoals Takadiastase, wordt bij voorkeur gebruikt
5 als ruw AMP deaminase.

Voor het omzetten van AMP in IMP is een hoeveelheid van een ruw enzyme nodig van 0,05 tot 0,2 gew.%, berekend als ruw proteïne op gistcellen, op droge basis.

Een enzymreactie voor het omzetten van AMP in IMP wordt
10 gewoonlijk uitgevoerd bij een pH in de nabijheid van de optimale pH voor toepassing van het enzyme en bij een temperatuur van 30 tot 55°C gedurende 2 tot 10 uur. De tijd van de enzymbehandeling kan worden verkort door deze behandeling tezamen met die voor het hydrolyseren van RNA tot 5'-nucleotiden uit te voeren. Na de
15 enzymbehandeling wordt het daarbij verkregen mengsel bij voorkeur gedurende 5 tot 10 minuten op een temperatuur van 90 tot 100°C verhit om de enzymactiviteiten te inactiveren. Daarna wordt een helder gistextract, dat aromatiserend 5'-nucleotide bevat, verkregen door afscheiden van onoplosbaar residu.

20 Het verkregen gistextract kan worden gebruikt als oplossing voor verschillende voedingsmiddelen of dranken. Het kan ook worden gebruikt als pasta met een watergehalte van 30 tot 60%, die wordt bereid door het heldere gistextract onder verlaagde druk te concentreren of door gebruik te maken van een osmotisch membraan,
25 dan wel in de vorm van poeders of korrels, die op de gebruikelijke wijze door verstuvingsdrogen zijn bereid.

De uitvinding wordt nader toegelicht aan de hand van de volgende voorbeelden, die overigens niet als beperking zijn bedoeld.

Voorbeeld I

30 50 liter voedingsmedium, bevattende 5% glucose, 1% ammoniumsulfaat, 0,3% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1% maisweekvloeistof met een pH van 5,5, werd gebracht in een fermenteervat van 70 liter en 15 minuten bij 110°C gesteriliseerd, waarna 200 ml van een entculture-oplossing van bakkersgist
35 (*Saccharomyces cerevisiae* CBS 1523), gecultiveerd onder aeroob schudden in hetzelfde kweekmedium gedurende 18 uur bij 30°C, inge-

bracht en er werd aeroob gekweekt bij 30°C gedurende 20 uur onder krachtig beluchten (half V.V.M) en roeren met 500 omwenteling per minuut onder een druk van 0,5 kg/cm².

5 Na het cultiveren werd 2,75 kg gistcellen verkregen in de vorm van een koek met een watergehalte van 60% door centrifugeren. De koek werd vervolgens gewassen met water en er werd aan de koek 8,0 liter water toegevoegd om een suspensie van gistcellen te vormen.

10 De suspensie werd gemengd met 150 ml ethylacetaat en door roeren goed gemengd. Daarna werd de suspensie verdeeld in porties van 1,0 liter en de pH van deze verdeelde porties werd ingesteld op 5,5 tot 5,7, zoals aangegeven in tabel A, met behulp van 30% NaOH. Men liet elk van de suspensies 18 uur bij 45°C staan en de pH werd geregeld door tijdens de autolyse alkali toe te voegen.

15 Na de autolyse werd iedere autolysaat-suspensie 2,0 uur op 90°C verhit waardoor overblijvende enzymen werden geïnactiveerd en er achterblijvende RNA werd geëxtraheerd.

20 Anderzijds werd aan 20 kg normale moutwortelen 20 liter water toegevoegd en het mengsel werd gemalen. Daarna werd een helder extract verkregen door het residu af te filtreren, dit werd 5 minuten op 63°C verhit om het 5'-nucleotidase te inactiveren en ter verkrijging van een ruw enzymoplossing, die kan worden gebruikt voor het hydrolyseren van RNA.

25 Bij iedere eerder bereide verhitte suspensie werd 200 ml van de ruwe enzymoplossing gevoegd en nadat de pH van iedere suspensie op 6,0 was ingesteld werd de enzymeringsreactie 5 uur bij 60°C uitgevoerd. Na de enzymering werd ieder enzymeringsmengsel 5 minuten op 90°C verhit en er werd een helder extract verkregen door het onoplosbare residu af te centrifugeren en dit werd onder verlaagde druk gedroogd om gistextract in de vorm van een poeder te
30 bereiden. Iedere opbrengst van vast materiaal en de 5'-GMP vormende verhouding (in gistextract aanwezig GMP/in de oorspronkelijke gistcellen aanwezig GMP, in procenten) werd bepaald en het resultaat is aangegeven in tabel A.

