

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12P 19/30 (2006.01)

C12P 19/32 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480002937.7

[43] 公开日 2008年4月2日

[11] 公开号 CN 101155929A

[22] 申请日 2004.1.23

[21] 申请号 200480002937.7

[30] 优先权

[32] 2003.1.27 [33] EP [31] 03075255.4

[86] 国际申请 PCT/EP2004/000658 2004.1.23

[87] 国际公布 WO2004/067758 英 2004.8.12

[85] 进入国家阶段日期 2005.7.27

[71] 申请人 帝斯曼知识产权资产管理有限公司

地址 荷兰海尔伦

[72] 发明人 伯图斯·诺丹姆

珍·格瑞特·科图特斯

[74] 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理有限
责任公司

代理人 肖善强

权利要求书 2 页 说明书 14 页

[54] 发明名称

生产 5' - 核糖核苷酸的方法

[57] 摘要

本发明描述了包含至少 55% w/w (基于无氯化钠干重) 的 5' - 核糖核苷酸的组合物, 以及用于生产该组合物的方法, 所述方法包括如下步骤: (i) 处理微生物细胞, 以释放出包含 RNA 的细胞内容物; (ii) 将存在于释放出的细胞内容物中的 RNA 与其它可溶性细胞物质分离; (iii) 将经过分离的 RNA 转化为 5' - 核糖核苷酸。

1. 一种包含至少 55% w/w（基于无 NaCl 的干重）5'-核糖核苷酸的组合物，其进一步地包含谷氨酸盐。
2. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述组合物包含至少 65%或至少 75% w/w（基于无 NaCl 的干重）的 5'-核糖核苷酸。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物，其中所述谷氨酸盐与 5'-核糖核苷酸的比例小于 0.1，优选小于 0.05 或者更优选地，小于 0.01；并且该比例大于 0.001。
4. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的组合物，其中所述组合物包含 0.01%至 10% w/w（基于无 NaCl 的干重）的谷氨酸盐。
5. 如权利要求 1 至 4 中任意一项所述的组合物，其中所述组合物包含的 5'-GMP 的量多于 5'-IMP 和 5'-AMP 的总和。
6. 一种生产含有 5'-核糖核苷酸的方法，所述方法包括：
 - (i) 处理微生物细胞，以释放出包含 RNA 的细胞内容物；
 - (ii) 将所述释放出的细胞内容物中存在的 RNA 与其它可溶性细胞物质分离；以及
 - (iii) 将经过分离的 RNA 转化为 5'-核糖核苷酸。
7. 如权利要求 6 所述的方法，其中，在处理所述微生物细胞以释放所述的细胞内容物之前对所述微生物细胞的天然的酶进行失活。
8. 如权利要求 6 或 7 所述的方法，其中用酶、化学或机械手段对所述的细胞进行处理。
9. 如权利要求 8 所述的方法，其中用酶对所述的细胞进行处理，优选用于处理细胞的酶是蛋白酶。
10. 如权利要求 6 至 9 中任意一项所述的方法，其中，在将所述释放出的细胞内容物中存在的 RNA 与其它可溶性细胞物质分离之前，除去来自所述微生物细胞的固体物质。
11. 如权利要求 10 所述的方法，其中，通过离心或过滤来除去所述的固体物质。

12. 如权利要求 6 至 11 中任意一项所述的方法，其中所述的将 RNA 与其它可溶性细胞物质的分离是通过超滤来进行的。

13. 如权利要求 6 至 12 中任意一项所述的方法，其中所述的经过分离的 RNA 是通过酶转化为 5'-核糖核苷酸的，优选通过 5'-Fdase 或者通过 5'-Fdase 和脱氨酶。

14. 如权利要求 6 至 13 中任意一项所述的方法，其中，通过去除具有高于 5'-核糖核苷酸的分子量的化合物来对所述 5'-核糖核苷酸进行进一步地纯化。

15. 如权利要求 14 所述的方法，其中，所述的去除具有高于 5'-核糖核苷酸的分子量的化合物是通过超滤来进行的。

16. 如权利要求 1 至 5 中任意一项所述的组合物或由权利要求 6 至 15 中任意一项所述的方法生产出的含 5'-核糖核苷酸的组合物在食品或饲料中的用途。

17. 如权利要求 1 至 5 中任意一项所述的组合物或由权利要求 6 至 15 中任意一项所述的方法生产出的含 5'-核糖核苷酸的组合物的用途，所述用途用于增强具有降低的或较低的总脂肪的食物的味道和/或香气和/或口感中的脂肪气味。

18. 如权利要求 1 至 5 中任意一项所述的组合物或由权利要求 6 至 15 中任意一项所述的方法生产出的含 5'-核糖核苷酸的组合物的用途，所述用途用于掩盖食品中人工加甜剂的后味。

19. 如权利要求 1 至 5 中任意一项所述的组合物或由权利要求 6 至 15 中任意一项所述的方法生产出的含 5'-核糖核苷酸的组合物的用途，所述用途用于增加饮料的味道和/或香气和/或口感中特定的蔬菜气味和/或水果气味和/或酒精气味。

生产 5'-核糖核苷酸的方法

本发明涉及包含 5'-核糖核苷酸的组合物和用于生产该组合物的方法。本发明还涉及包含 5'-核糖核苷酸的组合物在食品或饲料中的应用。

自溶酵母提取物是对细胞进行破碎和对聚合酵母物质进行消化（裂解）之后从酵母中获得的可溶物质的浓缩物。细胞破碎之后培养基中释放出来的活性酵母酶是造成裂解的原因。通常上述类型的酵母提取物不包含 5'-核糖核苷酸，因为在自溶过程期间，天然 RNA 已被分解或修饰，使其无法或几乎无法降解成 5'-核糖核苷酸。富含氨基酸的上述类型的酵母提取物作为基本味道提供者被用于食品工业。酵母提取物中存在的氨基酸为食品增加了类似肉汤、肉汤味。

另一方面，水解酵母提取物是在下述处理之后从酵母中获得的可溶性物质的浓缩物，所述处理是：对细胞进行破碎、消化（裂解）以及在裂解期间向酵母悬浮物中加入蛋白酶和/或肽酶以及特别地，核酸酶。天然酵母酶在裂解之前被失活。该过程期间，形成了鸟嘌呤的 5'-核糖核苷酸（5'-鸟嘌呤单磷酸酯；5'-GMP）、尿嘧啶的 5'-核糖核苷酸（5'-尿嘧啶单磷酸酯；5'-UMP）、胸腺嘧啶的 5'-核糖核苷酸（5'-胸腺嘧啶单磷酸酯；5'-CMP）和腺嘌呤的 5'-核糖核苷酸（5'-腺嘌呤单磷酸酯；5'-AMP）。向混合物中加入腺苷酸脱氨酶后，5'-AMP 被转化为 5'-肌酐单磷酸酯（5'-IMP）。通过此种方法获得的水解酵母提取物因此富含 5'-核糖核苷酸，尤其是富含 5'-GMP 和 5'-IMP。通常酵母提取物还富含谷氨酸单钠（MSG）。5'-IMP、5'-GMP 和 MSG 因其增强香味的特性而为人们所知。它们在某些种类的食品中能增加香喷喷的美妙味道。该现象被描述为“口感”或鲜味（umami）。富含 5'-核糖核苷酸以及可选地，富含 MSG 的酵母提取物通常被加入到汤、酱、腌汁或香料调料中。

目前，富含 5'-核糖核苷酸的酵母提取物是用具有高 RNA 含量的酵母

菌株和/或通过对细胞内容物的部分提取来生产的。此类型的增味水解酵母提取物的缺点在于：由于氨基酸、短肽和其它酵母成分的存在，它们不适合需要纯净味道的应用。

JP 51106791 描述了一种纯化 RNA 的方法，其中对酵母提取物进行超滤，接着是若干额外的纯化步骤。对于获得有商业吸引力的 RNA 来说所必需的一系列纯化步骤使得该过程复杂而又昂贵。在该篇文献中没有暗示将经纯化的 RNA 用于含有 5'-核糖核苷酸的组合物的生产，所述 5'-核糖核苷酸可被用作食品中的增味剂。

本发明的一个目的是提供含有高含量 5'-核糖核苷酸的组合物，其在味道方面是纯净的，并可被用于若干食品或饲料上的应用。本发明的另一个目的是提供具有上述特征的含有 5'-核糖核苷酸的组合物的简单而有效的生产方法。

发明内容

本发明提供了包含至少 55% w/w（基于无 NaCl 的干重）5'-核糖核苷酸的组合物。优选地，该组合物包含至少 65% w/w 的 5'-核糖核苷酸，更优选地，至少 75% w/w 的 5'-核糖核苷酸。优选地，该组合物还包含谷氨酸盐。典型地，本发明的组合物包含至多 98% w/w 的 5'-核糖核苷酸。