Tabel A

Invloed van de pH op de opbrengst aan vast materiaal en de GMP-vormende verhouding

	pH van de autolyse	Opbrengst aan vast materiaal (%)	GMP vormende verhouding (%)	GMP gehalte in het extract (%)
5	5,5	61	-	-
	5,8	65	4,2	0,17
	6,0	65	10	0,41
	6,2	64	18	0,75
10	6,4	57	25	1,17
	6,6	41	30	1,95
	7,0	25	21	2,67
	7,5	15	20	3,55

15 In tabel A werd het RNA gehalte van gistcellen bepaald volgens de methode van Schmidt-Thannhauser & Schneider en het gehalte aan GMP in RNA van gistcellen wordt berekend op basis van de veronderstelling, dat de vier soorten basen (guanine, adenine, uracil en cytosine) in gelijke hoeveelheden aanwezig zijn.

20 Het GMP in het verkregen gistextract werd bepaald door vloeistof-kolomchromatografie onder toepassing van een kolom van een kationen-uitwisselende hars (LSZIZ). Voor het bepalen liet men het elueringsmiddel (pH 2,6, H_3PO_4 -NaOH bufferoplossing) door de kolomstroom (4 mm diameter x 500 mm) met een snelheid van 0,6

25 ml/min. bij 40°C. Zoals in tabel A is vermeld zijn zowel de opbrengst aan vast materiaal als de GMP-vormende verhouding hoog als de autolyse wordt uitgevoerd bij een pH tussen 6,0 en 6,6. Uit het resultaat van organoleptische proeven, door een panel van 20 leden, die voor dit doel speciaal waren geoefend, bleek dat het gistextract,

30 verkregen door autolyse bij een pH van 6,0 tot 6,6 en in het bijzonder bij een pH van 6,2 tot 6,4, minder ongewenste geuren vertoont, die eigen zijn aan gist zelf, en dat het een dikte of volheid van smaak heeft, die overeenkomst vertonen met die van rundvleesextract en daar de kwaliteit van het gistextract uitstekend

35 is op grond van de sterke aromatiserende smaak.

Voorbeeld II

1,0 Liter van een suspensie van gistcellen, bereid als in voorbeeld I, werd gemengd met 30 ml ethylacetaat en de autolyse van de gistcellen werd uitgevoerd bij een pH van 6,2 en een temperatuur van 52°C gedurende 20 uur onder gematigd roeren, waarbij de pH van de suspensie op ongeveer 6,2 werd gehouden met behulp van alkali. Na de autolyse werd de autolysaat-suspensie 2,0 uur op 92°C verhit, waardoor de ongewenste enzymen worden geïnactiveerd en het overblijvende intracellulaire RNA werd geëxtraheerd. Uit de verhitte oplossing werd een heldere extractoplossing verkregen door centrifugeren en de oplossing, die werd gebruikt voor het wassen van het residu, werd bij de heldere oplossing gevoegd om 1 liter gistextract te verkrijgen. Anderzijds werden twee soorten ruw enzympreparaat bereid volgens een geheel gebruikelijke werkwijze.

Eerst werd telkens 50 ml van een kweekmedium, bevattende 5% glucose, 0,5% pepton, 0,1% KH_2PO_4 , 0,04% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,04% CaCl_2 en 0,1% fytine, met een pH van 7,0, in een schudkolf van 500 ml gebracht en voor steriliseren 10 minuten op 120°C verhit. Nadat elk medium was afgekoeld werd 1,5 ml ethanol toegevoegd en *Penicillium citrinum* IAM 1131, gekweekt op aardappel-dextrose agar-hellende bodem, werd in het kweekmedium geïnoculeerd en gecultiveerd onder aeroob schudden bij 30°C gedurende 3 dagen. Na het cultiveren werd een helder cultuurfiltoraat 15 minuten op 60°C verhit om schadelijk 5'-nucleotidase te inactiveren en ter verkrijging van 250 ml ruwe enzymoplossing.