本发明还提供了一种非常简单、划算因此在商业上很具吸引力的方法。有益地，本发明的方法与从酵母提取物中对 RNA 的分离以及将经过分离的 RNA 向 5'-核糖核苷酸的转化结合在一起。以这种方式，可能以相对简单并因此在商业上很具吸引力的方法生产出高纯度的 5'-核糖核苷酸来。

本发明的方法可被用于生产本发明组合物。

特别地，本发明提供了用于生产含有 5'-核糖核苷酸的组合物的方法，所述方法包括：

(i) 处理微生物细胞，以释放出包含 RNA 的细胞内容物；

(ii) 将存在于释放出的细胞内容物中的 RNA 与其它可溶性细胞物质分离；

(iii) 将经过分离的 RNA 转化为 5'-核糖核苷酸。

在此用术语“5'-核糖核苷酸”来指 5'-GMP、5'-CMP、5'-UMP、5'-AMP 和/或 5'-IMP 的混合物，其中混合物中的 5'-IMP 是通过将 5'-AMP 部分或完全转化成 5'-IMP 来获得的。

术语“5'-核糖核苷酸”在本文中指游离的 5'-核糖核苷酸或其盐。

5'-核糖核苷酸在本发明组合物中的重量百分比基于该组合物无 NaCl 的干重，并且作为 5'-核糖核苷酸的二钠盐七水合物 ($2\text{Na}\cdot 7\text{Aq}$) 来被计算。无 NaCl 并不意味着本发明的组合物就不能含有 NaCl，而是在计算 %w/w 时将 NaCl 从所述组合物中排除出去。后一种计算可以通过本领域技术人员已知的方法来进行。组合物中谷氨酸盐的量被计算为谷氨酸的百分比 (%w/w)，即，组合物的每重量无 NaCl 干重中游离谷氨酸的重量。

优选地，本发明的组合物包含谷氨酸盐，其中，谷氨酸盐与 5'-核糖核苷酸的比例小于 0.1，优选地，小于 0.05，或者更优选地，小于 0.01；以及，其中该比例大于 0.001。通常，所述组合物包含 0.01%至 10%，优选 0.05%至 5%或更优选地，0.1%至 2% w/w 的谷氨酸盐，这些含量基于所述组合物的无 NaCl 干重。

优选地，本发明的组合物包含的 5'-GMP 的量比 5'-IMP 和 5'-AMP 的总和更多。商业上可获得的所有酵母提取物含有的 5'-GMP 的量都比 5'-IMP 和 5'-AMP 的总和要少。优选从酵母获得的本发明的 5'-核糖核苷酸组合物含有比 5'-IMP 和 5'-AMP 的总和还多的 5'-GMP。在此类组合物中相对于 5'-IMP 和 5'-AMP 的总和而言，更高的 5'-GMP 含量是有好处的，因为这使得该组合物较之目前商业上可获得的酵母提取物具有更强的增味能力。这是因为 5'-GMP 在增加香味的方面比 5'-IMP 更为有用，而 5'-AMP 对增加香味没有作用 (T. Nagodawithana, “Savoury Flavours”, (1995) edited by Esteekay associates, Inc, Wisconsin, USA, page 302)。

任何类型的微生物都可被用作本发明方法中 RNA 的来源。细菌和真菌微生物是优选的，例如适于食品和饲料应用的那些。优选的微生物是那些具有食品级状态并因此可以安全用于人类食品消耗的。优选的是具有高 RNA 含量的微生物。

适合在本发明方法中使用的微生物的例子包括酵母和丝状真菌，例如 *Trichoderma* 或 *Aspergillus*。属于 *Saccharomyces*、*Kluyveromyces* 或 *Candida* 属的酵母菌株是优选使用的。属于 *Saccharomyces*，例如属于 *Saccharomyces cerevisiae* 株的酵母菌株是优选的。

合适的细菌微生物的例子是乳酸细菌，例如，乳酸菌 (*Lactobacillus*)。

本发明的方法可以以讨论中的微生物的发酵培养液开始。可使用本领域内已知的发酵方法。在一些情况下，该发酵培养液在用于本发明的方法之前可被浓缩，例如通过离心或过滤。例如，膏状酵母（已被浓缩成 15-27wt%干物质含量的面包酵母）可被使用。

通常从具有高 RNA 含量的菌株（即，典型地，具有 6-15%的 RNA 含量）中来获得发酵培养液。以这种方式，在水解过程中会产生高含量的 5'-核糖核苷酸。虽然具有高 RNA 含量的酵母或其它微生物菌株是优选的，但是，具有低 RNA 含量的酵母或其它微生物菌株也是可以使用的。有利地，使用本发明的方法，可将上述酵母或其它微生物菌株转化为具有高 5'-核糖核苷酸含量的组合物或酵母提取物。此外，使用本发明的方法，可以获得其中 5'-核糖核苷酸含量比基于初始酵母或微生物的 RNA 含量预测出来的含量和/或在目前可获得的酵母提取物中发现的含量要高的组合物。