Voor het bereiden van AMP deaminase werd *Aspergillus oryzae* ATCC 14578, gekweekt op hellende aardappel-dextrose-agar, geïnoculeerd in elke 50 ml gesteriliseerd cultuurmedium, bevattende 5% glucose, 0,5% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 0,05% maisweekvloeistof, waarvan de pH 6,0 bedraagt, en 2 dagen onder schudden bij 30°C gecultiveerd. Bij het heldere filtraat werd ammoniumsulfaat gevoegd en een ruw enzyme, geprecipiteerd door 80% verzadiging met ammoniumsulfaat, werd door filtreren verzameld, gewassen met ethanol-water-oplossing (ethanol:water = 2:1) en onder verlaagde druk gedroogd ter verkrijging van 0,2g ruw enzympreparaat.

Bij 1,0 liter gistextract, zoals eerder bereid, werd

250 ml gevoegd van de ruwe enzymoplossing, afgeleid van *Penicillium citrinum*, en men liet de gemengde oplossing, nadat de pH op 4,5 was ingesteld, 2 uur bij 70°C staan om het geëxtraheerde RNA te hydrolyseren tot 5'-nucleotiden. Na het enzymeren werd de
 5 pH van de oplossing met alkali op 6,0 ingesteld en er werd 0,2g ruw enzyme van AMP deaminase toegevoegd en het enzymeren werd 3 uur bij 45°C uitgevoerd. Daarna werd de oplossing 10 minuten op 95°C verhit en onder verlaagde druk ingedampt ter verkrijging van 96g gistextract. Dit gistextract bevatte 0,78% 5'-GMP, resp. 0,7%
 10 5'-IMP en had een sterke aromatiserende smaak.

Voorbeeld III

Pichia farinosa CBS 2006, gekweekt op hellende aardappel-dextrose-agar, werd geïnoculeerd in een kweekmedium, bevattende 0,5% ammoniumacetaat, 1% maisweevloeistof, 0,2% KH_2PO_4 , 0,5%
 15 ammoniumsulfaat, 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en het cultiveren werd bij 30°C en een pH van 6,0 uitgevoerd. De pH werd op 6,0 gehouden door toevoegen van een mengsel van azijnzuur en ammoniumacetaat tijdens het cultiveren. Het cultiveren werd gestopt als maximale groei was bereikt en de gistcellen werden door centrifugeren gewonnen. Na was-
 20 sen met water werd 1,0 liter gistroom met een watergehalte van 85% verkregen en men liet deze 20 uur bij 45°C staan voor de autolyse. De pH van de room werd tijdens de autolyse op 6,6 gehouden met 30% NaOH. Daarna werd 50g gistextract met een watergehalte van 5% verkregen op de in voorbeeld I beschreven wijze. Het aldus verkregen
 25 gistextract bevatte 1,4% 5'-GMP en had een sterke aromatiserende smaak.

C o n c l u s i e s

1. Werkwijze voor het bereiden van een gistextract dat een aromatiserend 5'-nucleotide bevat en een verbeterde dikte of volheid van smaak heeft, met het kenmerk, dat men

5 (1) gesuspendeerde gistcellen autolyseert bij aanwezigheid van een autolysestimulator bij een constante pH tussen 6,0 en 6,6,

(2) de geautolyseerde suspensie verhit bij een temperatuur van 90 tot 100°C gedurende 1 tot 3 uur om een intracellulair RNA, dat is achtergebleven, te extraheren en dat men vervolgens de
10 beide volgende trappen in willekeurige volgorde uitvoert,

(3) hydrolyseren van het geëxtraheerde RNA met 5'-fosfodiesterase en desgewenst omzetten van AMP in IMP met een AMP-deaminase en

(4) het verkregen heldere extract van onoplosbaar
15 residu scheidt.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat trap (2) wordt gevolgd door de trappen (3) en (4).

3. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat trap (2) wordt gevolgd door de trappen (4) en (3).

20 4. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het 5'-fosfodiesterase is afgeleid van mout of moutwortelen.

5. Werkwijze volgens een der voorgaande conclusies, in hoofdzaak als beschreven in de voorafgaande beschrijving en/of toegelicht aan de hand van de voorbeelden.