在对微生物细胞进行处理以释放出细胞内容物之前，优选对所述微生物细胞进行处理以使所述细胞中存在的天然的酶失活。通常，在自溶微生物提取物中 RNA 会被降解或修饰，对该 RNA 的分离因此也就缺少吸引力了。

例如用热激 (heat shock) 对发酵培养液中天然的酶进行失活是可行的，所述热激例如 5 至 10 分钟，适合在 80°C-97°C 的温度下进行。该处理应当至少使降解所述微生物 RNA 的酶（例如，磷酸酶、Rnase、Fdase）失活。因此，优选地，在该处理之后所述微生物 RNA 将不会被降解或修饰。RNA 降解可能发生于稍后的阶段，例如，通过加入合适的酶。

在本发明的方法中，对微生物细胞进行处理以释放出包含 RNA 的细

胞内容物。通过该处理，细胞壁被破碎和/或破坏，导致细胞内容物的释放。

为了从细胞中释放出细胞内容物，可以采用本领域技术人员已知的方法对细胞进行化学处理、机械处理或酶处理。

机械处理包括均质（homogenisation）技术。为此目的，适用高压均质机是可行的。其它的均质技术可以包括用颗粒例如沙和/或玻璃珠来混合，或者研磨装置（例如玻璃珠研磨机）。

化学处理包括使用盐、碱和/或一种或多种表面活性剂或去垢剂。化学处理是较不优选的，因为它们可能导致 RNA 的部分降解，尤其是用到碱的时候，以及导致随后 2'-核糖核苷酸和 3'-核糖核苷酸的形成。

优选地，用酶进行该溶解或细胞壁裂解步骤，因为就此可以获得对该过程的更好的控制。此外，酶的使用使得该方法特别适合于大规模的应用。若干种酶制剂都可以使用，包括纤维素酶、葡聚糖酶、半纤维素酶、几丁质酶、蛋白酶或果胶酶。例如，可以使用蛋白酶，例如内切蛋白酶。用于酶的反应条件取决于所使用的酶。通常，所述的微生物细胞被酶处理 1 至 24 小时，在 4 至 10 的 pH 和 40°C 至 70°C 的温度下进行。

化学处理或酶处理之后，优选地，所用的化学物质或酶应在使得 RNA 不会被实质上改变和/或降解的条件下被中和或失活。

对酶的失活可通过 pH 处理或者优选地，通过热处理来进行。

随后，将释放出的细胞内容物中存在的 RNA 与其它可溶性微生物细胞物质分离。

按照本领域技术人员已知的方法，可以将可溶的 RNA 与其它可溶性物质分离，例如 RNA 的选择性沉淀或者色谱方法。优选地，通过超滤（UF）来进行 RNA 与其它可溶性微生物细胞物质的分离。超滤很经济又很方便，特别适合大规模应用以及制造食品级产品。就实验室规模而言，对 RNA 的分离可以若干种途径来进行，其中每种都能获得非常纯净的少量 RNA 样品。这些方法通常劳动强度大且很昂贵。本发明提供了特别适用于大规模分离 RNA 或 5'-核糖核苷酸的方法，该方法还允许以有商业吸引力的规模来生产 RNA 或 5'-核糖核苷酸。本发明的方法产生了良好纯度

且高产量的 5'-核糖核苷酸。大规模意味着本发明方法中的初始材料可以是 10 m³ 或更大的发酵罐中生产的微生物的发酵培养液。

在用 UF 来分离 RNA 与其它可溶性细胞物质的情况下，可以使用具有 10-50 kD 分子量分离点 (cut-off) 的过滤器，优选是 20-50 kD。通常，较大的过滤器尺寸允许较高的过滤器流量，但也可能导致较大的损失和/或较为不纯净的产品。从超滤步骤产生的渗余物中回收 RNA 部分 (fraction)。本领域的技术人很清楚：最终组合物中 5'-核糖核苷酸的量会受到方法中所用的超滤器类型的影响，并会受到超滤步骤中洗涤效率的影响。

经过分离的 RNA 可被转化为 5'-核糖核苷酸，优选是使用酶来进行的。

5'-磷酸二酯酶 (5'-Fdase) 可被用于进行 RNA 到 5'-核糖核苷酸的转化。5'-磷酸二酯酶可从微生物来源或植物来源 (例如，麦芽根的提取物) 获得。商业上可获得的微生物的 5'-Fdase 的一个例子是 Amano (日本) 生产的 RP-1 酶。脱氨酶，例如腺嘌呤脱氨酶可被用于将 5'-AMP 转化为 5'-IMP。商业上可获得的脱氨酶的一个例子是 Amano (日本) 生产的脱氨酶 500。

用 5'-Fdase 和脱氨酶进行的从 RNA 到 5'-核糖核苷酸的转化可用两步法或一步法来进行。

在分离 RNA 之前，在本发明的一种优选实施方式中，将来自微生物细胞 (例如细胞壁) 的固体物质与释放出的细胞内容物里存在的可溶性物质 (包括 RNA、蛋白质、碳水化合物、矿物质、油脂和维生素) 分离。这可以通过任何适于开展固/液分离的方法来达成。例如可以使用离心或过滤。当在 RNA 与其它可溶性微生物细胞物质的分离之前未除去来自微生物细胞的固体时，所述固体物质可在完成 RNA 到 5'-核糖核苷酸的转化之后通过任何固/液分离方法来除去。

应当理解，在本发明上下文中，类似于“将存在于释放出的细胞内容物中的 RNA 与其它可溶性细胞物质分离”的措辞或类似于“将经过分离的 RNA 转化为 5'-核糖核苷酸”的措辞并不一定意味着所有 RNA 都应被

分离或转化。本领域的技术人员很清楚：被分离出的 RNA 的数量将取决于所用的分离方法的类型；被转化的 RNA 的量将取决于若干种因素，例如取决于所用的酶的类型。

在 RNA 向 5'-核糖核苷酸转化之后，以及可选地，在除去来自微生物细胞的固体物质之后获得的含有 5'-核糖核苷酸的部分，优选地从比 5'-核糖核苷酸分子量更高的化合物中来提纯，优选通过超滤。纯化的程度将取决于所用的超滤膜的分子量分离点。

含有 5'-核糖核苷酸的部分，（可选地，在通过超滤进行的纯化之后，）通常作为可被进一步浓缩和/或干燥的溶液通过本领域技术人员已知的方法来获得。

可用本发明方法获得的包含 5'-核糖核苷酸的组合物，具有高的 5'-核糖核苷酸含量，在味道上是纯净的。本说明书中出现的“味道上纯净”指：当以合适的量将本发明的组合物加到食品或饲料中时，在所述食品或/或饲料中，极少有或不存在任何是从中获得所述组合物的微生物所典型具有的特殊的味道和/或气味，或者任何来自所述组合物的肉汤或类似肉汤的味道和/或气味。优选地，在本发明组合物中极少有或不存在微生物所典型具有的任何特殊的味道和/或气息和/或气味。

例如，使用 *Saccharomyces* 作为初始材料的情况下，组合物没有酵母味道；使用 *Candida* 作为初始材料的情况下，组合物没有甜味。以合适的量应用于食物制品时，该组合物将不提供肉汤或类似肉汤的味道。

根据本发明的一种实施方式，所述 5'-核糖核苷酸组合物可按照任何想要的比例加入到传统的酵母提取物中。作为结果，可以获得具有任何想要的 5'-核糖核苷酸含量的酵母提取物。

本发明的组合物来自天然的来源，特别是优选为食物级的微生物。

根据本发明的含有 5'-核糖核苷酸的组合物可被用于任何食品或饲料产品中，尤其是为了改善和/或增加其味道和/或香气和/或口感。可加入所述组合物的典型的食品类型包括日常食品、烘焙食品、蔬菜、水果、肉、糖果、脂肪、油、饮料（例如，碳酸饮料或来自日常食品的饮料，例如牛奶，来自蔬菜、水果的饮料、酒精饮料等）或任何从上述食品加工得到的

食品。

本发明的组合物在具有降低的或较低的总脂肪的食品（或饮料）中也有合适的应用。在本发明的上下文中，具有降低的或较低的总脂肪的食品，通常是通过加工、配方或导致其中包含的总脂肪降低的再配方，和/或用脂肪替代品对所述总脂肪的替代，从相应的全脂食品中获得的。所述过程和所述的脂肪替代品是本领域内已知的。

具有降低的或较低的总脂肪的食品的明显缺点是：此类食品缺乏相应全脂食品或饮料制品的丰富香味。通过用本发明的组合物来增强具有降低的或较低的总脂肪的食品的味道和/或香气和/或口感中的脂肪气味可以克服掉该缺点。后者意味着所述包含有本发明组合物的具有降低的或较低的总脂肪的食品具有与相应全脂食品的味道和/或香气和/或口感更为相似的味道和/或香气和/或口感。

本发明的组合物还在包含人工加甜剂的食物中具有合适的应用。与使用人工加甜剂相关的明显缺点是副味或后味（例如苦味）在食物中的存在或发展。单独或组合使用时存在上述问题的最常用的人工加甜剂是：安赛蜜-K、阿力甜（alitime）、阿斯巴甜、环己基氨基磺酸盐（cyclamate）、纽甜（neotame）、新橙皮甘（neohesperidine）、糖精、甜叶菊甙、蔗糖素（sucralose）和甜蛋白（thaumatin）。通过使用本发明的组合物来掩盖食物或饮料中人工加甜剂的副味或后味可以克服该缺点。本发明还包括包含人工加甜剂和本发明组合物的组合物。

本发明的组合物可被用来增加饮料中更为特别的味道和/或香气和/或口感，具体而言，在饮料的味道和/或香气中增加特定蔬菜的气味和/或水果气味和/或酒精气味。例如，它们可被用于在蔬果汁中增加特定的蔬菜味道和/或蔬菜香气，在水果汁中增加特定的水果味道和/或水果香气，在酒精饮料，尤其是那些具有低或降低的酒精含量的酒精饮料（例如葡萄酒和啤酒）中增加特定的酒精味道和/或酒精香气。

在上述应用中加入到食物或饮料中的5'-核糖核苷酸组合物的量将取决于食物或饮料的类型以及取决于所述的应用。5'-核糖核苷酸组合物的量可以在例如0.0001% w/w至10% w/w中变化，所述的量是相对于所述食物或饮

料而言的。

现在将通过一些实施例来对本发明进行阐释，所述实施例并不是要限制本发明的范围。

实施例 1

在连续直通热交换器（continuous flowthrough heat exchanger）中，于 95°C 对 40000 kg 的膏状酵母（干固体为 18.2%）进行 10 分钟的热处理，以失活所有的酵母酶活性。随后，用 Pescalase（来自 *Bacillus licheniformis* 的内切蛋白酶，DSM N.V.，荷兰）在 pH 8.0 和 62°C 对失活的酵母分批进行 6 小时的处理。此后，在 70°C 通过对所述蛋白酶进行 1 小时的热处理（分批）使其失活，用盐酸将 pH 降至 5.3。通过连续离心从反应混合物中除去固体物质。在 50 kD 的超滤器上对剩下的上清液进行超滤以将高分子量的部分（包括 RNA）与低分子量的物质分离，所述低分子量的物质例如无机成分、维生素、碳水化合物（例如海藻糖）、游离氨基酸、肽和小的蛋白质。然后在 pH 5.3 和 65°C 对所述高分子量的部分（渗余物 UF1）与 5'-磷酸二酯酶分批进行 15 小时的培养，以将 RNA 水解成 5'-核糖核苷酸。接着，通过脱氨酶在 pH 5.1 和 55°C 进行的 2.5 小时的培养，将释放出的 5'-AMP 转化为 5'-IMP。最后，用 50 kD 的过滤器对所述反应混合物再次进行超滤。滤液的干固体主要由 5'-核糖核苷酸（滤液 UF2）组成。

根据下述方法通过 HPLC 对样品进行 RNA 含量和/或 5'-核糖核苷酸含量的分析。样品中的 RNA 在碱处理阶段被水解。用 5'-GMP 作为标准，用 Whatman Partisil 10-SAX 柱，用 pH 3.35 的磷酸缓冲液作为洗脱液以及 UV 检测，通过 HPLC 来对 GMP（即从 RNA 水解得到的 2'-GMP 和 3'-GMP）进行定量。基于无氯化钠干物质的 RNA 的重量百分比相当于基于无氯化钠干物质的游离 GMP 的重量百分比的~4 倍。

还可对过滤物 UF2 的 5'-GMP、5'-IMP、5'-AMP 和谷氨酸含量进行分析。用 Whatman Partisil 10-SAX 柱，用 pH 3.35 的磷酸缓冲液作为洗脱液以及 UV 检测，通过 HPLC 来测定样品中 5'-GMP、5'-IMP 和 5'-AMP 的量（以基于无氯化钠的干物质的其二钠七水合物的重量百分比来表示）。

基于 5'-GMP、5'-IMP 和 5'-AMP 的标准来计算浓度。利用在食物和其它物质测试试剂盒（Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Enzymatic BioAnalysis/Food Analysis, Catalogue No. 10139092035, Catalogue year 2004, R-BIOPHARM AG, Darmstad, Germany）中测定 L-谷氨酸的 L-谷氨酸 Colorimetric 方法来测定谷氨酸的量。

表 1 中显示了所述提取方法的数据。

表 1: 核苷酸提取方法的数据

	数量 (kg)	干固体 (%w/w)	干固体 (kg)	RNA* * (%)	5'- GMP* ** (%)	5'- IMP*** (%)	谷氨 酸** (%)	5'- AMP** * (%)
膏状酵母	40000	18.20	7280	8.2				
上清液*	54100	8.77	4750	10.3			5.5	
渗余物 UF1	8120	7.80	632	72.5			0.4	
滤液 UF2*	10160	3.98	404	0.0	24.5	24.1	0.5	0

*包括洗涤液体

**%基于无 NaCl 的干固体

***基于无 NaCl 的干固体，以 2Na.7aq 表示

组合物中 5'-核糖核苷酸的量是大约 97% w/w，这是基于无氯化钠的干物质的。

实施例 2

于 95°C 对 2100 g 膏状酵母的一部分（干固体为 18.2%）进行 10 分钟的热处理，以失活所有的酵母酶活性。随后，用 Pescalase（来自 *Bacillus licheniformis* 的内切蛋白酶，DSM N.V., 荷兰）在 pH 8.0 和 62°C 对失活的酵母分批进行 6 小时的处理。此后，在 70°C 通过对所述蛋白酶进行 1 小时的热处理（分批）使其失活，用盐酸将 pH 降至 5.3。在 50 kD 的超滤器上对水解物进行超滤以将高分子量的部分及细胞壁（包括 RNA）与低分子量的可溶性物质分离，所述低分子量的物质例如无机成分、维生素、碳水化合物（例如海藻糖）、游离氨基酸、肽和小的蛋白质。然后在 pH 5.3 和 65°C 将所述渗余物与 5'-磷酸二酯酶进行 15 小时的培养，以将 RNA 水

解成 5'-核糖核苷酸。接着，通过脱氨酶在 pH 5.1 和 55°C 进行的 2.5 小时的培养，将释放出的 5'-AMP 转化为 5'-IMP。最终，通过离心去除所述固体，用去矿物质洗涤颗粒部分，并再次离心。两份上清液（初级上清液和洗涤液）被合并，在 50 kD 超滤器上对整体进行超滤，以将低分子量的物质包括 5'-核糖核苷酸与高分子量的物质分离。得到的超滤液被浓缩及喷雾干燥。

对得到的粉末分析其 5'-GMP、5'-IMP 和 5'-AMP 的浓度。此外，在终产物中测量谷氨酸和氯化钠的浓度，以及在膏状酵母中测量 RNA 的浓度。通过用 Jenway 氯化物测量仪 PCLM3 (Jenway, Essex, England) 在样品中测量氯离子以及计算相应的氯化钠的量，来对氯化钠进行测定。表 2 中显示了所述提取方法的数据。

表 2: 核苷酸提取方法的数据 (50 kD UF 过滤器)

	干固体 (%w/w)	干固体 (g)	RNA*	NaCl (%)	5'- GMP** (%)	5'- IMP** (%)	谷氨酸 * (%)	5'- AMP** (%)
膏状酵母	18.2	383	8.2	0				
最终粉末	97.4		0.0	7.3	18.2	18.2	0.9	0.0

*%基于无 NaCl 的干固体

**基于无 NaCl 的干固体，以 2Na.7aq 表示

组合物中 5'-核糖核苷酸的量是 73% w/w，这是基于无氯化钠的干物质的。该数量要低于实施例 1 中终产物中的数量（基于无氯化钠的干物质，大约 97%）。这意味着组合物中 5'-核糖核苷酸的量可能受方法类型的影响。

实施例 3

按照实施例 2 所述，从 2100 g 膏状酵母（干固体为 18.2%）来开展所述的方法。但是，本实施例中使用 30 kD 的超滤器（实施例 2 中是 50 kD 的超滤器）。

表 3 中显示了该提取方法的数据。

表 3: 核苷酸提取方法的数据 (30 kD UF 过滤器)

	干固体 (%w/w)	干固体 (g)	RNA*	NaCl	5'- GMP*	5'- IMP**	谷氨 酸*	5'- AMP*
			(%)	(%)	* (%)	(%)	(%)	** (%)
膏状酵母	18.50	389	8.2	0				
最终粉末	95.83		0.0	5.0	19.4	16.0	0.6	3.4

*%基于无 NaCl 的干固体

**基于无 NaCl 的干固体, 以 2Na.7aq 表示

组合物中 5'-核糖核苷酸的量是大约 78% w/w, 这是基于无氯化钠的干物质的。该数量较之通过 50 kD UF 过滤器生产的组合物 (实施例 2) 要高大约 5%。这意味着组合物中 5'-核糖核苷酸的量可能受 UF 过滤器类型的影响。

实施例 4 含有 5'-核糖核苷酸的组合物在人工加甜剂型的 Coca Cola®或在普通 Fanta orange®中的用途

对根据本发明的含有 5'-核糖核苷酸的组合物添加到人工加甜剂型的 Coca Cola® (Coca Cola Light®-Coca Cola Company-Rotterdam) 或加到普通 Fanta Orange® (Coca Cola Company-Rotterdam) 中的影响进行了研究。

所述组合物含有 17.8% w/w 的 5'-GMP、17.6% w/w 的 5'-IMP (即大约 70% 的 5'-核糖核苷酸) 和 0.7% w/w 的谷氨酸, 上述含量基于无 NaCl 的干物质。干物质中氯化钠含量 < 1%。每升饮料中使用 50 mg 剂量的组合物。

包含所述组合物的饮料的味道和/或香气和/或口感是由一组食品品尝方面的专家来分析的 (实验 1 和 2), 并与原来的饮料进行了比较。对 Coca Cola Light®而言, 还将包含所述组合物的饮料的味道和/或香气和/或口感与普通的 Coca Cola® (Coca Cola Company-Rotterdam) 进行了比较。

表 4 (Coca Cola Light®) 和表 5 (Fanta Orange®) 中分别显示了所述结果。

表 4

实验	组合物 (mg/l)	对于味道/香气的观察
Coca Cola [®]	0	可乐味、酸、尖 (peaky)、刺激 (pungent)
Coca Cola Light [®]	0	可乐味、较不浓郁 (less body)、化学性后味
实验 1	50	可乐味、无化学性后味、纯净、强烈 (full)、更为浓郁、比 Coca Cola Light [®] 甜、更接近 Coca Cola [®] 、无酵母气味

表 5

实验	组合物 (mg/l)	对于味道/香气的观察
Fanta Orange [®]	0	橙皮味、酸、轻微刺激
实验 2	50	更为强烈、变为果肉味、较少橙皮味、纯净的橙香、更好口感、无酵母气味

该结果清晰地显示了核糖核苷酸对 Cola Cola Light[®]或 Fanta Orange[®]的味道和/或香气和/或口感的正面影响。在包含所述组合物的 Cola Cola Light[®]中，饮料中由于存在人工加甜剂（阿斯巴甜、环己基氨基磺酸钠和安赛蜜）而产生的后味被掩盖了。在包含所述组合物的 Fanta Orange[®]，整体味道，尤其是其中的水果气味得到了增强。

此外，没有酵母气味被引入到所述饮料中，而使用传统的酵母提取物时，这种气味就是正常情况了。这表示，根据本发明的组合物味道纯净，特别适于不期望存在有来自酵母提取物或组合物的酵母味道/气味的饮料应用。

实施例 5 含有 5'-核糖核苷酸的组合物在经过加工的奶酪中的用途

将实施例 4 中的组合物加入到低脂奶酪酱（Slimkuipje 天然 15+，包含 5% w/w 的总脂肪）中，加入剂量为每 100 g 奶酪酱中 50 mg。包含所述组合物的奶酪酱（实验 1）的味道和/或香气通过食品品尝方面的一组专家来分析，并与原本的（低脂）奶酪酱的味道和相应的全脂产品（全脂）

(Goudkuipje 天然 48+, ERU-Woerden-荷兰生产, 包含 21% w/w 的总脂肪) 的味道进行比较。

结果显示于表 6 中。

表 6

实验	组合物 (mg/100g)	对于味道/香气的观察
全脂产品	0	幼奶酪味、微弱香气、脂肪感
低脂产品	0	奶酪味道较弱、香气少、无奶酪的真正特点、无奶油感、无脂肪感
实验 1	50	较低脂产品有更强的奶酪香气、更多奶油感、更多脂肪感、较低脂产品更好口感、更接近全脂产品、纯净的奶酪味道、无酵母气味

该结果清楚地显示了本发明组合物对经加工低脂奶酪的味道和/或香气和/或口感的影响。具体而言, 包含所述组合物的低脂奶酪酱的味道和/或香气和/或口感更像全脂奶酪酱的味道和/或香气和/或口感。此外, 没有来自所述组合物的酵母气味被引入食品。